

PA 21402

UNIVERZITET U BEOGRADU
Biološki fakultet



Sandra Vojnović

**REGULACIJA EKSPRESIJE *kgmB* GENA
BAKTERIJE
*Streptomyces tenebrarius***



Doktorska disertacija

Beograd, 2011.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
'СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ'-БЕОГРАД

И. Бр. 167708



MENTORI:

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

dr Đorđe Fira, vanredni profesor
Biološki fakultet, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

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

dr Đorđe Fira, vanredni profesor
Biološki fakultet, Beograd

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

DATUM ODBRANE:

Mom tati...

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Ovom prilikom želim da se zahvalim dr Branki Vasiljević na ukazanom poverenju i pruženoj šansi da se oprobam na polju nauke, korisnim savetima koji su pomogli da se ovaj rad realizuje, kao i na kritičkom čitanju i oceni ovog rada.

Zahvaljujem se dr Ivani Morić na podršci, kritičkoj oceni i nesebičnoj pomoći tokom pisanja ne samo ovog, već i drugih mojih radova.

Dr Đorđu Firi se zahvaljujem na savetima i kritičkoj oceni ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem najpre svojim kolegama iz laboratorije Nadi, Tanji, Sanji, Lidiji, Jasmini i Saši, a potom i bivšim članovima naše laboratorijske družine, kao i ostalim članovima IMGGI, na svakoj vrsti pomoći i lepoj atmosferi u kojoj je bilo zadovoljstvo raditi.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj koleginici „velikoj“ Tanji, koja je bila moja podrška od prvog dana. Drago mi je što sam baš sa njom delila uzbudljive trenutke u iščekivanju i tumačenju rezultata, tugovala zbog neuspeha, ali se i radovala svakom uspehu u našoj neprekidnoj borbi sa izazovima na polju nauke.

Prof. Udo Bläsi i dr Armin Resch su mi omogućili da svoje znanje proverim i dalje usavršim, te im se ovim putem zahvaljujem.

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

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

Mojim momcima, Viktoru i Igoru, neizmerno hvala na strpljenju i velikom razumevanju za moje često "nemanje vremena".

APSTRAKT

Bakterija *Streptomyces tenebrarius*, proizvođač nebramicinskog kompleksa aminoglikozidnih antibiotika, štiti se od sopstvenih toksičnih proizvoda i pomoću modifikacije ribozoma. Metilacijom specifičnih nukleozida u okviru 16S rRNK, čime je onemogućeno vezivanje aminoglikozida za njegov target, tj. 30S ribozomalnu subjedinicu, postiže se visok nivo rezistencije. Za ovaj fenomen su odgovorne S-adenozil-L-metionin (SAM) zavisne 16S rRNK metiltransferaze (MTaze) kakva je i KgmB MTaza iz bakterije *S. tenebrarius*. Smatra se da za postizanje potpune zaštite nije neophodna maksimalna ekspresija gena, tj. da je svega nekoliko molekula funkcionalnog enzima potrebno da se modifikuju sve 30S ribozomalne subjedinice. Zbog toga je postojanje mehanizama negativne autoregulacije ekspresije, kao načina da se koncentracija enzima održi na konstantnom i vrlo niskom nivou, sasvim očekivano.

Model translacione autoregulacije *kgmB* gena, zasnovan na *in vivo* i *in silico* analizama, pretpostavlja da KgmB MTaza prepoznaje isti motiv (ili više motiva) unutar 16S rRNK, koji je prisutan i u okviru 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK. Po ovom modelu bi se KgmB MTaza, nakon što izvrši modifikaciju svog primarnog targeta (16S rRNK), vezivala za sekundarni target, sopstvenu iRNK, onemogućavala inicijaciju translacije i tako sprečavala sopstvenu ekspresiju.

U ovom radu je testirana hipoteza o mehanizmu regulacije ekspresije *kgmB* gena, primenom različitih *in vitro* i *in vivo* tehnika. Eksperimenti usporene elektroforetske pokretljivosti su pokazali da se KgmB MTaza sa podjednakom efikasnošću, tj. malim afinitetom, vezuje za sve analizirane RNK. Na osnovu rezultata „footprint“ eksperimenata nije bilo moguće precizno definisati mesto vezivanja KgmB MTaze unutar 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK. Rezultati „toeprint“ eksperimenata nisu omogućili da se pouzdano odredi mesto vezivanja ribozoma za 5'UTR region na *kgmB* iRNK, kao ni da se definiše precizan mehanizam regulacije *kgmB* gena. Postoji značajna homologija između KgmB MTaze i Sgm MTaze iz bakterije *Micromonospora zionensis*, na strukturnom i funkcionalnom nivou. Zbog toga je *in vitro* mapiranjem pomoću različitih RNaza analizirano postojanje sekundarnih struktura na *kgmB* i *sgm* iRNK. Pokazano je da specifična sekundarna struktura, najpre određena *in silico*, u okviru 5'UTR regiona na *sgm* iRNK postoji, dok kod 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK rezultati ovog eksperimenta nisu potvrdili *in silico* predikciju. Translaciona autoregulacija *kgmB* i *sgm* gena je testirana u komercijalnom „cell-free“ sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju gde je pokazano da obe MTaze reprimiraju sintezu odgovarajućeg fuzionog proteina. Na osnovu rezultata svih opisanih eksperimenata se može zaključiti da KgmB i Sgm MTaza pokazuju sposobnost autoregulacije, ali i da je mehanizam odgovoran za ovaj fenomen mnogo kompleksniji od ranije predloženog.

Ključne reči: aminoglikozidi; rezistencija; metiltransferaze; regulacija

ABSTRACT

Streptomyces tenebrarius, the producer of nebramicin complex of aminoglycoside antibiotics, utilizes methylation of ribosomes as a mean of self-protection. Through methylation of specific nucleosides within the tRNA acceptor aminoacyl site of 16S rRNA, which impedes binding of aminoglycosides to the 30S ribosomal subunit, S-adenosyl-L-methionine-dependant 16S rRNA methyltransferases (MTase), such as KgmB MTase from *S. tenebrarius* confer a high-level resistance to aminoglycosides. The level of antibiotic resistance is not usually related to MTase gene dosage and expression of relatively few enzyme molecules is sufficient for complete modification of the target. A negative autoregulatory system may be involved in maintaining both constant and low concentrations of this protein.

The model for translational autoregulation of KgmB MTase, based on *in vivo* studies and *in silico* prediction, suggests that KgmB MTase recognizes the same sequences and/or structure within 16S rRNA and 82 nucleotides long 5' untranslated region (5' UTR) on its own mRNA, and that is capable of preventing further translation if interacts with these sequences.

Our aim was to further elucidate the mechanism of translational autoregulation of KgmB MTase, using different *in vitro* and *in vivo* techniques. Electromobility shift assays revealed that KgmB MTase binds to all tested RNAs, with low affinity. RNA footprinting studies failed to indicate the exact position of KgmB binding to the *kgmB* 5'UTR. Toeprinting results were not clear enough to provide the evidence, beyond reasonable doubt, for KgmB interference with ribosomal binding. As Sgm MTase from *Micromonospora zionensis* exhibits similar mechanism of autoregulation both the *kgmB* and *sgm* mRNA secondary structures were studied *in vitro* by enzymatic probing with different RNases. The analysis revealed disagreement with computer prediction for the *kgmB* 5'UTR, but supported computer prediction for the *sgm* 5'UTR. Results from cell-free translation experiments demonstrated that KgmB and Sgm MTase inhibit expression of *kgmB-lacZ* and *sgm-lacZ* gene fusions, respectfully. These findings confirm that KgmB and Sgm MTase do autoregulate themselves, but also indicate that mechanism for their translational autoregulation is more complex than it was previously proposed.

Keywords Aminoglycosides; Resistance; Methyltransferases; Regulation

SADRŽAJ

I UVOD	1
1. Inicijacija translacije kod bakterija	1
2. Regulacija na nivou inicijacije translacije	5
2. 1. Strukturni elementi na iRNK koji utiču na inicijaciju translacije	5
2. 2. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko <i>cis</i> -aktivnih elemenata na iRNK	7
2. 2. 1. Ribosvičevi	7
2. 2. 2. RNK termosenzori	12
2. 3. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko <i>trans</i> -aktivnih regulatora – RNK i proteina	15
2. 3. 1. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko antisens RNK	15
<i>Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko cis-kodiranih antisens iRNK</i>	17
<i>Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko trans-kodiranih antisens iRNK</i>	20
2. 3. 2. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije posredovana proteinima	24
<i>Regulacija inicijacije translacije putem kompeticije</i>	28
<i>Represija mehanizmom “klopke”</i>	32
3. 16r RNK metiltransferaze i rezistencija na aminoglikozidne antibiotike	34
3. 1. Sinteza proteina i antibiotici koji je inhibiraju	34
3. 1. 1. Antibiotici koji deluju na ribosome	35
3. 2. 16S rRNK metiltransferaze	40
3. 2. 1. “Housekeeping” metiltransferaze i rezistencija	40
3. 2. 2. 16S rRNK metiltransferaze bakterija koje proizvode aminoglikozide	41
3. 2. 3. Pojava 16S rRNK metiltransferaza kod patogenih bakterija	44

3. 3. Regulacija ekspresije gena za rRNK metiltransferaze	47
3. 4. Struktura i funkcija 16S rRNK metiltransferaza	49
II CILJ RADA	56
III MATERIJAL I METODE	57
1. Bakterijski sojevi i korišćeni plazmidi	57
2. Medijumi za rast bakterija	60
3. Transformacija <i>E. coli</i>	61
4. Mini metoda za izolaciju plazmidne DNK iz <i>E. coli</i>	62
5. Enzimske reakcije sa DNK	63
5. 1. Obrada DNK restrikcionim enzimima	63
5. 2. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK	63
5. 3. Ligiranje DNK fragmenata	64
6. Prečišćavanje DNK fenolom	64
7. Sinteza DNK reakcijom lančane polimerizacije (<i>eng.</i> Polymerase Chain Reaction, PCR)	64
8. Elektroforeza DNK i RNK	67
9. Elucija DNK i RNK iz gela	68
10. Sekvenciranje DNK	69
11. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnih proteina	70
11. 1. Ekspresija proteina na velikoj skali i izolovanje ukupnih proteina iz <i>E. coli</i>	70
11. 2. Prečišćavanje rekombinantnih proteina metal afinitetnom hromatografijom pod nativnim uslovima	71
11. 3. Dijaliza proteina	71
11. 4. Ekstrakti kultura iz kojih su prečišćavani His ₆ -KgmB i His ₆ -Sgm fuzioni proteini	71
12. Analiza proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektrogorezom	72
13. Određivanje koncentracije proteina	73

14. Ispitivanje interakcije RNK i Sgm proteina metodom usporene elektroforetske pokretljivosti ili EMSA (<i>eng.</i> electrophoretic mobility shift assay)	73
14. 1. Pripremanje DNK matrice za <i>in vitro</i> transkripciju	73
14. 2. Sinteza RNK reakcijom <i>in vitro</i> transkripcije sa T7 RNK polimerazom	75
14. 3. Defosforilacija 5' kraja RNK molekula	75
14. 4. Radioaktivno obeležavanje RNK molekula	76
14. 5. Vezivanje proteina za RNK probu i određivanje koncentracije proteina koja dovodi do nastanka vidljivog protein-RNK kompleksa	76
14. 6. Vezivanje proteina za RNK u prisustvu specifičnog i nespecifičnog kompetitora	77
15. "Filter binding" esej	77
16. "Toeprint" esej	78
16. 1. Radioaktivno obeležavanje prajmera	78
16. 2. Priprema 30S ribozomalnih subjedinica	79
16. 3. "Toeprint" reakcija	80
16. 4. Didezoksisekvenciranje RNK	81
17. "Footprint" esej sa RNazom T1	82
18. Mapiranje sekundarnih struktura	83
19. <i>In vitro</i> transkripcija i translacija u sistemu <i>E. coli</i>	85
20. Test β -galaktozidaze	86

IV REZULTATI **87**

1. Ispitivanje interakcije His ₆ -KgmB proteina i <i>kgmB</i> RNK metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)	89
1. 1. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina za <i>kgmB</i> RNK dužine 114 nt	89
1. 1. 1. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina za mRS <i>kgmB</i> RNK (CGUCA→GAUCC) u prisustvu kompetitora	90

1. 1. 2. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina za mRS' <i>kgmB</i> RNK (CGCCC→AUAAA) u prisustvu kompetitora	92
1. 1. 3. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina za ΔΔ <i>kgmB</i> RNK (CGUCA→GAUCC, CGCCC→AUAAA) u prisustvu kompetitora	94
1. 2. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina za kratke <i>kgmB</i> RNK	96
1. 3. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina za wt <i>kgmB</i> RNK dužine 114 nt u prisustvu S-adenozil-metionina (SAM)	99
1. 4. Vezivanje His ₆ -KgmB proteina iz S30 frakcije za wt <i>kgmB</i> RNK dužine 114 nt	100
2. Ispitivanje interakcije His ₆ -KgmB proteina i RNK „filter binding“ metodom	103
3. Ispitivanje interakcije His ₆ -KgmB proteina i RNK „toeprint“ metodom	104
4. Ispitivanje interakcije His ₆ -KgmB proteina i wt <i>kgmB</i> RNK "footprint" metodom sa Rnazom T1	109
5. Mapiranje sekundarne strukture na 5' kraju RNK molekula parcijalnom digestijom RNazama	110
5. 1. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja wt <i>kgmB</i> RNK analiziranjem produkata reverzne transkripcije	111
5. 2. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja wt <i>kgmB</i> i <i>sgm</i> RNK analiziranjem produkata parcijalne digestije RNazama	113
5. 2. 1. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja wt <i>kgmB</i> iRNK	113
5. 2. 2. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja <i>sgm</i> iRNK	115
6. Ispitivanje negativne autoregulacije <i>kgmB</i> i <i>sgm</i> gena u sistemu za <i>in vitro</i> transkripciju i translaciju <i>E. coli</i>	117
6. 1. Ispitivanje negativne autoregulacije <i>kgmB</i> i <i>sgm</i> gena u sistemu za <i>in vitro</i> transkripciju i translaciju <i>E. coli</i>	117
7. Ispitivanje negativne autoregulacije <i>kgmB</i> gena <i>in vivo</i>	120
8. Ispitivanje negativne autoregulacije <i>grmA</i> gena <i>in vivo</i>	122

V DISKUSIJA	125
VI ZAKLJUČCI	158
VII REFERENCE	161

I UVOD

Od presudne važnosti za normalno odvijanje životnog ciklusa bakterija je brz i precizan odgovor na sve promene u spoljašnjoj sredini, koji se postiže regulacijom genske ekspresije. Iako je za bakteriju najekonomičnija regulacija genske ekspresije na transkripcionom nivou, značajan broj esencijalnih gena je regulisan na nivou translacije i to u fazi njene inicijacije.

1. Inicijacija translacije kod bakterija

Inicijacija translacije kod bakterija se odvija u nekoliko sukcesivnih koraka tokom kojih 30S ribozomalna subjedinica, uz pomoć faktora inicijacije (IF1, IF2 i IF3 (Gualerzi *et al.*, 2001)), interaguje sa dve vrste RNK (iRNK i inicijatorskom tRNK^{fmet}), što na kraju dovodi do formiranja 30S inicijatorskog kompleksa (Laursen *et al.*, 2005). Sekvenca i struktura iRNK definišu način na koji će se ovaj proces dešavati kao i efikasnost i učestalost translacije. Najpre 30S ribozomalna subjedinica prepoznaje iRNK i vezuje se za nju na način koji omogućava da se AUG start kodon pravilno usmeri ka peptidil-tRNK mestu (P mesto) na 30S ribozomalnoj subjedinici. Potom sledi pozicioniranje AUG start kodona u P mesto i njegova interakcija sa antikodonom na inicijatorskoj tRNK (tRNK^{fmet}) čime se formira 30S inicijatorski kompleks. Poslednji korak je vezivanje 50S ribozomalne subjedinice čime se formira 70S inicijatorski kompleks, nakon čega sledi faza elongacije. Uloga faktora inicijacije u opisanom procesu je višestruka – između ostalog, IF1 faktor se vezuje za A mesto (*eng.* tRNA acceptor aminoacyl site) na 30S ribozomalnoj subjedinici i verovatno onemogućava prerano vezivanje elongatorske tRNK (Dahlquist and Puglisi, 2000), dok IF2 stimuliše kodon-antikodon interakciju pomažući vezivanje inicijatorske tRNK^{fmet} za P mesto na ribozomu (Brandi *et al.*, 2004), a IF3 faktor je kontrolor tačnosti sinteze proteina, s obzirom da destabilizuje sparivanje kodona sa neadekvatnim antikodonima (Laursen *et al.*, 2005).

Ključno pitanje u pokušaju da se na adekvatan način objasni inicijacija translacije je način na koji ribozomi razlikuju start kodon u odnosu na druge identične kodone. Kod prokariota, procesi transkripcije i translacije su u sprezi, s obzirom da se ribozomi vezuju za iRNK još u fazi njene sinteze. Postoji više modela koji nude objašnjenje složenog procesa inicijacije translacije (Boni, 2006), a po kanonskom modelu je za vezivanje ribozoma i otpočinjanje translacije od presudnog značaja interakcija između Shine-Dalgarno sekvence (SD) na iRNK, pozicionirane uzvodno u odnosu na AUG start kodon, i anti-SD sekvence, koja se nalazi u okviru 3' regiona na 16S rRNK i komplementarna je SD sekvenci (Jacob *et al.*, 1987; Shine and Dalgarno, 1974; Steitz and Jakes, 1975). Po ovom modelu efikasnost inicijacije translacije zavisi od stepena komplementarnosti između SD i anti-SD sekvence (Jackson, 2000; Kozak, 1999), a od značaja su još i dužina i sekvenca regiona na iRNK između SD sekvence i start kodona, priroda samog start kodona, kao i linearna forma mesta vezivanja ribozoma (*eng.* ribosomal binding site; RBS) (de Smit and van Duin, 1994a; Ringquist *et al.*, 1992; Shultzaberger *et al.*, 2001). U literaturi se često skraćena RBS koristi kao sinonim za SD sekvencu, što nije adekvatan naziv, s obzirom da RBS, deo iRNK koji je zaštićen ribozomom u fazi inicijacije translacije, obuhvata region od -20 do +15 u odnosu na start kodon (Schneider *et al.*, 1986). Ispravnije bi bilo region za otpočinjanje translacije (*eng.* translation initiation region; TIR) definisati kao region u okviru iRNK čije granice nisu jasno određene, a koji obuhvata sve elemente koji mogu da utiču na efikasnost inicijacije translacije na određenoj iRNK. Iako kod većine gena bakterije *Escherichia coli* SD sekvenca prethodi start kodonu pet do deset nukleotida (nt), postoje brojni primeri gena, čak izuzetno eksprimiranih, čiji 5' netranslatirani regioni (*eng.* untranslated region; UTR) na iRNK ne sadrži SD sekvencu, a među njima je i *rpsA* gen za S1 ribosomalni protein (Boni *et al.*, 2001). Dugogodišnje studije procesa sinteze proteina kod *E. coli* su pokazale da su ribozomi bakterije *E. coli* sposobni za inicijaciju translacije na različito struktuiranim TIR regionima, bilo da ovi regioni sadrže SD sekvencu ili ne, imaju linearnu formu ili sadrže različite sekundarne strukture. U *E. coli* je moguća čak i ekspresija sa iRNK koje nemaju 5'UTR tj. koje počinju samim start kodonom, tzv. "leaderless" iRNK (Wu and Janssen, 1997; Moll *et al.*, 2004). Postalo je jasno da kanonski model inicijacije translacije ne objašnjava adekvatno sve zapažene fenomene vezane za

inicijaciju translacije. Ukoliko se ribozom posmatra kao nukleoprotein moguće je pretpostaviti da se vezivanje 30S ribozomalne subjedinice i iRNK ne ostvaruje posredstvom samo RNK : RNK interakcija (SD : anti-SD), već da i protein : RNK interakcije imaju bitnu ulogu u ovom procesu (Boni, 2006). U prilog ovom zaključku idu i rezultati eksperimenata sa S1 ribozomalnim proteinom gde je pokazano da je njegovo prisustvo neophodno za translaciju svih iRNK u ćeliji (Sorensen *et al.*, 1998). S1 protein se preferencijalno vezuje za jednolančane regione na RNK koji sadrže uglavnom U- ili U(C)/A nukleotide (Boni *et al.*, 1991; Subramanian, 1983). Ovaj ribozomalni protein poseduje specifične strukturne domene označene kao “OB fold” (*engl.* oligonucleotide/oligosaccharide-binding motifs) (Bycroft *et al.*, 1997). Ova četiri visoko homologa domena R1-R4 dužine oko 80 amino kiselina iz C-terminalnog dela S1 proteina se u literaturi označavaju kao S1 motivi i prisutni su u brojnim RNK-vezujućim proteinima kako kod prokariota, tako i kod eukariota. Inicijacija translacije sa iRNK koje ne poseduju SD sekvencu se odvija upravo zahvaljujući S1 proteinu (Boni *et al.*, 2001; Tzareva *et al.*, 1994), a S1 protein je neophodan i za inicijaciju translacije čak i ako je prisutna kanonska SD sekvenca (Boni *et al.*, 2001; Komarova *et al.*, 2002). Uzevši u obzir sve navedene činjenice može se reći da su za inicijalno vezivanje ribozoma za RBS na iRNK odgovorni S1 ribozomalni protein i anti-SD sekvenca na 16S rRNK. Upravo je *rpsA* gen sa kog se eksprimira S1 protein primer gde kanonski model inicijacije translacije ne daje adekvatno objašnjenje, s obzirom da TIR region na ovoj iRNK zauzima kompleksnu strukturu i ne sadrži SD sekvencu, a opet se S1 protein sintetiše u značajnoj količini (Boni *et al.*, 2001). Sem *rpsA* gena postoje i drugi primeri, kao što je gen za treonil-tRNK sintetazu, gde je kompleksna forma TIR regiona u vidu stabilnih sekundarnih i čak tercijarnih struktura neophodna za uspešnu ekspresiju (Sacerdot *et al.*, 1998). Ovakvi TIR regioni se mogu smatrati analogima IRES sekvenci (*eng.* internal ribosome entry sites) koje su prisutne kod prokariotskih viralnih iRNK, a koje se zahvaljujući svojoj jedinstvenoj sekundarnoj strukturi savršeno prilagođavaju površini ribozoma (Boni *et al.*, 2001; Jenner *et al.*, 2005; Tchufistova *et al.*, 2003). Kod bakterija iz roda *Streptomyces* postoji veći broj gena koji se prepisuju u formi “leaderless” iRNK koje počinju neposredno start kodonom ili nekoliko nukleotida uzvodno od njega (Day and Janssen, 2004). Sve je više dokaza da su za

inicijaciju translacije u ovom slučaju odgovorni 70S ribozomi za koje može biti vezana tRNK^{fmet} u P mestu, a sinteza proteina sa “leaderless” iRNK u *E. coli* je jedinstven slučaj za translaciju u odsustvu S1 proteina (Moll *et al.*, 2002; O'Donnell and Janssen, 2002).

Uopšteno govoreći, visoko eksprimirana bakterijska iRNK sadrži sve ili neke od navedenih elemenata: start kodon, SD sekvencu (kod iRNK *E. coli* je GGAGG 7±2 nukleotida uzvodno od start kodona), niz pirimidinskih nukleotida koji služe kao “ribosome recognition site” preko S1 proteina (Boni *et al.*, 1991; Sengupta *et al.*, 2001), kao i specifične enhenser elemente uzvodno (O'Connor *et al.*, 1999) ili nizvodno od start kodona (Sprengart *et al.*, 1996), ali uzajamna zavisnost i značaj pobrojanih elemenata nije do kraja razjašnjena.

