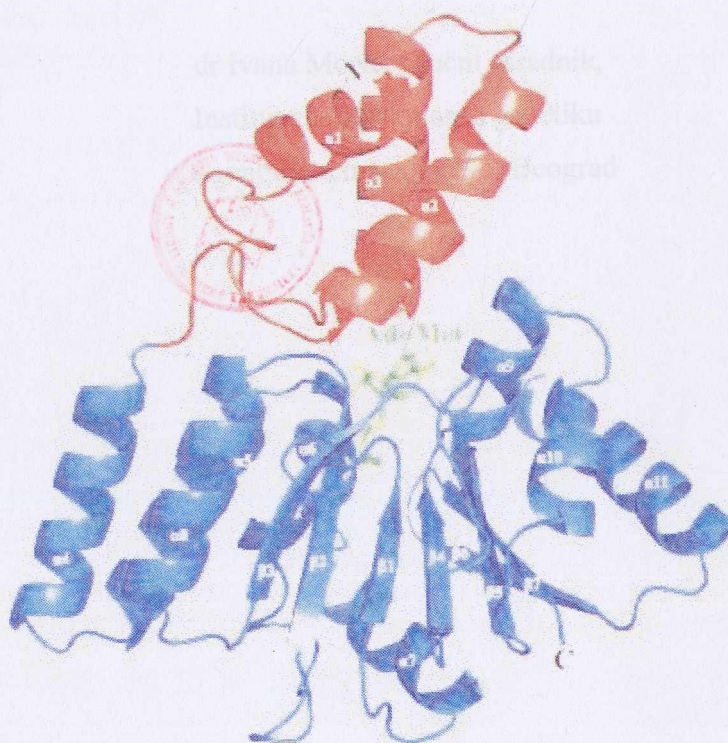


PA 20725

11p 3701471

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

IZUČAVANJE TRANSLACIONE
AUTOREGULACIJE *sgm* GENA *in vitro*



TATJANA ILIĆ-TOMIĆ

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2010

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
И. Бр. 161285



ČLANOVI KOMISIJE:

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo, Beograd

dr Jelena Lozo, docent,
Biološki fakultet, Beograd

dr Ivana Morić, naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo, Beograd

Ovaj rad je realiziran u Laboratoriju za molekularnu genetiku i genomiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod rukovodstvom dr. Branka Vasiljević. Ovim prilikom želim se najprije zahvaliti na pruženoj pomoći toj mom izučavaču i piscu ovog rada, kao i na inspirativnim sugovornim prilikom analize dobijenih rezultata.

Veliku zahvalnost dugujem dr. Ivani Marić na svim vrstama i podlici toj mom eksperimentalno izučavaču rada kao i na kritičkoj oceni toj mom prijatelju: ova tekst.

Dr. Jelena Lobo se zahvaljujem na kritičkoj oceni i ovoj radu.

Svojim kolegama iz laboratorije Nadi, Lidi, Tanji, Janji se najtoplije zahvaljujem na svakoj vrsti pomoći i lepoj atmosferi ispunjenoj uzajamnom i stalnom u kojoj je bilo zadovoljavajuće raditi.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj kolegici i prijateljici Sašici Vojnović na svakoj vrsti pomoći i stalnom podstraku da istrajam u teškim trenucima. Dragi mi je što imam sa njom debite u budućnosti i nastaviti u otkrivanju i tumačenju rezultata.

Moim članovima porodice na molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo se zahvaljujem na prijateljskoj i mladačkom atmosferi koja ovaj institut čini jedinstvenim prijateljskim mestom za rad.

Hvala vam mojim prijateljima na podršci i volenosti prema ovom radu.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici jer su svojim pažnjom, podrškama i ljubavlju doprineli da ovaj rad privodim kraju.

I konačno, ostaje mi da se zahvalim svojim prijateljima i kolegama na svakoj vrsti pomoći i stalnom podstraku da istrajam u teškim trenucima. Dragi mi je što imam sa njima debite u budućnosti i nastaviti u otkrivanju i tumačenju rezultata.

MOJOJ PORODICI

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku aktinomiceta, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod rukovodstvom dr Branke Vasiljević. Ovom prilikom želim da joj se zahvalim na pruženoj pomoći tokom izrade i pisanja ovog rada, kao i na inspirativnim sugestijama prilikom analize dobijenih rezultata.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ivani Morić na svim savetima i podršci tokom eksperimentalne izrade rada kao i na kritičkoj oceni tokom pisanja ove teze.

Dr. Jelena Lozo se zahvaljujem na kritičkom čitanju i oceni ovog rada.

Svojim kolegama iz laboratorije Nadi, Lidiji, Tanji, Sanji se najtoplije zahvaljujem na svakoj vrsti pomoći i lepoj atmosferi ispunjenoj muzikom i smehom u kojoj je bilo zadovoljstvo raditi.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj kolegici i prijateljici Sandri Vojnović na velikoj pomoći i stalnom podstreku da istrajem u teškim trenucima. Drago mi je što sam sa njom delila uzbudljive trenutke u iščekivanju i tumačenju rezultata .

Svim članovima Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo se zahvaljujem na prijateljskoj i mladalačkoj atmosferi koja ovaj institut čini jedinstveno prijatnim mestom za rad.

Hvala svim mojim prijateljima na podršci i interesovanju za moj rad.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici jer su svojom pažnjom, podrškom i ljubavlju doprineli da ovaj rad privedem kraju.

I konačno, ostaje mi da se zahvalim svom suprugu Nenadu i svojoj najvećoj inspiraciji Maši bez čije podrške i razumevanja ovaj rad ne bi ugledao svetlost dana.

APSTRAKT

Proizvođač aminoglikozidnog antibiotika G-52, *Micromonospora zionensis* poseduje *sgm* (sisomicin-gentamicin metilaza) gen koji kodira 16S rRNK metiltransferazu čijom se aktivnošću ostvaruje rezistencija na 4,6 disupstituisane aminoglikozidne antibiotike. Na osnovu rezultata dobijenih *in vivo* korišćenjem *sgm-lacZ* genskih i operonskih fuzija, u heterologom domaćinu *E. coli*, postavljena je hipoteza o translacionoj autoregulaciji *sgm* gena. Hipoteza se zasniva na činjenici da je potreno malo molekula Sgm metiltransferaze u ćeliji za potpunu modifikaciju ribozoma i da se ovaj enzim vezuje za sopstvenu iRNK sprečavajući dalju inicijaciju translacije kada su svi ribozomi metilovani.

In vitro analiza translacione autoregulacije *sgm* gena je urađena u cilju razrešenja mehanizma interakcije Sgm protein-sopstvena iRNK. U tu svrhu, Sgm protein je eksprimiran i prečišćen metal afinitetnom hromatografijom. Metilacionim esejom je indirektno pokazano da je mesto delovanja Sgm metiltransferaze G1405 u 16S rRNK. Rekombinantni Sgm protein je korišćen u vezivanju za regulatorne regione u 5' UTR *sgm*- iRNK molekula u EMSA eksperimentima. Takođe je korišćen u „toeprint“ esejima da bi se determinisao mehanizam translacione represije. Ovi rezultati su pokazali da Sgm protein ne poseduje visok afinitet i specifičnost za sopstvenu iRNK, što je navelo na zaključak da je mehanizam dejstva mnogo složeniji od onog iznetog u hipotezi. Takođe, učinjen je pokušaj da se translaciona represija dokaže u „cell free“ sistemu *E. coli* za *in vitro* transkripciju i translaciju. Pokazano je da se *sgm* eksprimira u ovakvom sistemu samo ukoliko je pod kontrolom T5 promotora i signala za inicijaciju translacije (RBS i ATG) iz samog ekspresionog vektora pQE 30.

Ključne reči: translaciona autoregulacija, Sgm metiltransferaza, rezistencija, 16S rRNK

ABSTRACT

In *Micromonospora zionensis*, a producer of G-52 antibiotic, the *sgm* gene encodes 16S rRNA methyltransferase and thus provide resistance against 4,6-disubstituted aminoglycosides antibiotics.

The hypothesis of autoregulation of the *sgm* gene expression at the translational level, was proposed according to *in vivo* results, obtained by using *sgm-lacZ* gene and operon fusions, in heterologous host such as *E. coli*. The hypothesis is based on the fact that a relatively few molecules of enzymes are sufficient for complete modification of the target (i.e., 16S rRNA). When all ribosomes are protected, unnecessary translation is prevented by binding to its own mRNA.

In order to resolve the mechanism of the Sgm protein-mRNA interaction, *in vitro* analysis of translational autoregulation of the *sgm* gene was performed. For that purpose, recombinant Sgm protein was expressed and purified by metal-affinity chromatography. It was shown in *in vitro* methylation assay, that Sgm methyltransferase acts at the residue G1405 within 16S rRNA. Recombinant Sgm protein was used in binding reactions with regulatory regions within its own mRNA, in mobility shift assays. Also, purified Sgm was used in toeprint assays in order to determine the mechanism of translational repression. The obtained results demonstrated that Sgm does not have high affinity for its own mRNA as well as that the mechanism of regulation of the *sgm* gene is more complex than in previously proposed hypothesis. Furthermore, the *E. coli* „cell free“ system for coupled *in vitro* transcription and translation was used in analysis of regulation of the *sgm* gene. It was shown that *sgm* expression is possible only under control of T5 promoter and signals for initiation of translation from the commercial vector pQE 30.

Key words: translational autoregulation, Sgm methyltransferase, resistance, 16S rRNA

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA TRANSLACIONOM NIVOU	1
1.1. INICIJACIJA TRANSLACIJE I STRUKTURA iRNK	1
1.2. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA TRANSLACIONOM NIVOU PROTEINSKIM FAKTORIMA.....	2
1.2.1. PROTEINI KAO AKTIVATORI TRANSLACIJE	2
1.2.2. PROTEINI KAO REPRESORI TRANSLACIJE.....	3
1.2.3. MEHANIZMI REPRESIJE TRANSLACIJE POSREDOVANI PROTEINIMA	4
<i>Regulacija ekspresije treonil-tRNK sintetaze</i>	<i>4</i>
<i>Regulacija ekspresije ribozomalnih proteina</i>	<i>5</i>
<i>S4 protein je alosterični efektor konformacije iRNK u α operonu E.coli.....</i>	<i>7</i>
<i>Regulacija ekspresije ribozomalnog proteina S15</i>	<i>9</i>
1.2.4. REGULACIJE EKSPRESIJE 16S rRNK METILTRANSFERAZA.....	9
1.3. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA NIVOU INICIJACIJE TRANSLACIJE PREKO CIS- AKTIVNIH iRNK ELEMENATA-RIBOSVIČEVI I RIBOZIMI	11
1.3.1 RIBOSVIČEVI	11
1.3.2. RNK TERMOSENZORI	14
1.3.3. RIBOZIMI.....	15
1.4. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA NIVOU INICIJACIJE TRANSLACIJE PREKO CIS- KODIRANIH ANTISENSE iRNK	15
1.5. REGULACIJA GENSKE EKSPRESIJE NA NIVOU INICIJACIJE TRANSLACIJE PREKO TRANS- KODIRANIH ANTISENSE iRNK	18
2. BAKTERIJSKI RIBOZOMI – MESTO DELOVANJA ANTIBIOTIKA	19
2.1. MESTO VEZIVANJA AMINOGLIKOZIDNIH ANTIBIOTIKA NA 30S SUBJEDINICI.....	21
3. 16S rRNK METIL-TRANSFERAZE I REZISTENCIJA NA AMINOGLIKOZIDNE ANTIBIOTIKE	24

3.1. KGM I KAM FAMILIJA METILTRANSFERAZA.....	26
3.2. ARM I PAM FAMILIJA METILTRANSFERAZA.....	29
3.3 HOUSE-KEEPING METILTRANSFERAZE I REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE	32
4. STRUKTURA I FUNKCIJA 16S RNK METILTRANSFERAZA	34
II CILJ	39
III MATERIJAL I METODE.....	40
1. BAKTERIJSKI SOJEVI I KORIŠĆENI PLAZMIDI	40
2. MEDIJUMI ZA RAST BAKTERIJA	42
3. MINI METODA ZA IZOLACIJU PLAZMIDNE DNK IZ <i>E. COLI</i>	42
4. ENZIMSKE REAKCIJE SA DNK.....	44
4.1. OBRADA DNK RESTRIKCIJONIM ENZIMIMA.....	44
4.2. DEFOSFORILACIJA 5' SLOBODNIH KRAJEVA DNK.....	44
4.3. LIGIRANJE DNK FRAGMENTA.....	44
5. PREČIŠĆAVANJE DNK FENOLOM.....	44
6. SINTEZA DNK REAKCIJOM LANČANE POLIMERIZACIJE	45
7. ELEKTROFOREZA DNK	46
8. ELEKTROELUCIJA DNK.....	47
9. TRANSFORMACIJA <i>E. COLI</i>	47
10. EKSPRESIJA I PREČIŠĆAVANJE REKOMBINANTNOG HIS ₆ - Sgm PROTEINA	49
10.1. INDUKCIJA I EKSPRESIJA REKOMBINANTNOG HIS ₆ - SGM PROTEINA.....	49
10.2. IZOLOVANJE UKUPNIH SOLUBILNIH PROTEINA IZ <i>E. COLI</i> MEHANIČKIM LOMLJENJEM U FRANCUSKOJ PRESI.....	49
10.3. PREČIŠĆAVANJE REKOMBINANTNOG HIS ₆ - SGM PROTEINA IZ <i>E. COLI</i>	50
10.4. PREČIŠĆAVANJE REKOMBINANTNOG HIS ₆ - SGM PROTEINA IZ <i>E. COLI</i> POD NATIVNIM USLOVIMA	50
10.5. DIJALIZA PROTEINA	50
11. ANALIZA PROTEINA SDS-POLIAKRILAMIDNOM GEL ELEKTROFOREZOM	51
12. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	51
13. IMUNO BLOT (WESTERN BLOT) ANALIZA PROTEINA	52

14. ISPITIVANJE INTERAKCIJE RNK I Sgm PROTEINA METODOM USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI ILI EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).....	53
14.1. PRIPREMANJE DNK MATRICE ZA <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPCiju	53
4.2. SINTEZA RNK REAKCIJOM <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPCije SA T7 RNK POLIMERAZOM.....	54
14.3. DEFOSFORILACIJA 5' KRAJA RNK MOLEKULA	54
14.4. VEZIVANJE SGM PROTEINA ZA RNK PROBU I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA KOJA DOVODI DO NASTANKA VIDLJIVOG PROTEIN-RNK KOMPLEKSA	55
14.5. VEZIVANJE PROTEINA ZA RNK U PRISUSTVU SPECIFIČNOG I NESPECIFIČNOG KOMPETITORA.....	55
15. „TOEPRINTING” ESEJ	56
15.1. RADIOAKTIVNO OBELEŽAVANJE PRAJNERA	56
15.2. „TOEPRINT” REAKCIJA	57
15.3. REAKCIJE EKSTENZIJE.....	57
15.4. DIDEOKSISEKVENCIRANJE RNK	58
16. METILACIONI ESEJ.....	60
17. IZOLOVANJE RIBOZOMA I RIBOZOMALNIH SUBJEDINICA	60
18. <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPCija I TRANSLACIJA U SISTEMU <i>E. COLI</i>	62
19. <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPCija I TRANSLACIJA U SISTEMU <i>S. LIVIDANS</i> I <i>M. ZIONENSIS</i>	62
IV REZULTATI.....	64
1. EKSPRESIJA I PREČIŠĆAVANJE Sgm PROTEINA IZ <i>E. COLI</i>	64
2. METILACIJA 30S RIBOZOMALNIH SUBJEDINICA I MESTO METILACIJE Sgm PROTEINA.....	66
3. ISPITIVANJE INTERAKCIJE RNK I Sgm PROTEINA <i>IN VITRO</i> METODOM USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI ILI EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).....	68
3.1. VEZIVANJE SGM PROTEINA ZA RNK PROBU	68
3.2. VEZIVANJE SGM PROTEINA ZA SOPSTVENU SGM IRNK DUŽINE 48 NT U PRISUSTVU SPECIFIČNOG I NESPECIFIČNOG KOMPETITORA.....	70
3.3. VEZIVANJE SGM PROTEINA ZA <i>PBLU</i> IRNK U PRISUSTVU SPECIFIČNOG I NESPECIFIČNOG KOMPETITORA.....	72

3.4. VEZIVANJE SGM PROTEINA ZA <i>P1-SGM</i> IRNK I <i>P2-SGM</i> IRNK U PRISUSTVU S-ADENOZIL-METIONINA (SAM)	75
3.5. VEZIVANJE SGM PROTEINA ZA <i>P1-SGM</i> IRNK DUŽINE 159 NT U PRISUSTVU S-ADENOZIL-HOMOCISTEINA (SAH)	79
4. ISPITIVANJE INTERAKCIJE RNK I <i>Sgm</i> PROTEINA „TOEPRINT“ METODOM	81
5. METILACIJA <i>IN VITRO</i> SINTETISANIH <i>sgm</i> IRNK.....	85
6. ISPITIVANJE NEGATIVNE AUTOREGULACIJE <i>sgm</i> GENA U SISTEMU ZA <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPCIJU I TRANSLACIJU <i>E. COLI</i>	86
6.1. <i>IN VITRO</i> TRANSLACIJA SA CIRKULARNIH DNK MATRICA.....	86
6.2. <i>IN VITRO</i> TRANSLACIJA SA IRNK I DNK MATRICA KOJIMA JE DODATA T7 RNK POLIMERAZA	89
6.3. <i>IN VITRO</i> TRANSLACIJA SGM, KGMB I GRM METILTRANSFERAZA I PROVERA EKSPRESIJE WESTERN BLOT EKSPERIMENTOM.....	90
6.4. <i>IN VITRO</i> TRANSLACIJA SGM METILAZE SA T5 PROMOTORA I PROVERA EKSPRESIJE WESTERN BLOT EKSPERIMENTOM	91
7. ISPITIVANJE NEGATIVNE AUTOREGULACIJE <i>sgm</i> GENA U SISTEMU ZA <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPCIJU I TRANSLACIJU <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> I <i>MICROMONOSPORA MELANOSPORA</i>	95
V DISKUSIJA	98
VI ZAKLJUČCI.....	116
VII REFERENCE.....	117

I UVOD

1. Regulacija genske ekspresije na translacionom nivou

Kao odgovor na promene u uslovima rasta ili pak zbog specifičnih potreba na datom stupnju životnog ciklusa bakterije i bakteriofazi su razvili izuzetno sofisticirane mehanizme za prilagođavanje nivoa genske ekspresije. Iako je transkripcija osnovni nivo regulacije genske ekspresije kod ovih organizama, u poslednje vreme je otkriven veći broj gena koji su regulisani i na translacionom nivou. Glavna kontrola se odvija na nivou inicijacije translacije preko tri različita mehanizma koji se oslanjaju na *trans*-aktivne proteine, *cis*-aktivne iRNK elemente ili *trans*-aktivne RNK koji imaju ulogu senzora za fizičko i hemijsko stanje ćelije (termosenzori ili ribosvičevi, eng. - riboswitch).

1.2. Regulacija genske ekspresije proteinskim faktorima na

1.1. Inicijacija translacije i struktura iRNK

Efikasnost inicijacije translacije i njena regulacija strogo su korelisani sa strukturom mesta vezivanja ribozoma (*eng.* - ribosome binding site - RBS). Kod prokariota, inicijacija translacije uključuje vezivanje 30S subjedinice ribozoma i tRNK^{fmet} za iRNK, i formiranje preinicijacionog trokomponentnog kompleksa. Preinicijacioni kompleks zatim prolazi kroz proces izomerizacije kada se formira stabilan inicijacioni kompleks (Gualerzi and Pon, 1990). Postoje dve primarne interakcije između iRNK i 30S subjedinice: vezivanje ribozomalnog S1 proteina za iRNK i interakcija Shine-Dalgarno (SD) sekvence sa iRNK i rRNK. Za obe interakcije neophodno je da iRNK bude nestruktuirana tj. jednolančana (Draper, *et al.*, 1987). Formiranje sekundarnih struktura u RBS (ribosome binding site) može da snizi efikasnost translacije preko kompetitivnog mehanizma, po kom *cis*-iRNK sekvence kompetiraju sa 30S subjedinicom za vezivanje za RBS mesta i stvaraju neaktivne komplekse. U radu sa različitim varijantama sekvenci RBS gena za omotač faga MS2 pokazana je korelacija između termodinamičke



stabilnosti RBS strukture i efikasnosti translacije (de Smit and van Duin, 1993, 1994). Sekvence sa manje baznih sparivanja i stoga manjom termodinamičkom stabilnošću se bolje eksprimiraju nego sekvence sa dužim sparivanjem i većom termodinamičkom stabilnošću. Takođe, pokazano je da kinetika savijanja iRNK reguliše inicijaciju translacije. iRNK za maturacioni protein faga MS2 sadrži lider sekvencu savijenu u obliku lista deteline koja inhibira inicijaciju translacije. Regulacija ovakvog sistema je pod kinetičkom kontrolom, tj. stopa formiranja lista deteline je sporija od stope formiranja inicijacionog kompleksa što rezultira efikasnom inicijacijom translacije (Poot, *et al.*, 1997). Do kašnjenja u formiranju strukture u vidu lista deteline dolazi zbog formiranja meta-stabilnog intermedijera koji obrazuje malu ukosnicu koja sprečava sparivanje uzvodnih komplementarnih iRNK sekvenci sa RBS sekvencom (van Meerten, *et al.*, 2001).

1.2. Regulacija genske ekspresije proteinskim faktorima na translacionom nivou

1.2.1. Proteini kao aktivatori translacije

Translaciona regulacija posredovana proteinima aktivatorima je ređe opisana u literaturi u odnosu na proteine represore. Jedan od dobro izučenih primera je BipA protein iz *E. Coli*, aktivator translacije Fis proteina koji je transkripcioni modulator (Owens *et al.*, 2004). Fis protein ima ključnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima tako što stabilizuje lokalnu DNK arhitekturu promotora target gena i na taj način stimuliše ili reprimira transkripciju, zavisno o kom se genu radi. (Schneider *et al.*, 2001). BipA protein poseduje GTPaznu aktivnost kada je vezan za ribozom i aktivira translaciju *fis* iRNK destabilizujući jake sekundarne strukture u okviru RBS.

1.2.2. Proteini kao represori translacije

Svi organizmi poseduju gene koji se eksprimiraju tokom odgovora na stres. U uslovima stresa sinteza proteina je limitirana zato što se ribozomi održavaju u neaktivnom stanju koje može brzo biti promenjeno kad nastupi period povoljan za ćeliju.

Kod *E. coli* stres izazvan niskim temperaturama dovodi do indukcije proteina Y, opšteg translacionog represora koji se eksprimira u uslovima stresa kada sinteza velikog broja proteina mora biti ukinuta. On se vezuje za 30S ribozomalnu subjedinicu tako da blokira A (aminoacil) i P (peptidil) mesta čime se inaktivira ceo ribozom.

Većina okarakterisanih regulacija na nivou translacije posredovanih proteinima kod *E. coli* funkcioniše po principu negativne povratne sprege: protein se veže za sopstvenu iRNK i tako onemogućava translaciju. Ovo je slučaj za većinu ribozomalnih proteina (r-proteina) i cilj regulacije je da spreči nagomilavanje slobodnih r-proteina u ćeliji. R-proteini se često sintetišu sa dugih operona. Jedan cistron operona kodira r-protein koji se primarno veže za rRNK a zatim i svoju sopstvenu iRNK onemogućavajući translaciju. Vezivanje za sopstvenu iRNK se odigrava na translacionom operatoru koji je najčešće lociran u blizini RBS mesta prvog cistrona. Inhibicija translacije prvog cistrona se prenosi na nizvodne gene preko translacionog sparivanja (Dean *et al.*, 1981; Mattheakis and Nomura, 1988). Sama sinteza r-proteina je povezana sa sintezom rRNK; ukoliko dođe do povećane sinteze rRNK u ćeliji svi slobodni regulatorni r-proteini biće vezani što direktno dovodi do derepresije sinteze r-proteina.

Kod *Bacillus subtilis* TRAP protein (*trp* RNA-binding attenuation protein) koga kodira *mtrB* gen iz *mtr* operona pored toga što dovodi do atenuacije transkripcije triptofanskog operona (*trp*) nakon promene intracelularne koncentracije triptofana (Babitzke and Gollnick, 2001), ima i funkciju translacionog represora gena triptofanskog operona (*trpE*, *trpG*, *trpP*). Funkciju represora ostvaruje ili vezivanjem za udaljene uzvodne regione iRNK ispred *trpE*, dovodeći do strukturnog rearanžmana iRNK i blokiranja RBS mesta (Du *et al.*, 1998), ili direktnim vezivanjem za devet ponovaka trinukleotida prisutnih u *trpG* transkriptu blokirajući pristup ribozomima ispred *trpG* i

trpP gena (Du *et al*, 1997). TRAP protein se inaktivira interakcijom sa Anti-TRAP proteinom koji je kodiran *rtpA* genom. Ovaj gen je regulisan na nivou inicijacije translacije zavisno od količine šaržirane tRNK^{trp} u ćeliji. Za ovu regulaciju je odgovoran lider peptid dug 10 aminokiselina, kodiran od strane *rtpLP* gena, prethodnice RBS sekvence *rtpA* gena. Kompletna translacija lider peptida pozicionira ribozom na stop kodon *rtpLP* gena čime se blokira RBS sekvenca *rtpA* gena i onemogućava translacija Anti-TRAP proteina. Ukoliko je šaržirana tRNK^{trp} u ćeliji deficitarna, ribozom će se zaustaviti na jednom od tri *trp* kodona iz lider peptida, što će sprečiti inhibiciju translacije *rtpA* gena (Chen and Yanofski, 2004).

1.2.3. Mehanizmi represije translacije posredovani proteinima

Do sada su okarakterisana dva mehanizma represije translacije (Draper, 1998). Prvi mehanizam, mehanizam „izmeštanja” (eng. – displacement) ili mehanizam kompeticije, uključuje kompeticiju između 30S subjedinice i sekundarne *cis*-aktivne iRNK strukture, ili 30S subjedinice i *trans*-aktivnog regulatornog faktora za vezivanje za RBS mesta na iRNK. Po drugom mehanizmu represije, mehanizmu „klopke” (eng. – entrapment), *cis*-aktivna sekvenca na iRNK ili represor ne sprečavaju interakciju 30S subjedinice sa RBS već inhibiraju izomerizaciju u stabilni inicijacioni kompleks.

Represija putem kompeticije najbolje može biti opisana na primeru treonil-tRNK sintetaze kao i brojnim primerima regulacije ekspresije ribozomalnih proteina.

Regulacija ekspresije treonil-tRNK sintetaze

Regulacija translacije treonil-tRNK sintetaze (ThrRS) se javlja kada je ThrRS prisutna u suvišku i dostupna za vezivanje za iRNK. Vezivanje enzima za sopstvenu iRNK fizički onemogućava 30S subjedinicu da se veže za RBS mesto. Po kompetitivnom modelu translacione regulacije povećana ekspresije sintetaze je rezultat ili povećane koncentracije ribozoma ili smanjene koncentracije ThrRS dostupne za vezivanje za RBS

na iRNK. Povećana koncentracija ribozoma brzo rezultira u povećanoj stopi formiranja inicijacionog kompleksa i povećanoj ekspresiji *thrS* iRNK. Dodatno, povećana ekspresija tRNK^{Thr} uzrokuje aktivaciju ThrRS ekspresije (Comer *et al.*, 1996) što je rezultat kompeticije između *thrS* iRNK i tRNK^{Thr} za vezivanje za ThrRS. Manja koncentracija slobodnog represora usporava ireverzibilnu asocijaciju represora i iRNK, rezultujući u povećanoj frakciji iRNK koja učestvuje u inicijaciji translacije.

Treonil-tRNK (ThrRS) sintetaza *E. coli* reprimira sopstvenu ekspresiju vezivanjem za operator koji je pozicioniran u lideru sopstvene *thrS* iRNK, i inhibira inicijaciju translacije tako što kompetira sa 30S ribozomalnim subjedinicama za vezivanje (Moine, *et al.*, 1990). U regulaciju ovog gena je uključena izuzetno specifična iRNK struktura. Pokazano je da u operatoru postoje 4 strukturna domena. Domen 1 je jednolančan i nosi RBS i inicijacioni kodon, domen 3 je takođe jednolančan i povezuje dve sekundarne strukture u vidu ukosnice, tj. povezuje domene 2 i 4 koji nose sekvencu analognu sekvenci u antikodonskoj petlji tRNK^{Thr}. Translacija je reprimirana nakon vezivanja ThrRS, koja prepoznaje domene 2 i 4 u iRNK od kojih svaki imitira antikodon ručicu tRNK^{thr} (Springer *et al.*, 1998). Bilo koji domen, izolovan od ostatka iRNK se ponaša kao kompetitivni inhibitor aminoaciklacije koju vrši sintetaza, što ukazuje da antikodonski domen kao i izolovana iRNK se vezuju za isto mesto na proteinu ThrRS. Oba domena sadrže petlju koja je ista kao i antikodonska petlja što je bitno za regulaciju. ThrRS je homodimer, a svaka njena jedinica je sposobna da veže pojedinačne tRNK^{Thr} molekule ili jedan od domena u iRNK koji liči na tRNK antikodon domen (Romby *et al.*, 1992). Takođe, razrešene kristalne strukture ThrRS vezane za tRNK (Sankaranarayanan *et al.*, 1999) ili vezane za iRNK operator (Torres-Larios *et al.*, 2002) pokazuju da su oba RNK molekula prepoznata na sličan način. "Mimikrija" domena na iRNK molekulu koji liče na tRNK^{Thr} se razvila kao efikasna strategija za prepoznavanje represora.

Regulacija ekspresije ribozomalnih proteina

Ribozomalni protein L20 iz *E. coli* je bitan ne samo za sklapanje 50S ribozomalne subjedinice već ima i ulogu translacionog represora sopstvenog *rpmI-rplT* operona. Ovaj

operon kodira dva ribozomalna proteina L35 i L20. Kada je prisutan u suvišku protein L20 direktno reprimira translaciju prvog cistrona *rpmI* koji kodira L35 protein (Lesage *et al.*, 1990). Ova inhibicija se zatim prenosi preko translacionog sparivanja na drugi cistron *rplT* koji kodira L20 protein (Lesage *et al.*, 1992). Translacioni operator ovog operona je dug preko 450 nt i savijen je u kompleksnu sekundarnu strukturu pseudočvora koja se formira između dve primarne iRNK sekvence koje su međusobno udaljene 280 nt (Chiaruttini *et al.*, 1996). L20 se kao monomer vezuje ne samo za pseudočvor, već i za centralni deo nepotpune sekundarne strukture u vidu ukosnice koja se nalazi uzvodno od *rpmI*. Pokazano je da su mesta vezivanja L20 proteina u interakciji (Allemand *et al.*, 2007). Obe strukture su neophodne za regulaciju, mada svaka može nezavisno vezivati L20 protein (Guillier *et al.*, 2005b). Na taj način se onemogućava pristup 30S ribozomalnim subjedinicama čime je blokirana translacija oba proteina.

Prepoznavanje regulatornih struktura od strane L20 je slično prepoznavanju H40-H41 veze u 23S rRNA od strane istog proteina, tj. postoji molekularna „mimikrija” po kojoj sekundarne strukture unutar iRNK oponašaju sekundarne strukture u 23S rRNK. Hipoteza „mimikrije” može da objasni kako kompeticija između rRNK i iRNK za vezivanje za ribozomalne proteine garantuje koordinisanu ekspresiju ribozomalnih proteina kao odgovor na nivo rRNK u ćeliji. (Guillier *et al.*, 2005a).

Na sličan način je regulisana sinteza ribozomalnog proteina L1 u *E. coli*. Mesto vezivanja ovog proteina za sopstvenu iRNK nalazi se unutar lider regiona u blizini RBS sekvence L11 operona koji kodira dva r-proteina L1 i L11 (Gourse *et al.*, 1986). Protein prepoznaje isti specifični strukturni motiv u svojim ciljnim mestima kako na sopstvenoj iRNK tako i na 23S rRNK (Nevskaya *et al.*, 2005).

Kod *E. coli*, *spc* operon kodira 11 ribozomalnih proteina i SecY protein uključen u sekreciju (Zengel and Lindahl, 1994). Translacija ovog operona je autoregulisana od strane proteina S8 koji ima ulogu translacionog represora, a sam S8 je kodiran petim cistronom ovog operona. Mesto vezivanja S8 na iRNK je specifična sekundarna struktura u blizini starta translacije trećeg cistrona koji kodira r-protein L5. Vezivanjem proteina

S8 za iRNK dolazi do represije translacije nizvodnih cistrona, dok prvi i drugi uzvodni cistron bivaju inaktivirani degradacijom 5' fragmenta (Mattheakis *et al.*, 1989)

Ribozomalni protein S1 je najveći i najduži r-protein. Za razliku od ostalih r-proteina koji se primarno vezuju za 16S ili 23S rRNK tokom sklapanja subjedinica, S1 protein se vezuje u kasnijim fazama sklapanja preko protein-protein interakcija. U ćeliji je odgovoran za vezivanje ribozoma za iRNK kao i za regulaciju sopstvene sinteze delujući kao translacioni represor (Boni *et al.*, 2000). S1 ne poseduje klasičnu RBS sekvencu u okviru translacionog inicijacionog regiona. Ovaj region je savijen u tri sekundarne strukture u vidu ukosnice međusobno odvojene jednolančanim A/U bogatim regionima. Represiju sopstvene sinteze S1 protein ostvaruje vezujući se za A/U bogate jednolančane regione čime se menja i narušava konformacija u 5'UTR i na taj način sprečava formiranje inicijacionog kompleksa iRNK i 30S subjedinice (Boni *et al.*, 2001).

Protein S2 takođe ima ekstraribozomalnu funkciju u *E. coli* kao translacioni represor sopstvenog operona *rpsB-tsf*. Za vezivanje ovog proteina za sopstvenu iRNK, odgovorne su dve sekundarne strukture u vidu ukosnice u 5'UTR *rpsB* gena. Represija prvog cistrona dovodi do reprimiranja nizvodnog cistrona *tsf*. U *in vivo* eksperimentima je pokazano da za razliku od ostalih r-proteina, S2 svoju funkciju translacionog represora ispoljava zajedno sa S1 r-proteinom. Ukoliko su S1 i S2 prisutni u suvišku u odnosu na ribozome, u ćeliji prvo dolazi do formiranja kompleksa S1-S2, a zatim kompleks ima ulogu represora sopstvenog operona (Aseev *et al.*, 2008).

Represija mehanizmom "klopke" je najbolje opisana na primeru ribozomalnih proteina S4 i S15.

S4 protein je alosterični efektor konformacije iRNK u α operonu *E. coli*

Ekspresija ribozomalnih proteina iz α operona *E. coli*, koji kodira S13, S11, S4, α subjedinicu RNK polimeraze kao i ribozomalni protein L17, je regulisana na translacionom nivou vezivanjem S4 proteina za α iRNK, što dovodi do njene



konformaciona promene. Gen za α subjedinicu RNK polimeraze je lociran između gena za proteine S4 i L17 i regulisan je nezavisno od njih, najverovatnije na nivou translacije iRNK. Ulogu translacionog represora protein S4 ostvaruje vezivanjem za strukturu pseudočvora koja se formira u prvih 127 nukleotida transkripta koji okružuju RBS prvog gena (S13) u operonu (Deckman and Draper 1987; Deckman *et al.*, 1987). Potom 16S rRNK i pseudočvor iRNK α operona kompetiraju za vezivanje za slobodan S4, mada nema očiglednih sličnosti u strukturama RNK. Struktura 5'UTR sekvence je vrlo važna za regulaciju sopstvene ekspresije. Mutacija RBS sekvence kao i delecije uzvodnog regiona koji je neophodan za formiranje stukture pseudočvora, utiču na efikasnost translacije, tako što aktivno utiču na sekundarnu ili tercijarnu strukturu iRNK.

Ekperimentalno je pokazano da su dve različite strukture iRNK uključene u mehanizam represije: I) aktivna frakcija iRNK koja odmah može da veže tRNK^{Met} i formira inicijacioni kompleks i II) neaktivna frakcija iRNK koja odmah vezuje S4 represor ali ne i inicijatorsku tRNK (Spedding and Draper, 1993, Spedding, *et al* 1993). Vezivanjem za jednu od iRNK konformacija, protein S4 ima ulogu alosteričkog efektor a iRNK strukture, utičući na distribuciju aktivne i neaktivne forme (Tang and Draper, 1990). Prisustvo S4 represora u suvišku koji ne učestvuje u sklapanju ribozoma moduliše distribuciju aktivne i neaktivne iRNK konformacije. Obe ove strukture su sposobne da vežu 30S subjedinice što govori u prilog tome da S4 i 30S prepoznaju različite karakteristike na iRNK. Bitna karakteristika iRNK za 30S subjedinicu je dostupnost RBS sekvence koja je podjednako dostupna i kod aktivne i kod neaktivne forme iRNK. U α operonu, S4 reprimira translaciju operona zarobljavajući 30S na iRNK. Indukcija se može desiti ukoliko S4 disosuje a iRNK se promeni iz neaktivne u aktivnu konformaciju.

Ključna komponenta mehanizma "klopke" je postojanje stabilnog trokomponentnog kompleksa koji se sastoji od neaktivne iRNK, 30S i translacionog represora. Ovaj kompleks se ne formira sa iRNK koja zauzima strukturu aktivne forme (Schlax, 2001). Mogućnost disocijacije pomenutog trokomponentnog kompleksa bilo dodavanjem u suvišku neobeleženog S4, bilo dodavanjem RNK fragmenata za koje se S4 specifično vezuje, kao i nemogućnost njegove disocijacije nakon dodavanja aktivne forme α iRNK, sugeriše da je vezivanje S4 proteina i 30S subjedinice za neaktivnu

konformaciju kooperativno. Prisustvo ovog trokomponentnog kompleksa je direktan dokaz koji podržava “klopka” mehanizam represije.

Regulacija ekspresije ribozomalnog proteina S15

Drugi primer za mehanizam “klopke” je autoregulacija r-proteina S15 iz *E. coli*. Kada je prisutan u suvišku u odnosu na rRNK S15 protein reprimira translaciju sopstvene iRNK tako što vezuje i stabilise motiv u 5'UTR iRNK koji ulazi u strukturu pseudočvora (Ehresmann *et al.*, 2004). U odsustvu S15 proteina, iRNK može da formira strukturu pseudočvora ili dvostuke ukosnice u kojima je RBS sekvenca sakrivena. Ribozom se vezuje jedino za konformaciju iRNK čiji 5'UTR formira strukturu pseudočvora (Philippe *et al.*, 1993).

Determinisanje precizne pozicije operator-represor kompleksa na ribozomu objašnjava kako kompleks iRNK-S15 vrši represiju translacije (Marzi *et al.*, 2007). Naime, kod aktivnog inicijacionog kompleksa i u odsustvu S15, iRNK poprima jednolančanu konformaciju u iRNK tunelu čime je obezbeđeno prisustvo inicijacionog kodona u P mestu (Yusupova *et al.*, 2001). U slučaju zaustavljenog preinicijacionog kompleksa, kodon AUG, inicijator translacije, je lociran uz RBS sekvencu u neposrednoj blizini strukture pseudočvora i nalaze se na ribozomalnoj platformi - univerzalnom mestu na 30S subjedinici odgovornom za vezivanje regulatornih elemenata u 5'UTR iRNK. Kao posledica toga, 3' kraj iRNK ostaje na površini ribozoma, ne ulazi u iRNK tunel i onemogućava interakciju inicijatorske tRNK sa start kodonom držeći ga na većoj udaljenosti od P mesta. Prema tome, S15 ispoljava svoju inhibitornu funkciju tako što sprečava rasplitanje strukture pseudočvora i ulazak iRNK u tunel. Na taj način S15 blokira tranziciju preinicijacionog kompleksa u aktivan inicijacioni kompleks (Marzi *et al.*, 2007).

1.2.4. Regulacije ekspresije 16S rRNK metiltransferaza

U literaturi su do sada opisana četiri primera autoregulacije bakterijskih metiltransferaza na nivou inicijacije translacije: *ksgA* gen za 16S rRNK adenozin

dimetiltransferazu (van Gemen *et al.*, 1989), *ermC* gen za 23S rRNK adenzin dimetiltransferazu (Denoya *et al.*, 1986; Breidt and Dubnau, 1990), *kgmB* gen za 16S rRNK guanozin metiltransferazu (Vajic *et al.*, 2004) i *sgm* gen za 16S rRNK guanozin metiltransferazu (Kojic *et al.*, 1996).

Transkripciono-translacioni eseji i analiza ekspresije fuzija KsgA metiltransferaze sa *lacZ* genom su pokazali da se metiltransferaza istim afinitetom vezuje za 16S rRNK i sopstvenu iRNK. Region u iRNK koji ova metiltransferaza prepoznaje obuhvata 200 nt ispred i 200 nt iza AUG start kodona. Ispred start kodona na udaljenosti od 90 nt u iRNK se nalazi sekundarna struktura. Između ovog fragmenta na iRNK i regiona u okviru 16S rRNK koji ova metiltransferaza prepoznaje postoji strukturna homologija

Translaciona autoregulacija je prisutna i kod *ermC* gena iz soja *Staphylococcus aureus* (Denoya *et al.*, 1986; Breidt and Dubnau, 1990). Ovaj gen kodira metiltransferazu koja dimetiluje adenzin na poziciji 2058 u okviru 23S RNK, čime obezbeđuje rezistenciju na eritromicin. *ErmC* iRNK postoji u dve alternativne konformacije, aktivnoj i neaktivnoj. U neaktivnoj konformaciji RBS-2 je zarobljen u petlji koju obrazuju odgovarajući invertovani ponovci, a vreme poluživota takve iRNA je 2-3 minuta. Sa neaktivne iRNK se prepisuje kratak lider-peptid i ako se eritromicin veže za ribosome i uzrokuje njihovo zaustavljanje tokom sinteze lider-peptida, dolazi do pregrupisanja petlji u okviru lider sekvence i aktiviranja iRNK tj. RBS-2 se oslobađa i počinje translacija kodirajuće sekvence *ermC* gena. Vreme poluživota *ermC* iRNK u aktivnoj konformaciji se produžava na 45 minuta. Indukcijom *ermC* gena dolazi do povećanja broja rezistentnih ribozoma, a budući da su za prepisivanje *ermC* gena neophodni senzitivni ribozomi, dolazi do postepenog smanjenja ekspresije *ermC* gena. Takođe, pošto na *ermC* iRNK postoji region sličan targetu za metiltransferazu na 23S rRNK, kada se mesta za metilaciju na 23S rRNK zasite, metiltransferaza se vezuje za sopstvenu iRNK i na taj način, sprečavajući translaciju, reguliše sopstvenu produkciju.

Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije je pokazana i kod *kgmB* gena iz *Streptomyces tenebrarius* (Vajić *et al.*, 2004). KgmB metiltransferaza metiluje G1405 u 16S rRNK koristeći SAM kao kofaktor (Beauclerk and Cundliffe, 1987). U *in vivo* eksperimentima je pokazano da potencijalna regulatorna sekvenca CGUCA u 5'UTR *kgmB* nije odgovorna za autoregulaciju gena, kao i to da postoji

moгуćnost da je sekvenca CGCCC, prisutna u okviru sekundarne stukture u vidu ukosnice u 5'UTR, odgovorna za autoregulaciju po uzoru na regulaciju *sgm* gena (Kojic et al., 1996). Takođe, u radu Vajic et al., 2004 se ne isključuje mogućnost da je neka dalja, uzvodnija primarna ili sekundarna struktura odgovorna za regulaciju *kgmB* gena na nivou inicijacije translacije.

1.3. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko *cis*-aktivnih iRNK elemenata - ribosvičevi i ribozimi

Za poslednjih desetak godina kod bakterija je pronađena velika raznolikost regulatornih elemenata u okviru 5' kraja iRNK koji ne zahtevaju prisustvo proteina ili *trans*-aktivnih RNK za modulaciju genske ekspresije. Ovi nekodirajući RNK regulatorni elementi pronađeni u intergenskim regionima Archaea, Eubacteria i Eukaryote (Montange and Batey, 2008). Foldovani su u kompleksne trodimenzionalne strukture koje vezuju ćelijske metabolite sa visokom specifičnošću utičući dalje na gensku regulaciju različitim mehanizmima (Barrik and Breaker, 2007). Dele se na ribosvičeve, termosenzore i ribozime. Ribosvičevi i termosenzori su u stvari *cis*-aktivni senzori smešteni u 5' UTR sopstvene iRNK koji reaguju na promene koncentracije malih metabolita u ćeliji ili na fizičke stimuluse tako što menjaju konformaciju sopstvene iRNK konformacije. Takođe, kod bakterija je pronađen i ribozim tj. RNK koja ima sposobnost samoisecanja (Winkler et al., 2004).

1.3.1 Ribosvičevi

Ribosvičevi regulišu više metaboličkih puteva uključujući biosintezu i transport vitamina (riboflavin, tiamin i kobalamin), metabolizam metionina, lizina i purina. S obzirom da su ribosvičevi visoko konzervisani, pronađeni kod arhea i eukariota, a kako ne zahtevaju dodatne faktore za svoju funkciju u genskoj regulaciji, smatra se da su jedan od najstarijih regulatornih sistema. U slučaju represije genske ekspresije, formiranje



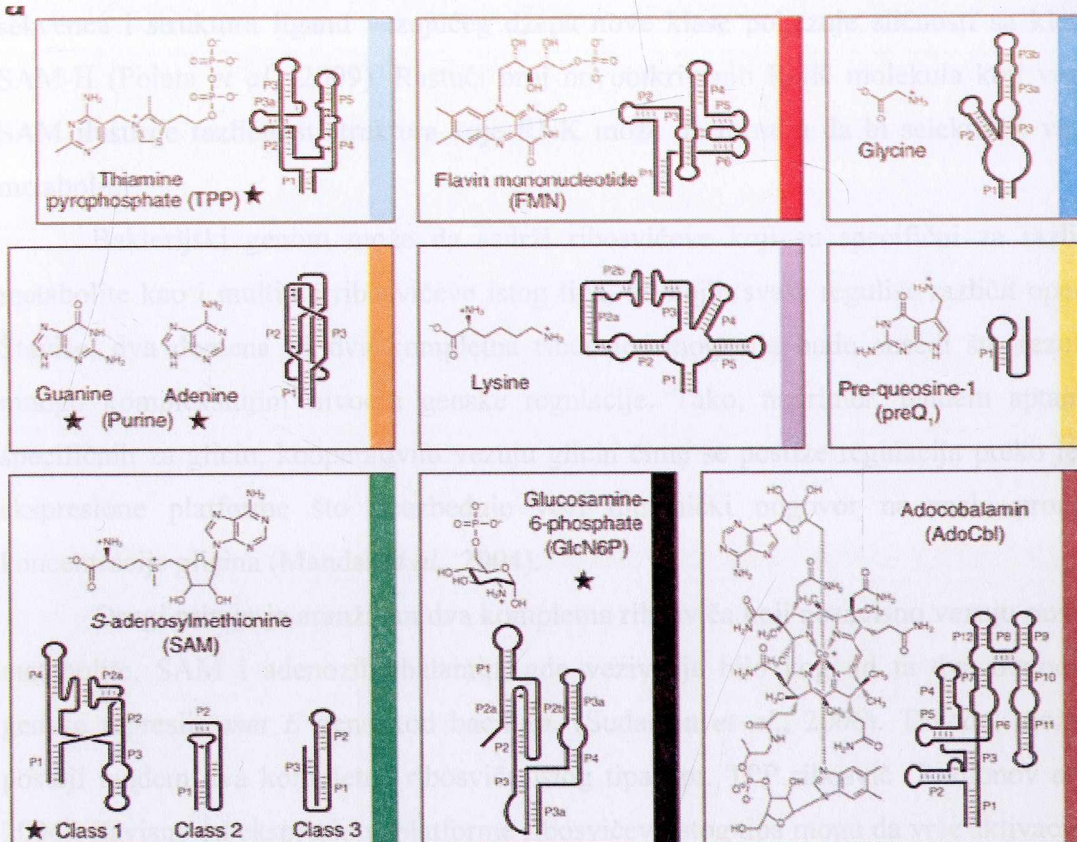
alternativnih iRNK struktura dovodi do prevremene terminacije transkripcije (Mandal and Breaker, 2004) ili inhibicije inicijacije translacije (Fuchs *et al.*, 2006).

