



12765



3088829

COBISS ◦

**Prirodno-matematički fakultet
Univerzitet u Beogradu**

**Mehanizmi rezistentnosti i vernost translacije
u bakterijama rezistentnim na aminoglikozidne
antibiotike**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BRANKA VASILJEVIĆ

Beograd, 1988.

92 12765

ANALIZIRANJE...
1988.08.15

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

Eksplozivni
mikrobiološki
molekularni
Centar za

Ustanova za
istraživanje
i razvoj

Mehanizmi rezistentnosti i vernost translacije u bakterijama
rezistentnim na aminoglikozidne antibiotike

DOKTORSKA DISERTACIJA

BRANKA VASILJEVIĆ

Beograd
1988.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОСЛАВ НАРНОВИЌ" - БЕОГРАД
И. Бр. 88829



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je uradjen u Odeljenju za mikrobiologiju Univerziteta u Minhenu, Nemačka, a zatim u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta "Boris Kidrič", Vinča i Centru za genetičko inženjerstvo Beograd.

Koristim priliku da se najtoplije zahvalim:

Dr Ljubiši Topisiroviću, za visegodišnje podsticaje i usmeravanje u radu, brojnim savetima, diskusijama i idejama. Posebno bih želela da mu se zahvalim na svesrdnoj pomoci u toku izrade doktorske disertacije, mnogobrojnim diskusijama i sugestijama koje su mi veoma koristile za interpretaciju rezultata kao i za kritičku ocenu ovog rada.

Dr Augustu Böcku i dr Wolfgangu Piendlu, na velikoj pomoći i gostoprimstvu za vreme mog jednogodišnjeg boravka u Laboratoriji u Minhenu.

Dr Ani Savić za korisne savete i primedbe učinjene prilikom definitivne redakcije ove disertacije.

Saradnicima Laboratorija u kojima sam radila i koji su na bilo koji način bili uključeni u realizaciju ovog rada. Posebnu zahvalnost dugujem saradnicima Centra za genetičko inženjerstvo na podsticajima pomoći i drugarskoj atmosferi u kojoj je pravo zadovoljstvo raditi.

SADRŽAJ

Uvod	1
1. Mehanizmi delovanja antibiotika na bakterije	2
1.1. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina	4
2. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike	20
2.1. Modifikacija targeta	20
2.2. Redukovana fizioloska važnost targeta	23
2.3. Sprečavanje dolaska u kontakt antibiotika i targeta	24
2.4. Enzimska inaktivacija antibiotika	25
Materijal i metode	32
1. Sojevi bakterija	32
2. Medijumi	33
3. Test proizvodnje antibiotika	33
4. Odredjivanje minimalnih inhibitornih koncentracija	33
5. Pripremanje ribozoma, ribozomskih subjedinica i S100 frakcije	34
6. Analiza enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike	35
7. Sistem za <i>in vitro</i> sintezu proteina	35
8. Elektroforeza proteina ribozoma	36
9. <i>In vivo</i> metilacija ribozomske RNK	37
10. Izolovanje ribozomske RNK, hidroliza i tankoslojna hromatografija	37
11. Hromatografija visoke moci razdvajanja u tecnoj fazi	38
12. <i>In vitro</i> metilacija ribozomske RNK	39

Rezultati	40
1. Minimalne inhibitorne koncentracije	40
2. Analiza enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike	42
3. Rezistencija na nivou ribozoma	44
4. Analiza ribozomskih proteina	48
5. Analiza ribozomske RNK	50
6. Analiza vernosti translacije	62
Diskusija	64
Zaključci	73
Literatura	75

UYOD

Aleksandar Fleming je 1929. godine primetio da je rast kulture *Staphylococcus* na agaru inhibiran metaboličkim produktom kolonije *Penicillium notatum*. Taj metabolički produkt je nazvan penicilin. Ovim otkrićem označen je početak antibiotičke ere, ere veoma intenzivne upotrebe antibiotika, kao i njihovog izučavanja.

Antibiotici su prirodne organske supstance, produkti nekih mikroorganizama, koje su aktivne protiv drugih mikroorganizama. Danas je poznato oko 6000 antibiotika prirodnog porekla. Od toga oko 70 antibiotika je našlo praktičnu primenu prvenstveno u medicini i veterini. Zahvaljujući široj upotrebi antibiotika, mnoge infektivne bolesti izazvane streptokokama, pneumokokama, stafilokokama, ili drugim mikroorganizmima, danas su skoro eliminisane. Medjutim, tokom vremena, sve više i više bakterijskih sojeva je postalo rezistentno na različite antibiotike, tako da su izučavanja u ovoj oblasti i dalje vrlo aktuelna. Da bi izučavanja novih antibiotika, kao i izolovanje sintetskih i semisintetskih agenasa, dalo pozitivne rezultate, neophodno je dobro poznavanje mehanizama delovanja antibiotika na bakterije, kao i izučavanje postojecih mehanizama rezistencije bakterija na antibiotike.



Tabela 1. mehanizmi delovanja antibiotika

INHIBICIJA	MESTO DELOVANJA	ANTIBIOTICI
BIOSINTEZA ĆELIJSKOG ZIDA	ENZIM TRANSPEPTIDAZA KOJA KATALIZUJE FINALNU REAKCIJU U BIOSINTEZI ĆELIJSKOG ZIDA	PENICILINI CEFALOSPORINI

1. Mehanizmi delovanja antibiotika na bakterije

Zahvaljujući specifičnom inhibitornom delovanju na metaboličke procese, antibiotici su potpomogli fundamentalna istraživanja u molekularnoj biologiji. Antibiotici inhibitorno deluju na pojedine biosintetske procese u bakterijskoj ćeliji, tako što se vezuju za neku komponentu ćelije i inaktiviraju njenu funkciju. Ova inhibicija dovodi do usporenog rasta ili do smrti ćelije.

S obzirom na mesto delovanja, antibiotike možemo podeliti u nekoliko grupa:

1. antibiotici koji deluju na biosintezu ćelijskog zida,
2. antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina,
3. antibiotici koji deluju na biosintezu ili funkcionisanje nukleinskih kiselina,
4. antibiotici koji utiču na permeabilnost ćelijske membrane,
5. antibiotici koji inhibiraju ključne metaboličke enzime.

U tabeli 1. dati su osnovni podaci o mehanizmu delovanja, mestu delovanja, kao i neki predstavnici ovih grupa antibiotika.

FUNKCIJE ĆELIJSKE MEMBRANE	ĆELIJSKA MEMBRANA	POLIMIKSINI
METACILIZANI	SINTEZA DIHIDRO- PTERIDINE KISELINE	SULFONAMIDI
	REDUKTAZA DIHIDRO- PTERIDINE KISELINE	TRIMETOPRIM

Tabela 1. Mehanizmi delovanja antibiotika

INHIBICIJA	MESTO DELOVANJA	ANTIBIOTICI
BIOSINTEZA CELIJSKOG ZIDA	ENZIM TRANSPEPTIDAZA, KOJA KATALIZUJE FINALNU REAKCIJU U BIOSINTEZI CELIJSKOG ZIDA	PENICILINI CEFALOSPORINI
	ALANIN RACEMAZA I D-ALANIL-D-ALANIN SINETAZA	D-CIKLOSERIN
BIOSINTEZA PROTEINA (TRANSLACIJA)	30S SUBJEDINICA RIBOZOMA	TETRACIKLINI AMINOGLIKOZIDI
	50S SUBJEDINICA RIBOZOMA	HLORAMFENIKOL ERITROMICIN LINKOMICIN
	FAKTOR ELONGACIJE (EF-G)	FUSIDICNA KISELINA
BIOSINTEZA NUKLEINSKIH KISELINA	BIOSINTEZA DNA (REPLIKACIJA)	NOVOBIOCIN
	BIOSINTEZA RNA (TRANSKRIPCIJA)	RIFAMPICIN
FUNKCIJE CELIJSKE MEMBRANE	CELIJSKA MEMBRANA	POLIMIKSINI
METABOLIZAM	SINETAZA DIHIDRO- PTEROIDNE KISELINE	SULFONAMIDI
	REDUKTAZA DIHIDRO- FOLNE KISELINE	TRIMETOPRIM

1. Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina

Velika grupa antibiotika svoje inhibitorno dejstvo ostvaruje na nivou sinteze proteina. Kompleksna gradnja ribozoma i etape u kojima se odvija sinteza proteina pružaju veliki broj mogućnosti za delovanje antibiotika (4,5,6). U tabeli 1., antibiotici koji inhibiraju translaciju svrstani su na osnovu targeta za koji se vezuju. Druga mogućnost podele bi bila na osnovu procesa koji inhibiraju (inicijacija, elongacija ili terminacija). U svakom slučaju ni jedna klasifikacija ne može biti idealna, pošto je pokazano da neki antibiotici imaju više od jednog mesta vezivanja na ribozomu, a takodje da mogu inhibirati više reakcija u sintezi proteina. Pored inhibicije sinteze proteina na ribozomima, neki antibiotici (naročito streptomycin) uzrokuju različite, na prvi pogled nepovezane fiziološke efekte, kao što su povećana permeabilnost ćelijske membrane, stimulacija sinteze RNK, morfološke promene i td. (7).

Najinteresantniju grupu antibiotika čine aminoglikozidi. Pravilno ime ovih antibiotika bi bilo aminociklitoli, pošto svi antibiotici koji se svrstavaju u ovu grupu ne sadrže ostatak amino-šećera. Aminoglikozidi mogu biti podeljeni na osnovu strukture aminociklitola koji sadrže (Tabela 2). Grupa antibiotika sa 2-dezoksistreptaminom može dalje biti podeljena na 4,5-disubstituisane dezoksistreptamine (neamin, neomicin, lividomicin, paromomicin, butirozin) i 4,6-disubstituisane dezoksistreptamine (kanamicin, tobramicin, gentamicin, sisomicin) zavisno od toga koje hidroksilne grupe (vezane za ugljenikove atome na poziciji 4,5 ili 6) su supstituisane razlicitim amino-šećerima. Pored ovih antibiotika u aminoglikozide spadaju i na primer kasugamicin i higromicin, čije se strukture razlikuju od ovih već opisanih.

Svi ovi aminoglikozidni antibiotici su proizvodi sekundarnog metabolizma bakterija roda *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, pa čak i nekih vrsta roda *Pseudomonas*. Pored ovih prirodnih antibiotika konstruisani su i neki semisintetski derivati, kao što su amikacin (derivat kanamicina)(8), dibekacin (derivat kanamicina)(9),



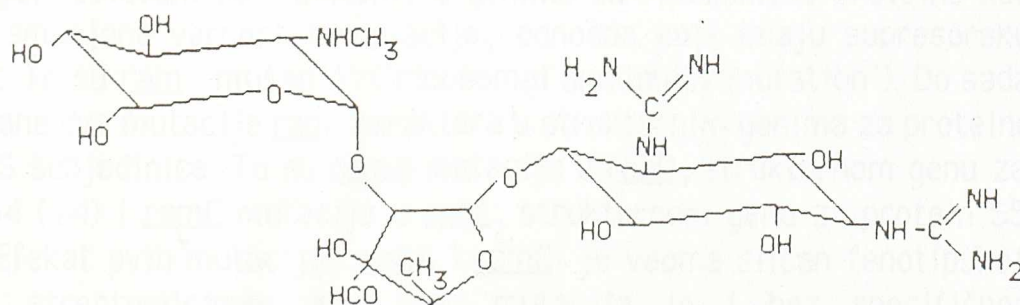
Tabela 2. Klase aminoglikozidnih antibiotika

Aminociklitol

Ime	Struktura	Antibiotik
streptidin		streptomycin
bluensidin		bluensomicin
2-dezoksistreptamin		neomicin paromomicin lividomicin kanamicin gentamicin sisomicin tobramicin
aktinamin		spektinomycin

netilmicin (derivat sisomicina)(10) u cilju efikasnije borbe protiv nekih bakterija rezistentnih na pojedine aminoglikozidne antibiotike.

Mehanizam delovanja aminoglikozidnih antibiotika najbolje je izučen u slučaju streptomicina. Streptomycin je prvobitno bio otkriven u kulturi *Streptomyces griseus*, a kasnije je otkriven i u drugim vrstama roda *Streptomyces*. Hemijska struktura streptomicina prikazana je na slici 1.



Slika 1. Hemijska struktura streptomicina

Pošto je struktura ovog molekula kationske prirode, kao što je slučaj i sa ostalim aminoglikozidima, streptomycin uzrokuje brojne efekte u intaktnim bakterijama i na njihovim ćelijskim komponentama. Tako streptomycin može da interaguje sa nukleinskim kiselinama i proteinima, da utiče na permeabilnost ćelijske membrane, da utiče na mnoge ćelijske procese preko promene nivoa cikličnog AMP-a i guanozin tetrafosfata (ppGpp)(7). Medjutim, najviše pažnje je usmereno na ribosome kao mesto delovanja streptomicina, što je pokazano još 1961. (11). Od tog vremena, pokazano je da ribozomi nisu samo mesto delovanja streptomicina, već i svih ostalih aminoglikozidnih antibiotika.

Pored toga što inhibiraju sintezu proteina, neki aminoglikozidi izazivaju grešenje u translaciji *in vivo* i *in vitro*. Grešenje u translaciji je prvo zapaženo kod mutanta "uslovno zavisnog od streptomicina" ("conditional streptomycin dependent" -CSD)(26,27). Naime, kod takvog mutanta je zapaženo da se enzim koji nedostaje u ćeliji usled prisustva "nonsense" mutacije u genu koji ga kodira, može sintetisati u prisustvu subletalnih koncentracija streptomicina. Ovakav efekat streptomicina je označen kao fenotipska supresija (28,29), pošto je ovaj efekat posledica uslova sredine na proces translacije, odnosno supresija zavisi od prisustva ili odsustva streptomicina u medijumu. Za razliku od fenotipske supresije, informaciona supresija je posledica mutacija u supresorskim lokusima, tj. posledica izmenjene aktivnosti tRNK (30). Pored toga, izolovani su i mutanti u genima za ribozomske proteine kod kojih je smanjena vernost translacije, odnosno koji imaju supresorsku aktivnost. To su ram mutanti ("ribosomal ambiguity mutation"). Do sada su izolovane dve mutacije ram karaktera u strukturnim genima za proteine male 30S subjedinice. To su ramA mutacija u rpsD, strukturnom genu za protein S4 (14) i ramC mutacija u rpsE, strukturnom genu za protein S5 (32,33). Efekat ovih mutacija ramA i ramC je veoma sličan fenotipskoj supresiji streptomycinom. Kod ovih mutacija je i bez specifičnog supresora moguća *in vivo* supresija sva tri "nonsense" kodona, kao i mutacija koje pomeraju okvir čitanja ("frameshift" mutacije). U *in vitro* uslovima takodje je moguće zapaziti efekat streptomicina ili ram mutacija na vernost translacije. Naime, zapaženo je da poli-U, informaciona RNK za polifenilalanin, može biti pročitana u prisustvu



streptomicina kao poliizoleucin ili poliserin i ovaj fenomen je nazvan grešenje u translaciji ili "misreading" (34). Slično efektu streptomicina, ribozomi izolovani iz ram mutanata izrazito greše u translaciji, što se ogleda u povećanoj sintezi poliizoleucina na poli-U kao iRNK (28,32). Pored ramA i ramC mutanata, nedavno su izolovani i mutanti u rpIL, strukturnom genu za protein L7/L12 (61,62). Ova dva proteina su medjusobno identična s tim što protein L7 ima acetilnu grupu na N-krajnjem serinu. Ovi mutanti pripadaju ram klasi pošto omogućavaju supresiju sva tri "nonsense" kodona *in vivo*, a takodje i povećano grešenje u translaciji *in vitro*.

Suprotno dejstvo na grešenje u translaciji *in vivo* i *in vitro* imaju mutacije u nekim genima za ribozomske proteine, čija je fenotipska ekspresija rezistencija na aminoglikozidne antibiotike. To su takozvane restriktivne mutacije, pošto prisustvo ovakve mutacije u genomu bakterija vodi ka *in vivo* restrikciji aktivnosti supresora, odnosno prisustvo ovakvih mutacija onemogućava supresiju "nonsense" mutacije u prisustvu specifičnog supresora (29,30,35). Pored toga, prisustvo ovakvih mutacija izaziva drastično smanjenje grešenja u translaciji u *in vitro* sistemu. Ovoj klasi restriktivnih mutacija pripada i mutacija u rpsL (strA) genu (strukturni gen za protein S12), čija je fenotipska ekspresija rezistencija na streptomicin (29,36,37). zatim mutacija u rpsQ (neaA) genu (strukturni gen za protein S17), koja je odgovorna za rezistenciju na neamin (38) i mutacija u rpIE genu (strukturni gen za protein L6), koja dovodi do rezistencije na gentamicin (39-40). Pored mutacije koja determiniše rezistentnost na antibiotik streptomicin, u rpsL genu mapira i mutacija koja vodi ka zavisnosti rasta bakterije od streptomicina (41,42). Ranije se pretpostavljalo da mutanti čiji je rast zvisan od prisustva antibiotika imaju ribozome čija je struktura tako narušena da vrše i restrikciju aktivnosti normalnih tRNK, odnosno mogu da vrše inkorporaciju aminokiselina samo ukoliko je prisutan antibiotik koji izaziva grešenje u translaciji (35). U slučaju streptomicin zavisnog mutanta, streptomicin u medijumu mogu zameniti paromomicin ili etanol (43). Medjutim, pokazano je da mutanti čiji je rast zavisn od streptomicina mogu da koriste antibiotik za rast u prilično niskoj koncentraciji i da ribozomi izolovani iz ovakvog mutanta imaju izuzetno nizak afinitet za streptomicin (44). Kasnije je pokazano da se streptomicin vezuje za ribozome ali samo tokom



rasta, odnosno da do vezivanja antibiotika dolazi samo tokom formiranja ribozoma i tako se najverovatnije poništava efekat promenjenog ribozomskog proteina. Na ovaj način sintetišu se funkcionalno aktivni ribozomi. Za razliku od ovakvih ribozoma, ribozomi koji se sintetišu tokom rasta u medijumu bez antibiotika (linearan rast) imaju promenjenu konformaciju i promenjene funkcionalne osobine (45,46).

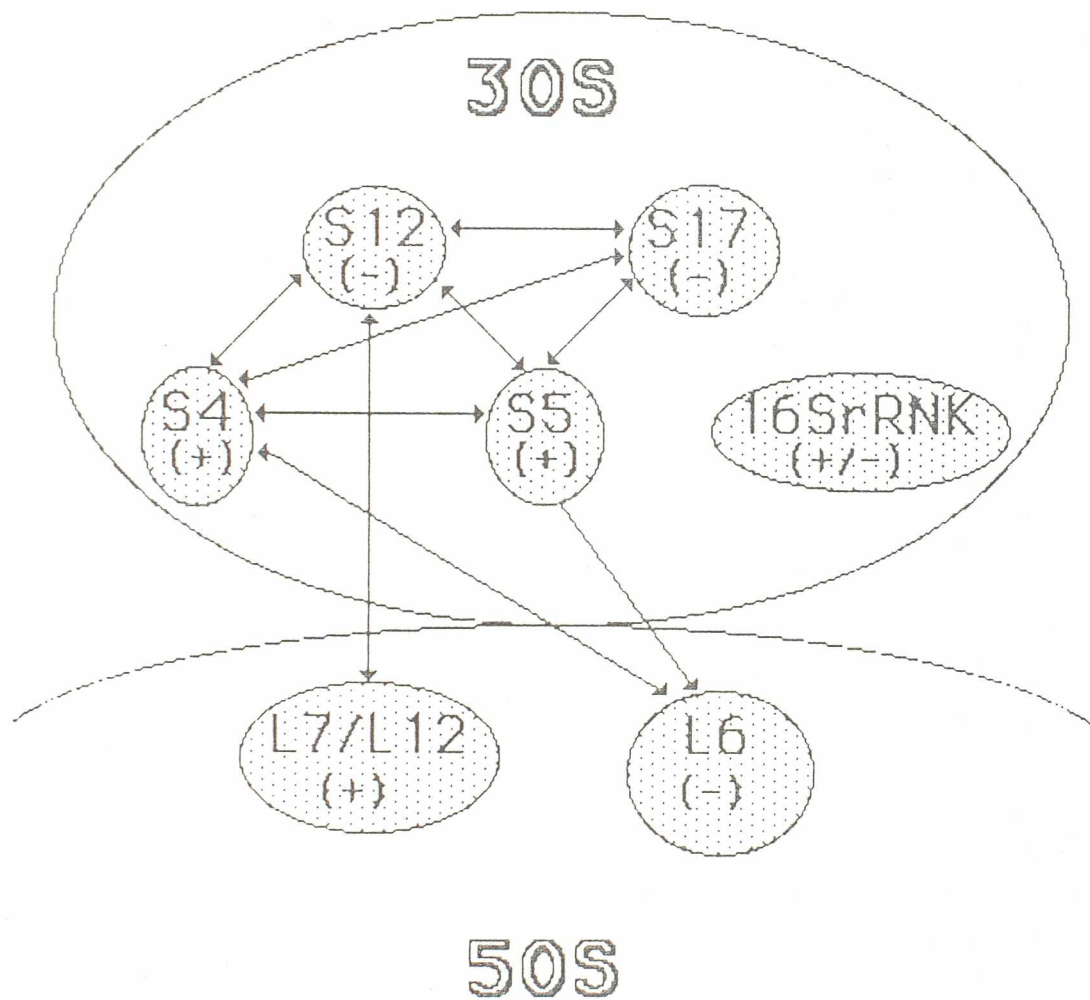
Pored streptomycin ovisnog mutanta, izolovani su i drugi mutanti čiji rast zavisi od prisustva antibiotika. To su spektinomycin zavisan, kasugamicin zavisan i neamin zavisan mutant (47, 48, 49, 50 i 51). Medjutim, što se tiče kontrole vernosti translacije interesantan je samo mutant čiji rast zavisi od neamina. Ovaj mutant pokazuje restrikciju aktivnosti supresora *in vivo*, a u skladu sa tim i povećanu vernost translacije u *in vitro* sistemu za sintezu proteina (51). Ovaj mutant, slično streptomycin zavisnom mutantu, ima izmenjen protein male subjedinice S12. Medjutim, neke osobine, na primer rast u prisustvu različitih antibiotika, čine ga različitim od streptomycin zavisnog mutanta, te se može smatrati da ovaj mutant nije streptomycin zavisan mutant za čiji rast može biti prisutan neamin, već da pripada novoj klasi antibiotik zavisnih mutanata. Pored podataka koji su dobijeni analizom ovih mutanata za protein S12 je u eksperimentima rekonstrukcije 30S subjedinice potvrđeno da je uključen u kontrolu vernosti translacije (52). Medjutim, mesta vezivanja ova dva antibiotika se ne preklapaju (53), što ukazuje na to da izmenjeni protein S12 ne utiče direktno na interakciju antibiotik-ribozom, već da u kooperaciji sa drugim komponentama ribozoma utiče na izmenjeni afinitet ribozoma za antibiotik (ili na formiranje ribozoma), a krajnji rezultat je povećana vernost translacije, odnosno fenotipski - rast zavisan od prisustva antibiotika.

Da postoji kooperacija različitih ribozomskih proteina u kontroli vernosti translacije, najbolje se vidi kod duplih mutanata. Takvi su na primer revertanti mutanata zavisnih od streptomicina čiji je rast postao neovisan od prisustva streptomicina. Naime, pokazano je da ovi revertanti poseduju dodatnu mutaciju ili u *rpsD* (*ramA*) genu (54,55) ili u *rpsE* (*ramC*) genu (56,57). Ovi revertanti pokazuju različite nivoe grešenja u translaciji i senzitivnost, odnosno rezistentnost na različite koncentracije

streptomicina što zavisi od toga koji su aleli rpsL gena i rpsD (ramA) ili rpsE (ramC) gena prisutni u genomu (32,58). Ipak, može se reći da je nivo grešenja u *in vitro* translaciji ribozoma izolovanih iz ovih revertanata sličan nivou grešenja ribozoma izolovanih iz bakterija divljeg tipa.

U cilju izučavanja interakcije proteina ribozoma koji utiču na vernost translacije, konstruisani su i dupli mutanti koji u svom genomu imaju jednu restriktivnu i jednu ram mutaciju (slika 2.). Slično kao i kod revertanata čiji je rast postao nezavisan od prisustva streptomicina mutacije u genima za S4 i S5 anuliraju efekat strA i neaA mutanata. U duplim mutantima dolazi do smanjivanja restrikcije aktivnosti supresora i povećavanja grešenja u translaciji u poredjenju sa restriktivnim sojem, odnosno nivo grešenja u translaciji se približava onom nivou koji je karakterističan za bakteriju divljeg tipa. Pored toga, kod duplih mutanata dolazi i do smanjenja stepena rezistencije u poredjenju sa rezistentnim sojem (1,2,3). Mutacije u genu za protein L7/L12 deluju na rpsL alel slično izmenjenim proteinima S4 i S5 (61,62).