Zanimljivo je gledište gde je TIR region opisan kao deo iRNK sastavljen od preferencijalnih nukleotida, ali da njegova sekvenca nije jedinstvena. Ribozom prepoznaje TIR preko višestrukih interakcija, kooperativnih i kumulativnih istovremeno, što je odlika enzima sa širokom supstratnom specifičnošću (Nakamoto, 2007). Autor ovog rada potencira značaj pravilnog izbora start kodona za sintezu proteina, slično kao u kanonskom modelu inicijacije translacije, ali veliki značaj daje i sklonosti iRNK da zauzima složene i stabilne sekundarne i tercijarne strukture. Ključni parametar za vezivanje ribozoma bi bio dostupnost start kodona u poređenju sa drugim identičnim kodonima. Ovaj mehanizam pretpostavlja da sekundarna struktura iRNK sprečava pristup većini kodona za metionin koji nisu inicijatorski, dok je omogućen pristup pravom TIR regionu gde se finalno prepoznavanje od strane ribozoma dešava zahvaljujući kooperativnosti i kumulativnoj specifičnosti više mesta za vezivanje liganada na ribozomima, što opet doprinosi širokoj supstratnoj specifičnosti ribozoma. Ukoliko je neki od kodona za metionin, sem start kodona, u linearnoj formi, onemogućena mu je funkcija start kodona lokalnim interakcijama okolnih nukleotida koje mogu biti tipa sterne smetnje, hidrofobnih ili hidrofilnih neusaglašenosti ili elektrostatičkog odbijanja. Da je reč o univerzalnom mehanizmu inicijacije sinteze proteina pokazuju rezultati eksperimenata gde su konstruisani hibridni sistemi eukariota/prokariota. Ovi eksperimenti su pokazali da su prokariotski signali za inicijaciju translacije očuvani i kod eukariotskih iRNK pošto su prokariotski ribozomi u stanju da sintetišu proteine sa ovih iRNK. Eukariotski ribozomi

takođe prepoznaju signale za inicijaciju translacije prokariota i uspešno otpočinju sintezu proteina, što navodi na zaključak da su eukariotski ribozomi isto tako očuvali mehanizam za inicijaciju translacije poreklom od prokariota (Nakamoto, 2007; Nakamoto, 2009).

2. Regulacija na nivou inicijacije translacije

Bakterije se konstantno prilagođavaju promenama spoljašnje sredine bilo da se radi o promeni temperature, dostupnosti hranjivih materija i vode, prisustvu toksičnih agenasa i sl. Iako se primarni mehanizam odgovora na stres ostvaruje preko regulacije ekspresije gena na transkripcionom nivou, regulacija translacije je brža i samim tim izuzetno važna. Post-transkripciona regulacija se ostvaruje ili preko kontrole stabilnosti iRNK ili na nivou inicijacije translacije. Za razliku od dugoživećih RNK kao što su rRNK ili tRNK, kod bakterija se većina iRNK brzo degraduje, u roku od jednog do tri minuta po sintezi. Opstanak svake iRNK zavisi kako od strukture samog molekula tako i od kompleksne mašinerije koja učestvuje u degradaciji iRNK do jediničnih komponenti. Inicijacija translacije je najčešće podložna regulaciji mada ima primera regulacije kako elongacije tako i terminacije translacije.

2.1. Strukturni elementi na iRNK koji utiču na inicijaciju translacije

Start kodon je jedan od osnovnih strukturnih elemenata svake iRNK i selekcija AUG ili alternativnih start kodona je prvi korak u procesu inicijacije translacije. Translacija je manje efikasna kada se AUG start kodon zameni nekim od alternativnih start kodona, što se objašnjava slabijom interakcijom sa inicijatorskom tRNK^{fmet}. Translacija u slučaju kada je prisutan AUU start kodon je izuzetno neefikasna, a interesantno je da sinteza faktora inicijacije IF3 otpočinje upravo ovim kodonom, što omogućava specifičan mehanizam regulacije genske ekspresije. Ukoliko je nivo faktora inicijacije IF3 u ćeliji nizak, inicijacija translacije sa nestandardnih kodona će biti pojačana, što će dovesti do porasta koncentracije samog IF3 proteina (Butler *et al.*, 1987). Kod većine bakterijskih iRNK je, unutar 5'UTR regiona, prisutna SD sekvenca i sparivanje četiri ili pet nukleotida iz SD sekvence sa anti-

SD sekvencom na 16S rRNK je dovoljno za efikasnu translaciju. Pokazano je da pojačavanje komplementarnosti ove dve sekvence nema uticaja na inicijaciju translacije ili je čak smanjuje (Komarova *et al.*, 2002). Jača SD : anti-SD interakcija doprinosi boljoj translaciji samo u slučaju kad je start kodon nije AUG (Weyens *et al.*, 1988) ili pak kada je SD sekvenca u okviru stabilne sekundarne strukture (de Smit and van Duin, 1994b). Pokazano je da regioni bogati sa U, A ili A/U nukleotidima, locirani uzvodno u odnosu na SD sekvencu, imaju stimulatorni efekat na inicijaciju translacije (Zhang and Deutscher, 1992). S obzirom na veliki uticaj sekundarnih struktura unutar 5'UTR regiona na inicijaciju translacije, moguće je da se u ovom slučaju radi o posrednom delovanju, odnosno da je inicijacija translacije olakšana zbog nemogućnosti formiranja ovakih sekundarnih struktura. Međutim, postoji i mogućnost da je za ovaj fenomen odgovoran ribozomalni protein S1, tj. ranije pomenuti efekat enhenser elemenata.

S obzirom da je većina iRNK kod bakterija policistronska, postoje primeri gde je translacija dva susedna cistrona spregnuta. U najvećem broju slučajeva ispred drugog cistrona postoji kanonska SD sekvenca koja je privremeno blokirana, pošto je u okviru stabilne sekundarne strukture, i sama translacija uzvodnog cistrona dovodi do rasplitanja sekundarne strukture, te RBS postaje funkcionalan i kreće translacija nizvodnog cistrona (Butkus *et al.*, 2003; Chen and Yanofsky, 2004). Postoje retki primeri gde nizvodni cistron ne sadrži RBS, ali se po završetku translacije uzvodnog cistrona, doduše sa malom efikasnošću, inicira translacija nizvodnog cistrona (Inokuchi *et al.*, 2000). Kod bakterija nije redak primer da se stop kodon jednog gena preklapa sa start kodonom sledećeg (UGAUG) što olakšava reinicijaciju translacije (Sprengel *et al.*, 1985). Spregnutom translacijom je moguće koordinisati i ekspresiju više gena, kao što je primer gena za neke ribozomalne proteine gde se ekspresija više proteina može regulisati u isti mah, zahvaljujući jednoj kontrolnoj tački, ali spregnuta translacija ne znači obavezno da će finalni proteini biti zastupljeni u jednakoj količini (Yu *et al.*, 2001).

Za razliku od inicijacije translacije, na koju u ogromnoj meri utiče prisustvo sekundarnih struktura unutar 5'UTR regiona, ovakve strukture u kodirajućem delu iRNK skoro da nemaju efekat na sintezu proteina, i najviše što mogu je da privremeno uspore elongaciju (Takyar *et al.*, 2005).

2.2. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko *cis*-aktivnih elemenata na iRNK

Regulacija genske ekspresije kod bakterija se delom ostvaruje i zahvaljujući izvanrednoj sposobnosti iRNK da formira različite strukture kao odgovor na brojne stimulse. Regulatorni elementi odgovorni za modulaciju ekspresije jednog ili više nizvodnih gena su najčešće prisutni unutar 5'UTR regiona na iRNK. Ovi RNK senzori obično zauzimaju kompleksne trodimenzionalne strukture i podležu konformacionim promenama u prisustvu hemijskog (ribosvičevi) ili fiziološkog signala (termosenzori).

Ribosvičevi su vrsta senzornih kontrolnih elemenata koji po vezivanju specifičnog metabolita menjaju konformaciju i utiču na terminaciju transkripcije i inicijaciju translacije. Na ovaj način se nivo sinteze enzima koji učestvuju u metaboličkom putu mehanizmom povratne sprege prilagođava unutarćelijskoj koncentraciji metabolita.

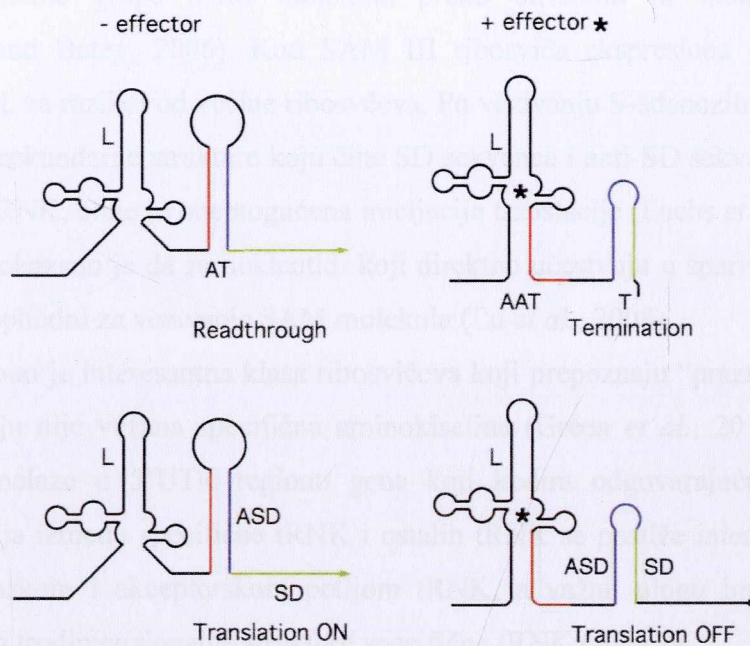
Termosenzori sadrže sekundarne strukture koje blokiraju SD sekvencu, a time i onemogućavaju pristup maloj ribozomalnoj subjedini. Ukoliko dođe do porasta temperature termosenzori se delimično "raspliću" što omogućava formiranje stabilnog inicijatorskog kompleksa.

2.2.1. Ribosvičevi

Saznanje da je gensku ekspresiju moguće kontrolisati preko RNK senzora prisutno je u nauci tek jednu deceniju. Zbog toga je i iznenađujući podatak da je kod roda *Bacillus* najmanje 2% gena, koji kontrolišu fundamentalne metaboličke procese, regulisano ribosvičevima (Mandal *et al.*, 2003). Ribosvičevi regulišu metaboličke puteve kao što je biosinteza i transport vitamina (riboflavin, tiamin i kobalamin), metabolizam metionina, lizina, purina, a deluju i kao senzori jona, npr. Mg^{2+} jona (Dann *et al.*, 2007; Serganov and Patel, 2007). Do danas je otkriveno oko 20 različitih klasa ribosvičeva, a za mnoge od njih su određene i trodimenzionalne (3D) strukture u kompleksu sa njihovim ligandima (Serganov, 2010). U većini slučajeva ribosvičevi sadrže dva modula, gde je prvi modul,



često označen kao aptamer, visoko konzervisan strukturni receptor koji specifično prepoznaje ligand u obliku malog molekula, a drugi modul je takozvana ekspresiona platforma (slika 1).



Slika 1. Osnovni model standardnog ribosviča koji vezuje mali metabolit (Henkin, 2008).

Prikazano je kako, u odsustvu efektor, tj. liganda, aptamer zauzima takav strukturni aranžman koji omogućava transkripciju ili translaciju. U prvom slučaju se formira specifični antiterminator (AT) zahvaljujući kojem RNK polimeraza može da prođe kroz dati region i nastavi sintezu RNK, a u drugom slučaju je SD sekvenca u linearnoj formi, omogućeno je vezivanje ribozoma i inicijacija translacije. Po vezivanju efektor, struktura aptamera se menja, što dovodi do formiranja sekundarne strukture tipa ukosnice koja predstavlja terminator transkripcije (T) ili strukturu unutar koje je zarobljena SD-sekvenca i time onemogućena inicijacija translacije.

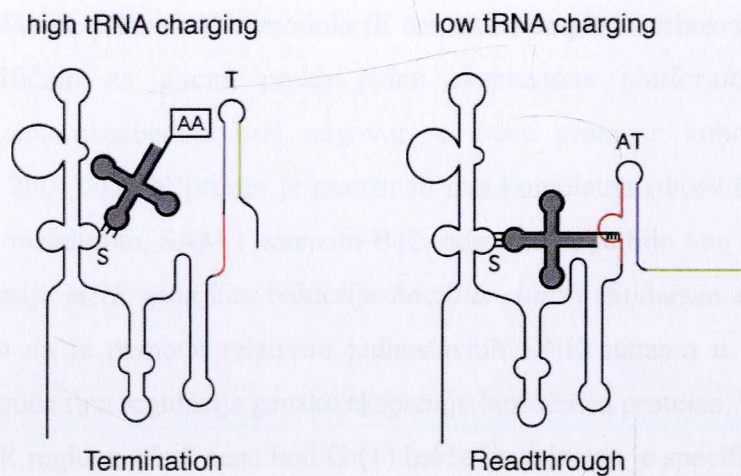
Vezivanje liganda dovodi do strukturne promene prvog modula, što se prenosi do ekspresione platforme i rezultuje u većini slučajeva formiranjem sekundarne strukture tipa ukosnice koja kontroliše ekspresiju gena. U većini slučajeva ribosvičevi funkcionišu kao OFF prekidači gde vezivanje liganda dovodi do formiranja terminatora i zaustavljanja transkripcije ili se po vezivanju liganda formira ukosnica u kojoj je zarobljena SD sekvenca, što sprečava inicijaciju translacije (Gilbert and Batey, 2006; Serganov and Patel, 2007; Winkler and Breaker, 2005). U ovom primeru je ligand krajnji produkt biosintetskog puta u kome učestvuju geni čiju ekspresiju kontrolišu ribosvičevi po principu povratne sprege te kad koncentracija metabolita u ćeliji pređe prag dolazi do njegovog vezivanja za ribosvič. Redi su primeri gde ribosvič funkcioniše kao ON prekidač kada, po vezivanju liganda, dolazi do takve konformacione promene u iRNK koja omogućava ekspresiju gena. Ribosvič koji vezuje glicin i reguliše ekspresiju *gcvT* operona kod bakterije *Bacillus subtilis* funkcioniše na ovaj način (Mandal *et al.*, 2004).

Pošto su kod većine ribosvičeva modul koji vezuje ligand i ekspresiona platforma odvojeni, njihovim kombinacijama se postižu različiti nivoi regulacije ekspresije gena. Ovo je najbolje ilustrovano kod TPP ribosviča koji vezuje tiamin pirofosfat (TPP) i reguliše gene koji učestvuju u metabolizmu tiamina. TPP ribosvič je pronađen kod predstavnika prokariota, arhea i eukariota i reguliše ekspresiju gena na nivou terminacije transkripcije, inicijacije translacije i obrade iRNK (Cheah *et al.*, 2007; Kubodera *et al.*, 2003; Miranda-Rios *et al.*, 2001; Mironov *et al.*, 2002; Sudarsan *et al.*, 2003). Struktura modula koji vezuje TPP je kod svih TPP ribosvičeva konzervisana (Edwards and Ferre-D'Amare, 2006; Serganov *et al.*, 2006; Thore *et al.*, 2006), ali način na koji ovaj ribosvič reguliše ekspresiju gena varira u zavisnosti od ekspresione platforme.

Metabolizam sumpora je kod mnogih bakterija regulisan ribosvičevima koji selektivno prepoznaju S-adenozilmetionin (SAM) ili S-adenozinhomocistein (SAH), iako se razlikuju u samo jednoj metil grupi. Do sada je otkriveno pet različitih strukturnih klasa ribosvičeva za SAM (Corbino *et al.*, 2005; Epshtein *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2006; McDaniel *et al.*, 2003; Poiata *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2003), kao i jedna klasa ribosvičeva koja prepoznaje SAH (Wang and Breaker, 2008). Prve tri klase – SAM-I, SAM-II i SAM-III formiraju različite vezujuće džepove za ligand, dok su kod klase

SAM-IV nukleotidi i podstrukture u vezujućem džepu identični onima u klasi SAM-I, a kod klase SAM-V postoji sličnost sa ligand vezujućim džepom klase SAM-II. Ovi ribosvičevi zauzimaju kompleksnu 3D konformaciju zahvaljujući kojoj se prepoznaju skoro sve funkcionalne grupe SAM molekula preko direktnih ili indirektnih interakcija (Montange and Batey, 2006). Kod SAM III ribosviča ekspresiona platforma direktno vezuje ligand, za razliku od većine ribosvčeva. Po vezivanju S-adenozilmetionina dolazi do stabilizacije sekundarne strukture koju čine SD sekvenca i anti-SD sekvenca locirana skoro na 5' kraju iRNK, čime je onemogućena inicijacija translacije (Fuchs *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2007). Pokazano je da su nukleotidi koji direktno učestvuju u sparivanju SD : anti-SD sekvenci neophodni za vezivanje SAM molekula (Lu *et al.*, 2008).

Posebno je interesantna klasa ribosvičeva koji prepoznaju "praznu" tRNK odnosno tRNK za koju nije vezana specifična aminokiselina (Green *et al.*, 2010). Obično se ovi ribosvičevi nalaze u 5'UTR regionu gena koji kodira odgovarajuću tRNK sintetazu. Diskriminacija između specifične tRNK i ostalih tRNK se postiže interakcijama ribosviča sa antikodonskom i akceptorskom petljom tRNK, a važnu ulogu ima i prepoznavanje ostalih odlika trodimenzionalne strukture specifične tRNK (slika 2).



Slika 2. Mehanizam delovanja tRNK ribosviča (Henkin, 2008).

Ukoliko sa ribosvičem interaguje tRNK koja nosi odgovarajuću aminokiselinu favorizovano je formiranje terminatora i transkripcija nizvodnog gena staje. Ukoliko se interakcija ostvaruje sa praznom tRNK favorizovano je formiranje antiterminatora, RNK polimeraza prolazi i transkripcija nizvodnog gena se nastavlja.

U slučaju da se u ćeliji nagomila “prazna” tRNK, dolazi do povećane ekspresije gena, zahvaljujući čijim produktima se specifična aminokiselina vezuje za adekvatnu tRNK. Bitna razlika između tRNK ribosviča i ostalih ribosvičeva je činjenica da ovde postoji interakcija sa dve forme liganda i da tRNK koja nosi odgovarajuću aminokiselinu funkcioniše kao kompetitor vezivanju “prazne” tRNK. Na ovaj način se prati odnos između supstrata i produkta, a ne samo prisustvo supstrata (Yousef *et al.*, 2005), što ima smisla, ukoliko se uzme u obzir podatak da se ukupna količina tRNK u jednoj bakterijskoj ćeliji ne menja i da je zapravo relevantan parametar količina tRNK koje nose aminokiselinu.

Bakterijski genom može da sadrži ribosvičeve koji su specifični za različite metabolite kao i nekoliko ribosvičeva istog tipa, od kojih svaki reguliše različit operon.

Mnogo kompleksniji nivo genske regulacije se postiže u slučaju kad su na istoj iRNK, na susednim pozicijama, prisutna dva modula ili čak dva kompletna ribosviča. Tako tandem aptamera specifičnih za glicin, preko jedne ekspresione platforme, kooperativnim vezivanjem glicina obezbeđuje brži odgovor na male promene koncentracije glicina (Mandal *et al.*, 2004). Drugi primer je aranžman dva kompletna ribosviča koji nezavisno vezuju različite metabolite, SAM i koenzim B12, gde vezivanje bilo kog od ta dva dovodi do genske represije *metE* gena kod bakterije *Bacillus clausii* (Sudarsan *et al.*, 2006). Ovi primeri ukazuju da je pomoću relativno jednostavnih RNK senzora u vidu tandemskih ribosvičeva moguća fina regulacija genske ekspresije bez učešća proteina.

U 5'UTR regionu *glmS* gena kod G (+) bakterija prisutan je specifičan ribosvič koji je, zbog sposobnosti samoisecanja, nazvan prvim bakterijskim ribozimom. Ukoliko je glukozamin-6-fosfat prisutan u suvišku, on će se vezati za ovaj ribosvič na iRNK za glutamin-fruktozo-6-fosfat amidotransferazu, doći će do samoisecanja iRNK na specifičnoj poziciji, njene degradacije i utišavanja *glmS* gena. Glukozamin-6-fosfat kao kofaktor aktivira ribozim, ali se po njegovom vezivanju ne dešava nikakva konformaciona promena ribozima, što se razlikuje od ostalih opisanih ribosvičeva (Tinsley *et al.*, 2007).

2.2.1. RNK termosenzori

Ravnoteža između alternativnih struktura unutar iRNK, koje se razlikuju po termodinamičkoj stabilnosti, u velikoj meri zavisi od temperature. Zahvaljujući ovoj pojavi sama sekundarna struktura, za koju nije vezan bilo koji ligand, može da funkcioniše kao termosenzor i kontroliše kako translaciju, tako i stabilnost iRNK (Kaberdin and Bläsi, 2006). Kod nekoliko različitih mikroorganizama se ovaj vid regulacije ekspresije javlja pri odgovoru na temperaturni šok, bilo da se temperatura smanjuje ili povećava (Gualerzi *et al.*, 2003; Narberhaus *et al.*, 2006). Većina termosenzora je locirana unutar 5'UTR regiona i obuhvata RBS, pri čemu je SD sekvenca zarobljena unutar stabilne sekundarne strukture. Usled porasta temperature dolazi do delimičnog „topljenja“ sekundarne strukture, omogućen je prilaz ribozomu i otpočinje translacija. Na ovaj način je regulisana ekspresija *rpoH* gena iz *E. coli* koji kodira „heat-shock“ sigma faktor σ^{32} (Morita *et al.*, 1999a; Morita

et al., 1999b). Zahvaljujući kratkotrajnom povećanju količine sigma faktora σ^{32} dolazi do povećane sinteze „heat-shock“ proteina među kojima su većinom šaperoni i proteaze sa centralnom ulogom u „savijanju“ proteina, njihovoj translokaciji i degradaciji (Georgopoulos *et al.*, 1994; Hendrick and Hartl, 1993). Jedino odstupanje od opisanog modela po kom funkcionišu termosenzori je činjenica da u formiranju složene trodimenzionalne strukture koja onemogućava pristup ribozomima učestvuju dva regiona iz kodirajućeg dela *rpoH* gena.

„Heat-shock“ proteini rizobijalnih vrsta su regulisani na sličan način, ali neke „heat-shock“ operone kontrolišu i termosenzori u vidu konzervisanih regulatornih elementa nazvanih ROSE (*eng.* Repression Of heat Shock gene Expression). ROSE elementi zauzimaju stabilne sekundarne strukture zahvaljujući kojima je blokiran pristup TIR regionu nizvodnih gena. Porast temperature dovodi do strukturnog rearanžmana koji omogućava vezivanje ribozoma i translaciju gena koji su pod kontrolom ROSE elemenata. Vezivanje ribozoma i sam proces translacije štite iRNK od degradacije te je na višim temperaturama zabeležena veća količina ovih iRNK (Nocker *et al.*, 2001a).

Ekspresija gena za virulenciju kod patogenih bakterija u velikoj meri zavisi od temperature domaćina. Promena temperature menja nivo superspiralizacije DNK i posredno utiče na vezivanje regulatornih proteina odgovornih za modulaciju transkripcije, utiče na konformaciju samih regulatornih proteina (proteinskih termometara), a menja i konformaciju termosenzora. Kod bakterije *Yersinia pestis* prisustvo aktivatora LcrF varira u zavisnosti od temperature, a smatra se da je za ovo delom odgovoran termosenzor prisutan u okviru 5'UTR regiona *lcrF* gena, dok na transkripciju ovog gena temperatura nema nikakav uticaj (Hoe and Goguen, 1993). Na sličan način je regulisana i ekspresija *prfA* gena za virulenciju kod bakterije *Listeria monocytogenes*, ali je u ovom slučaju termosenzor u vidu jednostavne sekundarne strukture tipa ukosnice, za razliku od prethodno pomenutih termosenzora „heat-shock“ proteina koje odlikuje kompleksna građa (Johansson *et al.*, 2002).