Ribosvič je preovlađujući mehanizam regulacije genske ekspresije kod bakterija, najmanje 2% gena je regulisano na taj način (Mandal *et al.*, 2003). Čelije prepoznaju sopstvene metaboličke potrebe i mogu da modulišu i koordinišu nivo ekspresije grupe gena u datom trenutku. Sistem za detekciju nivoa nekog metabolita - ribosvič- je u stvari RNK-bazirani regulatorni mehanizam gde 5' UTR bakterijske iRNK za određeni metabolit, vezuje taj metabolit, čime se menja konformacija senzora što dalje utiče na regulaciju nizvodnih gena (Winkler and Breaker, 2005; Gilbert and Batey, 2006). Ribosvičevi funkcionišu po principu povratne sprege, kad koncentracija metabolita u ćeliji pređe prag dolazi do njegovog vezivanja za 5' UTR u iRNK.

Ovi regulatorni elementi su bi-modularni. Prvi modul nazvan aptamer je visoko konzervisan strukturni receptor koji specifično prepoznaje razne metabolite: koenzime, vitamine, nukleobaze, aminokiseline, ili jone npr. Mg^{2+} jone (Cromie *et al.*, 2006; Dan *et al.*, 2007). Drugi modul je takozvana ekspresiona platforma koja reaguje na regulatorne signale i dovodi do ON/OFF odgovora. Kod bakterija ovaj odgovor se postiže formiranjem struktura koje modulišu terminaciju transkripcije, inicijaciju translacije ili dovode do samoisecanja RNK (Serganov and Patel, 2007).

Do sada je okarakterisano 15 različitih klasa ribosvičeva. Na slici 1. su prikazane sekundarne stukture za dvanaest ribosvičeva (Blount et Breaker, 2006) kao i ligandi koji se vezuju odgovarajući ribosvič. Pripadnici svake klase vezuju isti metabolit i imaju istu konzervisanu sekvencu i sekundarnu strukturu.

Dobro je okarakterisan ribosvič za koenzim tiamin pirofosfat (TPP) iz *E. coli*, za koji je pokazano da reguliše translaciju *thiM* iRNK koja kodira enzim hidroksietil tiazol kinazu (Rodionov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). Represija translacije se dešava preko promene konformacije usled vezivanja TTP koje indukuje remodelovanje iRNK i formiranje duge ukosnice koja narušava translacioni inicijacioni region (Winkler *et al.*, 2002). Slični TTP ribosvičevi su pronađeni u genomima drugih bakterija (Rodionov *et al.*, 2002).



Slika 1. Sekundarne strukture receptornih domena kod 12 klasa ribosvičeva i hemijske strukture metabolita koji se vezuju da dati ribosvič (Blount and Breaker, 2006).

Metabolizam sumpora kod mnogih bakterija je regulisan ribosvičevima koji selektivno prepoznaju S-adenozilmetionin ili S-adenozinhomocistein (Wang *et al.*, 2008). Ribosvičevi prave oštru razliku između ova dva jedinjenja koja se razlikuju u samo jednoj metil grupi.

Do sada je otkriveno pet različitih strukturnih klasa ribosvičeva za SAM od kojih su tri prikazane na slici 1 (Blount and Breaker, 2006; Poiata *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2007), kao i jedna klasa ribosvičeva koja prepoznaje SAH (Wang *et al.*, 2008).

Prve tri klase SAM-I, SAM-II i SAM-III formiraju različite vezujuće džepove za ligand, za razliku od klase SAM-IV koja sadrži različite konzervisane sekvence i strukturne karakteristike u poređenju sa ostalim klasama, ali nukleotidi i substrukture u vezujućem džepu su identični onim u klasi SAM-I. Druga novootkrivena klasa SAM-V je preovlađujuća metagenomska sekvenca karakteristična za morske bakterije. Konsenzus

sekvenca i struktura ligand vezujućeg džepa nove klase pokazuje sličnosti sa klasom SAM-II (Poiata *et al.*, 2009). Rastući broj novootkrivenih RNK molekula koji vezuju SAM ilustruje različitost struktura koje RNK može da formira da bi selektivno vezala metabolit.

Bakterijski genom može da sadrži ribosvičeve koji su specifični za različite metabolite kao i multiple ribosvičeve istog tipa, od kojih svaki reguliše različit operon. Štaviše, dva domena ili dva kompletna ribosviča mogu da budu susedi što rezultira mnogo kompleksnijim nivoom genske regulacije. Tako, naprimer, tandem aptamera specifičnih za glicin, kooperativno vezuju glicin čime se postiže regulacija preko jedne ekspresione platforme što obezbeđuje veći dinamički odgovor na male promene koncentracije glicina (Mandal *et al.*, 2004).

Drugi primer je aranžman dva kompletna ribosviča koji nezavisno vezuju različite metabolite, SAM i adenozilkobalamin, gde vezivanje bilo kog od ta dva dovodi do genske represije *met E* gena kod bacilusa. (Sudarsan *et al.*, 2006). Takođe, može da postoji tandem dva kompletna ribosviča istog tipa npr. TPP ribosvič (Rodionov *et al.*, 2004). Zavisno od ekspresione platforme ribosvičevi istog tipa mogu da vrše aktivaciju ili represiju gena što povećava njihov regulatorni potencijal.

1.3.2. RNK termosenzori

RNK termosenzori su regulatorni regioni u okviru 5' UTR iRNK tj. sekundarne i tercijarne interakcije uključene u savijanje iRNK koje direktno detektuju temperaturne promene i prenose signal do translacionog aparata menjajući RNK konformaciju (Narberhaus *et al.*, 2006).

Kod *Listeria monocytogenes* i *Yersinia pestis* termosenzori su bitni za aktivaciju ekspresije gena za virulenciju na temperaturi tela domaćina (Johansson *et al.*, 2002; Hoe and Goguen, 1993). U oba slučaja RBS sekvenca gena za virulenciju je nepristupačna za ribosome jer se nalazi u okviru sekundarnih struktura koje su stabilne na nižim temperaturama, dok na višim dolazi do njihovog 'topljenja' i vezivanja ribozoma.

Gen *rpoH* iz *E. coli* koji kodira „heat-shock“ sigma faktor σ^{32} je najbolje okarakterisan primer gde se sa povišenom temperaturom iRNK usmerava ka translaciji

(Morita *et al.*, 1999). Regulacija σ^{32} se odigrava na translacionom nivou (Nagai *et al.*, 1991; Yuzava *et al.*, 1993). Tokom normalnog rasta i temperature sigma faktor σ^{32} je reprimiran.

Termalna stabilnost iRNK je bitna u regulaciji mnogih gena uključujući i one regulisane sa ROSE (eng.-repression of heat shock gene expression) elementima koji su konzervisani kod rizobijalnih vrsta (Nocker *et al.*, 2001). Pokazano je da je iRNK za σ^{32} strukturirana u regionu RBS mesta i da je ovaj region ekstremno osetljiv na temperaturne promene oko 42° C, kao i da temperaturni šok ćelije indukuje lokalno topljenje sekundarne structure oko RBS čime se omogućava inicijacija translacije (Yura *et al.*, 2000).

Dakle, sama iRNK je senzor za temperaturne promene kada se većina neaktivne populacije iRNK prevodi u aktivnu na višim temperaturama. Ova promena u iRNK populaciji se odvija nezavisno od trans – delujućih regulatornih faktora. Ova brza indukcija „heat shock“ proteina je esencijalna za preživljavanje ćelija

1.3.3. Ribozimi

Ribozim *glmS* je identifikovan u 5' UTR *glmS* gena iz *Bacillus subtilis* i neophodno mu je prisustvo kofaktora za samoisećanje (Winkler *et al.*, 2004). Ovaj gen kodira enzim glutamin-fruktozo-6-fosfat amidotransferazu koja generiše glukozamin 6 fosfat, molekul koji se koristi za biosintezu ćelijskog zida. U suvišku glukozamin 6 fosfata, ribozim koristi ovaj molekul kao kofaktor u reakciji samoisećanja, što uzrokuje degradaciju *glmS* iRNK i stoga i utišavanje gena. Identifikacijom bakterijskog ribozima *glmS* uspostavljena je bliža veza između ribosvičeva i ribozima karakterističnih za eukariote.

1.4. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko *cis*-kodiranih antisens iRNK

Antisens RNK su mali (50-300 nt), visoko strukturirani molekuli RNK koji se uglavnom ne transliraju. Antisens RNK i target iRNK se transkribuju u suprotnoj orijentaciji sa iste DNK sekvence i stoga su potpuno komplementarne. Vezivanjem za svoje target sens RNK, male antisens RNK regulišu gensku ekspresiju.

Većina ovih molekula je pronađena na plazmidima, transpozonomima i kod faga, mada ih ima i na bakterijskom hromozomu. Antisens RNK imaju ulogu u regulaciji fundamentalnih procesa u ćeliji: inicijaciji replikacije, konjugaciji, transpoziciji, degradaciji iRNK i inicijaciji translacije.

Najčešći mehanizam regulacije inicijacije translacije putem antisens RNK je direktno blokiranje translacionog inicijacionog regiona (Brantl, 2007). Tipičan primer je antisens RNK CopA, za koju je pokazano da reguliše broj kopija plazmida R1 tako što reprimira translaciju *repA* iRNK, koja kodira protein inicijator replikacije RepA. Sinteza RepA zahteva translaciju kratkog lider peptida (*tap*), koji je pozicioniran uzvodno od *repA*, a koji treba da 'otopi' sekundarnu strukturu u vidu ukosnice u kojoj je maskiran RBS ovog gena (Blomberg *et al.*, 1992). CopA indirektno inhibira *repA* ekspresiju tako što blokira pristup ribozomima na *tap* RBS čime se sprečava translacija. CopA je potpuno komplementaran sa targetom CopT, a samo vezivanje se odvija u više koraka da bi došlo do formiranja stabilnog kompleksa sa lider regionom CopT, neposredno uzvodno od *tap* okvira čitanja. Ovaj kompleks blokira pristup ribozomima na *tap* RBS, a prisustvo ukosnice koja maskira *repA* RBS dovodi do inhibicije translacije RepA (Kolb *et al.*, 2000).

Antisens RNK može takođe da ima ulogu RNK "antitoksina". Naime, kod prokariota su pronađeni "toksin-antitoksin" lokusi na plazmidima i u hromozomu, u nekoliko ili više kopija. Ovi lokusi imaju funkciju u replikaciji i održavanju plazmida i konjugaciji. Lokusi su dvokomponentni sistemi koji kodiraju stabilan "toksin" čija prekomerna ekspresija dovodi do smrti ćelije i nestabilan "antitoksin" koji može biti protein ili mala antisense RNK koji se vezuju za "toksin" iRNK i sprečavaju njenu translaciju.

Kod *E. coli* R1 plazmid kodira *hok/sok* sistem "toksin/antitoksin" (TA) (Gerdes and Wagner, 2007) dok kod *Enterococcus faecalis* plazmid AD1 kodira RNAI /RNAII ili *par* sistem (Weaver *et al.*, 1993). Ovi TA moduli stabilišu plazmide unutar ćelijske

populacije tako što dovode do programirane ćelijske smrti ćerki ćelija koje su izgubile plazmid. Gubitak plazmida dovodi do degradacije “antitoksina” i aktivacije “toksina” ili njegove translacije i ćelijske smrti. Aktivnost “toksina” se sprečava vezivanjem “antitoksina” za isti.

Kod *hok/sok* i *par* modula “antitoksin” je relativno nestabilna regulatorna RNK koja se vezuje antitoksin i sprečava njegovu translaciju. Hok/sok lokus ima tri gena: *hok* (eng.-host killing) koji kodira visoko toksični transmembranski protein koji ireverzibilno oštećuje ćelijsku membranu, *mok* (eng.-modulation of killing) koji pre pokriva *hok* i neophodan je za njegovu translaciju i *sok* (eng.-suppression of killing) koji je mala antisense RNK koja sprečava translaciju *mok*. Pošto translacija *hok* gena zavisi od translacije *mok* gena, Sok RNK indirektno inhibira translaciju *hok* gena tako što inhibira translaciju *mok* gena (Thisted *et al.*, 1992). Sok RNK se prepisuje sa jakog promotora i nestabilna je (poluživot je 30 sekundi), dok se *hok* sintetiše sa slabog promotora, stabilna je i ima poluživot od 20 minuta. Tokom ćelijskog rasta Sok RNK je prisutna u molarnom suvišku u odnosu na *hok* iRNK. Kada dođe do ćelijske deobe i ako ćerke ćelije ne sadrže plazmid, Sok RNK se brzo degraduje tako da u ćelijama zaostaje zrela forma *hok* iRNK koja se translira što dovodi do smrti ćelija koje su bez plazmida. Sok RNK i *hok* iRNK formiraju dupleks koji prepoznaje i iseca RNaza III (Franch *et al.*, 1999). Pokazano je da u ćelijama prvo dolazi do akumulacije pre-iRNK za *hok* koja je u stabilnoj i neaktivnoj konformaciji: ne vezuje ribosome i Sok RNK (Franch *et al.*, 1996). Ova pre-iRNK podleže sporoj degradaciji od strane RNaze II sa 3' kraja čime se menja njena konformacija u formu koja može da veže ribosome ili Sok RNK. Kod ćelija koje su nasledile plazmid sa *hok/sok* lokusom, Sok RNK se veže za zrelu *hok* iRNK i reprimira translaciju.

Kod *Enterococcus faecalis* konjugabilni plazmid pAD1 je stabilisan prisustvom *par* lokusa koji kodira dve male RNK: RNK I i RNK II (Weaver *et al.*, 1996). RNA I kodira toksični peptid Fst od 33 aminokiseline koji utiče na propustljivost membrane i dovodi do ćelijske smrti. RNK II sprečava translaciju RNK I tako što dolazi do preklapanja 3' krajeva ovih RNK u dužini od 75 bp (Greenfield *et al.*, 2000). Preklapanje rezultira formiranjem ukosnice koja ima ulogu u terminaciji transkripcije. *In vitro* analizama je pokazano da RNK II sprečava vezivanje ribozoma za RNK I kao i to da nije

neophodno potpuno formiranje RNK dupleksa za funkcionisanje *par* lokusa. Takođe je pokazano da na 5' kraju toksin RNK I postoji sekundarna struktura koja je neophodna za vezivanje sa antitoksin RNK II *in vivo*, i suprimiranje Fst translacije dovoljno dugo da bi došlo do interakcije 3' krajeva RNK I i RNK II (Shokeen *et al.*, 2008).

1.5. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko *trans*-kodiranih antisens iRNK

Trans aktivne antisens RNK mogu da vrše inhibiciju translacije direktnim maskiranjem translacionog inicijacionog regiona. Kod *E. coli* u odgovoru na oksidativni stres sintetiše se OxyS RNK dužine 109 nt koja štiti bakterijsku DNK od oštećenja i indukuje plejotropni efekat menjajući ekspresiju više gena (Altuvia *et al.*, 1997). OxyS reguliše translaciju *rpoS* iRNK koja kodira sigma faktor stacionarne faze RpoS i translaciju *fhfA* iRNK koja kodira transkripcioni aktivator u metabolizmu formijata. Pokazano je da mehanizam represije *fhfA* iRNK uključuje interakciju dve sekundarne strukture iz OxyS sa dve ukosnice prisutne u lider regionu *fhfA* iRNK. Ovakav kompleks dovodi do direktnog blokiranja RBS sekvence *fhfA* iRNK (Argaman and Altuvia, 2000). Za ovu regulaciju *in vivo* bitne su strukture obe RNK kao i prisustvo opšteg regulatora Hfq.

Pored antisens RNK koje reaguju sa translacionim inicijacionim regionima (TIR) postoje antisens RNK koje se vezuju za regione iRNK koje su mnogo udaljeniji od TIR.

Kod *E. coli* postoji *tisAB* lokus koji kodira SOS indukovani „toksin“ i antisense RNK IstR-1 koja ima ulogu „antitoksina“. Pokazano je da je RBS sekvenca lokusa *tisAB* sakrivena u kompleksnoj strukturi i stoga je onemogućeno vezivanje ribozoma, a da je udaljeniji uzvodni jednolančani region neophodan za formiranje ternarnog kompleksa 30S-tRNK-iRNK (Darfeuille *et al.*, 2007). Naime, 30S ribozomalna subjedinica je usidrena na jednolančanom regionu i najverovatnije sklizne do otvorenog TIR lokusa *tisAB*. Antitoksin IstR se jedino vezuje za translirajuću formu *tisAB* iRNK za jednolančani region za koji je privremeno može biti usidrena 30S subjedinica. U ovom slučaju antisens RNK kompetira sa ribozomima za vezivanje.

U mnogim slučajevima antisens RNK mogu da koregulišu više iRNK koje pripadaju različitim transkripcionim regulonima. Ovo je način da se vremenski koordiniše ekspresija različitih klasa iRNK u odgovoru na stres ili dostupnost nutrienata.

Kod *S. typhimurium* je pokazano da GcvB antisens RNK direktno inhibira inicijaciju translacije sedam target iRNK koje kodiraju proteine ABC transportera za aminokiseline i peptide (Sharma *et al.*, 2007). Ova antisens RNK pošto ima G/U bogate sekvence se direktno vezuje za C/A bogate motive prisutne u više različitih iRNK. Ovi C/A motivi mogu biti prisutni u okviru TIR što objašnjava kako GcvB antisens RNK inhibira translaciju. Međutim, C/A motivi mogu biti prisutni i u uzvodnim sekvencama lociranim 35 nt dalje od RBS sekvence a da GcvB antisens RNK i dalje može da spreči vezivanje ribozoma. Kako je poznato da nesparene sekvence prisutne uzvodno od RBS sekvence pojačavaju efikasnost ribozoma, ovi C/A bogati motivi mogu biti prepoznati od strane ribozomalnog proteina S1 što olakšava pristajanje ovih iRNK na ribozomu (Komarova *et al.*, 2005).

Pored gore opisanih slučajeva mali RNK molekuli mogu da regulišu transkripte koji kodiraju proteine koji koriste gvožđe kao što su enzimi akonitaza, superoksid dismutaza SodB, i više proteina koji skladište gvožđe (Masse and Gottesman, 2002).

Takođe, antisens RNK mogu biti deo regulatorne mreže koja omogućava patogenim bakterijama da prilagode svoje metaboličke potrebe tokom infektivnog procesa i da kad se ukaže potreba eksprimiraju gene za virulenciju (Romby *et al.*, 2006.; Toledo-Arana *et al.*, 2007).

2. Bakterijski ribozomi – mesto delovanja antibiotika

Ribozomi su kompleksni makromolekulski sistemi koji se sastoje, čak i kod najjednostavnijih organizama, od preko pedeset različitih proteina i rRNK molekula, tako da ukupna molekulska masa prelazi dva miliona Daltona. Kod svih danas živih ćelija ribozomi imaju istu osnovnu funkciju, funkciju u sintezi proteina.

Ribozomalni proteini, s jedne strane, imaju ulogu u struktuiranju rRNK molekula što im omogućava da poprime konformaciju neophodnu za brzu i efikasnu funkciju (Klein *et al.*, 2004). Mnoge od ovih konformacija bi bile termodinamički nestabilne i

nemoguće da nije r-proteina. Druga funkcija r-proteina je helikazna aktivnost koja omogućava pristup informaciji u čvrsto strukturanoj iRNK koja ulazi u ribozom (Takyar *et al.*, 2005). Osim toga, na ulazu u peptidni tunel, r-proteini mogu da imaju ulogu senzora i da zavisno od prirode nascentnog peptida menjaju njegovu konformaciju dok prolazi kroz tunel, na izlazu iz tunela na zadnjoj strani ribozoma, r-proteini imaju ulogu u ukotvljavanju šaperona (Gabashvili *et al.*, 2001, Ferbitz *et al.*, 2004).

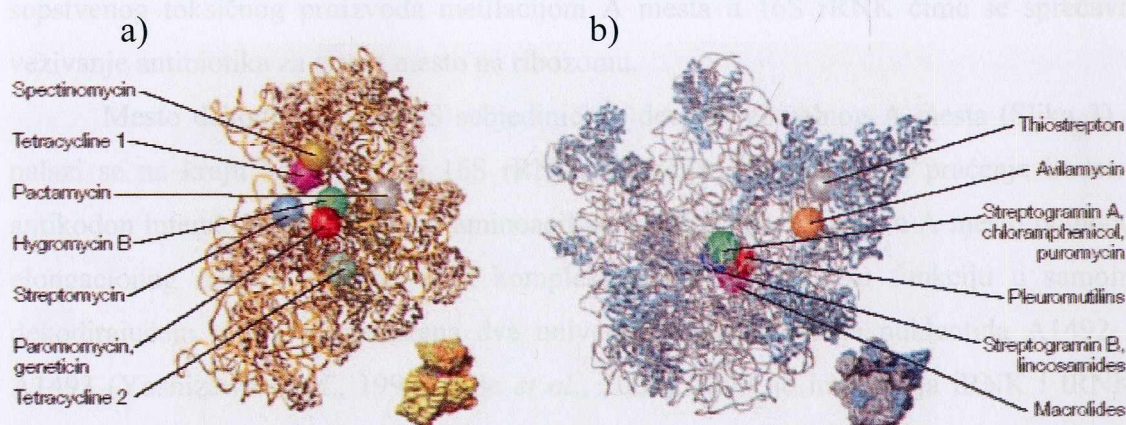
Kako je očuvanost funkcije povezana sa očuvanošću stukture, ribozomi filogenetski udaljenih organizama, kao što su bakterije i arhee, očekivano pokazuju značajan stepen sličnosti. Štaviše, eukariotski ribozomi, uključujući i one iz humanih ćelija pokazuju sličnost sa prokariotskim ribozomima. Konzervisanost strukture ribozoma je najočiglednija u regionima rRNK koji su direktno povezani sa kritičnim funkcijama ribozoma: dekodiranje iRNK i peptidil transfer.

Prisustvo ovih specifičnih konzervisanih mesta kod svih bakterijskih vrsta ima za posledicu to da su ribozomi odlična meta za antibiotike. Veliki broj hemijski različitih antibiotika utiče na sintezu proteina vezujući se za svega nekoliko mesta na ribozomima. Mehanizam prepoznavanja vezujućih mesta od strane antibiotika je postao mnogo jasniji od kada je razrešena stuktura ribozoma, na nivou atomskih koordinata, dobijena difrakcijom X zraka na kristalima. Ono što je odmah postalo očigledno je da u regionu ribozoma koji je odgovoran za sintezu proteina nema r-proteina na rastojanju od 18 Å, što je velika udaljenost imajući u vidu činjenicu da je ceo ribozom veličine ~200 Å (Nissen *et al.*, 2000). To je bio dokaz da rRNK usklađuje aminoacil i peptidil krajeve tRNK na (A) i (P) mestu u optimalnu konfiguraciju za formiranje peptidne veze (Bashan *et al.*, 2003).

Većina antibiotika koja se vezuje za ribozome se u stvari vezuje za one delove 30S i 50S subjedinica koji su rRNK bogati (slika 2), i do sada je rešeno više kristalnih struktura ribozomalnih subjedinica u kompleksu sa nekim od brojnih antibiotika.

Mala ribozomalna subjedinica je target za tetracikline, ciklične peptide, paktamicin i aminoglikozodne antibiotike (slika 2a). Vezivanje aminoglikozida kao što su geneticin, paromomicin i apramicin za mesto dekodiranja u 30S subjedinici je dobro okarakterisano bilo kristalografski (Hermann *et al.*, 2005; Vicens *et al.*, 2003) bilo NMR metodom (Fourmy *et al.*, 1996; Yoshizawa *et al.*, 1998).

Velika, 50S ribozomalna subjedinica je target za veći broj antibiotika: MLS_B (makrolidi, linkozamide, streptogramin B), ketolidi, tiopeptidne antibiotike i hloramfenikol (slika 2b). Oni se vezuju za tri bitna funkcionalna domena u subjednici koji kontrolišu GTP hidrolizu, formiranje peptidne veze i transfer peptida kroz tunel subjednice. Najveći broj informacija dobijen difrakcijom X zraka na kristalima, odnosi se na vezivanje MLS_B antibiotika (Tu *et al.*, 2005; Schlunzen *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2002) hloramfenikola (Hansen *et al.*, 2003), puromicina (Nissen *et al.*, 2000) i oksazolidinona (Kloss *et al.*, 1999) za peptidiltransferazni centar.



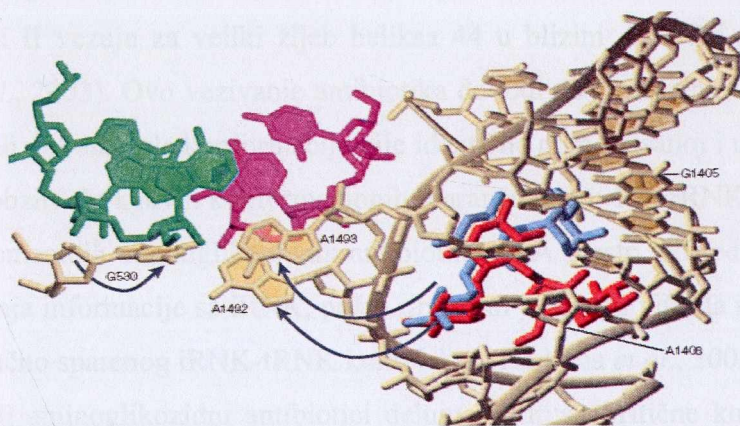
Slika 2. Mesta vezivanja antibiotika na bakterijskim ribozomima (Poehlsgaard *et al.*, 2005). a) Mala ribozomalna subjedinica 30S. b) Velika ribozomalna subjedinica 50S. rRNK je prikazana u žutoj i sivoj boji dok su ribozomalni proteini prikazani u narandžastoj i plavoj boji.

2.1. Mesto vezivanja aminoglikozidnih antibiotika na 30S subjednici

Aminoglikozidni antibiotici su moćne bakteriostatske i baktericidne supstance, širokog spektra, koji primarno deluju na aerobne Gram-negativne bacile i Gram-pozitivne koke. Po hemijskom sastavu to su polikatjonski oligosaharidi sa više amino i hidroksil grupa. Molekuli aminoglikozida se sastoje od karakterističnog centralnog

aminociklitolnog prstena koji je povezan sa jednim ili više aminošećera glikozidnim vezama. Većina aminoglikozidnih antibiotika koja je u kliničkoj upotrebi ima 2-deoksistreptamin kao centralni aminociklitol koji može biti monosupstituisan na poziciji 4 kao što je slučaj kod antibiotika neamina, ili disupstituisan na pozicijama 4 i 5 (ribostamicin), odnosno na pozicijama 4 i 6 (kanamicin, gentamicin, tobramicin). Bakterije najčešće proizvode aminoglikozide u neaktivnoj formi, fosforilisane ili acetilovane, koji se aktiviraju nakon sekrecije van ćelija uklanjanjem inaktivnih grupa (Lacalle *et al.*, 1993; Tercero *et al.*, 1996). Kako antibiotici u aktivnoj formi mogu ponovo da uđu u ćeliju, organizmi proizvođači aminoglikozidnih antibiotika štite se od sopstvenog toksičnog proizvoda metilacijom A mesta u 16S rRNK čime se sprečava vezivanje antibiotika za target mesto na ribozomu.

Mesto dekodiranja na 30S subjedinici je deo ribozomalnog A mesta (Slika 3) i nalazi se na kraju heliksa 44 u 16S rRNK. Funkcija ovog mesta je praćenje kodon-antikodon interakcije nakon što se aminoacilovana tRNK pozicionira u A mesto pomoću elongacionog faktora Tu koji je u kompleksu sa GTP. Za ovu funkciju u samom dekodirajućem mestu su zadužena dva univerzalno konzervisana nukleotida A1492 i A1493 (Yoshizawa *et al.*, 1999; Ogle *et al.*, 2001). Kada je interakcija iRNK i tRNK potpuno kompatibilna, konformacija njihove ribozo-fosfatne okosnice je takva da favorizuje formiranje vodoničnih veza sa bazama nukleotida A1492 i A1493. Da bi došlo do takve interakcije, A1492 i A1493 moraju da se izmeste iz heliksa 44 kao što je to prikazano na Slici 3.



Slika 3. Mesto dekodiranja na 30S ribozomalnoj subjedinici (Poehlsaard *et al.*, 2005). Prikazani su nukleotidi A1492 i A1493 nakon izmeštanja iz heliksa 44, u interakciji sa iRNK (ljubičasta boja) i tRNK (zelena boja) u A mestu. Aminoglikozidni antibiotici paromomicin (crvena boja) i geneticin (plava boja) su vezani za heliks 44. Prikazani su i nukleotidi G1405 i A1408.

Vezivanje tRNK za A mesto je takođe praćeno konformacionom promenom nukleotida G530 koji dodatno podržava izmenjenu konformaciju A1492 i A1493. Opisane konformacione promene u 16S rRNK dovode do rearanžmana više r-proteina što rezultira pomeranjem glave 30S subjedinice ka većoj ribozomalnoj subjedinici koja dalje odgovara na signale hidrolizom GTP molekula. Potom dolazi do pomeranja aminoacilovanog ostatka tRNK u peptidil-transferazni centar na 50S subjedinici gde se formira peptidna veza. Ribozom se zatim pomera jedan kodon duž iRNK molekula čime novi kodon biva smešten unutar A mesta. Ovo dalje vodi translokaciji tRNK koja nosi peptid u P mesto, dok se deacilovana tRNK pomera u E mesto odakle biva izbačena sa ribozoma. Ciklus se ponavlja više stotina puta dok peptidni lanac narasta iz peptidil-transferaznog centra kroz tunel u većoj subjedinici da bi izašao sa zadnje strane ribozoma.

Analiza kristalnih struktura dekodirajućeg A mesta u kompleksu sa paromomicinom, tobramicinom i geneticinom je pokazala da je za specifično vezivanje antibiotika za A mesto bitan par U1406·U1495 i A1408 iz heliksa 44, kao i 2-deoksistreptaminski ostatak antibiotika (Pfister, 2005).

Aminoglikozidni antibiotici sa neaminskom stukturom se preko aminoglikozidnih prstenova I i II vezuju za veliki žljeb heliksa 44 u blizini A1492 i A1493 nukleotida (Vicens *et al.*, 2003). Ovo vezivanje antibiotika dovodi do izmeštanja A1492 i A1493 iz heliksa 44, ali novonastala konformacija nije identična gore opisanoj i u njoj ne učestvuje G530. Bez obzira do kakvih konformacionih rearanžmana u 16S rRNK molekulu dovodi vezivanje pomenutih aminoglikozidnih antibiotika za A mesto, posledica je narušavanje tačnosti čitanja informacije sa iRNK, pošto ribozomi ne mogu više da razlikuju pogrešno spareni od tačno sparenog iRNK-tRNK kompleksa (Rodnina *et al.*, 2002).

Ostali aminoglikozidni antibiotici deluju na druge kritične korake u translaciji. Spektinomycin se npr. vezuje za manji žljeb 16S rRNK na kraju heliksa 34 blizu osne

tačke glave 30S subjedinice i sprečava pomeranje glave i rearanžman heliksa koji su neophodni za korak translokacije (Carter *et al.*, 2000). Higromicin B se vezuje između A i P mesta tako da utiče na i na tačnost čitanja informacije i na translokaciju (Brodersen *et al.*, 2000). Međutim, za razliku od drugih aminoglikozidnih antibiotika koji utiču na tačnost čitanja, higromicin B ne ostvaruje kontakt sa A1408 koji je konzervisan među bakterijama. Odsustvo ovog kontakta objašnjava činjenicu da se higromicin B može vezati i za eukariotske ribosome gde se na poziciji 1408 u 18S rRNK nalazi G (Lynch and Puglisi, 2001). Streptomycin pak, interaguje sa fosforiboznom okosnicom iz četiri različita domena 16S rRNK. To je ujedno i jedini aminoglikozidni antibiotik koji ostvaruje interakciju sa r-proteinima, tačnije S12 proteinom (Puglisi *et al.*, 2000).

Bez obzira da li aminoglikozidi deluju baktericidno kao što je slučaj sa kazugamicinom, higromicinom B i spektinomycinom, ili bakteriostatski što je slučaj kod disupstituisanih 2-deokistreptamina, posledica njihovog dejstva je produkcija pogrešno transliranih proteina što ima dramatične posledice po ćeliju, koje vode letalnom ishodu.

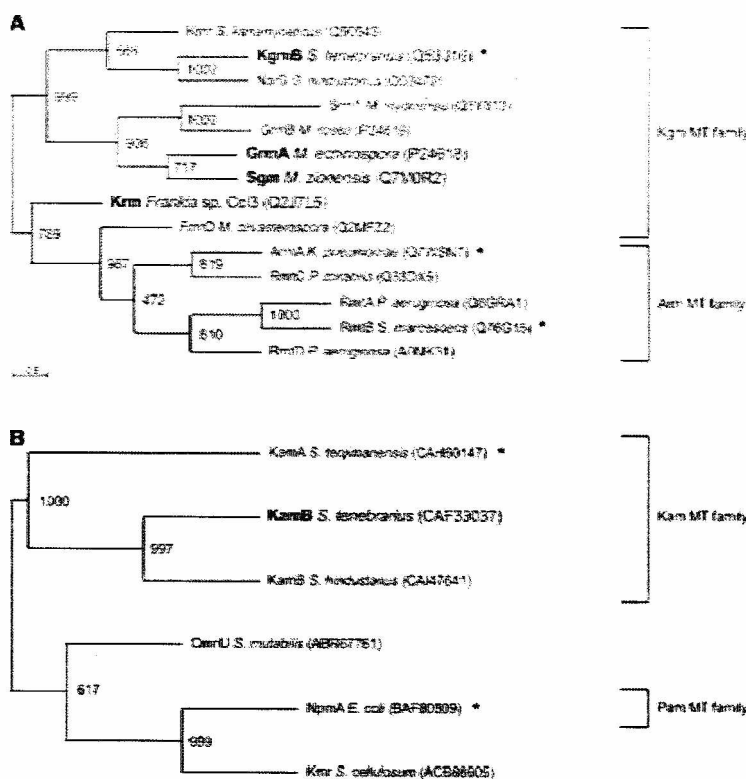
3. 16S rRNK metiltransferaze i rezistencija na aminoglikozidne antibiotike

Mikroorganizmi proizvođači raznih sekundarnih metabolita npr. antibiotika, moraju ostati aktivni u sopstvenog toksičnog proizvoda. Strategije tolerancije koje su proizvođači antibiotika razvili u cilju izbegavanja samointoksikacije uključuju enzimsku modifikaciju antibiotika, sprečavanje kontakta antibiotika i njegovog targeta i modifikaciju mesta vezivanja antibiotika.

Posedovanje enzima koji inaktiviraju antibiotike je bitna karakteristika za preživljavanje kod većeg broja bakterija proizvođača. Tako je rezistencija na aminoglikozidne antibiotike najčešće ostvarena delovanjem enzima koji modifikuju i inaktiviraju sam antibiotik: aminoglikozid acetiltransferaze i aminoglikozid fosfotransferaze dok su kod kliničkih sojeva tj. patogenih bakterija prisutne aminoglikozid adeniltransferaze koje nisu pronađene kod proizvođača (Shaw, *et al.*, 1993).

Kod proizvođača aminoglikozidnih antibiotika, streptomiceta i mikromonospora, rezistencija na sopstveni toksični proizvod može biti obezbeđena pored već pomenute enzimske inaktivacije, i modifikacijom mesta vezivanja antibiotika putem metilacije rRNK molekula. Metilacija tačno određenih nukleotida u 16S rRNK (G1405 i A1408) onemogućava vezivanje antibiotika za ciljno mesto i efikasno štiti domaćina (Cundliffe, 1989a i b).

Do pre par godina metilacija 16S rRNK kao mehanizam rezistencije nije bila detektovana kod patogenih bakterija. Sa otkrićem 16S rRNK metiltransferaza kod kliničkih sojeva, porastao je broj članova porodice metiltransferaza kao i potreba da se ovi enzimi klasifikuju. Tako je predloženo da metiltransferaze iz proizvođača i patogena čine superfamiliju koja je označena kao Rma (Resistance methyltransferases for aminoglycosides) (Conn *et al.*, 2008). Ova superfamilija je podeljena u dve različite grupe, zavisno od toga koji je nukleotid metilovan, pa postoje G1405 metiltransferaze i A1408 metiltransferaze. Porodice metiltransferaza koje metiluju G1405 su označene kao Kgm (Kanamycin-gentamicin methyltransferase), ukoliko su izolovane iz proizvođača, ili Arm (Aminoglycoside resistance methyltransferase) ukoliko su izolovane iz patogena. Porodice metiltransferaza koje metiluju A1408 su označene kao Kam (Kanamycin-apramycin methyltransferase) ukoliko potiču iz proizvođača, ili Pam (Pan-aminoglycoside methyltransferase) ukoliko su izolovane iz patogena (slika 4).



Slika 4. Filogenetski odnos familija 16S rRNK metiltransferaza koje obezbeđuju rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike (Savic *et al.*, 2009). **A**) G1405 metiltransferaze (Kgm i Arm familija) i **B**) A1408 metiltransferaze (Kam i Pam familija)

3.1. Kgm i Kam familija metiltransferaza

Mnogi od gena koji kodiraju enzime, pripadnike Kgm i Kam familija metiltransferaza su klonirani (Holmes *et al.*, 1991, Keleman *et al.*, 1991, Kojic *et al.*, 1992, Thompson *et al.*, 1982). Opšta karakteristika ovih enzima je da koriste S-adenozil-L-metionin kao kofaktor tj kao donora metil grupe.

Nukleotid G1405 je determinisan kao mesto metilacije za veći broj članova Kgm familije metiltransferaza: KgmB iz *Streptoallotheicus tenebrarius* ranije poznat kao i *Streptomyces tenebrarius* (Tamura *et al.*, 2008), Sgm iz *Micromonospora zionensis*,

GrmA iz *Micromonospora echinospora*, Krm iz *Frankia sp.* (Holmes *et al.*, 1991; Tomic, *et al.*, 2008; Savic *et al.*, 2009; Cubrilo *et al.*, 2009;).

Mesto delovanja KamA iz *Streptomyces tenjimariensis* kao i KamB i KamC iz *Saccharopolyspora hirsuta*, metiltransferaza iz Kam familije je takođe određeno, i pokazano je da je to A1408 nukleotid u 16S rRNK (Beauclerk *et al.*, 1987; Savic *et al.*, 2009; Holmes *et al.*, 1991).

Aminoglikozidni antibiotici 4,5- i 4,6-disupstituisani 2-deoksistreptamini (2-DOS) (Slika 5.) formiraju specifične vodonične veze sa nukleotidima A mesta u 16S rRNK. Modifikacija ili mutacija ključnih nukleotida u ovom regionu dovodi do narušavanja vodoničnih veza što dalje rezultira nemogućnošću vezivanja antibiotika za 16S rRNK i rezistencijom na aminoglikozidne antibiotike kod bakterija.

Aktinomicete proizvođači aminoglikozidnih antibiotika mogu da vrše metilaciju N7 guanina u poziciji 1405 i N1 adenina u poziciji 1408. Metilacija ^{N7}G1405 kod proizvođača obezbeđuje rezistenciju na 4,6, disupstituisane 2-DOS iz kanamicinske i gentamicinske grupe, ali ne i na apramicin, dok metilacija ^{N1}A1408 obezbeđuje rezistenciju na kanamicin, tobramicin, sisomicin i apramicin, ali ne i na gentamicin (Cundliffe *et al.*, 1989; Skeggs *et al.*, 1985; Zalacain and Cundliffe, 1989). Ovakav obrazac rezistencije je pronađen i kod patogenih bakterija.

Substitution	Ring I	Ring II	Ring III, IV, V	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Aminoglycoside	
4-monosubstituted				NH ₂	OH	H		Neamine Paromamine	
									Apramycin
4,5-disubstituted					NH ₂	OH	H		Ribostamycin Bulfosein B
					NH ₂	OH	H		Neomycin B Paromomycin
									Lividomycin A
4,6-disubstituted					NH ₂	OH	OH	H	Kanamycin A
					NH ₂	OH	NH ₂	H	Kanamycin B Kanamycin C Tobramycin
					NH ₂	H	NH ₂	H	Tobramycin
					NH ₂	OH	OH	AHE	Amikacin
					CH ₃	NHCH ₃	H		Gentamicin C1 Gentamicin C2 Gentamicin C1A
					CH ₃	OH	OH	OH	Genetidin

Slika 5. Hemijske strukture aminoglikozidnih antibiotika: monosupstituisanih, 4,5-disupstituisanih i 4,6-disupstituisanih 2-DOS. (Chittapragada *et al.*, 2009)

Obe grupe disupstituisanih 2-deoksistreptamina, 4,6-DOS i 4,5-DOS, se vezuju za 16S rRNK tako da se njihov prsten I nalazi u neposrednoj blizini A1408. Metilovani nukleotid A1408 je pozitivno naelektrisan na neutralnom pH i može da spreči vezivanje antibiotika sternim ometanjem ali i odbijanjem pozitivno naelektrisanog antibiotika. Ova

modifikacija obezbeđuje rezistenciju na apramicin i na kanamicinsku grupu 4,6-DOS aminoglikozida ali ne i gentamicin, neomicin i paromomicin (Cundliffe *et al.*, 1990).

Nedavno je pokazano da se neomicin, paromomicin i gentamicin vezuju za heliks 69 u 23S rRNK u neposrednoj blizini P-mesta čime inhibiraju recikliranje ribozoma (Borovinskaya *et al.*, 2007). Po svemu sudeći jednostavna zaštita metilacijom primarnog targeta nije dovoljna za obezbeđivanje visokog nivoa rezistencije na antibiotike pa su neophodne dodatne interakcije antibiotika i ribozoma. Poznato je takođe da paromomicin inhibira sklapanje 30S subjedinice sa podjednakom efikasnošću kao što inhibira translaciju (Champney *et al.*, 2006; Mehta *et al.*, 2002)

Kristalne strukture dva 4,6-DOS aminoglikozida, gentamicina i tobramicina, u kompleksu sa A mestom 16S rRNK su pokazale da antibiotici preko supstituenata na prstenu III ostvaruju direktan kontakt sa G1405 (Yoshizawa *et al.*, 1998; Vicens and Westhof, 2002). Kada je G1405 metilovan, dolazi do sternih smetnji i elektrostatičkog odbijanja između nukleotida i antibiotika. S druge strane, kod 4,5-DOS aminoglikozida kao što su paromomicin i neomicin, supstituenti na poziciji 5 su pod drugačijim uglom tako da su udaljeniji od G1405 i metilacija na ovom mestu ne interferira sa vezivanjem antibiotika. Dakle, modifikacija G1405 od strane Kgm familije metilaza je jedino efikasna protiv 4,6-DOS aminoglikozida i obezbeđuje visok nivo rezistencije i na kanamicinsku i na gentamicinsku grupu antibiotika. Nijedna metiltransferaza pronađena kod producenata ne obezbeđuje rezistenciju na 4,5-DOS aminoglikozidne antibiotike.

3.2. Arm i Pam familija metiltransferaza

Od 2002. godine do danas otkriveno je pet različitih 16S rRNK metiltransferaza u kliničkim izolatima *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* (Yokoyama *et al.*, 2003; Galimand *et al.*, 2003 i 2005; Yan *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2004, 2005, 2007; Gonzales-Zorn *et al.*, 2005a i 2005b; Park *et al.*, 2006; Wachino *et al.*, 2006, 2007; Chen *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008).

Pet različitih 16S rRNK metiltransferaza su klasifikovane kao Arm familija metiltransferaza (ArmA, RmtA, RmpB, RmtC i RmtD).

S druge strane prisustvo metilaze, NpmA, koja vrši metilaciju A1408 kod klinički izolovanih bakterija potvrđeno je u samo jednom slučaju, kod *E. coli* (Wachino *et al.*, 2007). Ova metiltransferaza je klasifikovana kao član Pam familije metiltransferaza.

Ovih šest novootkrivenih 16S rRNK metiltransferaza, baš kao i metiltransferaze kod proizvođača, metiluju N7 guanina u poziciji 1405, odnosno N1 adenina u poziciji 1408 i na taj način obezbeđuju rezistenciju na širok spektar aminoglikozida. Geni za 16S rRNK metiltransferaze kod kliničkih izolata su smešteni na plazmidima, za razliku od aktinomiceta, proizvođača antibiotika, kod kojih se metilazni geni nalaze na hromozomu. Mada, prema najnovijim podacima iz literature (Yu *et al.*, 2009), geni za metiltransferaze kod patogenih bakterija mogu biti locirani i na hromozomu.

Prvi otkriveni član Arm familije je ArmA metiltransferaza pronađena kod kliničkog soja *Citrobacter freundii*, mada, osim deponovane sekvence nema drugih literaturnih podataka o ovom izolatu. Ubrzo potom je ArmA metiltransferaza identifikovana i dobro okarakterisana kod *K. pneumoniae* (Galimand *et al.*, 2003). Pokazano je da je gen *armA* smešten na konjugabilnom plazmidu kao deo funkcionalnog transpozona zajedno sa genima *ant3''9* (omogućava rezistenciju na streptomycin i spektinomycin) *sull* (omogućava rezistenciju na sulfonamide) i *dfrXII* (omogućava rezistenciju na trimetoprim) (Galimand *et al.*, 2005). ArmA metiltransferaza, locirana na transpozonu zajedno sa drugim genima za rezistenciju, je identifikovana i kod *E. coli* izolata iz životinja (Gonzales-Zorn *et al.*, 2005a).

Kod sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* iz kliničkih uzoraka pronađene su još dve 16S rRNK metiltransferaze, RmtA odnosno RmtB, koje na nivou aminokiselinske sekvence pokazuju 82% identičnosti (Yamane *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 2004). Kasnije je utvrđeno prisustvo metilaze RmtB i kod *E. coli* (Perichon *et al.*, 2007). Pronađeni sojevi su pokazivali visok nivo rezistencije na različite aminoglikozide uključujući amikacin, tobramicin, kanamicin i gentamicin.

Za produkte *armA* i *rmtB* gena je eksperimentalno određeno mesto metilacije, i pokazano je da ove metiltransferaze, kao što je i očekivano, modifikuju N7 guanin na poziciji 1405 (Liou *et al.*, 2006; Perichon *et al.*, 2007).

P. aeruginosa je pokazivao i rezistenciju na arbekacin, antibiotik koji može biti inaktivisan samo bifunkcionalnim enzimom koji poseduje acetiltransferaznu i fosfotransferaznu aktivnost, a koji nije do danas pronađen kod Gram negativnih bakterija (Doi *et al.*, 2004). *rmtA* gen je pronađen na transpozonu Tn5041 (Yamane *et al.*, 2004), a *rmtB* je deo velikog nekonjugabilnog plazmida *S. marcescens* koji se elektroporacijom može lako ubaciti u *E. coli* (Doi *et al.*, 2004).