Pošto je izmenjeni protein L6 jedini protein velike subjedinice za koji je pokazano da povećava vernost translacije, bilo je interesantno videti da li restriktivan uticaj ovog proteina može biti anuliran mutacijom u strukturnim genima za druge proteine 50S ili 30S subjedinice. Izolovani su revertanti koji više ne pokazuju restriktivan efekat na vernost translacije i pokazano je da takvi revertanti imaju promenjen ili protein S4 ili protein S5. Interesantno je zapaziti da u ovim eksperimentima nisu izolovani revertanti sa izmenjenim proteinima velike subjedinice, npr. sa izmenjenim proteinom L7/L12. Jedna od ovih mutacija u rpsD genu (protein S4) koja je izolovana u ovakvim revertantima, kombinovana je sa mutacijom u rpsL genu i dobijen je efekat derestrikcije kakav nije primećen ni sa jednim alelom rpsD gena koji je dobijen selekcijom za derestrikciju aktivnosti supresora u bakteriji sa mutacijom u rpsL (strA) genu. Iz ovoga se može zakljuciti da samo oni izmenjeni proteini 30S subjedinice koji izazivaju veoma visok nivo grešenja u translaciji mogu da utiču na restrikciju uzrokovanu mutiranim proteinom 50S subjedinice (59).



Slika 2. Interakcije ribozomskih proteina koji učestvuju u kontroli vernosti translacije. (+) i (-) označavaju da li mutacije u genima za te proteine povećavaju ili smanjuju nivo grešenja u translaciji.

Konstruisani su i sojevi koji imaju dve ram mutacije u svom genomu - ramA (protein S4) i ramC (protein S5). Pretpostavljeno je da ovakvi sojevi imaju najveći mogući nivo grešenja u translaciji i bilo je interesantno videti da li su ovakvi sojevi vijabilni i da li kod njih dolazi do multiplikacije grešenja u translaciji. Dupli mutanti ramA, ramC su vijabilni iako jako sporo rastu i imaju povećan nivo grešenja u translaciji. Medjutim, povećanje grešaka u translaciji nije mnogo veće kada se poredi sa grešenjem koje izaziva prisustvo samo jedne ram mutacije, što govori da efekat ove dve mutacije nije aditivan. Pored povećanog nivoa grešenja u translaciji sojevi sa dve ram mutacije su hipersenzitivni na antibiotik streptomycin, što je i karakteristika sojeva sa samo jednom ram mutacijom u poredjenju sa sojem divljeg tipa. Medjutim, sojevi sa dve ram mutacije imaju manje inhibitorne koncentracije od sojeva sa jednom ram mutacijom (60).

Na osnovu opisanih rezultata moglo bi se zakljuciti da kooperativni efekat ribozomskih proteina na vernost translacije kvantitativno odgovara njihovom uticaju na fenotip koji se ogleda u rezistenciji na animoglikozide. Naime, mutanti sa povećanom vernošću translacije su rezistentniji, a oni sa smanjenom vernošću translacije su senzitivniji na aminoglikozide u odnosu na soj divljeg tipa. Sojevi koji poseduju i jednu i drugu vrstu mutacija pokazuju intermedijarnu rezistentnost zavisno od alela koji su prisutni u genomu bakterija.

Na slici 2. je naznačeno da i 16S rRNK učestvuje u kontroli vernosti translacije. To mogu da ilustruju dva primera. Prvi primer je izmenjena vernost translacije u ribozomima tretiranim kloacinom DF13. Kloacin DF13 je bakteriocin koji, slicno kolicinu E3, deluje endonukleolitički na 16S rRNK i to tako što je prekida na 49 nukleotida sa 3' kraja. Ovaj fragment ostaje vezan za ribosome, ali posledica ove lezije je drastična inhibicija proteinske sinteze *in vivo* i *in vitro*. Tretirani ribozomi zadržavaju 10-20% aktivnosti, ali za razliku od netretiranih ribozoma sintetišu relativno kraće polipeptide. Pored toga ribozomi tretirani kloacinom DF13 imaju povećanu vernost translacije, što je pokazano u *in vitro* sistemu za sintezu proteina u kome su kao informacione RNK korišćene ili MS2 RNK ili poli-U (63).

Drugi primer pruža antibiotik kazugamicin i mutant rezistentan na ovaj antibiotik (tabela 3.). Kazugamicin je aminoglikozidni antibiotik koji inhibira inicijaciju sinteze proteina ali se smatralo da ne izaziva grešenje u translaciji, pošto u svojoj strukturi ne sadrži streptamin ili 2-dezoksistreptamin (5). Međutim, nedavno je pokazano da kazugamicin u koncentraciji koja ne inhibira sintezu proteina smanjuje grešenje u *in vitro* translaciji i da čak može da anulira efekat streptomocina kada su prisutni zajedno u sistemu. S druge strane, mutant rezistentan na kasugamicin koji je defektan u dimetilaciji dva susedna adenina na 3' kraju 16S rRNK (64) pokazuje povećano grešenje u translaciji *in vivo* u sistemu u kome su koriscene i "nonsense" i "frameshift" mutacije. Mutant rezistentan na kazugamicin je prema tome sličan ram mutantima. Međutim, u *in vitro* sistemu u kome je korišćena MS2 RNK, nije bilo moguće detektovati povećan nivo grešenja u translaciji sa ribozomima izolovanim iz kazugamicin rezistentog mutanta (65). Moguće je da ovaj sistem nije dovoljno senzitivian tako da ne mogu da se detektuju male razlike u nivou grešenja u translaciji.

Svi ovi primeri ukazuju na to da su različite komponente ribozoma uključene u kontrolu vernosti translacije. Osnovna pretpostavka je da pravilna interakcija kodona i antikodona osigurava vernost translacije, pa prema tome sve komponente ribozoma koje su posredno ili neposredno uključene u ostvarivanju te interakcije mogu uticati na vernost translacije. Gorini je pretpostavio da ribozom poseduje "selektivni mehanizam" koji može diskriminisati molekule tRNK (35). Jačina kodon - antikodon interakcije utiče ne efikasnost "selektivnog mehanizma". Komponente ribozoma koje su uključene u kontrolu vernosti translacije su prema ovoj hipotezi deo "selektivnog mehanizma" ribozoma i njihove promene mogu uticati na efikasnost ovog mehanizma.

Postavljene su medjutim i druge hipoteze koje uzimaju u obzir i druge aspekte sinteze proteina a ne samo kodon - antikodon interakciju. Tako, prema kinetičkom modelu koji je dao Ninio proteini uključeni u kontrolu vernosti translacije mogu uticati na brzinu procesa elongacije u sintezi proteina i prema tome povećavati ili smanjivati verovatnoću da dodje do greške u tom procesu (66). On je pretpostavio da se aminoacil -

tRNK prvo labilno vezuje za ribozom. Transpeptidacija je moguća tek kada ta veza postane stabilna. Verovatnoća da će doći do stabilizacije veze pa prema tome i do transpeptidacije zavisi od vremena u kome je aminoacil-tRNK labilno vezana ("sticking time"). Ukoliko je to vreme duže veća je verovatnoća da će doći do inkorporacije aminokiseline. Izmenjeni proteini ribozoma mogu uticati na verovatnoću inkorporacije aminokiselina preko promene tog vremena. Tako bi naprimer ram mutacija povećavala "sticking time", odnosno povećavala verovatnoću inkorporacije pogrešne aminokiseline, a strA mutacija bi smanjivala "sticking time", odnosno smanjivala takvu verovatnoću. Pokazano je da strA mutant koji je rezistentan na streptomycin ima smanjenu brzinu sinteze polipeptidnog lanca u poredjenju sa sojem divljeg tipa (67). Smanjena brzina sinteze je povezana sa sporijom transpeptidacijom što zahteva bržu stabilizaciju veze aminoacil - tRNK sa ribozomom. To znači da je vreme u kome je aminoacil - tRNK labilno vezana kraće, odnosno da je manja verovatnoća inkorporacije pogrešne aminokiseline u polipeptidni lanac. Na taj način može se objasniti smanjenje grešenja u translaciji, odnosno smanjenje broja pogrešno inkorporiranih aminokiselina koje je primećeno u soju rezistentnom na streptomycin.

Pored ovog modela koji je dao Ninio pokazano je da ribozomi poseduju i druge mehanizme odgovorne za prepoznavanje korektnog supstrata, odnosno korektne aminoacil - tRNK. Hopfield je prvi pretpostavio postojanje kinetičkog korektora ("proofreading") koji je uslovljen hidrolizom GTP-a (31). Upravo je ova povezanost korektora supstrata i hidrolize GTP-a omogućila da se eksperimentalno utvrdi postojanje korektora i njegovo učešće u opštoj vernosti translacije (68). U korektorskom mehanizmu vernost translacije se postepeno povećava ponovljenim selekcijama supstrata u jednom ili više koraka u kojima može da dodje do odbacivanja supstrata i koje slede posle inicijalne selekcije. Prema tome energetska cena koju plaća sistem za održavanje vernosti translacije je različita u korektorskom mehanizmu i u prvom reverzibilnom selektivnom koraku. Ovakav redosled događaja podrazumeva da su komponente ribozoma koje učestvuju u organizaciji R-mesta (mesto prepoznavanja tRNK - "recognition site") i A-mesta (akceptorsko mesto) odgovorne i za kontrolu vernosti translacije. Medjutim, pokazano je da i

P-mesto (peptidil mesto) može da učestvuje u kontroli vernosti translacije tako što utiče na brzinu translokacije (69). Naime, pokazano je da nesrodna tRNK usporava translokaciju i tako povećava mogućnost disocijacije pogrešne peptidil - tRNK. Na ovaj način translokacija ima ulogu u ispravljanju grešaka tokom proteinske sinteze bar u početku translacije.

Poznato je da prosečna frekvencija grešenja u translaciji iznosi $1 - 6 \times 10^{-4}$ (70). Postojanje mutanata sa manjom ili većom frekvencijom grešaka ukazuje na to da je vernost genske ekspresije kontrolisana evolucionom selekcijom. Postavlja se pitanje zašto je nivo vernosti translacije kod bakterija divljeg tipa značajno ispod onog nivoa koji imaju neki mutanti. Skorašnji rezultati ukazuju na to da postoji korelacija između brzine rasta i vernosti translacije (71, 72). Naime, pošto translacioni aparat predstavlja najveći deo mase rastućih bakterija (a prema tome i sinteza proteina je glavna metabolička aktivnost bakterija), sledi da je brzina rasta bakterija osetljiva na efikasnost translacije. Odnosno, bakterije sa najbržim rastom su one koje imaju najefikasniji translacioni sistem. To međutim nije i sistem sa najvećom mogućom vernošću translacije, nego onaj sistem koji optimizira cenu koju plaća bakterija zbog neke frekvencije defektnih proteina i cenu dalje redukcije grešaka. Poznato je da mutanti sa visokom vernošću translacije postižu tu vernost tako što odbacuju 1.5 - 2.5 srodna ternarna kompleksa po jednoj formiranoj peptidnoj vezi za razliku od bakterija divljeg tipa kod kojih je ta vrednost 1.1 (71). Prema tome, potrošnja GTP-a do čije hidrolize dolazi prilikom korekturne provere vezivanja aminoacil - tRNK je mnogo veća kod restriktivnih mutanata sa visokom vernošću translacije nego kod bakterija divljeg tipa koje imaju umeren nivo vernosti translacije. S druge strane, proteini u *E. coli* mogu da tolerišu odredjen nivo aminokiselinskih zamena, odnosno mogu da tolerišu greške u svojoj primarnoj strukturi bez uticaja na funkciju. Prema tome, izabrana je ona vernost translacije za koju bakterija ne plaća suviše visoku energetska cenu (hidroluza GTP-a), a s druge strane joj omogućava maksimalnu brzinu rasta i samim tim selektivnu prednost.

Pošto je poznato da neki aminoglikozidi izazivaju grešenje u

translaciji, postavlja se pitanje da li aminoglikozidi deluju tako što postepeno povećavaju broj defektnih proteina koji povratno utiču na vernost translacije, tako da je broj grešaka sve veći i veći i na kraju dolazi do smrti ćelije. Pokazano je da ribozomi izolovani iz ćelija koje su rasle u prisustvu subletalnih koncentracija streptomicina sadrže defektne proteine. Međutim neki defektni proteini su izolovani samo u solubilnoj frakciji bakterija što ukazuje na to da postoji diskriminatorni mehanizam tokom formiranja ribozoma (73). S druge strane, pokazano je da takvi ribozomi iako sadrže defektne proteine, nemaju bitno izmenjenu ni brzinu elongacije niti vernost translacije u poredjenju sa bakterijama koje nisu tretirane streptomycinom (74), što ukazuje na to da baktericidni efekat streptomicina nije uzrokovan amplifikovanim brojem grešaka. To potvrđuje i činjenica da ram mutanti imaju veoma stabilne kulture, iako je kod njih nivo grešenja u translaciji mnogo veći od nivoa grešenja indukovano niskim koncentracijama streptomicina u bakterijama divljeg tipa. Da grešenje u translaciji nije samo po sebi odgovorno za letalni efekat streptomicina govori i činjenica da streptomycin, kao i većina drugih aminoglikozida, inhibira inicijaciju proteinske sinteze. Ova dva efekta - inhibicija inicijacije i grešenje u translaciji predstavljaju svojevrsan paradoks koji je razjašnjen kada je pokazano da se radi o dejstvu antibiotika na ribozome u dva razlicita stanja - jedni su uključeni u inicijaciju translacije, a drugi su uključeni u elongaciju polipeptidnog lanca (75). Streptomycin blokira inicijacioni kompleks, ali na ribozome koji su uključeni u elongaciju polipeptidnog lanca deluje tako što smanjuje i brzinu i vernost translacije (76). Na ovaj način može da se objasni alternativni efekat niskih i visokih koncentracija streptomicina na ćelije. Naime, kada je streptomycin prisutan u niskim koncentracijama on uglavnom deluje na preovladujuću klasu ribozoma, odnosno na polizome i dovodi do povećanog grešenja u translaciji, dok u visokim koncentracijama streptomycin dopire do svih ribozoma uključujući i one koji su angazovani u inicijaciji translacije i tako zaustavlja proteinsku sintezu. Inicijacioni kompleks blokirani streptomycinom nije stabilno vezan za informacionu RNK, već ta veza ima poluzivot od oko 5 minuta (77) tako da dolazi do reciklizacije blokiranih ribozoma i inhibicije novoformiranih informacionih RNK (78). U svakom slučaju kod mutanata koji imaju izmenjeni ribozomski protein S12 ne dolazi ni do inhibicije inicijacije niti

do indukovanog grešenja u translaciji što ukazuje na to da je jedno mesto vezivanja za ribozom odgovorno za oba ova efekta. Medjutim, poznato je da se streptomycin ne vezuje za protein S12. Naprotiv streptomycin se dobro vezuje za ribozomska jezgra ("core" partikule) kojima nedostaje protein S12. To vezivanje je bolje ukoliko su prisutni proteini S3 i S5, a pokazano je da se streptomycin delimično vezuje i za protein S4 (79). Velika 50S subjedinica takodje pospešuje vezivanje streptomicina za ribozom (80). U eksperimentima u kojima su korišćeni bifunkcionalni agensi koji mogu formirati medjumolekulske mostove ("cross-linking") pokazano je da i proteini male subjedinice S11 i S13 učestvuju u vezivanju streptomicina (81), a takodje i proteini velike subjedinice L2, L6 i L17 (82). Korišćenjem fluorescentnih reagenasa pokazano je da i protein L31 učestvuje u mestu vezivanja streptomicina (86). Prema ovim rezultatima mesto vezivanja je samo jedno i uključuje regione obe subjedinice. Odnosno, streptomycin se vezuje za površinu male subjedinice koja učestvuje u interakciji sa velikom subjedinicom i utiče na promenu u tom regionu. Posledica ovakve promene je narušen korekturni mehanizam ribozoma (61, 87). S druge strane, još je Gorini pokazao da se streptomycin specifično vezuje za 16S rRNK i pretpostavio da ribozomski proteini, uključujući i S12, mogu da modifikuju sposobnost vezivanja streptomicina (83). Novijim tehnikama je utvrđeno da se streptomycin specifično vezuje za određeni region 16S rRNK u koji je uključena i baza na poziciji 912 (84). Tranzicija baze na ovoj poziciji dovodi do rezistencije na streptomycin, a takodje i do smanjenog grešenja u translaciji (85).

Aminoglikozidi pored toga što deluju na sintezu proteina utiču i na druge procese u ćeliji (7). Najinteresantniji je efekat na ćelijsku membranu koja postaje propustljiva za nukleotide, aminokiseline, kalijumove jone, a takodje omogućava ulazak citrata ili β -galaktozida u ćelije koje nemaju odgovarajući transportni sistem za te molekule. Pošto je bilo primećeno da dolazi do propustljivosti za kalijumove jone istovremeno kada dolazi i do inhibicije sinteze proteina, zaključeno je da je oštećenje membrane deo baktericidnog mehanizma, a ne posledica delovanja streptomicina na ribozome. Medjutim, da ovo nije tačno pokazano je u eksperimentima koji dokazuju da je za oštećenje membrane neophodna aktivna sinteza proteina. Ovo dokazuju i mutanti rezistentni na

streptomycin, koji imaju izmenjen ribozomski protein S12 i kod kojih ne dolazi do oštećenja membrane pod dejstvom streptomicina. Ukoliko bi streptomycin nezavisno delovao i na membranu i na ribosome bilo bi malo verovatno da jedna mutacija koja menja strukturu ribozoma može da utiče i na membranu. Prema tome, oštećenje membrane nije direktna posledica dejstva streptomicina, već rezultat njegovog dejstva na senzitivne ribosome uključene u sintezu proteina. Dokaz za to je i činjenica da do ubrzanog transporta ("uptake") streptomicina u bakterijsku ćeliju, poznatog kao EDP II ("energy-dependent phase II" - energetski ovisna faza II: jedna od faza transporta aminoglikozida u ćeliju) ne dolazi ukoliko je proteinska sinteza inhibirana hloramfenikolom (88). Transport streptomicina je takodje sprečen i kod bakterija koje sadrže plazmide koji nose gene odgovorne za rezistenciju na streptomycin. U ovom slučaju dolazi do enzimske modifikacije streptomicina koji zatim ne može da interaguje sa ribozomima.

S druge strane, pokazano je da streptomycin pošto ima sposobnost da indukuje grešenje u translaciji, utiče i na to da se sintetišu defektni proteini koji se zatim inkorporiraju u ćelijsku membranu i utiču na inicijaciju EDP II (89). Slično tome puromicin koji dovodi do prevremene terminacije proteinske sinteze i na taj način stvara defektne proteine može da dovede do ubrzanog ulaska streptomicina u ćeliju, čak i u streptomycin rezistentnom mutantu za koga je pokazano da nema EDP II (90). Takodje, ram mutanti imaju skraćenu prvu fazu transporta antibiotika (EDP I) koja prethodi fazi ubrzanog ulaska streptomicina u ćeliju - EDP II. Ribozomi izolovani iz ram mutanata imaju povećan afinitet za streptomycin (91), međjutim ovo povećanje je veoma malo da bi se njime moglo objasniti skracenje EDP I faze. Verovatnije je da ram mutanti koji imaju povećan nivo grešenja u translaciji imaju i veći broj defektnih proteina inkorporiranih u membranu, a na to se još nadovezuje i autokatalitičko dejstvo samog streptomicina na transport, tako da dolazi do veoma brze inicijacije EDP II faze.

Na osnovu ovakvih podataka Davies (92) je pretpostavio sledeći redosled događaja odgovornih za baktericidno dejstvo aminoglikozida:

1. Mala količina antibiotika ulazi u ćeliju preko, za sada nepoznatog mehanizma. Moguće je da antibiotik koristi kanale formirane od defektnih proteina nastalih zbog prirodnog nivoa grešenja u translaciji. Moguće je takodje, da antibiotik može da koristi za ulazak u ćeliju kanale koji nastaju na mestima gde je membrana vezana za rastuci ćelijski zid ili kanale na mestima proteinske sekrecije. Treća mogućnost je da antibiotik može da koristi nespecifičnost transportnog sistema uključenog u transport neke druge postrukturi slične komponente. Ta mala količina antibiotika je dovoljna da deluje na ribosome angazovane u elongaciji i da izazove povećano grešenje u translaciji.

2. Neki od defektnih proteina inkorporiraju se u membranu i zbog lošeg uklapanja u strukturu membrane stvaraju kanale koji omogućavaju ulazak antibiotika. Tako nastaje autokatalitički proces povećanog ulaska antibiotika, grešenja u translaciji i formiranja kanala.

3. Koncentracija intracelularnog antibiotika se postepeno povećava i dostiže onu koncentraciju koja je dovoljna da blokira dalju inicijaciju proteinske sinteze.

4. Letalni efekat dejstva aminoglikozida nastaje zbog ireverzibilne blokade proteinske sinteze i zbog permanentnog transporta antibiotika u ćeliju.

2. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike

Inhibitorno delovanje bakterija na antibiotike zasniva se na interakciji antibiotika sa nekom komponentom bakterijske ćelije koja je neophodna za njeno pravilno funkcionisanje. Prema tome, svako sprečavanje dolaska u kontakt antibiotika i targeta dovodi do rezistencije bakterije na antibiotik. U biohemijskom smislu do rezistencije može doći na nekoliko načina:

1. Modifikacijom targeta u ćeliji, koji više ne može da interaguje sa antibiotikom ali i dalje zadržava normalno funkcionisanje u ćeliji;
2. Redukcijom fiziološke važnosti targeta;
3. Sprečavanjem dolaska u kontakt antibiotika i targeta;
4. Enzimskom modifikacijom antibiotika.

2.1. Modifikacija targeta

Primer za ovakav tip rezistencije je rezistencija na antibiotike koji inhibiraju sintezu proteina. Rezistencija nastaje kao posledica promene strukture ribozoma ili neke komponente koja je uključena u sintezu proteina, tako da se antibiotik ne može više vezati za svoj target u ćeliji, ali je zadržano njegovo normalno funkcionisanje u ćeliji. U tabeli 3. su dati primeri za ovakav mehanizam rezistencije. U ovu tabelu nisu uneti podaci koji se odnose na modifikaciju targeta u bakterijama koje proizvode antibiotike. Mehanizmi rezistencije ovih bakterija su opisani u diskusiji.

Mutacije u genima za ribozomske proteine koje su odgovorne za rezistenciju na različite antibiotike mogu se relativno lako dobiti u laboratorijskim uslovima. To su uglavnom mutanti sa izmenjenim

Tabela 3. Rezistencija na antibiotike koji inhibiraju sintezu proteina uslovljena modifikacijom targeta.

Antibiotik	Modifikovana komponenta	Referenca
Spektinomycin	S5 16S rRNK	93 107,108
Streptomycin	S12 16S rRNK	36,94 85
Neamin	S17 S5 S12	38 95
Kanamycin	S12	96
Gentamicin	L6	39,40
Kazugamicin	submetilacija 16S rRNK* S2	64,97 98,99
Eritromicin	metilacija 23S rRNK* L4 L22 23S rRNK	100,101 102,103 102,103 109
Tiostrepton	metilacija 23S rRNK* L11	104 105,106
Eritromicin + Hloramfenikol	23S rRNK	110

Nastavak tabele 3.

Antibiotik	Modifikovana komponenta	Referenca
Kiromicin	EF-Tu	111,112
Fusidicna kiselina	EF-G	113,114

*označava da se radi o post-transkripcionoj modifikaciji rRNK; u slučajevima gde je samo rRNK navedena kao modifikovana komponenta radi se o mutaciji u genu za određenu RNK (detaljna objašnjenja vidi u tekstu).

ribozomskim proteinima. Međutim, ovaj tip rezistencije nije bitno zastupljen među kliničkim izolatima. S druge strane, rezistencija na eritromicin koja nastaje usled metilacije adenina na poziciji 2058 u 23S rRNK (115), zastupljena je u kliničkim izolatima pošto su geni za metilazu locirani ili na plazmidima ili na transpozonomima, tako da se mogu lakše prenositi u populaciji bakterija iste ili različitih vrsta. Ovaj tip rezistencije označen je kao "MLS-rezistencija", pošto su bakterije koje nose ovaj gen rezistentne i na ostale antibiotike iz grupe makrolida, linkozamida i na streptogramin B (100, 116). Poredjenjem specifičnosti metilaza odgovornih za MLS-rezistenciju izolovanih iz različitih bakterija došlo se do zaključka da se metilacija odvija na homolognim mestima, odnosno u jako konzervativnom regionu 23S rRNK za koji se smatra da učestvuje u organizaciji peptidil - transferaznog centra ribozoma (101, 117).

Iz tabele 3. se može videti da pored izmenjenih proteina ribozoma za rezistenciju mogu biti odgovorne i modifikacije u ribozomskoj RNK. Međutim, pored metilacija (eritromicin, tiostrepton) i submetilacije (kazugamicin) u poslednje vreme su izolovani i mutanti rezistentni na

antibiotike koji imaju izmenjenu primarnu strukturu 16S rRNK (spektinomycin streptomycin) ili 23S rRNK (eritromycin eritromycin + hloramfenikol)(tabela 3.). Direktnom selekcijom za rezistenciju nije bilo moguće izolovati ovakve mutante pošto bakterije u svom hromozomu imaju više operona odgovornih za sintezu ribozomskih RNK (*E.coli* ima sedam takvih operona - 118). Prema tome, klasičnom mutagenozom i selekcijom za rezistenciju nije moguće dobiti mutante sa izmenjenom ribozomskom RNK pošto bi isti mutacioni događaj morao da se desi u nekoliko gena koji kodiraju sintezu istog produkta. Jedini takav primer koji nažalost nije analiziran do detalja, je mutant *Micobacterium smegmatis* dobijen kao klinički izolat i koji je rezistentan na peptidni antibiotik viomicin, kod koga je pokazano da do rezistencije može da dovede promena ili u 16S rRNK ili u 23S rRNK (119). Medjutim, problem mutageneze gena za ribozomske RNK može da se prevaziđe ako se radi sa kloniranim genima na plazmidu sa velikim brojem kopija. Na ovaj način se povećava učestalost izmenjenih rRNK u ribozomima. Uspešni primeri ovakvog pristupa su mutanti rezistentni na spektinomycin, streptomycin, eritromycin i eritromycin i hloramfenikol (tabela 3.). Svi ovi primeri ukazuju na to da je ribozomska RNK primarni target za neke antibiotike i da prema tome ribozomska RNK nije samo strukturni deo ribozoma već da ima i fundamentalnu ulogu u funkciji ribozoma (84-120).