Ako se temperatura snizi, transkripcija i translacija većine bakterijskih gena se smanjuju, možda čak i prestaju, za razliku od gena za „cold-shock“ proteine koji se preferencijalno i vremenski ograničeno eksprimiraju. „Cold-shock“ proteini bakterija su

primarno regulisani na posttranskripcionom nivou, dominantno preko kontrole stabilnosti iRNK, ali značajan udeo u regulaciji ekspresije ima i kontrola translacije (Gualerzi *et al.*, 2003). Pretpostavlja se da 5'UTR region *cspA* gena funkcioniše kao RNK termometar i kontroliše nivo translacije (Yamanaka, 1999). Na nivo translacije utiču i *trans*-aktivni elementi, prevashodno IF3, uz druge faktore inicijacije i CspA protein.

Ukoliko se uporede translacioni i transkripcioni nivoi ekspresije gena jasno je da kontrola translacije ima prednost ako se uzme u obzir brzina odgovora na temperaturne promene. Za bakteriju možda nije najekonomičnije da sintetiše iRNK sa kojih se ne aktivira sinteza proteina (ili čak iRNK koje će biti degradovane), ali opcija da se veoma brzo aktiviraju odgovor na stres ili geni za virulenciju svakako ima vrednost. Većina termometara je smeštena u 5'UTR regionu upravo da bi se izbegla nepotrebna translacija. Iako RNK termosenzori funkcionišu po jednostavnom principu, mnogi detalji ovog mehanizma ostaju za sada nerazjašnjeni (Narberhaus *et al.*, 2006). Među njima je svakako struktura do sada opisanih RNK termometara pošto je pokazano da se kompjuterska predikcija ROSE elemenata ne slaže u potpunosti sa eksperimentalnim rezultatima. Mnogo je nepoznanica i oko procesa topljenja RNK termometara. Većina RNK termometara ima kompleksnu građu i sadrži nekoliko struktura tipa ukosnice, a njihovi odnosi nisu do kraja poznati. Postoji indikacija da modularna organizacija *rpoH* i ROSE termometara ima funkcionalni značaj, a dodatna komplikacija je i činjenica da RNK termosenzori nemaju samo dve alternativne konformacije i da za razliku od ribosvičeva ne mogu da funkcionišu kao "on/off" prekidač. Pretpostavlja se da dinamika savijanja RNK ima presudnu ulogu i da RNK termosenzori prolaze kroz mnogo malih promena u strukturi koje se dešavaju u skladu sa temperaturnim gradijentom. Sam mehanizam kontrole translacije zahteva još eksperimentalnih potvrda, a i pitanje stabilnosti iRNK koje sadrže RNK termometre nije do kraja razjašnjeno. Pokazano je da su ove iRNK izrazito nestabilne i da se brzo degraduju ukoliko ne dođe do translacije, te ostaje nejasno zašto bakterija produkuje iRNK koju će degradovati (Nocker *et al.*, 2001b). Izgleda da je degradacija neiskorišćenih RNK senzora opšti princip, pošto su i iRNK koje sadrže neke ribosvičeve takođe izrazito nestabilne (Hoe and Goguen, 1993; Winkler *et al.*, 2004). Iako broj novootkrivenih RNK termometra iz dana u dan raste (Narberhaus, 2010), zanimljivo bi bilo otkriti nove RNK termometre kod

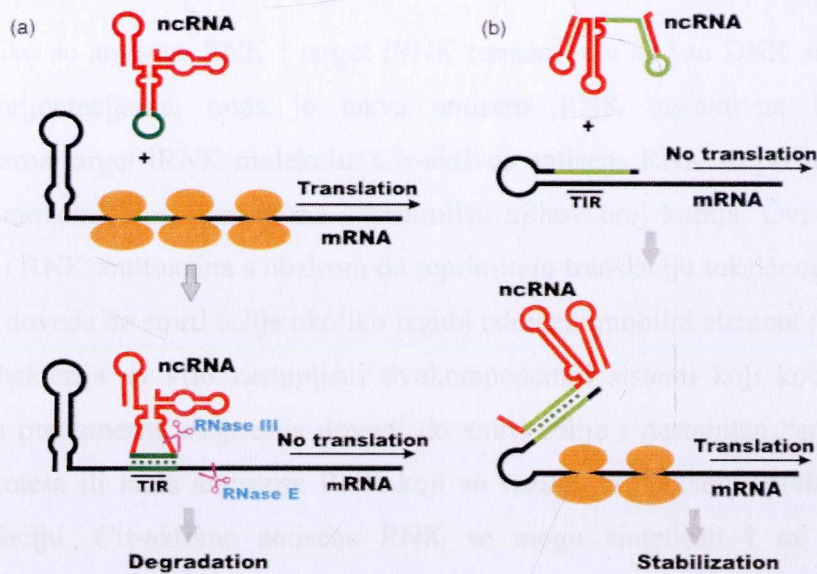
bakterija koje žive na izrazito visokim ili niskim temperaturama pošto se može očekivati da ove RNK termometre odlikuju potpuno nove strukture. Svi ovde navedeni RNK termosenzori kontrolišu pristup RBS regionu i time utiču na inicijaciju translacije, a bilo bi zanimljivo utvrditi da li ovi RNK regulatori mogu da kontrolišu i neke druge procese, s obzirom da druga grupa RNK regulatora, ribosvičevi, sem inicijacije translacije, kontrolišu i terminaciju transkripcije i aktivnost ribozima (Serganov, 2010).

2.3. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko *trans*-aktivnih regulatora - RNK i proteina

Najefikasniji mehanizam regulacije translacije kod bakterija je blokiranje pristupa ribozoma TIR regionu. Jedan od načina da se ovo postigne je formiranje sekundarnih struktura unutar kojih je zarobljena SD sekvenca, bilo da strukturu formira sama iRNK ili da je reč o sparivanju između iRNK i antisens RNK regulatora. Drugi način blokade TIR regiona se ostvaruje posredstvom RNK vezujućih proteina kao regulatora. Pri vezivanju proteina i antisens RNK za specifična mesta na iRNK dolazi do konformacionih promena kako samih regulatora, tako i ciljne iRNK, a to utiče na inicijaciju translacije i dalju ekspresiju gena.

2.3.1. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije preko antisens RNK

Antisens RNK su mali (50-300 nt), visoko struktuirani molekuli RNK koji se uglavnom ne translatiraju, sparuju se sa TIR regionom na target iRNK i blokiraju translaciju, što kao krajnji rezultat ima degradaciju iRNK kombinovanim dejstvom endo- i egzo- ribonukleaza (slika 3).



Slika 3. Funkcionalna inaktivacija (a) i aktivacija (b) iRNA pomoću noncoding RNA (ncRNA), tj. antisens RNA (Kaberdin and Bläsi, 2006).

Nakon sparivanja antisens RNA sa svojom target iRNA dolazi do strukturnih rearanžmana, zahvaljujući kojima se formiraju mesta prepoznavanja za RNazu III i RNazu E (Afonyushkin *et al.*, 2005), i spregnute degradacije RNA regulatora i njegovog targeta. Ukoliko se bakterija nađe u stresnim uslovima moguće je aktivirati translaciju sa nekih iRNA zahvaljujući delovanju RNA regulatora. Kod *rpoS* iRNA, u normalnim uslovima, RBS je blokiran sekundarnom strukturom. Kada se u stresnim uslovima DsrA antisens RNA veže za 5'UTR na *rpoS* iRNA, sekundarna struktura se raspliće i otpočinje sinteza alternativnog δ^S faktora (Repoila *et al.*, 2003).

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

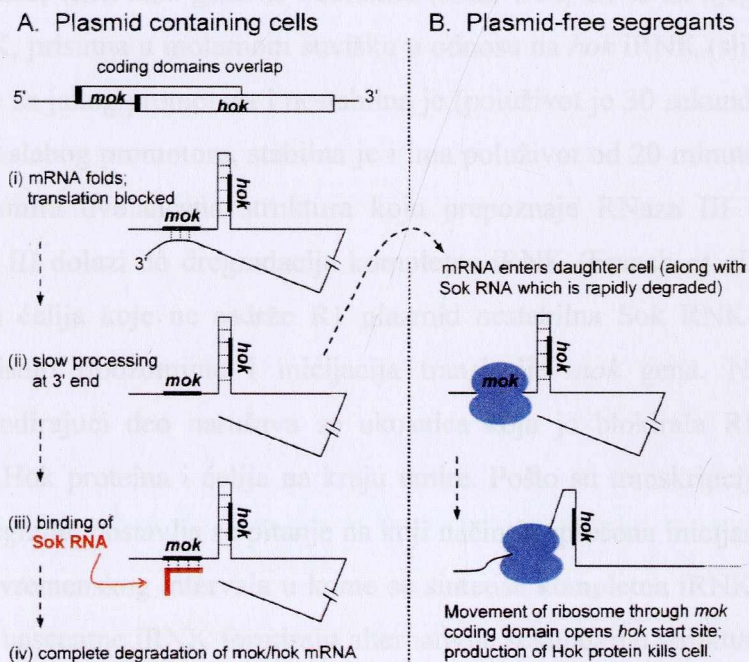
Ukoliko se antisens RNK i target iRNK transkribuju sa iste DNK sekvence, ali u suprotnim orijentacijama, onda je takva antisens RNK *cis*-aktivna i potpuno je komplementarna target iRNK molekulu. *Cis*-aktivne antisens RNK su prisutne uglavnom na ekstrahromozomalnim elementima i kontrolišu njihov broj kopija. Ovi riboregulatori imaju ulogu i RNK antitoksina s obzirom da reprimiraju translaciju toksičnog proteina koji bi mogao da dovede do smrti ćelije ukoliko izgubi određeni mobilni element (Brantl, 2007). Inače, kod bakterija su vrlo zastupljeni dvokomponentni sistemi koji kodiraju stabilan "toksin" čija prekomerna ekspresija dovodi do smrti ćelije i nestabilan "antitoksin" koji može biti protein ili mala antisense RNK koji se vezuju za "toksin" iRNK i sprečavaju njenu translaciju. *Cis*-aktivne antisens RNK se mogu sintetisati i sa bakterijskijog hromozoma, ali je njihova fiziološka uloga u ovom slučaju manje jasna. Većina olakšava degradaciju iRNK koje kodiraju proteine toksične za ćeliju, ukoliko su prisutni u velikim koncentracijama, ili pak reprimira translaciju sa ovih iRNK. Iako će visoka koncentracija toksina dovesti do smrti ćelije, znatno niži nivo toksina može samo da uspori rast. Zanimljiv je koncept po kome "toksin/antitoksin" (TA) moduli prisutni na bakterijskom hromozomu u stresnim uslovima indukuju usporen rast bakterije ili ga čak zaustavljaju, da bi dozvolili ćeliji da popravi štetu ili se na drugi način prilagodi uslovima sredine (Fozo *et al.*, 2008; Gerdes and Wagner, 2007).

Najjednostavniji mehanizam represije translacije putem *cis*-aktivnih antisens RNK je direktno sparivanje i blokiranje RBS regiona (Brantl, 2007). Na ovaj način, pomoću RNAII riboregulatora, reprimirana je translacija *repB* gena na plazmidu pLS1. FinP antisens RNK blokira inicijaciju translacije *traJ* gena, aktivatora operona za konjugabilni transfer plazmida F i R1. Međutim, postoje primeri gde je regulacija translacije preko antisens RNK kompleksnija i kombinovana sa drugim mehanizmima.

CopA antisens RNK je osnovni element koji reguliše broj kopija plazmida R1, preko *repA* gena, a sama regulacija se odvija na dva nivoa. RBS *repA* gena je blokiran unutar sekundarne strukture tipa ukosnice i da bi došlo do sinteze RepA inicijatora

replikacije neophodno je da se najpre sintetiše lider peptid (*tap*), pozicioniran uzvodno. Na početku *repA* iRNK se nalazi CopT, target RNK CopA riboregulatora i njihovim sparivanjem je blokiran pristup ribozomima i translacija lider peptida, što posredno inhibira i sintezu RepA proteina. CopA je potpuno komplementaran sa targetom CopT, a samo vezivanje se odvija u više koraka da bi došlo do formiranja stabilnog kompleksa (Brantl, 2002). Inicijalni kontakt između ova dva RNK molekula se ostvaruje preko dve komplementarne petlje, a ključnu ulogu u ovom sparivanju ima “U-turn” motiv na CopT RNK, prisutan unutar petlji i na drugom RNK (Heidrich and Brantl, 2003).

Primer TA lokusa kod *E. coli* je *hok/sok* sistem na R1 plazmidu, odgovoran za programiranu ćelijsku smrt ćerki ćelija ukoliko izgube plazmid. Gubitak plazmida dovodi do degradacije “antitoksina” i aktivacije “toksina” odnosno njegove sinteze (slika 4).



Slika 4. Kontrola translacija *hok* gena sa plazmida R1 (Kozak, 2005).

Na slici 4 je prikazan kompleksan mehanizam inhibicije translacije *hok* (eng. host killing) iRNK po principu blokade SD sekvence čime je onemogućen pristup ribozomima (Gerdes and Wagner, 2007; Kozak, 2005). Između *hok* i *mok* (eng. modulation of killing) cistrona se formira ukosnica unutar koje je blokiran RBS *hok* gena, a RBS *mok* gena je blokiran ili sparivanjem sa 3' krajem iRNK ili sa Sok (eng. suppression of killing) antisens RNK. Ovako stroga kontrola ekspresije *hok* gena je neophodna zbog toga što je njegov produkt visoko toksični transmembranski protein koji ireverzibilno oštećuje ćelijsku membranu. Kodirajući domeni *mok* i *hok* gena se preklapaju i sinteza Hok proteina zavisi od sinteze Mok proteina, a ona je tokom rasta ćelija koje nose plazmide blokirana intermolekulskim sparivanjem sa 3' krajem iRNK (Franch *et al.*, 1997; Thisted and Gerdes, 1992) (slika 4Ai). Konstitutivnim delovanjem 3' egzonukleaze dolazi do narušavanja sekundarne strukture, RBS *mok* gena se odblokira (slika 4Aii) ali se za njega brzo vezuje Sok antisens RNK, prisutna u molarnom suvišku u odnosu na *hok* iRNK (slika 4Aiii). Sok RNK se prepisuje sa jakog promotora i nestabilna je (poluživot je 30 sekundi), dok se *hok* iRNK sintetiše sa slabog promotora, stabilna je i ima poluživot od 20 minuta. Vezivanjem Sok RNK se formira dvolančana struktura koju prepoznaje RNaza III i zahvaljujući delovanju RNaze III dolazi do degradacije kompletne iRNK (Franch *et al.*, 1999) (slika 4Aiv). Kod ćerki ćelija koje ne sadrže R1 plazmid nestabilna Sok RNK brzo nestaje, omogućen je pristup ribozomima i inicijacija translacije *mok* gena. Napredovanjem ribozoma kroz kodirajući deo narušava se ukosnica koja je blokirala RBS *hok* gena, otpočinje sinteza Hok proteina i ćelija na kraju umire. Pošto su transkripcija i translacija kod bakterija spregnute, postavlja se pitanje na koji način je sprečena inicijacija translacije *mok* gena tokom vremenskog intervala u kome se sintetiše kompletna iRNK. Pokazano je da se na 5' kraju nascentne iRNK formiraju alternativne sekundarne strukture koje takođe blokiraju RBS *mok* gena (Moller-Jensen *et al.*, 2001).

Hok/sok lokusi su pronađeni na različitim plazmidima, ali i na hromozomu enterobakterija gde njihov broj varira (Faridani *et al.*, 2006). Međutim, postoje i *hok/sok*-slični lokusi kao što je *ldrD* lokus na hromozomu *E. coli* K12, a njegovi analozi, prisutni u različitom broju kopija, pronađeni su kod drugih enterobakterija (Faridani *et al.*, 2006; Kawano *et al.*, 2002).

Kod *Enterococcus faecalis* konjugabilni plazmid pAD1 je stabilisan prisustvom *par* lokusa koji kodira dve male RNK – RNK I i RNK II (Weaver *et al.*, 1996). RNK I kodira toksični peptid Fst od 33 aminokiseline koji utiče na propustljivost membrane i dovodi do ćelijske smrti. Ove dve RNK nastaju konvergentnom transkripcijom sa istog lokusa pri čemu se njihovi 3' krajevi, delom koji sadrži terminatore transkripcije, preklapaju u dužini od 75 bp. Na 5' kraju obe RNK postoje po dva direktna ponovka što znači da postoje tri komplementarna regiona, a ne jedan u kontinuitetu, što je bio slučaj sa prethodno opisanim antisens RNK. Interakcija dva RNK molekula započinje preko dve terminatorske petlje, što potom olakšava interakciju direktnih ponovaka i blokiranje inicijacije translacije (Greenfield *et al.*, 2001). Kompleks između RNK I i RNK II je izuzetno stabilan, što ne važi za ostale antisens RNK (Weaver *et al.*, 2004). Takođe je pokazano da na 5' kraju RNK I postoji sekundarna struktura koja je neophodna za suprimiranje Fst translacije dovoljno dugo da bi došlo do interakcije 3' krajeva RNK I i RNK II (Shokeen *et al.*, 2008).

Sinteza SOS indukovanog toksina SymE je regulisana na više nivoa i to najpre na nivou transkripcije preko LexA represora, zatim inhibicijom translacije pomoću SymR antisens RNK i na kraju aktivnošću Lon proteaze koja degraduje SymE toksin, a poslednji mehanizam je prisutan i kod drugih SOS indukovanih proteina (Kawano *et al.*, 2007).

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

Trans-kodirane antisens RNK i njihove target iRNK se sintetišu sa različitih DNK lokusa, a ove antisens RNK se eksprimiraju kao odgovor na promene uslova spoljašnje sredine, bilo da se radi o promenama temperature, pH vrednosti ili dostupnosti hranjivih materija (Kaberdin and Bläsi, 2006). Kako uglavnom jedna *trans*-kodirana antisens RNK kontroliše više različitih targeta, ona poseduje samo delimičnu komplementarnost sa svojom target iRNK te joj je neophodan kofaktor u vidu RNK šaperona – Hfq proteina. Obično se kontakt sa target iRNK ostvaruje preko više kraćih delova antisens RNK i ne dolazi do savršenog sparivanja dužih regiona kao u slučaju *cis*-kodiranih antisens RNK. Region na antisens RNK koji je komplementaran sa ciljnom iRNK je obično dužine od 10 do 25 nukleotida, iako je samo nekoliko nukleotida dovoljno za regulatornu funkciju *trans*-

kodiranih antisens RNK. U većini slučajeva sparivanje antisens RNK i ciljne iRNK dovodi do inhibicije translacije i/ili degradacije targeta, čime je blokirana ekspresija određenog proteina (Aiba, 2007; Gottesman, 2005). Pokazano je da se ove antisens RNK uglavnom vezuju za 5'UTR na iRNK i direktno maskiraju TIR region, mada neke od njih, kao što su GcvB i RyhB, inhibiraju translaciju vezivanjem za region koji je značajno udaljen od start kodona (Sharma *et al.*, 2007; Večerek *et al.*, 2007). Ovaj antisens RNK : iRNK dupleks najčešće prepoznaje RNaza E i degraduje ga, što dodatno umanjuje mogućnost ekspresije regulisanog proteina, s obzirom da je primarni efekat blokada RBS regiona i inhibicija translacije (Morita *et al.*, 2006). Međutim, antisens RNK mogu i da aktiviraju ekspresiju interakcijom koja onemogućava formiranje sekundarne strukture koja bi blokirala RBS (Hammer and Bassler, 2007; Prevost *et al.*, 2007).

U većini slučajeva regulatorna uloga antisens RNK zavisi od Hfq proteina koji može da ubrza RNK : RNK interakcije (Waters and Storz, 2009). Hfq protein je homolog Sm proteinu i Sm-sličnim proteinima koji učestvuju u obradi i degradaciji iRNK kod eukariota, a zauzima oblik heksamernog prstena. Postoji više modela pomoću kojih se objašnjava njegovo učešće u regulaciji genske ekspresije preko antisens RNK (Aiba, 2007). Moguće je da ovaj protein aktivno remodeluje antisens RNK i target iRNK narušavanjem sekundarnih struktura ili možda deluje pasivno kao platforma koja vezuje obe RNK, povećava njihovu lokalnu koncentraciju i time pomaže sparivanju. Hfq utiče i na količinu antisens RNK pošto u kompleksu sa ovim proteinom RNK molekul teže podleže degradaciji. Po sparivanju antisens RNK i target iRNK ovaj kompleks podleže degradaciji RNazom E, a možda je uloga Hfq proteina da mobilise mašineriju za degradaciju RNK preko njegovih interakcija sa RNazom E i drugim komponentama degradozoma.

Za razliku od *cis*-kodiranih antisens RNK, od kojih se neke eksprimiraju konstitutivno, *trans*-kodirane antisens RNK se eksprimiraju u specifičnim sredinskim uslovima. Kod *E. coli* ove antisens RNK su prisutne u uslovima niskih koncentracija gvožđa (RyhB), oksidativnom stresu (OxyS), pri poremećajima spoljašnje membrane (MycA i RyhB), pri visokim koncentracijama glicina (GcvB), kod promena u koncentraciji glukoze (Spot42 i CyaR) i pri povišenim koncentracijama glukoze-fosfata (SgrS) (De Lay and Gottesman, 2009; Gorke and Vogel, 2008; Gottesman, 2005; Johansen *et al.*, 2006a;

Urbanowski *et al.*, 2000). Pošto jedna antisens RNK ima mogućnost da reguliše više različitih targeta, moguća je regulacija specifičnog fiziološkog odgovora jednim riboregulatorom, kao kod transkripcionih faktora, ali na posttranskripcionom nivou (Bejerano-Sagie and Xavier, 2007; Masse *et al.*, 2007; Valentin-Hansen *et al.*, 2007). Dobro su okarakterisani regulatorni efekti antisens RNK na inhibiciju sinteze gvožđe-vezujućih proteina (*E. coli* RyhB) u uslovima kada je koncentracija gvožđa smanjena, inhibiciju sinteze porina iz spoljašnje membrane u stresnim uslovima (*E. coli* MicA i RybB), kao i na represiju „quorum sensing“ mehanizma u uslovima smanjene brojnosti ćelija (*Vibrio cholerae* Qrr). Kod *E. coli*, u slučaju nedostatka gvožđa RyhB antisens RNK inhibira translaciju sa bar 18 target iRNK, koje kodiraju različite gvožđe-vezujuće proteine, a u uslovima kada gvožđa ima dovoljno, Fur protein reprimira transkripciju *ryhB* (Masse *et al.*, 2005).

Kod *E. coli* je za očuvanje integriteta ćelijskog zida odgovorna δ^E subjedinica RNK polimeraze, zahvaljujući kojoj se aktivira ekspresija oko 100 gena čiji produkti na različite načine učestvuju u organizaciji ćelijskog zida. Sinteza MicA i RyhB antisens RNK je pod pozitivnim uticajem δ^E subjedinice, a ove antisens RNK inhibiraju sintezu nekoliko porina iz spoljašnje membrane bakterije (*ompA*, *ompC* i *ompW* iRNK) (Johansen *et al.*, 2006a). Još jedan primer su pet Qrr antisens RNK (Qrr 1 - Qrr 5) koje inhibiraju sintezu dva glavna „quorum sensing“ aktivatora transkripcije kod dva predstavnika roda *Vibrio* (Svenningsen *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008).