Kod *E. coli* 1540 je detektovan *rmtB* gen na velikom konjugabilnom plazmidu. Pored ovog gena na istom plazmidu se nalazi gen *qepA* koji kodira transporter tj. pumpu za efluks kinolona iz ćelije čime je bakteriji obezbeđena rezistencija na kinolone norfloksacin i ciprofloksacin (Perichon *et al.*, 2007). Takođe, za ovaj gen je determinisano mesto metilacije, a to je N7 nukleotida G1405.

Identičnost sekvenci na aminokiselinskom nivou RmtA, RmtB i metiltransferaza iz aktinomiceta se kreće preko 30%. Identičnost između RmtA i GrmA, GrmB, KgmB i Sgm metilaza iznosi oko 32%, dok je identičnost sekvenci RmtB sa metiltransferazama iz aktinomiceta preko 30% (Savic, 2009). Visok G+C sastav RmtA i RmtB metilaza sugeriše mogući horizontalni transfer gena iz bakterija proizvođača antibiotika u Gram negativne patogene.

RmtC metiltransferaza, četvrta od 6 novih metiltransferaza, je detektovana i kod *Proteus mirabilis* (Wachino *et al.*, 2006). Ona je odgovorna za rezistenciju bakterija na 4,6 2-DOS. Mesto metilacije nije determinisano ali se pretpostavlja da je to G1405 po uzoru na metiltransferaze iz aktinomiceta koje pokazuju isti profil rezistencije na 4,6-DOS, ali i senzitivnost na 4,5-DOS. RmtC metiltransferaza pokazuje nizak procenat identičnosti sa ostalim metiltransferazama pronađenim u patogenima (oko 30%) kao i sa metiltransferazama iz aktinomiceta (manje od 25%).

RmtD je peta otkrivena 16S rRNK metiltransferaza iz Gram negativnih bakterija, a druga otkrivena u *Pseudomonas aeruginosa* nakon RmtA (Doi *et al.*, 2007). RmtD obezbeđuje rezistenciju na 4,6 2-DOS aminoglikozide ali ne i na apramicin, neomicin i streptomycin, što ukazuje da pripada grupi metiltransferaza koje deluju na G1405. RmtD pokazuje 42% identičnosti na aminokiselinskom nivou sa RmtB, 40% sa RmtA i manje od 29% identičnosti sa RmtC. Ove metiltransferaze su svega 29% do 31% identične sa ArmA.

Sve metiltransferaze iz patogenih bakterija pokazuju oko 20% do 30% identičnosti sa metiltransferazama iz aktinomiceta: GrmA, KgmB, Kmr i FmrO (Wachino *et al.*, 2006). Ne postoji direktan dokaz da geni iz kliničkih sojeva vode poreklo od zajedničkog pretka, mada se pretpostavlja da potiču od za sada, nepoznatog proizvođača aminoglikozidnih antibiotika.

Do danas, jedini otkriveni član Pam familije je NpmA metiltransferaza iz *E. coli* (Wachino *et al.*, 2007). NpmA je jedina do sada pronađena metiltransferaza koja obezbeđuje rezistenciju na 4,6 2-DOS aminoglikozide, kao što je amikacin i gentamicin, ali i na 4,5 2-DOS aminoglikozidne antibiotike-neomicin i ribostamicin. Mesto metilacije je determinisano i pokazano je da NpmA metiluje N1 adenin u poziciji 1408. Ovaj novi enzim pokazuje svega 30% identičnosti sa KamA metilazom iz *Streptomyces tenjimariensis*. G+C sastav *npmA* gena je 34% što je mnogo niže od G+C sastava gena za KamA metiltransferazu iz aktinomiceta koji iznosi 70%. Na osnovu ovih podataka je jasno da poreklo ovog gena treba tražiti kod bakterija proizvođača sa niskim G+C sastavom.

Geni za metiltransferaze kod patogenih bakterija su pronađeni na mobilnim genetičkim elementima, transpozonima i plazmidima. Ovi geni su asocirani sa genima koji omogućavaju rezistenciju na neke druge antibiotike i genima koji omogućavaju transpoziciju. Kombinacija transpozicije i konjugacije ima ključnu ulogu u širenju gena za metiltransferaze među enterobakterijama humanog i životinjskog porekla.

3.3 „House-keeping“ metiltransferaze i rezistencija na antibiotike

RNK metiltransferaznoj grupi enzima pripadaju i RNK metiltransferaze koje za substrat mogu da imaju tRNK i rRNK i neophodne su za pravilno funkcionisanje ribozoma odnosno translacije. Prepoznavanje rRNK od strane većeg broja „house-keeping“ metiltransferaza je mesto specifično i odvija se tokom sazrevanja rRNK. Poznato je da *E. coli* sadrži 10 metilovanih nukleotida u manjoj i 14 u većoj 50S ribozomalnoj subjednici. Svi metilovani nukleotidi se nalaze u regionima koji su

neophodni za funkcionisanje ribozoma kao što je mesto dekodiranja, iRNK i tRNK vezujuće mesto (Basturea *et al.*, 2006; Decatur *et al.*, 2002). Smatra se da „house-keeping“ metiltransferaze imaju ulogu u održavanju i stabilizaciji 3D strukture ribozoma što je neophodno za pravilnu translaciju. Dodatak metil grupe lokalno menja konformaciju rRNK i njenu interakciju sa specifičnim proteinima, tRNK i iRNK i tako utiče na efikasnost sinteze proteina.

U ribozomalnom A mestu u 16S rRNK *E. coli* „house-keeping“ metiltransferaze metiluju više nukleotida: C1402, C1407 i U1498. Metiltransferaza RsmF metiluje C1407 (Hallberg *et al.*, 2006), RsmE metiluje U1498 (Basturea *et al.*, 2006) dok je nepoznata metilaza koja deluje u poziciji C1402. Gen *ksgA* kodira RsmA (van Buul and Knnipenberg, 1985) metilazu koja vrši dimetilaciju dva adenina: A1518 i A1519; *rsmB* i *rsmC* geni kodiraju dva enzima koji metiluju C967 i G1207 (Tscherne *et al.*, 1999a, Tscherne *et al.*, 1999b).

Mada imaju osnovnu ulogu u održavanju normalne funkcije ribozoma, pokazano je da ukoliko dođe do gubitka neke od gore pomenutih modifikacija ribozomi pokazuju nizak do umeren nivo rezistencije na neke antibiotike. Prvi i najbolje opisani primer je KsgA ili RsmA metiltransferaza koja je odgovorna za dimetilaciju dva nukleotida koji se nalaze na 3' kraju 16S rRNK: A1518 i A1519. Izostanak metilacije A1519 direktno dovodi do rezistencije na kazugamicin najverovatnije promenom konformacije vezujućeg mesta za antibiotik koje se nalazi u kanalu između E i P mesta na 30S subjedinici (Vila-Sanjurjo *et al.*, 1999).

KsgA prepoznaje 30S subjedinicu ali ne i golu 16S rRNK. Kristalna struktura KsgA je pokazala da je ovaj protein najbliži N6,N6, adenzin dimetilazi ErmC' (O'Farel *et al.*, 2004). Ortolozi ovog enzima su pronađeni kod arheobakterija (O'Farel *et al.*, 2006), eukariota (Lafontaine *et al.*, 1994), hloroplasta (Tokuhisa *et al.*, 1998) i mitohondrija (Seidel-Rogol *et al.*, 2003). Nedavno je pokazano da KsgA ima ulogu kontrolora novoformiranih, 30S subjedinica koji su sposobni za translaciju (Connolly *et al.*, 2008) kao i da prepoznaje i modifikuje samo translaciono neaktivnu konformaciju 30S (Desai *et al.*, 2006).

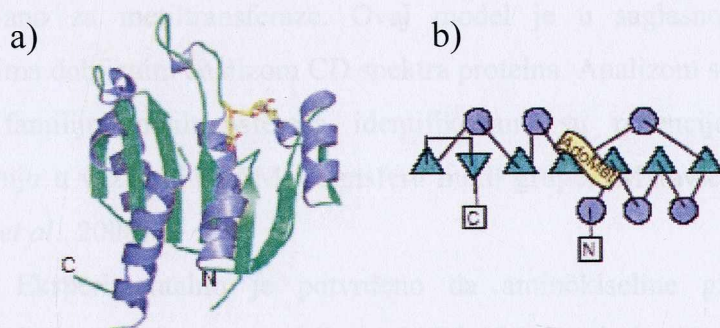
Slično KsgA metiltransferazi, usled gubitka metilacione aktivnosti *rsmG* gena koji kodira 16S rRNK metiltransferazu koja metiluje G527, javlja se rezistentan fenotip.

Streptomycin reaguje sa rRNK u ovom regionu i gubitak metilacije je u korelaciji sa niskim nivoom rezistencije na antibiotik (Okamoto *et al.*, 2007). Ukoliko dođe do gubitka funkcije TlyA metiltransferaze iz mikobakterija, koja modifikuje C1409 u 16S rRNK i C1920 u 23S rRNK, bakterije postaju rezistentne na kapreomicin i viomicin, dva antibiotika koja se vezuju za granične površine ribozoma (Johansen *et al.*, 2006).

4. Struktura i funkcija 16S RNK metiltransferaza

Metiltransferaze koje koriste SAM kao kofaktor u enzimskoj reakciji su podeljene u pet različitih klasa (Schubert *et al.*, 2003). Najbrojnija je klasa I i njoj pripadaju metiltransferaze koje mogu da modifikuju najrazličitije supstrate: proteine, DNK, RNK i mnoge male molekule. Ovoj klasi pripadaju i 16S rRNK metiltransferaze.

Zajednička karakteristika svih SAM-zavisnih metiltransferaza jeste prisustvo visoko stuktuiranog jezgra koje je nazvano „SAM-zavisna metiltransferazna struktura“ koji sadrži džep za vezivanje SAM. Ovo jezgro čini β ploča sastavljena od sedam lanaca. Lanac 7 je antiparalelan u odnosu na ostale i umetnut je između lanaca 5 i 6. Sama β ploča je oivičena α heliksima (Slika 6).



Jezgro klase I SAM-zavisnih metiltransferaza je visoko konzervisano i prisutno kod mnogih enzima koji prepoznaju različite supstrate. Kako proteini ove klase pokazuju veliku sličnost sa proteinima koji poseduju Rossmann-fold domene pa se pretpostavlja da i jedni i drugi vode poreklo od zajedničkog pretka.

Do skora je postojalo malo podataka vezanih za strukturu 16S rRNK metiltransferaza. Inicijalni pokušaji sagledavanja stukture Sgm 16S rRNK metiltransferaza načinile su istovremeno dve istraživačke grupe 1) Laboratorija za molekularnu genetiku aktinomiceta iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u saradnji sa Laboratorijom Greame Conn-a sa Univerziteta u Mančesteru i 2) Laboratorija Gordane Maravić Vlahoviček sa Odseka za biohemiju i molekularnu biologiju Farmaceutskog i Biohemijskog fakulteta u Zagrebu. Prvi rezultati, publikovani u isto vreme, tokom 2008 godine, su saglasni i potvrđuju da se Sgm protein sastoji iz dva domena manjeg N-terminalnog i većeg C-terminalnog domena, kao i da je veći C-terminus odgovoran za katalitičku i koenzimsku funkciju a da je funkcija manjeg N-terminusa prepoznavanje targeta (Maravic Vlahovicek *et al.*, 2008; Savic *et al.*, 2008).

Komparativnom analizom sekvenci i kompjuterskim modelovanjem napravljena je strukturalna baza za funkcionalnu karakterizaciju Sgm metiltransferaze. Model jasno pokazuje podelu proteina na dva velika strukturalna domena kao i to da u okviru C-terminusa 164 aminokiseline formiraju Rossmann-fold-u sličnu strukturu, kao što je i očekivano za metiltransferaze. Ovaj model je u saglasnosti sa eksperimentalnim podacima dobijenim analizom CD spektra proteina. Analizom sekvenci pripadnika Kgm i Arm familije metiltransferaza identifikovane su potencijalne aminokiseline koje učestvuju u vezivanju SAM i transferu metil grupe. (Maravic Vlahovicek *et al.*, 2008; Savic *et al.*, 2008).

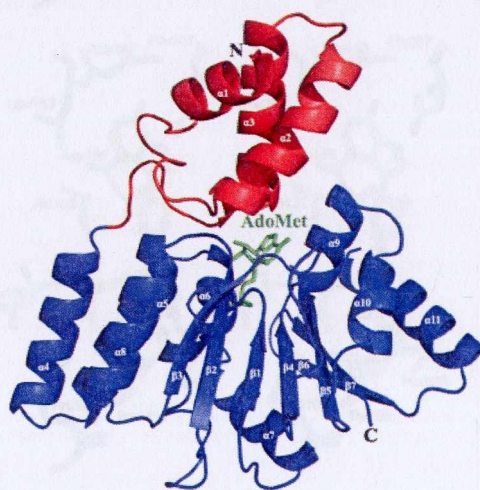
Eksperimentalno je potvrđeno da aminokiseline glicin na poziciji 135 i asparaginska kiselina na pozicijama 156 i 182 formiraju džep za vezivanje SAM, dok aminokiseline lizin na poziciji 199, glutaminska kiselina na pozicijama 205 i 267 i arginin na poziciji 236 učestvuju u transferu metil grupe (Savic *et al.*, 2008).

Prema *in silico* modelu N-terminalni domen ima ulogu u prepoznavanju targeta. S obzirom da Sgm metiltransferaza prepoznaje 16S rRNK samo u okviru kompletno struktuirane 30S subjedinice, pretpostavljeno je da je ribozomalni protein S12, koji se

nalazi u blizini nukleotida G1405 i A1408 odgovoran za interakciju Sgm proteina sa 30S subjedinicom (Con *et al.*, 2008). Uloga S12 bi mogla biti ili direktna, što bi značilo da Sgm interaguje sa S12 i rRNK ili indirektna kada bi protein modulisao strukturu rRNK praveći specifično mesto prepoznavanja jedino prisutno u intaktnoj 30S subjedinici. Da bi se detaljno objasnio molekularni mehanizam kako Sgm prepoznaje target, neophodno je napraviti kristal u kom bi Sgm metiltransferaza bila vezana za 30S subjedinicu.

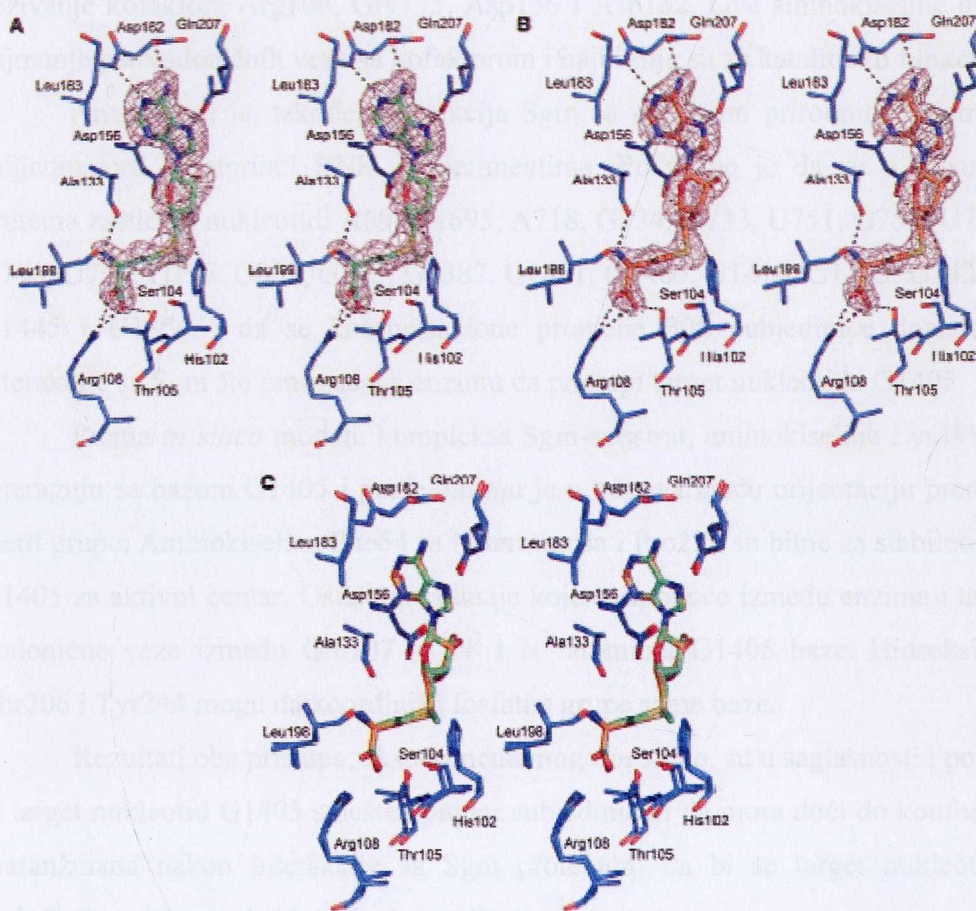
Od nedavno situacija vezana za stukturu i funkciju Sgm postaje mnogo jasnija s obzirom da je grupa autora, objavila rad sa prvom razrešenom trodimenzionalnom stuktrom Sgm 16S rRNK metiltransferaze poreklom iz proizvođača antibiotika u kompleksu sa kofaktorima S-adenozil metioninom (SAM) i S-adenozil homocisteinom (SAH) na rezoluciji od 2.0 i 2.1 Å (Husain *et al.*, 2010). Ovo nije prva razrešena struktura jedne 16S rRNK metiltransferaze; pre pomenutog rada, objavljene su razrešene strukture dve metiltransferaze iz patogenih bakterija ArmA i RmtB (Schmitt *et al.*, 2009).

Razrešena 3D struktura Sgm metiltransferaze kao i urađeni biohemijški eksperimenti pokazuju da je C-terminalni domen specifičan za familiju metiltransferaza kojoj pripadaju i ArmA i RmtB metiltransferaze. Prikazana sekundarna stuktura Sgm metiltransferaze u kompleksu sa kofaktorom (slika 7), dobijena na osnovu difrakcije X zraka je u saglasnosti sa ranijim kompjuterskim predikcijama tercijarne strukture ovog proteina (Maravic Vlahovicek *et al.*, 2008).



Slika 7. Struktura Sgm metiltransferaze (Husain *et al.*, 2010). Dijagram Sgm-kofaktor kompleksa. Obeleženi su N (crvena boja) i C terminusi (plava boja), kao i kofaktor SAM (zeleno boja).

Eksperimentalni podaci potvrđuju domensku prirodu proteina: N-terminus (Asp8-Pro70) i C terminus (Asn71-Gln273). C-terminus poprima Rossmann strukturu tipičnu za klasu I metiltransferaza, i sastoji se od centralne sedmolančane β ploče koju okružuju tri α heliksa sa svake strane. C-terminus je proširen ka N terminusu za još dva α heliksa. Sam N-terminus je u vidu svežnja koji se sastoji od tri α heliksa. Aktivno mesto je locirano u C-terminusu koji interaguje sa SAM i SAH. Na slici 7 je prikazana mapa elektronske gustine u aktivnom mestu Sgm.



Slika 8. Mapa elektronske gustine u aktivnom centru Sgm (Husain *et al.*, 2010). A) Sgm-SAM kompleks B) Sgm-SAH kompleks C) Superponirani kompleksi Sgm-SAM i sgm-SAH.

Sa slike se uočava da aminokiseline His102, Ser104, Thr105, Arg108, Ala133, Asp156, Asp182, Leu183, Leu198 i Gln207 sačinjavaju mesto vezivanja kofaktora. Ove aminokiseline interaguju i sa SAM i sa SAH i imaju ulogu u metilaciji G1405. Enzim i kofaktor su povezani sa 11 vodoničnih veza. Aminokiseline Leu183, Gln207 i konzervisana Asp182 interaguju sa adenzilnim ostatkom kofaktora dok konzervisana Asp156 reaguje sa 2' i 3' OH grupama riboze. Ostale konzervisane aminokiseline Leu198, Ala133 i Arg108 reaguju sa karboksi propil ostatkom SAM ili SAH.

Mutacionom analizom je pokazano da su 4 najbitnije aminokiseline odgovorne za vezivanje kofaktora Arg108, Gly135, Asp156 i Asp182. Ove aminokiseline obezbeđuje najmanje pet vodoničnih veza sa kofaktorom i najbitnije su za katalitičku funkciju Sgm.

Analizirana je, takođe, interakcija Sgm sa njegovim prirodnim supstratom 30S subjedinicom „footprint“ RNK eksperimentima. Pokazano je da su u prisustvu Sgm proteina zaštićeni nukleotidi A694, A695, A718, G734, G733, U751, G755, U757, G765, A790, U793, U798, G887, G895, G1387, G1401, G1405, U1414, G1423, G1426, G1435, U1445 i U1450 i da se konformacione promene 30S subjedinice događaju nakon interakcije sa Sgm što omogućava enzimu da pristupi target nukleotidu G1405.

Prema *in silico* modelu kompleksa Sgm-supstrat, aminokiseline Lys199 i Ser104 interaguju sa bazom G1405 i pozicioniraju je u odgovarajuću orijentaciju prema donoru metil grupe. Aminokiselina Phe64 sa N-terminusa i Pro229 su bitne za stabilno vezivanje G1405 za aktivni centar. Ostale interakcije koje su moguće između enzima i targeta jesu vodonične veze između Glu107 sa N² i N³ atomima G1405 baze. Hidroksilne grupe Thr206 i Tyr244 mogu da koordinišu fosfatne grupe same baze.

Rezultati oba pristupa, eksperimentalnog i *in silico*, su u saglasnosti i potvrđuju da je target nukleotid G1405 smešten unutar subjedinice i da mora doći do konformacionog rearanžmana nakon interakcije sa Sgm proteinom da bi se target nukleotid G1405 „izložio“ enzimu, te da bi došlo do metilacije.

II CILJ RADA

Kod proizvođača aminoglikozidnog antibiotika G-52, *M. zionensis*, rezistencija na sopstveni produkt je omogućena postojanjem enzima Sgm metiltransferaze. Ovaj enzim modifikuje A mesto u okviru 3' kraja 16S rRNK, čineći ga nedostupnim delovanju antibiotika. U ranijim radovima je dokazano da je ekspresija *sgm* gena regulisana na nivou inicijacije translacije. Prema rezultatima dobijenim *in vivo* korišćenjem *sgm-lacZ* genskih i operonskih fuzija, predložen je model autoregulacije *sgm* gena, prema kome Sgm metiltransferaza, nakon što izvrši modifikaciju primarnog targeta 16S rRNK, prepoznaje i vezuje sekundarni target, sopstveni iRNK molekul, čime je onemogućena inicijacija translacije.

Cilj ovog rada je *in vitro* analiza translacione autoregulacije *sgm* gena, odnosno, izučavanje mehanizma po kome se ova regulacija odigrava. U tu svrhu je potrebno prečistiti rekombinantni Sgm protein metal afinitetnom hromatografijom, koji će biti korišćen u reakcijama vezivanja za sopstvenu iRNK u cilju određivanja mehanizma regulacije. Pored toga, ispitivanje regulacije *sgm* gena na nivou inicijacije translacije će biti urađeno u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju.

Drugi cilj ovog rada je utvrđivanje mesta delovanja Sgm metiltransferaze i u tu svrhu biće korišćena Sgm metiltransferaza i KgmB metiltransferaza, za koju je ranije utvrđeno da deluje na poziciji G1405 u okviru 16S rRNK, u metilacionim esejima sa 30S subjedinicama izolovanim iz rezistentnih bakterija čiji su ribozomi metilovani *in vivo*, dejstvom Sgm. Na ovaj način indirektno može da se ukaže na primarno mesto delovanja Sgm metiltransferaze.

III MATERIJAL I METODE

1. Bakterijski sojevi i korišćeni plazmidi

U ovom radu korišćeni su sojevi *E. coli*:

NM522 (*supE*, *thi*, (*hsdMSmciB*)5, (*lac-proAB*), F'(*proAB*⁺, *lacIq*, *lacZ* M15))

DH5α (*F*, Δ*lac*, U169(Φ80 *lacZ* ΔM15), *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *gzaA96*, *endA1*, *thi1*, *relA1*)

Plazmidi korišćeni i konstruisani u ovom radu prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Korišćeni i konstruisani plazmidi.

plazmid	referentne karakteristike	referenca
pQE30	Amp ^r , lacO, T5 (3.4 kb)	QIAGEN
pBluescript II SK+/-	Amp ^r , lacZ (2.9 kb)	Stratagene
pUC18	Amp ^r , lacZ (2.7 kb)	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985.
pUC19	Amp ^r , lacZ (2.7 kb)	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985.
pUMK 33	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen (<i>Sall/Sall</i>) subkloniran u pUC19 (3,82 kb)	Kojić, 1992
pΔK1	Amp ^r , Gm ^r , skraćeni <i>kgmB</i> fragment (<i>SmaI/HindIII</i>) subkloniran u pUC19 (4,2 kb)	Milojević, 1998.
pQES5	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen (<i>BamHI/HindIII</i>) subkloniran u pQE30 (4,36 kb)	ovaj rad
pHDV-5'UTRsgm	Amp ^r , skraćeni 5'UTR <i>sgm</i> gena (<i>EcoRI/NheI</i>) subkloniran 3'HDV	ovaj rad

Tabela 1 (nastavak). Korišćeni i konstruisani plazmidi

plazmid	referentne karakteristike	referenca
pHDV-P1sgm	Amp ^r , 5'UTR <i>sgm</i> gena od P1 promotora (<i>EcoRI/NheI</i>) subkloniran 3'HDV	ovaj rad
pHDV-P2sgm	Amp ^r , 5'UTR <i>sgm</i> gena od P2 promotora (<i>EcoRI/NheI</i>) subkloniran 3'HDV	ovaj rad
pT7sgm-P1	Amp ^r , <i>sgm</i> gen od P1 promotora (<i>EcoRI/HindIII</i>) kloniran pod T7 promotor vektora pGEM-T easy	ovaj rad
pT7sgm-m5	Amp ^r , <i>sgm</i> gen sa deletiranom regul. sekvencom (<i>BamHI/HindIII</i>) kloniran pod T7 promotor vektora pGEM-T easy	ovaj rad
pLac-m5-18	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen sa deletiranom regul. sekvencom (<i>EcoRI</i>) kloniran pod <i>lacZ</i> promotor u pUC18	ovaj rad
pT5-wt-sgm	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen od P1 promotora (<i>EcoRI</i>) kloniran pod T5 promotor u pQE30 vektor	ovaj rad
pSgm57	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen (<i>Sall/Sall</i>) sa mutiranom drugom potencijalnom regulatornom sekvencom, ukloniran u pUC19	ovaj rad
pPCR57	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen (<i>BamHI/HindIII</i>), sa deletiranom prvom i mutiranom drugom potencijalnom regulatornom sekvencom, ukloniran u pUC18	ovaj rad

2. Medijumi za rast bakterija

Bakterijski sojevi su gajeni na čvrstim ili tečnim podlogama sa LB hranljivim medijumom (1% bakto-tripton, 0.5% NaCl, 0.5% kvašćev ekstrakt, pH 7.5; za čvrste podloge uz dodatak 1.5% agara; sterilizacija autoklaviranjem, 20 minuta na 121°C). U zavisnosti od eksperimenta u medijum su dodavani antibiotici u sledećim koncentracijama: ampicilin 100 µg/ml, gentamicin 30 µg/ml, kanamicin 25 µg/ml. Za detekciju aktivnosti β-galaktozidaze (plavo-bela selekcija) na čvrste podloge je nanošeno po 40 µl 40 µg/ml rastvora 5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktozida (X-gal). Za indukciju *lac* promotora korišćen je izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid (IPTG) u finalnoj koncentraciji 1 mM. Svi sojevi su gajeni na 37°C.

Sojevi *M.melanosporea* i *S. lividans* su gajeni na čvrstim, NE (10g glukoza, 2g kvašćev ekstrakt, 1g mesni ekstrakt, 2g kazaamino kiseline, 20g agar, 1l vode) ili tečnim, YEME (0,3% ekstrakt kvasca, 0,5% baktopepton, 0,1% maltoza, 34% saharoza, 1% glukoza, 5mM MgCl₂, 0,5% glicin) hranljivim podlogama.

3. Mini metoda za izolaciju plazmidne DNK iz *E. coli*

Pri izolaciji plazmidne DNK polazi se od prekonoćne kulture *E. coli* NM522 koja je dobijena zasejavanjem pojedinačnih kolonija u 3 ml LB medijuma uz obavezno dodavanje odgovarajućeg antibiotika (Birnboim and Doly, 1979). Talog dobijen centrifugiranjem prekonoćne kulture, koja je rasla na 37°C uz aeraciju pri 180 obrt/min, resuspendovan je u 100 µl svežeg rastvora za lizozim (2 µg lizozima u 1 ml destilovane vode). Posle inkubacije od 5 min. na sobnoj temperaturi dodavano je 200 µl sveže pripremljene smeše 1% SDS-a i 0.2 M NaOH. Nakon laganog mešanja u dobijeni lizat je dodavano 150 µl 3M Na-acetata pH 4.5, smeša je inkubirana 10 min. na -20°C, a zatim centrifugirana 20 min. na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi, na +4°C pri čemu su istaloženi ostaci citoplazmatske membrane, proteini i DNK vezana za membranu. Dobijeni supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK prebacivan je u čiste Eppendorf epruvete, a potom je rađena ekstrakcija proteina dodavanjem 200 µl neutralnog fenol-hloroforma (1:1), vorteksovanjem i centrifugiranjem (10 min. na sobnoj temperaturi;

13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Vodena-gornja faza je pažljivo prebacivana u čiste epruvete, a zatim je vršena precipitacija dodavanjem 2 zapremine hladnog 95% etanola (-20°C). Precipitat je staložen centrifugiranjem u trajanju od 20 min. na 13000 obrt/min na +4°C (mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (1 ml; -20°C), zatim osušen u "Speed vac"-u i resuspendovan u 50 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) koji sadrži 0.2 mg/ml RN-aze A.

Za izolaciju plazmidne DNK iz *E. coli* DH5α korišćena je druga metoda, zasnovana na alkalnoj lizi kao i prethodna. Talog dobijen centrifugiranjem 3 ml prekonocne kulture resuspendovan je u 100 µl rastvora PI (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RN-aza I, pH 8). U uzorak je dodavano 200 µl rastvora PII (0.2 M NaOH, 1% SDS), lagano promešano, a potom dodavano još 150 µl rastvora PIII (3 M K-acetat pH 5.5) i lagano promešano invertovanjem Eppendorf epruvete. Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 10 minuta uzorci su centrifugirani (sobna temperatura; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Dobijeni supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK prebacivan je u čiste Eppendorf epruvete, a zatim je vršena precipitacija dodavanjem 1 ml 95% etanola (-20°C). Sledilo je centrifugiranje u trajanju od 10 minuta (sobna temperatura; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Po odlivanju supernatanta talog je resuspendovan u 500 µl rastvora PIV (100 mM Na-acetat, pH 6), a potom je vršena precipitacija dodavanjem 1 ml 95% etanola (-20°C) i centrifugiranjem (10 min. na sobnoj temperaturi; 13 000 obrt/min; mikrocentrifuga). Dobijeni talog je sušen pod vakumom i resuspendovan u 100 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5).

Za dobijanje veće količine ili bolje prečišćavanje plazmidna DNK je izolovana upotrebom komercijalnih rastvora (QIAGEN Plasmid Kit i QIAGEN Mini-prep Kit, QIAGEN). Oba kita se zasnivaju na alkalnoj lizi bakterija (Birnboim, 1983) i prečišćavanju plazmida na komercijalnoj koloni koja specifično vezuje DNK.

4. Enzimske reakcije sa DNK

4.1. Obrada DNK restrikcionim enzimima

Plazmidna DNK obrađivana je restrikcionim endonukleazama prema uputstvu proizvođača datog enzima. Digestije su se odvijale u puferima specifičnim za restrikcione enzime (Pharmacia i Fermentas). Inaktivacija restrikcionih enzima vršena je gde je to bilo moguće inkubacijom 20 minuta na 65°C, odnosno 15 minuta na 85°C.

4.2. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK

Defosforilacija 5' slobodnih krajeva fragmenata DNK vršena je alkalnom fosfatazom (CIAP, Fermentas) po uputstvu proizvođača: preparati DNK (1-20 pmol) rastvoreni u 1xCIAP puferu (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂) inkubirani su sa 1 U enzima, 30 minuta na 37°C. Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran inkubiranjem 15 minuta na 85°C.

4.3. Ligiranje DNK fragmenata

Ligiranje molekula DNK rađeno je u komercijalnom ligacionom puferu sastava: 40 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, a T4 DNK ligaza (Fermentas) dodavana je u desetomikrolitarske reakcije u količini koja odgovara 1 Weiss jedinici. Reakcija se odvijala na 16°C u trajanju od najmanje 4 sata. Molarna koncentracija inserta u reakciji održavana je tri do pet puta većom od koncentracije vektora da bi se favorizovala intermolekulska ligacija.

5. Prečišćavanje DNK fenolom

Uzorak DNK je razblaživan vodom do finalne zapremine od 200 µl. Po dodavanju iste zapremine neutralnog fenol-hloroforma (1:1), uzorak je dobro promešan na vorteksu i centrifugiran (10 minuta, 13000 obrt/min, mikrocentrifuga). Vodena-gornja faza, je pažljivo prebacivana u čiste epruvete, a zatim je rađena precipitacija dodavanjem 1/10 zapremine 3 M Na-acetata i 2.5 volumena hladnog 95% etanola (-20°C). Nakon inkubacije na -70°C u trajanju od 20 minuta precipitat je staložen centrifugiranjem (20

minuta, 13000 obrt/min, +4°C, mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (1 ml; -20°C), zatim osušen pod vakuumom i resuspendovan u vodi.

6. Sinteza DNK reakcijom lančane polimerizacije

Za modifikaciju 5' i 3' krajeva *sgm* gena radi kloniranja u ekspresione vektore korišćena je reakcija lančane polimerizacije (PCR) uz upotrebu odgovarajućih prajmera (Pharmacia LKB). Sekvence korišćenih prajmera navedene su u tabeli 2.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u reakcijama PCR-a.

Ime prajmera	Sekvenca prajmera
sgmCCTGCCCfor (5' prajmer, uvodi <i>EcoRI</i> restrikciono mesto i promotor za T7 RNK polimerazu)	5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAG GGAGACGGTGGGCCGGCGAG-3'
sgmCCGCCCrev (3' prajmer, uvodi <i>NheI</i> restrikciono mesto)	5'-GTTTCGCCGCCCATGCTAGC-3'
ForP1sgm (5' prajmer, uvodi <i>EcoRI</i> restrikciono mesto i promotor za T7 RNK polimerazu)	5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GAGAGTGTGCGATCCGGT -3'
Rev+80sgm (3' prajmer, uvodi <i>NheI</i> restrikciono mesto)	5'-CGGCTAGCGCCACCGTCTGGTAAC -3'
ForP2sgm (5' prajmer, uvodi <i>EcoRI</i> restrikciono mesto i promotor za T7 RNK polimerazu)	5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GAGACCGCCAAGTGTGC-3'
RevSTOPsgm (3' prajmer, uvodi <i>HindIII</i> restrikciono mesto)	5'-CCCAAGCTTCTATTTCTGAATGACGTA -3'
sgmin vitro translac (5' prajmer ya deleciju regulatorne sekvence; uvodi <i>BamHI</i> restrikciono mesto i	5'-GCGGATCCTTGGAGGGACCGATG-3'

PCR reakcije su pripremane u reakcionoj smeši od 50 μ l sledećeg sastava: 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 3% DMSO, 0.2 mM dNTP, 100 pmol svakog prajmera, 1 U Taq polimeraze (Fermentas) i 50 ng plazmidne DNK matrice. Reakcije su se odvijale po šemi prikazanoj u tabeli 3.

Tabela 3. Šema reakcije PCR-a

	temperatura	Vreme	faza reakcije
	95°C	5 min	hot start
15 ciklusa PCR-a	95°C	1 min	denaturacija dvolančane DNK
	65°C, $\Delta=-1^\circ\text{C}$	1,5 min	hibridizacija (<i>eng.</i> annealing)
	72°C	2 min	sinteza, elongacija
15 ciklusa PCR-a	95°C	1 min	denaturacija dvolančane DNK
	50°C	1,5 min	hibridizacija (<i>eng.</i> annealing)
	72°C	2 min	sinteza, elongacija
	72°C	10 min	finalna elongacija

Pri svakom postavljanju PCR reakcije kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša koja je imala sve pomenute neophodne sastojke osim DNK matrice.

7. Elektroforeza DNK

Elektroforeza DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima koji su pravljani otapanjem agaroze u TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, finalno pH 8.3) sa etidijum bromidom (0.5 mg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je TBE pufer. Agarozni gelovi različitog procenta (1-2) korišćeni su u zavisnosti od toga koje veličine DNK molekula je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine fragmenata DNK dobijenih posle digestije restrikcionim enzimima određivane su poređenjem njihove elektroforetske

pokretljivosti sa standardima molekularnih masa. U eksperimentalnom radu su korišćeni markeri molekularnih veličina:

- λ DNK digerirana *Hind*III i *Eco*RI restrikcionim enzimima pri čemu su dobijeni fragmenti DNK dužine: 21400 bp, 5170 bp, 4310 bp, 3530 bp, 2020 bp, 1940 bp, 1610 bp, 1360 bp, 940 bp, 860 bp, 580 bp i 150 bp.

- 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) - sadrži fragmente DNK veličine od 100 do 2000 bp, koji se međusobno razlikuju za 100 bp.

Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorske boje (bromfenol plavo i ksilencijanol), a detekcija uzoraka na gelu postizana je njihovim osvetljavanjem ultra-ljubičastim svetlom (266nm).

8. Elektroelucija DNK

Za izolaciju fragmenata DNK dobijenih sećenjem restrikcionim enzimima ili u PCR reakciji iz agaroznog gela su isecani delovi u kojima se nalazi željeni DNK fragment. Isećeni komad gela stavljen je u crevo za dijalizu ispunjeno TBE puferom. Pod uticajem električnog polja (100 V, 1h) DNK je izlazila iz gela u pufer koji je sakupljen. Etidijum bromid je ekstrahovan izoamil alkoholom (zapreminski odnos 1:1), a DNK je precipitirana iz pufera na već opisani način.

9. Transformacija *E. coli*

Kompetentne ćelije *E. coli* sojeva pripremane su isključivo hemijskom metodom. Kompetentne DH5 α *E. coli* su pripremane tako što su uzgajane u LB medijumu na 37°C uz snažnu aeraciju do optičke gustine kulture od 0.5 na 600 nm (Hanahan, 1983). Nakon toga ćelijski rast je zaustavljan hlađenjem kulture (10 min. na +4°C). Ohlađena kultura je taložena (10 min, 6000 obrt/min na +4°C, Sorvall SS34 rotor), ćelije iz taloga su resuspendovane u istoj zapremini hladnog 0.1 M CaCl₂ i inkubirane 15 min. na ledu. Nakon inkubacije, ćelije su taložene kao i ranije, zatim nežno resuspendovane u 12.5 puta

manjoj zapremini hladnog RF2 pufera (10 mM MOPS, pH 6.8; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15% glicerol) i inkubirane 15 minuta na ledu. Po završenoj inkubaciji, suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od po 0.2 ml koji su trenutno zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C do korišćenja.

Prilikom korišćenja, zamrznute kompetentne ćelije su otapane na ledu. Suspenziji kompetentnih ćelija dodavana je DNK (u zapremini manjoj od 20 µl, ukupne količine DNK manje od 0.2 µg) i suspenzija je inkubirana 10 do 60 minuta na ledu. Nakon inkubacije ćelije su izlagane termičkom stresu u trajanju od 2 min. na 42°C i 5 min. na ledu. Ćelije su posttransformaciono oživljavane dodavanjem 0.8 ml neselektivnog bogatog medijuma i inkubiranjem uz intenzivnu aeraciju od 30 do 60 minuta. Ćelije su zatim razmazivane na selektivne podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata. Efikasnost transformacije bila je od 10⁵-10⁷ transformanata po µg DNK zavisno od načina pripremanja.

Kompetentne *E. coli* NM522 ćelije za jednokratnu upotrebu pripremane su kalcijum-hloridnom metodom (Mandel and Higa, 1970). Pojedinačna bakterijska kolonija je zasejavana u 5 ml LB medijuma. Nakon prekonoćne inkubacije (37°C, 180 obrt/min) kultura je razblaživana 1000 puta u svežem LB medijumu i dalje inkubirana pod istim uslovima do srednje logaritamske faze rasta (OD₆₀₀= 0.5). Rast ćelija je zaustavljan inkubacijom kulture na ledu 10 minuta. Posle taloženja 1.5 ml kulture centrifugiranjem (10 minuta na 5000 obrt/min, +4°C, mikrofuga) talog ćelija je resuspendovan u 1.5 ml hladnog 0.1 M CaCl₂. Suspenzija je inkubirana na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije, ćelije su taložene kao i ranije, a potom resuspendovane u 50 µl hladnog 0.1 M CaCl₂. Nakon inkubacije 30 min. na ledu u ćelijsku suspenziju je dodavana DNK i dalje nastavljen rad po već opisanoj proceduri za *E. coli* DH5α ćelije.

10. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnog His₆- Sgm proteina

Ekspresioni vektor pQES5 je transformisan u *E. coli* soj NM522 i transformanti su selektovani na LB podlogama sa ampicilinom. Funkcionalnost Sgm-His₆ fuzionog

proteina proveravana je zasejavanjem na LB podloge sa kanamicinom odnosno gentamicinom.

10.1. Indukcija i ekspresija rekombinantnog His₆- Sgm proteina

Za izolaciju rekombinantnog proteina Sgm koji ima dodatnih 6 histidina na N-terminusu (His₆-Sgm) korišćen je soj *E. coli* NM522 transformisan pQES5 plazmidom. Sa 20 ml prekonocne kulture inokulisano je 1000 ml tečnog LB medijuma sa 100 µg/ml ampicilina. Bakterije su rasle na 37°C uz intenzivnu aeraciju do OD₆₀₀ 0,6. Potom je indukovana ekspresija proteina dodavanjem 1mM IPTG-a, a ćelije ostavljene da dalje rastu pod istim uslovima još 3h. Po isteku ovog vremena bakterijske ćelije su sakupljane centrifugiranjem (4000 x g, 20 minuta) i do dalje upotrebe čuvane na -20°C.

10.2. Izolovanje ukupnih solubilnih proteina iz *E. coli* mehaničkim lomljenjem u francuskoj presi

Talog bakterijske kulture dobijen nakon indukcije resuspendovan je u 30ml pufera za lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0). Nakon toga ćelijama je dodavan lizozim finalne koncentracije 2mg/ml i ova smeša je inkubirana 30 minuta na ledu. Tretman lizozimom omogućava stvaranje pora u ćelijskom zidu i efikasnije oslobađanje ćelijskog sadržaja u procesu mehaničkog lomljenja u francuskoj presi. Francuska presa je podešena za rad na pritisku u rasponu od 16000 do 18000 lb/in². Bakterijska suspenzija je 2 puta propušтана kroz presu sa hlađenjem na ledu između dva propuštanja. Nakon mehaničkog lomljenja ćelija rastvor je centrifugiran 30 minuta na 10000 x g, +4°C, Sorvall SS34 rotor. Supernatant sa rastvorenim ćelijskim proteinima je filtriran kroz 0,45µm filter i nanošen na kolonu za afinitivnu hromatografiju.

10.3. Prečišćavanje rekombinantnog His₆- Sgm proteina iz *E. coli*

Za prečišćavanje proteina His₆-Sgm korišćena je Ni-NTA agarozna (Ni-Nitrilotriacetic acid agarose, Qiagen) kao medijum za afinitivnu hromatografiju (Porath *et al.*, 1975.). Ova tehnika se zasniva na reverzibilnoj reakciji između bočnih lanaca aminokiselina i imobilisanih metalnih jona (histidina i dvovalentnog nikla). Metalni jon se vezuje preko 4 helatne veze za NTA koja je sama vezana za sefarozu. Ovako vezan nikl je veoma stabilan i ostaje vezan za NTA i pod vrlo jakim denaturišućim uslovima kao što je 6M guanidin. Rekombinantni proteini sa histidinskim epitopom se mogu eluirati sa Ni-NTA agaroze na 2 načina: puferom sa kiselim pH (pH 5,0) ili niskim koncentracijama imidazola. Elucija se dešava kad imidazol, koji je sličan histidinu, počne da kompetira proteinu za vezivanje za jon Ni.

10.4. Prečišćavanje rekombinantnog His₆- Sgm proteina iz *E. coli* pod nativnim uslovima

Izolovani, solubilni ćelijski proteini rastvoreni u puferu za lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) su nanošeni na kolonu sa Ni-NTA agarozom čija je zapremina bila 2ml. Brzina protoka kroz kolonu je podešena tako da ne bude manja od 1 ml/5 minuta da bi vezivanje proteina za smolu bilo efikasnije. Zatim je Ni-NTA agarozna prana 5 puta sa po 1ml pufera za pranje nativnih proteina (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0). Po završenom pranju, protein vezan za smolu je eluiran 5 puta sa po 0,5ml pufera za eluciju nativnih proteina (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) i čuvan na temperaturi +4°C.

10.5. Dijaliza proteina

Za određene eksperimente bilo je potrebno promeniti pufer u kome je Sgm protein eluiran sa Ni-NTA agaroze. Određena zapremina izolovanog proteina stavljena je u crevo za dijalizu, potopljena u hiljadu puta veću zapreminu pufera za dijalizu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, pH 7.5) i inkubirana 4h na +4°C uz stalno mešanje. Nakon toga pufer za dijalizu je zamenjen svežim i dijaliza je nastavljena preko noći.

11. Analiza proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom

Elektroforetska analiza proteina rađena je na poliakrilamidnim gelovima pri denaturišućim uslovima u diskontinuiranom puferskom sistemu (Laemmli, 1970).

Korišćen je gel za razdvajanje (*eng.* running gel) koncentracije akrilamida 12.5% u rastvoru sastava: 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8; 0.1% SDS; 0.001% TEMED; 0.1% amonijum persulfat. Gel za koncentrovanje proteina (*eng.* stacking gel) je nalivan nakon polimerizacije gela za razdvajanje, a sadržao je: 5% akrilamid; 0.125 M Tris-HCl pH 6.8; 0.1% SDS; 0.001% TEMED; 0.1% amonijum persulfat. Radni elektroforetski pufer se sastojao od 0.025 M Tris; 0.2 M glicin; 0.1% SDS; pH 8.3. Sastav pufera za uzorak je bio sledeći: 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β -merkaptoetanol. Pre nanošenja na gel uzorci su dodatno denaturisani inkubacijom od 5 minuta na 95°C. Parametri strujnog kola se podešavaju u zavisnosti od veličine gela te su za gel veličine 10 x 8 cm iznosili: 25 mA, 130 V, 1.5 h. Detekcija proteina u gelu vršena je fiksiranjem i bojenjem u rastvoru koji sadrži 0.025% boju Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250, 45% metanol i 10% sirćetnu kiselinu. Gel je inkubiran u rastvoru za bojenje 1-2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon bojenja gel je odbojavan u rastvoru 45% metanola i 10% sirćetne kiseline, nekoliko sati na sobnoj temperaturi. Potpuno obezbojavanje do pojave jasnih traka proteina postizano je ispiranjem gela u 7% sirćetnoj kiselini preko noći.

12. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je metodom po Bradfordu koja se zasniva na upotrebi bojenog reagensa tj. kiselog rastvora boje CBB G-250 (BioRad Protein Assay, BioRad) (Bradford, 1976). Za određivanje koncentracije proteina korišćena je mikroesej procedura koja podrazumeva mešanje 0.2 ml bojenog reagensa sa 0.8 ml rastvora proteina nepoznate koncentracije. Nakon inkubacije od 15 minuta merena je apsorbancija na 595 nm naspram slepe probe. Izmerene vrednosti apsorbancije su prevedene u koncentraciju proteina ekstrapolacijom sa krive koja predstavlja zavisnost A_{595} od poznatih koncentracija proteinskog standarda (BSA, bovin serum albumine, *eng.*).