2.2. Redukovana fiziološka važnost targeta

Ovaj mehanizam zapravo objašnjava delimičnu "urođjenu" rezistenciju nekih bakterija na antibiotike. Tako, ako se analizira rezistencija na β -laktamske antibiotike medju klinički važnim bakterijama, zapaža se da je jedan broj tih bakterija delimično rezistentan na ove antibiotike. Ova delimična rezistentnost je kompleksan biohemijski mehanizam, ali sigurno je da je jedan od elemenata koji doprinosi rezistenciji i nedostupnost targeta (enzima odgovornih za sintezu peptidoglikana) za delovanje β -laktama, specijalno u Gram - negativnih bakterija, usled prisustva spoljne membrane koja je nepermeabilna za veći broj ovih antibiotika. Osim toga Gram - negativne bakterije poseduju i mnogo tanji sloj peptidoglikana nego Gram - pozitivne

bakterije, što ukazuje na manju fiziološku ulogu peptidoglikana u održavanju osmotskog pritiska kod ovih bakterija. Peptidoglikanski kompleks čini 10% ćelijskog zida Gram - negativnih bakterija, dok kod Gram - pozitivnih čini 50% a ponekad i do 90%, što je i razumljivo pošto je kod ovih bakterija osmotski pritisak 3 - 5 puta veći. Gram - pozitivne bakterije skoro sasvim ovise od prisustva peptidoglikanskog omotača za održavanje osmotskog pritiska i zbog toga su one znatno senzitivnije na β -laktamske antibiotike (121).

2.3. Sprečavanje dolaska u kontakt antibiotika i targeta

Ovaj tip rezistencije se objašnjava uspostavljanjem barijere na nivou transporta antibiotika u ćeliju. Primer ovakve rezistencije je rezistencija na tetraciklin. Prisustvo plazmida u bakteriji *E.coli* koji determiniše rezistenciju na tetraciklin omogućava indukovanu sintezu tri proteina koji se integrišu u citoplazmatičnu membranu i sprečavaju transport tetraciklina u ćeliju. Način kako ovi proteini sprečavaju transport tetraciklina nije poznat, međutim pošto tetraciklin rezistentne ćelije ipak sadrže određenu količinu antibiotika (antibiotik je u ovom slučaju transportovan u ćeliju različitim mehanizmom od onoga koji se koristi kod senzitivnih ćelija), izgleda da je u mehanizam rezistencije pored smanjenog ulaska u ćeliju uključena i mogućnost izbacivanja antibiotika iz ćelije (122,123). Interesantno je još napomenuti da su geni odgovorni za rezistenciju klonirani iz bakterije proizvođača oksitetraciklina (*Streptomyces rimosus*) u senzitivnan soj *Streptomyces griseus*. Okarakterisana su dva gena *tetA* i *tetB*, pri čemu je produkt *tetA* gena povezan sa rezistencijom na nivou translacionog aparata (ribozomi nisu direktno odgovorni za ovu rezistenciju već se radi o promeni nekog solubilnog faktora), dok je produkt *tetB* gena odgovoran za redukovanu akumulaciju tetraciklina (124).

Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike, takodje može nastati sprečavanjem transporta antibiotika u ćeliju. Aminoglikozidi se transportuju u ćeliju procesom ovisnim o energiji i zato inhibicija oksidativne fosforilacije vodi sprečavanju transporta aminoglikozida

odnosno rezistenciji na ove antibiotike. Mutanti defektni u oksidativnoj fosforilaciji ne transportuju aminoglikozide u ćeliju. Zato su aminoglikozidi manje efikasni u anaerobnim uslovima i protiv anaerobnih bakterija. Pošto aerobni uslovi omogućavaju transport elektrona u respiratornom lancu, što je neophodno za transport aminoglikozida u ćeliju, bilo koja mutacija koja narušava ovaj proces, a nije letalna za bakteriju dovodi do opšte rezistencije na aminoglikozide (88, 121). Ovakve mutacije su detektovane u laboratorijskim uslovima kao i u kliničkim izolatima. Pored toga, promene na nivou transporta aminoglikozida su zapažene i u bakterijama koje ih proizvode. To je slučaj sa bakterijama koje proizvode streptomycin, *Streptomyces griseus* i *Streptomyces bikiniensis*. Ove bakterije pored toga što imaju enzim koji inaktivira intracelularni streptomycin, tokom proizvodnje streptomicina imaju smanjenu permeabilnost ćelijske membrane za ekstracelularni antibiotik (125, 126).

2.3. Enzimska inaktivacija antibiotika

Ovo je najčešći mehanizam rezistencije na antibiotike zapažen u kliničkim izolatima bakterija. Mehanizam rezistencije ovog tipa sastoji se u sposobnosti bakterija da vrše inaktivaciju antibiotika degradacijom ili modifikacijom. Oba ova procesa moguća su usled prisustva odgovarajućih enzima u rezistentnim bakterijama. Geni za ove enzime su najčešće locirani na plazmidima (123).

Primer za ovaj tip rezistencije je rezistencija na β -laktamske antibiotike koja nastaje kao posledica prisustva enzima β -laktamaze. Ovaj enzim katalizuje hidrolizu β -laktamskog prstena i dovodi do degradacije ovih antibiotika. β -laktamaze mogu biti veoma specifične za supstrat delujući samo na peniciline (penicilinaza) ili cefalosporine (cefalosporinaza), mada veliki broj β -laktamaza dobro hidrolizuje obe klase β -laktamskih antibiotika. Kod većine Gram - pozitivnih bakterija ovi enzimi su inducibilni i skoro uvek ekstracelularni, dok kod Gram - negativnih bakterija mogu biti i inducibilni i konstitutivni i skoro uvek su vezani za ćeliju u periplazmatičnom prostoru (121).

S druge strane, rezistencija na hloramfenikol se zasniva na modifikaciji antibiotika usled prisustva enzima hloramfenikol acetiltransferaze. Ovaj enzim je prilično specifičan i ne može inaktivirati bilo koji drugi antibiotik. Izolovan je iz velikog broja rezistentnih bakterija, kako Gram - pozitivnih tako i Gram - negativnih i nadjeno je da sve hloramfenikol acetiltransferaze imaju sličnu sekvencu aminokiselina i da se mogu svrstati u svega nekoliko klasa (121).

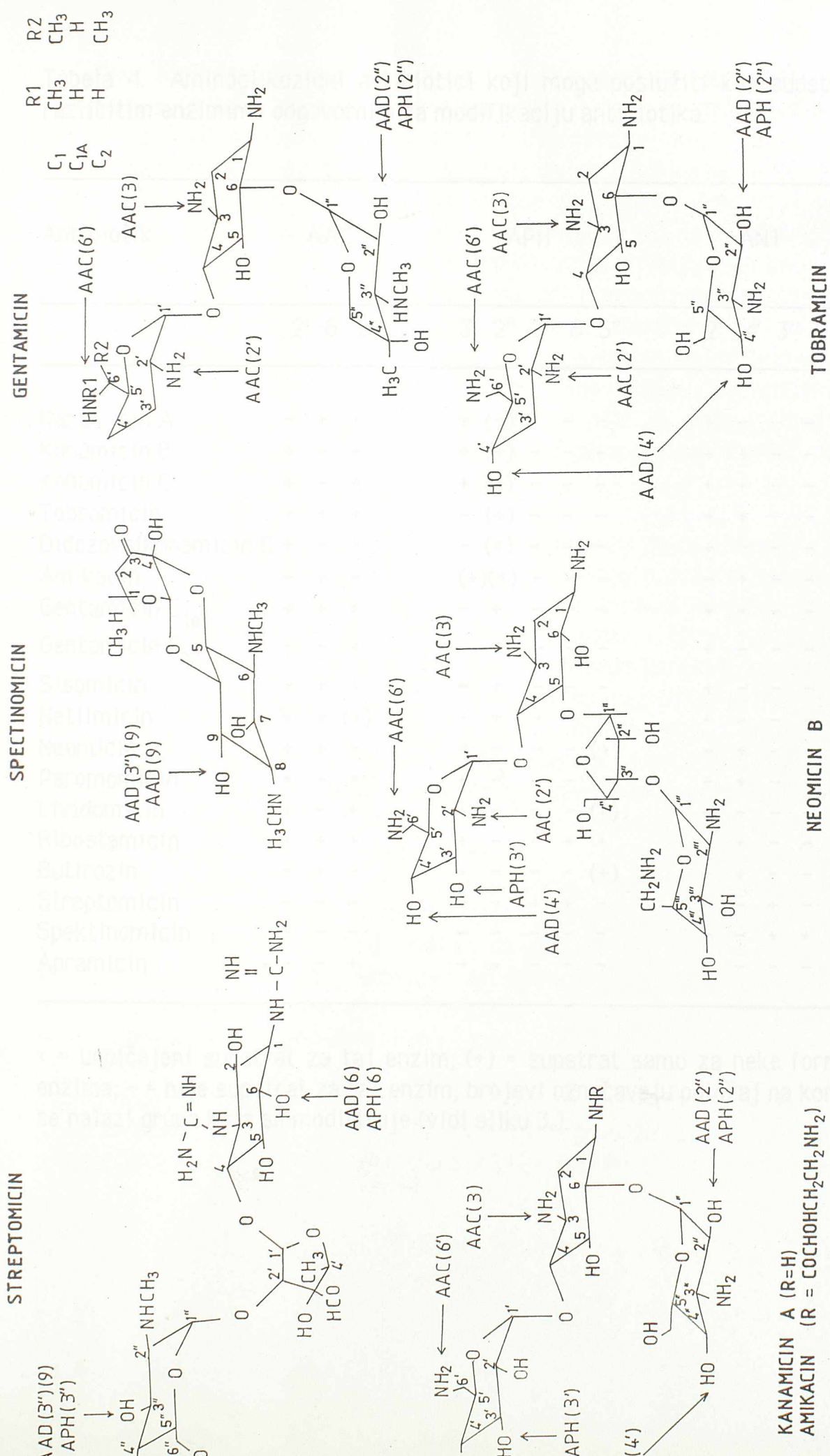
U enzime koji inaktiviraju antibiotik modifikacijom njegove strukture spadaju i enzimi koji omogućavaju rezistenciju bakterija na aminoglikozide (123, 127). Postoje tri kategorije ovih enzima:

1. Aminoglikozid acetiltransferaze (AAC) koje koriste acetyl - CoA kao donor acetilne grupe. Inaktivacija aminoglikozida je posledica N - acetilacije aminoglikozida.

2. Aminoglikozid fosfotransferaze (APH) su enzimi koji koriste ATP kao donor fosforne grupe u O - fosforilaciji aminoglikozida.

3. Aminoglikozid nukleotidil ili adeniltransferaze (ANT) koje koriste takodje ATP, ali kao donor adenilnog ostatka u procesu O - adenilacije aminoglikozida.

Na slici 3. prikazane su strukture nekih aminoglikozida i označena su mesta koja mogu biti modifikovana, a u tabeli 4. sumirani su podaci o acetilaciji, fosforilaciji i adenilaciji različitih aminoglikozidnih antibiotika.



Slika 3. Strukture nekih aminoglikozida i mesta koja mogu biti modifikovana različitim enzimima.

Tabela 4. Aminoglikozidni antibiotici koji mogu poslužiti kao supstrat različitim enzimima odgovornim za modifikaciju antibiotika.

Antibiotik	AAC			APH					ANT			
	2'	6'	3	3'	2"	3"	6	5"	2"	4'	3"	9
Kanamycin A	-	+	+	+	(+)	-	-	-	+	+	-	-
Kanamycin B	+	+	+	+	(+)	-	-	-	+	+	-	-
Kanamycin C	+	-	+	+	(+)	-	-	-	+	+	-	-
Tobramicin	+	+	+	-	(+)	-	-	-	+	+	-	-
Didezoksikanamicin C	+	+	+	-	(+)	-	-	-	+	-	-	-
Amikacin	-	+	-	(+)(+)	-	-	-	-	-	+	-	-
Gentamicin C _{1a}	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Gentamicin C ₁	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sisomicin	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Netilmicin	+	+	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Neomicin	+	+	+	+	-	-	-	(+)	-	+	-	-
Paromomicin	+	-	+	+	-	-	-	(+)	-	+	-	-
Lividomicin	+	-	+	+	-	-	-	(+)	-	+	-	-
Ribostamicin	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Butirozin	+	+	-	+	-	-	-	(+)	-	+	-	-
Streptomycin	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Spektinomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Apramicin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = uobičajeni supstrat za taj enzim; (+) = supstrat samo za neke forme enzima; - = nije supstrat za taj enzim; brojevi označavaju položaj na kome se nalazi grupa koja se modifikuje (vidi sliku 3.).

Geni odgovorni za sintezu ovih enzima (označeni su kao R-faktori - "resistance factor") locirani su na plazmidima i mogu se naći u velikom broju različitih rezistentnih bakterija. Slični enzimi koji inaktiviraju antibiotike nalaze se u bakterijama koje proizvode antibiotike (126, 128). Postavlja se pitanje da li R-faktori vode poreklo od bakterija koje proizvode antibiotike. Takvo poreklo R-faktora je sasvim moguće. Medjutim, postoje enzimi odgovorni za rezistenciju u proizvođačima koji nisu zastupljeni među kliničkim izolatima, ali i obrnuto neki enzimi koji modifikuju antibiotike nadjeni su u kliničkim izolatima, ali ne i u bakterijama proizvođačima antibiotika. Takav je slučaj sa enzimima koji vrše O-adenilaciju aminoglikozida. Naime, ANT enzimi su nadjeni u kliničkim izolatima, ali ni jedan takav enzim nije do sada izolovan u bakterijama proizvođačima (129). Prema tome, pitanje odakle potiču ANT enzimi ostaje nerazjašnjeno.

Enzimi koji modifikuju antibiotike odgovorni su za rezistenciju kod kliničkih izolata. Da li ovi enzimi imaju istu ulogu u bakterijama koje proizvode antibiotike? Bakterije koje proizvode antibiotike često imaju multipne mehanizme rezistencije na antibiotike. Tako na primer, *Streptomyces tenebrarius*, proizvođač nebramicinskog kompleksa, uključujući i kanamicin B i tobramicin, pored rezistencije na nivou ribozoma, ima i dva enzima koji inaktiviraju antibiotike N-acetiltransferazu [AAC(6'')] i O-fosfotransferazu [APH(2'')] (130, 131). Slično, proizvođač kanamicina *Streptomyces kanamyceticus* ima ribozome rezistentne na kanamicin, ali i enzim [AAC(6'')] (132). Za razliku od *S.tenebrarius* i *S.kanamyceticus*, proizvođač neomicina *Streptomyces fradiae* ima senzitivne ribozome. Medjutim, ovaj soj ima dva enzima koji modifikuju aminoglikozide - O-fosfotransferazu [APH(3')] i N-acetiltransferazu [AAC(3)]. Ukoliko se geni za ove enzime kloniraju nezavisno jedan od drugog dobijaju se samo transformanti sa niskim nivoom rezistencije na neomicin. Visok nivo rezistencije se dobija samo ukoliko su oba enzima prisutna (126).

S druge strane bakterije koje proizvode streptomicin, *S.griseus* i *S.bikiniensis*, imaju samo jedan enzim odgovoran za modifikaciju streptomicina. To je O-fosfotransferaza [APH(6)]. Proučavanje biosinteze

streptomocina dovelo je do interesantnog modela kako se bakterije štite od toksičnih metabolita. Naime, streptomocin se sintetiše počev od mioinozitola, preko streptidina i izgleda da su svi kasniji intermedijeri u biosintetskom putu fosforilisani i kao takvi biološki inertni. Finalna reakcija u biosintezi streptomocina je njegova defosforilacija tokom transporta kroz membranu, tako da se izvan ćelije nalazi samo aktivna forma antibiotika. Ukoliko dolazi do ulaska aktivne forme streptomocina u ćeliju fosfotransferaza može da inaktivira antibiotik i tako zaštititi ćeliju od njegovog dejstva.

Prema tome, enzimi koji vrše inaktivaciju antibiotika imaju ulogu u mehanizmu rezistencije, ali najverovatnije imaju ulogu i u biosintezi antibiotika, a možda i u regulaciji njegove sinteze. Geni koji su odgovorni za rezistenciju u bakterijama koje proizvode antibiotike najčešće su povezani sa genima uključenim u biosintezu antibiotika. Ova činjenica pruža mogućnosti kako u povećanju proizvodnje već poznatih antibiotika, tako i u konstrukciji novih hibridnih antibiotika. Naime, ukoliko se geni odgovorni za rezistenciju kloniraju na plazmidima sa velikim brojem kopija i ako se bakterije koje proizvode antibiotike transformišu takvim plazmidima dolazi ne samo do povećanja rezistentnosti već i do povećanja proizvodnje antibiotika (133). Povećana proizvodnja antibiotika može biti posledica uklanjanja limitirajućeg faktora, odnosno povećanja rezistentnosti, međutim ovakvi eksperimenti ukazuju i na mogućnost učešća proizvoda gena odgovornih za rezistenciju u regulaciji biosintetskih gena.

S druge strane geni odgovorni za rezistenciju na antibiotike mogu biti korišćeni kao probe za izolovanje biosintetskih gena. Kloniranjem gena odgovornih za biosintezu antibiotika omogućena je detaljna analiza biosinteze antibiotika. Tako je na primer kloniran ceo set gena odgovornih za sintezu antibiotika aktinorodina i postignuta je njihova ekspresija ne samo u mutantu koji više ne proizvodi ovaj antibiotik, nego i u heterolognom domaćinu (134). Takodje, biosinteza makrolidnih antibiotika je u velikoj meri razjašnjena zahvaljujući kloniranju gena koji učestvuju u biosintetskom putu ovih antibiotika (135, 136). Pored toga, kombinovanjem gena koji učestvuju u biosintezi srodnih ili različitih antibiotika moguće

je ostvariti sintezu novih, hibridnih antibiotika (137, 138).

Očigledno je da izučavanja u oblasti antibiotika nisu i ne mogu biti završena. Postoji još mnogo nerazjašnjenih pitanja, a pojava rezistentnih bakterija medju kliničkim izolatima neprekidno nameće nova pitanja i nove probleme koje treba rešavati. U cilju što efikasnije borbe protiv patogenih mikroorganizama neophodno je stalno traziti nove i efikasnije antibiotike. Takav posao zahteva dobro poznavanje mehanizma dejstva antibiotika, njihovu biosintezu, a takodje i poznavanje mehanizama rezistencije na antibiotike.

Cilj ovog rada je izučavanje mehanizma rezistencije u bakterijama koje proizvode aminoglikozidne antibiotike.

1. Sojevi bakterije

Sojevi rade *Mitromonospira* koji su korišćeni u ovom radu prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Sojevi *Mitromonospira*

soj		antibiotik koji proizvodi
<i>Mitromonospira</i>	DSMZ 126	nije proizvođač
<i>M. flavus</i>	NRRL 3800	vardamicin
<i>M. luteus</i>	ATCC 27500	sisomicin
<i>M. luteorubra</i>	NRRL 5726	G-418
<i>M. sagamiensis</i>	ATCC 21949	asgamicin
<i>ssp. non-reducans</i>		
<i>M. zionensis</i>	NRRL 5466	D-52

Pored ovih sojeva korišćeni su i sojevi *Escherichia coli* koji nose plazmide pWP371, pACYC177 i pR178 (dobijeni od W. Piepersberga).

MATERIJAL I METODE

1. Sojevi bakterija

Sojevi roda *Micromonospora* koji su korišćeni u ovom radu prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. Sojevi mikromonospora

soj		antibiotik koji proizvodi
<i>M.melanosporea</i>	DSM43126	nije proizvođač
<i>M.grisea</i>	NRRL3800	verdamicin
<i>M.inyoensis</i>	ATCC27600	sisomicin
<i>M.rhodorangea</i>	NRRL5326	G-418
<i>M.sagamiensis</i>	ATCC21949	sagamicin
ssp. <i>non-reducans</i>		
<i>M.zionensis</i>	NRRL5466	G-52

Pored ovih sojeva korišćeni su i sojevi *Escherichia coli* koji nose plazmide pWP871, pACYC177 i pMY18 (dobijeni od W.Piepersberga).

Za detekciju produkcije antibiotika korišćen je soj *Bacillus subtilis* iz laboratorijske kolekcije Lehrstúhl für Mikrobiologie, Universität München.

2. Medijumi

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

Za rast *E.coli* sojeva i *B.subtilis* korišćen je LB bogati medijum (ekstrakt kvasca 5g, tripton 10g, NaCl 5g na 1l destilovane vode).

3. Test proizvodnje antibiotika

Proizvodnja antibiotika u sojevima mikromonospora je testirana na sledeći način. Kulture mikromonospora su centrifugirane i supernatant je nanošen u udubljenja u agaru u kome se nalaze spore soja *B.subtilis* koji je senzitiv na aminoglikozidne antibiotike. Petri šolje su inkubirane preko noći na 37°C. Ukoliko kultura proizvodi antibiotik, oko tog udubljenja pojaviće se zona inhibicije rasta *B.subtilis*.

4. Odredjivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Kulture su sterilnom ezom nanošene na podlogu za rast mikromonospora, koja je sadržala različite koncentracije antibiotika. Ovakve podloge su inkubirane na 30°C i praćen je rast u periodu od 5 - 10 dana.

5. Pripremanje ribozoma, ribozomskih subjedinica i S100 frakcije

Ćelije mikromonospora u logaritamskoj fazi rasta se sakupljaju centrifugiranjem i operu se dva puta, prvo puferom I (10mM TRIS/HCl pH7.5, 10mM Mg-acetat, 1M KCl, 5mM Mg-Titriplex, 6mM β -merkaptotanol), a zatim puferom II (10mM TRIS/HCl pH7.5, 10mM Mg-acetat, 50mM KCl, 5mM Mg-Titriplex, 6mM β -merkaptotanol). Ćelije se resuspenduju u puferu II (oko 10g celija u 15ml pufera), doda se DNaza I (5 μ g/ml) i ćelije se dezintegrišu u "French press" na 10000 lb/in². Ova suspenzija se centrifugira prvo 10 min na 12000 rpm (rotor SS34), a zatim 30 min na 15000 rpm (SS34). Supernatant je S30 frakcija. Zatim se S30 frakcija centrifugira kroz 30% saharozu 3 časa na 50000 rpm u rotoru Ti55.2, pri čemu se istalože ribozomi. Ribozomi se resuspenduju u TMNSH puferu (10mM TRIS/HCl pH7.4, 10mM Mg-acetat, 30mM NH₄Cl, 6mM β -merkaptotanol). Ovako pripremljeni ribozomi se čuvaju zamrznuti na -70°C.

Ribozomske subjedinice su izolovane iz ćelija koje su nakon dostizanja logaritamske faze rasta bile inkubirane 15 min na 10°C. Frakcija S30 je izolovana kao što je već opisano u pripremi 70S ribozoma, s tom razlikom što je pufer II zamenjen puferom za disocijaciju (20mM TRIS/HCl pH7.5, 1mM Mg-acetat, 150mM KCl, 6mM β -merkaptotanol). Frakcija S30 se zatim dijalizuje preko noći u puferu za disocijaciju. Posle dijalize odredi se prinos preko optičke gustine RNK. Na pripremljene saharozne gradijente (10-30%) se nanosi oko 150 optičkih jedinica A₂₆₀ i gradijenti se centrifugiraju 80 min na 44000 rpm u VTi50 rotoru. Nakon toga gradijenti se frakcionišu, pa se sakupe one frakcije koje sadrže subjedinice. Subjedinice se zatim sakupe centrifugiranjem 6 sati na 50000 rpm u Ti55.2 rotoru. Talog koji sadrži subjedinice se rastvori u TMNSH puferu i čuva se zamrznut na -70°C.

S100 frakcija je pripremana tako što je S30 frakcija centrifugirana 3 sata na 35000 rpm u rotoru Ti50. Frakcija S100 se zatim dijalizuje u TMNSH puferu. U slučaju kada je S100 frakcija bila izolovana iz senzitivnog soja *M.melanosporea*, za *in vitro* sintezu polifenilalanina, TRIS je u puferu bio zamenjen Hepes-om. Ovim je postignuto značajno povećanje inkorporacije fenilalanina (12).

Izolovanje ribozoma, subjedinica i S100 frakcije je vršeno na 4°C.

6. Analiza enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike

Prisustvo enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike u S100 frakcijama mikromonospora (proizvodjača antibiotika) je testirano metodom koja je data u radu J.Davies (13). Reakciona smeša se sastoji od: 1. 10 μ l univerzalnog pufera pH7.8 (0.25M TRIS, 50mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.1M NH₄Cl);

2. 10 μ l radioaktivno obeleženog kofaktora ([¹⁴C]-acetil-koenzim A spec.aktiv. 25 μ Ci/ μ Mol, [³²P]-ATP spec.aktiv. 20 μ Ci/ μ Mol, ili [¹⁴C]-ATP spec.aktiv. 10 μ Ci/ μ Mol);

3. 10 μ l S100 frakcije;

4. 5 μ l rastvora antibiotika (1mg/ml).