Kod *E. coli* u odgovoru na oksidativni stres sintetiše se OxyS antisens RNK dužine 109 nt. Njenom aktivnošću se štiti bakterijska DNK od oštećenja i indukuje plejotropni efekat kroz promenu ekspresije više gena (Altuvia *et al.*, 1997). OxyS reguliše translaciju *rpoS* iRNK sa koje se sintetiše RpoS, sigma faktor stacionarne faze, kao i translaciju *fhla* iRNK koja kodira transkripcioni aktivator u metabolizmu formijata. Pokazano je da mehanizam represije *fhla* iRNK uključuje interakciju dve sekundarne stukture iz OxyS sa dve ukosnice prisutne u lider regionu *fhla* iRNK. Ovakav kompleks dovodi do direktnog blokiranja RBS sekvence *fhla* iRNK (Argaman and Altuvia, 2000).

Kod bakterije *Salmonella typhimurium* je pokazano da GcvB antisens RNK direktno inhibira inicijaciju translacije sedam target iRNK koje kodiraju proteine ABC

transportera za aminokiseline i peptide (Sharma *et al.*, 2007). Za vezivanje GcvB antisens RNK je neophodno prisustvo G/U sekvenci komplementarnih C/A bogatim motivima, prisutnih u više različitih iRNK. Represorni efekat se može objasniti direktnim blokiranjem SD sekvence, ali je pokazano da se GcvB antisens RNK vezuje i za C/A motive prisutne 35 nt uzvodno od SD sekvence i inhibira translaciju. Moguće je da C/A motivi deluju kao enhenser sekvence i da je njihovom blokadom otežana interakcija sa S1 ribozomalnim proteinom i pristajanje ovih iRNK na ribozom (Komarova *et al.*, 2005).

Jasno je zašto brojne antisens RNK regulišu patogenezu bakterija, s obzirom da su pri bakterijskoj infekciji neohodni višestruki brzi i koordinisani odgovori patogena na promene u spoljašnjoj sredini. Centralna uloga antisens RNK je modulisanje nivoa bakterijskih proteina spoljašnje membrane, koji su inače ciljne determinante imunog odgovora, kao i drugih mehanizama koji su neophodni da bakterija preživi u domaćinu (Romby *et al.*, 2006; Toledo-Arana *et al.*, 2007).

RNK regulatori imaju nekoliko prednosti ukoliko se uporede sa regulatornim proteinima. Najpre, produkcija kratkih antisens RNK je ekonomičnija za ćeliju i brža u poređenju sa sintezom iRNK dužine oko 1000 nt koja kodira prosečan *E. coli* protein od 350 aminokiselina. Sem toga, finalni efekat RNK regulatora se ostvaruje mnogo brže, a time je i stimulacija ili represija ekspresije brža, ukoliko se uporedi sa delovanjem proteina regulatora transkripcije (Mehta *et al.*, 2008; Shimoni *et al.*, 2007). Ne treba zanemariti ni značaj postojanja određenog praga u odgovoru na stimulus (Legewie *et al.*, 2008; Levine *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2008). Većina regulatornih RNK deluje stehiometrijski, preko degradacije iRNK ili kompetitivnom inhibicijom inicijacije translacije, pri čemu su ključne relativne koncentracije regulatora i targeta. U slučaju malih RNK koje deluju inhibitoryno, genska ekspresija je čvrsto blokirana kada je regulatorna RNK prisutna u suvišku u odnosu na target RNK, ali u obrnutoj situaciji, regulatorna RNK ima zanemarljiv uticaj. Zbog ovoga RNK regulatori nisu efikasni kao proteini pri reakciji na stimulus malog intenziteta ili reakciji na prolazni stimulus, ali u slučaju stalnog stimulusa ili stimulusa velikog intenziteta se pretpostavlja da je represija sinteze proteina malim RNK bolja i pouzdanija. Smatra se da je efekat malih RNK izuzetno osetljiv na promene koncentracija regulatora i ciljne RNK bliske kritičnom pragu, naročito u slučaju kada su male RNK u velikom broju

prisutne u ćeliji, kao kod Qrr „quorum-sensing“ sistema u *V. cholerae*, što omogućava odgovor po tipu sve ili ništa (Lenz *et al.*, 2004). Male RNK, u kombinaciji sa proteinima, obezbeđuju veliku raznovrsnost u regulatornim procesima i doprinose izrazito čvrstoj represiji sinteze proteina, porastu broja gena koji se regulišu kao odgovor na pojedinačni signal, a i obrnuto, porastu broja signala na koje reaguje jedan gen (Shimoni *et al.*, 2007).

2.3.2. Regulacija genske ekspresije na nivou inicijacije translacije posredovana proteinima

Ne tako davno se smatralo da je kontrola genske ekspresije na nivou translacije i kontrole stabilnosti iRNK ograničena na određen broj gena, pri čemu većina njih kodira proteine koji učestvuju u translaciji ili su direktno deo ribozoma (Springer, 1996; Zengel and Lindahl, 1994). Tokom poslednje dve decenije broj novootkrivenih gena čija je ekspresija regulisana na posttranskripcionom nivou značajno raste. Razloge treba tražiti u činjenici da su otkriveni brojni globalni regulatori koji omogućavaju bakteriji da koordinisano kontroliše ekspresiju gena ili operona raspoređenih širom genoma, sa produktima različitih i nepovezanih funkcija (Nogueira and Springer, 2000). Važno je napomenuti i da se kontrola ekspresije nekih globalnih regulatora transkripcije ostvaruje na posttranskripcionom nivou.

Iako među globalnim regulatorima dominantnu ulogu imaju male RNK, ne treba zanemariti ni ulogu proteina. Kod većine proteina koji reprimiraju sintezu proteina zajedničko je da prepoznaju karakteristične sekvence na iRNK i svojim vezivanjem sprečavaju inicijaciju translacije. Ciljna sekvenca može biti deo sa AUG start kodonom, sekundarna struktura u okviru koje je RBS, sam RBS ili jednolančana lider sekvenca na 5' kraju iRNK. Većinom se proteini vezuju za iRNK direktno preko RBS sekvence ili dovoljno blizu da sterno ometaju pristup ribozomima i time inhibiraju translaciju (Jenner *et al.*, 2005). Malo je komplikovanija situacija kada se protein vezuje za deo iRNK daleko od RBS regiona. Bez obzira na udaljenost, njegovo vezivanje dovodi do promena u strukturi iRNK što na kraju uzrokuje formiranje takvih sekundarnih struktura koje blokiraju SD sekvencu i pristup ribozomima (Du and Babitzke, 1998). Postoje i primeri gde ribozom

može da se veže za iRNK, za koju je u blizini RBS regiona prethodno već vezan regulatorni protein, ali do sinteze proteina ne dolazi jer je blokiran pristup inicijatorskoj tRNK^{fmet}, a time i formiranje funkcionalnog inicijatorskog kompleksa (Philippe *et al.*, 1993; Schlax *et al.*, 2001).

Kod *E. coli* je izuzetno zastupljen princip negativne povratne sprege gde se protein veže za sopstvenu iRNK i tako onemogućava dalju translaciju. Ovo je slučaj kod većine ribozomalnih proteina (r-proteina) gde je cilj regulacije da spreči nagomilavanje slobodnih r-proteina u ćeliji. R-proteini se često sintetišu sa policistronskih iRNK. Jedan cistron operona kodira r-protein koji se primarno veže za rRNK, a zatim i svoju sopstvenu iRNK, onemogućavajući translaciju. Vezivanje za sopstvenu iRNK se odigrava na translacionom operatoru koji je najčešće lociran u blizini RBS mesta prvog cistrona. Inhibicija translacije prvog cistrona se prenosi na nizvodne gene preko translacionog sparivanja (Dean *et al.*, 1981; Mattheakis and Nomura, 1988). Sama sinteza r-proteina je povezana sa sintezom rRNK – ukoliko dođe do povećane sinteze rRNK u ćeliji, svi slobodni regulatorni r-proteini biće vezani, čime se sinteza r-proteina dereprimira.

Mnogo ređi su slučajevi gde regulatorni proteini aktiviraju translaciju. Jedan od dobro izučenih primera je BipA protein iz *E. coli*, aktivator translacije Fis proteina koji je transkripcioni modulator (Owens *et al.*, 2004). Fis protein ima ključnu ulogu u mnogim ćelijskim procesima tako što stabilizuje lokalnu DNK arhitekturu promotora ciljnih gena i na taj način stimuliše ili reprimira transkripciju, zavisno o kom se genu radi (Schneider *et al.*, 2001). BipA protein poseduje GTPaznu aktivnost kada je vezan za ribozom i aktivira translaciju *fis* iRNK destabilišući jake sekundarne strukture u okviru RBS.

Jedan od bakterijskih globalnih regulatora je CsrA protein, koji prepoznaje različite iRNK i utiče na njihovu stabilnost i translaciju. Pomoću CsrA proteina su regulisani različiti procesi, kao na primer metabolizam ugljenika, pokretljivost bakterija i sposobnost formiranja biofilma, patogeneza i virulentnost bakterija, odgovor na oksidativni stres kao i "quorum sensing". CsrA protein *E. coli* prepoznaje 5'-RUACARGGAUGU-3' sekvencu (R-purinska baza), a pokazano je da je za njegovo vezivanje bitna i sekundarna struktura tipa ukosnice koja se formira tako da GGA triplet bude lociran unutar petlje (Baker *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2005). Represija translacije se postiže vezivanjem za specifične

sekvence na iRNK koje obuhvataju SD sekvencu ili se sa njom preklapaju, onemogućena je inicijacija translacije što rezultira degradacijom iRNK. *hfq* iRNK je jedan od targeta CsrA proteina u *E. coli* pri čemu je translacija ove iRNK delovanjem CsrA proteina reprimirana, ali degradacija *hfq* iRNK izostaje (Baker *et al.*, 2007). Broj CsrA vezujućih mesta na različitim iRNK targetima varira. Na *hfq* iRNK je prisutna jedna kopija, dok ih kod *pgaABCD* iRNK ima 6 (Baker *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Dobro je izučen uticaj CsrA proteina na akumulaciju glikogena preko kontrole *glgCAP* operona i *glgB* gena iz *glgBX* operona, gde je, na primer, pokazano da 5'UTR na *glgCAP* iRNK sadrži 4 vezujuća mesta za CrpA protein i da se jedno preklapa sa SD sekvencom (Baker *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1995; Mercante *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 1996). Postoje primeri gde CsrA protein aktivira translaciju kao u slučaju *flhDC* gena za glavni transkripcioni regulator sinteze flageluma kod *E. coli*. Polazni princip je isti kao kod negativne regulacije, ali vezivanje CsrA za specifična mesta unutar 5'UTR regiona dovodi u ovom slučaju do stabilizacije iRNK i omogućava translaciju (Wei *et al.*, 2001). Aktivnost CsrA proteina je regulisana preko malih CsrB i CsrC RNK koje vezuju protein i čine ga nedostupnim za dalje reakcije. Pokazano je da nivo ekspresije ovih malih RNK zavisi od medijuma u kojem se bakterije gaje i da su ovi riboregulatori u siromašnom medijumu bez aminokiselina visoko ekspimirani, a u medijumu sa aminokiselinama je njihova ekspresija redukovana (Jonas *et al.*, 2010).

Drugi poznati globalni regulator je Hfq protein kod *E. coli* sa primarnom ulogom medijatora u interakcijama između *trans*-kodiranih antisens iRNK i njihovih target iRNK (Aiba, 2007; Masse and Gottesman, 2002; Moller *et al.*, 2002; Sledjeski *et al.*, 2001; Večerek *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002), ali ovaj protein učestvuje i u regulaciji ekspresije *rpoS* gena za sigma faktor stacionarne faze σ^{38} (Brown and Elliott, 1996; Muffler *et al.*, 1996), u kontroli stabilnosti nekoliko iRNK (Folichon *et al.*, 2003; Tsui *et al.*, 1997; Vytvytska *et al.*, 2000) i malih regulatornih RNK (Moll *et al.*, 2003; Sledjeski *et al.*, 2001), funkcioniše kao šaperon različitih iRNK (Geissmann and Touati, 2004; Moll *et al.*, 2003), a od značaja je i njegova funkcija u virulenciji (Christiansen *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2004; Robertson and Roop, 1999; Sonnleitner *et al.*, 2003). Hfq protein deluje kao aktivator translacije *rpoS* gena za σ^S subjedinicu RNK polimeraze s obzirom da potpomaže vezivanje

DsrA antisens RNK za 5' UTR *rpoS* iRNK, što uzrokuje strukturni rearanžman molekula iRNK zahvaljujući kojem se oslobađa inače zaklonjeni RBS (Majdalani *et al.*, 2001). Sa druge strane, pri analizi mehanizma degradacije *ompA* iRNA *E. coli* otkrivena je represorska uloga Hfq proteina na nivou inicijacije translacije (Vytvytska *et al.*, 2000). U uslovima sporog rasta koncentracija Hfq proteina se povećava, on stimuliše vezivanje MicA antisens RNK za 5' UTR *ompA* iRNK, sprečava vezivanje ribozoma i inicijaciju translacije, što za posledicu ima pojačanu degradaciju *ompA* iRNK posredovanu RNazom E (Udekwa *et al.*, 2005).

Kod *E. coli* stres izazvan niskim temperaturama dovodi do indukcije proteina Y, opšteg translacionog represora koji se eksprimira na niskom temperaturama kada sinteza velikog broja proteina mora biti ukinuta. On se vezuje za 30S ribozomalnu subjedinicu tako da blokira A mesto i P mesto, čime se inaktivira ceo ribozom (Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Međutim, da li i na koji način bi ovaj protein mogao učestvovati u preferencijalnoj translaciji sa "cold-shock" iRNK ostaje da se istraži.

Kod bakterije *Bacillus subtilis* TRAP protein (*eng. Trp* RNA-binding Attenuation Protein), mehanizmom transkripcione atenuacije, reguliše ekspresiju *trpEDCFBA* operona (Gollnick *et al.*, 2005). Kada je u ćeliji prisutno dovoljno triptofana TRAP protein se aktivira i vezuje za 11 (G/U)AG tripleta na nascentnoj iRNK, time sprečava formiranje antiterminatora, čime je favorizovano formiranje terminatora i transkripcija se prekida pre nego što RNK polimeraza dospe do strukturnih gena. U slučaju da ćeliji nedostaje triptofan, TRAP bez kofaktora ostaje neaktivan, ne može da se veže za ciljne sekvence čime je omogućeno formiranje antiterminatora i prepisivanje strukturnih gena. Pokazano je da RNK polimeraza privremeno zaustavljena na poziciji U107 doprinosi atenuaciji, verovatno tako što obezbeđuje dovoljno vremena za vezivanje TRAP proteina i nascentnog *trp* lider transkripta (Yakhnin and Babitzke, 2002; Yakhnin *et al.*, 2006). TRAP protein takođe reguliše i translaciju *trpE* gena, prvog gena iz *trp* operona. Ukoliko RNK polimeraza prođe terminator i nastavi sintezu iRNK, vezivanje TRAP proteina može da dovede do takvog strukturnog rearanžmana da se formira ukosnica koja blokira SD sekvencu, vezivanje ribozoma i sintezu TrpE proteina (Du and Babitzke, 1998; Merino *et al.*, 1995). Alternativna sekundarna struktura se formira ukoliko TRAP protein nije vezan, pri čemu SD

sekvenca ostaje u linearnoj formi i za nju se vezuju ribozomi. Interesantno je da RNK polimeraza, privremeno zaustavljena na poziciji U144, što je 3-4 nt nizvodno od mesta terminacije transkripcije, učestvuje u kontroli translacije, pretpostavlja se tako što daje drugu šansu TRAP proteinu da se veže za nascentnu iRNK. Kako je translacija *trpE* i *trpD* gena spregnuta, formiranjem ukosnice u kojoj je zarobljena SD sekvenca *trpE* gena se inhibira i sinteza TrpD proteina. TRAP protein se inaktivira interakcijom sa Anti-TRAP proteinom koji se ekspirira u uslovim kada u ćeliji nema dovoljno šaržirane tRNK^{trp}, što je regulisano preko inicijacije translacije (Chen and Yanofsky, 2003; Valbuzzi *et al.*, 2002). Ispred RBS sekvence *rtpA* gena, koji kodira Anti-TRAP protein, nalazi se *rtpLP* gen sa kog se prepisuje lider peptid dug 10 aminokiselina. Kompletna translacija lider peptida pozicionira ribozom na stop kodon *rtpLP* gena, čime se blokira RBS sekvenca *rtpA* gena i onemogućava translacija Anti-TRAP proteina. Ukoliko je šaržirana tRNK^{trp} u ćeliji u manjku, ribozom će se zaustaviti na jednom od tri trp kodona iz lider peptida, a SD sekvenca će biti na raspolaganju, što će sprečiti inhibiciju translacije *rtpA* gena (Chen and Yanofsky, 2004). Moguće je da je uloga ribozoma samo posredna tj. da oni dovode do strukturnih rearanžmana na iRNK koji blokiraju ili oslobađaju SD sekvencu i time onemogućavaju ili dozvoljavaju translaciju.

Represija inicijacije translacije putem kompeticije

Represija translacije u fazi inicijacije se obično opisuje pomoću dva mehanizma: represije putem kompeticije i represije mehanizmom “klopke”. Prvi mehanizam podrazumeva kompeticiju u vezivanju represora i ribozoma za preklapajuće ili blisko pozicionirane delove iRNK što dovodi do formiranja dva moguća kompleksa (represor-iRNK ili ribozom-iRNK) koji se međusobno isključuju (Romby and Springer, 2003). Sem *trans*-delujućeg proteina i *cis*-delujuća sekundarna struktura unutar iRNK može biti uspešan kompetitor vezivanju 30S subjedinice za RBS region unutar iRNK.

Represija inicijacije translacije putem kompeticije između 30S subjedinice i *trans*-aktivnog regulatornog proteina se najbolje može opisati na primeru treonil-tRNK sintetaze (ThrRS) kao i na brojnim primerima regulacije ekspresije ribozomalnih proteina. ThrRS,

prisutna u suvišku u odnosu na 30S ribozomalnu subjedinicu, vezuje se u formi dimera za dve sekundarne strukture tipa ukosnice (domeni 2 i 4) u okviru TIR regiona, onemogućava vezivanje 30S ribozomalne subjedinice i time inhibira sopstvenu ekspresiju. U sastav TIR regiona na *thrS* iRNK ulaze i dva jednolančana domena gde domen I obuhvata AUG start kodon i SD sekvencu, dok domen III, bogat A/U nukleozidima, razdvaja domene 2 i 4. Mesta vezivanja ThrRS i 30S ribozomalne subjedinice se ne poklapaju u potpunosti, već izduženi N-terminalni region ovog regulatornog proteina fizički onemogućava pristup 30S subjedinici što ukazuje na indirektni mehanizam kompeticije (Jenner *et al.*, 2005). U skladu sa ovim mehanizmom je i podatak da ako se N-terminalni domen ThrRS proteina deletira, rezultujući protein, uprkos činjenici da se efikasno vezuje za *thrS* operator, ne može da spreči vezivanje ribozoma (Caillet *et al.*, 2003). Kada se sekvenca *thrS* operatora promeni tako da podseća na tRNK^{met}, moguće je translaciju ThrRS regulisati sa metionil-tRNK sintetazom (Graffe *et al.*, 1992). Postoji i kinetička kontrola celog procesa, jer se ThrRS vezuje brže za operator na iRNK od 30S subjedinice, što prati ubrzana degradacija iRNK, čineći efekat vezivanja ThrRS nepovratnim (Nogueira *et al.*, 2001).

ThrRS prepoznaje domene 2 i 4 u okviru TIR regiona na *thrS* iRNK od kojih svaki imitira antikodon ručicu tRNK^{thr} (Springer *et al.*, 1998). ThrRS je homodimer, a svaka njena jedinica je sposobna da veže pojedinačne tRNK^{Thr} molekule ili jedan od domena u iRNK koji liči na tRNK antikodon domen (Romby *et al.*, 1992). Takođe, razrešene kristalne strukture ThrRS vezane za tRNK (Sankaranarayanan *et al.*, 1999) ili vezane za iRNK operator (Torres-Larios *et al.*, 2002) pokazuju da su oba RNK molekula prepoznata na sličan način. "Mimikrija" domena na iRNK molekulu koji liče na tRNK^{Thr} se razvila kao efikasna strategija za prepoznavanje represora.

Po kompetitivnom modelu translacione regulacije povećana ekspresije sintetaze je rezultat ili povećane koncentracije ribozoma ili smanjene koncentracije ThrRS dostupne za vezivanje za RBS na iRNK. Povećana koncentracija ribozoma brzo rezultira u povećanoj stopi formiranja inicijacionog kompleksa i povećanoj ekspresiji *thrS* iRNK. Dodatno, povećana ekspresija tRNK^{Thr} uzrokuje aktivaciju ThrRS ekspresije (Comer *et al.*, 1996), što je rezultat kompeticije između *thrS* iRNK i tRNK^{Thr} za vezivanje za ThrRS. Manja koncentracija slobodnog represora usporava ireverzibilnu asocijaciju represora i iRNK,

rezultujući u povećanoj frakciji iRNK koja učestvuje u inicijaciji translacije (Schlax and Worhunsky, 2003).

Rezultati eksperimenta u kojima je izučavana regulacija ekspresije *thrS* gena su pokazali da se ribozom može efikasno vezati za struktuiranu iRNK (Jenner *et al.*, 2005). U direktnom vezivanju ribozoma učestvuju domen I, u čijem okviru se nalazi SD sekvenca, ali i jedan deo nukleotida iz domena III (Sacerdot *et al.*, 1998). Ovaj segment domena III je lokalizovan u neposrednoj blizini SD sekvence zahvaljujući domenu II, a sam domen II, tj. sekundarna struktura tipa ukosnice ne ometa vezivanje ribozoma. Po predloženom modelu za autoregulaciju *thrS* gena, s obzirom da ribozomi prepoznaju domen I i deo domena III, a ThrRS protein domene II i IV, inhibitorski efekat ThrRS proteina se ostvaruje kombinovanim stericnim efektom, tj. fizičkom blokadom pristupa ribozomima i promenom u orijentaciji četiri domena *thrS* iRNK po vezivanju ThrRS proteina.

Represija putem kompeticije je opisana i kod ribozomalnog proteina L20. Ribozomalni protein L20 iz *E. coli* ima ulogu translacionog represora sopstvenog *rpmI-rplT* operona, sa kojim se prepisuju dva ribozomalna proteina: L35 i L20. Kada je prisutan u suvišku, protein L20 direktno reprimira translaciju prvog cistrona *rpmI* koji kodira L35 protein (Lesage *et al.*, 1990). Ova inhibicija se zatim prenosi preko translacionog sparivanja na drugi cistron *rplT* koji kodira L20 protein (Lesage *et al.*, 1992). L20 protein se kao monomer može vezati za jedno od dva postojeća mesta na iRNK – za kompleksnu sekundarnu strukturu pseudočvora koja se formira između dve primarne iRNK sekvence koje su međusobno udaljene 280 nt (Chiaruttini *et al.*, 1996), kao i za centralni deo nepotpune sekundarne strukture u vidu ukosnice koja se nalazi uzvodno od *rpmI*. Pokazano je da su obe ove sekundarne strukture neophodne za regulaciju, da svaka može nezavisno vezivati L20 protein i da međusobno interaguju (Allemand *et al.*, 2007; Guillier *et al.*, 2005). Vezivanje L20 proteina za jednu od sekundarnih struktura dovodi do takvog rearanžmana TIR regiona koji onemogućava pristup 30S ribozomalnim subjedinicama čime je blokirana translacija oba proteina. I u ovom slučaju se regulacija ekspresije ostvaruje zahvaljujući molekularnoj „mimikriji” između sekundarnih struktura operatora na iRNK i prirodnog targeta L20 proteina, mesta u 23S rRNK gde se ukrštaju heliks 40 i heliks 41 (H40-H41 veza). Hipotezom „mimikrije” se objašnjava kako kompeticija između rRNK i

iRNK za vezivanje za ribozomalne proteine garantuje koordinisanu ekspresiju ribozomalnih proteina kao odgovor na nivo rRNK u ćeliji (Guillier *et al.*, 2005).