13. Imuno blot (Western blot) analiza proteina

Imuno ili Western blot analiza proteina zasniva se na razdvajanju proteina na SDS poliakrilamidnom gelu, njihovom transferu na nitroceluloznu membranu i specifičnoj imunohemijskoj detekciji (Burnette, 1981). Transfer proteina na nitroceluloznu membranu (Hybond C, Amersham) odvijao se u jedinici za elektrotransfer (Multiphor II, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) u polju konstantne jačine struje od 0.8 mA/cm^2 membrane u trajanju od 1 sat (Towbin *et al.*, 1979). Pre elektrotransfera gel i membrana su inkubirani 30 min. u transfer puferu sledećeg sastava: 0,3% Tris-HCl; 1,44% glicin i 20% metanol. Nakon transfera proteini su fiksirani na membrani petnaestominutnom inkubacijom u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 45% metanola na sobnoj temperaturi. Membrana je potom ispirana vodom i proteini su reverzibilno bojeni jednogminutnim stajanjem u rastvoru 1% Ponceau S u 5% sirćetnoj kiselini. Ovim je omogućena vizualizacija transferovanih proteina na membrani. Pre same imunohemijske reakcije nespecifična vezivna mesta na membrani blokirana su 2% rastvorom nemasnog mleka u TBST-u (*eng.* Tris Buffered Saline + Tween 20; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20) jednočasovnom inkubacijom na sobnoj temperaturi pri 0.3 ml/cm^2 membrane.

Zečji antiserum koji je sadržao primarna anti-Sgm poliklonska antitela rastvoren je u TBST-u u odnosu 1:500 i membrana je inkubirana 1h u $0,15 \text{ ml}$ rastvora antitela po cm^2 membrane uz mešanje. Nakon toga su nevezana primarna antitela ispirana TBST-om tri puta po 5 minuta. Zatim su za kompleks antigen - primarno antitelo vezivana sekundarna antitela specifična za zečje IgG konjugovana sa alkalnom fosfatazom (Anti-rabbit IgG, Sigma Immunochemicals). Ova interakcija se odvijala pri inkubaciji membrane 1h u rastvoru sekundarnih antitela razblaženja 1:8000 ($0,15 \text{ ml/cm}^2$ membrane). Nakon ispiranja nevezanih sekundarnih antitela nastali imuno kompleks detektovan je dodavanjem supstrata za alkalnu fosfatazu NBT/BCIP (nitrblue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Promega) rastvorenog u puferu 100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2 . Bojena reakcija je zaustavljena nakon 5 minuta ispiranjem membrane vodom.

14. Ispitivanje interakcije RNK i Sgm proteina metodom usporene elektroforetske pokretljivosti ili EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti je jednostavna i osjetljiva metoda za određivanje interakcija između proteina i RNK. Metoda je zasnovana na razdvajanju kompleksa protein-RNK i slobodne RNK u nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Kompleksi proteina i RNK se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u odnosu na slobodnu RNK. Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti može se podeliti u dva dela:

1. pripremanje i obeležavanje RNK probe
2. vezivanje proteina za RNK i određivanje smanjene elektroforetske pokretljivosti kompleksa protein-RNK

14.1. Pripremanje DNK matrice za *in vitro* transkripciju

Regulatorni netranslatirajući region *sgm* gena je umnožen i modifikovan reakcijom PCR-a korišćenjem 5' prajmera *sgmCCTGCCCC*for koji uvodi *EcoRI* restrikciono mesto i promotor za T7 RNK polimerazu, i 3' prajmera *sgmCCGCCCrev*, koji uvodi *NheI* restrikciono mesto. Dobijeni PCR produkt je radi lakšeg čuvanja i manipulacije ukloniran u plazmid pGem-T easy. Ovaj plazmid je, da bi poslužio kao matrica za sintezu RNK molekula, sečen sa *NheI* i prečišćavan precipitacijom. DNK fragment je rastvaran u sterilnoj ("RN-ase free") vodi i služio kao matrica za *in vitro* transkripciju.

Kao matrica za sintezu RNK koja će se koristiti kao nespecifični kompetitor je korišćen plazmid pBluescript II SK+/- linearizovan *XbaI* enzimom. Na ovaj način se sa T7 promotora prepisuje polilinker plazmida pBluescript II SK+/- do *XbaI* mesta i dobija se RNK molekul veličine 55 nukleotida.

14.2. Sinteza RNK reakcijom *in vitro* transkripcije sa T7 RNK polimerazom

Za sintezu RNK reakcijom *in vitro* transkripcije korišćen je T7-MEGAscript kit (Ambion). Reakciona smeša zapremine 20 μ l sastojala se od 2 μ l 10x koncentrovanog reakcionog pufera, po 2 μ l svakog ribonukleotida (75 mM), 2 μ l T7 enzimske smeše i 200 ng DNK matrice u slučaju eluiranog fragmenta, odnosno 5 μ g u slučaju linearizovanog plazmida. Reakcija se odvijala 3 h na 37°C. U slučaju korišćenja linearizovanog plazmida kao matrice, DNK je nakon reakcije *in vitro* transkripcije uklanjana tretmanom sa DN-azom I prema uputstvu proizvođača. Sintetisana RNK proveravana je elektroforetski na 2% nedenaturišućim agaroznim gelovima, a tačna koncentracija RNK u ovom i svakom daljem koraku određivana je spektrofotometrijski merenjem A_{260} . Nakon toga reakcionoj smeši je dodato 6 μ l 5 M NaCl i voda do 200 μ l. Enzim je uklonjen tretmanom sa fenolom po opisanoj proceduri za DNK, a vodena faza je nakon toga na isti način tretirana hloroformom. RNK je iz vodene faze precipitirana dodatkom 2.5 zapremine 95% etanola (Clarke, 1999). Nakon inkubiranja 30 minuta na -80°C, precipitat je staložen centrifugiranjem (20 minuta, 13000 obrt/min, +4°C, mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom, zatim osušen pod vakuumom i resuspendovan u vodi. Uzorci RNK čuvani su na -80°C.

14.3. Defosforilacija 5' kraja RNK molekula

Da bi se sintetisani RNK molekul radiokativno obeležio na 5' kraju, neophodna je njegova defosforilacija. RNK dobijena *in vitro* transkripcijom (oko 1 μ g odnosno 200 pmol) rastvorena je u puferu za alkalnu fosfatazu (50 mM Tris-HCl, pH 9; 1 mM MgCl₂) i inkubirana sa 1 U bakterijske alkalne fosfataze (BAPA19, Amersham Pharmacia) 1 h na 37°C. Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran 15 minuta na 85°C. Zatim je enzim uklonjen tretmanom sa fenolom, a RNK je iz vodene faze precipitirana po već opisanoj proceduri.

14.4. Vezivanje Sgm proteina za RNK probu i određivanje koncentracije proteina koja dovodi do nastanka vidljivog protein-RNK kompleksa

Vezivanje prečišćenog Sgm proteina za obeleženi RNK molekul se odvijalo u reakcionoj smeši zapremine 30 μ l u puferu sledećeg sastava: 10 mM HEPES pH 7.6, 40 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01% Igepal CA-630. Količina RNK u reakciji vezivanja održavana je konstantnom i iznosila je oko 0.05 pmol, dok je količina KgmB proteina linearno povećavana od 0.5 do 60 pmol da bi se odredila ona koncentracija proteina koja dovodi do pojave jasno vidljivog protein-RNK kompleksa. U reakcionu smešu dodavani su još i 4U inhibitora RN-aze (RNAguard Ribonuclease Inhibitor (Porcine), Amersham Pharmacia) i 100 ng kvaščeve tRNK kako bi se sprečilo delovanje eventualno prisutne RN-aze. Reakcija vezivanja se odvijala 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga je dodavano 10 μ l rastvora boje (25% glicerol, 0.05% brom-fenol plavo). Ovako pripremljeni uzorci nanošeni su na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel. Elektroforeza se odvijala u hladnoj sobi (+4°C) u 0.5xTBE puferu, pri 250 V i 25 mA u trajanju od 1h i 45 min. Po završenoj elektroforezi, gelovi su sušeni i stavljeni na ekspoziciju sa "X-ray" filmovima na temperaturi od -70°C.

14.5. Vezivanje proteina za RNK u prisustvu specifičnog i nespecifičnog kompetitora

U kompetitivnim esejima su specifični kompetitor (neobeležena RNK proba) i nespecifični kompetitor (RNK dobijena transkripcijom polilinkera pBluescript II SK+/- plazmida) dodavani u velikom višku (100-1200x) u odnosu na obeleženu RNK probu. Reakciona smeša sastava navedenog u odeljku III-14.4. je sastavljena prvo sa neobežeženim kompetitivnim RNK probama i inkubirana 10 min. na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodavana obeležena RNK proba i inkubacija nastavljena još 20 minuta. Reakcione smeše su nakon dodatka rastvora boje nanošeni na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel.

15. „Toeprinting” esej

Metoda "toeprint" je osetljiva metoda za određivanje interakcija između proteina i RNK. Metoda se zasniva na "primer extension" reakciji, kada MMLV reverzna transkriptaza spadne sa iRNK nakon nailaska na stabilan ternarni kompleks 30S-iRNK-tRNK^{fmet}, što se detektuje u vidu trake, "toeprint" signala, na denaturišućem poliakrilamidnom gelu, Preinkubiranjem proteina sa iRNK, pre dodavanja ostalih komponenti u reakciju, 30S i tRNK^{fmet}, se sprečava formiranje ternarnog kompleksa što se na denaturišućem poliakrilamidnom gelu detektuje kao "hlađenje" signala. Metoda "toeprint" esej se može podeliti u tri dela:

1. radioaktivno obeležavanje primer-a
2. toeprint reakcija
3. dideoksi sekvenciranje.

15.1. Radioaktivno obeležavanje prajmera

Prajmer rev+80atgsgm je radioaktivno obeležavan fosforilacijom njegovog 5' kraja, pri čemu je korišćena T4 polinukleotid kinaza i ³²P-γ-ATP. Reakciona smeša (annealing miks) zapremine 20 μl je sadržavala 2 μl 5 pmol primer-a, 2 μl 10x kinaznog pufera (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M MgCl₂, 50 mM DTT), 10U T4 polinukleotid kinaze (Fermentas) i 3 μl ³²P-γ-ATP (5000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia) i 12 μl sterilne vode. Reakcija obeležavanja se odvijala 45 min na 37°C. Zatim je u reakcije dodavano 13 μl sterilne vode. Obeležen prajmer je propuštán kroz Sephadex G-25 kolonice (prema uputstvu proizvođača – Amersham) kako bi se oslobodila od neugrađenih radioaktivnih nukleotida. Efikasnost obeležavanja merena je na scintilacionom brojaču.

15.2. Toeprint reakcija

Sama "toeprint" reakcija obuhvata vezivanje prajmera za iRNK. Za sintezu iRNK reakcijom *in vitro* transkripcije korišćen je T7-MEGAshortscript kit (Ambion), što je

napred već objašnjeno; reakcija ekstenzije; testiranje uticaja proteina na formiranje ternarnog kompleksa.

Vezivanje prajmera za iRNK se odigrava u reakcionoj smeši zapremine 20 μl koja se sastojala od 4 μl 5x VD koncentrovanog reakcionog pufera (0.05M Tris-Cl pH 7.4; 0.3M NH_4Cl ; 30mM β -Mercapto-etanol), 2 μl 0.25 pmol/ μl iRNK, 3.3 μl 0.5 pmol/ μl prajmera, i 10.7 μl vode. Reakcija se zagreva 3' na 80°C/85°C, zatim se brzo zamrzava u tečnom azotu, i stavlja na led da se polako otapa. Dok su uzorci na ledu, dodaje se 5 μl of 50mM Mg-acetata u 1xVD+Mg²⁺ puferu. do finalne koncentracije od 10mM. Ukupni volumen reakcije je ~25 μl i koncentracija iRNA je ~0.02 pmol/ μl .

15.3. Reakcije ekstenzije

Pripremaju se zasebno reakcije za "primer extension" i formiranje binarnog kompleksa. Reakciona smeša za "primer extension" sadrži 6 μl 1xVD pufer sa 0.01M Mg acetatom, 2 μl 0.02 pmol/ μl "annealing" miksa. Reakciona smeša za formiranje binarnog kompleksa sadrži 4 μl 1xVD pufera sa 0,01M Mg acetatom, 2 μl 30S (2 pmol/ μl) i 2 μl "annealing" miksa. Obe reakcione smeše se inkubiraju 10'/37°C, a zatim se dodaje 2 μl MMLV enzimskog miksa sastava 1 μl 5xVD Buffer+Mg²⁺, 2 μl MMLV (200 U/ μl), 2.5 μl BSA (1 mg/ml ili 2 mg/ml) u 1xVD Buffer+Mg²⁺, 2.5 μl dNTP u 1xVD Buffer+Mg²⁺ (3.75 mM), 2 μl H₂O i reakcije se dodatno inkubiraju 10'-15'/37°C. Na kraju se dodaje 20 μl MMLV pufera za lodiranje uzoraka koji se pravi od 188 μl 10M uree, 8 μl 10xTBE, 4 μl boje 2% Bromfenolblu+ksilencianol, 6 μl 0.5M EDTA, i uzorci se lodiraju na 8% denaturišući poliakrilamidni gel. Uticaj proteina na formiranje "toeprint" signala se testira tako što se najpre preinkubira "annealing" miks sa proteinom 5'/37°C ili na sobnoj temperaturi, a zatim dodaje 30S i tRNA-fMet i reakcija dodatno inkubira 10'/37°. Na kraju se dodaje 2 μl of MMLV enzimskog miksa i reakcija inkubira 10'-15'/37°C. Zaustavljanje reakcije se izaziva dodavanjem 20 μl MMLV pufera za lodiranje uzoraka.

15.4. Dideoksisekvenciranje RNK

U cilju determinacije tačne pozicije „toeprint“ signala u okviru iRNK, radi se dideoksisekvenciranje iRNK, prevashodno sa AMV reverznom transkriptazom. Postoje izvesne razlike u pripremanju "annealing" miksa za sekvenciranje u odnosu na

"annealing" miks za reakcije ekstenzije. Sve reakcije se odvijaju u 1xRT puferu koji može biti sa ili bez Mg^{2+} (10xRT Buffer+/- Mg^{2+} ; je sledećeg sastava: 0.5M Tris-Cl pH 8.3*, 0.6M NaCl, 0.1M DTT, (+0.06M MgOAc)).

Za reakcije ekstenzije se pravi "annealing" miks ukupnog volumena 20 μ l, sastavljen od: 2 μ l 10xRT Buffer Mg^{2+} , 2 μ l mRNA (0.25 pmol/ μ l), 3.3 μ l primer (0.5 pmol/ μ l), 12.7 μ l H_2O . Reakcija se zagreva 3' na 80°C/85°C, zatim se brzo zamrzava u tečnom azotu, i stavlja na led da se polako otapa. Dok su uzorci na ledu, dodaje se 5 μ l of 36mM $MgCl_2$ u 1xRT+ Mg^{2+} puferu. do finalne koncentracije od 7,2 mM. Ukupni volumen reakcije je ~25 μ l i koncentracija iRNA je ~0.02 pmol/ μ l.

Za reakcije sekvenciranja se pravi "annealing" miks ukupnog volumena 10 μ l, sastavljen od: 1 μ l 10xRT Buffer- Mg^{2+} , 2.4 μ l mRNA (0.25 pmol/ μ l), 4 μ l primer (0.5 pmol/ μ l), 2.6 μ l H_2O . Reakcija se zagreva 3' na 80°C/85°C, zatim se brzo zamrzava u tečnom azotu, i stavlja na led da se polako otapa. Dok su uzorci na ledu, dodaje se 2 μ l of 36mM $MgCl_2$ u 1xRT+ Mg^{2+} puferu. do finalne koncentracije od 6 mM. Ukupni volumen reakcije je ~12 μ l i koncentracija iRNA je ~0.05 pmol/ μ l. Reakcije se prave prema uputstvu iz tabele 4.

Tabela 4. Uputstvo za pravljenje reakcija za sekvenciranje

	A)			10xdNTPs su uključeni u AMV Enzimski miks
		1xRT Buffer+ Mg^{2+}	4 μ l	5 μ
		10xdNTPs	2 μ l	/
		/	/	/
		Annealing mix (0.02 pmol/ μ l)	2 μ l	2 μ l
			8 μ l	7 μ l
+	B)			
		AMV Enzimski miks u 1xRT Buffer+ Mg^{2+}	2 μ l	3 μ l
			10 μ l	10 μ l

Reakcioni miks A se inkubira 10'/37°C, zatim se dodaje reakcioni miks B tj. 2 μ l AMV enzimskog miksa (1.5 μ l AMV RT (10 U/ μ l), 3 μ l 10xRT Buffer+ Mg^{2+} , 25.5 μ l H_2O). i inkubira 10'-15'/42°C do 48°C. Nakon toga se dodaje 20 μ l AMV-boje za lodiranje uzoraka (188 μ l 10M urea, 8 μ l 10xTBE, 4 μ l 2% bromfenolblu+ksilencianol) koji se

nanose na 8% denaturišući poliakrilamidni gel. Pre lodiranja uzorci je kuvaju 3'/92°C-95°C. Sve komponente reakcije bi trebalo da budu spremljene u puferu 1xRT Buffer+Mg²⁺. Reakcije sekvenciranja se prave prema uputstvu iz tabele 5.

Tabela 5. Uputstvo za pravljenje reakcija za sekvenciranje

	primer extensions	sekvenciranje	10xdNTPs su uključeni u AMV enzimski miks
1xRT Buffer+Mg ²⁺	4 µl	2 µl	3 µl
10xdNTPs	2 µl	2 µl	/
10xddNTPs (G, A, U, C)	/	2 µl	2 µl
Annealing miks (0.1 pmol/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
AMV Enzimski miks u 1xRT Buffer+Mg ²⁺	2 µl	2 µl	3 µl
	10 µl	10 µl	10 µl

Reakcije se inkubiraju 10'-15'/42°C do 48°C. Zatim se dodaje AMV boja za lodiranje uzoraka i uzorci lodiraju na 8% denaturišući poliakrilamidni gel. Pre lodiranja uzorci je kuvaju 3'/92°C-95°C. Takođe, sve komponente reakcije trebalo i da budu spremljene u puferu 1xRT Buffer+Mg²⁺.

10xdNTP miks (3.75mM) se priprema od 6 µl svakog od 4xdNTP (100mM), 16 µl 10xRT Buffer+Mg²⁺, 120 µl H₂O

10xddNTP miks (5mM) se priprema od 20 µl 10mM ddNTP, 10 µl 10x RT Buffer+Mg²⁺, 70 µl H₂O.

AMV Enzimski miks sa dNTP se priprema prema od 1 µl AMV (10 U/µl), 1.2 µl 10xRT Buffer+Mg²⁺, 12 µl 10xdNTP's in 1xRT Buffer+Mg²⁺, 9.8 µl H₂O

16. Metilacioni esej

Metilacionim esejom se proverava aktivnost enzima metiltransferaza tako što se prati ugradnja radioaktivne metil grupe iz SAM u 30S ribozomalne subjedinice.

Reakciona smeša (finalna zapremina 100 μ l) se sastoji od 20 μ l 20 pmol 30S subjedinica u HRS puferu (10mM MgCl₂, 50mM NH₄Cl, 5mM β -merkaptotanol), 5 μ l proteina (5-8 μ g), S30 ili S100 frakcije, 5 μ l 2.5 μ Ci SAM (500 mCi/mmol; 0.5 μ Ci/ μ l) ili 2.5 μ l 2.5 μ Ci SAM (1000 mCi/mmol; 1 μ Ci/ μ l), HRS pufer do 100 μ l. Prvo se dodaje SAM, protein i pufer do zapremine od 80 μ l, pa tek onda (posle inkubacije smeše) i ribozomalne subjedinice. Inkubirati reakciju 10 min na 35 °C pre dodavanja subjedinica. Nakon dodavanja subjedinica nastaviti inkubaciju na 35 °C, i uzimati alikvote od 20 μ l u određenim vremenskim intervalima. Alikvote dodati u 1 ml hladne 5% TCA (koja je alikvotirana u graduisane epruvete. Inkubirati 20-30 min na ledu. Zaustavljena reakcija se filtrira na GF/C filterima (dodate se po isteku inkubacije na ledu jos 4 ml TCA, pa se jos jednom epruveta ispere sa 5 ml TCA) i meri se aktivnost na scintilacionom brojacu.

17. Izolovanje ribozoma i ribozomalnih subjedinica

Za izolaciju ribozoma i ribozomalnih subjedinica se koristiti prekonocna kultura *E coli* zasejana u odgovarajućem medijumu (50 ml medijuma u erlenmajeru od 250 ml), za inokulaciju većih količina svežeg medijuma (na primer, 4 x 500ml medijuma u erlenmajerima od 2 litra). Čelije se narastaju do srednje logaritamske faze. *E. coli* – prekonocna bakterijska kultura se razblaži 50 – 100 puta, tako da početni OD₆₀₀ ima vrednost od 0,05 – 0,10 (izmeriti OD po inokulaciji). Inokulirani medijum se inkubira na 37 °C/180rpm do 0,7 – 0,9 OD₆₀₀. Čelije se sakupe centrifugiranjem 10 min/+4 °C/ 7 000 rpm, u Sorvall centrifugi (GS3 rotor), a potom se operu 2 puta u puferu I (10 mM HEPES/KOH pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 M NH₄Cl, 6 mM β -merkaptotanol) i 1x u puferu II (10 mM HEPES/KOH pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 6 mM β -merkaptotanol). Između pranja, čelije se obaraju pod istim uslovima. Za svako pranje koristi se 500 ml pufera na 1 litar početne kulture. Oprane čelije se resuspenduju u puferu II (oko 10 g

ćelija u 15 ml), ćelije se razbijaju u francuskoj presi na 16 000 – 18 000 psi, dodaje se DNaza I (50U DNaze I - Pharmacia).

Dobijena suspenzija se centrifugira 10 min/ 12 000 rpm/ +4 °C u SS34 Sorvall rotoru, a potom još jednom (sakupljeni supernatant) 30 min/ 15 000 rpm/ +4 °C. Dobijeni supernatant je S30 frakcija. S30 frakcija se dijalizira preko noći na +4 °C u 2000 ml pufera III (10 mM Hepes/KOH pH 7,6, 0,2 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 6 mM β-merkaptotanol) sa jednom zamenom pufera posle 2 sata dijalize. Posle dijalize odredi se OD₂₆₀.

Na pripremljene saharozne gradijente (10 – 30%) nanosi se 150 OD₂₆₀ (u zapremini od 500 μl) i gradijenti se centrifugiraju 15h u SW28 rotoru u ultracentrifugi, na 23 000 rpm (ili 80 minuta na 44 000 rpm, u VTi50).

Linearni saharozni gradijenti 10 – 30 % se prave tako što se 20% rastvor saharoze u puferu III sipa u odgovarajuće epruvete za ultracentrifugu, koje se tariraju i onda zalede na – 70 °C (preko noći). Gradijent se formira pri postepenom otpanju na +4 °C preko noći. Neophodno je tarirati epruvete u kimblama i pre i posle nanošenja uzoraka. Po završenom centrifugiranju neophodno je gradijente držati na +4 °C.

Sledeći korak je frakcionisanje gradijenata. Kada se sakupe frakcije i očita OD₂₆₀, frakcije koje sadrže 30S i 50S subjedinice se spoje. Dodaje se MgCl₂ do 10mM a zatim i pufer II. Subjedinice se potom centrifugiraju preko noći na 50000 rpm/+4°C u ultracentrifugi. Istaložene subjedinice se resuspenduju u puferu II, alikvotiraju i čuvaju na -80°C.

18. *In vitro* transkripcija i translacija u sistemu *E. coli*

In vitro transkripcija i translacija su rađene u komercijalno dostupnom sistemu *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA (Promega), prema uputstvu proizvođača. Klonirani DNK fragment koji se ispituje, mora imati adekvatni prokariotski promotor i RBS da bi se uspešno eksprimirao u ovom sistemu. Reakciona smeša za ovaj esej se pravi u ukupnom volumenu od 25 μl i ima sledeći sastav: 2 μg DNK marica, 2,5 μl aminokiselinskog miksa bez metionina, 10 μl S30 premiksa bez aminokiselina, 1 μl [³⁵S]metionina (1200Ci/mmol na 15mCi/ml), 7,5 μl S30 ekstrakta za cirkularnu DNK,

voda do finalnog volumena. Reakcija se blago vorteksuje i inkubira 1-2 sata na 37°C. Reakcija se zaustavlja inkubacijom na ledu 5 min. Uzima se alikvot reakcije od 5 µl na koji se dodaje 20 µl acetona, i dalje se inkubira 15 min na ledu. Nakon toga, uzorci se centrifugiraju 5 min na 12000x g. Supernatant se odbacuje a talog se suši 15 min pod vakuumom. Finalno se uzorak resuspenduje u 20 µl pufera za uzorak (25% glicerol, 0.05% bromfenolblu) sa SDS-gel elektroforezu i kuva 3 min. Mali alikvot uzorka se lodira na 12.5 % SDS poliakrilamidni gel. Elektroforeza se odvijala preko noći u SDS puferu, pri 150 V i 25 mA. Po završenoj elektroforezi, gelovi su sušeni i stavljeni na ekspoziciju sa "X-ray" filmovima na temperaturi od -70°C.

19. *In vitro* transkripcija i translacija u sistemu *S. lividans* i *M. melanosporea*

Procedura za *in vitro* transkripciju i translaciju u sistemu *S. lividans* i *M. melanosporea* se radi prema protokolu iz Practical Streptomyces Genetics, (Kieser *et al.*, 2000).

Za dobijanje S30 frakcije *S. lividans* i *M. melanosporea* se polazi od ćelijske kulture koja se dobija zasejavanjem spora sa sveže sporulisane petri šolje u 1l YEME medijuma uz obavezno dodavanje odgovarajućeg antibiotika. Bakterije rastu 17 do 18 sati uz aeraciju pri 250 obrt/min., tj. vreme inkubacije treba da bude toliko da se na kraju dobije 1,5 do 2 gr svežeg micelijuma po litru bakterijske kulture. Talog micelijuma se dobija centrifugiranjem kulture na 7000 rpm, 10 min na +4°C. Dobijeni talog je ispiran (na litar kulture ide 500 ml pufera) dva puta puferom za pranje (10 ml 1M HepesKOH pH7,5; 10 ml 1M MgCl₂; 250 ml 4M NH₄Cl; 0,35 ml β merkaptotanol; 730 ml vode) i jednom S30 puferom (50 ml 1M HepesKOH pH7,5; 10 ml 1M MgCl₂; 12,5 ml 4M NH₄Cl; 0,35 ml β merkaptotanol; 927 ml vode). Oprani micelijumi se resuspenduju u S30 puferu i filtriraju pod vakuumom. Pre razbijanja u francuskoj presi se izmereni micelijumi resuspenduju u S30 puferu sa 10% glicerolom u razmeri 1g na 2,5 ml pufera. Razbijanje se vrši dva puta, pod pritiskom od 10-12 x 10³ psi a razbijeni micelijum se centrifugira na 15000g, 30 min na +4°C. Dobijeni supernatant je S30 frakcija koja bi

trebalo da nakon očitavanja A_{260} ima 300 do 350 jedinica po ml. Ovako dobijena S30 frakcija se koristi u eseju *in vitro* transkripcija i translacija prema sledećoj recepturi: 10 μ l S30 frakcije (2 do 3 A_{260}), 6 μ l S30 pufera, 2 μ l [35 S]-metionina, 2 μ l 0,1M Mg-acetata, 8 μ l smeše za sintezu i 2 μ l plazmidne DNK količine oko 2 μ g.

Smeša za sintezu se priprema prema recepturi: 200 μ l 2M HepesKOH pH8,2; 250 μ l 0,55M DTT; 250 μ l 38 mM ATP pH7; 75 μ l 88 mM CTP, GTP, UTP miksa pH7; 500 μ l 0,42 M fosfoenolpiruvat pH7; 50 μ l 55 mM aminokiseline (ukupno 19 aminokiselina bez metionina); 375 μ l 40% PEG 8000, 100 μ l "folinic acid" (2,7mg/ml); 240 μ l piruvat kinaze (2000U/ml u 20% glicerolu). 66,5 μ l 4,2 M amonijumacetat; 66,5 μ l 8,4 M kalijum acetat).

Pripremljena reakcija se inkubira 30 min na 30°C, zatim se dodaje 2 μ l neobeležnog metionina i inkubacija nastavlja još 10 min pod istim uslovima. Za proveru se uzima jedna polovina volumena reakcije kojoj se dodaje jedna trećina pufera za lodiranje za SDS PAGE. Elektroforeza se odvijala preko noći u SDS puferu, pri 150 V i 25 mA. Po završenoj elektroforezi, gelovi su sušeni i stavljeni na ekspoziciju sa "X-ray" filmovima na temperaturi od -70°C.

IV REZULTATI

Kod bakterije *Micromonospora zionensis*, proizvođača aminoglikozidnog antibiotika G-52, Sgm metiltransferaza metilacijom G1405 u 16S rRNK obezbeđuje rezistenciju na gentamicin (Savic *et al.*, 2009). Smatra se da je za kompletnu modifikaciju 30S ribozomalnih subjednica i obezbeđivanje rezistentnog fenotipa, potrebno svega nekoliko molekula metiltransferaze u ćeliji. Na osnovu ovakve pretpostavke predložena je hipoteza o negativnoj autoregulaciji *sgm* gena na nivou inicijacije translacije koja bi održavala nisku koncentraciju metiltransferaze u ćeliji.

Model translacione autoregulacije *sgm* gena postavljen na osnovu *in vivo* eksperimenata (Kojić *et al.*, 1996) sugerise da Sgm metiltransferaza prepoznaje heksanukleotid CCGCCC koji se nalazi 14 nt ispred RBS regiona u 5'UTR sopstvene iRNK, a koji takođe ulazi u sastav specifične sekundarne strukture u vidu ukosnice. Ista heksanukleotidna sekvenca se nalazi u okviru sekundarne strukture u 16S rRNK, tačnije u heliksu 44 koji prepoznaje Sgm metiltransferaza. Pretpostavka na kojoj se zasniva model je da nakon što metiluje sve ribosome, Sgm protein prepoznaje heksanukleotid i vezuje sopstvenu iRNK, tako da deluje kao translacioni represor. Translaciona autoregulacija je *in vivo* testirana korišćenjem različitih *sgm::lacZ* genskih i operonskih fuzija u heterologom sistemu *E. coli*, i potvrđeno je da Sgm metiltransferaza smanjuje nivo ekspresije fuzionog proteina u *in cis* i *in trans* konstelaciji.

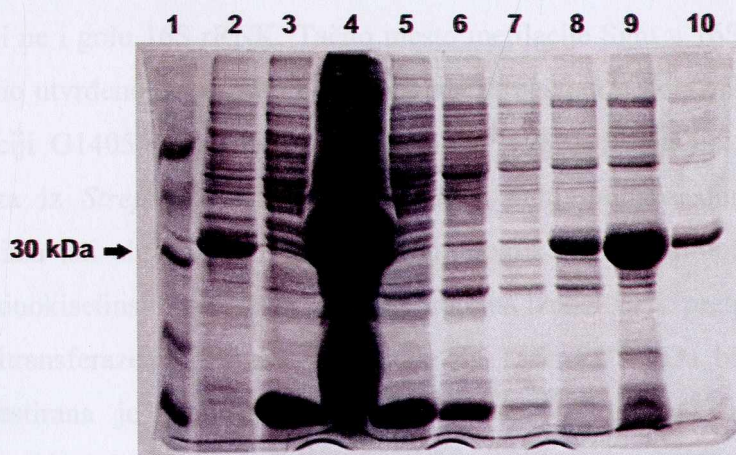
1. Ekspresija i prečišćavanje Sgm proteina iz *E. coli*

Za ekspresiju i prečišćavanje Sgm proteina iz *E. coli* korišćen je *QIAexpress* sistem (Qiagen). Ovaj sistem omogućava izolaciju rekombinantnih proteina fuzionisanih sa 6 histidina bilo na N- ili C- terminusu i njihovo jednostavno prečišćavanje metal afinitetnom hromatografijom na Ni-NTA agarozu. Ekspresija ovakvih proteina je pod kontrolom promotor-operator elemenata koji se sastoji od promotora T5 faga (kog prepoznaje RNK polimeraza *E. coli*) i dve *lac* operator sekvence za koje se vezuje *lac*

repressor koji blokira jak T5 promotor. Kako se T5 promotor indukuje sa IPTG, za održavanje pQE konstrukata sa ukloniranim genom, obeleženim sa His₆ biraju se *E. coli* sojevi koji nose *lacI^f*, mutiran gen za repressor, bilo na plazmidu bilo na F' epizomu.

Vektor pQES5 (Ilic-Tomic *et al.*, 2005) sadrži *sgm* gen sa kodirajućom sekvencom iz originalnog domaćina *Micromonospora zionensis* kojem je na N-terminusu pozicioniran histidinski repić i mesto prepoznavanja i obrade enterokinazom. S obzirom da ovaj repić nije uticao na funkcionalnost Sgm proteina u *E. coli* (izrasle su na podlogama sa gentamicinom), nije bilo potrebe za daljom obradom Sgm proteina enterokinazom.

S obzirom da je za proučavanje translacione autoregulacije *sgm* gena potreban aktivan protein, izolacija Sgm je rađena pod nativnim uslovima. Takođe, aktivan protein je bio neophodan za metilacione eseje kojima se posredno određuje mesto metilacije u 16S rRNK.



Slika 9. Prečišćavanje rekombinantnog N-(His)₆-Sgm proteina pod nativnim uslovima korišćenjem Ni-NTA afinitivne hromatografije. Prikazan je 12,5% poliakrilamidni gel. Kolone: 1. proteinski marker; 2. ćelijski lizat *E. coli* pQES5 tri sata nakon indukcije sa 1mM IPTG; 3 i 4. proteinske frakcije nakon lize i centrifugiranja ćelijskih ostataka; 5 i 6. frakcija nevezana za Ni-NTA kolonu; 7. frakcija nakon pranja kolone; 8, 9, 10, elucija N-(His)₆-Sgm proteina sa 0,25M imidazolom. Strelicom je označena traka molekulske težine od 30 kDa u markeru.

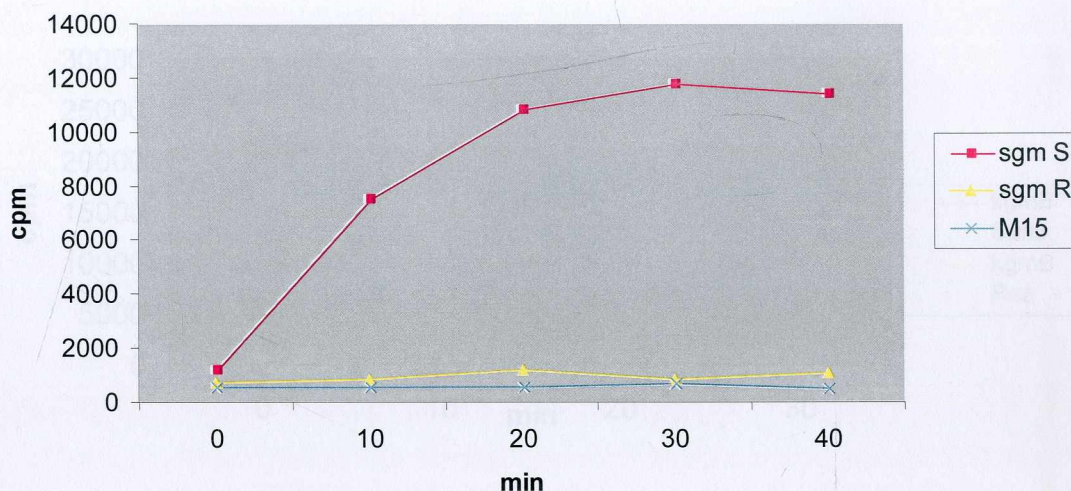
Optimizovani su uslovi rasta kulture *E. coli* koje nose ekspresioni vektor pQES5 kao i uslovi prečišćavanja Sgm proteina. Zadovoljavajuća ekspresija Sgm proteina

(približno 1 mg/ml prečišćenog proteina iz 1 l LB medijuma) je postignuta uz indukciju sa 1 mM IPTG i rastom kulture od 3 sata nakon indukcije.

Ukoliko je koncentracija Sgm proteina u rastvoru za eluciju preko 1 mg/ml dolazi do formiranja agregata tokom 24 h bilo da se protein čuva na +4, +20 ili -20 °C. Prečišćavanje i izolacija proteina na afinitivnoj Ni-NTA koloni je rađena puferom sa imidazolom (Slika 9.). Protein je prečišćen do 95% čistoće.

2. Metilacija 30S ribozomalnih subjedinica i mesto metilacije Sgm proteina

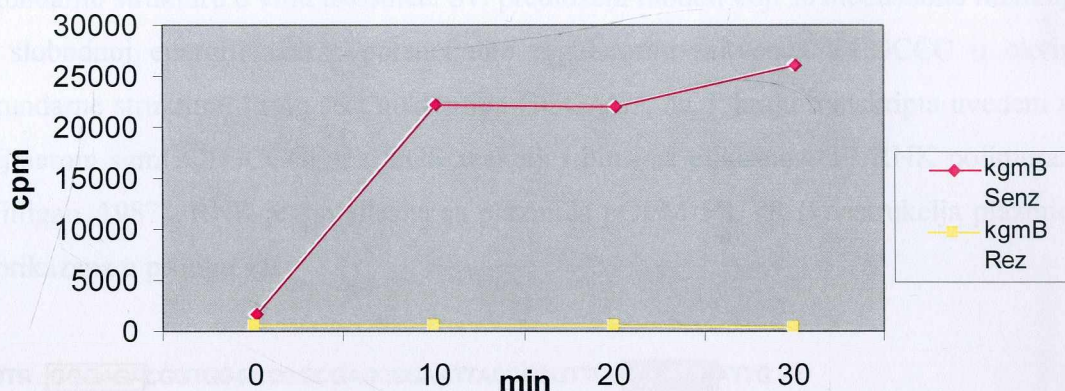
Da bi se potvrdila funkcionalnost Sgm metiltransferaze izolovane pod nativnim uslovima urađen je metilacioni esej. Iz ranijih radova je bilo poznato da Sgm metiltransferaza može da prepozna i metiluje 16S rRNK u okviru kompletne 30S subjedinice, ali ne i голу 16S rRNK. Tačno mesto metilacije Sgm u 16S rRNK nije bilo eksperimentalno utvrđeno, za razliku od KgmB metiltransferaze koja vrši metilaciju 16S rRNK u poziciji G1405 (Beauclerk and Cundliffe, 1987). Imajući u vidu da KgmB metiltransferaza iz *Streptoalloteicus tenebrarius* i Sgm metiltransferaza obezbeđuju svojim nosiocima isti obrazac rezistencije na aminoglikozidne antibiotike, kao i to da identičnost aminokiselinskih sekvenci ova dva proteina iznosi 54%, pretpostavljeno je da ove dve metiltransferaze dele mesto metilacije na 16S rRNK. Da bi se ispitala ova mogućnost, testirana je metiltransferazna aktivnost oba enzima u prisustvu 30S ribozomalnih subjedinica koje su prečišćene iz senzitivnog soja *E. coli*, kao i 30S ribozomalnih subjedinica koje su izolovane iz *E. coli* u kojoj je eksprimiran Sgm protein te su stoga rezistentne na gentamicin. Kao negativna kontrola poslužila je S30 frakcija senzitivnog soja M15 za koju je pokazano da ne može da metiluje senzitivne subjedinice. Rezultati su prikazani na slici 10 i 11.



Slika 10. *In vitro* metilacioni esej Sgm metiltransferaze sa 30S ribozomalnim subjedinicama izolovanim iz senzitivnog soja *E. coli* (sgmS) i 30S ribozomalnim subjedinicama izolovanim iz rezistentnog soja *E. coli* (sgmR). Negativna kontrola je metilacioni esej 30S subjedinica sa S30 frakcijom senzitivnih M15 *E. coli* ćelija (M15).

Sa slike 10 se može videti da je prečišćeni Sgm protein aktivan i da vrši prebacivanje metil grupe sa radioaktivno obeleženog SAM-a na senzitivne subjedinice, kao i da nema ugradnje metil grupe u rezistentne subjedinice.

Paralelno sa prethodnim eksperimentom urađen je metilacioni esej 30S subjedinica sa KgmB proteinom (Slika 11). Vidi se da KgmB protein ugrađuje metil grupe u senzitivne 30S subjedinice ali ne i u rezistentne koje su *in vivo* metilovane Sgm metiltransferazom. Izostanak metilacije rezistentnih subjedinica bio je prvi posredan dokaz da dve metiltransferaze imaju isto mesto delovanja, G na poziciji 1405 (Ilic-Tomic *et al.*, 2008), što su kasnije potvrdila i druga istraživanja (Cubrilo *et al.*, 2009, Savic *et al.*, 2009).



Slika 11. *In vitro* metilacioni esej 30S ribozomalnih subjedinica izolovanih iz senzitivnog soja *E. coli* (kgmB Sens) i 30S ribozomalnih subjedinica izolovanih iz rezistentnog soja *E. coli* (kgmB Rez).

3. Ispitivanje interakcije RNK i Sgm proteina *in vitro* metodom usporene elektroforetske pokretljivosti ili EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

3.1. Vezivanje Sgm proteina za RNK probu

Za testiranje hipoteze o negativnoj autoregulaciji *sgm* gena na nivou inicijacije translacije odabrana je metoda usporene elektroforetske pokretljivosti ili EMSA. Ovom metodom se interakcija proteina sa iRNK može analizirati i kvalitativno i kvantitativno.

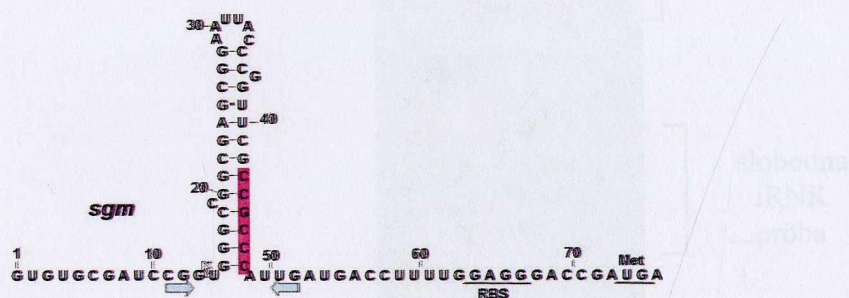
Prvi korak u ispitivanju vezivanja Sgm proteina za RNK je bio sinteza odgovarajuće *sgm* iRNK probe u eksperimentu *in vitro* transkripcije. S obzirom na rezultate *in vivo* eksperimenata (Kojić *et al.*, 1996) za dalji rad je odabran iRNK molekul dužine 48 nt, koji obuhvata 5'UTR *sgm* gena u regionu -21 nt do -62 nt u odnosu na start translacije. Predikcija sekundarne stukture ovog RNK molekula dobijena je korišćenjem

Mfold web servera (www.Mfold) (Slika 12). Prema predikciji, ovaj RNK fragment pravi sekundarnu strukturu u vidu ukosnice. Svi predloženi modeli koji se međusobno razlikuju po slobodnoj energiji sadrže potencijalnu regulatornu sekvencu CCGCCC u okviru sekundarne strukture. Prvih šest nukleotida GGGAGA na 5' kraju transkripta uvedeni su prajmerom *sgm*CCTGCCCCFor u PCR reakciji i bitni za efikasnost T7 RNK polimeraze (Milligan, 1987). RNK je sintetisana sa plazmida pGEM-5'UTR (konstrukcija plazmida je prikazana u prilogu 1).

A)

5' UTR : GGGAGA CCGTGGGCCGGCGAGCGGAATTACCCGGTTCC CCGCCC ATTG 48

B)

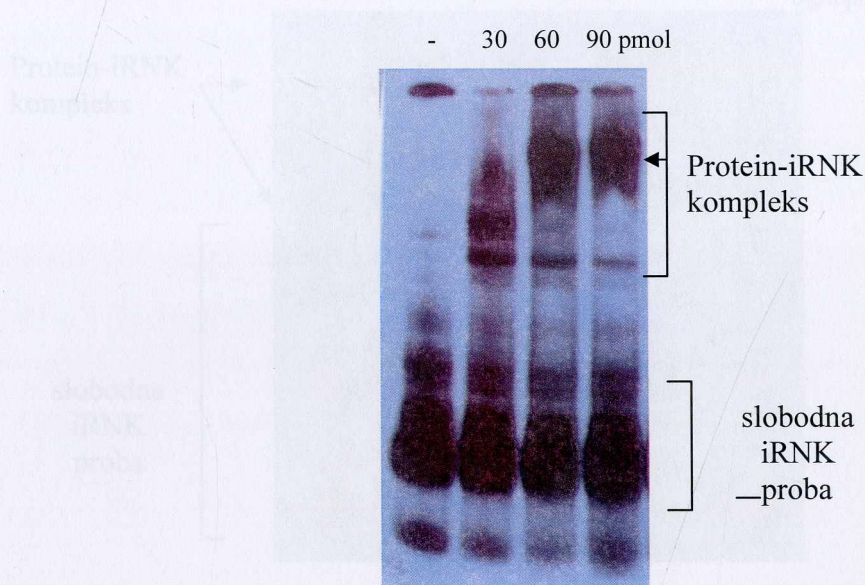


Slika 12. A) Primarna struktura 5'UTR *sgm* iRNK molekula u regionu od -21 do -62 u odnosu na start kodon. Promotor T7 vektora pGem-easy je uokviren žutim pravougaonikom, potencijalna regulatorna sekvencija je uokvirena roze pravougaonikom. B). Sekundarna struktura u okviru 5' UTR *sgm* iRNK molekula od P1 promotora, sa potencijalnom regulatornom sekvencijom koja je uokvirena roze pravougaonikom, strelicama je ograničena sekvencija *sgm* iRNK molekula od 48 nt. RBS kao i start kodon su podvučeni.

Sgm protein koji je korišćen u svim reakcijama vezivanja je prečišćen afinitivnom hromatografijom na koloni od Ni-NTA agaroze preko His₆ repića.

U reakciji vezivanja količina iRNK je bila konstantna i iznosila je približno 0.1 pmol, dok je koncentracija *Sgm* proteina linearno rasla od 15 do 90 pmol. Rezultati više ponovljenih, nezavisnih EMSA eksperimenata su pokazali da koncentracija *Sgm* proteina koja dovodi do pojave vidljivog protein-iRNK kompleksa iznosi 30 pmol. Na slici 13 je prikazan rezultat jednog od eksperimenata vezivanja. U reakciji gde je detektovan jasan signal je prisutno 300 puta više molekula proteina u odnosu na iRNK. Prema podacima iz

literature gde je optimalan odnos protein:iRNK bio 10:1, dobijeni eksperimentalni rezultati govore u prilog činjenici da postoji slab afinitet Sgm proteina za iRNK korišćenu eksperimentu. Međutim, trebalo bi imati u vidu da nakon reakcije obeležavanja iRNK probe ostaje izvesna količina neobebeženog iRNK molekula za koji se Sgm protein vezuje istim afinitetom, što se ne može detektovati na radigrafiji.