Uporedo se pripremaju i kontrolne reakcione smeše koje ne sadrže antibiotik ili enzim. Reakciona smeša se inkubira 20 min na 30°C, a zatim se 20 μ l ove smeše prebaci na fosfocelulozni papir. Papir se suši na vazduhu oko 5 min, a zatim se ubaci u vodu na 80°C 2-3 min. Nakon toga fosfocelulozni papir se ispiri 4-5 puta hladnom vodom. Papir se suši pod infracrvenom lampom i stavlja se u posude u koje se dodaje 10ml scintilacione tečnosti (0.5% PPO - 2,5-difeniloksazol u toluenu). Radioaktivnost se meri u scintilacionom brojaču (Spectral LKB).

7. Sistem za *in vitro* sintezu proteina

Reakciona smeša za sintezu polifenilalanina ili poliizoleucina na poli-U kao arteficijalnoj iRNK, u 250 μ l sadrži: 70 μ l Mix II, 30 μ l L-[¹⁴C]-fenilalanina ili L-[¹⁴C]-izoleucina (spec.aktiv. 10 μ Ci/ μ Mol, 0.2mM), 20 μ l poli-U (4mg/ml), 10 μ l S100 frakcije (oko 150 μ g proteina), 50 μ l antibiotika rastvorenog u vodi, 6 optičkih jedinica na 260nm (OD₂₆₀ jedinica) 70S ribozoma ili 2 OD₂₆₀ jedinice 30S i 3 OD₂₆₀ jedinice 50S subjedinica. Mix II je pripreman kao što su opisali Rosset i Gorini (14) sa tom razlikom što je TRIS zamenjen Hepes-om, a sastoji se od 625 μ l Mix I (1ml 2.08M Hepes/KOH pH7.4, 0.4ml 10mM GTP, 0.4ml 100mM ATP, 1.46ml

2M NH_4Cl , 0.24 ml 2M Mg-acetat i destilovana voda do 4ml), 500 μl 75mM fosfoenolpiruvata, 10 μl fosfoenolpiruvat kinaze (10mg/ml), 375 μl β -merkaptoetanol (dil. 10^{-2}) i 250 μl tRNK (10mg/ml). Reakcione smeše se inkubiraju 2 sata na 30°C. Reakcija se zaustavlja dodavanjem 1ml 10% trihlorsirćetne kiseline (TCA) i inkubacijom 20min na 95°C. Nakon toga smese se filtriraju i filtri se ispiraju 5% TCA i 70% etanolom, suše se i stavljaju u 10ml 0.5% PPO u toluenu. Radioaktivnost se određuje u scintilacionom brojaču.

8. Elektroforeza proteina ribozoma

Dvodimenzionalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu je radjena po metodi Geyl et al.(15). Prva dimenzija elektroforeze se vrši u cevčicama dimenzija 0.6x11cm. Gel za prvu dimenziju se sastoji od 4g akrilamida, 0.1g metilenbisakrilamida, 1.19g BisTris-a, 36g uree, 0.2g EDTA u 100ml destilovane vode (pH5.0). Za polimerizaciju se dodaje 35 μl TEMED i 100 μl 7% amonijumpersulfata na 10ml gela. Gornji i donji pufer za elektroforezu se pripremaju kao 10 puta koncentrovani rastvori. Gornji pufer sadrži BisTris (20.9g) i sirćetnu kiselinu (45ml) na 1l destilovane vode. pH ovog rastvora je 3.8, a nakon razblazivanja je 4.0. Donji pufer sadrži K-acetat (175.7g) i sirćetnu kiselinu (49ml) na 1l destilovane vode. pH rastvora je 5.3, a nakon razblaživanja je 5.0.

Ribozomski proteini se ekstrahuju sirćetnom kiselinom (16) i rastvaraju se u puferu za uzorak (urea 36g, 1M ditiotreitol 1ml, 10 puta koncentrovani gornji pufer 10ml, nekoliko kapi baznog fuksina - 0.5mg/ml i voda do 100ml).

Elektroforeza se vrši na 4°C, pri jačini struje od 1mA po cevčici u prvih pola sata, a zatim pri jačini struje od 4mA po cevčici, dok boja ne dodje do dna (oko 7 sati).

Elektroforeza u drugoj dimenziji se vrši na poliakrilamidnom gelu dimenzija 10x10x0.3cm. Osnovni rastvor za drugu dimenziju sadrži 186g akrilamida, 4.8g metilenbisakrilamida, 372g uree, 54ml sirćetne kiseline, 10ml 5N KOH na jedan litar rastvora (pH4.5). Polimerizacija je vršena sa TEMED-om (60 μl /10ml gela) i 7% amonijumpersulfatom (400 μl /10ml gela). Pufer za elektroforezu u drugoj dimenziji se sastoji od 14g glicina,

glacijalne sirćetne kiseline do pH4 i destilovane vode do 11. Elektroforeza se vrši na 4°C, pri naponu od 80V. Trajanje elektroforeze je oko 18 sati.

9. *In vivo* metilacija ribozomske RNK

Za *in vivo* obeležavanje ribozomske RNK radioaktivitetom korišćena je modifikacija procedure autora Lai i Weisblum (17). Mikromonospore se zaseju u 50ml medijuma za rast mikromonospora. Kulture se inkubiraju preko noći i zatim se dodaje 0.1 μ Ci/ml ¹⁴C-metionina (51.4mCi/mMol). Nastavlja se inkubacija kultura, a u odredjenim vremenskim intervalima se uzimaju uzorci za merenje radioaktiviteta u ćelijama i u medijumu. Kada se u ćelijama akumulira dovoljno radioaktiviteta, kultura se stavi na led da bi se procesi sveli na minimum, a zatim se ćelije sakupe centrifugiranjem i operu se u FT puferu (10mM TRIS/HCl pH 7.75, 15mM mg-acetat). Dezintegracija ćelija se vrši po metodi koju su opisali Ron i saradnici (18). Ćelije se resuspenduju u 1ml FT pufera, doda se 1mg lizozima i ova suspenzija se naizmenicno zaledjuje u tečnom azotu i otapa se na 37°C do lize ćelija. Ribozomi se izoluju kao što je vec opisano.

10. Izolovanje ribozomske RNK, hidroliza i tankoslojna hromatografija

Ribozomi se razblaže tako da bude 50 optičkih jedinica na 260nm u 1ml TMNSH pufera kome se doda NaCl (1%) i SDS (0.1%). Zatim se doda isti volumen fenola saturisanog vodom i meša se 30 min na 4°C na magnetnoj mešalici. Centrifugira se 10 min u Ependorf centrifugi, a zatim se ukloni vodena faza i ponovi se fenolska ekstrakcija. Nakon toga se vodenoj fazi dodaju dva volumena etanola i inkubira se najmanje 2 sata na -20°C. Ribozomska RNK se sakuplja centrifugiranjem 10 min u Ependorf centrifugi, talog se suši i resuspenduje u 1N HCl.

Kisela hidroliza RNK se vrši 1sat na 95°C. Produkti ove hidrolize su

12. In vitro metilacija ribozonske RNK

purinske baze i pirimidinski nukleotidi.

Hromatografija je radjena na gotovim pločama za hromatografiju - Kieselgel 60 debljine 0.2mm (EM Reagents). Pored uzoraka na ploče su nanošeni i standardi. Hromatografija je radjena uzlaznom metodom, a tečna faza je bila izopropanol : NH_4Cl : voda (85 : 1.3 : 15) (19). Položaj nukleotida je odredjivan pomoću UV svetla, a zatim je hromatogram isecan na trake širine 1cm u kojima je meren radioaktivitet.

11. Hromatografija visoke moći razdvajanja u tečnoj fazi (HPLC)

Identifikacija metilovanih baza u rRNK je radjena i metodom reverzne faze u sistemu hromatografije visoke moći razdvajanja u tečnoj fazi (HPLC - high performance liquid chromatography). Korišćen je LKB-ov sistem za HPLC koji se sastoji od kontrolne jedinice, dve HPLC pumpe, dela za nanošenje uzoraka ("sample injector") i UV monitora. Radjeno je sa kolonom TSK ODS - 120T (4.6x250mm). Uzorci su pripremani isto kao što je opisano za tankoslojnu hromatografiju, sa tom razlikom što su nakon kisele hidrolize liofilizirani a zatim rastvarani u solventu koji je korišćen za hromatografiju. Uzorak zapremine 20 μl nanosi se specijalnim špricem u deo za nanosenje uzoraka. Pre nanošenja uzoraka kolona se ekvilibriše sa 10 zapremina solventa. Solventi su bili 0.2M NaH_2PO_4 , 0.025M tetrabutilamonium hidroksid pH6.0, 10% metanol (protok 0.75 ml/min) ili 0.4M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 3.8, 5% metanol (protok 0.5 ml/min). Sakupljane su frakcije u kojima je merena radioaktivnost.

Svi rastvori koji se koriste za HPLC obavezno se filtriraju preko Sartorius 0.45 μm filtera i degasiraju se.

12. *In vitro* metilacija ribozomske RNK

Za *in vitro* metilaciju ribozomske RNK korišćena je modifikacija ranije opisanih metoda (20, 21). Naime, za inhibiciju RNazne aktivnosti korišćenisu ili KCN ili specifični RNazni inhibitor izolovan iz humane placente. Frakcije mikromonospora S30 ili S100 su korišćene kao izvor metilaze zajedno sa S-adenozil-metioninom (SAM) kao kofaktorom. Reakciona smeša (ukupno 100 μ l) se sastoji od 50mM Hepes/KOH pH7.5, 7.5mM MgCl₂, 37.5mM NH₄Cl, 3mM β -merkaptetoetanol, 20pmol 30S ribosomalne subjedinice *M.melanosporea* (supstrat za metilaciju), S30 ili S100 frakcije soja koji proizvodi aminoglikozide i 2.5 μ Ci S-adenozil-(metil-³H)-metionina (spec. aktiv. 500mCi/mmol). Reakciona smeša se inkubira na 30°C, a u odredjenim vremenskim intervalima uzimaju se uzorci od 20 μ l, koji se zatim precipitiraju sa 5% trihlorsirćetnom kiselinom. Posle 20 min na 0°C, precipitati se sakupljaju na filterima (GFC, Whatman). Filtri se zatim ispiraju sa 20ml 5% trihlorsirćetne kiseline, suše se i radioaktivnost se odredjuje u scintilacionom brojaču.

REZULTATI

U ovom radu su korisćeni sojevi roda *Micromonospora* (Tabela 5.) koji proizvode aminoglikozidne antibiotike (22). To je potvrđeno u testu za proizvodnju antibiotika. Zone inhibicije (1.1-1.6cm u dijametru, zavisno od soja) formirale su se oko udubljenja u agaru u kojima je bio supernatant dobijen centrifugiranjem tečne kulture mikromonospora, sem u slučaju *M.zionensis*. Proizvodnja antibiotika u slučaju *M.zionensis* je mogla biti potvrđena tek kada je kultura ovog soja na čvrstoj podlozi bila prelivena mekim agarom koji sadrži spore *B.subtilis*. Nakon inkubacije na 37°C, oko kolonija *M.zionensis* se mogu videti zone inhibicije rasta *B.subtilis*.

Pored mikromonospora koje proizvode antibiotike, u svim eksperimentima je korišćen i soj *Micromonospora melanosporea*, koji ne proizvodi antibiotike i senzitivn je na njih (23).

1. Minimalne inhibitorne koncentracije

Minimalna inhibitorna koncentracija aminoglikozida za pet sojeva koji proizvode antibiotike i za senzitivn soj *M.melanosporea*, koji ne proizvodi antibiotike, data je u Tabeli 6. Vidi se da su svi sojevi mikromonospora koji proizvode antibiotike visoko rezistentni na antibiotike koji su po strukturi slični njihovim sopstvenim proizvodima (4,6-disupstituisani dezoksistreptamini), a takodje i na higromicin B. S druge strane, ovi sojevi su senzitivni na 4,5-disupstituisane dezoksistreptamine (za lividomicin je nešto povećana minimalna inhibitorna koncentracija) i na streptomycin (osim *M.rhodorangea*). Za razliku od ovih sojeva koji proizvode aminoglikozide, *M.melanosporea* je senzitivna na sve testirane antibiotike.

Tabela 6. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) aminoglikozida za mikromonospore.

ANTIBIOTIK	MIK ($\mu\text{g/ml}$)					
	<i>M.m.</i>	<i>M.g.</i>	<i>M.z.</i>	<i>M.i.</i>	<i>M.s.</i>	<i>M.rh.</i>
<u>4,6-disupstituisani</u>						
<u>dezoksistreptamini:</u>						
amikacin	0.6	>500	>500	200	200	500
gentamicin	2.5	300	>500	>500	>500	>500
G-418	10	>500	>500	>500	>500	>500
netilmicin	40	100	>500	500	>500	>500
sagamicin	1	20	500	500	320	>500
sisomicin	5	500	>500	>500	320	>500
tobramicin	5	200	>500	200	500	300
<u>4,5-disupstituisani</u>						
<u>dezoksistreptamini:</u>						
lividomicin	2.5	20	50	20	20	10
neomicin	1.2	<1	<1	<1	<1	<1
paromomicin	0.6	<1	5	<1	<1	5
<u>drugi:</u>						
higromicin B	5	400	>500	500	500	500
streptomycin	5	0.5	1	0.5	0.5	100

M.m. - *M.melanosporea*; *M.g.* - *M.grisea*; *M.z.* - *M.zionensis*;
M.i. - *M.inyoensis*; *M.s.* - *M.sagamiensis*; *M.rh.* - *M.rhodorangea*

Ovi rezultati ukazuju na veliku sličnost testiranih sojeva mikromonospora sa srodnim sojem *M.purpurea*, koji proizvodi gentamicin (24).

2. Analiza enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike

Poznato je da pojedine bakterije proizvođači antibiotika, poseduju enzime kojima inaktiviraju sopstveni toksični proizvod. Da bi se utvrdilo da li mikromonospore imaju sličan mehanizam odbrane, bilo je potrebno testirati prisustvo ovih enzima i u sojevima mikromonospora. S100 frakcije mikromonospora, proizvođača antibiotika, *M.melanosporea*, kao i sojeva za koje se pouzdano zna da poseduju specifične enzime koji modifikuju aminoglikozide, testirane su na način koji je opisan u pogavlju Materijal i metode. Rezultati ovih analiza su prikazani u Tabeli 7. Kao supstrat za ove enzime korišćeni su aminoglikozidni antibiotici koji su proizvod odgovarajućeg soja mikromonospora, sem u slučaju *M.grisea* i *M.zionensis*, gde su umesto verdamicina i antibiotika G-52 korišćeni strukturno slični antibiotici kanamicin i gentamicin. Kod *M.rhodorangea* je pored enzima specifičnih za antibiotik G-418, testirano i prisustvo fosfo- i nukleotidil transferaza specifičnih za streptomycin, pošto je pokazano da je ovaj soj rezistentan na streptomycin, za razliku od ostalih mikromonospora (Tabela 6.). Medjutim, prisustvo ovih enzima nije dokazano, tako da je najverovatnije neki drugi mehanizam odgovoran za rezistenciju *M.rhodorangea* na streptomycin.

Rezultati prikazani u tabeli 7. ukazuju na to da sojevi mikromonospora nemaju enzime koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike, pošto je količina radioaktiviteta u kompletnom esaju ista kao i u kontrolnim esejima koji su bili pripremani ili bez S100 frakcije (enzima), ili bez antibiotika (supstrata). Jedino je u slučaju *M.melanosporea* povećana aktivnost acetiltransferaze, što je i ranije bilo primećeno (24). Medjutim, analizom produkata ove reakcije je pokazano da acetiltransferaza nije specifična za gentamicin.

Tabela 7. Analiza enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike

Soj	AG	Acetiltransferaze AAC		Fosfotransferaze APH		Adeniltransferaze ANT				
		+AG	-S100 -AG	+AG	-S100 -AG	+AG	-S100 -AG			
<i>M.m.</i>	Gm	15000	300	750	1500	1300	2500	150	70	130
<i>M.g.</i>	Km	300	200	300	-	NT -	-	180	90	140
<i>M.z.</i>	Gm	2000	NT	1800	1500	NT	1700	100	NT	80
<i>M.i.</i>	Sis	600	300	360	1500	1500	1700	100	80	100
<i>M.s.</i>	Sag	2000	300	2300	2500	1000	2700	450	90	240
<i>M.r.</i>	G-418	1000	260	1000	1500	1000	1100	180	40	180
	Sm	-	NT-	-	1000	1600	NT	230	100	NT
pWP871	Gm	46000	NT	1000	-	NT-	-	-	NT-	-
pACYC177	Km	-	NT-	-	34000	1100	1000	-	NT-	-
pMY18	Gm	-	NT-	-	-	NT-	-	15000	NT	90

Objasnjenje uz tabelu 7. *M.m.* - *M.melanosporea*; *M.g.* - *M.grisea*; *M.z.* - *M.zionensis*; *M.i.* - *M.inyoensis*; *M.s.* - *M.sagamiensis*; *M.r.* - *M.rhodorangea*.
 Plazmid pWP871 nosi gene za sintezu acetiltransferaze AAC(3)-III; pACYC1177 - fosfotransferaze APH(3'); pMY18 - adeniltransferaze ANT(2").
 Gm - gentamicin; Km - Kanamicin; Sis - sisomicin; Sag - sagamicin; Sm - streptomycin.
 +AG - kompletan esej; -S100 i -AG - kontrolni esaji koji ne sadrže S100 frakciju ili aminoglikozidni antibiotik. NT - nije testirano.

3. Rezistencija na nivou ribozoma

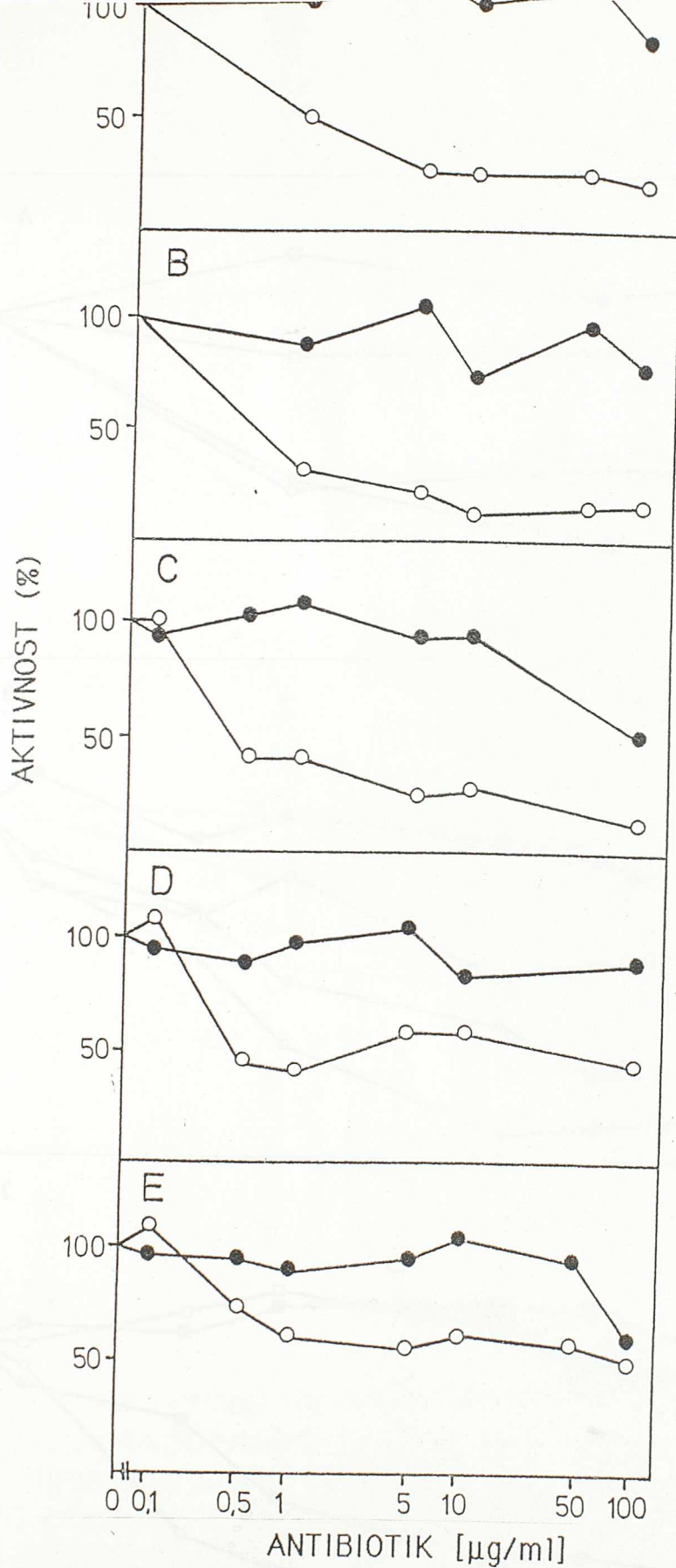
Ribozomi izolovani iz mikromonospora su analizirani u sistemu za *in vitro* sintezu proteina u prisustvu različitih koncentracija aminoglikozidnih antibiotika (slika 4.). Frakcija S100 je bila pripremljena iz senzitivnog soja koji ne proizvodi antibiotike (*M.melanosporea*), tako da ova komponenta u sistemu za *in vitro* sintezu proteina ne može da utiče na *in vitro* rezistenciju. Zadovoljavajuća aktivnost S100 frakcije je bila postignuta tek kada je TRIS pufer bio zamenjen Hepes-om u izolovanju S100 frakcije, kao i u samom eseju (12).

Kao kontrola u svim ovim eksperimentima korišćeni su ribozomi izolovani iz senzitivnog soja (*M.melanosporea*). Na slici 4. se vidi da ovi ribozomi pokazuju inhibiciju inkorporacije fenilalanina koja je proporcionalna povećanju koncentracije antibiotika. S druge strane, ribozomi izolovani iz sojeva mikromonospora koji proizvode antibiotike su rezistentni na njih.

Prethodnim eksperimentima je utvrđeno da su ribozomi odgovorni za rezistenciju mikromonospora na sopstvene toksične proizvode. Odgovor na pitanje koja subjedinica je odgovorna za rezistenciju je dobijen u sledećim eksperimentima. Naime, izolovane su 30S i 50S subjedinice ribozoma iz proizvodjača i iz senzitivnog soja, a zatim su homologno i heterologno rekonstruisani ribozomi (sve četiri moguće kombinacije) testirani u sistemu za *in vitro* sintezu polifenilalanina. Rezultati ovih analiza su pokazali da inkorporacija fenilalanina nije inhibirana antibiotikom ukoliko je u rekonstruisanim ribozomima 30S subjedinica iz rezistentnog soja, odn. iz proizvodjača (slika 5.). S druge strane, bilo je irelevantno da li je velika, 50S subjedinica iz proizvodjača ili iz kontrolnog, senzitivnog soja.



Slika 4. Efekat aminoglikozidnih antibiotika na aktivnost S100 ribozoma u sistemu za sintezu polifenilalanina na pH 6.5. (1) *M. lindsayi* (○) i *M. melanosporea* (□); antibiotik - streptomisin. (2) *M. grisea* (△) i *M. melanosporea* (◇); antibiotik - kanamicin. (3) *M. zingensis* (◇) i *M. melanosporea* (○); antibiotik - streptomisin. (4) *M. sagittiferus* (△) i *M. melanosporea* (□); antibiotik - streptomisin.



Slika 4. Efekat aminoglikozidnih antibiotika na aktivnost 70S ribozoma u *in vitro* sistemu za sintezu polifenilalanina na poli-U.