Po istom principu je regulisana sinteza ribozomalnog proteina L1 u *E. coli* gde se L1 protein vezuje za specifični strukturni motiv unutar lider regiona u blizini SD sekvence L11 operona koji kodira dva r-proteina, L1 i L11 (Gourse *et al.*, 1986; Nevskaya *et al.*, 2005).

Ribozomalni protein S8 ima ulogu translacionog represora *spc* operona kod *E. coli*, koji kodira 11 ribozomalnih proteina, među kojima su i S8, kao i SecY protein uključen u sekreciju (Zengel and Lindahl, 1994). Mesto vezivanja S8 na iRNK je specifična sekundarna struktura u blizini starta translacije trećeg cistrona koji kodira r-protein L5. Vezivanjem proteina S8 za iRNK dolazi do represije translacije nizvodnih cistrona, dok se prvi i drugi uzvodni cistroni inaktiviraju degradacijom 5' fragmenta (Mattheakis *et al.*, 1989).

Ribozomalni protein S1 je najveći i najduži r-protein. S1 protein učestvuje u prepoznavanju i efikasnom vezivanju većine iRNK za 30S subjedinicu u procesu inicijacije sinteze proteina, a za razliku od ostalih ribozomalnih proteina, koji se primarno vezuju za target sekvence na rRNK, vezivanje S1 proteina u procesu formiranja ribozoma se ostvaruje posredstvom protein-protein interakcija. Ne postoji specifičnost u sekvenci koju S1 protein prepoznaje pri vezivanju različitih iRNK, ali je S1 protein sposoban da prepozna sopstvenu iRNK i reprimira sopstvenu sintezu na translacionom nivou (Boni *et al.*, 2000). Njegov globularni N-terminalni region je odgovoran za interakcije sa proteinima, a centralni i C-terminalni region su u formi izduženog RNA-vezujućeg domena sa karakterističnim visokohomologim ponovcima koji se nazivaju S1-motivima. S1 ne poseduje klasičnu SD sekvencu u okviru regiona za inicijaciju translacije. TIR region je savijen u tri sekundarne strukture u vidu ukosnice međusobno odvojene jednolančanim A/U bogatim regionima. Prve dve ukosnice su izuzetno stabilne za razliku od treće u okviru koje se, u dvolančanom regionu, nalazi SD-slična struktura (GAAG), dok je u samoj petlji AUG start kodon. Zahvaljujući optimalnom aranžmanu svih elemenata TIR regiona *rpsA* gena, koji ga čine savršeno prilagođenim površini 30S subjedinice ribozoma, postiže se izuzetno velika efikasnost translacije *rpsA* gena. Ukoliko je S1 protein prisutan u suvišku, njegovim

vezivanjem za A/U bogate jednolančane-regione remeti se optimalni aranžman i sprečava formiranje inicijacionog kompleksa iRNK i 30S subjedinice (Boni *et al.*, 2001).

I ribozomalni protein S2 u *E. coli* ima ulogu translacionog represora sopstvenog operona *rpsB-tsf*, ali je *in vivo* eksperimentima pokazano da mu je za efikasnu represiju neophodan i S1 r-protein, za razliku od ostalih r-proteina. Ukoliko su S1 i S2 prisutni u suvišku u odnosu na ribosome, u ćeliji prvo dolazi do formiranja kompleksa S1-S2, a zatim kompleks ima ulogu represora *rpsB-tsf* operona (Aseev *et al.*, 2008).

Represija mehanizmom „klopke”

Represija mehanizmom „klopke” (*eng.* entrapment) je, za razliku od represije putem kompeticije, mnogo slabije okarakterisana. Ovaj mehanizam podrazumeva da *cis*-aktivna sekvenca na iRNK ili *trans*-delujući protein represor ne sprečavaju interakciju 30S subjedinice sa RBS, već inhibiraju izomerizaciju u stabilni inicijacioni kompleks (Ehresmann *et al.*, 2004; Schlax and Worhunsky, 2003). Represija mehanizmom „klopke” je najbolje opisana na primeru ribozomalnih proteina S4 i S15.

Ekspresija ribozomalnih proteina iz α operona *E. coli*, koji kodira S13, S11, S4, α subjedinicu RNK polimeraze, kao i ribozomalni protein L17, je regulisana na translacionom nivou vezivanjem S4 proteina za α iRNK. S4 protein se vezuje za strukturu pseudočvora koja se formira u prvih 127 nukleotida transkripta koji okružuju SD sekvencu prvog gena (S13) u operonu (Deckman and Draper, 1987; Deckman *et al.*, 1987). Struktura 5'UTR regiona ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije. Eksperimentalno je pokazano da su dve različite forme iRNK uključene u mehanizam represije: I) aktivna frakcija iRNK koja odmah može da veže tRNK^{fMet} i formira inicijacioni kompleks i II) neaktivna frakcija iRNK koja odmah vezuje S4 represor ali ne i inicijatorsku tRNK (Spedding and Draper, 1993; Spedding *et al.*, 1993). Vezivanjem za jednu od iRNK konformacija, protein S4 ima ulogu alosteričkog efektor iRNK strukture, utičući na distribuciju aktivne i neaktivne forme (Tang and Draper, 1990). Obe ove strukture su sposobne da vežu 30S subjedinice što govori u prilog tome da S4 i 30S prepoznaju različite karakteristike na iRNK. Indukcija se može desiti ukoliko S4 disosuje, a iRNK se promeni iz neaktivne u aktivnu konformaciju.

Ključna komponenta mehanizma “klopke” je postojanje stabilnog trokomponentnog kompleksa koji se sastoji od neaktivne iRNK, 30S subjedinice i translacionog represora. Ovaj kompleks se ne formira sa iRNK koja zauzima strukturu aktivne forme (Schlax *et al.*, 2001). Eksperimentalno je potvrđeno da pomenuti trokomponentni kompleks disosuje bilo dodavanjem u suvišku neobebeženog S4, bilo dodavanjem RNK fragmenata za koje se S4 specifično vezuje (neaktivna forma α iRNK ili odgovarajući fragment 16S rRNK), a da do disocijacije ne dolazi nakon dodavanja aktivne forme α iRNK, što navodi na zaključak da je vezivanje S4 proteina i 30S subjedinice za neaktivnu konformaciju kooperativno. Prisustvo ovog trokomponentnog kompleksa je direktan dokaz koji podržava represiju mehanizmom “klopke”, gde S4 protein “zarobi” 30S subjedinicu na neaktivnoj iRNK.

S15 protein ima ključnu ulogu u organizaciji centralnog domena 30S ribozomalne subjedinice (Agalarov *et al.*, 2000). Kada je S15 protein prisutan u suvišku u odnosu na 16S rRNK, on se vezuje za 5'UTR na *rpsO* iRNK i stabilizuje sekundarnu strukturu u vidu pseudočvora (Ehresmann *et al.*, 2004). *rpsO* iRNK je u ravnoteži između dva moguća strukturalna oblika, od kojih jedan sadrži pomenutu strukturu pseudočvora, sličnu pseudočvoru kod α operona, a kod drugog se formiraju dvostruke ukosnice. Ribozom se vezuje jedino za konformaciju iRNK čiji 5'UTR formira strukturu pseudočvora (Philippe *et al.*, 1993).

Determinisanje precizne pozicije operator-represor kompleksa na ribozomu objašnjava kako kompleks iRNK-S15 vrši represiju translacije (Marzi *et al.*, 2007). iRNK sa struktuiranim 5'UTR regionima se vezuju za ribozom u tri faze: najpre se smeštaju na tzv. “docking” mestu ribozoma, potom sledi topljenje sekundarnih struktura i na kraju se iRNK usmerava ka odgovarajućem tunelu. Kod aktivnog inicijacionog kompleksa i u odsustvu S15, *rpsO* iRNK poprima jednolančanu konformaciju u iRNK tunelu čime je obezbeđeno prisustvo inicijacionog kodona u P mestu (Yusupova *et al.*, 2001). U slučaju zaustavljenog preinicijacionog kompleksa, kodon AUG, inicijator translacije, je lociran uz SD sekvencu u neposrednoj blizini strukture pseudočvora i nalaze se na ribozomalnoj platformi - univerzalnom mestu na 30S subjedinici odgovornom za vezivanje regulatornih elemenata u 5'UTR iRNK. Kao posledica toga, 3' kraj iRNK ostaje na površini ribozoma, ne ulazi u iRNK tunel i onemogućava interakciju inicijatorske tRNK sa start kodonom

držeći ga na većoj udaljenosti od P mesta. Prema tome, S15 ispoljava svoju inhibitornu funkciju tako što sprečava rasplitanje strukture pseudočvora i ulazak iRNK u tunel. Na taj način S15 blokira tranziciju preinicijacionog kompleksa u aktivan inicijacioni kompleks (Marzi *et al.*, 2007).

3. 16S rRNK metiltransferaze i rezistencija na aminoglikozidne antibiotike

Metiltransferaze (MTaze) koje koriste S-adenozil-L-metionin (SAM) kao kofaktor modifikuju najraznovrsnije targete među kojima su i rRNK molekuli (Cheng and Blumenthal, 1999). Posttranskripciona metilacija različitih nukleozida u okviru tRNK prebacivanjem metil grupe na različite atome od presudnog je značaja za funkcionisanje tRNK s obzirom da, delujući na njenu rigidnost i fleksibilnost, direktno utiče na prepoznavanje odgovarajućeg kodona (Cheng and Blumenthal, 1999). Važno je pomenuti i posttranskripcionu metilaciju rRNK i njenu „housekeeping“ ulogu u procesima formiranja, sazrevanja kao i u samom funkcionisanju ribozoma. Ribozom *E. coli* sadrži 24 metilovana nukleozida -10 u okviru 16S rRNK i 14 u okviru 23S rRNK (Wilson and Nierhaus, 2007). Svi metilovani nukleotidi se nalaze u regionima koji su neophodni za funkcionisanje ribozoma kao što je mesto dekodiranja, iRNK i tRNK vezujuće mesto (Basturea *et al.*, 2006; Decatur and Fournier, 2002).

3.1. Sinteza proteina i antibiotici koji je inhibiraju

S obzirom na elementarnu ulogu ribozoma u životu svake ćelije, nije čudo što veliki broj antibiotika deluje baš na ribosome (Poehlsgaard and Douthwaite, 2005). Antibiotici prepoznaju uglavnom rRNK, a ne proteine koji ulaze u sastav ribozoma, što je u skladu sa činjenicom da rRNK nosi glavnu ulogu tokom sinteze proteina, dok su ribozomalni proteini tu kao podrška (Green and Noller, 1997; Nissen *et al.*, 2000; Noller, 2005). Nekoliko različitih klasa antibiotika se vezuje za rRNK u okviru 30S i 50S ribozomalne subjedinice i time onemogućavaju pravilno funkcionisanje ribozoma (Poehlsgaard and Douthwaite,

2005). Rezistencija na ove antibiotike se često ostvaruje promenom mesta delovanja antibiotika preko baznih zamena ili metilacijom nukleozida posredstvom posebne klase SAM-zavisnih MTaza (Cundliffe, 1990), i upravo bakterije koje proizvode antibiotike pomoću ovog mehanizma se štite od sopstvenih toksičnih proizvoda (Poehlsgaard and Douthwaite, 2005).

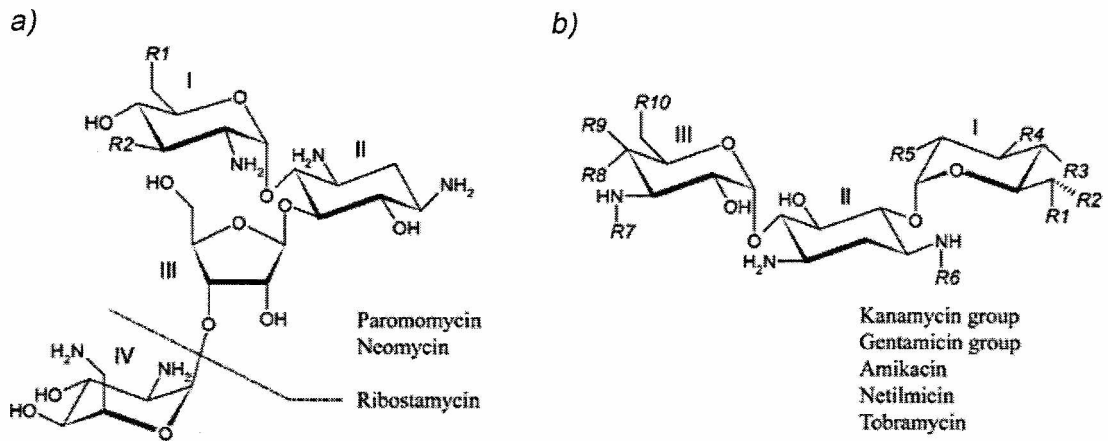
3.1.1. Antibiotici koji deluju na ribozome

Antibiotici koji deluju na 50S ribozomalnu subjedinicu vezuju se za tri ključna mesta i ometaju hidrolizu GTP (tiosrepton), formiranje peptidne veze (hloramfenikol) i prolaz nascentnog peptida kroz tunel u okviru 50S ribozomalne subjedinice (makrolidi, linkozamidi i streptogramin B – MLS_B). Među ovim antibioticima su klinički najznačajniji makrolidi, a ključnu ulogu u njihovom vezivanju imaju nukleozidi A2058 i A2059. Mutacijom ovih nukleozida i metilacijom A2058 se onemogućava vezivanje makrolida (Schlunzen *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2005; Vester and Douthwaite, 2001; Weisblum, 1995). Za modifikaciju nukleozida A2058 su odgovorne 23S rRNK MTaze koje se nazivaju Erm MTazama, a međusobno se razlikuju po tome da li dodaju jednu ili dve metil grupe (Douthwaite *et al.*, 2005; Gaynor and Mankin, 2003).

Na 30S ribozomalnu subjedinicu deluju antibiotici koji sprečavaju vezivanje tRNK za A mesto na ribozomu (tetraciklini) (Chopra *et al.*, 1992; Schnappinger and Hillen, 1996), zarobljavaju ribozom u prelaznoj fazi translacije (ciklični peptidi) (Ermolenko *et al.*, 2007) i indukuju greške tokom translacije (aminoglikozidi).

Najbolje proučeni među ovim antibioticima su aminoglikozidi, moćne bakteriostatske i baktericidne supstance, širokog spektra, koji primarno deluju na aerobne G (-) bacile i G (+) koke. Po hemijskom sastavu to su polikatjonski oligosaharidi sa više amino i hidroksil grupa. Molekuli aminoglikozida se sastoje od karakterističnog centralnog aminociklitolnog prstena, u većini slučajeva 2-dezoksistreptamina ili streptamina, za koji su vezani amino šećeri preko glikozidnih veza. Ovi antibiotici se najčešće dele u tri grupe, na osnovu pozicije veza sa amino šećerima, i to na: 4,5-disubstituisane 2-dezoksistreptamine (4,5-DOS), 4,6-disubstituisane 2-dezoksistreptamine (4,6-DOS) i treću klasu u koju spadaju

jedinjenja koja se ne mogu svrstati ni u jednu od dve prethodno opisane klase kao npr. 4-monosubstituisani 2-dezoksistreptamini (apramicin, neamin), streptomycin, higromicin B i spektinomycin. Na slici 5 su prikazane 4,5-DOS i 4,6-DOS klasa aminoglikozida.



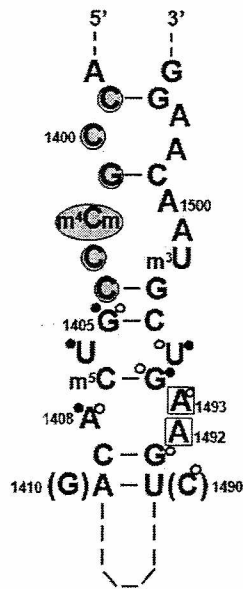
Slika 5. Struktura 4,5- i 4,6-disubstituisanih aminoglikozida.

a) 4,5-disubstituisani 2-dezoksistreptamini i b) 4,6-disubstituisani 2-dezoksistreptamini. Kanamicinskoj grupi pripadaju: kanamicin A i kanamicin B, a gentamicinska grupa obuhvata: gentamicin B, gentamicin C1, gentamicin C1a i gentamicin C2. Substituenti (R) mogu da budu: H; OH; NH₂; NHCH₃; CH₃; CH₂OH. Rimskim brojevima su označeni prstenovi: II – aminociklitolski prsten (2-dezoksistreptamin); I, III i IV – amino šećeri.

Bakterije najčešće proizvode aminoglikozide u neaktivnoj formi, fosforilisane ili acetilovane, a oni se aktiviraju nakon sekrecije van ćelija uklanjanjem inaktivnih grupa (Lacalle *et al.*, 1993; Tercero *et al.*, 1996). Kako antibiotici u aktivnoj formi mogu ponovo da uđu u ćeliju, organizmi proizvođači aminoglikozida štite se od sopstvenog toksičnog proizvoda metilacijom A mesta u 16S rRNK, čime se sprečava vezivanje antibiotika za target mesto na ribozomu. Mesto dekodiranja na 30S subjedinici je deo ribozomalnog A mesta (slika 6) i nalazi se na kraju heliksa 44 (h44) u 16S rRNK. Funkcija ovog mesta je praćenje kodon-antikodon interakcije nakon što se aminoacilovana tRNK pozicionira u A mesto pomoću elongacionog faktora Tu koji je u kompleksu sa GTP. Za ovu funkciju u

samom dekodirajućem mestu su zadužena dva univerzalno konzervisana nukleotida A1492 i A1493 (Ogle *et al.*, 2001; Yoshizawa *et al.*, 1999). Kada je interakcija iRNK i tRNK potpuno kompatibilna, konformacija njihove ribozo-fosfatne okosnice je takva da favorizuje formiranje vodoničnih veza sa bazama nukleotida A1492 i A1493. Da bi došlo do takve interakcije, A1492 i A1493 moraju da se izmeste iz h44, kao što je to prikazano na slici 7. Vezivanje tRNK za A mesto je takođe praćeno konformacionom promenom nukleotida G530 koji dodatno podržava izmenjenu konformaciju A1492 i A1493. Opisanim promenama u 16S rRNK započinje niz konformacionih promena ribozoma tokom kojih se u peptidil-transferaznom centru na 50S subjedinici formira peptidna veza, a ribozom se pomera jedan kodon duž iRNK molekula čime se A mesto oslobađa za smeštanje novog kodona. Istovremeno se tRNK, koja nosi nascentni peptid u procesu translokacije pomera u P mesto, dok se deacilovana tRNK pomera u E mesto sa kog napušta ribozom.

Aminoglikozidi inhibiraju translaciju tako što indukuju greške u translaciji i/ili onemogućavaju translokaciju. Tačnost procesa translacije zavisi od dva ključna koraka - I) sparivanja kodona na iRNK i antikodona na aminoacilovanoj tRNK i II) provere adekvatnosti sparivanja (Magnet and Blanchard, 2005). Kanamicin, gentamicin, neomicin i paromomicin se na sličan način vezuju za osnovu h44 u okviru 16S rRNK, koji zajedno sa delom petlje 530 i heliksom 34 gradi A mesto. Pokazano je da prethodno pobrojani antibiotici dele dve zajedničke pozicije pri vezivanju, nukleozide A1408 i G1494 unutar h44 sa kojima ostvaruju skoro identične vodonične veze. Četiri nukleozida unutar A mesta na 16S rRNK, A1408, A1492, A1493, i G1494, interaguju sa tRNK, iako im se afiniteti razlikuju (Kotra *et al.*, 2000). Na slici 6 su prikazane pozicije za koje se vezuju aminoglikozidi i pozicije koje modifikuju MTaze.

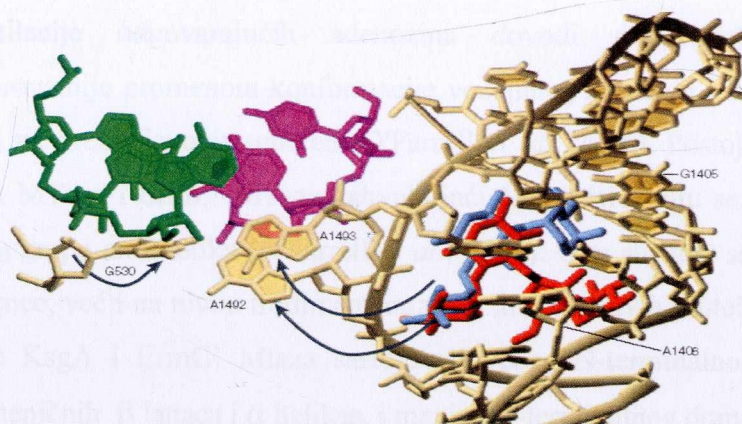


Slika 6. Sekvenca i sekundarna struktura A mesta na 16S rRNK sa pozicijama za koje se vezuju aminoglikozidi.

A1492 i A1493 nukleozidi su obeleženi kvadratima, a mesta koje modifikuju “housekeeping” MTaze u ovom regionu *E. coli* rRNK su obeležene slovom m. Nukleozidi koji učestvuju u vezivanju paromomicina su obeleženi belim krugovima; nukleozidi koji učestvuju u vezivanju gentamicina CIA i kanamicina A su obeleženi crnim krugovima. Paromomicin se vezuje za C1490; međutim, ovde prikazana 16S rRNK *E. coli* nosi A1410:U1490 par dok je kod 16S rRNK aktinomiceta prisutan G1410:C1490 par, što je naznačeno zagradama. Motiv prisutan u okviru 5'UTR na *kgmB* i *sgm* iRNK je obeležen sivim krugovima.

Vezivanje aminoglikozida za A mesto na 16S rRNK uzrokuje izmeštanje nukleozida A1492 i A1493 iz h44, što oponaša konformaciju koju zauzimaju ovi nukleozidi “kontrolori” (*eng.* fidelity gatewatch nucleosides) u 16S rRNK kao u slučaju kada su sparni adekvatni kodon sa iRNK i antikodon sa tRNK (slika 7) (Ogle and Ramakrishnan, 2005; Shandrick *et al.*, 2004). Iako nije u pitanju potpuno identična promena konformacije, pošto u njoj ne učestvuje G530, aminoglikozidi forsiraju neadekvatnu kodon:antikodon interakciju i dovode do grešaka u procesu translacije (Vicens and Westhof, 2003). Vremenom, nagomilavanje proteina koji su usled grešenja tokom translacije ili skraćeni ili

formiraju pogrešne 3D strukture dovodi do smrti ćelije. Iako se i apramicin vezuje za dekodirajuće mesto na 16S rRNK, on je jedini antibiotik koji primarno deluje tako što blokira translokaciju ribozoma duž iRNK. Ovaj jedinstveni efekat apramicina se pripisuje njegovoj neuobičajenoj strukturi koja mu omogućava da ometa lokalnu konformaciju ribozomalnog proteina S12, koji učestvuje u procesu translukacije (Han *et al.*, 2005). Streptomycin se takođe vezuje za 16S rRNK u blizini dekodirajućeg mesta, ali dovodi do grešaka u procesu translacije preko kompleksnog mehanizma koji utiče na inicijalni izbor tRNK i kontrolu kodon : antikodon interakcije (Carter *et al.*, 2000). Higromicin B je aminoglikozid čije se mesto vezivanja delimično preklapa sa mestima vezivanja of 4,5- i 4,6-DOS aminoglikozida unutar dekodirajućeg mesta, ali je ovaj antibiotik u kontaktu samo sa nukleozidima koji su isti i kod prokariota i kod eukariota pa se higromicin B ne može koristiti kao selektivni antibiotik (Pfister *et al.*, 2003).