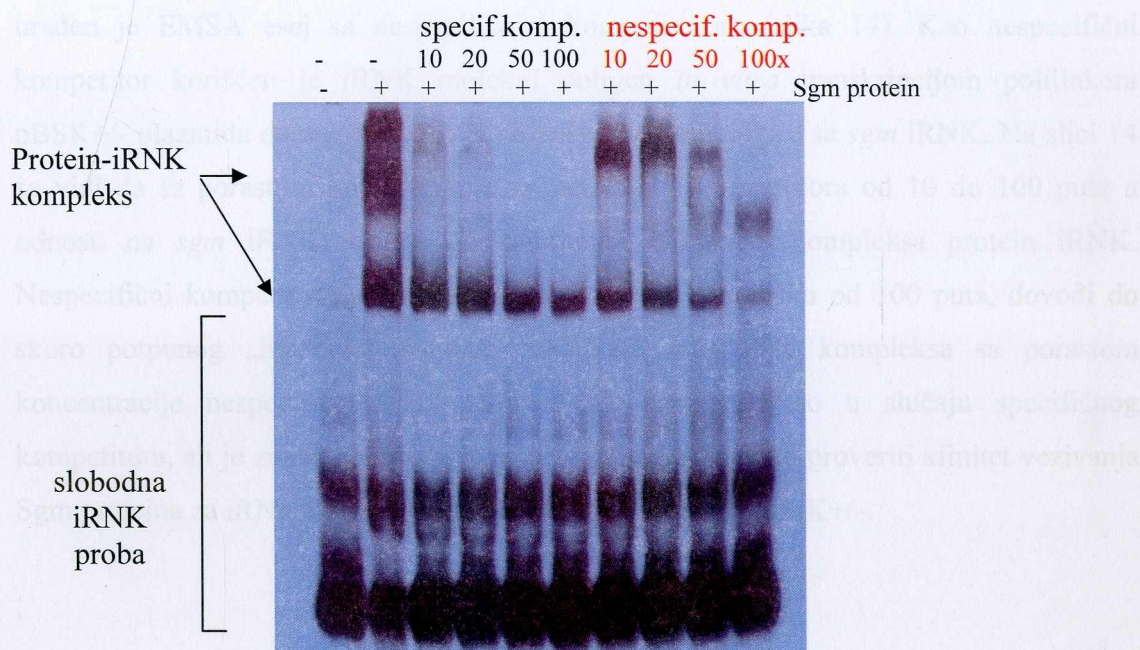


Slika 13. Vezivanje Sgm proteina za *sgm* iRNK (48 nt) probu. Na 8% nenedaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom RNK (0,1 pmol) a rastućom koncentracijom Sgm proteina: 30, 60, 90 pmol. U prvoj koloni je slobodna iRNK proba bez proteina.

3.2. Vezivanje Sgm proteina za sopstvenu *sgm* iRNK dužine 48 nt u prisustvu specifičnog i nespecifičnog kompetitora

Da bi se ispitala specifičnost vezivanja Sgm proteina za sopstveni 48 nt dug iRNK molekul, urađen je EMSA eksperiment sa neobebeženom *sgm* iRNK probom koja se u reakciju vezivanja dodaje u suvišku u odnosu na obeleženu iRNK probu. Porast koncentracije ovakve iRNK koja je specifični kompetitor, treba da dovede do slabljenja

intenziteta kompleksa protein-iRNK tj. „hlađenja“ signala. Koncentracija proteina u reakciji je konstantna i iznosi 30 pmol, dok je koncentracija specifičnog kompetitora linearno povećavana od 10 do 100 puta više u odnosu na obeleženu probu (slika 14).



Slika 14. Vezivanje Sgm proteina za iRNK u prisustvu specifičnog i nespecifičnog kompetitora. Prikazan je 8% nenedenaturišući poliakrilamidni gel na koji su nanete reakcije kompeticije sa konstantnom koncentracijom obeležene iRNK (0,1 pmol) i Sgm proteina (30 pmol), a rastući odnos koncentracija specifičnog i nespecifičnog kompetitora u odnosu na obeleženu iRNK označen je na slici. U prvoj koloni se nalazi slobodna iRNK proba bez Sgm proteina. Označen je položaj protein-iRNK kompleksa.

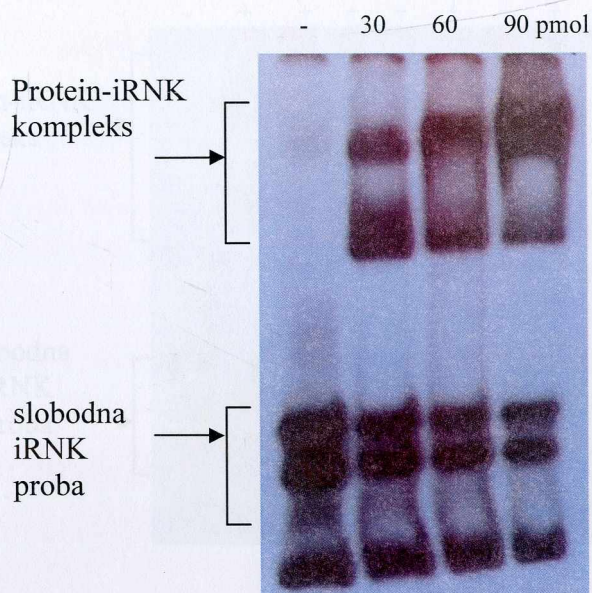
Na radiografiji se uočava da sa porastom koncentracije specifičnog kompetitora u reakciji vezivanja, intenzitet kompleksa opada. Do potpunog slabljenja kompleksa dolazi u prisustvu 100 puta veće koncentracije specifičnog kompetitora. Takođe, u centralnom delu radiografije se uočava prisustvo „lakšeg“ kompleksa, tj. kompleksa protein-iRNK koji brže putuje. Kompleks koji sporije putuje tkz. „teži“ kompleks, mogao bi da bude posledica protein-protein interakcija ili interakcija između kompleksa Sgm proteina formiranog sa obeleženom iRNK probom i onog formiranom sa neobeleženom iRNK

probom. S obzirom da se na radiografiji uočava prisustvo više formi slobodne iRNK probe, moguće objašnjenje je da je „teži“ kompleks formiran od proteina i jedne od formi iRNK.

Radi daljeg ispitivanja specifičnosti vezivanja Sgm proteina za sopstvenu iRNK urađen je EMSA esej sa nespecifičnim kompetitorom (slika 14). Kao nespecifični kompetitor korišćen je iRNK molekul dobijen *in vitro* transkripcijom polilinkera pBSK+/- plazmida dužine 55 nt, koji ne pokazuje homologiju sa *sgm* iRNK. Na slici 14 se vidi da sa porastom koncentracije nespecifičnog kompetitora od 10 do 100 puta u odnosu na *sgm* iRNK, dolazi do slabljenja intenziteta kompleksa protein iRNK. Nespecifični kompetitor dodat u reakciju vezivanja u suvišku od 100 puta, dovodi do skoro potpunog „hlađenja“ signala. Slabljenje intenziteta kompleksa sa porastom koncentracije nespecifičnog kompetitora nije izraženo kao u slučaju specifičnog kompetitora, ali je značajno. Stoga je bilo neophodno dodatno proveriti afinitet vezivanja Sgm proteina za iRNK dužine 55 nt, dobijenu sa plazmida pBSK+/-.

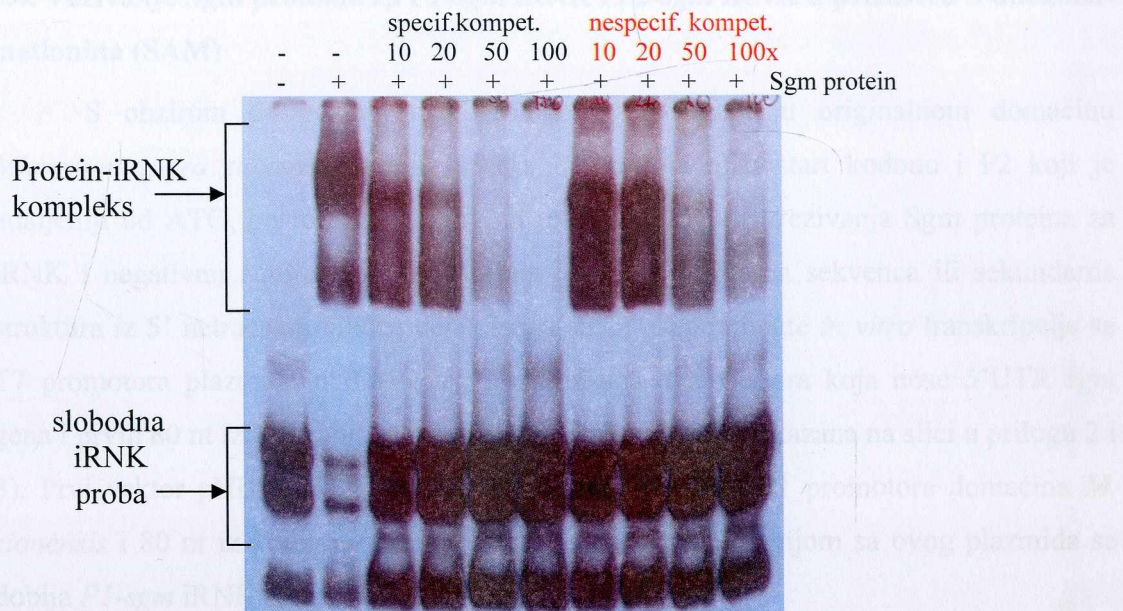
3.3. Vezivanje Sgm proteina za *pBlu* iRNK u prisustvu specifičnog i nespecifičnog kompetitora

Novi EMSA eksperimenti su pokazali da Sgm protein sa podjednakom efikasnošću vezuje radioaktivno obeleženu *pBlu* iRNK dužine 55 nt, kao i sopstvenu iRNK, tj. do pojave vidljivog signala dolazi kada je protein prisutan u suvišku od 300x u odnosu na iRNK (slika 15).



Slika 15. Vezivanje Sgm proteina za *pBlu* iRNK (55 nt) probu. Na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom RNK (0,1 pmol) a rastućom koncentracijom Sgm proteina: 30, 60, 90 pmol. U prvoj koloni je slobodna iRNK proba bez proteina.

Specifičnost vezivanja Sgm proteina za *pBlu* iRNK je dodatno proverena kompetitivnim EMSA eksperimentom, u kom je kao specifični kompetitor korišćena neobeležena *pBlu* iRNK, a kao nespecifični kompetitor 48 nt duga *sgm* iRNK. Na slici 16 se vidi da sa porastom koncentracije kako specifičnog tako i nespecifičnog kompetitora u reakciji dolazi do slabljenja intenziteta signala. Specifični, kao i nespecifični kompetitor dodati su suvišku od 100x potpuno „hlade“ signal.



Slika 16. Vezivanje Sgm proteina za *pBlu* iRNK dužine 55 nt u prisustvu specifičnog i nespecifičnog kompetitora. Prikazan je 8% nenedaturišući poliakrilamidni gel na koji su nanete reakcije kompeticije sa konstantnom koncentracijom obeležene iRNK (0,1 pmol) i Sgm proteina (30 pmol), a rastući odnos koncentracija specifičnog i nespecifičnog kompetitora u odnosu na obeleženu iRNK označen je na slici. U prvoj koloni se nalazi slobodna RNK proba bez Sgm proteina. U drugoj koloni se vidi signal koji predstavlja kompleks protein iRNK. Strelicama su označeni položaji protein-RNK kompleksa i slobodne iRNK probe.

Jasno je da se Sgm protein sa podjednakom efikasnošću vezuje za bilo koju kratku iRNK koja mu se ponudi, ukoliko je prisutan u reakciji u suvišku od 300x u odnosu na iRNK. Kako je očito da samo prisustvo potencijalne regulatorne sekvence CCGCCC i navedene pretpostavljene sekundarne strukture nije dovoljno da obezbedi specifičnost vezivanja proteina za sopstvenu iRNK, za dalji rad su sintetisane duže iRNK.

3.4. Vezivanje Sgm proteina za *P1-smg* iRNK i *P2-smg* iRNK u prisustvu S-adenozil-metionina (SAM)

S obzirom da postoje dva promotora *sgm* gena u originalnom domaćinu *Micromonospora zionensis* (Kojić, 1994), P1 koji je bliži start kodonu i P2 koji je udaljeniji od ATG, postoji mogućnost da je za specifičnost vezivanja Sgm proteina za iRNK i negativnu autoregulaciju potrebna još neka primarna sekvenca ili sekundarna struktura iz 5' netranslatirajućeg dela. Stoga su za eksperimente *in vitro* transkripcije sa T7 promotora plazmida pGEM-easy, konstruisana dva vektora koja nose 5'UTR *sgm* gena i prvih 80 nt iz kodirajućeg dela gena (konstrukcija je prikazana na slici u prilogu 2 i 3). Prvi vektor pHDV-P1sgm sadrži 5'UTR *sgm* gena od P1 promotora domaćina *M. zionensis* i 80 nt iz kodirajućeg dela gena. *In vitro* transkripcijom sa ovog plazmida se dobija *P1-smg* iRNK dužine 159 nt (slika 17).

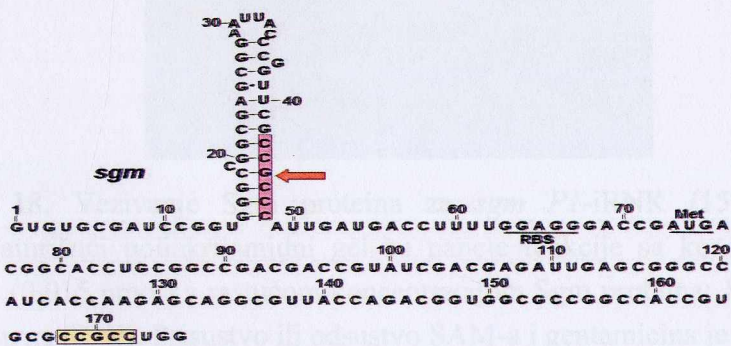
A)

```

P2: GGGAGACCGCCAAGTGTGCCAGACGCAATCACCACTGTGGADGTGCAAAAAGCGGCCAAGACGGGCTTGCAGGACAGGCCGACCAATATGGACGTGACTGT
P1: -----
P2: CGTGTGGTGTGCGGCGGCCCCCTGCCCGCTCGTAATACCCCTGTAACAACCTCTTGGTAGADGAAGCAGCAACTCTTGGTGTGCGATCCGGTGGGCCGGGA
P1: ----- GGGAGAGTGTGGATCCGGTGGCCGGGGA

P2: GCGGAATTACCCGGTTGCGGCCATTGATGACCTTTTGGAGGACCGATGACGGCACCTGCGGCCGACGACCGTATCGACGAGATTGAGCGGGCCATCACC
P1: GCGGAATTACCCGGTTGCGGCCATTGATGACCTTTTGGAGGACCGATGACGGCACCTGCGGCCGACGACCGTATCGACGAGATTGAGCGGGCCATCACC

P1: AAGAGCAGGCGTTACCAAGACGGTGGCG : 333
P2: AAGAGCAGGCGTTACCAAGACGGTGGCG : 159
    
```

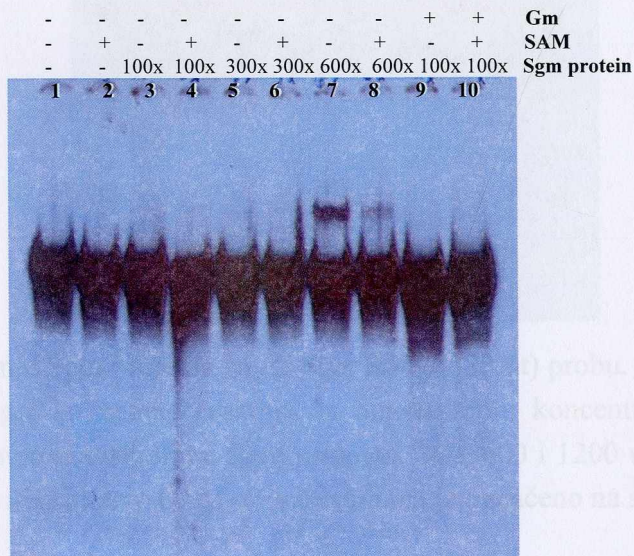


B)

Slika 17. A). Primarna struktura 5'UTR *sgm* gena od P1 i P2 promotora. Promotor T7 vektora pGem-easy je uokviren žutim pravougaonikom, potencijalna sekundarna struktura je podvučena zelenom crtom, potencijalna regulatorna sekvenca je uokvirena roze pravougaonikom, RBS je podvučen bordo crtom, start kodon je označen sa +1. B). Položaj sekundarne strukture sa potencijalnom prvom regulatornom sekvencom je označen strelicom, druga potencijalna regulatorna sekvenca je uokvirena žutim pravougaonikom.

Drugi konstrukt, pHDV-P2sgm, sadrži 5'UTR *sgm* gena od udaljenijeg, P2 promotora domaćina *M. zionensis* i 80 nt iz kodirajućeg dela gena. *In vitro* transkripcijom sa ovog plazmida se dobija *P2sgm*-iRNK dužine 333 nt (slika 17). Obe iRNK su korišćene u EMSA eksperimentima.

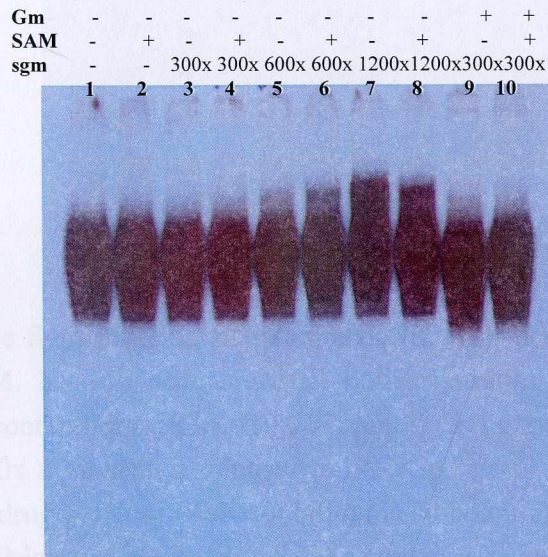
Da bi se ispitao potencijalni uticaj SAM na specifičnost vezivanja Sgm proteina za sopstvene iRNK molekule, dodavan je u EMSA reakcije ovaj kofaktor Sgm metiltransferaze u finalnoj koncentraciji od 1mM. Takođe, u istu svrhu, dodavan je i antibiotik gentamicin (Gm) u finalnoj koncentraciji od 1 µg/ml. Rezultat eksperimenta koji je urađen sa *P1-sgm*-iRNK dužine 159 nt je prikazan na slici 18.



Slika 18. Vezivanje Sgm proteina za *sgm P1*-iRNK (159 nt) probu. Na 6 % nenedaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom iRNK (0,015 pmol) a rastućom koncentracijom Sgm proteina: 100, 300, 600 u suvišku u odnosu na iRNK. Prisustvo ili odsustvo SAM-a i gentamicina je označeno na slici sa +/-.

Sa slike 18 se uočava da do pojave vidljivog signala dolazi tek kada je protein prisutan u reakciji u suvišku od 600x u odnosu na iRNK, što je u saglasnosti sa prethodnim eksperimentima koji su urađeni sa kratkim *sgm* iRNK molekulom. S obzirom da je pojava signala izostala u kolonama 4 i 6 kao i kolonama 9 i 10, gde je protein bio u suvišku od 100x u odnosu na iRNK, zaključeno je da prisustvo 1mM SAM u kolonama 4

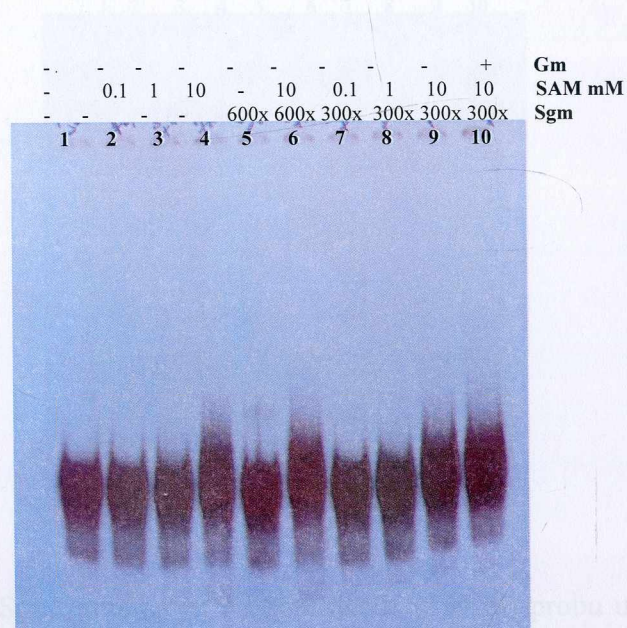
i 6, kao i gentamicina u reakcijama 9 i 10, ne dovodi do povećane specifičnosti vezivanja Sgm proteina za iRNK. Štaviše, u koloni 8 gde je prisutan SAM intenzitet signala je slabiji kada se uporedi sa kolonom 7 gde SAM nije prisutan. Identičan eksperiment je ponovljen sa *in vitro* sintetisanom *P2sgm*-iRNK dužine 333 nt. Rezultat je prikazan na slici 19.



Slika 19. Vezivanje Sgm proteina za *P2-sgm* RNK (333 nt) probu. Na 6% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom iRNK (0,015 pmol) a rastućom koncentracijom Sgm proteina: 300, 600 i 1200 u suvišku u odnosu na iRNK. Prisustvo ili odsustvo SAM-a i gentamicina je označeno na slici sa +/-.

Na slici 19 može da se uoči pojava signala kada je protein prisutan u suvišku od 600x u odnosu na iRNK, kao i da se intenzitet signala pojačava sa porastom koncentracije proteina u reakciji. Kao i u prethodnom eksperimentu, dodavanje SAM i gentamicina u reakciju nema značaja, jer ne dolazi do povećane specifičnosti vezivanja Sgm metiltransferaze za sopstvenu iRNK.

EMSA eksperiment sa *P1-sgm* iRNK dužine 159 nt je ponovljen i u prisustvu rastuće koncentracije SAM: 0,1, 1 i 10 mM. Rezultat prikazan na slici 20 potvrđuje prethodne eksperimente, tj. da prisustvo kofaktora ne utiče na specifičnost vezivanja proteina za iRNK.

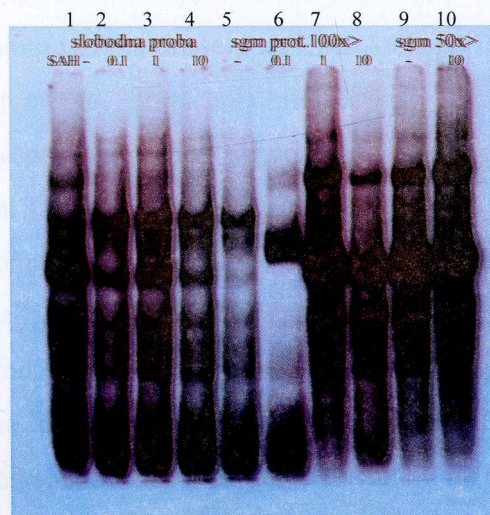


Slika 20. Vezivanje

Slika 20. Vezivanje Sgm proteina za *PI-sgm* iRNK (159 nt) probu u prisustvu rastuće koncentracije SAM. Na 6% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom iRNK (0,015 pmol) a rastućom koncentracijom Sgm proteina: 300 i 600x u suvišku u odnosu na iRNK. U prvoj koloni je iRNK proba bez proteina i SAM, u drugoj, trećoj i četvrtoj koloni je slobodna iRNK proba bez proteina ali joj je dodat SAM. Prisustvo ili odsustvo SAM i gentamicina je označeno na slici sa +/-.

3.5. Vezivanje Sgm proteina za *PI-sgm* iRNK dužine 159 nt u prisustvu S-adenozil-homocisteina (SAH)

Nakon dodavanja kofaktora u EMSA reakcije, urađen je još jedan pokušaj da se ovim tipom eksperimenta pokaže vezivanje Sgm proteina za sopstvenu iRNK. Naime, u reakcije je dodavan SAH, molekul koji nastaje nakon što se metil grupa prebaci na substrat. Ideja je bila da se prisustvo SAH kao stabilnijeg molekula od SAM, iskoristi da održi protein u aktivnoj konformaciji u kojoj on prepoznaje sopstvenu iRNK, vezuje se za nju i onemogućava inicijaciju translacije. Eksperiment je urađen sa *PI-sgm* iRNK dužine 159 nt u prisustvu 1mM SAH, kao i u prisustvu rastuće koncentracije koncentracije SAH. Rezultat je prikazan na slici 21.



Slika 21. Vezivanje Sgm proteina za *P1-sgm* iRNK (159 nt) probu u prisustvu rastuće koncentracije SAH: 0,1, 1, 10 mM. Na 6% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa koncentracijom iRNK od 0,015 pmol i koncentracijom Sgm proteina od 100 i 50x u suvišku u odnosu na RNK. U prvoj koloni je iRNK proba bez proteina i SAH, u drugoj, trećoj i četvrtoj koloni je slobodna iRNK proba bez proteina, ali joj je dodat SAH. Prisustvo ili odsustvo SAH je označeno na slici sa +/- . U kolonama 5, 6, 7, 8 je iRNK probi dodat Sgm protein u suvišku od 100x, u kolonama 9 i 10 je protein prisutan u suvišku od 50X.

Iz ovog eksperimenta se jasno uočava da dodavanje SAH u EMSA reakcije ne utiče na specifičnost vezivanja Sgm proteina za iRNK.

Podaci dobijeni nakon eksperimenta u kom je praćeno vezivanje Sgm proteina za *P1-sgm* iRNK dužine 159 nt u prisustvu 1mM SAH, su u saglasnosti sa prethodnim eksperimentom i ne govore u prilog povećanoj specifičnosti vezivanja proteina za iRNK (rezultati nisu prikazani u ovom radu).

Svi urađeni EMSA eksperimenti pokazuju da se prečišćeni Sgm protein nespecifično vezuje bilo koju iRNK koja mu se ponudi, ukoliko je prisutan u velikom suvišku.

Iako *in vivo* eksperimenti nedvosmisleno ukazuju na postojanje negativne autoregulacije na nivou inicijacije translacije *sgm* gena (Kojic *et al.*, 1996), pokazano nespecifično vezivanje Sgm proteina sugerise da najverovatnije postoji još nešto u ćeliji što bi moglo da utiče na specifičnost vezivanja ove metiltransferaze za sopstvenu iRNK.

Da bi se proverila ova pretpostavka urađeni su EMSA eksperimenti u kojima su, umesto prečišćenog His₆Sgm proteina, korišćeni bilo ćelijski ekstrakti bilo S30 frakcija. Međutim, očekivano povećanje specifičnosti vezivanja Sgm proteina za sopstvenu iRNK nije dobijeno ni u jednom slučaju.

Paralelno sa EMSA esejima su rađeni filter binding eseji da bi se odredila konstanta disocijacije proteina. Esej je rađen sa prečišćenim Sgm proteinom, ćelijskim ekstraktom, S30 frakcijom, S100 frakcijom koje su sadržale eksprimirani Sgm protein i iRNK probama koje su prethodno opisane. Ni u jednom slučaju nije pokazana razlika u vezujućem afinitetu Sgm proteina za iRNK probe (rezultati nisu prikazani).

4. Ispitivanje interakcije RNK i Sgm proteina „toeprint“ metodom

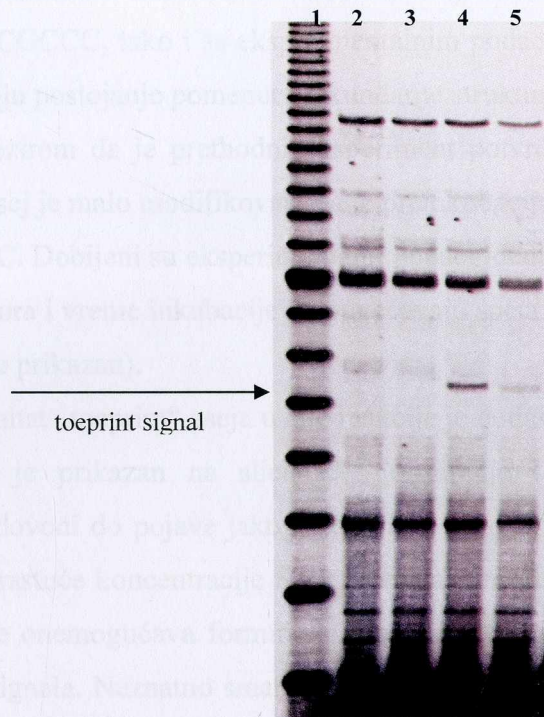
Kada tokom reakcije polimerizacije reverzna transkriptaza naiđe na 30S ribozomalnu subjedinicu vezanu za RBS, disosuje sa iRNK a kao rezultat toga nastaje „toeprint“ signal. Signal se obično javlja na poziciji +15, u kodirajućem delu gena. Kako hipoteza o negativnoj autoregulaciji *sgm* gena na nivou inicijacije translacije nije dokazana putem EMSA eseja, urađeni su „toeprint“ eksperimenti, u kojima je očekivano nestajanje „toeprint“ signala, jer bi vezivanje Sgm proteina za regulatorne sekvence u sopstvenoj iRNK onemogućilo vezivanje 30S subjedinice za RBS.

Prvi korak u ovom eksperimentu je bio izbor i radioaktivno obeležavanje odgovarajućeg prajmera sa γ -ATP. Odabrani prajmer, „+80atgsgmrev“, je komplementaran *sgm* genu na poziciji od +80 od ATG i usmeren ka početku gena. Za „toeprint“ esej je *in vitro* sintetisana *P1-sgm* iRNK dužine 159 nt, koja je korišćena u prethodnim eksperimentima. Nakon vezivanja prajmera za iRNK, MMLV reverznom transkriptazom je sintetisan komplementarni lanac što omogućava da formirani kompleksi, kako binarni 30S-iRNK, tako i ternarni 30S-iRNK-tRNK^{fmet} budu vizuelizovani na akrilamidnom gelu .

Za ispitivanje interakcije Sgm proteina i iRNK, u „toeprint“ eksperimentu neophodno je preinkubirati prečišćeni Sgm protein sa smešom u kojoj je prajmer vezan za iRNK pre

dodavanja ostalih komponenti u reakciju. Preinkubacija je rađena 45 min na sobnoj temperaturi. Imajući u vidu rezultate EMSA eksperimenata, polazna koncentracija prečišćenog Sgm u reakciji od koje smo pošli je 600x veća u odnosu na iRNK.

Rezultat „toeprint“ eseja je prikazan na slici 22.



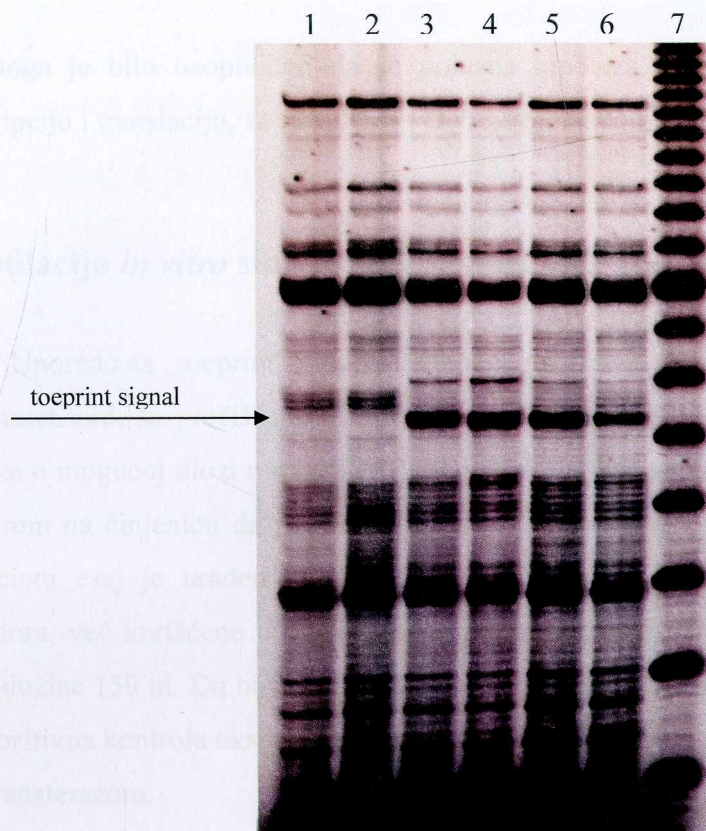
Slika 22. „Toeprint“ esej. U prvoj koloni je 10bp DNK lestvica. Reakcije „primer extension“ (kolona 2), formiranje binarnog kompleksa (kolona 3), formiranje ternarnog kompleksa (kolona 4), kao i reakcija kompeticije između Sgm proteina i 30S subjediniice (kolona 5) su označene na slici. Pojava „toeprint“ signala je označena strelicom.

U ovim eksperimentalnim uslovima nije bilo moguće detektovati tranzientni binarni kompleks. Formiranje stabilnog ternarnog kompleksa 30S-iRNK-tRNK^{fmet} dovodi do pojave „toeprint“ signala na poziciji +15 nukleotida nizvodno od inicijacionog kodona. Dodavanje Sgm proteina u suvišku od 600x u odnosu na iRNK tokom formiranja ternarnog kompleksa, dovodi do slabljenja ali ne i do potpunog nestanka „toeprint“ signala na poziciji +15. Ovi rezultati navode na zaključak da ne postoji kompeticija između Sgm proteina i 30S subjediniice za vezivanje za iRNK, ali i da ne postoji visoka specifičnost vezivanja proteina za sopstvenu iRNK. Takođe, sa slike se jasno uočava da u svim reakcijama postoji više signala tj. više mesta na iRNK sa kojih je reverzna

transkriptaza spadala tokom sinteze cDNK. Glavni signali, prema DNK lestvici, prisutni su na poziciji +30 u kodirajućem delu gena, kao i na poziciji -20 u odnosu na start kodon. Moguće objašnjenje za ove signale je postojanje stabilnih sekundarnih struktura unutar iRNK. Štaviše, signal na poziciji -20 je potpuno u saglasnosti kako sa kompjuterskom predikcijom stabilne sekundarne strukture koja obuhvata i potencijalnu regulatornu sekvencu CCGCCC, tako i sa eksperimentalnim podacima dobijenim RN-aznim esejima koji potvrđuju postojanje pomenute sekundarne strukture (Vojnovic *et al.*, in press 2010).

S obzirom da je prethodni eksperiment potvrdio rezultat EMSA eseja, naredni „toeprint“ esej je malo modifikovan, pa je preinkubacija Sgm proteina sa iRNK rađena 10 min na 37° C. Dobijeni su eksperimentalni podaci identični prethodno opisanim i ukazuju da temperatura i vreme inkubacije ne povećavaju specifičnost vezivanja proteina za RNK (rezultat nije prikazan).

Rezultat „toeprint“ eseja u čije reakcije je dodavana duplo veća koncentracija 30S subjedinica je prikazan na slici 23. Formiranje ternarnog kompleksa 30S-iRNK-tRNK^{fmet} dovodi do pojave jakog „toeprint“ signala na poziciji +15C od start kodona. Dodavanje rastuće koncentracije Sgm proteina u reakcije od 100x i 300x više u odnosu na RNK, ne onemogućava formiranje ternarnog kompleksa tj. ne dolazi do „hlađenja“ „toeprint“ signala. Neznatno smanjenje intenziteta signala se primećuje u reakciji gde je prisutan Sgm protein u suvišku od 300x. U svim reakcijama je prisutan isti profil traka tj. isti signali kao u prethodnom eksperimentu.



Slika 23. „Toeprint“ esej. U poslednjoj koloni je 10bp DNK lestvica. Reakcije „primer extension“ (kolona 1), formiranje binarnog kompleksa (kolona 2), formiranje ternarnog kompleksa (kolona 3 i 4) kao i reakcije kompeticije između Sgm proteina i 30S subjedinice (kolone 5 i 6) su označene na slici. Pojava „toeprint“ signala je označena strelicom.

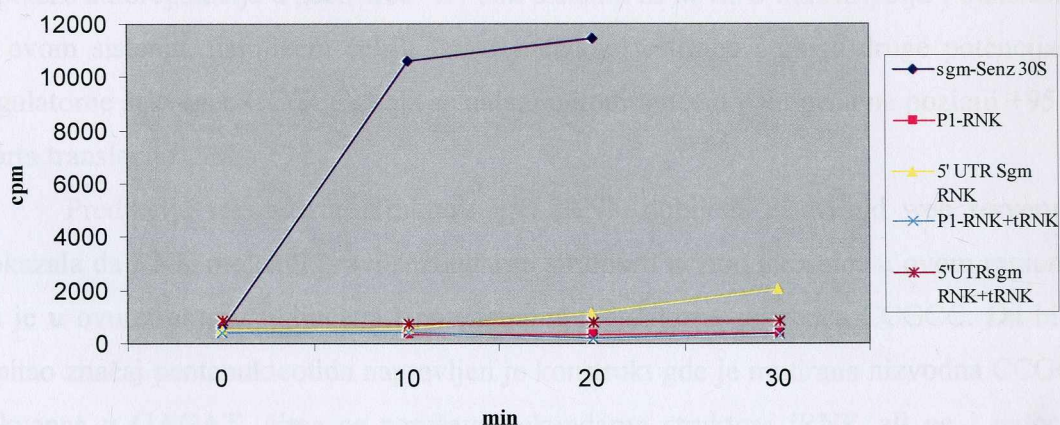
Navedeni rezultati, kao i rezultati „toeprint“ eseja koji nisu prikazani, jasno ukazuju da Sgm protein ne sprečava vezivanje 30S subjedinica za iRNK ukoliko je prisutan u reakciji u suvišku od 100x u odnosu na iRNK. Prema podacima iz literature za formiranje kompleksa protein-RNK dovoljno je da protein bude dodat u reakciju u suvišku od 3x. Očigledno je da u ovom slučaju ne postoji visok afinitet vezivanja proteina za ponuđenu RNK. Do potpunog „hlađenja“ „toeprint“ signala dolazi tek ako je protein prisutan u suvišku od 1200x (podaci nisu prikazani).

Nakon „toeprint“ eksperimenata i evidentnog odsustva vezivanja Sgm metilaze, koje je prvobitno utvrđeno EMSA eksperimentima, postavilo se pitanje da li su odabrane metode dovoljno osetljive za dokazivanje represije na nivou inicijacije translacije *sgm* gena.

Zbog toga je bilo neophodno da se polazna hipoteza testira u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju, sa cirkularnih DNK, koji su komercijalno dostupni (Promega).

5. Metilacija *in vitro* sintetisanih *sgm* iRNK

Uporedo sa „toeprint“ esejima rađena je metilacija *sgm* iRNK molekula koji su *in vitro* sintetisani, sa prečišćenim Sgm proteinom. Ovim eksperimentom je proveravana hipoteza o mogućoj ulozi metilacije iRNK molekula, kao signala za njihovu degradaciju. S obzirom na činjenicu da je genska regulacija *sgm* vezana za njegov 5' kraj, *in vitro* metilacioni esej je urađen sa dve kratke iRNK koje su *in vitro* sintetisane sa T7 promotora, već korišćene u EMSA eksperimentima: *sgm*-iRNK dužine 48 nt i *P1*-*sgm* iRNK dužine 159 nt. Da bi se olakšala precipitacija iRNK, u reakciju je dodavana tRNK. Kao pozitivna kontrola eksperimenta poslužila je reakcija metilacije 30S subjedinica Sgm metiltransferazom.



Slika 24. *In vitro* metilacioni esej iRNK koje su sintetisane u *in vitro* sistemu sa T7 promotora sa Sgm metiltransferazom. Pozitivna kontrola-metilacija 30S subjedinica (*sgm*-Senz 30S), metilacija *P1*-*sgm* iRNK (*P1*-RNK), metilacija *P1*-*sgm* iRNK u prisustvu tRNK (*P1*-RNK+tRNK), metilacija *sgm* iRNK (5'UTR Sgm RNK), metilacija *sgm* iRNK u prisustvu tRNK (5'UTR Sgm RNK+tRNK).

Rezultat metilacionog eseja je prikazan na slici 24. Do metilacije dolazi samo u reakciji gde je target za Sgm protein 30S subjedinica. U ostalim reakcijama sa *Pl-sm* iRNK i *sgm*-iRNK molekulima metilacija izostaje, što je bio znak da Sgm ne prepoznaje sopstvene iRNK kao target, tako da hipoteza o metilaciji iRNK kao signala za njihovu degradaciju nije potvrđena.

6. Ispitivanje negativne autoregulacije *sgm* gena u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju *E. coli*

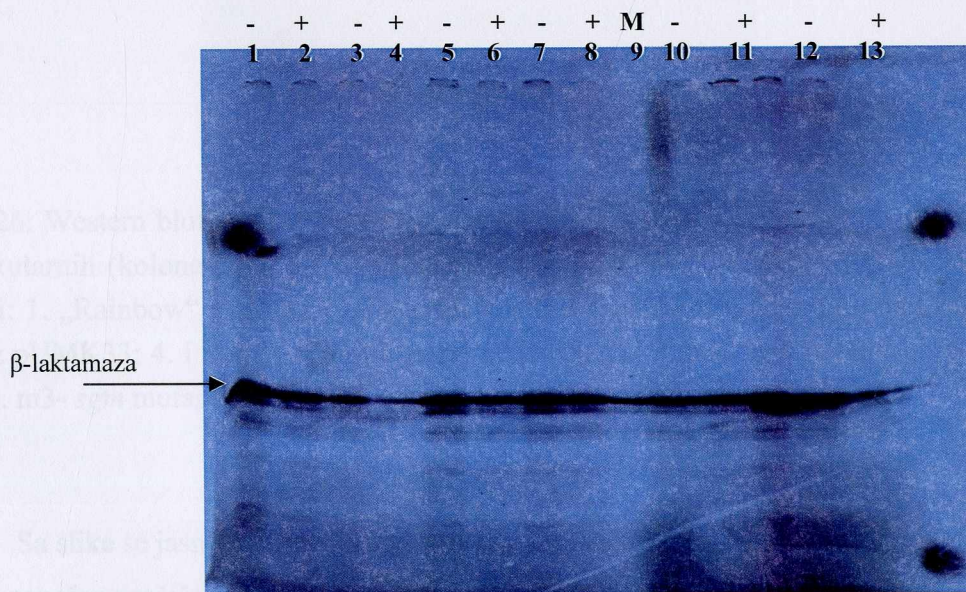
6.1. *In vitro* translacija sa cirkularnih DNK matrica

Kako ni jedan od eksperimentalnih pristupa nije pružio dokaze postojanja autoregulacije na nivou inicijacije translacije *sgm* gena, a kako je pokazano da ona postoji u heterologom domaćinu, *E. coli*, dalji eksperimenti su bili usmereni ka testiranju hipoteze autoregulacije u „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju. U ovom sistemu, najbližem ćeliji, istovremeno je testirana i uloga druge potencijalne regulatorne sekvence CCGCC, koja se nalazi u kodirajućem delu gena na poziciji +95 od starta translacije (Slika 17).

Predikcija sekundarne strukture *sgm* iRNK dobijena na Mfold web serveru je pokazala da RNK molekul pravi sekundarnu strukturu u vidu ukosnice u ovom regionu i da je u ovu strukturu uključena i potencijalna regulatorna sekvenca CCGCC. Da bi se ispitao značaj pentanukleotida napravljen je konstrukt gde je mutirana nizvodna CCGCC sekvenca u GAGAT, čime se narušava sekundarna struktura iRNK ali ne i redosled aminokiselina u proteinu. U drugom konstrukt su obe potencijane regulatorne sekvence bile mutirane, tj. pored već pomenute izmene u pentanukleotidu, prva, CCGCCC uzvodna regulatorna sekvenca je deletirana.

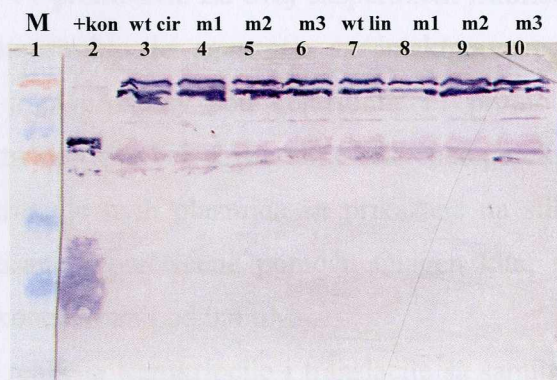
Transkripcija i translacija *sgm* gena su prvobitno rađene sa 4 plazmidne DNK koje su linearizovane neposredno iza samog *sgm* gena, u ćelijskom ekstraktu u prisustvu radioaktivno obeleženog metionina [³⁵S] prema uputstvu proizvođača. Ekspresija *sgm*

gena, bilo da je wt tj. sa intaktnim potencijalnim regulatornim sekvencama, ili sa mutiranim potencijalnim regulatornim sekvencama, je pod kontrolom *lacZ* promotora. Plazmid pUMK33 nosi wt *sgm* gen sa nepromenjenim regulatornim sekvencama. Drugi plazmid pM5-18 (prilog 6) ima wt *sgm* gen i deletiranu CCGCCC uzvodnu regulatornu sekvencu u 5'UTR. Kod pSgm57 plazmida je mutirana nizvodna potencijalna sekvencu, CCGCC iz kodirajućeg regiona, u GAGAT, čime je narušena sekundarna struktura iRNK ali ne i redosled aminokiselina u proteinu (prilog 8A). Plazmid pPCR57 ima deletiranu uzvodnu i mutiranu nizvodnu regulatornu sekvencu u GAGAT (prilog 8B). Kao pozitivna kontrola korišćena je reakcija *in vitro* translacija sa plazmida pΔK1 koji nosi *kgm* gen. Negativna kontrola je bila reakcija *in vitro* translacije sa plazmida pUC18. Pre stavljanja u reakcionu smešu plazmidi su dodatno prečišćeni na koloni G-25 (Pharmacia). Rezultat eksperimenta je prikazan na slici 25.



Slika 25. Autorepresija translacije Sgm *in vitro*. Na 12,5% SDS- poliakrilamidni gel su nanete reakcije *in vitro* translacije sa plazmida bez i u prisustvu dodatog prečišćenog Sgm proteina: pUMK33 (kolone 1 i 2), pM5-18 (kolone 3 i 4), pSgm57 (kolone 5 i 6), pPCR57 (kolone 7 i 8), pUC18 (kolone 12 i 13). Reakcije *in vitro* translacije sa plazmida pΔK1 bez i u prisustvu dodatog prečišćenog Kgm (kolone 10 i 11).

Na radiografiji se uočava prisustvo jakog signala na poziciji oko 31kDa, u svim kolonama. Ovaj signal po molekularnoj težini odgovara ne samo Sgm proteinu, već i β -laktamazi. Gen za β -laktamazu je selektivni marker korišćenih plamida. S obzirom da se isti signal javlja i u koloni sa negativnom kontrolom, pUC18, dolazi do prepokrivanja signala Sgm (31 kDa) i β -laktamaze (~31 kDa) tj. ova dva proteina putuju istom brzinom na 12,5% SDS-poliakrilamidnom gelu. Da bi se utvrdilo da li dolazi do *in vitro* translacije *sgm* gena, dodatno je urađen Western blot eksperiment sa poliklonskim anti-Sgm antitelima (Ilic-Tomic *et al.*, 2005). Rezultat je prikazan na slici 26.