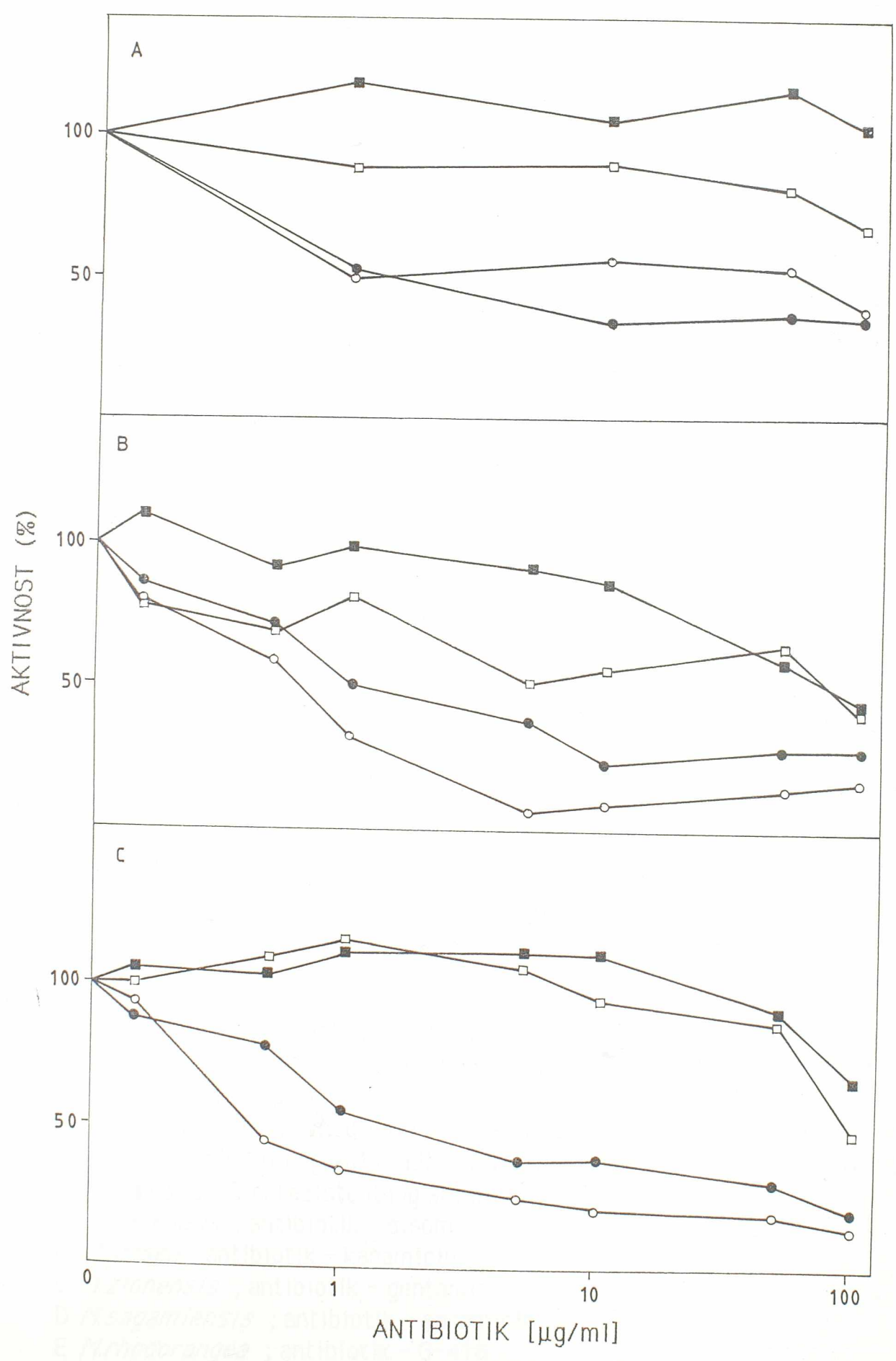
A *M. inyoensis* (●) i *M. melanospora* (○); antibiotik - sisomicin;

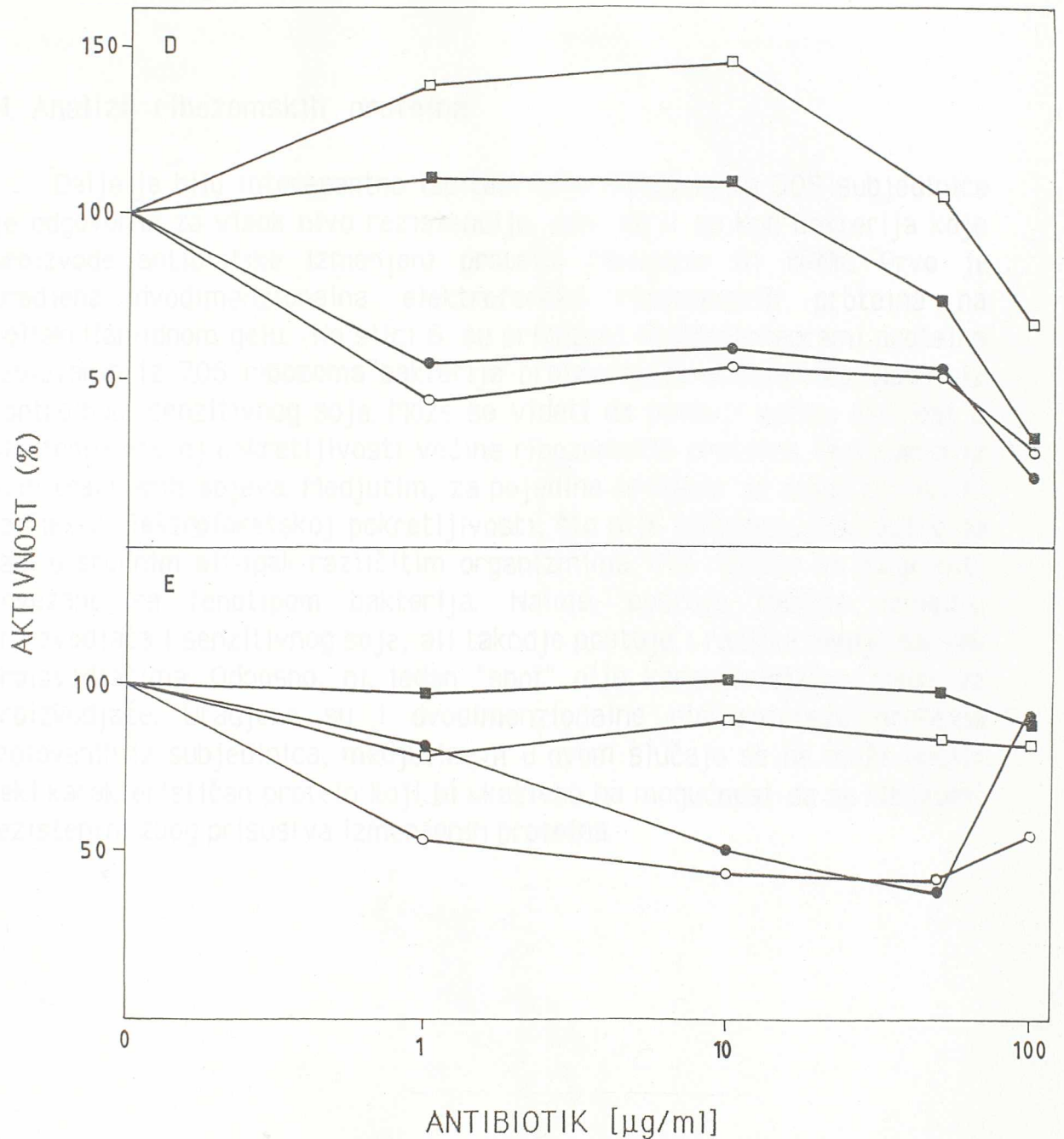
B *M. grisea* (●) i *M. melanospora* (○); antibiotik - kanamicin;

C *M. zionensis* (●) i *M. melanospora* (○); antibiotik - gentamicin;

D *M. sagamiensis* (●) i *M. melanospora* (○); antibiotik - sagamicin;

E *M. rhodorangea* (●) i *M. melanospora* (○); antibiotik - G-418





Slika 5. Efekat aminoglikozidnih antibiotika na aktivnost homologno i heterologno rekonstituisanih 70S ribozoma u *in vitro* sistemu za sintezu polifenilalanina na poli-U.

(○) 30S i 50S senzitivnog soja *M.melanosporea* ; (●) 30S senzitivnog soja i 50S rezistentnog soja; (□) 30S rezistentnog soja i 50S senzitivnog soja; (■) 30S i 50S rezistentnog soja;

A *M.inyoensis* ; antibiotik - sisomicin;

B *M.grisea* ; antibiotik - kanamicin;

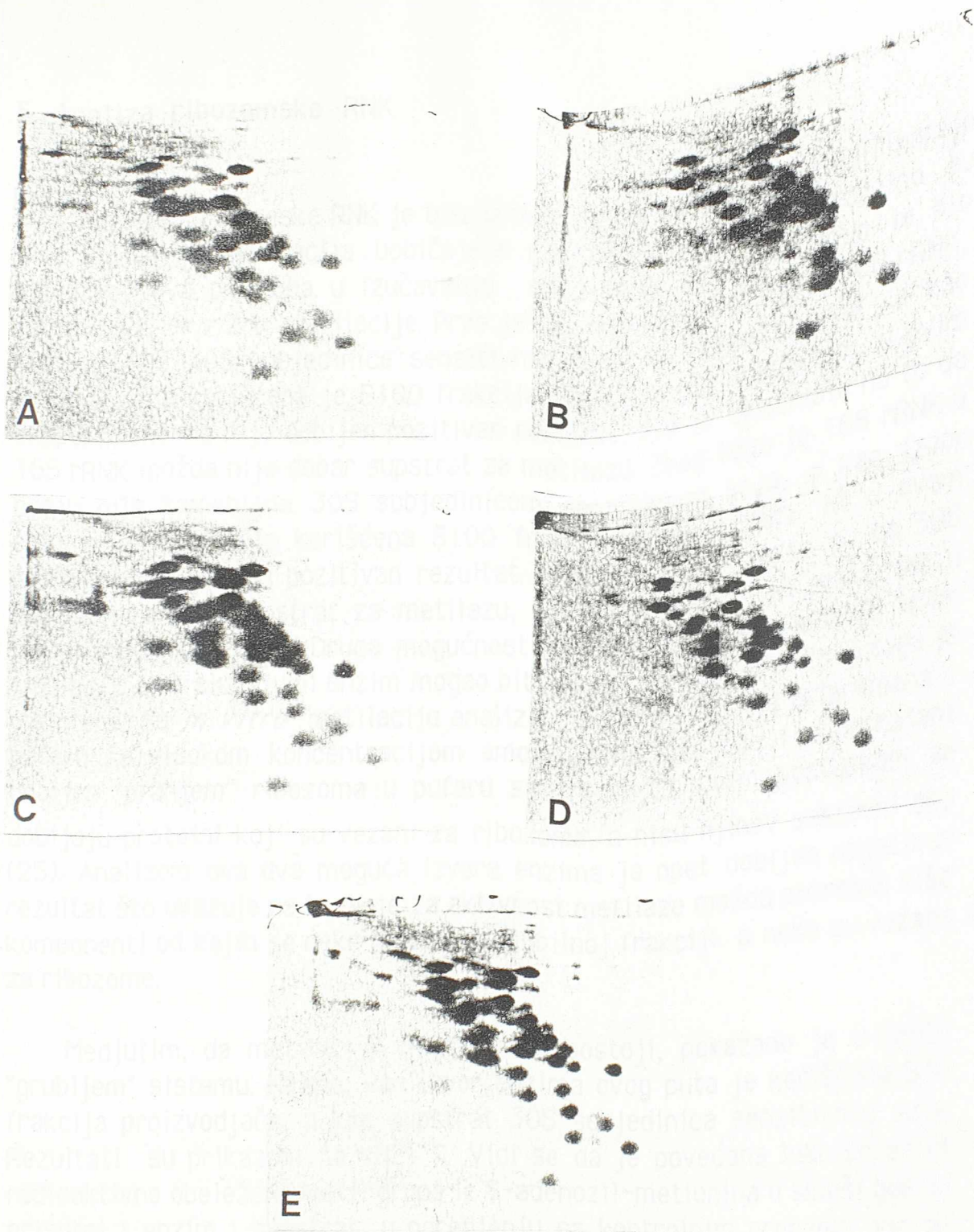
C *M.zionensis* ; antibiotik - gentamicin;

D *M.sagamiensis* ; antibiotik - sagamicin;

E *M.rhodorangea* ; antibiotik - G-418

4. Analiza ribozomskih proteina

Dalje je bilo interesantno ispitati koja komponenta 30S subjedinice je odgovorna za visok nivo rezistencije, odn. da li su kod bakterija koje proizvode antibiotike izmenjeni proteini ribozoma ili rRNK. Prvo je uradjena dvodimenzionalna elektroforeza ribozomskih proteina na poliakrilamidnom gelu. Na slici 6. su prikazani elektroforegrami proteina izolovanih iz 70S ribozoma bakterija proizvodjača antibiotika, kao i iz kontrolnog, senzitivnog soja. Može se videti da postoji velika sličnost u elektroforetskoj pokretljivosti većine ribozomskih proteina izolovanih iz svih testiranih sojeva. Medjutim, za pojedine proteine se mogu primetiti razlike u elektroforetskoj pokretljivosti, što nije iznenadjujuće pošto se radi o srodnim ali ipak različitim organizmima. Ove razlike ne mogu biti povezane sa fenotipom bakterija. Naime, postoje razlike izmedju proizvodjača i senzitivnog soja, ali takodje postoje i razlike medju samim proizvodjačima. Odnosno, ni jedan "spot" nije karakterističan samo za proizvodjače. Uradjene su i dvodimenzionalne elektroforeze proteina izolovanih iz subjedinica, medjutim ni u ovom slučaju se ne može uočiti neki karakterističan protein koji bi ukazivao na mogućnost da su ribozomi rezistentni zbog prisustva izmenjenih proteina.

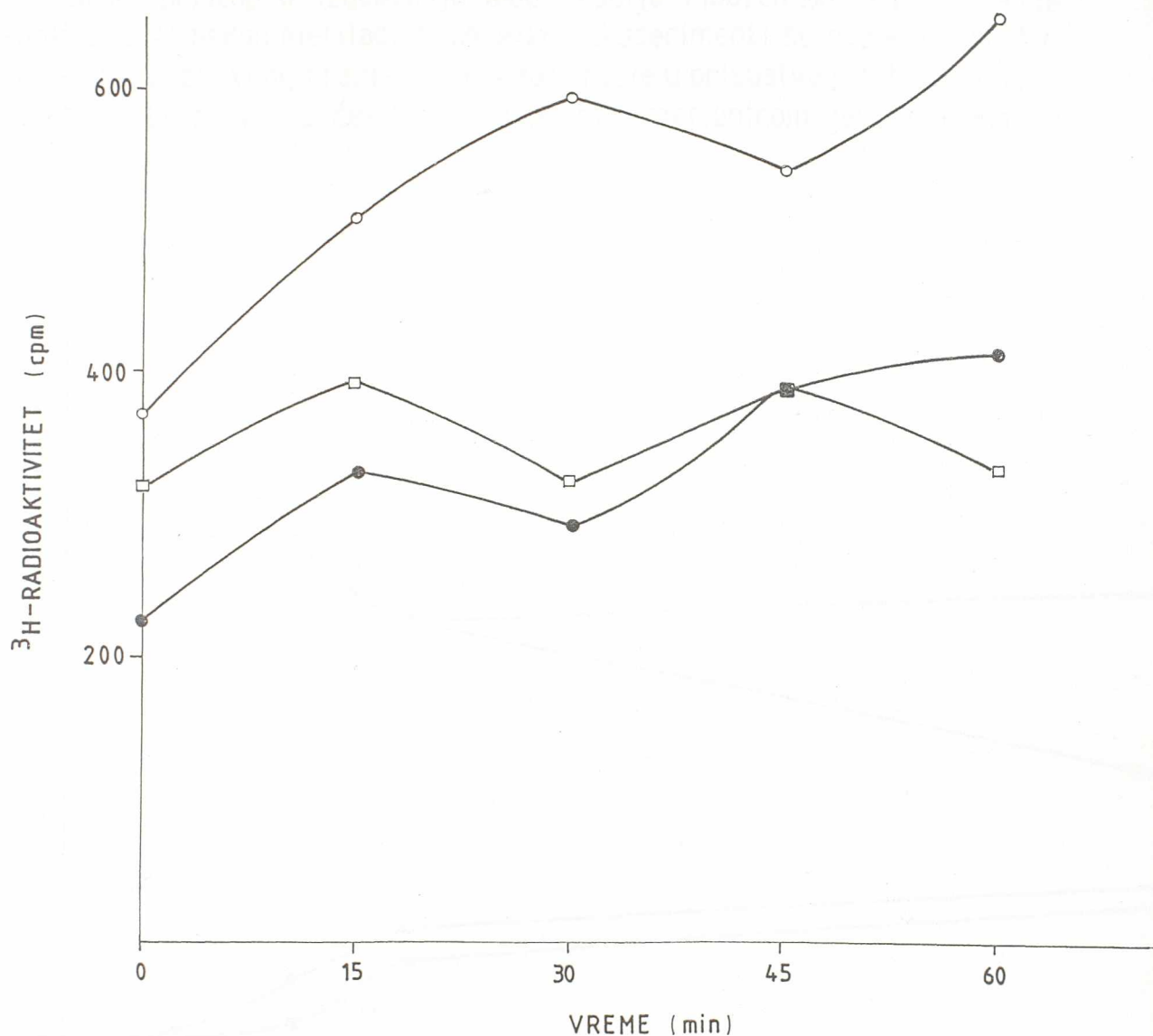


Slika 6. Elektroforegrami ukupnih proteina ribozoma izolovanih iz sojeva:
 A *M.melanosporea* ; B *M.inyoensis* ; C *M.zionensis* ; D
M.sagamiensis ; E *M.rhodorangea* .

5. Analiza ribozomske RNK

Analiza ribozomske RNK je bila usmerena na ispitivanje modifikacije RNK. Pošto je metilacija uobičajena modifikacija rRNK, paralelno su korišćena dva pristupa u izučavanju metilacije. Jedan pristup je bio izučavanje *in vitro* metilacije. Prvo je kao supstrat korišćena 16S rRNK, izolovana iz 30S subjedinice senzitivnog soja *M.melanosporea*, a kao izvor enzima korišćena je S100 frakcija *M.zionensis*. Medjutim, u ovim eksperimentima nije dobijen pozitivan rezultat, što je ukazivalo na to da 16S rRNK možda nije dobar supstrat za metilazu. Zbog toga je 16S rRNK u eseju bila zamenjena 30S subjedinicom senzitivnog soja, a kao izvor enzima je opet bila korišćena S100 frakcija proizvođača. Ni u ovom slučaju nije dobijen pozitivan rezultat. Mogući razlozi za to su da 30S subjedinica nije supstrat za metilazu, već je to neki njen prekursor u formiranju ribozoma. Druga mogućnost je da S100 frakcija nije izvor enzima. U tom slučaju bi enzim mogao biti vezan za ribozome. Zbog toga je u sistemu za *in vitro* metilaciju analizirana S100 frakcija pripremana u puferu sa visokom koncentracijom amonijumhlorida, kao i supernatant dobijen "pranjem" ribozoma u puferu sa 1M NH_4Cl . Ovim postupkom se dobijaju proteini koji su vezani za ribozome, a nisu njihov sastavni deo (25). Analizom ova dva moguća izvora enzima je opet dobijen negativan rezultat što ukazuje na to da je za aktivnost metilaze možda potrebno više komponenti od kojih se neke nalaze u solubilnoj frakciji a neke su vezane za ribozome.

Medjutim, da metilacija rRNK zaista postoji, pokazano je u nešto "grubljem" sistemu. Naime, kao izvor enzima ovog puta je korišćena S30 frakcija proizvođača, a kao supstrat 30S subjedinica senzitivnog soja. Rezultati su prikazani na slici 7. Vidi se da je povećana inkorporacija radioaktivno obeležene metil grupe iz S-adenozil-metionina u smeši gde su prisutni i enzim i supstrat, u poredjenju sa kontrolnim probama gde su inkubirane samo S30 frakcija ili samo 30S subjedinica sa donatorom metil grupe.

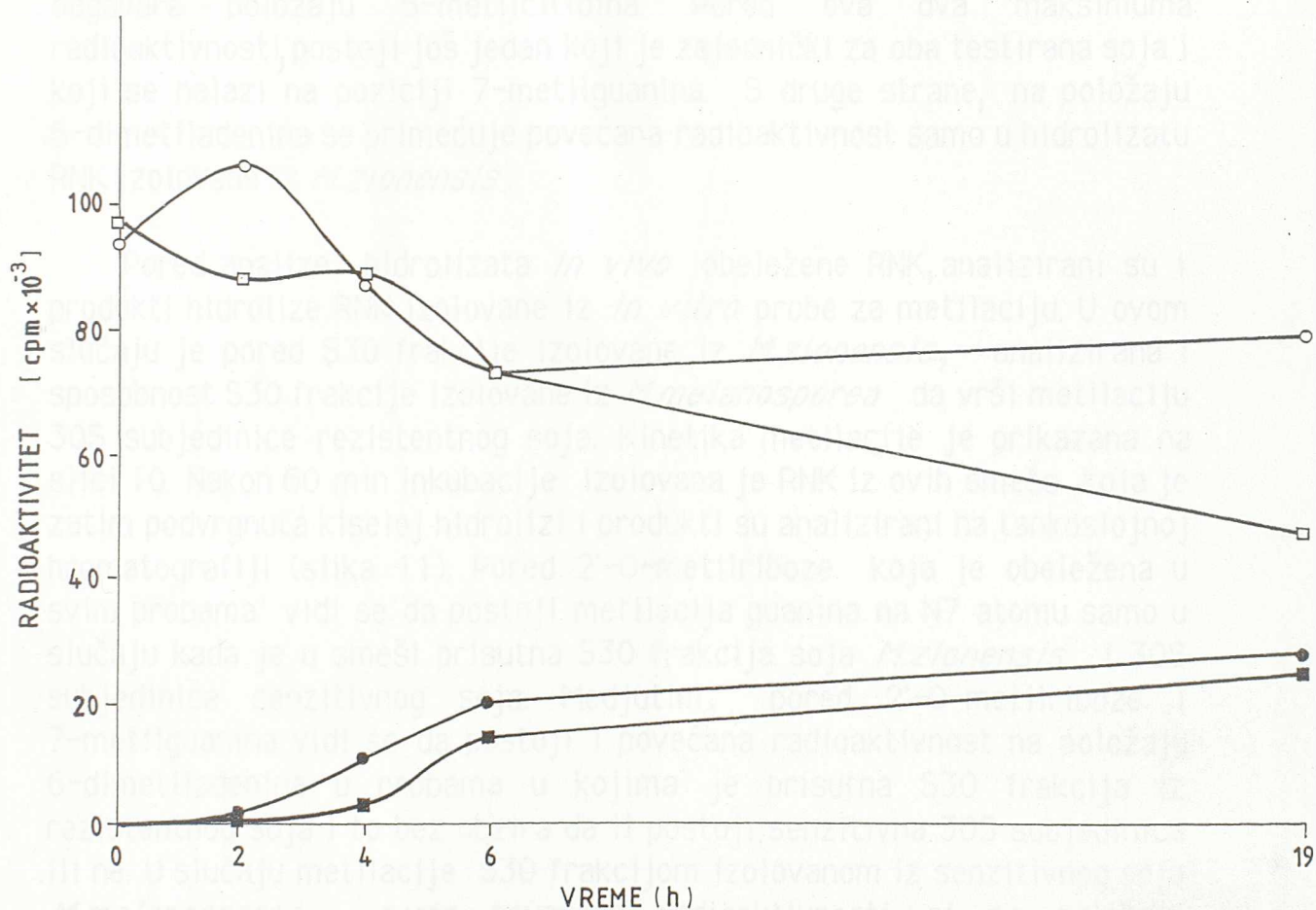


Slika 7. Metilacija 30S ribozomske subjedinice izolovane iz senzitivnog soja *M.melanosporea* pomoću S30 frakcije izolovane iz soja *M.zionensis* (○).

(●) - aktivnost metilaze u S30 frakciji *M.zionensis* u odsustvu senzitivne subjedinice;

(□) - kontrolna proba u kojoj je testirana aktivnost samo 30S subjedinice senzitivnog soja.

Drugi pristup u izučavanju modifikacije ribozomske RNK bila je analiza rRNK nakon metilacije *in vivo*. Eksperimenti su radjeni tako što su ćelije senzitivnog i rezistentnog soja rasle u prisustvu [^{14}C]-metionina. Kinetika obeležavanja ćelija radioaktivnim metioninom je prikazana na slici 8.



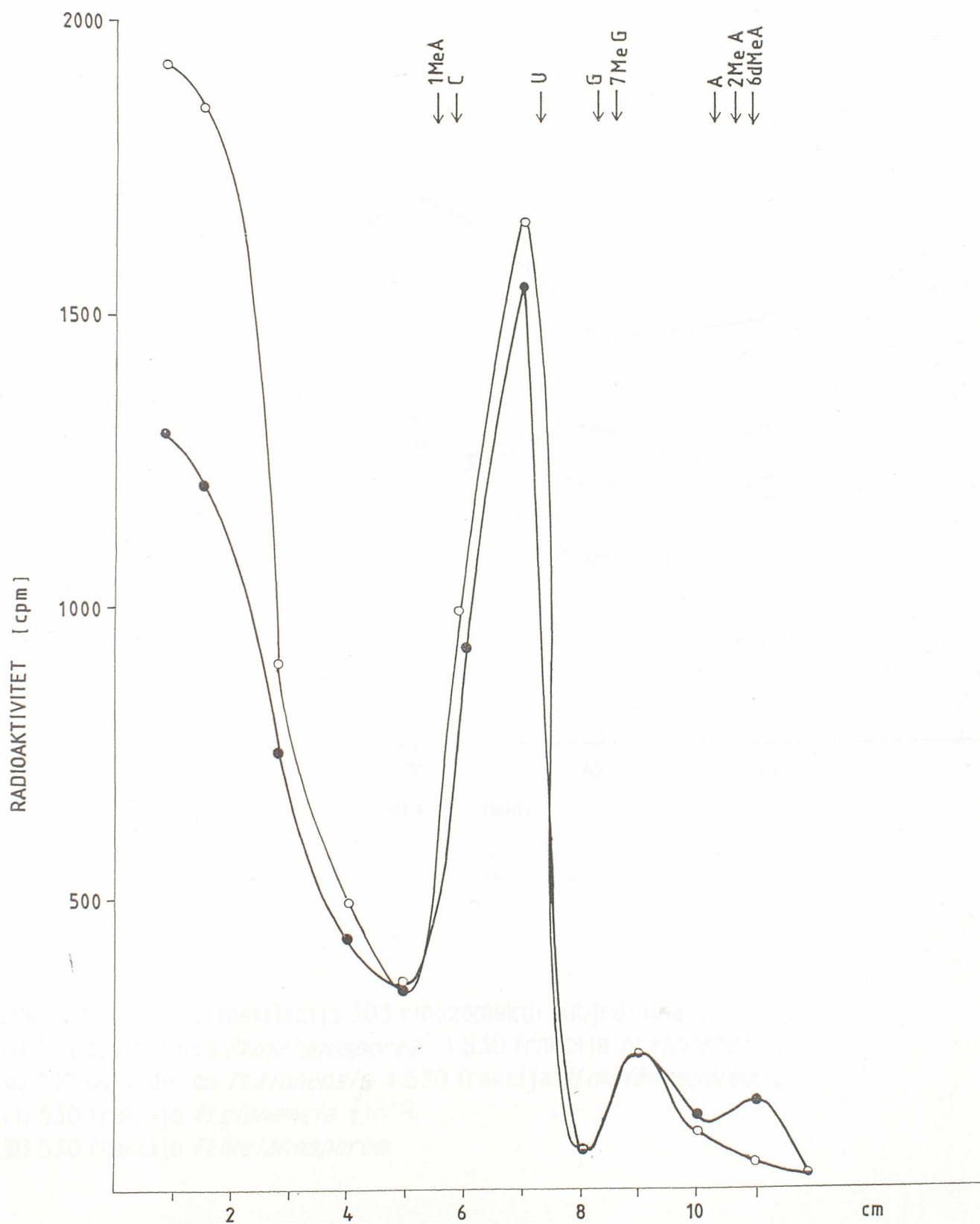
Slika 8. Inkorporacija radioaktivnog metionina u kulturama *M. melanosporea* i *M. zionensis*. Radioaktivnost izmerena u medijumu (○) i u ćelijama (●) *M. zionensis* i u medijumu (□) i u ćelijama (■) *M. melanosporea*.