Slika 7. Mesto dekodiranja na 30S ribozomalnoj subjedini (Poehlsaard and Douthwaite, 2005). Prikazani su nukleotidi A1492 i A1493 nakon izmeštanja iz heliksa 44, u interakciji sa iRNK (ljubičasta boja) i tRNK (zelena boja) u A mestu. Aminoglikozidni antibiotici paromomicin (crvena boja) i geneticin (plava boja) su vezani za heliks 44. Prikazani su i nukleotidi G1405 i A1408.

3.2. 16S rRNK metiltransferaze

3.2.1. “Housekeeping” metiltransferaze i rezistencija

Jedna od “housekeeping” MTaza je KsgA koja dimetiluje dva susedna nukleozida, A1518 i A1519 iz petlje heliksa 45 (h45), blizu 3' kraja 16S rRNK, prevodeći ih u N6,N6-dimetiladenozine (Helser *et al.*, 1972). To je jedini enzim među enzimama koji su odgovorni za posttranskripcionu modifikuju rRNK sa univerzalno konzervisanom strukturom i funkcijom, koja je očuvana čak i kod mitohondrija i hloroplasta. Metilacija h45 posredstvom KsgA MTaze, direktno ili indirektno, je obeležje kompletnih, funkcionalno sposobnih 30S subjedini. KsgA MTaza prepoznaje i modifikuje samo translaciono neaktivnu konformaciju 30S subjedini ali ne i golu 16S rRNK (Desai and Rife, 2006). Može se reći da KsgA funkcioniše kao poslednja tačka provere tek sklopljenih

malih ribozomalnih subjedinica pre nego što se uključe u proces translacije (Connolly *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Zanimljivo je i da inaktivacija KsgA MTaze i nemogućnost dimetilacije odgovarajućih adenzina dovodi do rezistencije na kazugamicin, najverovatnije promenom konformacije vezujućeg mesta za antibiotik, pri čemu je ukupni uticaj na preživljavanje umeren (O'Farrell *et al.*, 2006). Postoji značajna sličnost između KsgA MTaze i ErmC' MTaze zahvaljujući čijem delovanju se uspostavlja rezistencija na MLS_B grupu antibiotika (O'Farrell *et al.*, 2004). Ova sličnost se ogleda ne samo na nivou sekvence, već i na nivou trodimenzionalnih struktura ovih proteina. Obe strukture pokazuju da se KsgA i ErmC' Mtaza sastoje od većeg N-terminalnog domena, izgrađenog od naizmeničnih β lanaca i α heliksa, i manjeg C-terminalnog domena, koji čini četiri ili pet α heliksa.

Slično KsgA metiltransferazi, usled gubitka metilacione aktivnosti *rsmG* gena koji kodira 16S rRNK MTazu odgovornu za modifikaciju nukleozida G527, javlja se rezistencija na streptomycin (Okamoto *et al.*, 2007).

Ukoliko dođe do gubitka funkcije TlyA MTaze iz mikobakterija, koja modifikuje C1409 u 16S rRNK i C1920 u 23S rRNK, bakterije postaju rezistentne na kapreomicin i viomicin, dva antibiotika koja se vezuju za granične površine ribozoma (Johansen *et al.*, 2006b).

3.2.2. 16S rRNK metiltransferaze bakterija koje proizvode aminoglikozide

Da bi izbegle sopstvene toksične proizvode, bakterije proizvođači antibiotika su razvile nekoliko odbrambenih strategija među koje spadaju I) enzimska modifikacija antibiotika, II) sprečavanje kontakta antibiotika i njegovog targeta i III) modifikacija mesta vezivanja antibiotika. Posedovanje enzima koji inaktiviraju antibiotike je bitna karakteristika za preživljavanje kod većeg broja bakterija proizvođača. Rezistencija na aminoglikozide se najčešće postiže delovanjem enzima koji modifikuju i inaktiviraju sam antibiotik: aminoglikozid-acetiltransferaze i aminoglikozid-fosfotransferaze, dok su kod kliničkih sojeva tj. patogenih bakterija prisutne i aminoglikozid-adeniltransferaze koje nisu pronađene kod proizvođača (Shaw *et al.*, 1993). Takođe, zahvaljujući metilaciji specifičnih

nukleozida unutar A mesta na 16S rRNK pomoću SAM zavisnih 16S rRNK MTaza, uspostavlja se visok nivo rezistencije na aminoglikozide kod bakterija koje te antibiotike proizvode, tj. njihova efikasna samozaštita. Delovanjem ovih enzima je onemogućeno vezivanje aminoglikozida za 30S ribozomalnu subjedinicu dok njena primarna uloga u procesu translacije ostaje očuvana.

Kristalne strukture kompleksa dva 4,6-DOS aminoglikozida: gentamicina C1a (Yoshizawa *et al.*, 1998), odnosno tobramicina (Vicens and Westhof, 2003) sa RNK koja reprezentuje A mesto, su pokazale da oba antibiotika ostvaruju direktan kontakt sa nukleozidom G1405 preko njihovih supstituenata na prstenu III. Metil grupa na poziciji N7 (^{m7}G1405) direktno ometa vezivanje antibiotika prvenstveno zbog sterne smetnje između modifikovanog nukleozida i prstena III, a postoji mogućnost i da dolazi do elektrostatičkog odbijanja zahvaljujući pozitivnom naelektrisanju modifikovane baze. Ova modifikacija kod proizvođača obezbeđuje rezistenciju na 4,6-DOS aminoglikozide iz kanamicinske i gentamicinske grupe, ali ne i na apramicin. Kod 4,5-DOS aminoglikozida, kao što su paromomicin ili neomicin, supstituent na poziciji 5 je postavljen pod takvim uglom da je usmeren od G1405 nukleozida te njegova metilacija ne utiče na vezivanje antibiotika. Obe grupe antibiotika, 4,5- i 4,6- DOS aminoglikozidi se vezuju za 16S rRNK tako da su substituenti na prstenu I postavljeni vrlo blizu nukleozida A1408. Adenozin sa metil grupom vezanom na poziciji N1 (^{m1}A1408) je pozitivno naelektrisan na neutralnom pH i verovatno ometa vezivanje aminoglikozida ne samo fizički, već i elektrostatičkim odbijanjem. Ovom modifikacijom se postiže rezistencija na apramicin i kanamicinsku grupu 4,6-DOS aminoglikozida, ali ne i na gentamicin.

Na osnovu pozicije nukleozida koje modifikuju, G1405 ili A1408, 16S rRNK MTaze odgovorne za rezistenciju na aminoglikozide, se dele na dve familije, Kgm (*eng.* kanamycin-gentamicin methyltransferase) i Kam (*eng.* kanamycin-apramycin methyltransferase) familije MTaza. KgmB MTaza iz bakterije *Streptomyces tenebrarius* (od skora klasifikovane kao *Streptoalloteichus tenebrarius*, (Tamura *et al.*, 2008)), Sgm MTaza iz bakterije *Micromonospora zionensis*, GrmA MTaza iz bakterije *M. echinospora* (ranije klasifikovane kao *M. purpurea*), Krm MTaza iz bakterije *Frankia* sp. Cc13, FmrO MTaza iz bakterije *M. olivasterospora*, Grm MTaza iz bakterije *M. rosea*, Srm1 MTaza iz

bakterije *M. inyonensis* i *NbrB* MTaza iz bakterije *Streptomyces hindustanus* pripadaju Kgm familiji MTaza (Savić *et al.*, 2009). Eksperimentalno je potvrđeno da KgmB, Sgm, GrmA i Krm MTaze modifikuju G1405 na poziciji N7 (Beauclerk and Cundliffe, 1987; Čubrilo *et al.*, 2009; Savić *et al.*, 2009; Tomić *et al.*, 2008). Za ostale pobrojane članove Kgm familije MTaza mesto delovanja se pretpostavlja na osnovu profila rezistencije. Modifikacija ^{m7}G1405 delovanjem članova Kgm familije MTaza je delotvorna samo protiv 4,6-DOS aminoglikozida (Savić *et al.*, 2008). Pošto je ciljani nukleozid G1405 sparen sa C1496 u osnovi dugačkog heliksa 44 i nemoguće je pristupiti njegovom N7 atomu radi metilacije, verovatno je neophodno da prvo dođe do takve konformacione promene koja će omogućiti da se metilacija uopšte desi.

Za samo tri člana Kam familije MTaza: KamA iz bakterije *Streptomyces tenjimariensis* (Beauclerk and Cundliffe, 1987), KamB iz bakterije *Streptomyces tenebrarius* (Savić *et al.*, 2009) i KamC iz bakterije *Saccharopolyspora hirsuta* (Holmes *et al.*, 1991) je eksperimentalno potvrđeno da metiluju nukleozid A1408 na poziciji N1.

Modifikacija delovanjem Kgm MTaza je delotvorna protiv 4,6-DOS aminoglikozida, pri čemu se ostvaruje visok stepen rezistencije na kanamicinsku i gentamicinsku grupu aminoglikozida, ali ne i na apramicin, 4-monosupstituisani dezoksistreptamin. Nasuprot ovome, pripadnici Kam familije MTaza uspostavljaju rezistenciju na apramicin i 4,6-DOS aminoglikozide, sem gentamicina. Poređenjem profila rezistencije između Kgm i Kam familije MTaza nedvosmisleno se uočavaju funkcionalne razlike vezane za modifikaciju G1405 i A1408 u okviru 16S rRNK.

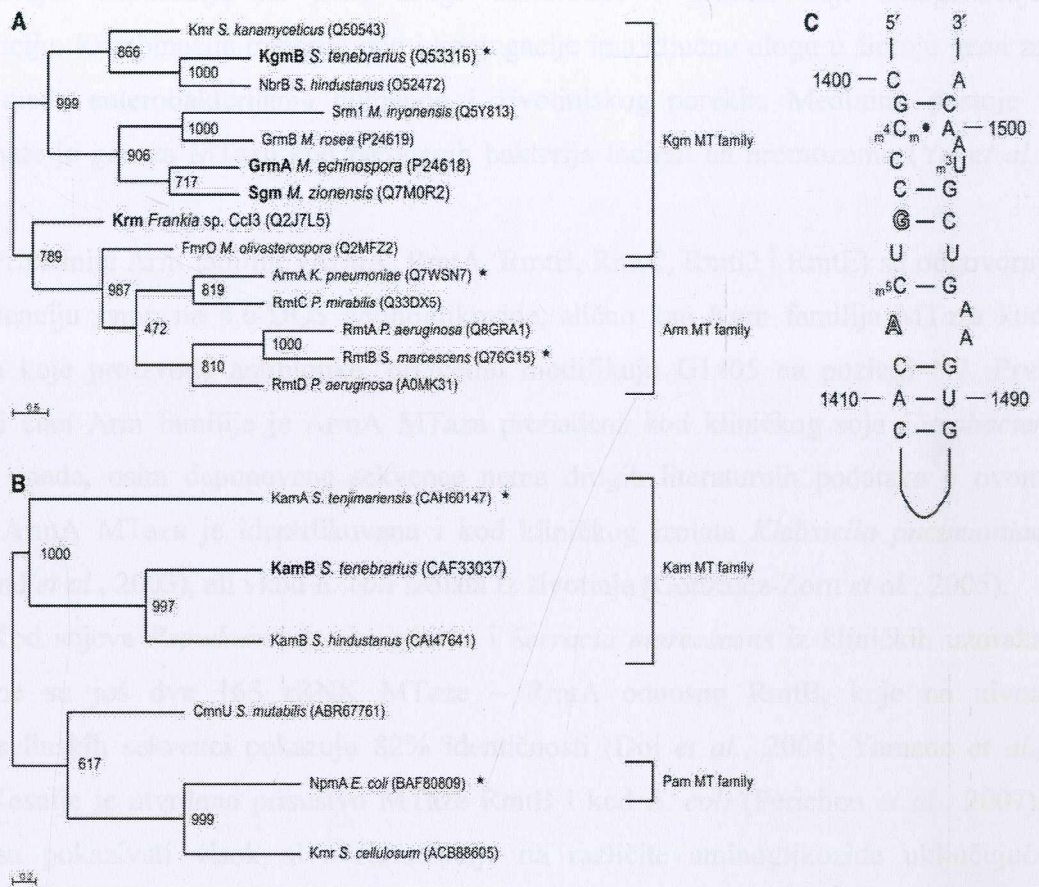
Vezivanje aminoglikozida, sem što uzrokuje greške tokom dekodiranja iRNK i blokira translokaciju bilo iRNK bilo tRNK, uzrokuje i druge fenomene koji utiču na pravilno funkcionisanje translacione mašinerije. Nedavno je pokazano da se neomicin, paromomicin i gentamicin vezuju za heliks 69 u 23S rRNK u neposrednoj blizini P mesta čime inhibiraju recikliranje ribozoma (Borovinskaya *et al.*, 2007). Poznato je takođe da paromomicin inhibira sklapanje 30S subjedinice sa podjednakom efikasnošću kao što inhibira translaciju (Champney, 2006; Mehta and Champney, 2002).

Higromicin B, aminoglikozid sa baktericidnim delovanjem, produkt bakterije *Streptomyces hygroscopicus* (Beauclerk and Cundliffe, 1987), ima strukturno različitu

aminociklitolnu komponentu i inhibira sintezu proteina blokiranjem translokacije ribozoma, dok značajnog efekta *in vivo* na grešenje tokom translacije nema (Bakker, 1992; Cabanas *et al.*, 1978; Eustice and Wilhelm, 1984; Gonzalez *et al.*, 1978; Pardo *et al.*, 1985). Zanimljivo je da se rezistencija na higromicin B ostvaruje samo ako se pripadnici Kgm familije MTaza eksprimiraju u bakterijama iz roda *Micromonospora* pri čemu se ova “kolateralna” rezistencija pripisuje jedinstvenim strukturnim odlikama 30S ribozomalne subjedinice kod pripadnika ovog roda (Kojić *et al.*, 1999). Inače, rezistencija na higromicin B se ostvaruje baznom zamenom specifičnih konzervisanih nukleozida unutar rRNK, što ovaj antibiotik čini toksičnim za skoro sve organizme (Pfister *et al.*, 2003).

3.2.3. Pojava 16S rRNK metiltransferaza kod patogenih bakterija

Metilacijom rRNK obično se postiže veoma visok stepen rezistencije na aminoglikozide [MIC > 0.5 mg/ml] i do nedavno se smatralo da je ovaj mehanizam rezistencije prisutan samo kod bakterija koje proizvode antibiotike. Međutim, prisustvo ovog tipa rezistencije je dokazano i kod klinički važnih patogenih bakterija kod kojih se broj novootkrivenih MTaza povećava iz dana u dan. S obzirom na porast broja metiltransferaza, a radi njihove lakše karakterizacije, pojavila se potreba da se 16S rRNK metiltransferaze klasifikuju. Predloženo je da metiltransferaze iz proizvođača i patogena čine superfamiliju koja je označena kao Rma (*eng. Resistance methyltransferases for aminoglycosides*) (Conn *et al.*, 2008). Isti obrazac rezistencije, prisutan kod proizvođača aminoglikozida, pronađen je i kod patogenih bakterija. Prema obrascu rezistencije i nukleozidu koji metiluju predloženo je da se familija MTaza koje su izolovane iz patogena i metiluju A1408 označava sa Pam (*eng. Pan-aminoglycoside methyltransferase*), dok bi MTaze izolovane iz patogena koje metiluju G1405 pripadale familiji označenoj sa Arm (*eng. Aminoglycoside resistance methyltransferase*) (slika 8).



Slika 8. Filogenetski odnos familija 16S rRNK metiltransferaza koje obezbeđuju rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike (Savić *et al.*, 2009).

A) G1405 metiltransferaze (Kgm i Arm familija); B) A1408 metiltransferaze (Kam i Pam familija) i C) Sekvenca i sekundarna struktura A mesta na 16S rRNK sa istaknutim mestima delovanja MTaza koje obezbeđuju rezistenciju na aminoglikozide (G1405-G i A1408-A).

Geni za MTaze kod patogenih bakterija su pronađeni na mobilnim genetičkim elementima – transpozonomima i plazmidima. Ovi geni su obično asocirani sa genima koji omogućavaju rezistenciju na neke druge antibiotike i genima koji omogućavaju transpoziciju. Kombinacija transpozicije i konjugacije ima ključnu ulogu u širenju gena za MTaze među enterobakterijama humanog i životinjskog porekla. Međutim, postoje i primeri gde je gen za MTazu kod patogenih bakterija lociran na hromozomu (Yu *et al.*, 2009).

Pripadnici Arm familije (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD i RmtE) su odgovorni za rezistenciju samo na 4,6-DOS aminoglikozide, slično kao Kgm familija MTaza kod bakterija koje proizvode antibiotike, pri čemu modifikuju G1405 na poziciji N7. Prvi otkriveni član Arm familije je ArmA MTaza pronađena kod kliničkog soja *Citrobacter freundii*, mada, osim deponovane sekvence nema drugih literaturnih podataka o ovom izolatu. ArmA MTaza je identifikovana i kod kliničkog izolata *Klebsiella pneumoniae* (Galimand *et al.*, 2003), ali i kod *E. coli* izolata iz životinja (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005).

Kod sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* iz kliničkih uzoraka pronađene su još dve 16S rRNK MTaze – RmtA odnosno RmtB, koje na nivou aminokiselinskih sekvenci pokazuju 82% identičnosti (Doi *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2004). Kasnije je utvrđeno prisustvo MTaze RmtB i kod *E. coli* (Perichon *et al.*, 2007). Izolati su pokazivali visok nivo rezistencije na različite aminoglikozide uključujući amikacin, tobramicin, kanamicin i gentamicin. Zanimljiv je podatak da je *P. aeruginosa* pokazivao i rezistenciju na arbekacin, antibiotik koji može biti inaktiviran samo bifunkcionalnim enzimom koji poseduje i aciltransferaznu i fosfotransferaznu aktivnost, a koji nije do danas pronađen kod G (-) bakterija (Doi *et al.*, 2004).

Za produkte *armA* i *rmtB* gena je eksperimentalno određeno mesto metilacije, i pokazano je da ove MTaze, kao što je i očekivano, modifikuju N7 guanin na poziciji 1405 (Liu *et al.*, 1995; Perichon *et al.*, 2007).

Identičnost između RmtA i MTaza iz aktinomiceta (GrmA, GrmB, KgmB i Sgm MTaza) iznosi oko 32%, dok je identičnost sekvenci RmtB sa MTazama iz aktinomiceta preko 30% (Savić, 2009; Savić *et al.*, 2009). Visok G+C sastav RmtA i RmtB MTaza

sugeriše mogući horizontalni transfer gena iz bakterija proizvođača antibiotika u G (-) patogene.

Kod patogena su pronađene još i RmtC MTaza, koja je detektovana kod *Proteus mirabilis* (Wachino *et al.*, 2006), kao i RmtD MTaza, druga otkrivena MTaza u *P. aeruginosa* nakon RmtA (Doi *et al.*, 2007). Na osnovu profila rezistencije smatra se da obe MTaze modifikuju G1405 nukleozid.

U više navrata je rađeno *in silico* poređenje MTaza poreklom iz patogenih bakterija sa MTazama aktinomiceta (Vojnović *et al.*, 2010; Wachino *et al.*, 2006). Rezultat od najviše 35.8% identičnosti sekvenci na aminokiselinskom nivou među članovima Kgm i Arm familije koji modifikuju iste nukleotide navodi na zaključak da ove MTaze možda potiču od zajedničkog pretka, ali da je on dosta dalek. Velika razlika u identičnosti na aminokiselinskom nivou unutar Kgm familije MTaza iz proizvođača, koja se kreće od 33.2% do 90.5%, takođe je zagonetna (Vojnović *et al.*, 2010).

NpmA MTaza iz *E. coli*, do sada jedini član Pam familije MTaza, odgovorna je za rezistenciju na kombinaciju 4,6- i 4,5- DOS aminoglikozida i apramicin, a eksperimentalno je utvrđeno da metiluje A1408 na poziciji N1 (Wachino *et al.*, 2007). Poređenjem NpmA MTaze sa KamA, A1408 MTazom iz *Streptomyces tenjimariensis*, utvrđen je stepen identičnosti na aminokiselinskom nivou od svega 30%. G+C sastav *npmA* gena je 34% što je mnogo niže od G+C sastava gena za KamA koji iznosi 70%. Na osnovu ovih podataka je jasno da poreklo *npmA* gena treba tražiti kod bakterija proizvođača sa niskim G+C sastavom.

3.3. Regulacija ekspresije gena za rRNK metiltransferaze

Obično stepen rezistencije za koju su odgovorne MTaze nije u direktnoj korelaciji sa količinom odgovornog enzima tj. ekspresija relativno malog broja molekula MTaze je dovoljna za kompletnu modifikaciju targeta. Intuitivno je jasno da je bakterijama neophodan mehanizam negativne autoregulacije zahvaljujući kojem bi se održavala konstantna i niska koncentracija ovih proteina. Ranije je već bilo reči o negativnoj autoregulaciji ribozomalnih proteina koja se često ostvaruje zahvaljujući mimikriji između

rRNK i operatora na iRNK za određeni ribozomalni protein. Pretpostavlja se da sličan mehanizam autoregulacije postoji i kod gena za rRNK MTaze. Pokazano je da je *ermC* gen za 23S rRNK MTazu regulisan na tri različita načina (Bechhofer, 1990) pri čemu je jedan od njih translaciona autoregulacija (Breidt and Dubnau, 1990). Po modelu negativne regulacije *ermC* gena kada koncentracija ErmC proteina pređe nivo koji je neophodan da se modifikuju svi raspoloživi ribozomi, slobodna MTaza se vezuje za *ermC* iRNK. Preciznije, ErmC protein se vezuje za region unutar iRNK koji po svojim strukturnim odlikama podseća na primarni supstrat, tj. 23S rRNK i sprečava translaciju. Ekspresija *ermC* gena zavisi i od stabilnosti *ermC* iRNK i regulacije preko mehanizma translacione atenuacije. *ErmC* iRNK postoji u dve alternativne konformacije, aktivnoj i neaktivnoj, a sadrži i dva RBS. Sa prvog RBS počinje translacija kratkog lider peptida, a sa drugog počinje translacija ErmC MTaze. U neaktivnoj konformaciji RBS *ermC* gena je zarobljen u petlji koju obrazuju odgovarajući invertovani ponovci, a vreme poluživota takve iRNA je 2-3 minuta. Sa neaktivne iRNK se prepisuje kratak lider-peptid i ako se eritromicin veže za ribosome i uzrokuje njihovo zaustavljanje (*eng. stalling*) tokom sinteze lider-peptida, dolazi do pregrupisanja petlji u okviru lider sekvence i aktiviranja iRNK, tj. RBS *ermC* gena se oslobađa i počinje translacija kodirajuće sekvence *ermC* gena. Vreme poluživota *ermC* iRNK u aktivnoj konformaciji se produžava na 45 minuta. Indukcijom *ermC* gena dolazi do povećanja broja rezistentnih ribozoma, a budući da su za prepisivanje *ermC* gena neophodni senzitivni ribozomi, dolazi do postepenog smanjenja njegove ekspresije.