Slika 26. Western blot analiza Sgm proteina sintetisanih u sistemu za *in vitro* translaciju sa cirkularnih (kolone 3, 4, 5 i 6) i linearizovanih (kolone 7, 8, 9 i 10) DNK matrica. Uzorci: 1. „Rainbow“ marker; 2. pozitivna kontrola - prečišćeni Sgm protein; 3. i 7. wt *sgm* iz pUMK33; 4. i 8. m1- *sgm* mutant iz pM5-18; 5. i 9. m2- *sgm* mutant iz pSgm57; 6. i 10. m3- *sgm* mutant iz pPCR57

Sa slike se jasno uočava prisustvo jakog signala u koloni sa pozitivnom kontrolom gde je nanešen prečišćen Sgm protein. U ostalim kolonama gde su uzorci sa proteinima iz *in vitro* translacije nema jasnog signala molekulske težine koja odgovara Sgm proteinu. Profil traka u svim kolonama je identičan onom u negativnoj kontroli koju predstavlja pUC18. Eksperiment je ponovljen i za reakcije translacije su korišćeni isti, prethodno opisani plazmidi linearizovani ovog puta sa *ScaI* enzimom koji prepoznaje i seče sekvencu unutar gena za β -laktamazu. Dobijen je istovetni rezultat, Sgm protein se ne

sintetiše u sistemu za *in vitro* translaciju, sa plazmida u kom je *sgm* gen pod *lacZ* promotora.

6.2. *In vitro* translacija sa iRNK i DNK matrica kojima je dodata T7 RNK polimeraza

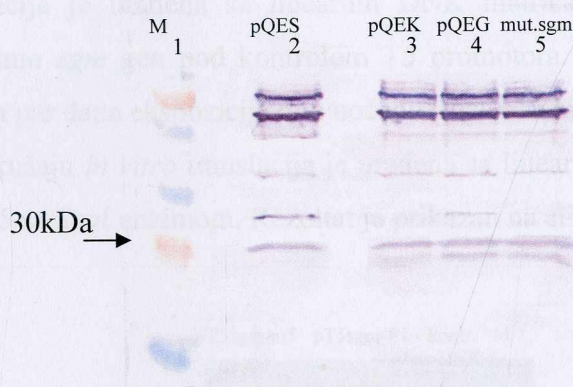
Kao matrice za sintezu Sgm proteina korišćene su kompletne *sgm* iRNK sintetisane *in vitro* sa T7 promotora. Za ovaj eksperiment iskorišćena su 2 konstrukta. U prvom pT7sgm-P1 konstrukt je *sgm* gen sa intaktnom regulatornom sekvencom CCGCCC ukloniran u pGEM-easy pod kontrolom T7 promotora, dok je u drugom pT7sgm-m5 konstrukt *sgm* gen bez regulatorne sekvence pod kontrolom T7 promotora u pGEM-easy (konstrukcije ovih plazmida su prikazane na slikama u prilogu 4 i 5). iRNK koje su sintetisane i prečišćene pomoću Qiagen kita, su stavljane u reakciju translacije u finalnoj koncentraciji od 0,4 μ M.

Paralelno su urađene reakcije transkripcije i translacije sa samih plazmida pT7sgm-P1 i pT7sgm-m5 koji su linearizovani sa *ScaI* enzimom koji seče unutar gena za β -laktamazu. S obzirom da Promegin sistem ne funkcioniše ukoliko su geni pod kontrolom T7 promotora, da bi se obezbedila transkripcija, u reakcije je dodavana T7 RNK polimeraza. Bez obzira da li su korišćene DNK ili RNK matrice, prisustvo signala nije uočeno na radiografiji (rezultati nisu prikazani). Eksperiment je ponovljen više puta sa iRNK koje su različito prečišćavane, međutim rezultat je uvek bio identičan.

Dodatno je Western blot-om potvrđeno da ne dolazi sinteze Sgm proteina u sistemu za *in vitro* translaciju.

6.3. *In vitro* translacija Sgm, KgmB i Grm metiltransferaza i provera ekspresije Western blot eksperimentom

S obzirom na prethodne rezultate, testirana je *in vitro* translacija *sgm*, *kgmB* i *grm* gena koji su stavljeni pod kontrolu T5 promotora iz ekspresionog vektora pQE. Reakcije *in vitro* translacije su proverene Western blot eksperimentom sa poliklonskim anti-Sgm antitelima za koja je ranije pokazano da pokazuju ukrštenu reaktivnost sa KgmB i Grm metiltransferazom (Markovic *et al.*, 2005, Moric *et al.*, 2008). Rezultat je prikazan na slici 27.



Slika 27. Western blot analiza proteina sintetisanih u sistemu za *in vitro* translaciju sa plazmida; kolona: 2. pQES (*sgm*), 3. pQEK (*kgm*), 4. pQEG (*grm*), 5. mutirani Sgm. U prvoj koloni je Rainbow marker, strelicom je označena pozicija proteina od 30 kDa.

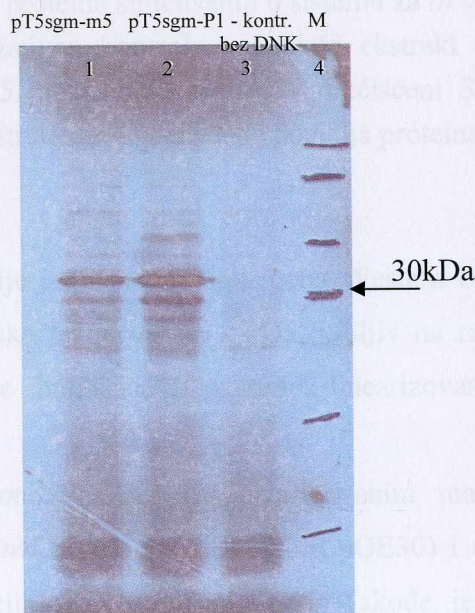
Na slici se uočava prisustvo jasnih signala na poziciji ~32 kDa u kolonama 2 i 4 što odgovara Sgm i Grm proteinima sa (His)₆ repićem. Slab signal je prisutan i u koloni 3 sa KgmB proteinom i koloni 5 gde je Sgm protein sintetisan sa gena čiji su kodoni prilagođeni *E. coli*. Zaključak koji sledi iz ovih eksperimenata je da je sistem za *in vitro* translaciju efikasan u slučaju sva tri gena, samo ukoliko su pod kontrolom promotora T5, i imaju RBS mesto i ATG start kodona iz samog komercijalnog pQE vektora.

6.4. *In vitro* translacija Sgm metilaze sa T5 promotora i provera ekspresije Western blot eksperimentom

Pošto je utvrđeno da *in vitro* translacija *sgm* zavisi od T5 promotora, *sgm* gen sa intaktnom regulatornom sekvencom u 5'UTR je prekloniran, iz vektora pT7sgm-P1 u jedinstveno *EcoRI* mesto locirano iza T5 promotora, u vektor pQE30. Prekloniran je i mutant *sgm* bez regulatorne sekvence iz vektora pT7sgm-m5 u vektor pQE30 pod T5 promotor (konstrukcija ovih plazmida je prikazana na slici prilogu 7A i 7B). U oba slučaja prekloniravanja, *sgm* gen zadržava svoj RBS i svoj start kodon ATG.

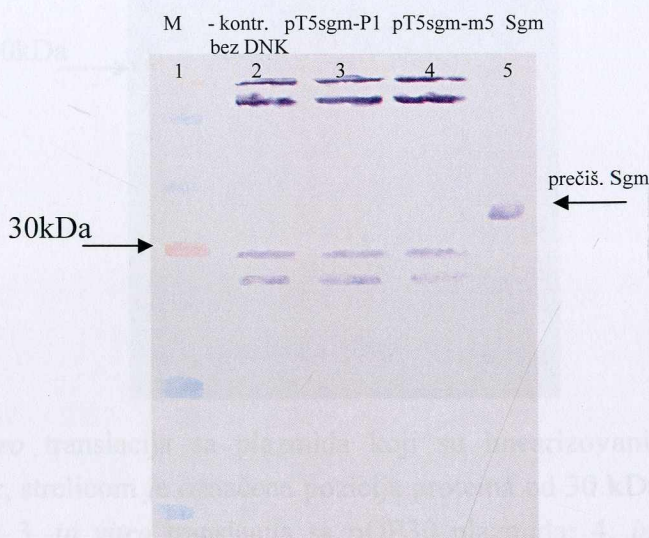
In vitro translacija je urađena sa linearnih DNK matrica eluiranih iz gela, a koje predstavljaju samo *sgm* gen pod kontrolom T5 promotora. Međutim, prisustvo jasnog signala ni nakon par dana ekspozicije nije uočeno (rezultati nisu prikazani).

U sledećem pokušaju *in vitro* translacija je urađena sa linearizovanih plazmida pT5sgm-P1 i pT5sgm-m5 sa *ScaI* enzimom. Rezultat je prikazan na slici 28.



Slika 28. *In vitro* translacija sa plazmida koji su linearizovani *ScaI* enzimom: pT5sgm-P1 i pT5sgm-m5. U trećoj koloni je prikazana negativna kontrola-ćelijski ekstrakt *E.coli* bez DNK. U poslednjoj koloni je marker, strelicom je označena pozicija proteina od 30 kDa.

Na radiografiji se vidi jak signal na poziciji oko 31 kDa koji može po molekularnoj težini da odgovara Sgm proteinu i β -laktamazi. Stoga je paralelno sa ovim eksperimentom urađena i provera Western blot-om. Rezultat je prikazan na slici 29.

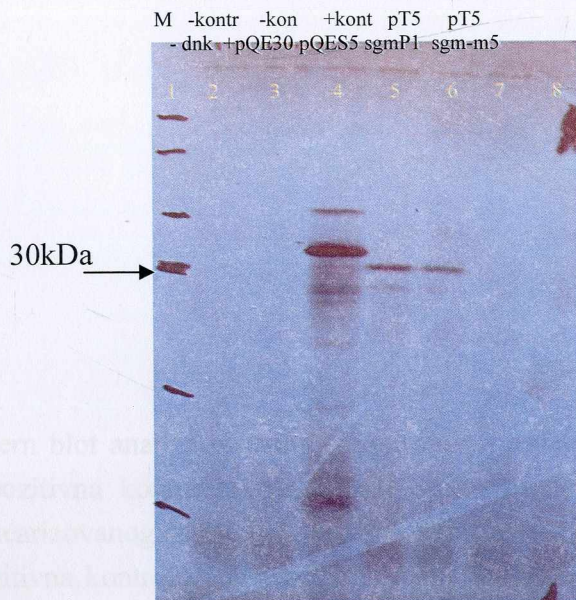


Slika 29. Western blot analiza proteina sintetisanih u sistemu za *in vitro* translaciju sa plazmida. 1. marker; 2. negativna kontrola - ćelijski ekstrakt *E.coli* bez DNK; 3. pT5sgmP1; 4. pT5sgm-m5; 5. pozitivna kontrola - prečišćeni Sgm protein. U prvoj koloni je „Rainbow“ marker, strelicom je označena pozicija proteina od 30 kDa.

Slika 29. Western blot analiza proteina sintetisanih u sistemu za *in vitro* translaciju sa plazmida. 1. marker; 2. negativna kontrola - ćelijski ekstrakt *E.coli* bez DNK; 3. pT5sgmP1; 4. pT5sgm-m5; 5. pozitivna kontrola - prečišćeni Sgm protein. U prvoj koloni je „Rainbow“ marker, strelicom je označena pozicija proteina od 30 kDa.

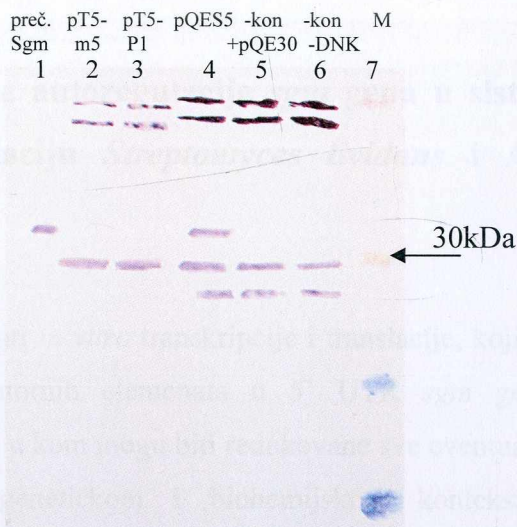
Proverom *in vitro* transkripcije i translacije *sgm* gena Western blot eksperimentom je pokazano da signal molekulske težine od ~31 kDa, vidljiv na radiografiji (Slika 29), potiče od β -laktamaze, koja je sintetisana sa plazmida linearizovanih *ScaI* restrikcionim enzimom.

Eksperiment je još jednom ponovljen sa istim linearizovanim matricama, sa dodatnom negativnom kontrolom (*in vitro* translacija sa vektora pQE30) i dodatnom pozitivnom kontrolom (*in vitro* translacija sa vektora pQES5). Takođe je ponovljena *in vitro* translacija sa DNK koje su izolovane iz gela a koje predstavljaju kompletan *sgm* gen (sečen sa dva restrikciona enzima), pod kontrolom T5 promotora, i bez sekvenci iz ostatka plazmida. Rezultat je prikazan na slici 30.



Slika 30. *In vitro* translacija sa plazmida koji su linearizovani *ScaI* enzimom. 1. proteinski marker, strelicom je označena pozicija proteina od 30 kDa; 2. ćelijski ekstrakt *E.coli* bez DNK; 3. *in vitro* translacija sa pQE30 plazmida; 4. *in vitro* translacija sa plazmida pQES5; 5. *in vitro* translacija sa pT5sgm-P1; 6. *in vitro* translacija sa psgm-m5; 7. *in vitro* translacija sa DNK izolovane iz gela, sa wt *sgm* genom; 8. *in vitro* translacija sa DNK izolovane iz gela, mutirani *sgm* gen sa deletiranom regulatornom sekvencom

Na radiografiji, u četvrtoj koloni, u kojoj je pozitivna kontrola, uočljiv je jak signal, dok se u kolonama 5 i 6 vide dva slabija signala, pozicionirana nešto niže u odnosu na pozitivnu kontrolu. Da bi sa sigurnošću mogli da tvrdimo kojim translacionim proizvodima odgovaraju dobijeni signali, paralelno je rađen i Western blot eksperiment. Rezultat Western blota je prikazan na slici 31.



Slika 31. Western blot analiza proteina sintetisanih u sistemu za *in vitro* translaciju sa plazmida. 1. pozitivna kontrola - prečišćeni Sgm protein; 2. *in vitro* translacija sa pT5sgm-m5 linearizovanog sa *ScaI*; 3. *in vitro* translacija sa pT5sgm-P1 linearizovanog sa *ScaI*; 4. pozitivna kontrola - *in vitro* translacija sa pQES5, 5. negativna kontrola-*in vitro* translacija sa pQE30; 6. negativna kontrola - ćelijski ekstrakt *E.coli* bez DNK; 7. „Rainbow marker“, strelicom je označena pozicija proteina od 30 kDa.

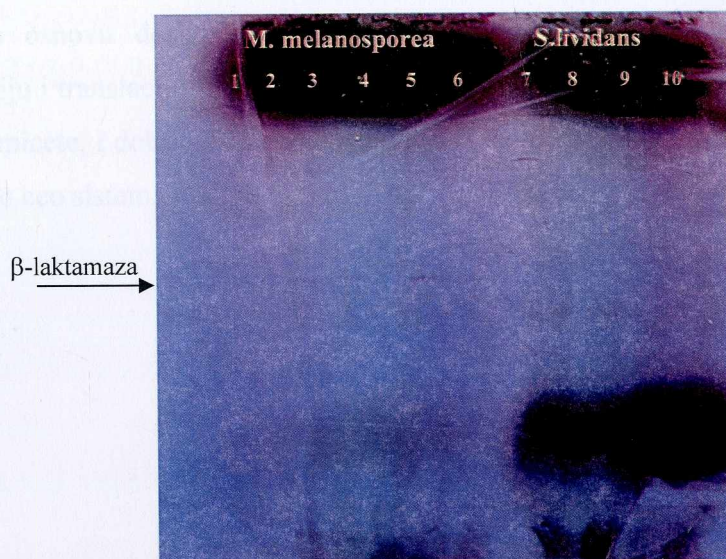
Ovim eksperimentom je potvrđeno odsustvo *in vitro* translacije sa plazmida u kojem je *sgm* gen, bilo da je sa regulatornom sekvencom ili bez nje, pod kontrolom T5 promotora, ali sa sopstvenim RBS i start kodonom. Ne treba smetnuti sa uma da ovi konstrukti omogućavaju rast ćelijma na gentamicinu tj. da se gen eksprimira *in vivo* i obezbeđuje rezistenciju na antibiotik. Posebno je interesantna činjenica da se *sgm* gen eksprimira *in vitro* ukoliko je pod kontrolom T5 promotora, i sa RBS-om i ATG kodonom iz ekspresionog pQE30 vektora. Pitanje koje se logično nameće je šta to ometa *in vitro* transkripciju i translaciju kada je *sgm* gen ukloniran u isti ekspresioni, komercijalni vektor, a nosi sopstveno mesto vezivanja ribozoma i ATG. Zato je u daljem radu, za ispitivanje negativne autoregulacije, uveden sistem za *in vitro* transkripciju i translaciju iz *Streptomyces lividans* i *Micromonospora melanosporea*.

7. Ispitivanje negativne autoregulacije *sgm* gena u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju *Streptomyces lividans* i *Micromonospora melanosporea*

Prethodni eksperimenti *in vitro* transkripcije i translacije, koji su izvedeni u cilju određivanja značaja regulatornih elemenata u 5' UTR *sgm* gena, urađeni su u heterologom sistemu *E. coli*, u kom mogu biti redukovane sve eventualne interakcije koje postoje u homolognom genetičkom i biohemijskom kontekstu. Stoga su, za prevazilaženje mogućih ograničenja mehanizma u *E. coli* sistemu, odabrani homologni sistemi za *in vitro* transkripciju i translaciju *Streptomyces lividans* i *Micromonospora melanosporea*. *In vitro* sistemi su napravljeni po uputstvu iz „Practical Streptomyces Genetics“, (Kieser *et al.*, 2000).

U eksperimentima transkripcije i translacije u homolognim *in vitro* sistemima *S. lividans* i *M. melanosporea*, u prisustvu radioaktivno obeleženog metionina [³⁵S] korišćeni su isti konstrukti: pSgm57, pΔK1, pUMK33, pM5-18. Ovi vektori, derivati pUC vektora, nose gen za β laktamazu koji se eksprimira u homolognom sistemu i služi kao pozitivna kontrola. Geni *sgm* i *kgmB* su pod kontrolom *lacZ* promotora koji je aktivan u aktinomicetama, a u svom 5'UTR sadrže regulatorne sekvence iz originalnih domaćina tj. *S. tenebrarius* i *M. zionensis*, koje može da prepozna ekspresioni sistem *S. lividans*.

U preliminarnim eksperimentima nije detektovan očekivani signal ni u jednom od pomenuta dva homologna *in vitro* sistema. Optimizacijom uslova rasta *M. melanosporea* i kao i modifikovanjem procedure po kojoj se priprema S30 ekstrakt, dobijen je rezultat prikazan na slici 32.



Slika 32. *In vitro* transkripcija i translacija sa plazmida pSgm57 i pUMK33 u sistemu *M. melanosporea*. Kolone od 1 do 6 se odnose na *M. melanosporea* sistem a i kolone od 7 do 10 na *S. lividans* sistem. U kolonama 1 i 4 je prikazana negativna kontrola - ćelijski ekstrakt *M. melanosporea* bez DNK. U kolonama 2 i 5 je prikazana translacija sa plazmida pSgm57; u kolonama 3 i 6 je prikazana translacija sa plazmida pUMK33 koji je linearizovan sa *Bam*HI. U kolonama 7 i 9 je prikazana negativna kontrola - ćelijski ekstrakt *S. lividans* bez DNK; u kolonama 8 i 10 je prikazana translacija sa plazmida pSgm57.

Na slici 32 se uočava prisustvo trake veličine ~31 kDa u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju *M. melanosporea* ali ne i u sistemu *S. lividans*. Traka po veličini odgovara Sgm proteinu ali može da odgovara i β laktamazi. Da bi se utvrdilo koji je protein od ova dva u pitanju, urađen je Western blot eksperiment, u kom nije dobijen signal sa anti-Sgm antitelima, što ukazuje da nema sinteze Sgm proteina u sistemu *M. melanosporea* (rezultat nije prikazan).

Dodatno je urađen eksperiment *in vitro* transkripcije i translacije u sistemu *M. melanosporea* sa plazmidima za streptomycete. pIJ702 je korišćen kao kontrolni plazmid bez kloniranih metiltransferaza dok su plazmidi pLST31 sa kloniranim *kgmB* genom i pMK33 sa kloniranim *sgm* genom korišćeni kao matrice. Međutim, eksperimentom je pokazano odsustvo ekspresije i marker gena koji obezbeđuje rezistenciju na antibiotik tiostrepton kao i ekspresije obe metiltransferaze Sgm i KgmB.

Na osnovu dosadašnjih eksperimenata u homolognom sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju *M. melanospora* i nemogućnosti dobijanja signala sa plazmida za streptomicete, i dobijanja slabih signala sa *E. coli* plazmida, može da se zaključi da je neophodno ceo sistem dodatno optimizovati da bi dao reprezentativne rezultate.

V DISKUSIJA

Transkripcija kao primarni i najekonomičniji način genske regulacije za ćeliju, prisutna je i kod *sgm* gena iz *M. zionensis*, proizvođača aminoglikozidnog antibiotika G-52 (6-N-metilsisomicin). Ova bakterija se štiti od sopstvenog toksičnog proizvoda modifikacijom ribozoma, koja se ostvaruje zahvaljujući Sgm metiltransferazi. Pokazano je da *sgm* gen ima složenu transkripcionu regulaciju. Naime, transkripciona analiza *sgm* gena kako u originalnom domaćinu *M. zionensis*, tako i u heterologom, *S. lividans* je pokazala da se ovaj gen prepisuje sa tandemskih promotora (Kojic *et al.*, 1992; Kojic, 1994). Pojava tandemskih promotora je karakteristična za veliki broj gena aktinomiceta (Bibb *et al.*, 1986; Janssen and Bibb, 1990; Baum *et al.*, 1988; Kormanec *et al.*, 1993). Bitna karakteristika tandemskih promotora je da su vremenski regulisani i da ih prepoznaju različiti sigma faktori za RNK polimerazu (Lin *et al.*, 1992). Posedovanje tandemskih promotora od strane *sgm* gena govori u prilog tome da dolazi do diferencijalne genske ekspresije.

Prvi transkript *sgm* gena počinje od G nukleotida koji se nalazi 72 nt uzvodno od ATG kodona (promotor P1), dok je drugi start transkripcije pozicioniran 250 nt od starta translacije (promotor P2). Pokazano je da je P2 promotor četiri puta jači od slabog P1 promotora. Izneta je hipoteza od strane autora (Kojić, 1994) da su promotori vremenski regulisani i da je P1 promotor konstitutivno eksprimiran tokom vegetativne faze rasta, dok je P2 promotor maksimalno aktivan tokom stacionarne faze rasta kada započinje ekspresija gena za sintezu antibiotika. Imajući u vidu činjenicu iz literature, da su geni za rezistenciju klasterovani sa genima za sintezu antibiotika, a često su i koregulisani i kotranskribovani (Doyle *et al.*, 1991; Dairi *et al.*, 1992a i b), autor pretpostavlja da P2 promotor promovise transkripciju većeg dela operona za rezistenciju i biosintezu antibiotika.

Ovaj model je zasnovan na podacima iz literature u kojima su okarakterisani promotori koji u velikoj meri jesu analogni situaciji kod *sgm* gena (Baum *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1992).

Interes za translacionu regulaciju *sgm* gena je proistekao iz činjenice da je bilo nemoguće izolovati Sgm protein iz *E. coli* ćelija koje su pokazivale rezistenciju na gentamicin. S druge strane, iz literature je poznato da ovaj tip enzima može sa relativno malim brojem molekula da izvrši kompletnu modifikaciju rRNK (Cundliffe *et al.*, 1989). Celokupna *in vivo* analiza regulacije *sgm* gena je urađena u heterologom domaćinu, *E. coli*, a ne u micromonospori ili streptomiceti. Ovaj pristup je bio opravdan, imajući u vidu to da nije bilo moguće dobiti detektabilnu količinu Sgm proteina iz *E. coli* mini ćelija, na osnovu čega je zaključeno da negativna translaciona autoregulacija *sgm* gena funkcioniše bez specijalnih dodatnih faktora, i da je uključena u održavanje konstantne i niske koncentracije Sgm proteina u ćeliji koja je dovoljna za uspostavljanje gentamicin rezistentnog fenotipa. Dokaz da se negativna regulacija *sgm* gena vrši na nivou inicijacije translacije, je dobijen nakon eksperimenata urađenih u *in vivo* uslovima, u heterologom domaćinu *E. coli* (Kojić, 1994). Naime, korišćenjem *sgm-lacZ* genskih i operonskih fuzija je pokazano da Sgm protein može da vrši represiju β -galaktozidaze samo u genskim ali ne i u operonskim fuzijama bilo da je prisutan u *in cis*, bilo u *in trans* konstelaciji. Ovaj rezultat je bio dokaz da Sgm vrši autoregulaciju sopstvene sinteze delujući kao translacioni represor. Prema predloženom modelu od strane autora (Kojić *et al.*, 1996), Sgm protein nakon što izvrši kompletnu modifikaciju svog primarnog targeta 16S rRNK, i obezbedi ćeliji rezistenciju na antibiotik, prepoznaje i vezuje se za sopstvenu iRNK, čime je onemogućena njena translacija. Kako je kompjuterskom analizom pokazano da postoji isti heksanukleotid CCGCCC kako u 5' UTR regionu *sgm* iRNK gde ulazi u sastav sekundarne strukture u vidu ukosnice, 14 nt ispred RBS, tako i u A mestu u okviru heliksa 44 na 3' kraju 16S rRNK koji je takođe i mesto vezivanja aminoglikozodnih antibiotika, izneta je hipoteza po kojoj Sgm metiltransferaza prepoznaje primarno isti heksanukleotid kako u 16S rRNK tako i u sopstvenoj iRNK (Kojić *et al.*, 1996). Dokaz u prilog ovoj hipotezi je dobijen nakon što je napravljena genska fuzija sa *sgm* genom kojem je deletiran skoro ceo 5' UTR uključujući i pretpostavljenu CCGCCC regulatornu sekvencu, i kada je pokazano da Sgm metiltransferaza, prisutna na istom plazmidu, ne reprimira aktivnost β -galaktozidaze. Ovaj rezultat je ukazivao na to da bi heksanukleotid CCGCCC mogao biti neophodan za translacionu represiju. Iz literature su poznata tri gena koja imaju autoregulaciju na nivou

inicijacije translacije, a koji svom nosiocu obezbeđuju rezistenciju na antibiotike metilacijom rRNK. To su *ermC* koji je odgovoran za rezistenciju na eritromicin (Denoya *et al.*, 1986), KsgA dimetiluje 16S rRNK, ukoliko izostane ova metilacija bakterije postaju rezistentne na kazugamicin (Van Gemen *et al.*, 1989) i *kgmB* koji obezbeđuje rezistenciju na kanamicin i gentamicin (Vajić *et al.*, 2004). Autoregulatorni mehanizmi u ovim slučajevima su bazirani na sličnosti između iRNK (u primarnoj ili sekundarnoj strukturi) i target mesta u okviru rRNK date metiltransferaze. Štaviše, potencijalna regulatorna sekvenca CGCCC *kgmB* gena se takođe nalazi u okviru sekundarne strukture u vidu ukosnice, i slična je strukturi u kojoj se nalazi regulatorna sekvenca za Sgm metiltransferazu. Ovom sličnošću sekvence i strukture se objašnjava sposobnost Sgm i KgmB metiltransferaze da regulišu jedna drugu (Milojević, 1998).

U prilog regulaciji *sgm* gena na nivou inicijacije translacije govore i rezultati *in vivo* eksperimenata, gde je pokazana veza između ekspresije sekundarnog targeta (5'UTR *sgm* gena) i rezistencije na gentamicin u *E. coli* i *M. melonosporea* (Kojić *et al.*, 2007). Naime, overekspresija 5' netranslatirajućeg regiona *sgm* gena, prisutnog na plazmidu pod kontrolom inducibilnog PLtI promotora, redukuje rezistenciju na gentamicin kod *E. coli*. Ovim eksperimentima je pokazana direktna korelacija između senzitivnosti ćelija na gentamicin sa nivoom indukcije PLtI promotora koja je rađena sa IPTG. Takođe, eksperimenti urađeni u micromonospori su pokazali da do veće senzitivnosti ćelija na gentamicin dolazi ukoliko se 5'UTR *sgm* gena eksprimira sa jačeg promotora. Prema ovim rezultatima višak sekundarnog targeta titrira određenu količinu Sgm proteina, dovodeći do smanjenja broja molekula neophodnih za obezbeđivanje visokog nivoa rezistencije. Na osnovu ovih rezultata se može izvesti zaključak da je vezivanje Sgm proteina za sopstvenu iRNK jače od vezivanja istog proteina za 30S ribozomalnu subjedinicu.

Imajući u vidu rezultate *in vivo* eksperimenata odlučeno je da se za autoregulaciju *sgm* gena dalje testira značaj potencijalne regulatorne sekvence CCGCCC i sekundarne strukture, u okviru koje se sekvenca nalazi, i da se *in vitro* eksperimentima potvrdi gore izneta hipoteza koja je ranije dokazana u *in vivo* uslovima.

Da bi se negativna regulacija Sgm metiltransferaze izučavala *in vitro* bilo je neophodno ekspimirati i prečistiti ovaj protein u aktivnoj formi za dalji rad. U tu svrhu je

korišćen QIAexpress sistem (Qiagen) kojim je protein obeležen histidinskim repićem na N terminusu i prečišćen afinitetnom hromatografijom na koloni od Ni-NTA agaroze (Ilić-Tomić *et al.*, 2005). Metilacionim esejom je potvrđeno da je ovako izolovan protein bio funkcionalan kao enzim.

Nakon potvrde metiltransferazne aktivnosti Sgm proteina, detaljnije se pristupilo analizi interakcije Sgm sa sopstvenom iRNK metodom EMSA. Prilikom analize kompleksa protein-iRNK treba imati na umu da se svaki takav kompleks nalazi u stanju ravnoteže sa određenom koncentracijom slobodnih komponenti, RNK i proteina (Setzer, 1999). U ravnoteži, raspodela komponenti između vezane i slobodne forme je određena ravnotežnom konstantom vezivanja K_d (ili konstantom afiniteta K_a , $K_a=1/K_d$). Ravnotežna konstanta vezivanja za takav kompleks se izračunava po formuli $K_d=[R][P]/[RP]$ gde je $[R]$ koncentracija RNK a $[P]$ koncentracija proteina. Takođe, ravnotežna konstanta vezivanja se može posmatrati i kao odnos konstanti brzina disocijacije (k_{off}), i brzine asocijacije (k_{on}), protein-RNK kompleksa, $K_d=k_{off}/k_{on}$. Za opisivanje kompleksa protein-RNK važno je praviti razliku između afiniteta koji je određen ravnotežnom konstantom vezivanja, i stabilnosti koja je određena konstantom brzine disocijacije. Posebna karakteristika protein-RNK kompleksa je specifičnost, i ona se analizira u reakcijama vezivanja sa različitim koncentracijama neobeleženeog specifičnog i nespecifičnog kompetitora.

Za analizu Sgm-iRNK interakcije korišćen je EMSA esej. Prvi korak u ispitivanju vezivanja proteina za 5' UTR sopstvene iRNK dužine 48 nt je determinisanje minimalne koncentracije proteina koja dovodi do formiranja vidljivog signala na radiografiji. Iz više nezavisno urađenih eksperimenata u kojima je koncentracija iRNK održavana konstantnom a u reakcije dodavana rastuća koncentracija Sgm proteina počev od 15 pmol do 90 pmol, prisustvo jasnog kompleksa je detektovano u reakcijama vezivanja u kojima je molarni odnos proteina prema iRNK iznosio 300:1 (Slika 13). Ovi rezultati govore u prilog tome da Sgm protein ima mali afinitet za iRNK tj. da ima malu konstantu afiniteta K_a , ili pak, ovi rezultati govore u prilog tome da je Sgm-iRNK kompleks nestabilan pa ima veliku konstantu brzine disocijacije k_{off} . S druge strane, ovaj visoki molarni odnos treba uzeti sa rezervom iz dva razloga. Prvo, nakon reakcije obeležavanja iRNK probe zaostaje izvesna količina neobeleženeog iRNK molekula za koji Sgm protein može da se

veže a da se to ne detektuje na radiografiji. Drugo, preračunata i dodata koncentracija proteina u svakoj reakciji vezivanja je relativna. Mada su korišćene frakcije proteina čistoće oko 95%, treba imati u vidu prisustvo kontaminirajućih proteina, kao i prisustvo Sgm molekula neaktivnih u vezivanju, što može biti posledica njegove denaturacije prilikom prečišćavanja ili tokom čuvanja.

Specifičnost Sgm-iRNK interakcije je testirana u reakcijama kompeticije kako sa specifičnim tako i sa nespecifičnim kompetitorom (Slika 14). U reakcijama kompeticije sa specifičnim kompetitorom dobijen je rezultat koji govori da je za potpuno hlađenje kompleksa Sgm-iRNK potrebna sto puta veća koncentracija neobeležene iRNK što je u skladu sa podacima iz literature (Baker *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2003). Međutim, ova specifičnost nije potvrđena u reakcijama kompeticije sa nespecifičnim kompetitorom (Slika 14). Kao nespecifični kompetitor korišćena je *pBlu* iRNK koja ne pokazuje nikakvu homologiju u sekvenci i strukturi sa *sgm* iRNK. Pokazano je da koncentracije nespecifičnog kompetitora istovetne onima kod specifičnog kompetitora takođe dovode do slabljenja kompleksa Sgm-iRNK, možda ne u istoj meri, ali svakako značajnoj da bi se dodatno proverilo vezivanje Sgm proteina za obeleženu *pBlu* RNK. Nakon podataka dobijenih iz reakcija vezivanja kao i kompetitivnog EMSA eseja koji je urađen sa obeleženom probom *pBlu* RNK (Slika 15 i 16), postalo je jasno da Sgm protein sa podjednakim afinitetom može da veže bilo koju kratku iRNK. Niska konstanta afiniteta jednog proteina za iRNK ne mora da bude negativna karakteristika datog kompleksa. Naime, po podacima iz literature za dobijanje vidljivog kompleksa na radiografiji, a to je S1 protein vezan za sopstveni 5' UTR *rpsA* iRNK molekul, molarni odnos protein:RNK je bio i do 300:1, što je ukazivalo na nisku konstantu afiniteta datog proteina za iRNK (Boni *et al.*, 2001). Međutim, ovaj protein je imao visoku specifičnost vezivanja za sopstvenu iRNK što je dokazano „toeprint“ esejom.

Nakon prvih EMSA eksperimenata postalo je jasno da za regulaciju *sgm* gena na nivou inicijacije translacije nije dovoljno prisustvo samo potencijalne regulatorne sekvence CCGCC ili sekundarne strukture u vidu ukosnice u okviru koje se nalazi ovaj heksanukleotid. Izneta je pretpostavka da je za prepoznavanje sopstvene iRNK od strane Sgm proteina neophodna još neka dodatna primarna ili sekundarna stuktura iz 5'UTR *sgm* gena. Stoga je eksperiment proširen na kompletan 5' UTR koji obuhvata region koji

uključuje sekvencu od P2 promotora, koji je udaljeniji u odnosu na start translacije od P1 promotora. Imajući u vidu rezultate dobijene *in vivo* studijom, po kojima kodirajući, 5' region *sgm* gena, nije od značaja za njegovu autoregulaciju (Kojić *et al.*, 1996), ovaj region nije uzet u razmatranje prilikom planiranja budućih EMSA eksperimenata. Takođe, u cilju povećanja specifičnosti vezivanja Sgm proteina za 5' UTR iRNK, u reakcije vezivanja je dodat kofaktor SAM kao i antibiotik gentamicin. Eksperimenti u kojima je praćeno vezivanje Sgm proteina za dve iRNK različitih dužina (Slika 18 i 19) u prisustvu 1mM SAM, su pokazali da Sgm metiltransferaza podjednakim afinitetom vezuje obe iRNK, bez obzira da li je u reakciji vezivanja prisutan ili odsutan kofaktor. Takođe, variranje koncentracije SAM u reakcijama vezivanja od 0,1 do 10 mM ne utiče na povećanu specifičnost vezivanja Sgm proteina za bilo koju od dve ponuđene iRNK (Slika 20).

Još jedan pokušaj da se istim tipom eksperimenta pokaže vezivanje Sgm za sopstvenu iRNK je učinjen dodavanjem SAH u reakcije vezivanja (Slika 21). Ovaj molekul je stabilniji od SAM i nastaje nakon što SAM otpusti svoju metil grupu. Vezivanjem SAH, Sgm metiltransferaza bi trebalo da zauzme aktivnu konformaciju kojom bi prepoznavala sopstvenu iRNK i vezivala se za nju. Podaci dobijeni iz više nezavisnih EMSA eksperimenata koji su urađeni u prisustvu kako konstantne, tako i rastuće koncentracije SAH, govore u prilog tome da ovaj kofaktor nema uticaja na specifičnost vezivanja Sgm proteina za 5' UTR *sgm* iRNK. Takođe, dodavanje antibiotika, gentamicina u reakcije vezivanja proteina za iRNK, ne doprinosi povećanoj specifičnosti Sgm metiltransferaze.

U svetlu opisanih eksperimentalnih rezultata indikativno je da se složenost delovanja Sgm proteina povećava. Naime, ono što je postalo jasno jeste činjenica da je za autoregulaciju *sgm* gena neophodan još neki faktor iz ćelije. Zbog toga su, uporedo sa EMSA esejima, rađeni „filter binding“ eseji, gde su umesto prečišćenog Sgm proteina, u reakcijama vezivanja za 5' UTR iRNK korišćene S30 i S100 ćelijske frakcije sa eksprimiranom Sgm metiltransferazom. Međutim, ni ovaj *in vitro* pristup za dokazivanje genske regulacije nije dao očekivani rezultat, a to je povećanje afiniteta Sgm proteina za sopstvenu iRNK. Svi EMSA eksperimenti koji su urađeni sa tri *sgm* iRNK različitih dužina su bili u potpunoj saglasnosti, i ne dokazuju hipotezu po kojoj je vezivanje Sgm

proteina samo za sekvencu ili sekundarnu strukturu u okviru 5' UTR *sgm* gena, odgovorno za negativnu autoregulaciju *sgm* gena. Alternativno objašnjenje za dobijene rezultate, je da EMSA nije dovoljno osetljiva metoda za dokazivanje iznete hipoteze.

Iz literature je poznato da SAM i SAH preko *cis* regulatornih elemenata, tkz. ribosvičeva, u okviru nekodirajućeg 5' kraja iRNK, mogu da modulišu gensku ekspresiju kod mnogih bakterija (Barrik and Breaker, 2007). Ovi regulatorni elementi ne zahtevaju prisustvo proteina ili *trans* aktivnih RNK za modulaciju genske ekspresije. Do trenutka kada su urađeni prethodno opisani eksperimenti bile su poznate tri strukturne klase ribosviča za SAM (Blount et Breaker, 2006). Pretraživanjem sekvence 5' UTR *sgm* gena za prisustvo ribosviča, nije pronađena ni jedna od tri do tada poznate klase ribosviča za SAM. Bez obzira što nisu pronađeni *cis* regulatorni elementi takvog tipa, nije značilo da oni ne postoje u okviru 5' UTR *sgm* gena. Do danas je otkriveno pet različitih strukturnih klasa ribosviča za SAM i jedna klasa ribosviča koja prepoznaje SAH (Poiata *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Kompjuterskom analizom sekvence *sgm* gena u programu www.RiboSW.com nije otkrivena ni jedna klasa, od svih do sada opisanih ribosvičeva u literaturi.

Prisustvo ribosvičeva koji mogu da vezuju antibiotik i dalje modulišu gensku ekspresiju kod bakterija još uvek nije utvrđeno. Međutim, u literaturi su opisani veštački dobijeni ribosvičevi-aptameri koji vezivanjem antibiotika regulišu gensku ekspresiju *in vivo*. To su ribosvičevi za tetraciklin (Hanson *et al.*, 2003; Suess *et al.*, 2003) i aminoglikozidni antibiotik neomicin (Weigand *et al.*, 2008). Verovatno je samo pitanje trenutka kada će se ovaj vid regulacije genske ekspresije pronaći kod bakterija. I danas ostaje otvoreno pitanje da li postoji u 5'UTR *sgm* gena neki nepoznati ribosvič koji može biti odgovoran za regulaciju *sgm* gena na nivou inicijacije translacije. Postojanje sekundarne strukture u vidu ukosnice koja obuhvata i potencijalnu regulatornu sekvencu CCGCCC u 5' UTR *sgm* gena, je najpre otkriveno kompjuterskom predikcijom (Mfold server), a kasnije je i eksperimentalno potvrđeno RNaznim eksperimentima (Vojnović *et al.*, 2010, in press). Pitanje koje može da se postavi je šta je stvarne funkcija ove sekundarne strukture, tj. da li ova struktura može biti sama po sebi *cis* regulatorni element?

Nakon EMSA eksperimenata naši dalji pokušaji su bili usmereni ka determinisanju uloge sekundarne strukture u vidu ukosnice, koja se nalazi u 5' UTR *sgm* gena, u translacionoj autoregulaciji metodom „toeprinting“. Prema našoj hipotezi, regulatorni mehanizam represije translacije se zasniva na kompeticiji između represora, tj. Sgm proteina i 30S ribozomalnih subjedinica, za vezivanje za target mesto (primarna ili sekundarna struktura) u 5' UTR *sgm* iRNK, koje se nalazi u blizini mesta vezivanja ribozoma. Pored pomenutog mehanizma kompeticije, postoji i drugi mehanizam represije, a to je „mehanizam klopke“, po kom je protein u stanju da blokira ribozome u preinicijacionom kompleksu i tako onemogućí inicijaciju translacije. „Toeprint“ esej može da pokaže kako vezivanje Sgm proteina za ciljno mesto u iRNK utiče na formiranje translacionog inicijacionog kompleksa, tj. po kom mehanizmu represije translacije od pomenuta dva se odigrava regulacija *sgm* gena.

Mehanizam kompeticije ili „izmeštanja“ je u literaturi opisan kao mehanizam regulacije kod većeg broja gena za ribozomalne proteine kao i kod gena za treonil sintetazu *E. coli.*, što je već opisano u uvodnom delu. Sve navedene primere karakteriše postojanje kompleksnih sekundarnih struktura u 5' UTR koje prepoznaje i vezuje protein represor. Bitna karakteristika ovog procesa jeste to da je prepoznavanje regulatornih struktura u sopstvenoj iRNK od strane represora, slično prepoznavanju primarnog targeta, tj. postoji molekularna mimikrija po kojoj sekundarne strukture unutar iRNK oponašaju sekundarne strukture u rRNK koje prepoznaju ribozomalni proteini (Guiller, *et al.*, 2005). U slučaju treonil sintetaze, dva domena u 5' UTR iRNK imitiraju antikodon ručicu tRNK^{thr} za koje se vezuje treonil sintetaza kao homodimer, čime je onemogućen pristup 30S subjedinici i inicijacija translacije (Springer *et al.*, 1998). Ovaj jednostavni mehanizam kompeticije između proteina i ribozomalne subjedinice je eksperimentalno potvrđen „toeprint“ esejom, gde treonil sintetaza sprečava formiranje kako binarnog kompleksa 30S-iRNK, tako i ternarnog kompleksa 30S-iRNK- tRNK^{thr}.

Pretpostavljena regulatorna sekvenca CCGCCC, koja se nalazi u 5' UTR *sgm* gena 14 nt uzvodno od mesta vezivanja ribozoma, u okviru sekundarne strukture u vidu ukosnice, je takođe prisutna i u C-1400 konzervisanom regionu heliksa 44 u 16S rRNK, koji je primarni target za Sgm metiltransferazu. Poređenjem ovog konzervisanog regiona sa 5' UTR *sgm* gena na nivou sekundarne strukture pokazan je izvestan stepen sličnosti, s

obzirom da sekundarna struktura tipa ukosnice ima sličan tip uređenosti kao region C-1400, tako da bi hipoteza o molekularnoj mimikriji mogla biti primenjena i na Sgm metiltransferazu. Rezultati „toeprint“ eseja su pokazali da formiranje inicijacionog ternarnog kompleksa 30S-iRNK- tRNK^{fmet} dovodi do pojave očekivanog toeprint signala u poziciji +15 u odnosu na start translacije, ali da se ovo formiranje ne odigrava preko preinicijacionog, binarnog kompleksa 30S-iRNK, s obzirom da ga nije bilo moguće detektovati na radiografiji (Slika 22 i 23). Formiranje ternarnog kompleksa u molarnom odnosu iRNK: Sgm protein=1:300 i 1:600, nije onemogućeno, što ukazuje na to da nema kompeticije Sgm metiltransferaze sa 30S ribozomalnim subjedinicama za vezivanje za iRNK, čak i kad je protein u reakciji prisutan u ovako velikom suvišku. Potpuno onemogućavanje formiranja ternarnog kompleksa je moguće samo ukoliko je protein prisutan u suvišku od 1200 puta u odnosu na iRNK. Prema podacima iz literature dovoljno je 5 do 10 puta više proteina u reakciji, da bi se potpuno „ohladio“ „toeprint“ signal (Philippe *et al.*, 1993).

S druge strane, nemogućnost detekcije preinicijacionog kompleksa 30S-iRNK, pod različitim eksperimentalnim uslovima, govori u prilog tome da 30S ribozomalna subjedinica ne stabilise sekundarnu strukturu u okviru 5' UTR *sgm* iRNK. Stabilizacija sekundarnih struktura unutar 5' UTR iRNK od strane 30S ribozomalnih subjedinica je karakteristika bitna za drugi mehanizam genske represije, „mehanizam klopke“. Naime, ribozomalni proteini S4 i S15, vrše represiju inicijacije translacije tako što na sopstvenoj iRNK „zarobljavaju“ 30S ribozomalne subjedinice. Same 30S subjedinice mogu da vežu kako aktivnu iRNK, tako i neaktivnu formu iRNK, na kojima stabilise sekundarnu strukturu u vidu pseudočvora što se na radiografijama detektuje kao jak “toeprint” signal čija je pozicija drugačija od “toeprint” signala koji se detektuje nakon formiranja ternarnog kompleksa (Schlax, 2001; Philippe *et al.*, 1993).

Prema našim eksperimentalnim podacima, *sgm* iRNK nije prisutna u dve alternativne konformacije, niti Sgm metiltransferaza blokira tranziciju preinicijacionog binarnog kompleksa u aktivni inicijacioni ternarni kompleks. Prisustvo signala koji nastaju kao rezultat spadanja MMLV reverzne transkriptaze sa iRNK nakon nailaska na sekundarne strukture, je primećeno, prema DNK lestvici, na poziciji +30 u kodirajućem delu gena, kao i na poziciji -20 u odnosu na start kodon. Međutim, isti signali su

primećeni i u reakciji „primer extension“, gde nisu dodate 30S subjedinice. Jak signal na poziciji -20 je potpuno u saglasnosti kako sa kompjuterskom predikcijom stabilne sekundarne strukture koja obuhvata i potencijalnu regulatornu sekvencu CCGCCC, tako i sa eksperimentalnim podacima dobijenim RN-aznim esejima koji potvrđuju postojanje pomenute sekundarne strukture (Vojnović *et al.*, 2010, in press).