Nakon obeležavanja, ćelije su sakupljene i iz njih je izolovana ribozomska RNK, koja je zatim hidrolizovana kao što je opisano u poglavlju Materijal i metode. Hidrolizat je analiziran na tankoslojnoj hromatografiji (slika 9). Rezultati ove analize pokazuju da postoji povećana radioaktivnost na početku hromatograma gde se obično nalazi 2'-O - metilriboza (podatak iz literature pošto ovaj standard nije bio dostupan) a takodje postoji i povećana radioaktivnost u području koji odgovara položaju 5-metilcitidina. Pored ova dva maksimuma radioaktivnosti, postoji još jedan koji je zajednički za oba testirana soja i koji se nalazi na poziciji 7-metilguanina. S druge strane, na položaju 6-dimetiladenina se primećuje povećana radioaktivnost samo u hidrolizatu RNK izolovane iz *M.zionensis*.

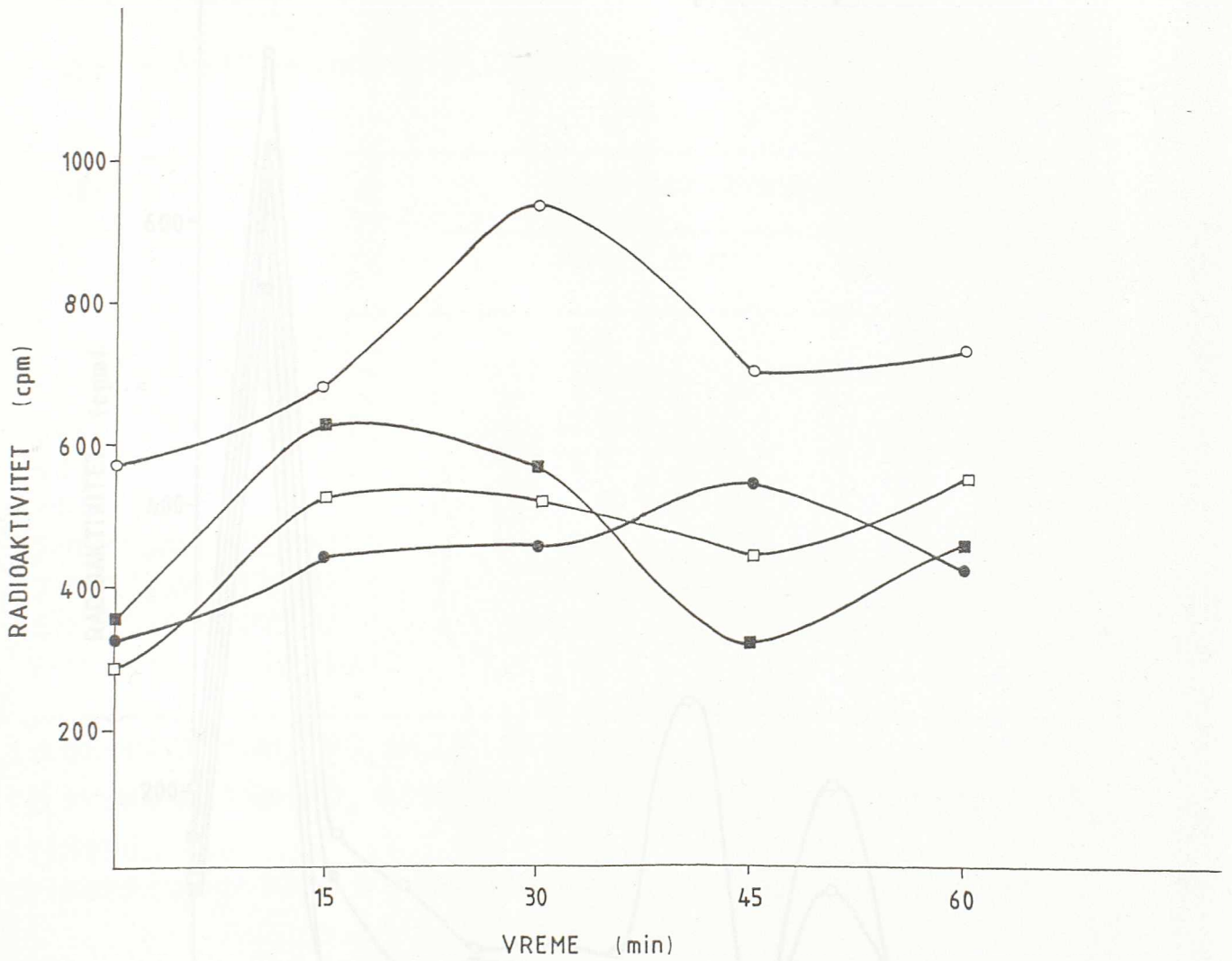
Pored analize hidrolizata *in vivo* obeležene RNK, analizirani su i produkti hidrolize RNK izolovane iz *in vitro* probe za metilaciju. U ovom slučaju je pored S30 frakcije izolovane iz *M.zionensis*, analizirana i sposobnost S30 frakcije izolovane iz *M.melanosporea* da vrši metilaciju 30S subjedinice rezistentnog soja. Kinetika metilacije je prikazana na slici 10. Nakon 60 min inkubacije izolovana je RNK iz ovih smeša koja je zatim podvrgnuta kiseloj hidrolizi i produkti su analizirani na tankoslojnoj hromatografiji (slika 11). Pored 2'-O-metilriboze koja je obeležena u svim probama vidi se da postoji metilacija guanina na N7 atomu samo u slučaju kada je u smeši prisutna S30 frakcija soja *M.zionensis* i 30S subjedinica senzitivnog soja. Medjutim, pored 2'-O-metilriboze i 7-metilguanina vidi se da postoji i povećana radioaktivnost na položaju 6-dimetiladenina u probama u kojima je prisutna S30 frakcija iz rezistentnog soja i to bez obzira da li postoji senzitivna 30S subjedinica ili ne. U slučaju metilacije S30 frakcijom izolovanom iz senzitivnog soja *M.melanosporea* nema povećane radioaktivnosti ni na položaju 7-metilguanina niti na položaju 6-dimetiladenina. To znači da je pojava radioaktivnog 7-metilguanina karakteristična samo za metilaciju u kojoj je kao izvor enzima korišćena S30 frakcija izolovana iz rezistentnog soja.

Pošto se zna da je submetilacija ribozomske RNK odgovorna za rezistenciju na antibiotik kazugamicin analizirana je sposobnost rasta soja *M.melanosporea* na podlogama sa različitim koncentracijama kazugamicina i pokazano je da je ovaj soj rezistentan na kazugamicin (raste na podlozi sa 500µg/ml kazugamicina). Medutim, pokazano je da i

soj *M.zionensis* raste na istim koncentracijama kazugamicina u podlozi. Razlike izmedju ova dva soja opisane su u diskusiji.



Slika 9. Tankoslojna hromatografija hidrolizata *in vivo* obeležene RNK. (○) *M.melanospora* ; (●) *M.zionensis*.



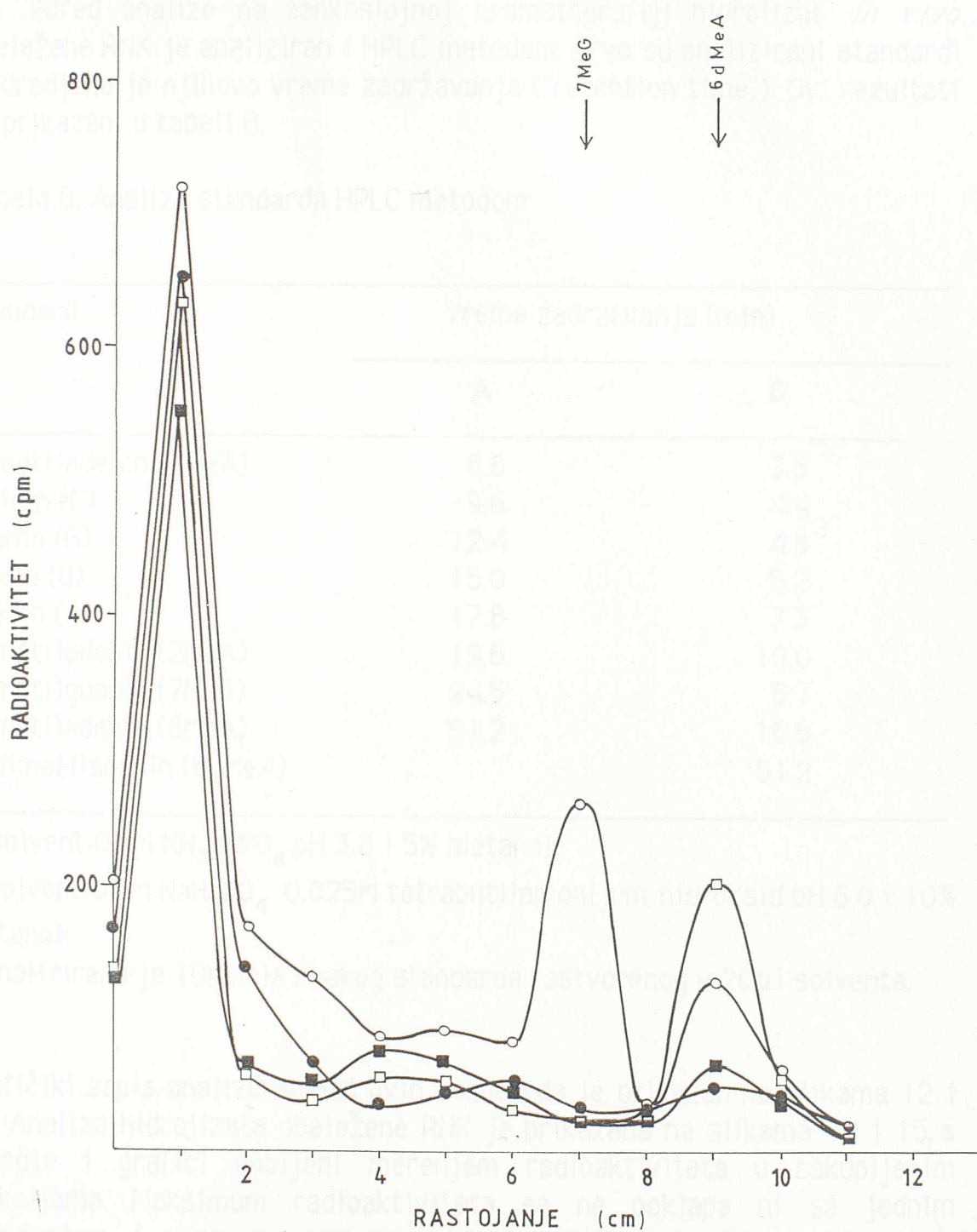
Slika 10. *In vitro* metilacija 30S ribozomskih subjedinica.

(o) 30S subjedinica *M.melanosporea* i S30 frakcija *M.zionensis* ;

(●) 30S subjedinica *M.zionensis* i S30 frakcija *M.melanosporea* ;

(□) S30 frakcija *M.zionensis* ;

(■) S30 frakcija *M.melanosporea*.



Slika 11. Tankoslojna hromatografija hidrolizata *in vitro* obeležene RNK izolovane iz proba prikazanih na slici 10. Oznake su iste kao na slici 10.

Pored analize na tankoslojnoj hromatografiji hidrolizat *in vivo* obeležene RNK je analiziran i HPLC metodom. Prvo su analizirani standardi i odredjeno je njihovo vreme zadržavanja ("retention time"). Ovi rezultati su prikazani u tabeli 8.

Tabela 8. Analiza standarda HPLC metodom

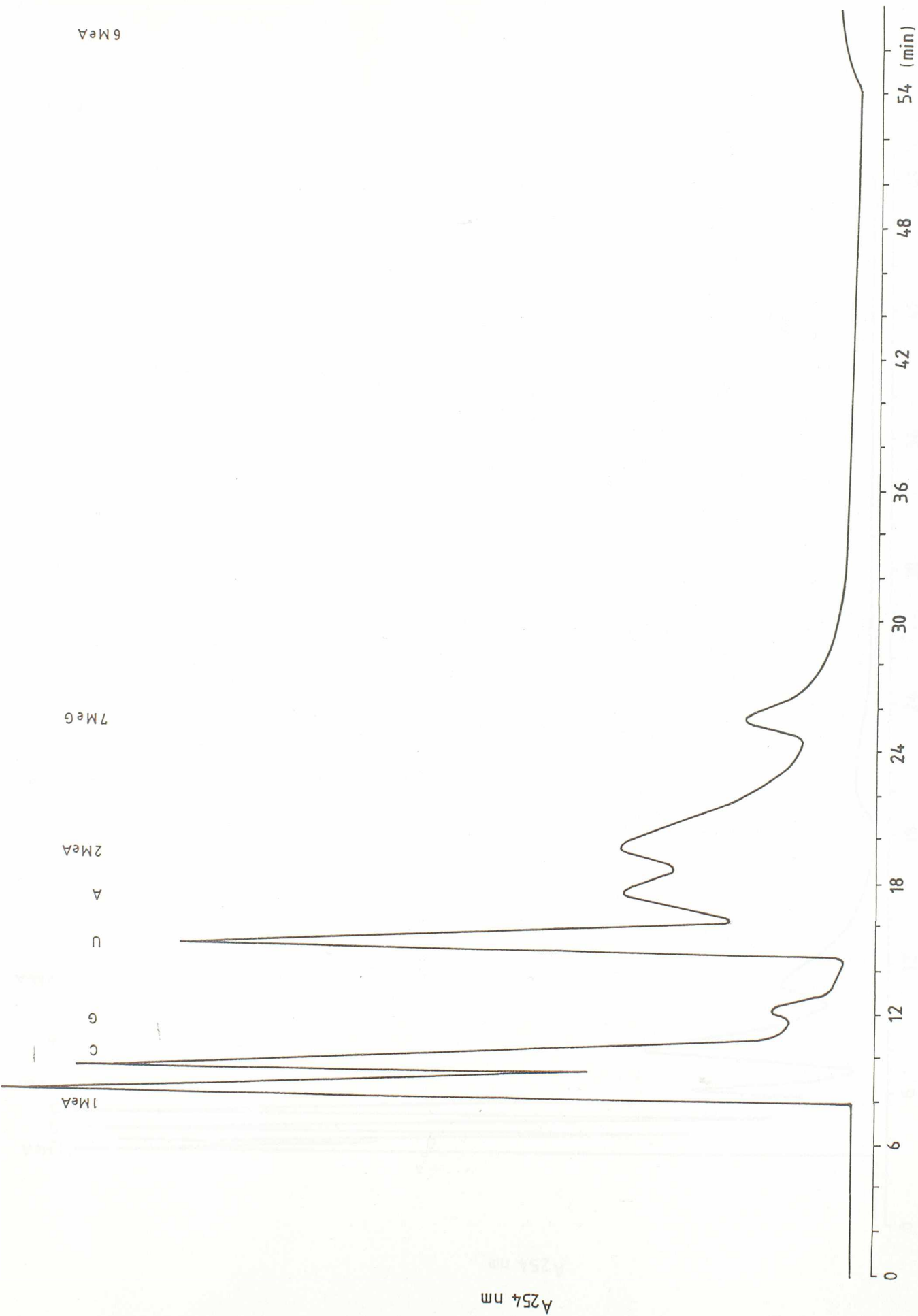
Standard	Vreme zadržavanja (min)	
	A	B
1-metiladenin (1MeA)	8.6	3.5
citidin (C)	9.6	4.4
guanin (G)	12.4	4.8
uridin (U)	15.0	5.2
adenin (A)	17.8	7.3
2-metiladenin (2MeA)	19.6	10.0
7-metilguanin (7MeG)	24.5	5.7
6-metiladenin (6MeA)	61.2	16.6
6-dimetiladenin (6dMeA)		51.2

A solvent 0.4M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 3.8 i 5% metanol;

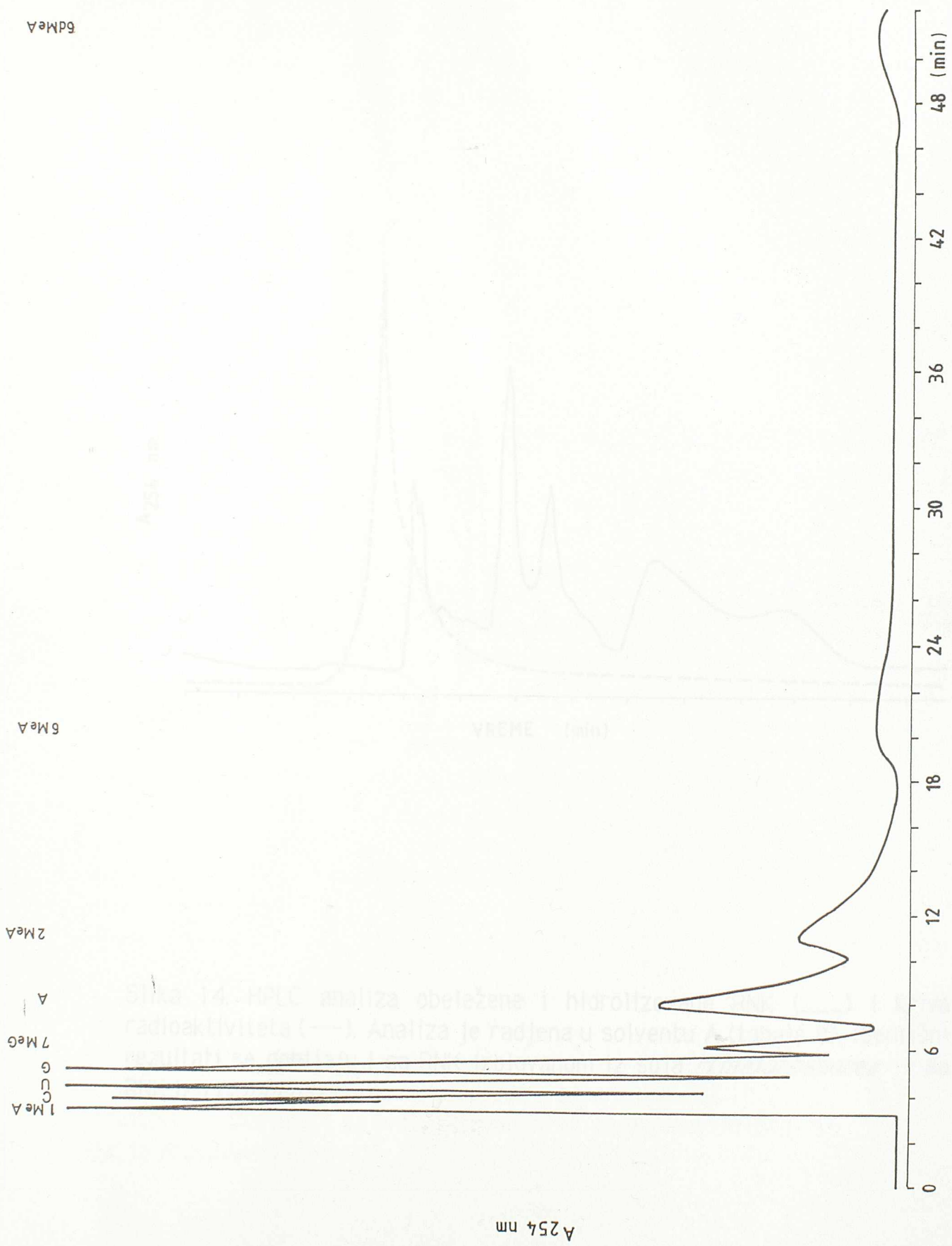
B solvent 0.2M NaH_2PO_4 0.025M tetrabutilamonijum hidroksid pH 6.0 i 10% metanol;

- analizirano je 10nmola svakog standarda rastvorenog u 20 μ l solventa.

Grafički zapis analize smeše ovih standarda je prikazan na slikama 12 i 13. Analiza hidrolizata obeležene RNK je prikazana na slikama 14 i 15, a takodje i grafici dobijeni merenjem radioaktiviteta u sakupljenim frakcijama. Maksimum radioaktiviteta se ne poklapa ni sa jednim standardom i verovatno odgovara 2'-O-metilribozi i 5-metilcitozinu (tankoslojna hromatografija). Iako je ova metoda veoma diskriminativna na ovaj način (sakupljanjem frakcija) nije moguće analizirati radioaktivno obeležene uzorke pošto se nakon prolaska kroz UV detektor menja pritisak i protok tako da dolazi do delimičnog mešanja uzoraka. Zbog toga je kriva



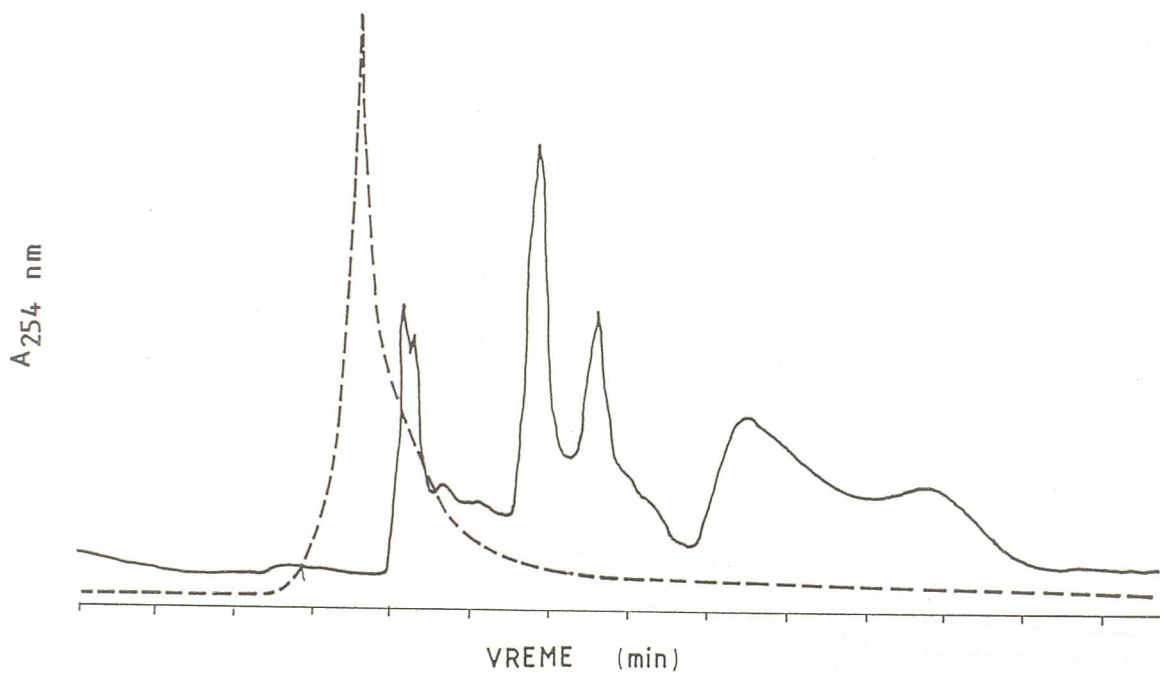
Slika 12. HPLC analiza standarda u solventu A (tabela 8).



Slika 13. HPLC analiza standarda u solventu B (tabela 8).

Slika 14. HPLC analiza obeležena i nirotilizirana radioaktiviteta (---). Analiza je radjena u solventu B (tabela 8).

1 MeA
C
U
G
7 MeG
A
2 MeA
6 MeA
6d MeA



Slika 14. HPLC analiza obeležene i hidrolizovane RNK (—) i kriva radioaktiviteta (---). Analiza je radjena u solventu A (tabela 8). Identični rezultati se dobijaju i sa RNK izolovanom iz soja *M.melanosporea* i sa RNK iz *M.zionensis*.

Analiza je radjena u solventu B (tabela 8). Identični rezultati se dobijaju i sa RNK izolovanom iz soja *M.melanosporea* i sa RNK iz *M.zionensis*.

izmerenog radioaktiviteta veoma razvučena tako da se ne mogu videti manja povećanja radioaktiviteta kao kod tankoslojne hromatografije. Da bi se to postiglo bilo bi potrebno paralelno povezati UV detektor i protočnu ćeliju scintilacionog brojača. Pošto ovo nije bilo moguće učiniti, diskutovani su samo rezultati dobijeni tankoslojnom hromatografijom.