Predložen je sličan model za translacionu autoregulaciju *ksgA* gena (van Gemen *et al.*, 1989), podržan otkrićem da je samo ograničena koncentracija KsgA proteina normalno prisutna u ćeliji (<1,000 molekula). Po ovom modelu strukturna sličnost između regiona sa dva ciljna adenzina unutar petlje locirane blizu 3' kraja 16S rRNK (substrat za KsgA MTazu) i *ksgA* iRNK ima ključnu ulogu u autoregulaciji. Region u okviru iRNK koji ova MTaza prepoznaje obuhvata 200 nt ispred i 200 nt iza AUG start kodona, a odlikuje ga i prisustvo sekundarne strukture 90 nukleotida ispred start kodona.

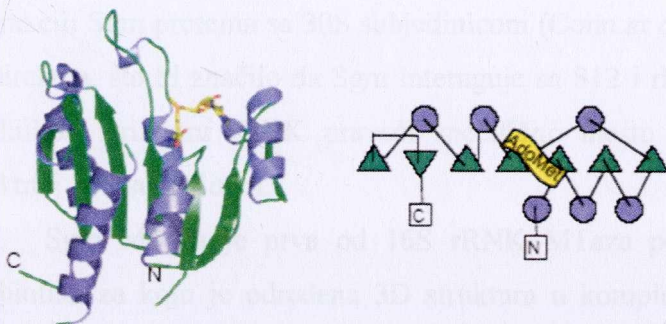
Iako svi detalji i puni značaj autoregulacije 23S rRNK MTaza koje su odgovorne za rezistenciju na makrolide, kao i KsgA "housekeeping" MTaze, nisu do kraja razjašnjeni, činjenica da je sličan mehanizam autoregulacije pronađen i kod 16S rRNK MTaza ukazuje

na njegovu važnost. Rezistencija na sopstvene toksične proizvode kod bakterije *S. tenebrarius*, proizvođača nebramicinskog kompleksa aminoglikozida, ostvaruje se i zahvaljujući delovanju KgmB 16S rRNK MTaze (Skeggs *et al.*, 1987). Opisana je i samozaštita bakterije *M. zionensis*, proizvođača G-52 amionoglikozida, preko Sgm 16S rRNK MTaze (Kojić *et al.*, 1992). Model koji opisuje translacionu regulaciju ovih gena je zasnovan na *in vivo* eksperimentima i pretpostavlja da Sgm i KgmB MTaza mogu da prepoznaju isti motiv (ili više motiva) unutar regiona na 16S rRNK (slika 6), koji je prisutan i u okviru 5'UTR regiona na njihovim iRNK (Kojić *et al.*, 1996; Miljković and Vasiljević, 2002; Vajić *et al.*, 2004). Sem toga, pokazano je i da postoji međusobna negativna regulacija između Sgm i KgmB MTaze, što navodi na zaključak da dele iste *cis*-delujuće regulatorne motive ((C)CGCCC motiv). Zanimljivo je i da GrmA MTaza iz bakterije *Micromonospora echinospora*, proizvođača gentamicinskog kompleksa aminoglikozida, ima sposobnost regulacije obe MTaze. (C)CGCCC motiv prisutan unutar 5'UTR regiona na *kgmB* i *sgm* iRNK, koji postoji i u okviru A mesta na 16S rRNK, a za koji se pretpostavlja da je regulatorna sekvenca (RS) sa ključnom ulogom u autoregulaciji oba gena, ne postoji kod 5'UTR regiona na *grmA* iRNK. Zapaženo je da rezistencija na gentamicin opada ukoliko se u *E. coli* ili *Micromonospora melanosporea* kao domaćinu koeksprimira *sgm* 5'UTR region zajedno sa Sgm proteinom (Kojić *et al.*, 2007), što se objašnjava mogućnošću da *sgm* 5'UTR titrira Sgm MTazu i tako smanjuje broj molekula enzima neophodnog za metilaciju 30S subjedinica.

3.4. Struktura i funkcija 16S RNK metiltransferaza

Pojava i globalna rasprostranjenost 16S rRNK MTaza odgovornih za rezistenciju patogena, kao i njihov negativni efekat na mogućnost upotrebe amonoglikozida, bacili su novo svetlo na osnovna istraživanja vezana za mehanizme rezistencije aktivnošću MTaza. Iako je prva 16S rRNK MTaza odgovorna za rezistenciju kod bakterija koje proizvode antibiotike otkrivena pre više od 20 godina, do nedavno je samo mali broj MTaza bio dobro okarakterisan.

Zajednička karakteristika svih SAM-zavisnih MTaza, bez obzira da li su prisutne kod patogena ili proizvođača antibiotika, jeste prisustvo visoko stuktuiranog jezgra, koje je nazvano SAM-zavisna metiltransferazna struktura, u vidu džepa za vezivanje kofaktora. Ovo jezgro čini β ploča sastavljena od sedam lanaca. Lanac 7 je antiparalelan u odnosu na ostale i umetnut je između lanaca 5 i 6. Sama β ploča je oivičena α heliksima (slika 9).



Slika 9. Tercijarna struktura klase I SAM-zavisnih MTaza koja se sastoji od sedmolančane β ploče oivičene α heliksima (Schubert *et al.*, 2003).

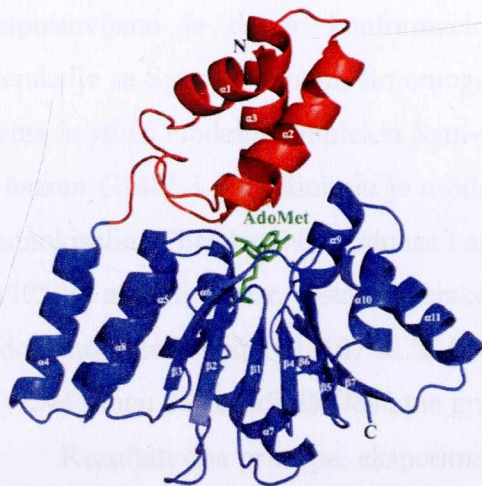
a) dijagram u vidu „traka“. β ploče su predstavljene zelenim, dok su α heliksi predstavljeni plavim „trakama“. b) dijagram topologije proteina. β ploče su predstavljene zelenim trouglovima, a α heliksi su predstavljeni plavim krugovima.

Jezgro klase I, najbrojnije od pet postojećih klasa SAM-zavisnih MTaza, je visoko konzervisano i prisutno kod mnogih enzima koji prepoznaju različite supstrate, među kojima je i 16S rRNK. Kod većine MTaza, sem karakterističnog „Rossmann-fold“ domena, postoje i domeni dodati ili umetnuti između njih (Martin and McMillan, 2002).

Veoma ograničene biohemijske podatke o G1405 MTazama su od skora upotpunili eksperimenti sa Sgm MTazom. Rezultati ovih eksperimenata su ukazali na postojanje dva strukturna domena (Maravić-Vlahoviček *et al.*, 2008) – manjeg N-terminalnog domena koji učestvuje u prepoznavanju ciljne sekvence i njenom vezivanju, dok bi veći C-terminalni domen bio odgovoran za vezivanje kofaktora i samu katalizu (Maravić-Vlahoviček *et al.*, 2008; Savić *et al.*, 2008). Takođe su identifikovane i amino kiseline odgovorne za vezivanje SAM kofaktora, prepoznavanje ciljne sekvence i transfer metil grupe (Savić *et*

al., 2008). Eksperimentalno je potvrđeno da aminokiseline glicin na poziciji 135 i asparaginska kiselina na pozicijama 156 i 182 formiraju džep za vezivanje SAM, dok aminokiseline lizin na poziciji 199, glutaminska kiselina na pozicijama 205 i 267 i arginin na poziciji 236 učestvuju u transferu metil grupe. S obzirom da Sgm MTaza prepoznaje 16S rRNK samo u okviru kompletno struktuirane 30S subjedinice, pretpostavlja se da ribozomalni protein S12, koji se nalazi u blizini nukleotida G1405 i A1408, učestvuje u interakciji Sgm proteina sa 30S subjedinicom (Conn *et al.*, 2008). Uloga S12 bi mogla biti ili direktna, što bi značilo da Sgm interaguje sa S12 i rRNK ili indirektna kada bi protein modulirao strukturu rRNK praveći specifično mesto prepoznavanja jedino prisutno u intaktnoj 30S subjedinici.

Sgm MTaza je prva od 16S rRNK MTaza poreklom iz bakterija proizvođača antibiotika za koju je određena 3D struktura u kompleksu sa SAM i SAH kofaktorima (Husain *et al.*, 2010). Takođe su određene i kristalne strukture dve MTaze poreklom iz patogena: ArmA i RmtB, pri čemu je utvrđeno da one imaju dva domena koji strukturno podsećaju na domene Sgm proteina (Schmitt *et al.*, 2009). Struktura Sgm MTaze u kompleksu sa kofaktorom, dobijena na osnovu difrakcije X zraka, je u saglasnosti sa ranijim kompjuterskim predikcijama tercijarne strukture ovog proteina (Maravić-Vlahoviček *et al.*, 2008). Eksperimentalni podaci su potvrdili domensku prirodu proteina: N-terminus (Asp8-Pro70) i C terminus (Asn71-Gln273).



Slika 10. Struktura Sgm MTaze (Husain *et al.*, 2010). Dijagram Sgm-kofaktor kompleksa. Obeleženi su N (crvena boja) i C terminusi (plava boja), kao i kofaktor SAM (zelena boja).

C-terminus Sgm MTaze poprima „Rossmann-fold“ strukturu tipičnu za klasu I MTaza, i sastoji se od centralne sedmolančane β ploče koju okružuju tri α heliksa sa svake strane. C-terminus je proširen ka N terminusu za još dva α heliksa. Sam N-terminus je u vidu svežnja koji se sastoji od tri α heliksa. Aktivno mesto je locirano u C-terminusu koji interaguje sa SAM i SAH. Utvrđeno je da aminokiseline His102, Ser104, Thr105, Arg108, Ala133, Asp156, Asp182, Leu183, Leu198 i Gln207 sačinjavaju mesto vezivanja kofaktora. Ove aminokiseline interaguju i sa SAM i sa SAH i imaju ulogu u metilaciji G1405. Enzim i kofaktor su povezani sa 11 vodoničnih veza. Aminokiseline Leu183, Gln207 i konzervisana Asp182 interaguju sa adenozilnim ostatkom kofaktora dok konzervisana Asp156 reaguje sa 2' i 3' OH grupama riboze. Ostale konzervisane aminokiseline Leu198, Ala133 i Arg108 reaguju sa karboksi propil ostatkom SAM ili SAH. Mutacionom analizom je pokazano da su 4 najbitnije aminokiseline odgovorne za vezivanje kofaktora Arg108, Gly135, Asp156 i Asp182. Ove aminokiseline obezbeđuje najmanje pet vodoničnih veza sa kofaktorom i najbitnije su za katalitičku funkciju Sgm. Interakcija Sgm

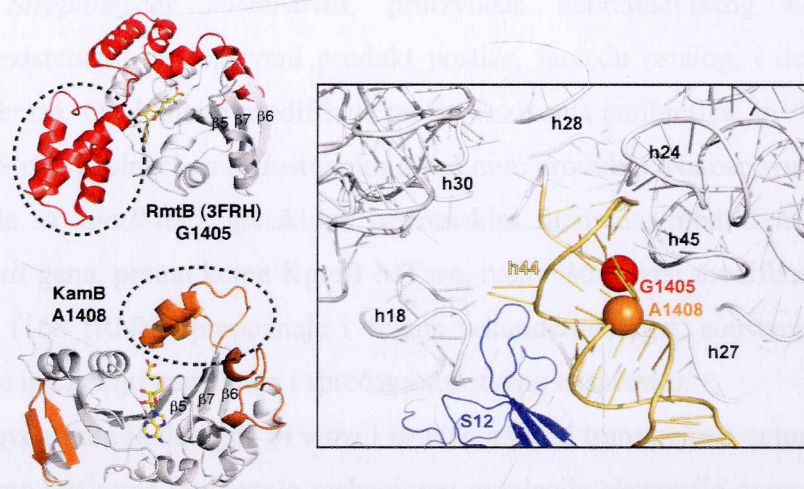
MTaze sa prirodnim supstratom 30S subjedinicom je analizirana pomoću RNK „footprint“ eksperimenata, zahvaljujući kojima su određeni nukleozidi koje Sgm protein štiti i pretpostavljeno je da se konformacione promene 30S subjedinice događaju nakon interakcije sa Sgm proteinom, što omogućava enzimu da pristupi target nukleotidu G1405. Prema *in silico* modelu kompleksa Sgm-supstrat, aminokiseline Lys199 i Ser104 interaguju sa bazom G1405 i pozicioniraju je u odgovarajuću orijentaciju prema donoru metil grupe. Aminokiselina Phe64 sa N-terminusa i aminokiselina Pro229 su bitne za stabilno vezivanje G1405 za aktivni centar. Ostale interakcije koje su moguće između enzima i targeta jesu vodonične veze između Glu107 sa N² i N³ atomima G1405 baze. Hidroksilne grupe Thr206 i Tyr244 mogu da koordinišu fosfatne grupe same baze.

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

Skoro su određene i 3D strukture dve A1408 MTaze: KamB iz *S. tenebrarius* i NpmA, njenog ortologa pronađenog kod patogena (Macmaster *et al.*, 2010; Zelinskaya *et al.*, 2011). Uprkos relativno niskom stepenu identičnosti na aminokiselinskom nivou (30%), ovi enzimi na sličan način vezuju SAM i zauzimaju vrlo slične 3D strukture. Potvrđeno je da ove dve MTaze pripadaju klasi I SAM-zavisnih MTaza, kao i G1405 MTaze. Međutim, strukturne odlike delova proteina van karakterističnog SAM-vezujućeg jezgra se značajno razlikuju kod G1405 i A1408 MTaza (slika 11), dok su visoko konzervisane unutar svake familije, bilo da su u pitanju enzimi izolovani iz proizvođača antibiotika ili iz patogena. Ova visoka strukturna konzervisanost ide u prilog zaključku o zajedničkom poreklu članova iste proteinske familije i horizontalnom transferu gena za MTaze između proizvođača antibiotika i patogenih bakterija. Međutim, činjenica da se GC sastav A1408 MTaza iz proizvođača antibiotika i patogena značajno razlikuje, kao i izražena sličnost u strukturi dela A1408 MTaza van konzervisanog SAM-vezujućeg jezgra sa m⁷G46 tRNK MTazom, sugeriše da postoji mogućnost alternativnog porekla MTaza patogena, sem direktnog horizontalnog transfera gena.

Ukoliko se uzme u obzir blizina G1405 i A1408 ciljnih nukleozida, može se pretpostaviti da MTaze odgovorne za njihovu modifikaciju prepoznaju većinu istih strukturnih motiva koji su prisutni u blizini h44 (slika 11). Zna se i da su G1405 MTaze za oko 5 kDa veće od A1408 MTaza i da se N-terminus može podeliti na dva subdomena, označena sa N1 i N2 (Schmitt *et al.*, 2009). Ukoliko N1 subdomen, neophodan za vezivanje 30S ribozomalne subjedinice, sa karakterističnim izgledom svežnja od tri α heliksa, nije prisutan, nema ni metilacije. Nasuprot ovome, kod A1408 MTaza nema funkcionalno važnog produžetka N-terminalnog domena, već su prisutni izduženi strukturni motivi između β -lanaca 5 i 6, i β -lanaca 6 i 7. Unutar drugog strukturnog motiva se nalaze tri aminokiseline neophodne za metilaciju A1408 ciljnog nukleozida (Trp193, Arg196 i Arg201 kod KamB MTaze). Na osnovu ovoga se može zaključiti da m⁷G1405 i m¹A1408 MTaze koriste različite mehanizme za prepoznavanje i selekciju nukleozidnih targeta. Pošto je nukleozid A1408 smešten unutar 30S subjedinice, pretpostavlja se da mora doći do takvog konformacionog rearanžmana kojim bi se on „izložio“ enzimu, da bi uopšte došlo do metilacije, slično kao kod Sgm MTaze (Husain *et al.*, 2010). Moguće je da petlja β 5– β 6 (aminokiseline 141–156) direktno učestvuje u prepoznavanju i izmeštanju A1408 nukleozida. Pošto ova petlja ostvaruje direktne kontakte sa drugim regionima proteina odgovornim za prepoznavanje targeta (petlja β 6– β 7) i pozicioniranje A1408 (Trp105 iz petlje β 4– β 5), vezivanjem uzrokovane konformacione promene se prenose i aktiviraju transfer metil grupe.

II CILJ RADA



Slika 11. A1408 i G1405 MTaze odgovorne za rezistenciju na aminoglikozide i njihova ciljna mesta na 30S ribozomalnoj subjedini (Macmaster *et al.*, 2010). Crvenom (za G1405 MTaze-RmtB) i narandžastom (za A1408 MTaze-KamB) bojom su istaknute strukturne odlike proteina van karakterističnog "Rossmann-like" SAM-vezujućeg džepa. Desno su prikazani target nukleozidi (A1408 i G1405) zajedno sa strukturnim motivima u 30S ribozomalnoj subjedini koje odgovarajuće MTaze verovatno prepoznaju (različiti heliksi 16S rRNK i ribozomalni protein S12).

Za potpuno razumevanje mehanizama pomoću kojih 16S rRNK MTaze prepoznaju svoje targete, neophodne su njihove kristalne strukture visoke rezolucije u kompleksu sa 30S ribozomalnim subjedinicama. Ove informacije su osnovni preduslov za uspešno dizajniranje inhibitora 16S rRNK MTaza zahvaljujući kojima bi korišćenje aminoglikozida i dalje bilo moguće, bez obzira na širenje gena za rezistenciju među patogenim bakterijama.

II CILJ RADA

Bakterija *Streptomyces tenebrarius*, proizvođač nebramicinskog kompleksa aminoglikozida, rezistenciju na sopstveni produkt postiže, između ostalog, i delovanjem KgmB metiltransferaze. Ovaj enzim modifikuje mesto vezivanja antibiotika, tj. A mesto u okviru 3' kraja 16S rRNK čineći ga nedostupnim toksičnom produktu. Na osnovu ranijih *in vivo* eksperimenata sa *kgmB-lacZ* genskim i operonskim fuzijama, predložen je model autoregulacije *kgmB* gena, prema kome KgmB MTaza, nakon što izvrši modifikaciju svog primarnog targeta (16S rRNK), prepoznaje i vezuje sekundarni target, sopstvenu iRNK, čime onemogućava inicijaciju translacije i sprečava sopstvenu ekspresiju.

Opšti cilj ovog rada je detaljna *in vitro* i *in vivo* analiza translacione autoregulacije *kgmB* gena, odnosno testiranje hipoteze o mehanizmu regulacije ekspresije ovog gena. Da bi ga ostvarili, postavili smo sledeće specifične ciljeve:

1. definisati motive koje KgmB MTaza prepoznaje i utvrditi da li se slažu sa motivima primarne i/ili sekundarne strukture 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK, za koje je na osnovu *in vivo* eksperimenata pretpostavljeno da imaju ulogu u autoregulaciji *kgmB* gena;
2. odrediti afinitet vezivanja KgmB MTaze za različite potencijalne motive unutar *kgmB* iRNK;
3. uporediti *in silico* generisanu sekundarnu strukturu u 5'UTR regionu na *kgmB* iRNK sa eksperimentalno određenom strukturom ovog regiona;
4. odrediti uticaj KgmB MTaze na ekspresiju *kgmB* gena u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju.

III MATERIJAL I METODE

1. Bakterijski sojevi i korišćeni plazmidi

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

NM522 (*supE*, *thi*, (*hsdMSmciB*)5, (*lac-proAB*), F'(*proAB*⁺, *lacI*^f, *lacZ* M15));

DH5α (F⁻, Δ*lac*, U169(Φ80 *lacZ* ΔM15), *supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *gza*96, *endA*1, *thi*1, *relA*1);

ER2566 (F⁻ λ *fhuA*2 [*lon*] *ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA*11 Δ(*mcrC-mrr*)114::*IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)*2, R(*zgb-210:: Tn10*) (*TetS*), *endA*1 [*dcm*];

M15 [pREP4] (*NaI*^S, *Str*^S, *Rif*^S, *Thi*⁻, *Lac*⁻, *Ara*⁺, *Gal*⁺, *Mit*⁻, F⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺) [Km^r, *lacI*, 3.74 kb].

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

Tabela 1. Korišćeni i konstruisani plazmidi.

plazmid	referentne karakteristike	referenca
pUCK-R	Amp ^r , Gm ^s , 5'UTR <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI/BamHI</i>) sa <i>T7</i> promotorom na 5' kraju subkloniran u pUC19 (2.8 kb)	(Marković, 2005)
pUCK-RmRS	Amp ^r , Gm ^s , 5'UTR <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI/BamHI</i>) sa mutiranom RS i sa <i>T7</i> promotorom na 5' kraju subkloniran u pUC19 (2.8 kb)	ovaj rad
pUCK-RmRS'	Amp ^r , Gm ^s , 5'UTR <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI/BamHI</i>) sa mutiranom RS' i sa <i>T7</i> promotorom na 5' kraju subkloniran u pUC19 (2.8	ovaj rad

	kb)	
pUCK-RΔΔ	Amp ^r , Gm ^s , 5'UTR <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI/BamHI</i>) sa mutirane obe potencijalne regulatorne sekvence i sa <i>T7</i> promotorom na 5' kraju subkloniran u pUC19 (2.8 kb)	ovaj rad
P3'HDVobe	5' UTR <i>kgmB</i> gena sa RS i RS' subkloniran u 3'-HDV plazmid	(Jovičić, 2005)
P3'HDVRS'	5' UTR <i>kgmB</i> gena sa RS' subkloniran u 3'-HDV plazmid	(Jovičić, 2005)
pUΔK1	Amp ^r , Gm ^r , skraćeni <i>kgmB</i> fragment (<i>SmaI/HindIII</i>) subkloniran u pUC19 (4.2 kb)	(Milojević, 1998)
pLΔK1	Amp ^r , Gm ^r , skraćeni <i>kgmB</i> fragment (<i>SalI/SalI</i>) subkloniran u pP _L tl7G (3.7 kb)	(Milojević, 1998)
pQEK-N	Amp ^r , Gm ^r , <i>kgmB</i> gen (<i>BamHI/HindIII</i>) subkloniran u pQE30 (4.3 kb)	(Marković <i>et al.</i> , 2005)
pΔK1	Amp ^r , Gm ^s , Δ <i>kgmB-lacZ</i> fuzija u pP _L tl7G (6 kb)	(Vajić <i>et al.</i> , 2004)
pMKT1	Sp ^c /Sm ^r , Gm ^s , Δ <i>kgm-lacZ</i> fuzija u pMS421 (7.7 kb)	(Vajić <i>et al.</i> , 2004)
pΔKC1	Amp ^r , Δ <i>kgmB-lacZ</i> fuzija sa mutiranom RS u pP _L tl7G (6 kb)	(Vajić <i>et al.</i> , 2004)
pUKT7	Amp ^r , Gm ^s , početak <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI/BglII</i>) sa <i>T7</i> promotorom na 5' kraju subkloniran u pUC19 (3 kb)	ovaj rad

pUAK1ATG	Amp ^r , Gm ^s , predvorje <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI</i> /blant) subklonirano u pUC19 (3.2 kb)	ovaj rad
pMAK1ATG	Spc ^r / Sm ^r , predvorje <i>kgmB</i> gena (<i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i>) subklonirano u pMS421 (4.9 kb)	ovaj rad
pK1T7	Amp ^r , Gm ^s , Δ <i>kgmB-lacZ</i> fuzija u pP _L tl7G koja ne sadrži deo potencijalnog ABC transportera (5.85 kb)	Lidija Vuković, neobjavljeni rezultati
pMKT1ATG	Spc ^r / Sm ^r , Gm ^s , Δ <i>kgm-lacZ</i> fuzija u pMS421 bez kodirajućeg dela <i>kgmB</i> gena (7.5 kb)	ovaj rad
pHDV-P1sgm	Amp ^r , 5'UTR <i>sgm</i> gena od <i>P1</i> promotora (<i>EcoRI</i> / <i>NheI</i>) subkloniran u 3'HDV	(Ilić-Tomić, 2010)
pUMK 33	Amp ^r , Gm ^r , <i>sgm</i> gen (<i>SalI</i> / <i>SalI</i>) subkloniran u pUC19 (3.82 kb)	(Kojić <i>et al.</i> , 1992)
pF6	Amp ^r , Gm ^s , <i>sgm-lacZ</i> fuzija u pP _L tl7G (5.9 kb)	(Kojić <i>et al.</i> , 1996)
pMM1	Spc ^r / Sm ^r , Gm ^s , <i>sgm-lacZ</i> fuzija u pMS421 (7.8 kb)	(Miljković and Vasiljević, 2002)
pLST1317	Amp ^r , Gm ^r , <i>grmA</i> gen (<i>SalI</i> / <i>SalI</i> / <i>SalI</i>) subkloniran u pUC19 (3.7 kb)	(Vasiljević and Cundliffe, 1190)
pMG181	Spc ^r / Sm ^r , deo <i>grmA</i> gena subkloniran u pMS421 (4.6 kb)	ovaj rad
pMG	Spc ^r / Sm ^r , Gm ^s , <i>grmA-lacZ</i> fuzija u pMS421 (7.6 kb)	ovaj rad

pMS421	Spc ^r / Sm ^r , <i>lacI^f</i> , (5.5 kb)	(Heath and Weinstock, 1991)
pP _{Ltl} 7G	Amp ^r , (2.5 kb)	(Konstantinović <i>et al.</i> , 1991)
pMC1871	Tet ^r , (7.5 kb), fuzioni vektor	Pharmacia
pUC18	Amp ^r , <i>lacZ</i> (2.7 kb)	(Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1984)
pUC19	Amp ^r , <i>lacZ</i> (2.7 kb)	(Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1984)
pBluescript II SK+/-	Amp ^r , <i>lacZ</i> (2.9 kb)	Stratagene
pUP _{Ltl}	Amp ^r , <i>P_{Ltl}</i> promotor (<i>EcoRI/PvuII</i>) subkloniran u pUC19(2.9 kb)	ovaj rad
pMP _{Ltl}	Spc ^r / Sm ^r , <i>P_{Ltl}</i> promotor (<i>EcoRI/PvuII</i>) subkloniran u pMS421 (4.4 kb)	ovaj rad

2. Medijumi za rast bakterija

Bakterijski sojevi su gajeni na čvrstim ili tečnim podlogama sa LB hranljivim medijumom (1% bakto-tripton, 0.5% NaCl, 0.5% kvašćev ekstrakt, pH 7.5; za čvrste podloge uz dodatak 1.5% agara; sterilizacija autoklaviranjem, 20 minuta na 121°C). U zavisnosti od eksperimenta, u medijum su dodavani antibiotici ampicilin (100 µg/ml), gentamicin (30 µg/ml), kanamicin (25 µg/ml), tetraciklin (15 µg/ml) i spektinomycin (50 µg/ml). Za detekciju aktivnosti β-galaktozidaze (plavo-bela selekcija) na čvrste podloge je nanošeno po 40 µl 40 µg/ml rastvora 5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktozida (X-gal). Za indukciju *lac* promotora korišćen je izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid (IPTG) u finalnoj koncentraciji od 1 mM. Svi sojevi su gajeni na 37°C.