Pokušaj da se determiniše funkcija 5' UTR i sekundarne strukture u vidu ukosnice u regulaciji *sgm* gena, u daljem radu je izveden eksperimentom *in vitro* metilacija *sgm* iRNK. Na ovaj način se testira da li je 5' UTR *sgm* iRNK molekula supstrat za Sgm metiltransferazu. Metilovane iRNK postaju podložne ubrzanoj degradaciji od strane RNaza. Kod *E. coli* i većine Gram negativnih bakterija degradacija iRNK koje poseduju 5' lider sekvencu započinje inicijalnim sečenjem molekula u okviru 5' netranslatirajućeg regiona, koje se vrši od strane RNaze E (Kaberdin and Blasi, 2006; Melefors and von Gabain, 1988; Gross *et al.*, 1991). Ova RNaza seče A/U bogate regione (Lin-Chao *et al.*, 1994) koji su najčešće pozicionirani u blizini RBS na iRNK, i za koje je poznato da stimulišu translaciju bilo da su smešteni uzvodno, bilo nizvodno od start kodona (Dreyfus *et al.*, 1988; Qing *et al.*, 2003). Objašnjenje za ovo otkriće je da A/U bogati regioni održavaju translacioni inicijacioni region u nestruktuiranoj formi, i stoga olakšavaju vezivanje ribozoma. Podaci iz literature ukazuju da vezivanje ribozoma za translacioni inicijacioni region, samo po sebi nije dovoljno da zaštiti iRNK u celosti od degradacije i da je aktivna translacija neophodna za njenu potpunu zaštitu (Arnold *et al.*, 1998). U prilog ovom tvrđenju idu i podaci dobijeni iz eksperimenata gde je vršeno uvođenje A/U bogatih sekvenci u 5' UTR uzvodno od RBS *lacZ* gena, što je rezultiralo povećanom translacijom kao i stabilnošću iRNK (Komarova *et al.*, 2005). U ovom slučaju, degradacija iRNK kod *E. coli* se može razmatrati kao posledica inhibicije translacije, jer u odsustvu ribozoma aktivnih u translaciji, iRNK postaju podložne napadu endonukleaza. Za razliku od Gram negativnih bakterija, kod Gram pozitivnih npr, *Bacillus* postoje analozi RNaze E, to su RNaza J1 i RNaza J2 koje se takođe vezuju za 5' kraj (Even *et al.*, 2005). Za Gram pozitivne bakterije je pokazano da je za zaštitu od degradacije iRNK, bitnije formiranje translacionog inicijacionog kompleksa na 5' kraju iRNK, od samog kretanja ribozoma duž iRNK, kao što je to slučaj kod Gram negativnih bakterija. Ovo dalje sugerira da vezivanje ribozoma za 5' kraj iRNK, interferira sa aktivnošću RNaze J1

i RNaze J2, koje se takođe vezuju i deluju u okviru 5' kraja iRNK (Sharp and Bechhofer, 2003). Kontrola translacije kod Gram pozitivnih bakterija može uključivati prisustvo lider peptida koji je kodiran od strane kratkog ORF, najčešće prisutnog neposredno uzvodno u odnosu na gene koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotike kod *S. aureus*: *ermA*, *ermC* i *cat* (Bechhofer *et al.*, 1990; Dreher and Matzura, 1991; Bechhofer *et al.*, 1993). U odsustvu antibiotika, RBS gena za rezistenciju se nalazi u okviru sekundarne strukture u 5' UTR iRNK, zbog čega je onemogućena translacija. Tokom translacije lider peptida, zadržavanje ribozoma indukovano subinhibitornim koncentracijama antibiotika, rezultira strukturnim rearanžmanima koji destabilišu inhibitorne strukture, i stoga dozvoljavaju vezivanje ribozoma i translaciju gena za rezistenciju. Ovaj mehanizam je poznat i kao translaciona atenuacija. Zadržavanje ribozoma u okviru lider peptida gena za rezistenciju umnogome stabilise transkript (Bechhofer and Dubnau, 1987), na način na koji to čini i formiranje translacionog inicijacionog kompleksa.

U 5' UTR *sgm* gena, neposredno uz RBS su prisutna četiri T, koja najverovatnije imaju ulogu u stabilizaciji i povećanoj translaciji *sgm* iRNK molekula, ali su i potencijalno mesto sečenja RNazeE. Metilacionim esejom nije dokazana hipoteza o metilaciji *sgm* iRNK molekula kao signalu za njihovu degradaciju od strane RNaza. U literaturi ne postoje podaci koji govore o metilaciji bakterijskih iRNK u bilo kom kontekstu, a koji bi podržavali i opravdavali našu hipotezu. S druge strane, u uzvodnom regionu *sgm* gena nije pronađen lider peptid kao što je to slučaj sa *ermC* genom, a koji bi bio odgovoran za regulaciju mehanizmom translaciona atenuacija.

U svetlu navedenih eksperimentalnih rezultata EMSA i „toeprint“ eseja, dovodi se u pitanje zaključak koji je izveden nakon serije eksperimenta sa genskim i operonskim *sgm-lacZ* fuzijama, da Sgm protein vrši autoregulaciju sopstvene sinteze delujući samo kao translacioni represor. Imajući u vidu podatke dobijene *in vitro* pristupom postalo je jasno da je regulacija mnogo složenija no što se prvobitno mislilo. S obzirom da nijedan od gore opisanih *in vitro* eksperimentalnih pristupa nije potvrdio hipotezu o translacionoj regulaciji *sgm* gena, u daljem radu je bilo od značaja da se njegovo autoregulatorno dejstvo razmatra u kontekstu koji je najpribližniji živoj ćeliji. Takođe, fenomeni vezani za regulaciju treba da se posmatraju u odnosu na njegovu specifičnu ulogu. Sgm protein je metiltransferaza koja se konstitutivno eksprimira i za efikasno obavljanje njene funkcije

je je potreban mali broj molekula. Prema podacima iz literature, proteini koji su autoregulisani na nivou inicijacije translacije a koji primarno prepoznaju rRNK, imaju i do 20 puta veći afinitet za 16S rRNK nego za sopstvenu iRNK (Serganov *et al.*, 2003). Mada eksperimentalnih dokaza nema, pretpostavlja se da je prepoznavanje i vezivanje Sgm metiltransferaze za 16S rRNK efikasnije nego za sopstvenu iRNK. Kako je celokupna *in vivo* analiza urađena u heterologom domaćinu *E. coli* (Kojić, 1994), za dokazivanje autorepresije translacije Sgm proteina *in vitro*, odabran „cell-free“ je *E. coli* sistem za *in vitro* transkripciju i translaciju sa cirkularnih plazmida proizvođača Promega. Takođe, svi *in vivo* eksperimenti su urađeni sa *sgm* genom gde dužina 5' UTR lider sekvence iRNK iz originalnog domaćina *M. zionensis* koja prethodi start kodonu, iznosi 205 nt. Ovaj lider obuhvata deo 5' UTR od P1 promotora *sgm* gena dužine 70 nt i još 135 nt uzvodne sekvence u odnosu na P1 promotor. Kodirajući region *sgm* gena, koji je fuzionisan sa *lacZ* genom, je dužine 177 nt. Dakle, prema podacima dobijenim iz *in vivo* eksperimenata (Kojić, 1994) unutar ovih 382 nt *sgm* gena se nalaze bilo primarne, bilo sekundarne strukture odgovorne za njegovu autoregulaciju. Prema Mfold web serveru, pored već napred pomenute i opisane sekundarne strukture u vidu ukosnice u 5' UTR, postoji još jedna takva struktura u kodirajućem delu gena na poziciji +95, koja sadrži pentanukleotid CCGCC, koji je sličan heksanukleotidu CCGCCC, prisutnom u prvoj sekundarnoj strukturi. Pokušaj da se *in vitro* eksperimentalnim pristupom potvrdi prvobitna hipoteza, je proširen i na drugu pomenutu sekundarnu strukturu u vidu ukosnice.

In vitro transkripcija i translacija su prvobitno urađene sa cirkularnih DNK matrica u kojima je *sgm* gen bio pod kontrolom *lacZ* promotora. Da bi se pravilno interpretirali dobijeni rezultati, a imajući u vidu istovetne molekulske težine Sgm proteina i β -laktamaze i mogućnost preklapanja signala na gelu, dodatno su rađeni Western blot eksperimenti. Kako je u „cell free“ sistemu *E. coli* obezbeđeno sve što je neophodno kako za ekspresiju tako i za regulaciju, nemogućnost dobijanja detektabilne količine Sgm proteina kako u reakcijama sa wt *sgm* genom gde je očuvana 5' UTR lider sekvencama, tako i u reakcijama sa mutiranim potencijalnim regulatornim sekvencama, govori u prilog složenosti translacione autoregulacije (Slika 25 i 26). S obzirom da je odsustvo sinteze proteina rezultat *in vitro* transkripcije i translacije, kako *sgm* gena kome je deletirana prva

potencijalna regulatorna sekvenca CCGCCC, tako i *sgm* gena kome je mutirana druga potencijalna regulatorna sekvenca CCGCC, izvodi se zaključak da sekundarna struktura u vidu ukosnice na poziciji +95, a koja obuhvata pentanukleotid CCGCC, nije od značaja za autoregulaciju. Pokušaj da se direktno sa *in vitro* sintetisanih *sgm* iRNK matrica, dodatih u reakcije *in vitro* translacije, testira regulacija, je takođe bio onemogućen. Moguće objašnjenje za odsustvo sinteze proteina u ovom slučaju može biti usled same tercijarne strukture *sgm* iRNK tj. nedostupnosti signala bitnih za odpočinjanje translacije na *sgm* iRNK, ali takođe moguće objašnjenje jeste da je odpočinjanje translacije onemogućeno iz istih razloga zbog kojih se ne dešava i sa napred pomenutih cirkularnih matrica. Da je sam sistem efikasan u sintezi proteina je očigledno sa radiografija, na kojima se uočavaju jaki signali koji predstavljaju β -laktamazu.

U prilog složenosti autoregulacije idu dodatni rezultati dobijeni iz reakcija *in vitro* transkripcije i translacije sa plazmida u kojima su wt *sgm* gen i mutirani *sgm* gen uklonirani pod jak T5 promotor. Dobijeni konstrukti omogućavaju preživljavanje *E. coli* ćelija na podlogama sa gentamicinom, ali u „cell free“ sistemu ne dolazi do ekspresije ni wt ni mutiranog *sgm* gena (Slike 28, 29, 30, 31). Pokušaj objašnjenja rezultata ovih eseja se dodatno usložnjava imajući u vidu to da se u ovom sistemu, pod T5 promotorom eksprimira *sgm* gen koji na svom 5' kraju nema sopstvene signale za inicijaciju translacije, već ima RBS kao i start kodon iz komercijalnog vektora pQE30 (Slika 27). Logično se nameće pitanje šta je to što onemogućava translaciju *sgm* gena u „cell free“ sistemu *E. coli* ukoliko u 5' lider regionu ima sopstveni RBS i start kodon. Generalno gledano, svi strukturni elementi koji kontrolišu inicijaciju translacije kod prokariota, jesu prisutni u *sgm* iRNK. Start kodon jeste ATG, koga prepoznaje tRNK^{finet}, i on ne utiče na redukciju efikasnosti translacije što je primećeno u slučaju GUG ili UUG start kodona (Kozak, 2005; Sussman et al., 1996; Blattner et al., 1997). RBS element u okviru *sgm* iRNK je standardne dužine od 5 nt i prisutan je na optimalnoj udaljenosti od 5 nt u odnosu na start kodon. Komplementarnost RBS sekvence sa 3' regionom 16S rRNK je potpuna, ne postoje nesporeni nukleotidi, i dovoljno jaka da omogući efikasnu translaciju. Prisustvo četiri T u blizini RBS sekvence onemogućava formiranje sekundarnih struktura koje bi sprečavale inicijaciju translacije. Dakle, svi kanonski principi neophodni za

odpočinjanje transkripcije i translacije *sgm* gena u „cell free“ sistemu *E. coli* su zadovoljeni. Ostaje otvoreno pitanje zašto se to i ne dešava.

Razrešenje ove nedoumice je trebalo da se dobije nakon urađenih eseja *in vitro* transkripcija i translacija u homologom sistemu *Streptomyces lividans* i *Micromonospora melanosporea*. Ovakvim pristupom se prevazilaze moguća ograničenja mehanizama u *E. coli* sistemu, a *sgm* gen se stavlja u biohemijski i genetički kontekst koji ima u originalnom domaćinu. S obzirom da homologni sistem nije komercijalno dostupan već je razvijan u laboratoriji, ova ideja nije do kraja realizovana. Naime, „cell free“ sistem *S. lividans* je bio neaktivan dok je kod *M. melanosporee* pokazivao nisku efikasnost u sintezi proteina markera (β -laktamaze) i kao takav se pokazao neadekvatnim za ispitivanje autoregulacije *sgm* gena. Kako se efikasnost ovih sistema može podići na najviši nivo modifikacijom eksperimentalnih uslova, što zahteva dosta vremena, ideja o homologom sistemu ostaje aktuelna za budući rad. Štaviše, ovaj *in vitro* pristup bi bio najadekvatniji od svih do sada opisanih, za ispitivanje regulacije na nivou inicijacije translacije *sgm* gena, i mogao bi da objašnjenje mogućeg mehanizma regulacije.

Ovde je bitno istaći da je isti fenomen odsustva translacije primećen i kod srodnog *kgmB* gena iz *S. tenebrarius* (Slika 25 i 26). Naime, i u slučaju *kgmB* gena je *in vivo* eksperimentima potvrđena autoregulacija na nivou inicijacije translacije koja umnogome slična opisanoj kod *sgm* gena (Vajić *et al.*, 2004). Identičnost sekvenci ova dva gena iznosi 54% a takođe postoje slične sekvence u 5' UTR regionima oba gena koje mogu biti potencijalne regulatorne sekvence, i stoga je očekivano da se autoregulišu na sličan način. Zato ne iznenađuje podatak da u „cell free“ sistemu *E. coli* nema sinteze KgmB proteina baš kao što je to slučaj sa Sgm proteinom.

Interesantno je pomenuti da *grmA* gen iz *M. echinosporee* u poređenju sa *sgm* genom nema sličan model regulacije, mada je identičnost sekvenci ova dva gena oko 90%. Naime, *grmA* gen ima samo jedan promotor koji inicira transkripciju na 11 nt ispred ATG kodona. Ovaj gen ne poseduje lider sekvencu kao *sgm* gen, a pored toga u *E. coli* mini ćelijama ga je bilo moguće sintetisati za razliku od *sgm* gena (Kojić, 1994).

Sa filogenetskog stanovišta, poređenje regulatornih mehanizama *sgm*, *kgmB* i *grmA* može biti značajno za razumevanje distribucije gena za rezistenciju kod bakterija proizvođača antibiotika. Na osnovu iznetih podataka može se pretpostaviti da su geni za

rezistenciju dobijeni od zajedničkog pretka, a da je svaki proizvođač razvio svoje specifične regulatorne elemente. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa literaturnim podacima prema kojima geni iz proizvođača antibiotika *sgm*, *kgmB* i *grmA* pripadaju Kgm familiji metiltransferaza, koja zajedno sa Arm familijom metiltransferaza, kojoj pripadaju geni za rezistenciju izolovani iz patogenih bakterija, vodi poreklo od zajedničkog pretka (Savić *et al.*, 2009).

Za razumevanje regulacije na translacionom nivou potrebno je poznavati mehanizam delovanja metiltransferaze na sopstvenu iRNK. Mehanizam prepoznavanja regulatornih signala u okviru sopstvene iRNK od strane Sgm metiltransferaze se može dovesti u vezu sa mehanizmom prepoznavanja primarnog targeta 16S rRNK. Iz ranijih radova je poznato da Sgm metiltransferaza može da prepozna samo kompaktnu 30S subjedinicu, ali ne golu 16S rRNK, što je navodilo na zaključak da je za ovo prepoznavanje odgovorna pre sekvenca nukleotida nego sekundarna struktura (Kojić, 1994). Za KgmB metiltransferazu iz *S. tenebrarius* je bilo poznato mesto delovanja u 16S rRNK, a kako KgmB i Sgm metiltransferaza obezbeđuju svojim nosiocima isti obrazac rezistencije na aminoglikozidne antibiotike, i kako je identičnost aminokiselinskih sekvenci ova dva proteina 54%, pretpostavljeno je da ove dve metiltransferaze dele mesto metilacije na 16S rRNK. Metiltransferazni esej je pokazao da KgmB protein ugrađuje metil grupe u senzitivne 30S subjedinice ali ne i u rezistentne koje su *in vivo* metilovane Sgm metiltransferazom (Slika 10 i 11). Ovaj rezultat bio je prvi posredan dokaz da dve metiltransferaze imaju isto mesto delovanja, G na poziciji 1405 (Ilic-Tomic *et al.*, 2008), što su kasnije potvrdila i druga istraživanja (Cubrilo *et al.*, 2009, Savić *et al.*, 2009).

Razrešenjem prve trodimenzionalne strukture Sgm 16S rRNK metiltransferaze poreklom iz proizvođača antibiotika u kompleksu sa kofaktorima S-adenozil metioninom (SAM) i S-adenozil homocisteinom (SAH) na rezoluciji od 2.0 i 2.1 Å (Husain *et al.*, 2010), determinisan je mehanizam prepoznavanja i delovanja ove metiltransferaze na 16S rRNK. Pre ove 3D strukture, razrešene su strukture ArmA i RmtB, dve metiltransferaze iz patogenih bakterija (Schmitt *et al.*, 2009).

Eksperimentalni podaci potvrđuju domensku prirodu proteina: N-terminus (Asp8-Pro70) i C terminus (Asn71-Gln273). C-terminus ima Rossmann strukturu tipičnu za klasu I metiltransferaza i za njega je vezana koenzimska i katalitička funkcija enzima što

je već bilo poznato iz ranijih radova (Maravic Vlahoviček *et al.*, 2008; Savić *et al.*, 2008). N-terminus je u vidu svežnja koji se sastoji od tri α heliksa i odgovoran je za prepoznavanje 16S rRNK zajedno sa C- terminusom. Ovde je bitno istaći da domeni u Kam familiji metiltransferaza koje metiluju A1408, imaju drugačiji redosled u odnosu na Kgm familiju, tako da je koenzimska i katalička funkcija Kam familije locirana u N-terminusu. Pretpostavlja se da je ovaj redosled domena bitan faktor koji doprinosi očiglednoj specifičnosti ove dve enzimske familije (Savic *et al.*, 2009).

Prema eksperimentalnim podacima dobijenim „footprint“ analizom, a koji pokazuju zaštitu nukleotida u prisustvu Sgm proteina, dolazi do prepoznavanja targeta na nivou cele 30S ribozomalne subjedinice (Husain *et al.*, 2010). Kako autori nisu bili u mogućnosti da na osnovu ovih podataka predlože model interakcije Sgm-30S ribozomalna subjedinica, uradili su *in silico* modelovanje Sgm-substrat kompleksa. Prema ovom modelu ključne aminokiseline koje interaguju sa G1405 jesu Lys199 i Ser104, i one orijentišu bazu prema donoru metil grupe, dok su Phe64 sa N-terminusa i Pro229 bitne za stabilno vezivanje G1405 za aktivni centar. Ostale moguće interakcije između enzima i targeta uključuju Glu107 sa N² i N³ atomima G1405 baze, kao i hidrosilne grupe Thr206 i Tyr244 koje mogu da koordinišu fosfatne grupe same baze. O ovim interakcijama je opširnije pisano u uvodu.

Analizom sekvenci i poređenjem konzervisanih aminokiselina u aktivnim mestima m⁷G metiltransferaza koje pripadaju različitim familijama pretpostavljeno je da se prepoznavanje i vezivanje za target nukleotid vrši na različite načine (Bujnicki *et al.*, 2001). Malo je podataka u literaturi koji su bazirani na stuktornim modelima a koji govore o interakciji metiltransferaza sa svojim targetom. Jedini dostupan je struktorni model je za cap 0 metiltransferazu koja modifikuje G0 u eukariotskoj iRNK (Fabrega *et al.*, 2004). Pored kristalnih struktura predstavnika Kgm i Arm familije, kristalne strukture postoje još i za TrmB familiju metiltransferaza koje metiluju G46 unutar tRNK (Zegers *et al.*, 2006) kao i za RsmG metiltransferazu koja metiluje 16S rRNK u poziciji G527 (Romanowski *et al.*, 2002). Kako nijedna od ovih struktura nije razrešena u kompleksu sa svojim supstratom, tako ni mehanizam akcije ovih enzima nije determinisan. Kompjuterskim modelovanjem i mapiranjem konzervisanih sekvenci unutar gore pomenutih metiltransferaza kojima je determinisana kristalna struktura, utvrđeno je da su

aminokiseline odgovorne za vezivanje kofaktora kao i sam način vezivanja kofaktora konzervisani kod svih analiziranih predstavnika. S druge strane, aminokiseline koje učestvuju u vezivanju guanozina se prilično razlikuju kod svih proteina a isto tako i predikcija konformacije i orijentacije guanozina vezanog za metiltransferazu (Husain *et al.*, 2010). Mada postoji analogija u tipu aminokiselina koje interaguju sa guanozinom, kao što je Pro, Tyr ili Phe koje stabilizuju bazu, njihova pozicija je potpuno nehomologa, 3D aranžman je potpuno različit, što ukazuje na postojanje drugačijih mehanizama metilacije N⁷ guanozina. Takođe, ovim modelovanjem se došlo do podatka da su najmanje četiri različite familije m⁷G metiltransferaza razvijale nezavisno načine prepoznavanja guanozina.

U svetlu navedenih eksperimentalnih rezultata dobijenih razrešenjem 3D strukture Sgm metiltransferaze, treba se još jednom osvrnuti na činjenicu da je najverovatniji mehanizam prepoznavanja i vezivanja sekundarnog targeta tj. sopstvene iRNK vrlo sličan napred opisanom mehanizmu prepoznavanja i vezivanja za primarni target 16S rRNK. Ovoj pretpostavci ide u prilog i manja konzervativnost N-terminusa, koji kao takav može da prepoznaje različite targete npr. rRNK i iRNK. Moguće objašnjenje može biti da Sgm protein u oba slučaja prepoznaje najpre specifičnu konformaciju RNK molekula, koja u slučaju 30S subjedinice jeste održavana zahvaljujući ribozomalnim proteinima, i ovo može biti objašnjenje zašto Sgm ne metiluje голу 16S rRNK. U slučaju *sgm* iRNK, postojeće sekundarne strukture slične onima u 16S rRNK, mogu biti mesto prepoznavanja i vezivanja za N-terminus Sgm proteina. Target nukleotid G1405 je smešten unutar 30S subjedinice i da bi bio metilovan mora doći do konformacionih promena same subjedinice. Vezivanjem Sgm proteina za 30S, dolazi do izmeštanja G1405 čime postaje bliži aktivnom centru Sgm metiltransferaze. Moguće je da Sgm protein nakon što oslobodi kofaktor ostaje u konformaciji pogodnoj za prepoznavanje sekundarnog targeta, da dalje dovodi do strukturnih rearanžmana unutar iRNK i njenog zaključavanja za efikasnu inicijaciju translacije.

U originalnom domaćinu *sgm* gen ima, pored konstitutivne ekspresije sa slabog P1 promotora i verovatnu, vremenski regulisanu ekspresiju sa jakog P2 promotora gde postoji mogućnost da se transkripcija prolongira i na nizvodne gene. Verovatno je da translacija *sgm* gena nije povezana sa njihovom translacijom iako su prisutni na istoj

policistronske iRNK. Uprkos tome što se aktivnošću P1 i P2 promotora povećava količina iRNK ne dolazi do nagomilavanja nepotrebne količine Sgm proteina u ćeliji usled vrlo izražene translacione autorepresije. Ukoliko bi *sgm* gen imao samo transkripcionu regulaciju, onda bi njegovim autoregulatornim delovanjem bili kontrolisani i nivoi ekspresije svih gena koji se nalaze nizvodno. U tom slučaju bi ekspresija nizvodnih gena bila određena potrebom ćelije za Sgm proteinom, što nije logično, ako se ima u vidu mala količina Sgm proteina potrebna da bi se izvršila metilacija svih ribozoma u ćeliji. Zbog toga se postojanje translacione autoregulacije nameće kao očigledno objašnjenje, a dalji radovi će pokazati njegovu opravdanost.

VI ZAKLJUČCI

1. Sgm metiltransferaza iz *Micromonospora zionensis* je eksprimirana u *E. coli* pomoću *QIAexpress* sistema.
2. Sgm protein je uspešno eksprimiran i prečišćen metal afinitetnom hromatografijom.
3. Potvrđena je funkcionalnost Sgm metiltransferaze metilacionim esejom.
4. Određivanjem mesta metilacije Sgm metiltransferaze u okviru 16S rRNK potvrđeno je da dolazi do metilacije na poziciji G1405.
5. Metodom EMSA je analizirana interakcija Sgm proteina sa 5' UTR *sgm* iRNK. Pokazano je da se Sgm protein vezuje u 600 puta većem molarnom odnosu za iRNK i da nema visok afinitet za sopstvenu iRNK. Reakcijama kompeticije je potvrđeno da se Sgm protein nespecifično vezuje za iRNK.
6. Metodom „toeprint“ je potvrđeno mesto vezivanja ribozoma za *sgm* iRNK, ali ne i precizan mehanizam regulacije *sgm* gena.
7. Složenost translacione autoregulacije je potvrđena *in vitro* transkripcijom i translacijom u sistemu *E. coli*. Ova metoda je ukazala na neophodnost prisustva, za sada nepoznatog faktora, u autoregulaciji *sgm* gena.

VII REFERENCE

- Allemand, F., Haentjens, J., Chiaruttini, C., Royer, C., Springer, M. (2007). *Escherichia coli* ribosomal protein L20 binds as a single monomer to its own mRNA bearing two potential binding sites. *Nucl. Acid. Res.* 35, 3016–3031.
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., Storz, G. (1997). A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell.* 90, 43–53.
- Argaman, L. and Altuvia, S. (2000). *fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J. Mol. Biol.* 300, 1101–1112.
- Arnold, T. E., Yu, J. & Belasco, J. G. (1998). mRNA stabilization by the *ompA* 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA.* 4, 319–330.
- Aseev, L. V., Levandovskaya, A. A., Tchufistova, L. S., Scaptsova, N. V., Boni, I. V. (2008). A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2- mediated control of the *rpsB*-*tsf* expression *in vivo*. *RNA.* 14, 1882-1894.
- Babitzke, P., and Gollnick, P. (2001). Posttranscription initiation control of tryptophan metabolism in *Bacillus subtilis* by the *trp* RNA binding attenuation protein (TRAP), anti-TRAP, and RNA structure attenuation protein (TRAP)-*trp* leader RNA interaction - *J. Bacteriol.* 183, 5795–5802.
- Baker, C. S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., and Babitzke, P. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44, 1599-1610.
- Barrick, J. E., Breaker, R. R. (2007). The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* 8: R239. doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r239.
- Bashan, A. (2003). Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol. Cell.* 11, 91–102
- Basturea, G. N., Rudd, K., Deutscher, M. P. (2006). Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family *RNA.* 12, 426-434

- Baum, E. Z., Love, S. F., Rothstein, D. M. (1988). Temporally regulated tandem promoters in *Micromonospora echinospora*. J Bacteriol. 170, 71-77
- Beauclerk, A. A. D., and Cundliffe, E. (1987). Sites of action of two ribosomal methylases responsible for resistance to aminoglycosides. J. Mol. Biol. 193, 661-671.
- Bechhofer D. (1993). 50 mRNA Stabilisers. Control of Messenger RNA stability (Belasco J & Brawerman G, eds), pp. 31-52. Academic Press Limited, London.
- Bechhofer D. H. (1990). Triple post-transcriptional control. Mol. Microbiol. 4, 1419-1423.
- Bechhofer, D. H. and Dubnau, D. (1987). Induced mRNA stability in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 498-502.
- 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 erytraeus*. Gene. 41, 357-368
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100, 243-255.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Blattner, F. R. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. 277, 1453-1462.
- Blomberg P, Wagner E. G. H., Nordstro, M. K. (1990). Control of replication of plasmid R1: the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. EMBO J. 9, 2331-2340.
- Blount, K. F. and Breaker, R. R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. Nature Biotechnol. 24, 1558-1564
- Boni, I. V., Artamonova, V. S, Tzareva, N. V., Dreyfus, M. (2001). Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: Synthesis of ribosomal protein S1. EMBO J. 20, 4222-4232.
- Boni, I. V., Artamonova, V. S., Dreyfus, M. (2000). The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control. J. Bacteriol. 182, 5872-5879.
- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., Cate, J. H. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. Nat. Struct. Mol. Biol. 14, 727-732.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brantl, S. (2007). Regulatory mechanisms employed by cis encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 102–109.
- Breidt, F., and Dubnau D. (1990). Identification of cis-acting sequences required for translational autoregulation of the *ermC* methylase. *J. Bacteriol.* 172, 3661–3668.
- Brodersen, D. E. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.* 103, 1143–1154.
- Bujnicki, J. M. and Rychlewski, L. (2001). Sequence analysis and structure prediction of aminoglycoside-resistance 16S rRNA:m7G methyltransferases. *Acta Microbiol. Pol.* 50, 7–17.
- Burnette, W. N. (1981). Western blotting. Electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE to unmodified nitrocellulose and radiographic detection of antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 204-210.
- Carter, A. P. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* 407, 340–348.
- Champney, W. S. (2006). The other target for ribosomal antibiotics: inhibition of bacterial ribosomal subunit formation. *Infect. Disord. Drug Targets.* 6, 377-390.
- Chen, G., Yanofsky, C. (2004). Features of a leader peptide coding region that regulate translation initiation for the anti-TRAP protein of *B. subtilis*. *Mol. Cell.* 13, 703–711.
- Chen, L., Chen, Z. L., Liu, J. H., Zeng, Z. L., Ma, J. Y., Jiang, H. X. (2007). Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 880-885.
- Chiaruttini, C., Milet, M., Springer, M. (1996). A long-range RNA–RNA interaction forms a pseudoknot required for translational control of the IF3–L35–L20 ribosomal protein operon in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 15, 4402–4413.
- Chittapragada, M., Roberts, S., Ham, Y. W. (2009). Aminoglycosides: Molecular Insights on the Recognition of RNA and Aminoglycoside Mimics. *Perspectives in Medicinal Chemistry.* 3: 21–37

- Clarke, P. A. (1999). Labeling and purification of RNA synthesized by in vitro transcription. p. 1-10. In *Methods in Molecular Biology*, Vol 118: RNA-protein interaction protocols. (Haynes, S. R. ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Comer, M. M., Dondon, J., Graffe, M., Yarchuk, O., and Springer, M. (1996). Growth rate-dependent control, feedback regulation and steady-state mRNA levels of the threonyl-tRNA synthetase gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 261, 108–124.
- Conn, G. L., Savic, M., Macmaster, R., (2008). Antibiotic resistance in bacteria through modification of nucleosides in 16S rRNA. In *DNA and RNA modification enzymes: comparative structure, mechanism, functions, cellular interactions and evolution*. Edited by H. Grosjean. Austin, Texas: Landes Bioscience
- Connolly, K., Rife, J. P., and Culver, G. M. (2008). Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA. *Mol. Microbiol.* 70, 1062–1075.
- Cromie, M. J., Shi, Y., Latifi, T. Groisman, E. A. (2006). An RNA sensor for intracellular Mg²⁺. *Cell.* 125, 71–84.
- Cubrilo, S., Babic, F., Douthwaite, S. and Maravic Vlahovicek, G. (2009). The aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm impedes RsmF methylation at an adjacent rRNA nucleotide in the ribosomal A site. *RNA.* 15, 1492–1497.
- Cundliffe, E. (1989a). Methylation of RNA and resistance to antibiotics. *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 91: 226-248.
- Cundliffe, E. (1989b). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-233.
- Cundliffe, E. (1990). Recognition sites for antibiotics within rRNA, p. 479–490. In W. E. Hill, P. B. Moore, A. Dahlberg, D. Schlessinger, R. A. Garrett, and J. R. Warner (ed.), *The ribosome: structure, function, and evolution*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Dairi, T., Ohta, T. and Hasegawa, M. (1992). Organization and nature of fortimicin A (astromicin) biosynthetic genes studied by a cosmid library of *Micromonospora olivasterospora*. *Mol. Gen. Genet.* 236, 39–48.
- Dairi, T., Ohta, T., Hasegawa, M. (1992). Self cloning in *Micromonospora olivasterospora* of *fms* genes for fortimicin A (astromicin) biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 232, 262–270.

- Dann, C. E., Wakeman, C. A., Sieling, C. L., Baker, S. C., Irnov, I., and Winkler, W. C. (2007). Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell*. 130, 878-892.
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., and Wagner, E. G. H. (2007). An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Mol. Cell*. 26, 381–392.
- de Smit, M. H., and van Duin, J. (1993). Translational initiation at the coat-protein gene of phage MS2: native upstream RNA relieves inhibition by local secondary structure. *Mol. Microbiol.* 9, 1079–1088.
- de Smit, M. H., and van Duin, J. (1994). Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine–Dalgarno interaction. *J. Mol. Biol.* 235, 173–184.
- Dean, D., Yates, J. L., and Nomura, M. (1981). *Escherichia coli* ribosomal protein S8 feedback regulates part of the *spc* operon. *Nature*. 289, 89–91.
- Decatur, W. A. and Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* 27, 344–351.
- Deckman, I. C., and Draper, D. E. (1987). S4-alpha mRNA translation regulation complex. II. Secondary structures of the RNA regulatory site in the presence and absence of S4. *J. Mol. Biol.* 196, 323–332.
- Deckman, I. C., Draper, D. E., and Thomas, M.S. (1987) S4-alpha mRNA translation repression complex. I. Thermodynamics of formation. *J. Mol. Biol.* 196, 313–322.
- Denoya, C. D., Bechhofer, D. H., Dubnau, D. (1986). Translational autoregulation of *ermC* 23S rRNA methyltransferase expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 168, 1133-1141.
- Desai, P. M., Rife, J. (2006). The adenosine dimethyltransferase KsgA recognizes a specific conformational state of the 30S ribosomal subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 449, 57–63.
- Doi, Y., de Oliveira Garcia, D., Adams, J., Paterson, D. L (2007). Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 852-856.
- Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, J., Wachino, N., Shibata, T., Yagi, K., Shibayama, H., Kato, Arakawa, Y. (2004). Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 491-496.

- 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
- Draper, D. E. (1987). Translational regulation of ribosomal proteins in *Escherichia coli*. In *Translational Regulation of Gene Expression*. Ilan, J. (ed.) New York: Plenum Press, pp. 1-26.
- Draper, D. E., Gluick, T. C., and Schlax, P. J. (1998). Pseudoknots, RNA folding and translational regulation. In *RNA Structure and Function*. Simons, R.W., and Grunberg-Manago, M. (eds). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 415-436.
- Dreher, J. and Matzura, H. (1991). Chloramphenicol-induced stabilization of cat messenger RNA in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5, 3025-3034.
- Dreyfus, M. (1988). What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on *Escherichia coli* mRNAs? *J. Mol. Biol.* 204, 79-94.
- Du, H., and Babitzke, P. (1998). *trp* RNA-binding attenuation protein mediated long distance RNA refolding regulates translation of *trpE* in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 273, 20494-20503.
- Du, H., Tarpey, R., and Babitzke, P. (1997). The *trp* RNA-binding attenuation protein regulates *TrpG* synthesis by binding to the *trpG* ribosome binding site of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 2582-2586.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Suzuki, K., Jones, A. D., Pandit, P., Romeo, T., and Babitzke, P. (2003). CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J. Bacteriol.* 185, 4450-4460
- Ehresmann, C., Ehresmann, B., Ennifar, E., Dumas, P., Garber, M., Mathy, N. (2004). Molecular mimicry in translational regulation: the case of ribosomal protein S15. *RNA Biol.* 1, 66-73.
- Even S, Pellegrini O, Zig L, Labas V, Vinh J, Brechemmier-Baey D & Putzer H (2005). Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucl. Acid. Res.* 33, 2141-2152.
- Fabrega, C., Hausmann, S., Shen, V., Shuman, S., and Lima, C. D. (2004). Structure and mechanism of mRNA cap (guanine-N7) methyltransferase. *Mol. Cell.* 13, 77-89.

- Ferbitz, L. (2004). Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*. 431, 590–596.
- Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C. & Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*. 274, 1367–1371.
- Franch, T., Gerdes, K. (1996) Programmed cell death in bacteria: translational repression by mRNA end-pairing. *Mol Microbiol*, 21, 1049-1060.
- Franch, T., Thisted, T., Gerdes, K. (1999). Ribonuclease III processing of coaxially stacked RNA helices. *J. Biol. Chem.* 274, 26572-26578.
- Fuchs, R., Grundy, F., Henkin, T. M. (2006). The SMK box is a new SAM binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 226–233.
- Gabashvili, I. S. (2001). The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol. Cell* 8, 181–188.
- Galimand, M., Coruvalin, P., and Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2565-2571.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Coruvalin, P., Lambert, T. (2005). Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2949-2953.
- Gerdes, K. and Wagner, E. G. H. (2007). RNA antitoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 117–124.
- Gilbert, S. D. and Batey, R. T. (2006). Riboswitches: Fold and function. *Chem. Biol.* 13, 805–807.
- Gonzalez-Zorn, B., A. Catalant, J. A. Escudero, L. Dominguez, T. Teshager, M. C. Porrero, M. A. Moreno. (2005). Genetic basis for dissemination of armA. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 583-585.
- Gonzalez-Zorn, B., Teshager, T., Casas, M., Porrero, M. C., Moreno, M. A., Courvalin, P. Dominguez, L. (2005). ArmA and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 954–956.
- Gourse, R., Sharrock, R., Nomura, (1986). Control of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. In Hardesty, B. and Kramer, G. (eds), *Structure, Function, and Genetics in Ribosomes*. Springer-Verlag, New York, 766–788.

- Greenfield, T. J., Ehli, E., Kirshenmann, T., Franch, T., Gerdes, K., Weaver, K. E. (2000). The antisense RNA of the *par* locus of *pAD1* regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism. *Mol. Microbiol.* 37, 652-660.
- Gross G (1991) RNase E cleavage in the *atpE* leader region of *atpE*/interferon-beta hybrid transcripts in *Escherichia coli* causes enhanced rates of mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 266, 17880–17884.
- Gualerzi, C. O., and Pon, C. L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry.* 29, 5881–5889.
- Guillier, M., Allemand, F., Dardel, F., Royer, C. A., Springer, M. & Chiaruttini, C. (2005). Double molecular mimicry in *Escherichia coli*: binding of ribosomal protein L20 to its two sites in mRNA is similar to its binding to 23S rRNA. *Mol. Microbiol.* 56, 1441–1456.
- Guillier, M., Allemand, F., Graffe, M., Raibaud, S., Dardel, F., Springer, M., Chiaruttini, C. (2005). The N-terminal extension of *Escherichia coli* ribosomal protein L20 is important for ribosome assembly, but dispensable for translational feedback control. *RNA.* 11, 728–738.
- Hallberg, B. M., Ericsson, U. B., Johson, K. A., Andersen, N. M., Douthwaite, S., Nordlund, P., Beuscher, A. E., Erlandsen, H. (2006). The structure of the RNA m^5C methyltransferase YebU from *Escherichia coli* reveals a C-terminal RNA-recruiting PUA domain. *J. Mol. Biol.* 360, 774-787.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hansen, J. L. (2002). The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell.* 10, 117–128.
- Hansen, J. L., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2003). Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* 330, 1061–1075.
- Hanson, S., Berthelot, K., Fink, B., McCarthy, J. E., Suess, B. (2003). Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol. Microbiol.* 49, 1627–1637.
- Hermann, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 355–366.
- Hoe N. P., Goguen J. D. (1993). Temperature sensing in *Yersinia pestis*: Translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J. Bacteriol.* 175, 7901–7909

- Holmes, D. J., and Cundliffe, E. (1991). Analysis of a ribosomal RNA methylase gene from *Streptomyces tenebrarius* which confers resistance to gentamicin. *Mol. Gen. Genet.* 229, 229-237.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Husain, N., Tkaczuk, K. L., Tulsidas S. R., Kaminska, K. H., Cubrilo, S., Maravic-Vlahovic, G., Bujnicki, J. M., Sivaraman, J. (2010). Structural basis for the methylation of G1405 in 16S rRNA by aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm from an antibiotic producer: a diversity of active sites in m7G methyltransferases *Nuc. Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkq122
- Ilic-Tomic, T., Markovic, S., Vasiljevic, B. (2005). Expression and purification of the Sgm protein from *E. coli*. 70, 817–822.
- Ilic-Tomic, T., Moric, I., Conn, G. L., Vasiljevic, B. (2008). Aminoglycoside resistance genes *sgm* and *kgmB* protect bacterial but not yeast small ribosomal subunits in vitro despite high conservation of the rRNA A-site. *Res Microbiol.*;159, 658-662.
- Janssen, G. R. and 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.
- Johansen, S. K., Maus, C. E., Plikaytis, B. B., Douthwaite, S. (2006). Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNA. *Mol. Cell.* 23, 173-182.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell.* 110, 551-561.
- Kaberdin, V. and Blasi, U., (2006). Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 967-979.
- Kang, H. Y., Kim, K. Y., Kim, J., Lee, J. C., Lee, Y., Cho, D. T., Sung Yong Seol, S. Y. (2008). Distribution of Conjugative-Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase Genes among Amikacin-Resistant Enterobacteriaceae Isolates Collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a University Hospital in South Korea and Identification of Conjugative Plasmids Mediating Dissemination of 16S rRNA Methylase. *J. Clin. Microbiol.* 46, 700-706.

- Kelemen, G. H., Cundliffe, E., Financsek, I. (1991). Cloning and characterisation of gentamicin-resistance genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea*. *Gene*. 98, 53-60.
- Klein, D. J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2004). The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* 340, 141–177
- Kloss, P., Xiong, L., Shinabarger, D. L. & Mankin, A. S. (1999). Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J. Mol. Biol.* 294, 93–101.
- Kojic, M. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 1994
- Kojic, M., Topisirovic, L., and Vasiljevic, B. (1992). Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. *J. Bacteriol.* 174, 7868-7872.
- Kojic, M., Topisirovic, L., and Vasiljevic, B. (1996). Translational autoregulation of the *sgm* gene from *Micromonospora zionensis*. *J. Bacteriol.* 178, 5493-5498.
- Kojic, M., Vojnovic, S., Vukov, N., Vasiljevic, B. (2007). Overexpression of *sgm* 5' UTR mRNA reduces gentamicin resistance in both *Escherichia coli* and *Micromonospora melanosporea* cells. *Arch. Biol. Sci.* 59, 273-280.
- Kolb, F. A., Engdahl, H. M., Slagter-Jäger, J. G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Westhof, E., Wagner, E. G. H., Romby, P. (2000). Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense RNA. *EMBO J.* 19, 5905-5915.
- Komarova, A. V., Tchufistova, L. S., Dreyfus, M., Boni, I. V. (2005). AU-rich sequences within 50 untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 1344–1349.
- Kormanec, J., Farkasovsky, M. (1993). Differential expression of principal sigma factor homologues of *Streptomyces aureofaciens* correlates with the developmental stage. *Nuc. Acid Res.* 21, 3647-3652.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 361, 13-37.

- Lacalle, R. A., Tercero, J. A., Vara, J., Jimeney, A. (1993). Identification of the gene encoding an N-acetylpuromycin N-acetylhydrolase in the puromycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces alboniger*. *J. Bacteriol.* 175, 7474-7478.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafontaine, D., Delcour, J., Glasser, A. L., Desgres, J., and Vandenhoute, J. (1994). The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3' 9'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J. Mol. Biol.* 241, 492-497.
- Lesage, P., Truong, H. N., Graffe, M., Dondon, J. Springer, M. (1990). Translated translational operator in *Escherichia coli*. Auto-regulation in the infC-rpmI-rplT operon. *J. Mol. Biol.* 213, 465-475.
- Lin, L. S., Rothstein, D. M., (1992). Micromonospora RNA polymerase activity changes during stationary phase. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1881-1885
- Lin-Chao, S., Wong, T. T, McDowall, K. J., Cohen, S. N. (1994). Effects of nucleotide sequence on the specificity of rne-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNAI encoded by the pBR322 plasmid. *J. Biol. Chem.* 269, 10797-10803.
- Liou, G. F., Yoshizawa, S., Courvalin, P. and Galimand, M. (2006). Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16 S methylation in human bacterial pathogens. *J. Mol. Biol.* 359, 358-364.
- Lynch, S. R. and Puglisi, J. D (2001). Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J. Mol. Biol.* 306, 1037-1058.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J. E., Winkler, W. C., and Breaker, R. R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell.* 113, 577-586.
- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J. E., Weinberg, Z., Emilsson, G. M., Ruzzo, W. L., and Breaker, R. R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science.* 306, 275-279.
- Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 154-158.
- Maravic Vlahovicek, G., Cubrilo, S., Tkaczuk, K. L. and Bujnicki, J. M. (2008). Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the

- activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *Biochim.Biophys. Acta.* 1784, 582–590.
- Markovic, S., Vojnovic, S., Jovanovic, M., Vasiljevic, B. (2005). Different expression level of two KgmB-His fusion proteins. *J Serb Chem Soc.*;70, 1401–1407.
- Marzi, S., Myasnikov, A. G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M. Klaholz, B. P. (2007). Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell.* 130, 1019–1031.
- Masse, E. and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 4620–4625.
- Mattheakis, L. and Nomura, M. (1988). Feedback regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*: Translational coupling and mRNA processing. *J. Bacteriol.* 170, 4482–4492.
- Mattheakis, L., Vu, L., Sor, F., Nomura, M., (1989). Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 448–452.
- Mehta, R. and Champey, W.S. (2002). 30S ribosomal subunit assembly is a target for inhibition by aminoglycosides in *E. coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1546-1549.
- Melefors, O., & von Gabain, A. (1988). Site-specific endonucleolytic cleavages and the regulation of stability of *E. coli* *ompA* mRNA. *Cell.* 52, 893–901.
- Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W., and Uhlenbeck, O. C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template. *Nucl. Acid. Res.* 15, 8783–8798.
- Milojevic, N. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, 1998.
- Moine, H. (1990). *E. coli* threonyl-tRNA synthetase and tRNA^{Thr} modulate the binding of the ribosome to the translation initiation site of the *thrS* mRNA. *J. Mol. Biol.* 216, 299–310.
- Montange, R. K., Batey, R. T. (2008). Riboswitches: Emerging themes in RNA structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 117–133.
- Moric, I., Bajkic, S., Savic, M., Ilic Tomic, T., Conn, G. L., Vasiljevic, B. (2009). Heterologous *Escherichia coli* expression, purification and characterization of the GrmA aminoglycoside-resistance methyltransferase. *Protein J.* 28, 326–332.

- Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T. S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor ζ 32: Evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & Dev.* 13, 655–665.
- Nagai H., Yuzawa H., Yura T. (1991). Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of ζ 32 synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10515–10519.
- Narberhaus, F., Waldminghaus T., Chowdhury, S. (2006). RNA thermometers. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 3-16.
- Nevskaya, N., Tishchenko, S., Gabdoulkhakov, A., Nikonova, E., Nikonov, O., Nikulin, A., Platonova, O., Garber, M., Nikonov, S., Piendl, W. (2005). Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA. *Nucl. Acid Res.* 33, 478–485.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* 289, 920–930.
- Nocker, A., Krstulovic, N. P., Perret, X., Narberhaus, F. (2001). ROSE elements occur in disparate rhizobia and are functionally interchangeable between species. *Arch. Microbiol.* 176, 44–51.
- O'Farrell, H. C., Pulicherla, N., Desai, P., Rife, J. P. (2006). Recognition of a complex substrate by the KsgA/Dim1 family of enzymes has been conserved throughout evolution. *RNA.* 12, 725-733.
- O'Farrell, H. C., Scarsdale, J. N., and Rife, J. P. (2004). Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 339, 337–353.
- Ogle, J. M. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science.* 292, 897–902.
- Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., Ochi, K. (2007). Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* 63, 1096-1106.
- Owens, M., Pritchard, G., Skipp, P., Hodey, M., Connell, S. R., Knud H., Nierhaus K. H., O'Connor, D. (2004). A dedicated translation factor controls the synthesis of the global regulator. *EMBO J.* 23, 3375–3385.