6. Analiza vernosti translacije

Pošto je poznato da aminoglikozidni antibiotici indukuju povećano grešenje u translaciji ("misreading") (5, 34) i da je takvo grešenje u translaciji značajno smanjeno kod ribozoma izolovanih iz rezistentnih sojeva *E. coli* (1), bilo je interesantno ispitati da li i ribozomi izolovani iz bakterija koje proizvode aminoglikozide pokazuju sličan efekat. Grešenje u translaciji je ispitivano u sistemu za *in vitro* sintezu na poli-U kao informacionoj RNK, ali tako što je fenilalanin bio zamenjen izoleucinom. Na slici 16. se može videti da povećanje koncentracije antibiotika ne utiče na povećanje grešaka u translaciji u slučaju kada je 30S subjedinica izolovana iz rezistentnog soja, odnosno iz proizvođača. S druge strane, primećeno je da rekonstituisani 70S ribozomi u kojima je 30S subjedinica iz senzitivnog soja, pokazuju povećano grešenje u translaciji proporcionalno povećanju koncentracije antibiotika. Smanjenje nivoa grešenja u translaciji pri visokim koncentracijama antibiotika je u korelaciji sa inhibicijom inkorporacije fenilalanina pri istim koncentracijama (slika 5).

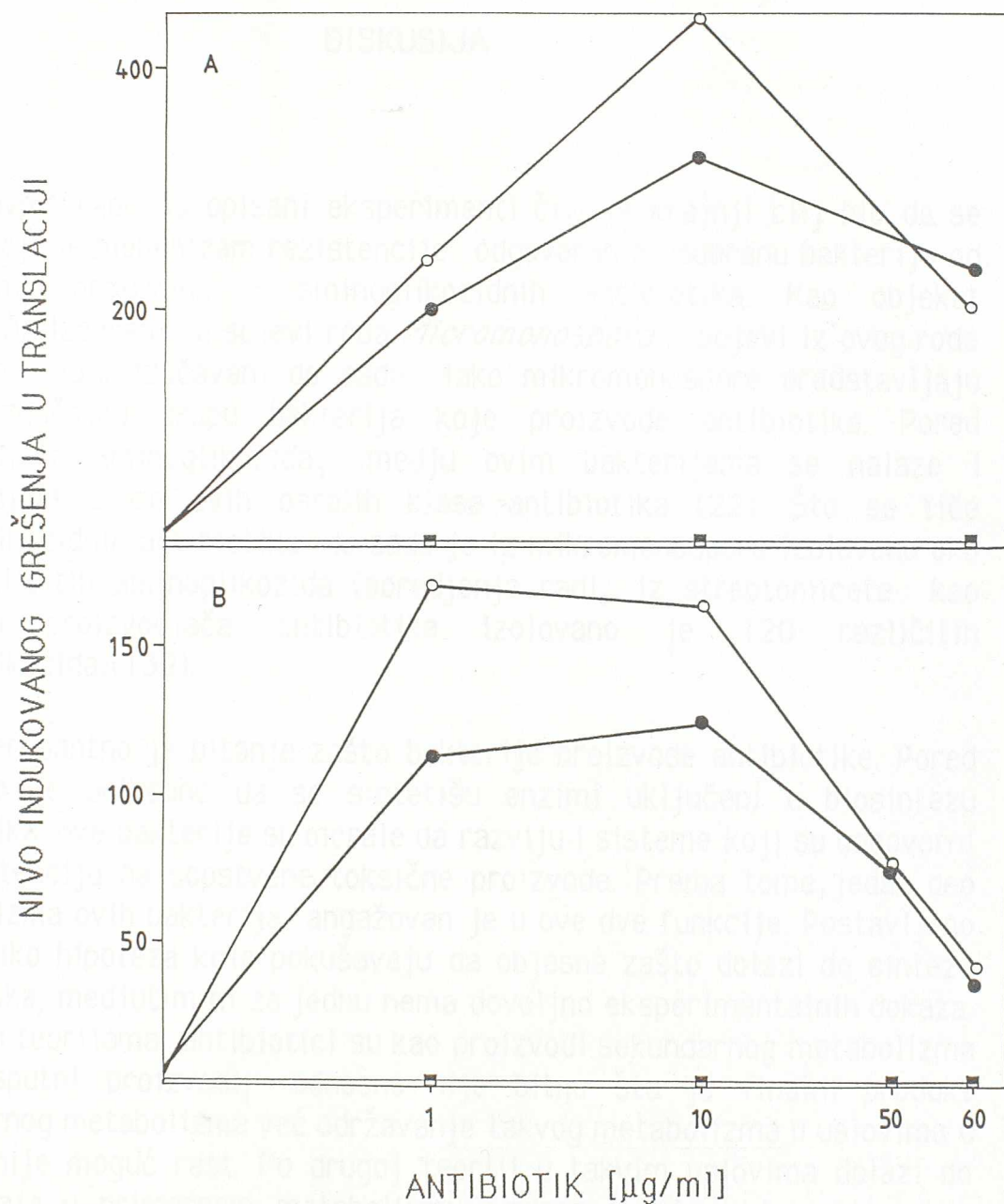
ANTIBIOTIK (μg/ml)

Slika 16. Grešenje u translaciji indukovano antibiotikom.

A homoložno i heteroložno rekonstruisani 70S ribozomi *M. luteus* sojeva i *M. luteus* (oznake su iste kao na slici 5.-C) antibiotik je gentamicin.

B homoložno i heteroložno rekonstruisani 70S ribozomi *M. luteus* sojeva i *M. luteus* (oznake su iste kao na slici 5.-D) antibiotik je streptomisin.

Nivo grešenja u translaciji se izražava kao broj inkorporisanih molekula izoleucina na 100 molekula Fenilalanina.



Slika 16. Grešenje u translaciji indukovano antibiotikom.

A homologno i heterologno rekonstruisani 70S ribozomi *M. melanospora* i *M. zionensis* (oznake su iste kao na slici 5.-C) antibiotik je gentamicin; B homologno i heterologno rekonstruisani 70S ribozomi *M. melanospora* i *M. sagamiensis* (oznake su iste kao na slici 5.- D) antibiotik je sagamicin.

Nivo grešenja u translaciji se izražava kao broj inkorporisanih pMola izoleucina na 100 pMola fenilalanina.

DISKUSIJA

U ovom radu su opisani eksperimenti čiji je krajnji cilj bio da se utvrdi koji je mehanizam rezistencije odgovoran za odbranu bakterija od sopstvenih proizvoda - aminoglikozidnih antibiotika. Kao objekat izučavanja izabrani su sojevi roda *Micromonospora*. Sojevi iz ovog roda su veoma malo izučavani do sada iako mikromonospore predstavljaju veoma značajnu grupu bakterija koje proizvode antibiotike. Pored proizvodjača aminoglikozida, medju ovim bakterijama se nalaze i proizvodjači skoro svih ostalih klasa antibiotika (22). Što se tiče aminoglikozidnih antibiotika do sada je iz mikromonospora izolovano oko 140 različitih aminoglikozida (poredjenja radi, iz streptomoceta kao najvećih proizvodjača antibiotika izolovano je 120 različitih aminoglikozida)(139).

Interesantno je pitanje zašto bakterije proizvode antibiotike. Pored toga što je potrebno da se sintetišu enzimi uključeni u biosintezu antibiotika ove bakterije su morale da razviju i sisteme koji su odgovorni za rezistenciju na sopstvene toksične proizvode. Prema tome, jedan deo metabolizma ovih bakterija angažovan je u ove dve funkcije. Postavljeno je nekoliko hipoteza koje pokušavaju da objasne zašto dolazi do sinteze antibiotika, medjutim ni za jednu nema dovoljno eksperimentalnih dokaza. Po nekim teorijama antibiotici su kao proizvodi sekundarnog metabolizma samo usputni proizvodi, odnosno nije bitno šta je finalni produkt sekundarnog metabolizma već održavanje takvog metabolizma u uslovima u kojima nije moguć rast. Po drugoj teoriji u takvim uslovima dolazi do poremećaja u primarnom metabolizmu, odnosno dolazi do prekomerne sinteze nekih primarnih metabolita koji se zatim konvertuju u sekundarne metabolite i kao takvi se ekskretiraju iz ćelije. Neke hipoteze pretpostavljaju da antibiotici imaju ulogu u diferencijaciji ćelija (sporulaciji) ili da predstavljaju kompetitivnu prednost za ove bakterije u njihovom prirodnom staništu (140). Poznato je da sporulacija koincidira sa proizvodnjom antibiotika, medjutim postoje različiti mutanti koji

dokazuju da ova dva procesa nisu medjusobno uslovljena. I kompetitivna teorija ima dokaza za i protiv. Iako izgleda logično da se bakterije proizvodnjom antibiotika obezbeđuju od prisustva drugih bakterija u svom staništu, koncentracije antibiotika prisutne u zemljištu su veoma male ili čak ispod nivoa detekcije (143). S druge strane postoji indikacija da streptomycin koji se oslobadja iz spora prilikom njihove germinacije štiti mlade hife od drugih bakterija koje se nalaze u okolini (144). Iako postoje dokazi za i protiv različitih hipoteza teško je pretpostaviti da se jednom hipotezom mogu obuhvatiti svi aspekti proizvodnje i uloge antibiotika.

Bakterije koje proizvode antibiotike kao finalni produkt sekundarnog metabolizma najčešće ne proizvode samo jedan antibiotik već vrlo često proizvode više srodnih antibiotika. Tako, na primer, *M.purpurea* proizvodi kompleks gentamicina koji se sastoji od gentamicina C_1 , C_{1a} i C_2 a takodje proizvodi i različite minorne komponente (22). Takodje, sojevi koji su izučavani u ovom radu proizvode više srodnih aminoglikozida. U tabeli 5 je data lista ovih sojeva i navedeni su antibiotici koji se proizvode kao glavna komponenta. Medjutim, *M.grisea* pored verdamicina proizvodi i sisomicin, a *M.sagamiensis* pored sagamicina proizvodi i gentamicin C_{1a} . S druge strane sisomicin je jedini produkt soja *M.inyoensis*, a to isto važi i za proizvodnju antibiotika G-52 i G-418 od strane sojeva *M.zionensis* i *M.rhodorangea*. Svi ovi antibiotici imaju slične hemijske strukture s tom razlikom što sisomicin verdamicin i antibiotik G-52 u aminošećeru koji je vezan za C_4 atom aminociklitola imaju jednu dvogubu vezu. Pored toga što proizvode slične aminoglikozide ove bakterije su i veoma slične što se tiče rezistencije na različite aminoglikozidne antibiotike (tabela 6.). Za razliku od senzitivnog soja *M.melanosporea* koji ne proizvodi antibiotike, svi testirani sojevi su visoko rezistentni na klasu 4,6-disupstituisanih aminoglikozida koji su strukturno slični antibiotocima koje proizvode ove bakterije. Pored toga, ovi sojevi su rezistentni i na higromicin B koji ima različitu hemijsku strukturu, a takodje je nešto povećana i minimalna inhibitorna koncentracija za lividomicin. Najverovatnije je da su različiti mehanizmi rezistencije odgovorni za rezistenciju na higromicin B i lividomicin. Takodje, *M.rhodorangea* koja ima povećanu inhibitornu koncentraciju za streptomycin to postiže nekim drugim mehanizmom koji je različit od onoga koji je odgovoran za rezistenciju na antibiotik koji proizvodi ova

bakterija. Testirano je prisustvo enzima koji mogu modifikovati streptomycin u ekstraktu ove bakterije, međutim pokazano je da takvi enzimi nisu prisutni. Takodje je testirano da li su ribozomi izolovani iz *M.rhodorangea* rezistentni na streptomycin u sistemu za *in vitro* sintezu proteina. Pokazano je da ova bakterija ima senzitivne ribosome na streptomycin, a takodje je pokazano da je nivo grešenja indukovano streptomycinom približno isti onom nivou grešenja koji pokazuju ribozomi izolovani iz senzitivnog soja. Prema tome, najverovatnije je da do rezistencije na streptomycin kod ovog soja dolazi usled promena na nivou membrane, odnosno usled sprečavanja transporta streptomicina u ćeliju.

Testirani sojevi mikromonospora su, što se tiče rezistencije na različite antibiotike veoma slični soju koji proizvodi gentamicin *M.purpurea* (24). Pošto su antibiotici koje proizvode ove bakterije strukturno veoma slični i verovatno koriste slične ili iste prekursore i biosintetske puteve (za sada je samo delimično poznata biosinteza sagamicina i gentamicina - 141) najverovatnije je da koriste identične ili slične mehanizme rezistencije. S obzirom da su kod bakterija koje proizvode antibiotike uglavnom zastupljena dva mehanizma odbrane (enzimska inaktivacija i modifikacija targeta)(126) dalja analiza ovih sojeva je bila usmerena ka tome da se pokaže koji je od ova dva mehanizma odgovoran za rezistenciju.

Iako rezistencija na različite aminoglikozide ne ukazuje na mogućnost postojanja nekog poznatog enzima koji modifikuje aminoglikozidne antibiotike (tabela 4.), prvo je analizirano prisustvo ovih enzima u sojevima mikromonospora. U ovim eksperimentima su pored proizvođača antibiotika kao kontrole testirani i sojevi *E.coli* koji nose plazmidne gene odgovorne za sintezu definisanih enzima, a takodje i senzitivni soj *M.melanosporea* (tabela 7). Pokazano je da sojevi mikromonospora nemaju enzime koji mogu modifikovati antibiotike koji proizvode ove bakterije ili strukturno slične antibiotike. Međutim, u soju *M.inyoensis* je dokazano prisustvo jedne nove acetiltransferaze za koju do sada nije bilo pokazano da se proizvodi u aktinomicetama (142). Ova acetiltransferaza može da acetiluje neomicin i njegove derivate a takodje i apramicin dok su gentamicin i kanamicin veoma slabi supstrati za ovaj enzim. S druge strane, sisomicin koji se proizvodi u ovom soju ne može uopšte biti modifikovan od strane ovog enzima. Prema tome prisustvo ove

acetiltransferaze ne može biti povezano sa mehanizmom rezistencije na sisomicin.

S druge strane, analiza rezistencije na nivou ribozoma je pokazala da su 70S ribozomi izolovani iz mikromonospora koje proizvode antibiotike rezistentni na aminoglikozide, odnosno da ne dolazi do inhibicije aktivnosti ovih ribozoma u prisustvu antibiotika (slika 4.). Za razliku od njih ribozomi izolovani iz senzitivnog soja pokazuju smanjenje aktivnosti sa povećanjem koncentracije antibiotika. S obzirom da su sve ostale komponente u *in vitro* sistemu za sintezu proteina bile iz senzitivnog soja, ovim eksperimentima je pokazano da je promena na nivou ribozoma, odnosno targeta za aminoglikozide odgovorna za rezistenciju kod mikromonospora.

Sledeći korak u analizi rezistencije kod ovih bakterija je bio da se utvrdi koja subjedinica ribozoma je odgovorna za rezistenciju. Pripremljene su subjedinice iz kontrolnog soja a takodje i iz svih pet sojeva koji proizvode aminoglikozide. U *in vitro* sistemu za sintezu polifenilalanina na poli-U testirane su sve kombinacije "senzitivnih" i "rezistentih" subjedinica i pokazano je da samo kada je prisutna 30S subjedinica izolovana iz rezistentnog soja ne dolazi do inhibicije sinteze proteina u prisustvu antibiotika (slika 5.). To znači da je target za ove antibiotike 30S subjedinica ribozoma i da je promena na nivou 30S subjedinice odgovorna za rezistenciju. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da je rezistencija na nivou ribozoma zastupljena medju proizvođačima aminoglikozidnih antibiotika mnogo više nego što se ranije mislilo. U tabeli 9. su sumirani podaci iz literature koji se odnose na modifikaciju targeta u bakterijama koje proizvode antibiotike. Pored rezistencije na nivou ribozoma za one bakterije koje proizvode antibiotike koji inhibiraju sintezu proteina, vidi se da i bakterije koje proizvode antibiotike koji inhibiraju druge procese u ćeliji zasnivaju svoj mehanizam odbrane na osnovu promene targeta.

Činjenica da su ribozomi koji sadrže jednu subjedinicu iz senzitivnog soja, a drugu iz rezistentnog aktivni kao i homologno rekonstruisani ribozomi, ukazuje na to da su ovi sojevi veoma srodni. Na ovu srodnost sojeva takodje ukazuje analiza ribozomskih proteina na poliakrilamidnom gelu (slika 6.).

Tabela 9. Modifikacija targeta odgovorna za rezistenciju u bakterijama koje proizvode antibiotike.

Soj	Antibiotik koji proizvodi	Modifikovana komponenta	Referenca
<i>S.azureus</i>	tioestrepton	23S rRNK	145,146
<i>S.erythraeus</i>	eritromicin	23S rRNK	100,147
<i>M.purpurea</i>	gentamicin	16S rRNK	148,149
<i>S.tenjimariensis</i>	istamicin	16S rRNK	148,150
<i>S.tenebrarius</i>	nebramicin	16S rRNK	148,151
<i>S.kanamyceticus</i>	kanamicin	30S	152
<i>N.mediterranei</i>	rifamicin	RNK polimeraza	153,154
<i>S.niveus</i>	novobiocin	DNK giraza	155
<i>S.cinnamoneus</i>	kiromicin	EF-Tu	156

S. - *Streptomyces*; *M.* - *Micromonospora*; *N.* - *Nocardia*.

Samo nekoliko proteina pokazuje različitu elektroforetsku pokretljivost što nije iznenadjujuće pošto se zna da i medju različitim sojevima *E.coli* postoje razlike u elektroforetskoj pokretljivosti nekih ribozomskih proteina (157). Takodje je pokazano da se ribozomski proteini izolovani iz različitih sojeva streptomiceta manje ili više razlikuju (158).

Rezultati prikazani na slici 5. jasno pokazuju da je 30S subjednica izolovana iz sojeva koji proizvode antibiotike odgovorna za rezistenciju. Pored toga, na slici 5. D se vidi da dolazi do stimulacije sinteze polifenilalanina ukoliko je 30S subjednica iz *M.sagamiensis* kombinovana sa 50S subjednicom iz senzitivnog soja. Sličan efekat je zapažen sa 30S subjednicama izolovanim iz sojeva *M.purpurea*,

S.tenjimariensis i *S.tenebrarius* koje su kombinovane sa 50S subjedinicama iz senzitivnih sojeva (24, 148). Mogući razlog za ovaj efekat je učešće 50S subjedinice u mestu vezivanja antibiotika (53, 159). Da postoji interakcija subjedinica u odgovoru na aminoglikozidne antibiotike dokazuje i činjenica da mutant *E.coli* rezistentan na gentamicin ima izmenjen protein velike subjedinice L6 (39, 40). Medjutim da ne postoji učešće 50S subjedinice u rezistenciji bakterija koje proizvode antibiotike jasno je pokazano u eksperimentima u kojima je vršena rekonstrukcija 30S subjedinice (148). Rekonstrukcija 30S subjedinica sojeva *M.purpurea*, *S.tenjimariensis* i *S.tenebrarius* uradjena je sa izolovanim 16S rRNK i ribozomskim proteinima senzitivnih i rezistentnih bakterija i pokazano je da je dovoljno prisustvo 16S rRNK iz rezistentnog soja da bi se ispoljila rezistencija u *in vitro* uslovima. Pored toga klonirani su i geni odgovorni za rezistenciju u sojevima *M.purpurea*, *S.tenjimariensis* i *S.tenebrarius*. Pokazano je da su ovi geni odgovorni za sintezu enzima koji specifično metiluju 16S rRNK (149, 150, 151). Prisustvo metilovane RNK u novom domaćinu je dovoljno da se ispolji rezistencija istog nivoa kao i u soju iz koga je poreklom gen za metilazu. Prema tome, bez obzira na poreklo 50S subjedinice i poreklo proteina 30S subjedinice za rezistenciju je dovoljno da u eksperimentima rekonstrukcije ribozoma 16S rRNK potiče iz rezistentnog soja. Moguće je takodje izvršiti *in vitro* metilaciju 16S rRNK pomoću enzima koji se nalaze u sojevima koji proizvode antibiotike. Takva RNK u rekonstruisanim 30S subjedinicama je dovoljna da bi se ispoljila rezistencija u *in vitro* uslovima.

S obzirom da su svi sojevi mikromonospora analizirani u ovom radu veoma slični u pogledu rezistencije na različite antibiotike i da svi pokazuju rezistenciju na nivou 30S subjedinice, za dalji rad je izabran soj *M.zionensis* koji je upoređivan sa senzitivnim sojem *M.melanosporea*. Pretpostavka je bila da i kod *M.zionensis* dolazi do metilacije 16S rRNK i zbog toga su analizirani produkti *in vivo* i *in vitro* metilacije. *In vivo* metilacija ribozomske RNK izolovane iz senzitivnog i rezistentnog soja i analiza produkata hidrolize ovih RNK na tankoslojnoj hromatografiji dala je veoma sličnu sliku za oba analizirana soja. Naime, svi maksimumi radioaktiviteta su identični za oba soja sem u položaju 6-dimetiladenina (slika 9.). Na tom položaju postoji maksimum radioaktiviteta samo kod rezistentnog soja, dok ribozomska RNK izolovana iz senzitivnog soja ne sadrži 6-dimetiladenin. Poznato je da sve do sada analizirane bakterije

imaju dva 6-dimetiladenina na 3' kraju 16S rRNK (160, 161). Mutanti bakterija koji nemaju enzim odgovoran za metilaciju ova dva susedna adenina na 3' kraju 16S rRNK rezistentni su na antibiotik kazugamicin (64, 97). Zbog toga je analizirana sposobnost rasta *M.melanosporea* i *M.zionensis* na podlogama sa različitim koncentracijama kazugamicina. Medjutim, oba ova soja su rezistentna na kazugamicin. Sa ovim rezultatima, bez dodatnih eksperimenata, samo se može spekulirati da je *M.melanosporea* rezistentna na kazugamicin usled demetilacije 16S rRNK dok je za rezistenciju u slučaju *M.zionensis* mozda odgovoran neki drugi mehanizam na primer promenjena propustljivost membrane.

Što se tiče analize produkata *in vitro* metilacija u kojima je korišćena S30 frakcija izolovana iz soja *M.melanosporea*, vidi se da se dobijaju iste krive bez obzira da li se radi o autometilaciji S30 frakcije ili o metilaciji 30S subjedinice iz rezistentnog soja (slika 11). Pored 2'-O-metilriboze, u oba slučaja se dobija neznatno povećanje radioaktiviteta na položaju na kome se nalazi 6-dimetiladenin. Ovaj rezultat govori u prilog ranije iznetoj pretpostavci da je *M.melanosporea* rezistentna na kazugamicin usled submetilacije RNK. Izgleda da je enzim odgovoran za ovu metilaciju iz nekog razloga neaktivan. Moguće je da je *M.melanosporea* zapravo mutant nekog od proizvođača antibiotika koji je izgubio sposobnost sinteze antibiotika, ali je zadržao rezistenciju.

S druge strane, rezultati analize *in vitro* metilovane RNK pokazuju da enzimi koji se nalaze u S30 frakciji rezistentnog soja vrše metilaciju senzitivnih 30S subjedinica i kao rezultat ove metilacije dobijaju se 2' - O -metilriboza, 7-metilguanin i 6-dimetiladenin. Izgleda, medjutim, da je samo 7-metilguanin odgovoran za rezistenciju pošto se druga dva metilovana produkta dobijaju i u slučaju kada je u probi prisutna samo S30 frakcija rezistentnog soja bez 30S subjedinice senzitivnog soja. Postavlja se pitanje zašto dolazi do ove autometilacije. S obzirom da su ovi eksperimenti radjeni sa S30 frakcijom i pošto se zna da je metilacija 16S rRNK kasni događaj u procesu biosinteze ribozoma (161) moguće je da se u ovoj frakciji nalaze prekursori ribozoma koji mogu biti metilovani. U tom slučaju metilacija guanina bi morala da se dešava u ranim fazama biosinteze ribozoma pošto ne dolazi do autometilacije u S30 frakciji rezistentnog soja. Indikaciju za ovakav zaključak pružaju i eksperimenti u kojima je analizirana sposobnost različitih ćelijskih frakcija da vrše

metilaciju 16S rRNK bilo izolovane, bilo u 30S subjedinici. Pošto ovi eksperimenti nisu dali pozitivne rezultate moguće je da se guanin koji se metiluje nalazi na takvom položaju u okviru 16S rRNK koji je dostupan enzimu samo u jednoj fazi formiranja ribozoma. Na to, takodje, ukazuje i činjenica da je odnos ugradjenih metil grupa po molekulu rRNK mnogo manji od jedan u probama u kojima je bila prisutna S30 frakcija rezistentnog soja i 30S subjedinica senzitivnog soja. Razlog ovakvom odnosu može da bude ili mala efikasnost sistema, ili mali broj 30S partikula pogodnih za metilaciju. Iako ova razmišljanja imaju svoju logiku i teorijsku osnovu, ipak je neophodno za finalni zaključak dobiti i potvrdu u eksperimentima. Takodje, treba voditi računa da se ipak radi o heterolognim sistemima pa bi prvenstveno bilo potrebno utvrditi koji je stepen homologije 16S rRNK ove dve bakterije. Pored toga, bilo bi potrebno da se utvrdi kakve su sličnosti ili razlike što se tiče post-transkripcionih modifikacija 16S rRNK. Drugi pristup u izucavanju ove metilacije RNK odgovorne za rezistenciju bi bio da se koristi poznati sistem kao što je na primer *E.coli*. Naime, bilo bi potrebno klonirati gen odgovoran za rezistenciju u *E.coli* i pošto su sve modifikacije 16SrRNK *E.coli* poznate (161), na jednostavniji način bi moglo da se utvrdi koja metilacija je odgovorna za rezistenciju.