- Park, Y. J., Lee, S., Yu, J. K., Woo, G., Lee, K., Arakawa, Y. (2006). Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum β -lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 907-908.
- Périchon, B., Courvalin, P., Galimand, M. (2007). Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 51, 2464-2469.
- Pfister, P. (2005). Mutagenesis of 16S rRNA C1409–G1491 base-pair differentiates between 6'-OH and 6'-NH₃⁺ aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* 346, 467–475.
- Philippe, C., Eyermann, F., Benard, L., Portier, C., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1993). Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 4394–4398.
- Poehlsaard J. and Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 870-881.
- Poiata, E., Meyer, M. M., Ames, T. D., Breaker, R. R. (2009). A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria. *RNA*. 15, 2046-2056.
- Poot, R. A., Tsareva, N. V., Boni, I. V., and van Duin, J. (1997). RNA folding kinetics regulates translation of phage MS2 maturation gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 10110-10115.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. 258, 598-599.
- Puglisi, J. D., Blanchard, S. C., Green, R. (2000). Approaching translation at atomic resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7, 855-861.
- Qing, G., Xia, B., & Inouye, M. (2003). Enhancement of translation initiation by A/T-rich sequences downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 6, 133–144.
- Rodionov, D. A., Dubchak, I., Arkin, A., Alm, E., Gelfand, M. S. (2004). Reconstruction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing δ -proteobacteria. *Genome Biology*, 5:R90

- Rodionov, D. A., Vitreschak, A. G., Mironov, A. A., Gelfand, M. S. (2002). Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 48949–48959.
- Rodnina, M. V., Daviter, T., Gromadski, K., Wintermeyer, W. (2002). Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome. *Biochimie.* 84, 745-754.
- Romanowski, M. J., Bonanno, J. B. and Burley, S. K. (2002). Crystal structure of the *Escherichia coli* glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold. *Proteins.* 47, 563–567.
- Romby, P., Brunel, C., Caillet, J., Springer, M., Grunberg- Manago, M., Westhof, E. (1992) Molecular mimicry in translational control of *E. coli* threonyl-tRNA synthetase gene. Competitive inhibition in tRNA aminoacylation and operator-repressor recognition switch using tRNA identity rules. *Nucl. Acid. Res.* 20, 5633–5640.
- Romby, P., Vandenesch, F., and Wagner, E. G. H. (2006). The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 229–236.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A.C., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., et al. (1999). The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA (Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell.* 97, 371–381.
- Savic, M., Ilic-Tomic, T., Macmaster, R., Vasiljevic, B. and Conn, G . L. (2008). Critical residues for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm. *J. Bacteriol.* 190, 5855–5861.
- Savic, M., Lovric, J., Ilic-Tomic T., Vasiljevic, B., Conn, G. L. (2009). Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nuc. Acid Res.* 37, 5420–5431.
- Savic, M. Doktorska disertacija, University of Manchester, 2009.
- Schlax, P. J., Xavier, K. A., Gluick, T. C., and Draper, D. E. (2001). Translational repression of the *Escherichia coli* α operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex. *J. Biol. Chem.* 276, 38494-38501.
- Schlunzen, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature.* 413, 814–821.

- Schmitt, E., Galimand, M., Panvert, M., Courvalin, P. and Mechulam, Y. (2009). Structural bases for 16S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 388, 570–582.
- Schneider R, Lurz R, Luder G, Tolksdorf C, Travers A, Muskhelishvili G (2001). An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucl. Acid. Res.* 29, 5107–5114.
- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sc.* 28, 329-335.
- Seidel-Rogol, B. L., McCulloch, V., Shadel, G. S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nat. Genet.* 33, 23–24.
- Serganov, A. and Patel D. J. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat. Rev. Genet.* 8, 776-789
- Serganov, A., Polonskaia, A., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Patel, D. J. (2003) Ribosomal protein S15 represses its own translation via adaptation of an rRNA-like fold within its mRNA. *EMBO J.* 22, 1898-1908.
- Setzer, D. R. (1999). Measuring equilibrium and kinetic constants using gel retardation assays. p. 115-128. In *Methods in Molecular Biology, Vol 118: RNA-protein interaction protocols.* (Haynes, S. R. ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Sharma, C. M., Darfeuille, F., Plantinga, T. H., and Vogel, J. (2007). A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev.* 21, 2804–2817.
- Sharp JS & Bechhofer DH (2003) Effect of translational signals on mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185, 5372–5379.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., Miller, G. H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138-163.
- Shokeen, S., Patel, S., Greenfield, T. J., Brinkman, C., Weaver, K. E. (2008). Translational Regulation by an Intramolecular Stem-Loop Is Required for Intermolecular RNA Regulation of the par Addiction Module. *J. Bacteriol.* 190, 6076-6083.

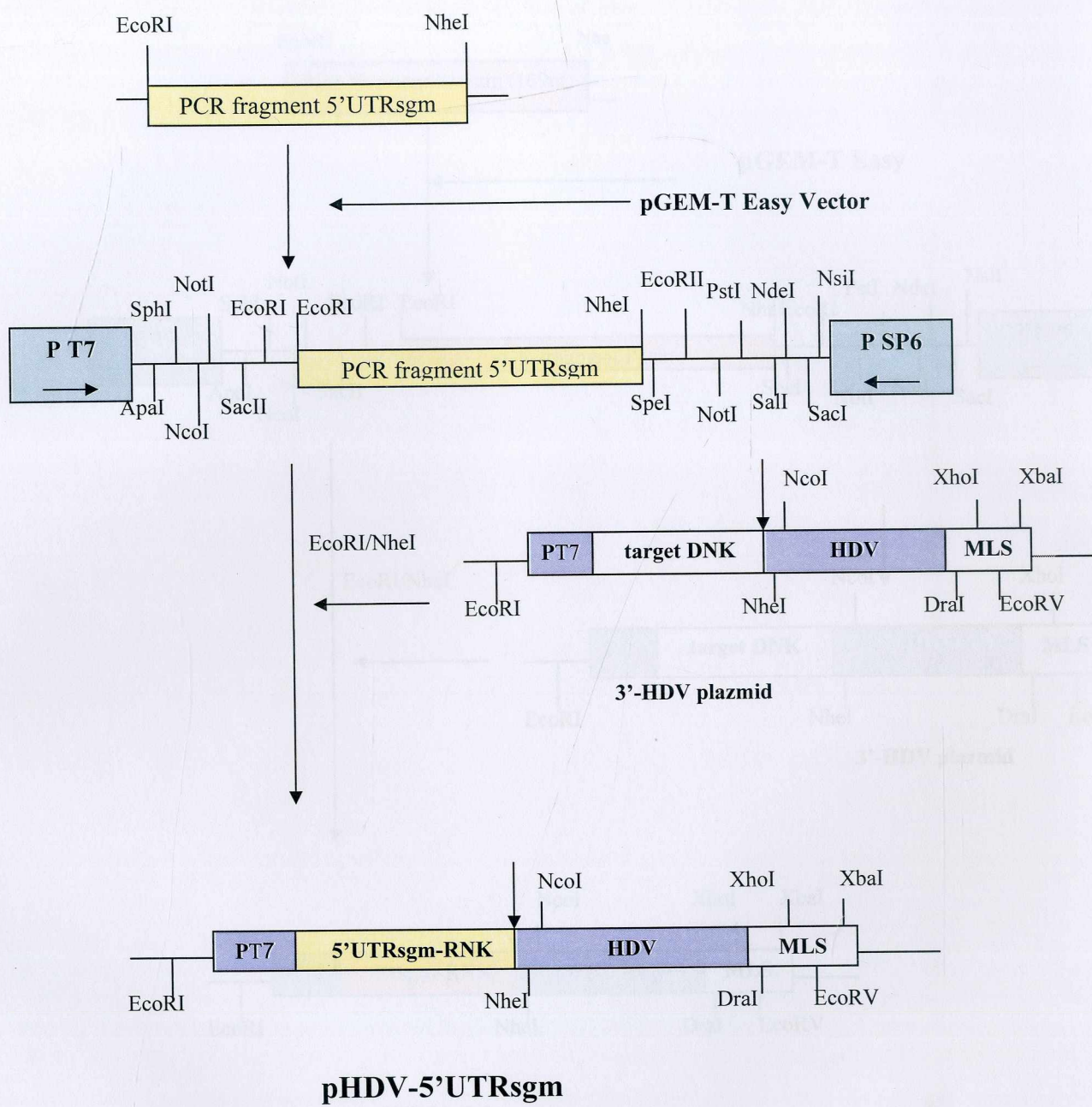
- Skeggs, P. A., Thompson, J., Cundliffe, E. (1985). Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*. *Mol. Gen. Genet.* 200, 415–421.
- Spedding, G., and Draper, D. E. (1993). Allosteric mechanism for translational repression in the *Escherichia coli* alpha operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 4399–4403.
- Spedding, G., Gluick, T. C., Draper, D. E. (1993). Ribosome initiation complex formation with the pseudoknotted alpha operon messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 229, 609–622.
- Springer, M., Portier, C., Grunberg-Manago, M. (1998). RNA Mimicry in the Translational Apparatus. In *RNA Structure and Function*. Simons, R.W., and Grunberg-Manago, M. (eds). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 377–413.
- Sudarsan, N., Hammond, M. C., Block, K. F., Welz, R., Barrick, J. E., Roth, A., Breaker, R. R. (2006). Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science.* 314, 300–304.
- Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R., and Hillen, W. (2004). A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucl. Acid. Res.* 32, 1610–1614.
- Sussman, J. K., Simons, E. L., Simons, R. W., (1996). *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. *Mol. Microbiol.* 21, 347–360.
- Takyar, S., Hickerson, R. P. & Noller, H. F. (2005). mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell.* 120, 49–58.
- Tamura T., Ishida Y., Otoguro M., Hatano K. and K. Suzuki (2008). Classification of ‘*Streptomyces tenebrarius*’ Higgins and Kastner as *Streptoalloteichus tenebrarius* nom. rev., comb. nov., and emended description of the genus *Streptoalloteichus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 688–691.
- Tang, C. K., and Draper, D. E. (1990). Evidence for allosteric coupling between the ribosome and repressor binding sites of a translationally regulated mRNA. *Biochemistry.* 29, 4434–4439.
- Tercero, J. A., Espinosa, J. C., Lacalle, R. A., Jimeney, A. (1996). The biosynthetic pathway of the aminonucleoside antibiotic puromycin, as deduced from the molecular analysis of the pur cluster of *Streptomyces alboniger*. *J. Biol. Chem.* 271, 1579–1590.

- Thisted, T., Gerdes, K. (1992). Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. *J. Mol. Biol.* 223, 41-54.
- Thompson, J. C., Skinner, H. R., Thompson, J., Ward, M. J., Hopwood, D. A., and Cundliffe, E. (1982). Biochemical characterisation of resistance determinants cloned from antibiotic-producing streptomycetes. *J. Bacteriol.* 151, 678-685.
- Tokuhisa, J. G., Vijayan, P., Feldmann, K. A., and Browse, J. A. (1998). Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase. *Plant Cell.* 10, 699-711.
- Toledo-Arana, A., Repoila, F., and Cossart, P. (2007). Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 182-188.
- Tomic, T. I., Moric, I., Conn, G. L. and Vasiljevic, B. (2008). Aminoglycoside resistance genes *sgm* and *kgmB* protect bacterial but not yeast small ribosomal subunits in vitro despite high conservation of the rRNA A-site. *Res. Microbiol.* 159, 658-662.
- Torres-Larios, A., Dock-Bregeon, A. C., Romby, P., Rees, B., Sankaranarayanan, R., Caillet, J., et al. (2002). Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* 9, 343-347.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350-4354
- Tscherne, J. S., Nurse, K., Popienick, P., Michel, H., Sochacki, M., and Ofengand, J. (1999a). Purification, cloning, and characterization of the 16S RNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 38, 1884-1892.
- Tscherne, J. S., Nurse, K., Popiernick, P., and Ofengand, J. (1999b). Purification, cloning, and characterization of the 16 S RNA m2G1207 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274, 924-929.
- Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2005). Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell.* 121, 257-270.

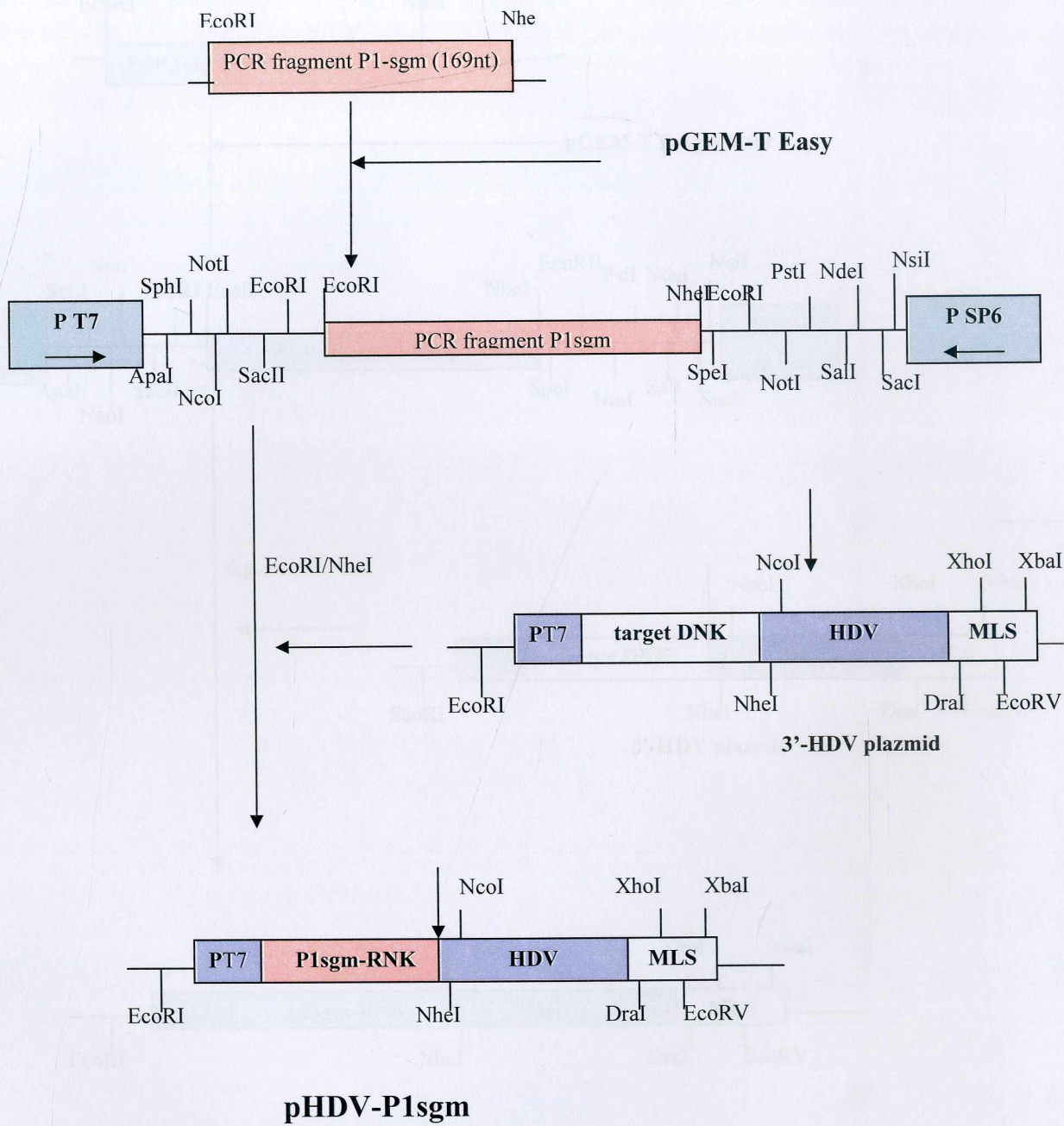
- Vajic, S., Anastasov, N., Vasiljevic, B. (2004). The *kgmB* gene, encoding ribosomal RNA methylase from *Streptomyces tenebrarius*, is autogenously regulated. *Arch. Microbiol.* 182, 475–481.
- van Buul, C. P. and van Knippenberg, P. H. (1985). Nucleotide sequence of the *ksgA* gene of *Escherichia coli*: Comparison of methyltransferases effecting dimethylation of adenosine in ribosomal RNA. *Gene.* 38, 65–72.
- 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.
- van Meerten, D. Girard, G., and van Duin, J. (2001). Translational control by delayed RNA folding: identification of the kinetic trap. *RNA.* 7, 483-494.
- Vicens, Q. & Westhof, E. (2003). Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* 326, 1175–1188.
- Vicens, Q. and Westhof, E. (2002). Crystal structure of a complex between aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding site. *Chem. Biol.* 9, 747-755.
- Vila-Sanjurjo, A., Squires, C. L., Dahlberg, A. E.. (1999). Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16 S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 293, 1-8.
- Vojnovic *et al.*, 2010, in press
- Wachino, J., Shibayama, K., Kurokawa, H., Kimura, K., Yamane, K., Suzuki, S., Shibata, N., Ike, Y., Arakawa, Y. (2007). Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m1A1408 Methyltransferase, NpmA, Found in a Clinically Isolated *Escherichia coli* Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides. *Antimic. Agen. and Chemoth.* 51, 4401-4409.
- Wachino, J., Yamane, K., Shibayama, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Suzuki, S., Doi, Y., Kimura, K., Ike, Y., and Arakawa Y. (2006). Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 178-184.
- Wang, J. X., Lee, E. R., Morales, D. R., Lim, J., Breaker, B. (2008). Riboswitches that Sense S-adenosylhomocysteine and Activate Genes Involved in Coenzyme Recycling. *Mol. Cell.* 29, 691–702.

- Weaver, K. E., Clewell, D. B., An, F. (1993). Identification, characterization, and nucleotide sequence of a region of *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive plasmid pAD1 capable of autonomous replication. *J. Bacteriol.* 175, 1900-1909.
- Weaver, K. E., Jensen, K. D., Colwell, A., Sriram, S. I. (1996). Functional analysis of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded stability determinant par. *Mol. Microbiol.* 20, 53-63.
- Weigand, J. E., Sanchez, M., Gunnesch, E. B. (2008). Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. 14, 89-97.
- Weinberg, Z., Barrick, J. E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J. N., Gore, J., Wang, J. X., Lee, E. R., Block, K. F., Sudarsan, N. (2007). Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucl. Acid. Res.* 35, 4809–4819.
- Winkler, W. C, Nahvi, A., and Breaker, R .R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature.* 419, 952–956.
- Winkler, W. C., and Breaker, R. R. (2005). Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 487–517.
- Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A., and Breaker, R. R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-binding ribozyme. *Nature.* 428, 281–286.
- Yamane, K., Doi, Y., Yokoyama, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Kato, H., and Arakawa, Y. (2004). Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48, 2069-2074.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kato, H., Shibayama, K., Kimura, K., Kumiko, K., Satoshi, I., Ozawa, Y., Toshifumi, K., Arakawa Y. (2007). 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, *Japan. Emerg. Infect. Dis.* 13, 642-646.
- Yamane, K., Wachino, J. I., Doi, Y., Kurokawa, H., and Arakawa. Y. (2005). Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerging Infect. Dis.* 11, 951-953.
- Yan, J., Wu, J., Ko, W. C., Tsai, S. H., Chuang, C. L., Wu, H. M., Lu, Y. J. and Li., J. D. (2004). Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1007-1012.

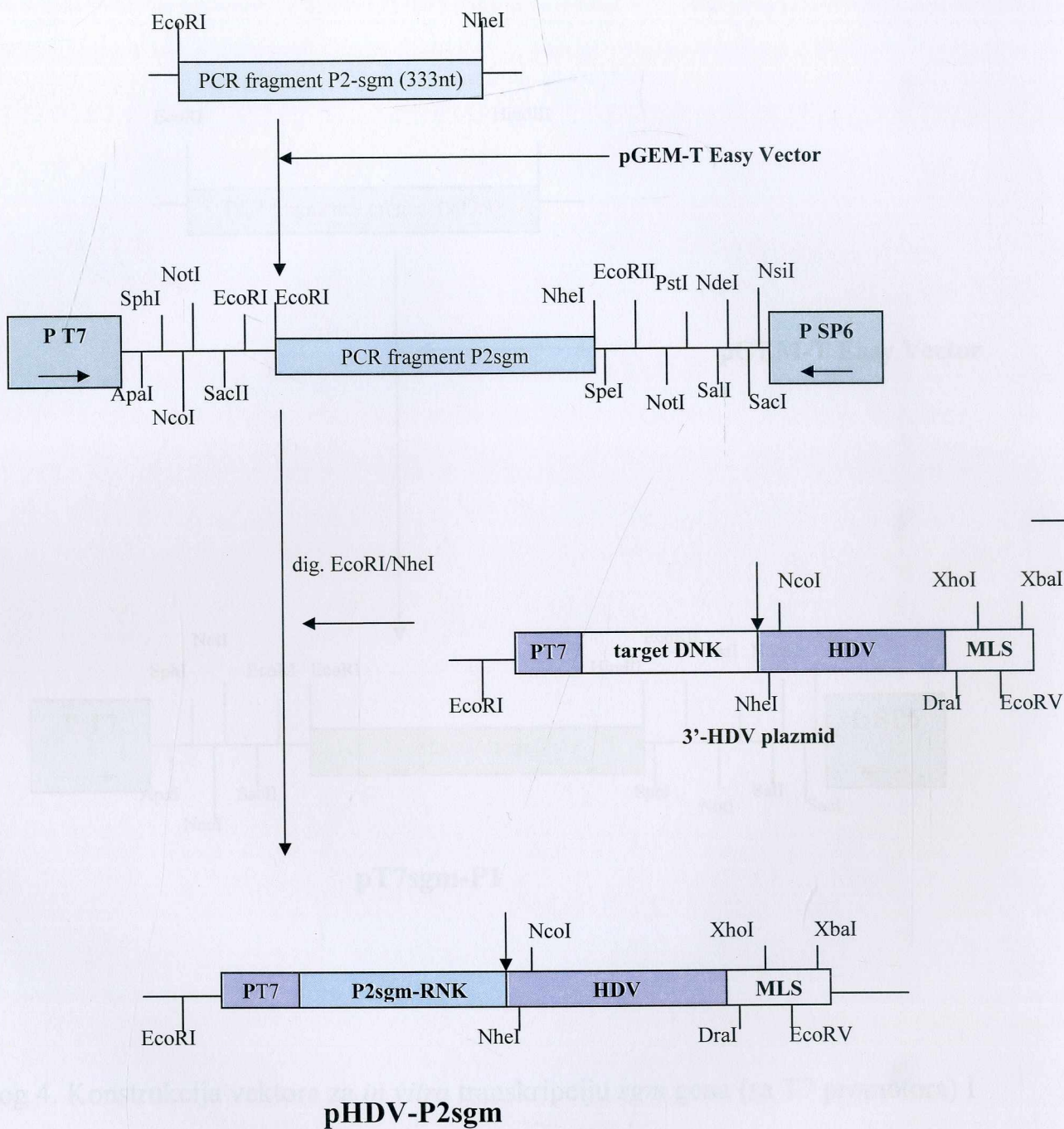
- Yokoyama, K., Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and T. Yagi. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362:1888-1893.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO J.* 17, 6437–6448.
- Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. (1999). Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science.* 285, 1722–1725.
- Yu, F., Wang, L., Pan, J., Yao, D., Chen, C., Zhu, T., Lou, Q., Hu, J., Wu, Y., Zhang, X., Chen, Z., Qu, D. (2009). Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate. *Diagnost. Microb. Infect. Dis.* 64, 57-63
- Yura T, Kanemori M, Morita M. T. (2000). The heat shock response: regulation and function. In: Storz G, Hengge-Aronis R (eds) *Bacterial stress responses*. ASM, Washington, DC, pp 3–18
- Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate J. H., Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell.* 106, 233–241.
- Yuzawa, H., Nagai, H., Mori, H., Yura T. (1993) Heat induction of ζ 32 synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucl. Acid. Res.* 21, 5449–5455.
- Zalacain, M., and Cundliffe, E. (1991). Cloning of *thrD*, a forth resistance gene, from the tylosin producer, *S. fradiae*. *Gene* 97, 137-142.
- Zegers, I., Gigot, D., van Vliet, F., Tricot, C., Aymerich, S., Bujnicki, J. M., Kosinski, J. and Droogmans, L. (2006). Crystal structure of *Bacillus subtilis* TrmB, the tRNA (m7G46) methyltransferase. *Nucl. Acid. Res.* 34, 1925–1934.
- Zengel, J. M., Lindahl, L. (1994). Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 47, 331–370.



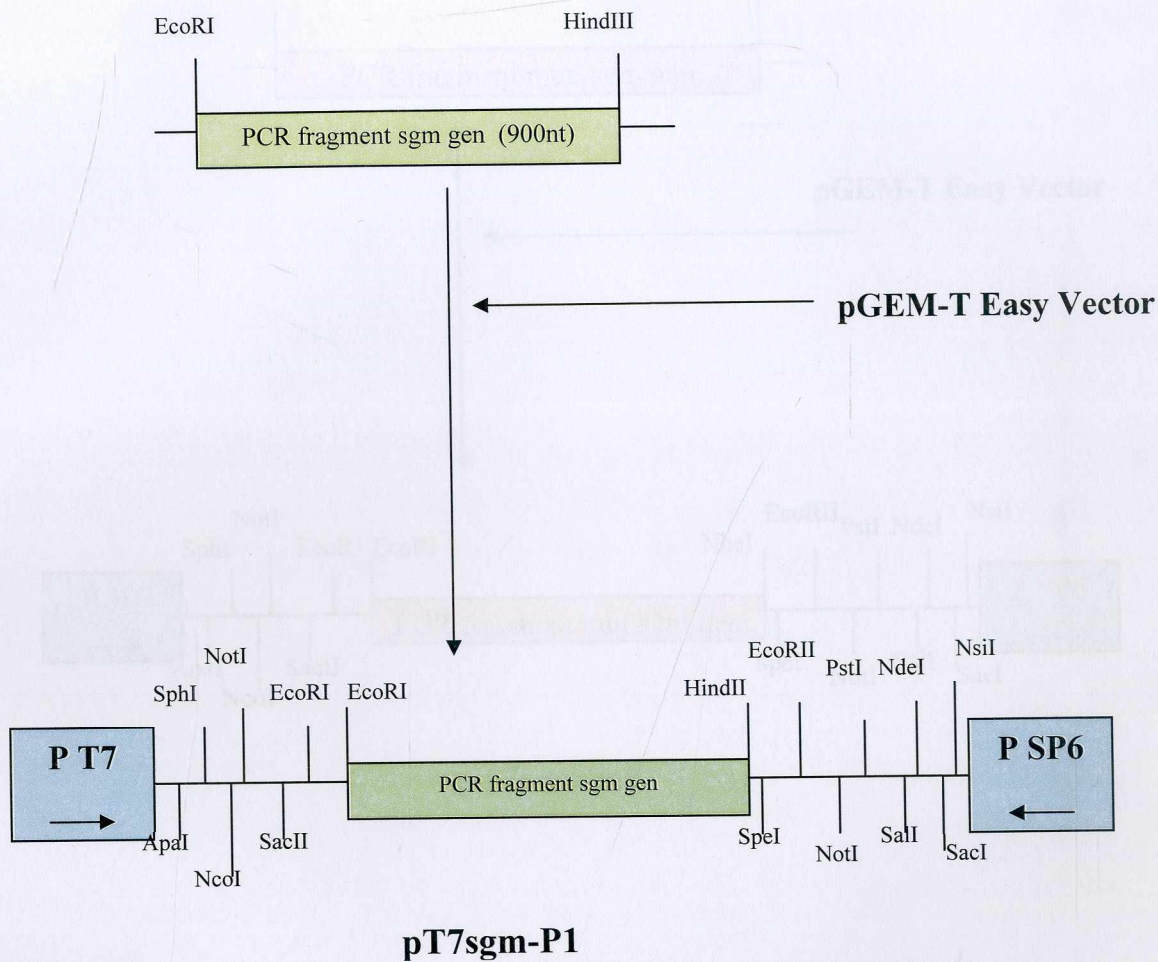
Prilog 1. Konstrukcija vektora sa 5'UTR sgm gena u vektor 3'HDV



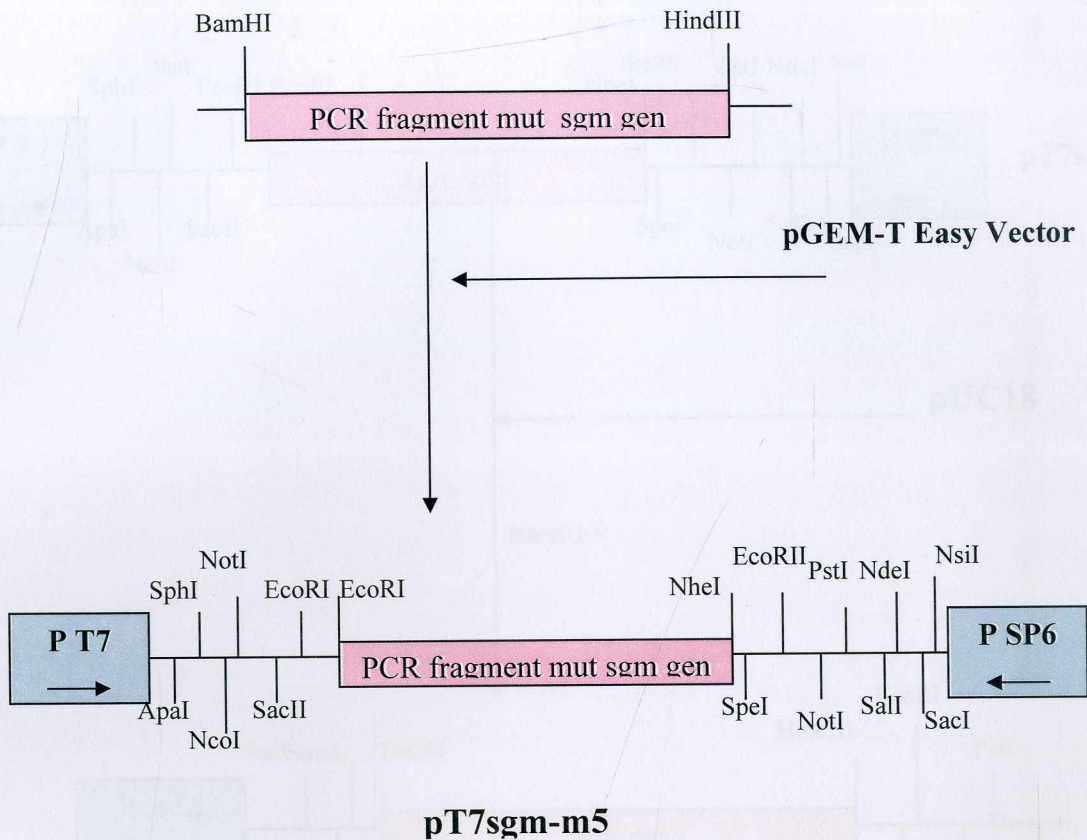
Prilog 2. Konstrukcija vektora sa 5'UTR *sgm* gena od P1 promotora u vektor 3'HDV



Prilog 3. Konstrukcija vektora sa 5'UTR *sgm* gena od P2 promotora u vektor 3'HDV

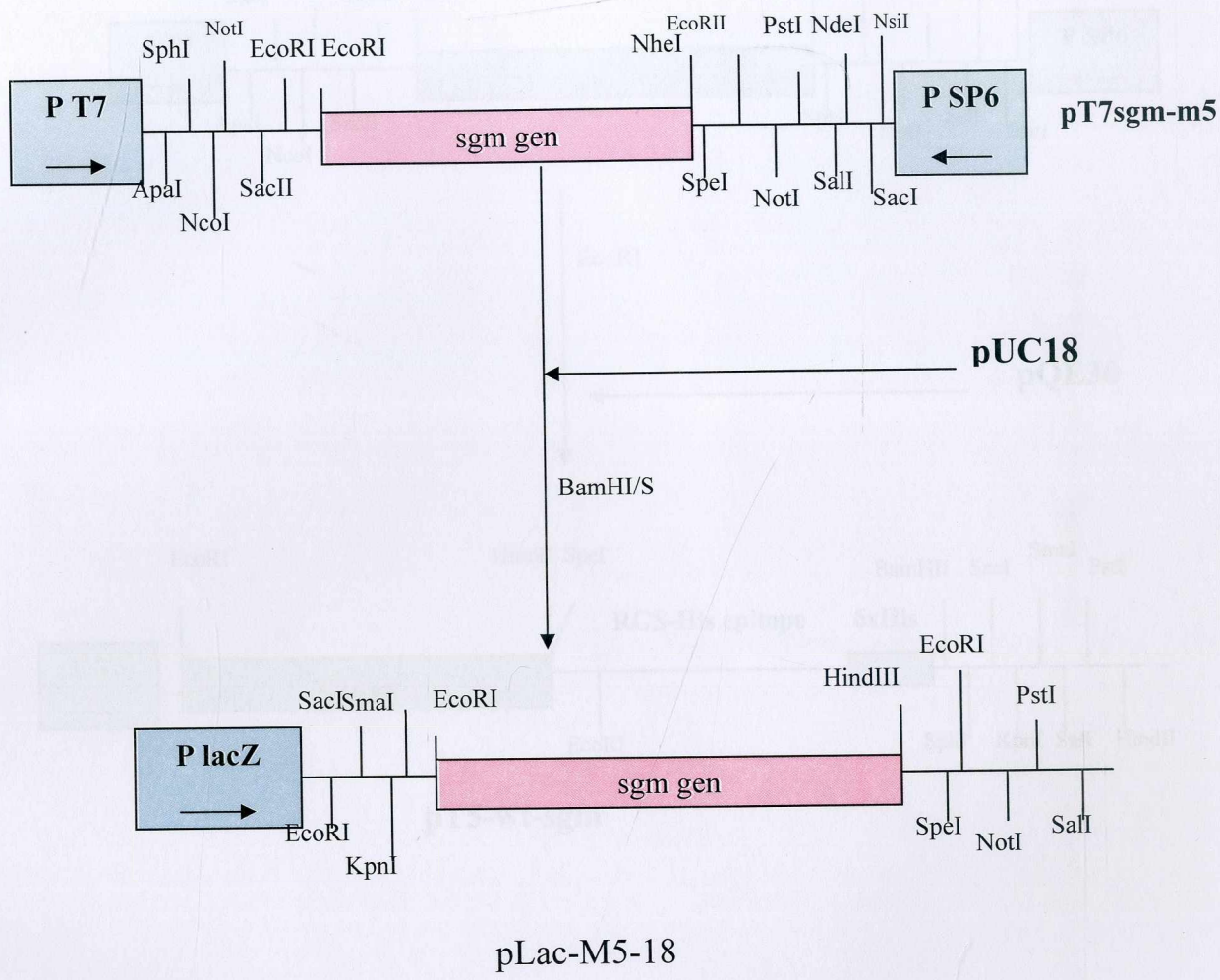


Prilog 4. Konstrukcija vektora za *in vitro* transkripciju *sgm* gena (sa T7 promotora) i translaciju *sgm* RNK sa intaktnom regulatornom sekvencom

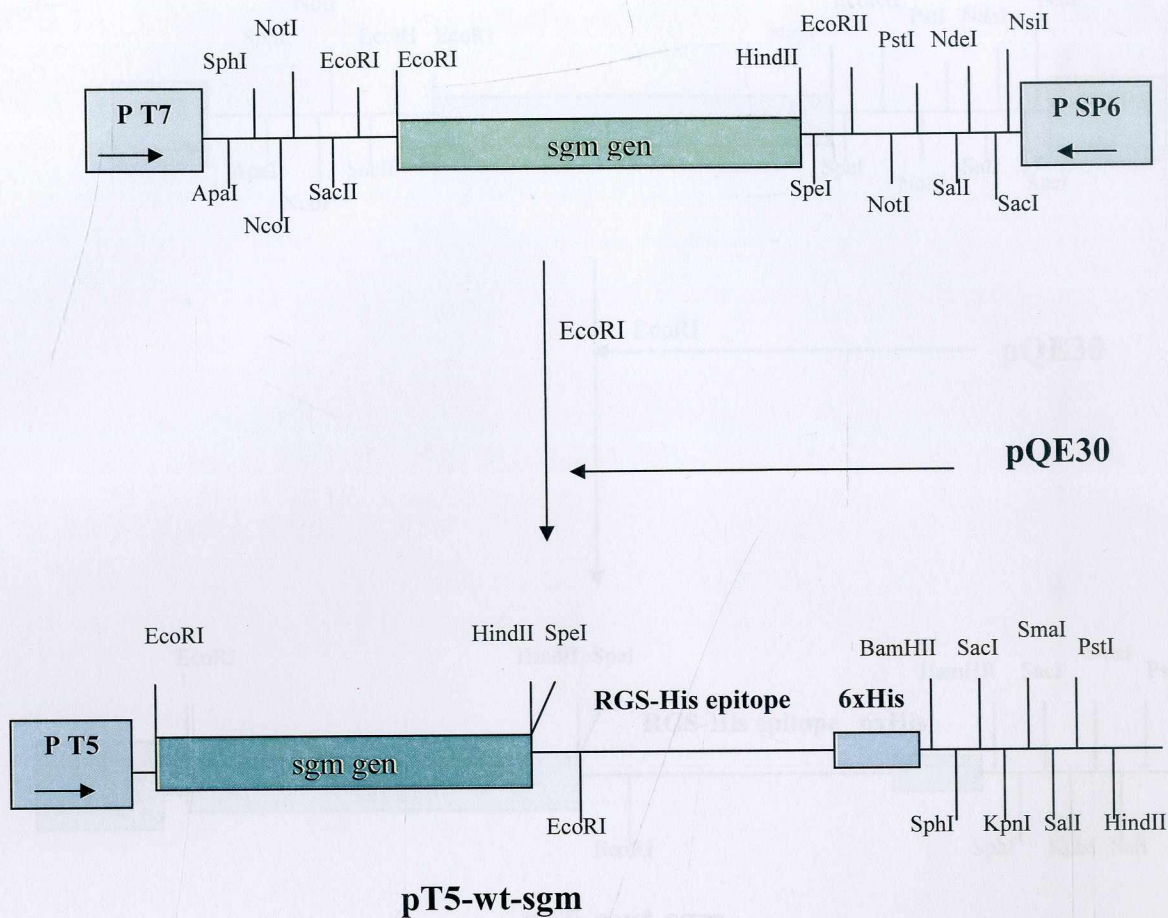


Prilog 5. Konstrukcija vektora za *in vitro* transkripciju *sgm* gena (sa T7 promotora) i translaciju *sgm* RNK sa deletiranom regulatornom sekvencom

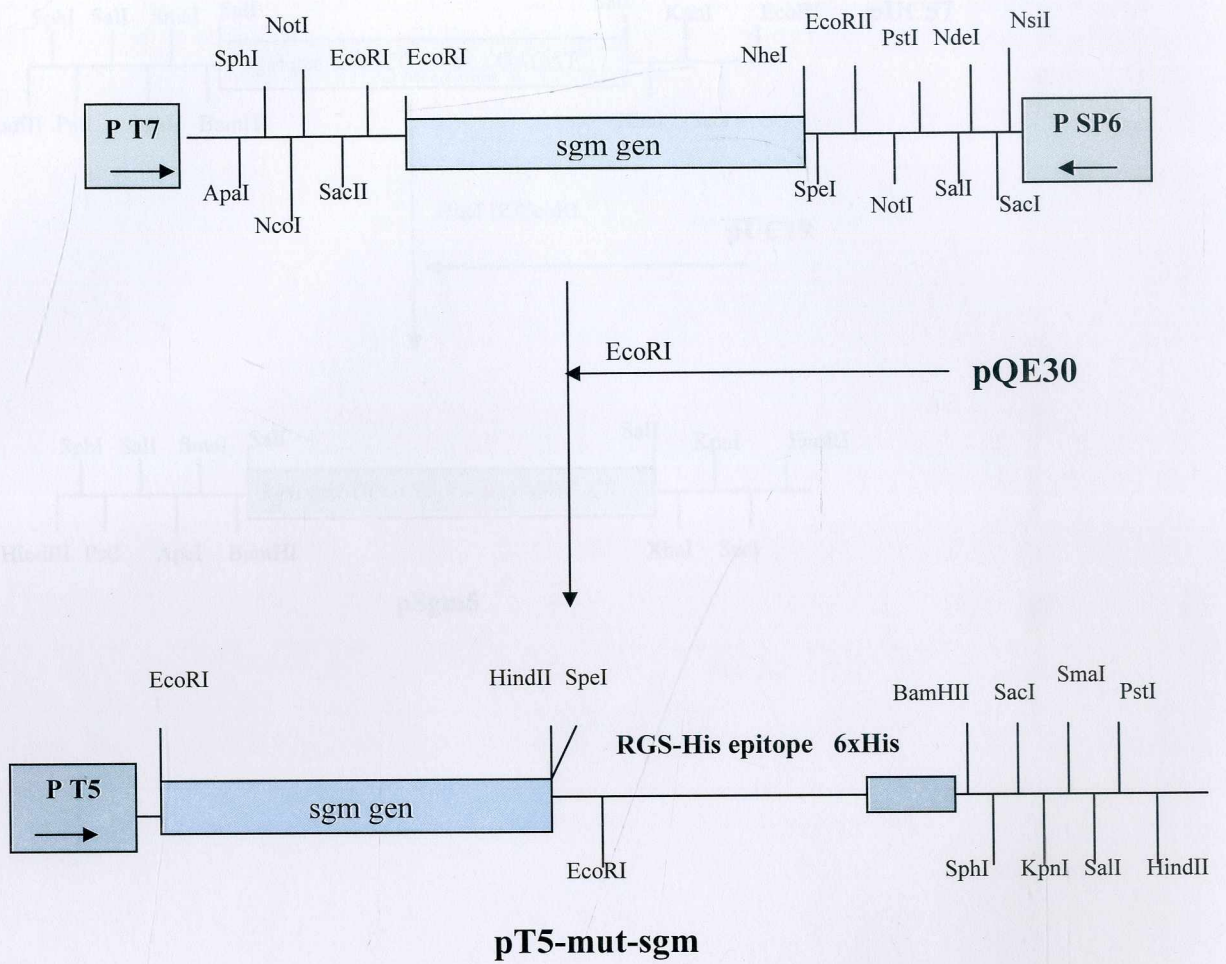
Prilog 6. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju *sgm* gena sa deletiranom regulatornom sekvencom pred *lacZ* promotorom



Prilog 6. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju *sgm* gena sa deletiranom regulatornom sekvencom pod *lacZ* promotorom

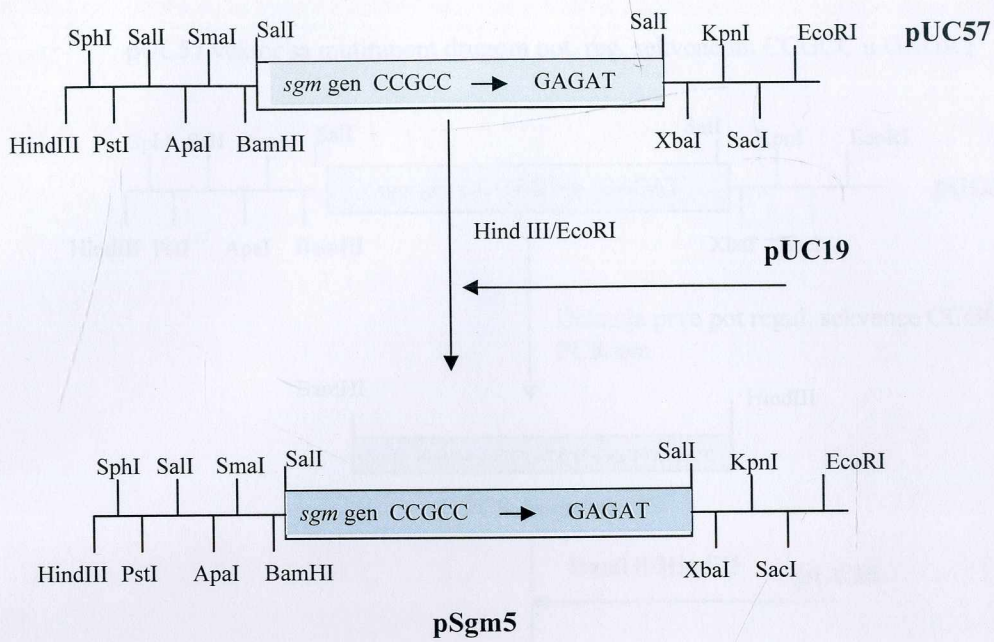


Prilog 7A. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju wt *sgm* gena sa regulatornom sekvencom pod T5 promotorom



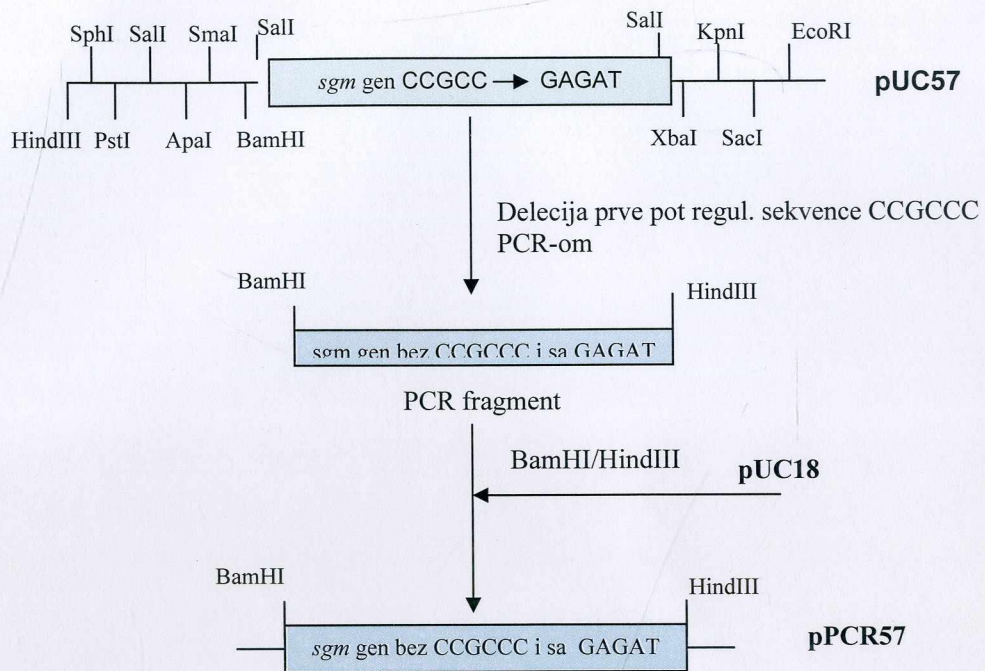
Prilog 8A. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju *sgm* gena sa intaktnom prvom i mutiranoj drugom potencijalnom regulatornom sekvencom CCGCC u GAGAT, pod lacI promotorom

Prilog 7B. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju *sgm* gena sa deletiranom regulatornom sekvencom pod T5 promotorom



Prilog 8A. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju *sgm* gena sa intaktnom prvom i mutitanom drugom potencijalnom regulatornom sekvencom CCGCC u GAGAT, pod *lacZ* promotorom

pUC57 vektor sa mutiranom drugom pot. reg. sekvencom CCGCC u GAGAT



Dvostruki mutant *sgm* gena, sa deletiranom prvom i mutiranom drugom regulatornom sekvencom

Prilog 8B. Konstrukcija vektora za *in vitro* translaciju *sgm* gena sa deletiranom prvom i mutiranom drugom potencijalnom regulatornom sekvencom CCGCC u GAGAT, pod *lacZ* promotorom