Metilacija 23 SrRNK je poznata od ranije i zna se da je metilacija adenina na položaju 1067 odgovorna za rezistenciju na tiostrepton u soju *S.azureus*, a metilacija A-2058 je odgovorna za rezistenciju na eritromicin u soju *S.erythraeus* (104,115). U novije vreme su definisana i mesta na 16 SrRNK koja se metiluju u sojevima *M.purpurea* i *S.tenjimariensis* (162). U slučaju soja *M.purpurea* dolazi do metilacije guanina na položaju 1405, a u slučaju *S.tenjimariensis* metiluje se A-1408. Za razliku od enzima koji su odgovorni za rezistenciju na tiostrepton i eritromicin, enzimi odgovorni za rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike u ova dva soja ne koriste u *in vitro* metilaciji kao supstrat čistu ribozomsku RNK već 30S subjedinice.

Interesantno je da do modifikacija dolazi u konzervativnom regionu 16S rRNK. Tokom evolucije odredjeni regioni u okviru sekundarne strukture 16S rRNK (ili 16S-sličnih molekula) su veoma očuvani (163, 164). To znači da ovi regioni mogu imati važnu ulogu u funkcionisanju ribozoma. Tako je za region oko 1400-tog nukleotida pokazano da sadrži modifikovane

nukleotide (različito rasporedjene kod različitih organizama), a takodje je pokazano da ovaj region može da interaguje sa iRNK ili tRNK i da na neki način učestvuje u procesu prepoznavanja kodona i antikodona (165). Zbog toga je moguće pretpostaviti da aminoglikozidi ostvaruju svoje dejstvo i dovode do povećanog grešenja u translaciji tako što se vezuju za ovaj region 16S rRNK. Noviji rezultati pokazuju da u vezivanju higromicina, neomicina, paromomicina, gentamicina i kanamicina učestvuje region 16S rRNK od 1400-1500-tog nukleotida (84). Što se tiče streptomocina, u njegovom vezivanju učestvuju nukleotidi u drugom regionu (oko 900-tog nukleotida), medjutim ovaj region je veoma blizak prethodnom kada se posmatra sekundarna struktura. Svi ovi antibiotici utiču na vernost translacije, pa se može pretpostaviti da je ovaj region RNK uključen u kontrolu vernosti translacije. S druge strane, spektinomocin koji ne izaziva povećanje grešenja u translaciji vezuje se za 16S rRNK u regionu oko 1060-tog nukleotida (84).

Analiza vernosti translacije u mikromonosporama je pokazala da je 30S subjedinica pored toga što je odgovorna za rezistenciju na aminoglikozide odgovorna i za izrazito smanjenje grešenja u translaciji (slika 16). S obzirom da se radi o metilaciji rRNK, bilo bi interesantno utvriti na kom položaju dolazi do metilacije - odnosno da li dolazi do metilacije u regionu od 1400-1500-tog nukleotida, ili se možda radi o nekom drugom regionu koji bi mogao biti uključen u regulaciju vernosti translacije.

Rezultati prikazani u ovom radu, kao i podaci iz literature potvrđuju da ribozomska RNK nema samo strukturnu ulogu u organizaciji ribozoma već da ima i veoma važnu ulogu u funkcionisanju ribozoma. Ovakva uloga RNK u biosintezi proteina ide u prilog ideji da se ishodni translacioni aparat sastojao samo od RNK bez proteina. Takodje je interesantna ideja da su na tom stupnju aminoglikozidni antibiotici, ili neki slični mali molekuli koji na ovako specifičan način mogu da interaguju sa rRNK imali važnu ulogu u sintezi proteina.

ZAKLJUČCI

1. Svi testirani sojevi mikromonospora pokazuju isti obrazac rezistencije na različite aminoglikozidne antibiotike - svi su visoko rezistentni na antibiotike koji su strukturno slični onim antibioticima koji se proizvode u ovim bakterijama.

2. Analiza enzima koji modifikuju aminoglikozidne antibiotike je pokazala da testirani sojevi mikromonospora nemaju ovakve enzime i da prema tome, ne zasnivaju svoj mehanizam odbrane na modifikaciji sopstvenog toksičnog proizvoda.

3. 70S ribozomi izolovani iz proizvodjača nisu inhibirani antibioticima u sistemu za *in vitro* sintezu proteina, za razliku od 70S ribozoma izolovanih iz senzitivnog soja. To dokazuje da su ove bakterije rezistentne na aminoglikozide zahvaljujući promeni targeta.

4. Analiza subjedinica ribozoma je pokazala da je 30S subjedinica ribozoma odgovorna za rezistenciju.

5. Komponenta 30S subjedinice koja je odgovorna za rezistenciju je ribozomalna RNK. Za razliku od senzitivnog soja, ribozomalna RNK rezistentnog soja koji proizvodi antibiotik *M.zionensis* je više metilovana. Frakcija S30 izolovana iz *M.zionensis* sadrži enzim koji može da metiluje ribozomsku RNK senzitivnog soja i produkt ove specifične metilacije je 7-metilguanin.

6. Soj koji ne proizvodi antibiotike i koji je korišćen u svim eksperimentima kao senzitivna kontrola (*M.melanosporea*) rezistentan je na antibiotik kazugamicin usled submetilacije ribozomske RNK. Rezistencija na kazugamicin ne menja osobine ribozoma u pogledu rezistencije na druge aminoglikozidne antibiotike.

7. Ribozomi izolovani iz bakterija koje proizvode aminoglikozidne antibiotike pokazuju izrazito nizak nivo grešenja u translaciji u poredjenju sa senzitivnim sojem. Pošto se rezistencija kod ovih bakterija zasniva na metilaciji ribozomske RNK znači da i ova komponenta ribozoma ima ulogu u kontroli vernosti translacije.

1. ...
 2. ...
 3. ...
 4. ...
 5. ...
 6. ...
 7. ...
 8. ...
 9. ...
 10. ...
 11. ...
 12. ...
 13. ...
 14. ...
 15. ...
 16. ...
 17. ...
 18. ...
 19. ...
 20. ...
 21. ...
 22. ...
 23. ...
 24. ...
 25. ...
 26. ...
 27. ...
 28. ...
 29. ...
 30. ...
 31. ...
 32. ...
 33. ...
 34. ...
 35. ...
 36. ...
 37. ...
 38. ...
 39. ...
 40. ...
 41. ...
 42. ...
 43. ...
 44. ...
 45. ...
 46. ...
 47. ...
 48. ...
 49. ...
 50. ...
 51. ...
 52. ...
 53. ...
 54. ...
 55. ...
 56. ...
 57. ...
 58. ...
 59. ...
 60. ...
 61. ...
 62. ...
 63. ...
 64. ...
 65. ...
 66. ...
 67. ...
 68. ...
 69. ...
 70. ...
 71. ...
 72. ...
 73. ...
 74. ...
 75. ...
 76. ...
 77. ...
 78. ...
 79. ...
 80. ...
 81. ...
 82. ...
 83. ...
 84. ...
 85. ...
 86. ...
 87. ...
 88. ...
 89. ...
 90. ...
 91. ...
 92. ...
 93. ...
 94. ...
 95. ...
 96. ...
 97. ...
 98. ...
 99. ...
 100. ...

LITERATURA

1. Piepersberg, W., Geyl, D., Hummel, H., Bock, A.; u "Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes"; ed. S.Osava, H.Ozaki, H.Uchida, T.Yura; University of Tokio Press, 1980.
2. Topisirovic, L., Villarroel, R., De Wilde, M., Herzog, A., Cabezon, T., Bollen, A.; Mol.gen.Genet.(1977) 151, 89
3. Matkovic, B., Herzog, A., Bollen, A., Topisirovic, L.; Mol.gen.Genet. (1980) 179, 135
4. Pestka, S.; u "Molecular mechanisms of protein biosynthesis", PP 467-553, Academic Press New York, 1977.
5. Vazques, D.; "Inhibition of protein biosynthesis", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979.
6. Cundliffe, E.; u "Ribosomes - Structure, Function and Genetics", ed. Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., Nomura, M., pp 555-581, Baltimore, Univ.Park, 1980.
7. Hancock, R.E.; J.Antimicrob.Chemoth.(1981) 8, 429
8. Kawaguchi, H., Naito, T., Nakagawa, S., Fujisawa, K.; J.Antib. (1972) 25, 695
9. Umezawa, H., Umezawa, S., Tsuchiya, T., Ozaki, Y.; J.Antib. (1971) 24, 485
10. Miller, G.H., Arcieri, G., Weinstain, M.Y., Waitz, J.A.; Antimicrob.Agents.Chemother. (1976) 10, 827
11. Spotts, C.R., Stanier, R.Y.; Nature (1961) 192, 633
12. Matkovic, B., Piendl, W., Bock, A.; FEMS Microb.Lett. (1984) 24, 273
13. Davies, J.; u "Antibiotics in Laboratory Medicine", ed. V.Lorian, pp 474-489, Williams and Wilkins, Baltimore, 1980.
14. Rosset, R., Gorini, L.; J.Mol.Biol. (1969) 39, 95
15. Geyl, D., Bock, A., Isono, K.; Mol.gen.Genet. (1981) 181, 309
16. Hardy, S.Y.S., Kurland, C.G., Voynow, G., Mora, G.; Biochemistry (1969) 8, 2897

17. Lai, C.Y., Weisblum, B.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1971) 68, 856
18. Ron, E.D., Kohler, R., Davis, B.: Science (1966) 153, 1119
19. Iwanami, Y., Brown, G.: Arch.Biochem.Biophys. (1968) 124, 472
20. Van Buul, C.P.J.J., Damm, J.B.L., Van Knippenberg, P.H.: Mol.gen.Genet. (1983) 189, 475
21. Thompson, J., Skeggs, P.A., Cundliffe, E.: Mol.gen.Genet. (1985) 201, 168
22. Wagman, G.H., Weinstein, M.J.: Ann.Rev.Microbiol. (1980) 34, 537
23. Baldacci, E., Locci, R.: Ann.Microbiol.Enzymol. (1961) 11, 19
24. Piendl, W., Bock, A.: Antimicrob. Agents.Chemother. (1982) 22, 231
25. Dubnoff, J.S., Maitra, U.: u "Methods in Enzymology" (1971) 20, 248
26. Gorini, L., Kataja, E.: Proc.Natl. Acad.Sci.USA (1964) 51, 487
27. Gorini, L., Kataja, E.:Biochem.Biophys.Res.Comm. (1965) 18, 656
28. Gorini, L.: u "Ribosomes", ed. Nomura, M., Tissieres, A., Lengyel, P., (1974) pp 791-803, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
29. Strigini, P., Gorini, L.: J.Mol.Biol. (1970) 47, 517
30. Gorini, L.: Ann.Rev.Gen. (1970) 4, 107
31. Hopfield, J.J.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1974) 71, 4135
32. Piepersberg, W., Bock, A., Wittmann, H.G.: Mol.gen.Genet. (1975) 140, 91
33. Cabezon, T., Herzog, A., De Wilde, M., Villarroel, R., Bollen, A.: Mol.gen.Genet. (1976) 144, 59
34. Davies, J., Gilbert, W., Gorini, L.: Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1964) 51, 883
35. Gorini, L.: Nature New Biology (1974) 234, 261
36. Ozaki, M., Mizushima, S., Nomura, M.: Nature (1969) 222, 333

37. Breckenridge, L., Gorini, L.; Genetics (1970) 65, 9
38. Bollen, A., Cabezon, T., De Wilde, M., Villarroel, R., Herzog, A.; J.Mol.Biol. (1975) 99, 795
39. Buckel, P., Buchberger, A., Bock, A., Wittmann, H.G.; Mol.gen.Genet.(1977) 158, 47
40. Kuhberger, R., Piepersberg, W., Petzet, A., Buckel, P., Bock, A.; Biochemistry (1979) 18, 187
41. Birge, E.A., Kurland, C.G.; Science (1969) 166, 1282
42. Momose, H., Gorini, L.; Genetics (1971) 67, 19
43. Gorini, L., Rosset, R., Zimmermann, R.A.; Science (1967) 157, 1314
44. Bock, A., Petzet, A., Piepersberg, W.; FEBS Lett. (1979) 104, 317
45. Hummel, H., Bock, A.; Mol.gen.Genet. (1983) 191, 167
46. Hummel, H., Ahmad, M.H., Bock, A.; Mol.gen.Genet. (1983) 191, 176
47. Dabbs, E.R.; Mol.gen.Genet. (1977) 151, 261
48. Dabbs, E.R.; J.Bacteriol. (1978) 136, 991
49. Dabbs, E.R.; Mol.gen.Genet. (1980) 177, 271
50. Matković, B., Topisirović, Lj.; Genetika (1984) 16, 95
51. Vasiljević, B., Topisirović, Lj.; Per.Biol.(1987) 89, 89
52. Pongs, O., Nierhaus, K.H., Erdmann, V.A., Wittmann, H.G.; FEBS Lett. (1974) 40, S28
53. Le Goffic, F., Capman, M.L., Tangy, F.; J.Antibiot. (1980) 33, 895
54. Deusser, E., Stoffler, G., Wittmann, H.G., Apirion, D.; Mol.gen.Genet. (1970) 109, 298
55. Funatsu, G., Puls, ., Schiltz, ., Reinbolt, ., Wittmann, H.G.; Mol.gen.Genet. (1972) 115, 131
56. Kreider, G., Brownstein, B.L.; J.Bacteriol. (1972) 109, 780
57. Stoffler, G., Deusser, E., Wittmann, H.G., Apirion, D.; Mol.gen.Genet. (1971) 111, 334

58. Hasenbank, R., Guthrie, C., Stoffler, G., Wittmann, H.G., Rossen, L., Apirion, D.; Mol.gen.Genet. (1973) 127, 1
59. Hummel, H., Piepersberg, W., Bock, A.; Mol.gen.Genet. (1980) 179, 147
60. Piepersberg, W., Nosedá, V., Bock, A.; Mol.gen.Genet. (1979) 171, 23
61. Kirsebom, L.A., Isaksson, L.A.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1985) 82, 717
62. Kirsebom, L.A., Amos, R., Isaksson, L.A.; Eur.J.Biochem. (1986) 156, 669
63. Twilt, J.C., Overbeek, G.P., Van Duin, J.; Eur.J.Biochem. (1979) 94, 477
64. Helser, T.L., Davies, J.E., Dahlberg, J.E.; Nature New Biol. (1971) 233, 12
65. Van Buul, C.P.J.J., Visser, W., Van Knippenberg, P.H.; FEBS Lett. (1984) 177, 119
66. Ninio, J.; J.Mol.Biol. (1974) 84, 297
67. Zengel, J.M., Young, R., Dennis, P., Nomura, M.; J.Bacteriol. (1977) 129, 1320
68. Thompson, R.C., Stone, P.J.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1977) 74, 198
69. Gast, P.U., Peters, P., Pingoud, A.; J.Biol.Chem. (1987) 262, 11920
70. Ellis, N., Gallant, J.; Mol.gen.Genet. (1982) 188, 169
71. Andersson, D.J., Van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H., Kurland, C.G.; Arch.Microbiol. (1986) 144, 96
72. Ehrenberg, M., Andersson, D., Bohman, K., Jelenc, P., Ruusala, T., Kurland, C.G.; u "Structure, Function and Genetics of Ribosomes" ed. B.Hardesty, G.Kramer, Springer-Verlag (1986) 573
73. Negre, D., Robert, E., Andieux, E., Cozzone, A.J.; J.Antibiot. (1985) 38, 661
74. Fast, R., Eberhard, T.H., Ruusala, T., Kurland, C.G.; Biochemie (1987) 69, 131

75. Tai, P.C., Wallace, B.J., Herzog, E.L., Davis, B.D.; *Biochemistry* (1973) 12, 609
76. Tai, P.C., Wallace, B.J., Davis, B.D.; *Proc.Natl.Acad.Sci.US* (1978) 75, 275
77. Modolell, J., Davis, B.D.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (1970) 67 1148
78. Wallace, B.J., Davis, B.D.; *J.Mol.Biol.* (1973) 75, 377
79. Pongs, O., Nierhaus, K.H., Erdmann, V.A., Wittmann, H.G.; *FEBS Lett.* (1974) 40, 28
80. Teraoka, H., Tanaka, K.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (1972) 46, 93
81. Melancon, P., Boileau, G., Brakier-Gingras, L.; *Biochemistry* (1984) 23, 6697
82. Melancon, P., Brakier-Gingras, L.; *Biochemistry* (1985) 24, 6089
83. Biswas, D.K., Gorini, L.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (1972) 69 2141
84. Moazed, D., Noller, H.F.; *Nature* (1987) 327, 389
85. Montandon, P.E., Wagner, R., Stutz, E.; *EMBO J.* (1986) 5, 3705
86. Hanas, J.S., Simpson, M.V.; *J.Biol.Chem.* (1986) 261, 6670
87. Ruusala, T., Kurland, C.G.; *Mol.gen.Genet.* (1984) 198, 100
88. Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., Arow, A.S.; *Microb.Rev.* (1987) 51, 439
89. Davis, B.D., Chen, L., Tai, P.C.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (1986) 83, 6164
90. Hurwitz, C., Braun, C.B., Rosano, C.L.; *Biochem.Biophys.Acta* (1981) 652, 168
91. Bock, A., Petzet, A., Piepersberg, W.; *FEBS Lett.* (1979) 104, 317
92. Davis, B.D.; *Microb.Rev.* (1987) 51, 341
93. Bollen, A., Davies, J., Ozaki, M., Mizushima, S.; *Science* (1969) 165, 85

94. Traub, P., Nomura, M.; Science (1968) 160, 198
95. De Wilde, M., Cabezon, T., Villarroel, R., Herzog, A., Bollen, A.; Mol.gen.Genet. (1975) 142, 19
96. Masukava, H.; J.Antibiot. (1969) 22, 612
97. Helser, T.L., Davies, J.E., Dahlberg, J.E.; Nature New Biol. (1972) 235, 6
98. Okuyama, A., Yoshikawa, M., Tanaka, N.; Biochem.Biophys.Res. Comm. (1974) 60, 1163
99. Yoshikawa, M., Okiyama, A., Tanaka, N.; J.Bacteriol. (1975) 122, 796
100. Lai, C.J., Weisblum, B.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1971) 68, 856
101. Thaker-Varia, S., Ranzini, A.C., Dubin, D.T.; Plasmid (1985) 14, 152
102. Wittmann, H.G., Stoffler, G., Apirion, D., Rosen, L., Tanaka, K., Tamaki, M., Takata, R., Dekio, S., Otaka, E., Osawa, S.; Mol.gen.Genet. (1973) 127, 175
103. Pardo, D., Rosset, R.; Mol.gen.Genet. (1977) 156, 267
104. Thompson, J., Schmidt, F., Cundliffe, E.; J.Biol.Chem. (1982) 257, 7915
105. Pestka, S., Weiss, D., Vince, R., Weiner, B., Stoffler, G., Smith, I.; Mol.gen.Genet. (1976) 144, 235
106. Cannon, M., Cundliffe, E.; Eur.J.Biochem. (1979) 97, 541
107. Mark, L.G., Sigmund, C.D., Morgan, E.A.; J.Bacteriol. (1983) 155, 989
108. Sigmund, C.D., Ettayebi, M., Morgan, E.A.; Nucleic Acids Res. (1984) 12, 4653
109. Douthwaite, S., Prince, J.B., Noller, H.F.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1985) 82, 8330
110. Ettayebi, M., Prasad, S.M., Morgan, E.A.; J.Bacteriol. (1985) 162, 551
111. Fisher, E., Wolf, H., Hautke, K., Parmeggiani, A.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1977) 74, 4341

112. Van de Kludent, J.A.M., Den Turk, E., Borman, A.H., Van der Meide, P.H., Bosch, L.: FEBS Lett. (1977) 81, 303
113. Kinoshita, T., Kawano, G., Tanaka, N.: Biochem.Biophys.Res.Comm. (1968) 33, 769
114. Tocchini-Valentini, G.P., Mittocchia, E.: Proc.Natl.Acad.Sci USA (1968) 61, 146
115. Skinner, R., Cundliffe, E., Schmidt, F.J.: J.Biol.Chem. (1983) 258, 12702
116. Lai, C.J., Dahlberg, J.E., Weisblum, B.: Biochemistry (1973) 12, 457
117. Denoya, C., Dubnau, D.: J.Bacteriol. (1987) 169, 3857
118. Lindhal, L., Zengel, J.: Ann.Rev.Genet. (1986) 20, 297
119. Yamada, T., Mizugishi, Y., Nierhaus, K.H., Wittmann, H.G.: Nature (1978) 275, 460
120. Cundliffe, E.: Biochemie (1987) 69, 863
121. Matković, B., Topisirović, Lj.: Genetika (1985) 17, 75
122. Chopa, I., Howe, T.G.B.: Microb.Rev. (1978) 42, 707
123. Davies, J., Smith, D.I.: Ann.Rev.Microbiol. (1978) 32, 469
124. Ohnuki, T., Kato, T., Imanaka, T., Aiba, S.: J.Bacteriol. (1985) 161, 1010
125. Sugiyama, M., Mochizuki, H., Nimi, O., Nomi, R.: J.Antibiot. (1981) 34, 1183
126. Cundliffe, E.: British Med.Bull. (1984) 40, 61
127. Phillips, I., Shannon, K.: British Med.Bull. (1984) 40, 28
128. Benveniste, R., Davies, J.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1973) 70 2276
129. Davies, J.: ASM News (1986) 52, 620
130. Yamamoto, H., Hotta, K., Okami, Y., Umezawa, H.: J.Antibiot. (1982) 35, 1020
131. Piendl, W., Bock, A., Cundliffe, E.: Mol.gen.Genet. (1984) 197, 24

132. Nakano, M.M., Mashiko, H., Ogawara, H.; J.Bacteriol. (1984) 157, 79
133. Cramer, R., Davies, J.E.; J.Antibiot. (1986) 39, 128
134. Malpartida, F., Hopwood, D.A.; Nature (1984) 309, 462
135. Stanzak, R., Matsushima, P., Baltz, R.H., Rao, R.N.; Biotechnology (1986) 4, 229
136. Fishman, S.E., Cox, K., Larson, J.L., Reynolds, P.A., Seno, E.T., Yeh, W.K., Van Frank, R., Hershberger, C.L.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1987) 84, 8248
137. Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G., Omura, S.; Nature (1985) 314, 642
138. Floss, H.G.; Trends in Biotech. (1987) 5, 111
139. Berdy, J., Jarai, M.; Process Biochem. (1986) June, 93
140. Demain, A.L.; Ann.NY Acad.Sci.(1974) 235, 601
141. Kase, H., Odakura, Y., Takazawa, Y., Kitamura, S., Nakayama, K.; u "An International Conference on Trends in Antibiotic Research, Genetics, Biosynthesis, Action and New Substances"; Tokyo (1982) 195
142. Salas, J.A., Cundliffe, E.; J.Gen.Microbiol. (1985) 131, 451
143. Gottlieb, D.; J.Antibiot. (1976) 29, 987
144. Szobo, J., Benedek, A., Barabas, G.; App.Env.Microbiol. (1985) 50, 438
145. Cundliffe, E.; Nature (1978) 272, 792
146. Cundliffe, E., Thompson, J.; Nature (1979) 278, 859
147. Graham, M.Y., Weisblum, B.; J.Bacteriol. (1979) 137, 1464
148. Piendl, W., Bock, A., Cundliffe, E.; Mol.gen.Genet. (1984) 197, 24
149. Thompson, J., Skeggs, P.A., Cundliffe, E.; Mol.gen.Genet. (1985) 201, 168
150. Skeggs, P.A., Thompson, J., Cundliffe, E.; Mol.gen.Genet. (1985) 200, 415

151. Skeggs, P.A., Holmes, D.J., Cundliffe, E.; J.Gen.Microbiol. (1987) 133, 915
152. Nakano, M.M., Ogawara, H.; u "Genetics of Industrial Microorganisms", Fifth International Symposium, Split (1986) 177
153. Blanco, G.M., Hardisson, C., Salas, J.A.; J.Gen.Microbiol. (1984) 130, 2883
154. Blanco, G.M., Rosa, J., Hardisson, C., Salas, J.A.; u "Genetics of Industrial Microorganisms", Fifth International Symposium, Split (1986) 159
155. Cundliffe, E.; u "Genetics of Industrial Microorganisms", Fifth International Symposium, Split (1986) 199
156. Glockner, C., Wolf, H.; FEMS Microbiol.Lett. (1984) 25, 121
157. Wittman-Liebold, B.; u "Structure, Function and Genetics of Ribosomes" ed. B.Hardesty, G.Kramer, Springer-Verlag (1986) 326
158. Pierro, J.F., Parra, F., Quiros, L.M., Hardisson, C., Salas, J.A.; FEMS microbiol.Lett. (1987) 41, 283
159. Misumi, M., Nishimura, T., Komai, T., Tanaka, N.; Biochem.Biophys.Res.Comm. (1978) 84, 358
160. Klagsbrun, M.; J.Biol.Chem. (1973) 248, 2512
161. Bjork, G.; u "Escherichia coli and Salmonella typhymurium: Cellular and Molecular Biology" Vol.1; ed. J.L.Ingraham, K.Brooks Low, B.Magasanik, M.Schaehter, H.E.Umbarger; ASM (1987) 719
162. Beauclerk, A.A.D., Cundliffe, E.; J.Mol.Biol. (1987) 193, 661
163. Woese, C.R., Gutell, R.R., Gupta, R., Noller, H.F.; Microbiol.Rev. (1983) 47, 621
164. Brimacombe, R., Stiege, W.; Biochem.J. (1985) 229, 1
165. Ofengand, J., Ciesiolka, J., Denman, R., Nurse, K.; u "Structure, Function and Genetics of Ribosomes" ed. B.Hardesty, G.Kramer, Springer-Verlag (1986) 473