3. Transformacija *E. coli*

Kompetentne DH5a *E. coli* su pripravane kalcijum-hloridnom metodom (Hanahan, 1983). Pojedinačne kolonije su zasejavane u 5 ml LB medijuma, inkubirane preko noći (37°C, 180 obrt/min), a potom su kulture razblaživane 1000x u svežem LB medijumu i dalje inkubirane pod istim uslovima, do srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600} = 0.5$). Nakon toga ćelijski rast je zaustavljan hlađenjem kulture (10 min na +4°C). Ohlađena kultura je taložena (10 min, 6000 obrt/min na +4°C, Sorvall SS34 rotor), a ćelije iz taloga su resuspendovane u istoj zapremini hladnog 0.1 M $CaCl_2$ i inkubirane 15 min na ledu. Nakon inkubacije, ćelije su taložene kao i u predhodnom koraku, zatim pažljivo resuspendovane u 12.5 puta manjoj zapremini hladnog RF2 pufera (10 mM MOPS, pH 6.8; 10 mM RbCl; 75 mM $CaCl_2$; 15% glicerol) i inkubirane 15 minuta na ledu. Po završenoj inkubaciji, suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od po 0.2 ml koji su trenutno zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C do korišćenja.

Prilikom korišćenja, zamrznute kompetentne ćelije su otapane na ledu. Suspenziji kompetentnih ćelija dodavana je DNK (u zapremini manjoj od 20 μ l, ukupne količine DNK manje od 0.2 μ g) i suspenzija je inkubirana 10 do 60 minuta na ledu. Nakon inkubacije ćelije su izlagane termičkom stresu u trajanju od 2 min na 42°C i 5 min na ledu. Ćelije su posttransformaciono oživljavane dodavanjem 0.8 ml svežeg neselektivnog bogatog medijuma i inkubiranjem na 37°C uz intenzivnu aeraciju od 30 do 60 minuta. Potom su ćelije razmazivane na odgovarajuće selektivne podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata. Efikasnost transformacije bila je od 10^5 - 10^7 transformanata po μ g DNK, u zavisnosti od načina pripremanja.

Kompetentne *E. coli* NM522 ćelije za jednokratnu upotrebu su takođe pripravane hemijskom metodom (Mandel and Higa, 1970). Pojedinačna bakterijska kolonija je zasejavana u 5 ml LB medijuma. Nakon preonoćne inkubacije (37°C; 180 obrt/min), kultura je razblaživana 1000x u svežem LB medijumu i dalje inkubirana pod istim uslovima do srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600} = 0.5$). Rast ćelija je zaustavljan inkubacijom kulture na ledu 10 minuta. Posle taloženja 1.5 ml kulture centrifugiranjem (10 minuta na 5000 obrt/min, +4°C, mikrocentrifuga) talog ćelija je resuspendovan u 1.5 ml

hladnog 0.1 M CaCl₂. Suspenzija je inkubirana na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije, ćelije su taložene kao u prethodnom koraku, a potom resuspendovane u 50 µl hladnog 0.1 M CaCl₂. Nakon inkubacije 30 min na ledu u ćelijsku suspenziju je dodavana DNK i dalje nastavljan rad po već opisanoj proceduri za *E. coli* DH5α ćelije.

Kompetentne *E. coli* M15 ćelije za jednokratnu upotrebu su pripremane na isti način kao i kompetentne *E. coli* NM522 ćelije, ali su bakterijske kulture gajene u LB medijumu sa dodatkom kanamicina (finalna koncentracija 25 µg/ml) radi selekcije pREP plazmida.

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

Pri izolaciji plazmidne DNK polazi se od prekončne kulture *E. coli* NM522 koja je dobijena zasejavanjem pojedinačnih kolonija u 3 ml LB medijuma, uz obavezno dodavanje odgovarajućeg antibiotika (Birnboim and Doly, 1979). Talog dobijen centrifugiranjem prekončne kulture, koja je rasla na 37°C uz aeraciju pri 180 obrt/min, resuspendovan je u 100 µl svežeg rastvora lizozima (2 µg lizozima u 1 ml destilovane vode). Posle inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi dodavano je 200 µl sveže pripremljene smeše 1% SDS-a i 0.2 M NaOH. Nakon laganog mešanja u dobijeni lizat je dodavano 150 µl 3M CH₃COONa pH 4.5, smeša inkubirana 10 min na -20°C, a zatim centrifugirana 20 min na 13000 obrt/min u mikrocentrifugi na +4°C, pri čemu su istaloženi ostaci citoplazmatske membrane, proteini i DNK vezana za membranu. Dobijeni supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK prebacivan je u čiste Eppendorf epruvete, a potom je rađena ekstrakcija proteina dodavanjem 200 µl neutralnog fenol-hloroforma (1:1), vorteksovanjem i centrifugiranjem (10 min na sobnoj temperaturi (RT); 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Vodena, gornja faza je pažljivo prebacivana u čiste epruvete, a zatim je vršena precipitacija dodavanjem 2 zapremine hladnog 95% etanola (-20°C). Precipitat je staložen centrifugiranjem u trajanju od 20 min na 13000 obrt/min na +4°C (mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (1 ml; -20°C), zatim osušen pod vakuumom i resuspendovan u 50 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) koji sadrži RNazu A u finalnoj koncentraciji od 0.2 mg/ml.

Za izolaciju plazmidne DNK iz *E. coli* DH5α korišćena je metoda, koja je takođe zasnovana na alkalnoj lizi. Talog dobijen centrifugiranjem 3 ml prekončne kulture

resuspendovan je u 100 µl rastvora PI (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RN-aza I, pH 8). U uzorak je dodavano 200 µl rastvora PII (0.2 M NaOH, 1% SDS), lagano promešano, a potom dodavano još 150 µl rastvora PIII (3 M CH₃COOK pH 5.5) i lagano promešano okretanjem Eppendorf epruvete. Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 10 minuta, uzorci su centrifugirani (RT; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Dobijeni supernatant u kome se nalazi plazmidna DNK prebacivan je u čiste Eppendorf epruvete, a zatim je vršena precipitacija dodavanjem 1 ml 95% etanola (-20°C). Sledilo je centrifugiranje u trajanju od 10 minuta (RT; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Po odlivanju supernatanta talog je resuspendovan u 500 µl rastvora PIV (100 mM Na-acetat, pH 6), a potom je vršena precipitacija dodavanjem 1 ml 95% etanola (-20°C) i centrifugiranjem (10 min na RT; 13 000 obrt/min; mikrocentrifuga). Dobijeni talog je sušen pod vakuumom i resuspendovan u 100 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5).

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

5. Enzimske reakcije sa DNK

5.1. Obrada DNK restrikcionim enzimima

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

5.2. Defosforilacija 5' slobodnih krajeva DNK

Defosforilacija 5' slobodnih krajeva fragmenata DNK vršena je alkalnom fosfatazom (CIAP, Fermentas) po uputstvu proizvođača gde je DNK inkubirana sa 1 U enzima, 30 minuta na 37°C. Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran inkubiranjem 15 minuta na 85°C.

5.3. Ligiranje DNK fragmenata

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

6. Prečišćavanje DNK fenolom

Uzorak DNK je razblaživan vodom do finalne zapremine od 200 µl. Po dodavanju iste zapremine neutralnog fenol-hloroforma (1:1), uzorak je dobro promešan na vorteksu i centrifugiran (10 minuta; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Vodena, gornja faza je pažljivo prebacivana u čiste epruvete, a zatim je rađena precipitacija dodavanjem 1/10 zapremine 3 M CH₃COONa i 2.5 volumena hladnog 95% etanola (-20°C). Nakon inkubacije na -70°C u trajanju od 20 minuta ili preko noći na -20°C, precipitat je staložen centrifugiranjem (20 min, 13000 obrt/min, +4°C, mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (1 ml; -20°C), zatim osušen pod vakuumom i resuspendovan u vodi.

7. Sinteza DNK reakcijom lančane polimerizacije (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR)

Sekvence prajmera korišćenih u PCR reakcijama su navedene u tabeli 2. Za modifikaciju 5' kraja *kgmB* gena, radi uvođenja T7 promotora pomoću kojeg bi se kasnije sintetisale odgovarajuće RNK probe *in vitro*, korišćena je reakcija lančane polimerizacije (PCR) uz upotrebu odgovarajućih prajmera (Pharmacia LKB ili Biosource).

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u reakcijama PCR-a.

Restrikciona mesta su podvučena, plavom bojom je obeležena sekvenca T7 promotora, a crvenom pentanukleotid kojim se menja regulatorna sekvenca RS'.

Ime prajmera	Sekvenca prajmera
FkgmRNA100 (5' prajmer, uvodi <i>EcoRI</i> restrikciono mesto i promotor za T7 RNK polimerazu)	5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGG AGAAGCCTCGCTAGGCTGG-3'
Rev.pr.ATG (3' prajmer, uvodi <i>Bam</i> HI restrikciono mesto)	5'-CGGGATCCATCACAGGGTCCTCTCC-3'
FkgmRNAMutI (5' prajmer, uvodi ATAAA umesto RS)	5'-AGCCTCGCTAGGCTGGACGGGCAGTGGAG CGGGCGCGGGCGCCCGGCCCGGATAAAAG AACAGGTCGCGGCGGG-3'
Bg1II-kgm (3' prajmer, pozicioniran iza <i>Bg</i> III restrikcionog mesta)	5'-GGAGGGCGTCGTACTIONTGGG-3'
pLtl2 (5' prajmer, pozicioniran 5' u odnosu na <i>P_{ltl}</i> promotor, usmeren ka polilinkeru pPLtl7G plazmida)	5'-CTTCAAGAATTCCCAGGGATCTC-3'
REVATGBgl (3' prajmer, uvodi <i>Bg</i> III restrikciono mesto)	5'-TTAGATCTGGCATCACAGGGTCCTCTCC-3'

FgrmSal (5' prajmer, uvodi <i>SalI</i> restrikcionno mesto)	5'-ACGCGT <u>CGACCGGAGG</u> ACTCGATGACG ACA-3'
RgrmBamHI (3' prajmer, uvodi <i>BamHI</i> restrikcionno mesto)	5'-CGGGATCCGAGATCTCATGCAGCCC-3'

PCR reakcije su pripremane u reakcionoj smeši od 50 µl sledećeg sastava: 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 na 25°C), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM Mg SO₄, 0.2 mM svaki dezoksinukleotid trifosfat (dNTP), 10 pmol svakog prajmera, 1.25 U *Pfu* DNK polimeraze (Fermentas) i 50 ng plazmidne DNK matrice. Kada je korišćena *Taq* DNK polimeraza reakciona smeša od 50 µl je imala sledeći sastav: 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 3% DMSO, 0.2 mM svaki dNTP, 10 pmol svakog prajmera, 1 U *Taq* DNK polimeraze (Pharmacia) i 50 ng plazmidne DNK matrice. Reakcije su se odvijale po šemi prikazanoj u tabeli 3.

Tabela 3. Šema PCR reakcija.

		temperatura	vreme	faza reakcije
<i>Pfu</i> polimeraza		97°C	5 min	“hot start”
	25 ciklusa PCR-a	95°C	1 min	denaturacija dvolančane DNK
		70°C	2 min	hibridizacija (<i>eng.</i> annealing), sinteza i elongacija
		72°C	10 min	finalna elongacija
	ili			
<i>Taq</i> polimeraza		97°C	5 min	“hot start”
	30 ciklusa PCR-a	95°C	1 min	denaturacija dvolančane DNK
		57°C	1 min	hibridizacija (<i>eng.</i> annealing)
		72°C	1 min	sinteza, elongacija
	72°C	10 min	finalna elongacija	

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

8. Elektroforeza DNK i RNK

Elektroforeza DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima koji su pravljani otapanjem agaroze u TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, finalno pH 8.3) sa etidijum bromidom u finalnoj koncentraciji od 0.5 mg/ml. Kao pufer za elektroforezu korišćen je TBE puffer (Maniatis *et al.*, 1989). Agarozni gelovi različitog procenta (1-2%) korišćeni su u zavisnosti od veličine DNK molekula koje je trebalo razdvojiti. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine fragmenata DNK dobijenih posle digestije restrikcionim enzimima određivane su poređenjem njihove elektroforetske pokretljivosti sa standardima molekulskih masa. U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći markeri molekulskih veličina:

- λ DNK digerirana *HindIII* i *EcoRI* restrikcionim enzimima pri čemu su dobijeni fragmenti DNK dužine: 21400 bp, 5170 bp, 4310 bp, 3530 bp, 2020 bp, 1940 bp, 1610 bp, 1360 bp, 940 bp, 860 bp, 580 bp i 150 bp;

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

- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) - sadrži fragmente DNK veličine od 100 do 3000 bp pri čemu su signali koji odgovaraju DNK fragmentima veličine 500 bp i 1000 bp intenzivniji;

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) - sadrži fragmente DNK veličine od 250 do 10 000 bp pri čemu su signali koji odgovaraju DNK fragmentima veličine 1, 3 i 6 kb intenzivniji.

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

Za razdvajanje RNK ili cDNK molekula u "toeprint" eksperimentu ili u eksperimentu mapiranja sekundarnih struktura u okviru 5'UTR *kgmB*, odnosno *sgm* gena, korišćen je 8% ili 6% denaturišući poliakrilamidni gel (PAG). Za 60 ml 8% gela korišćeno je 30 g uree, 16 ml 30% akrilamida (38 g akrilamida i 2 g bisakrilamida na 100 ml), 6 ml 10xTBE pufera, vode koliko je potrebno da se dostigne finalna zapremina, 0.4 ml 10% amonijum-persulfata i 20 µl TEMED-a. Elektroforeza je izvođena u 1xTBE puferu pri konstantnoj snazi od 60 W, pri čemu je voltaža bila 1500-1900 V, a jačina struje 30-50 mA. Po završenoj elektroforezi, gelovi su sušeni i stavljeni na ekspoziciju sa "X-ray" filmovima na temperaturi od -70°C.

Za razdvajanje RNK i protein-RNK kompleksa u eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti korišćen je 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel (PAG). Za 50 ml 8% gela korišćeno je 13.35 ml 30% akrilamida (38 g akrilamida i 2 g bisakrilamida na 100 ml), 2.5 ml 10xTBE pufera, vode koliko je potrebno da se dostigne finalna zapremina, 0.4 ml 10% amonijum-persulfata i 20 µl TEMED-a. Elektroforeza se odvijala u hladnoj sobi (+4°C) u 0.5xTBE puferu, pri 250 V i 25 mA u trajanju od 1h i 45 min. Po završenoj elektroforezi, gelovi su sušeni i stavljeni na ekspoziciju sa "X-ray" filmovima na temperaturi od -70°C.

9. Elucija DNK i RNK iz gela

Za izolaciju fragmenata DNK dobijenih sečenjem restrikcionim enzimima ili u PCR reakciji iz agaroznog gela su isecani delovi u kojima se nalazi željeni DNK fragment. Po potrebi je rađena elektroelucija željenog DNK fragmenta gde je isečeni komad gela stavljan u crevo za dijalizu ispunjeno TBE puferom. Pod uticajem električnog polja (100 V, 1h) DNK je izlazila iz gela u pufer, koji je sakupljen. Etidijum bromid je ekstrahovan izoamil alkoholom (zapreminski odnos 1:1), a DNK je precipitirana iz pufera na već opisani način. Povremeno je rađena i elucija DNK iz gela pomoću kita „QIAquick Gel Extraction Kit” firme QIAGEN po priloženom uputstvu.

RNK molekuli, produkti *in vitro* transkripcije sa T7 polimerazom, su eluirani iz 6% denaturišućeg poliakrilamidnog gela. Deo gela sa očekivanom dužinom RNK je usitnjavan,

a potom inkubiran preko noći u 3-5x većoj zapremini elucionog pufera (0.5M CH₃COONH₄, 1mM EDTA, 0.1% SDS-AMBION) u hladnoj sobi (+4°C), uz šejkiranje. Po završenoj inkubaciji odvajana je tečna faza, u nju dodavan etanol u 2.5x većoj zapremini, uzorak dalje inkubiran 30 minuta na -70°C, a RNK iztaložena centrifugiranjem (20 minuta, 13000 obrt/min, +4°C, mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (1 ml; -20°C), zatim osušen pod vakuumom i resuspendovan u DEPC-vodi.

10. Sekvenciranje DNK

Sekvenciranje plazmidne DNK je rađeno na aparatu "Applied Biosystems ABI Prism 3100 DNA Sequencer" u Padovi ili na aparatu "Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer" u IMGGI. U drugom slučaju su reakcije za sekvenciranje pripremane po uputstvu iz "DNA BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit". Reakciona smeša ukupne zapremine 8 µl je sadržala 3µl rastvora "Ready Reaction Mix", 1µl odgovarajućeg prajmera koncentracije 3.2pmol/µl, 3.6 µl plazmidne DNK prečišćene na afinitetnoj kolonici (150 – 300ng) i 0.4 µl DMSO, a umnožavanje je vršeno po programu:

- 96°C / 1min
 - 96°C / 10sec
 - 50°C / 5sec
 - 60°C / 4min
- } 25 ciklusa

Reakcije sekvenciranja su prečišćavane tako što je prvo dodavano 40µl rastvora A (1.2 ml 3M Na-acetata (pH 5.2), 25 ml etanola visokog stepena čistoće i 5.8 ml ddH₂O), a potom je sledila precipitacija centrifugiranjem (10 minuta; sobna temperatura; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga). Po odlivanju supernatanta talog je ispiran dva puta sa po 200µl 70% etanola, a uzorci taloženi centrifugiranjem pod istim uslovima, kao u prethodnom koraku. Dobijeni talog je sušen na sobnoj temperaturi i na kraju resuspendovan u 20 – 25µl rastvora HiDi Formamide. Sledila je elektroforeza na aparatu "Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer" i analiza sekvence pomoću softvera "Sequencing Analysis Software v5.2" (Applied Biosystems).

11. Ekspresija i prečišćavanje rekombinantnih proteina

E. coli soj M15 je transformisan ekspresionim vektorima pQEK-N i pQES5, a dobijeni transformanti su selektovani na LB podlogama sa ampicilinom, pri čemu je u podlogu dodavan i kanamicin radi selekcije pREP plazmida. Funkcionalnost His₆-KgmB i His₆-Sgm fuzionih proteina proveravana je zasejavanjem sojeva koji nose ove plazmide na LB podloge sa gentamicinom.

11.1. Ekspresija proteina na velikoj skali i izolovanje ukupnih proteina iz *E. coli*

Za prečišćavanje His₆-KgmB i His₆-Sgm fuzionih proteina bakterije su gajene na većoj skali. Pet mililitara prekonoćne kulture *E. coli* M15/pQEK-N ili *E. coli* M15/pQES5 zasejano je u 250 ml LB medijuma sa ampicilinom (50 µg/ml) i kanamicinom (25 µg/ml) i inkubirano na 37°C, 180 obrt/min do OD₆₀₀=0.5. Potom je indukovana ekspresija proteina dodavanjem 1mM IPTG-a, a ćelije ostavljene da dalje rastu pod istim uslovima još 4h. Po isteku ovog vremena bakterijske ćelije su sakupljane centrifugiranjem (5000 obrt/min, 20 minuta, +4°C, Sorvall GSA rotor) nakon čega su ili korišćene neposredno za prečišćavanje rekombinantnih proteina ili čuvane na -20 °C do dalje upotrebe.

Talog bakterijske kulture je resuspendovan u 10 ml pufera za lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) sa 1 mg/ml lizozima. Inkubacija na ledu je trajala 30 minuta. Tretman lizozimom omogućava stvaranje pora u ćelijskom zidu i efikasnije oslobađanje ćelijskog sadržaja u procesu mehaničkog lomljenja u francuskoj presi. Ćelije su razbijane propuštanjem kroz francusku presu 3 puta pri pritisku 16000 lb/in². Nakon mehaničkog lomljenja ćelija u lizat je dodata DNaza I do koncentracije 5 µg/ml i uzorak je inkubiran 15 min na ledu. Potom je lizat provučen kroz iglu 2 puta i centrifugiran 30 minuta na 10000 obrt/min, +4 °C, Sorvall SS34 rotor. Supernatant je filtriran kroz 0.45 µm filter i nanošen na kolonu za afinitetnu hromatografiju.

11.2. Prečišćavanje rekombinantnih proteina metal afinitetnom hromatografijom pod nativnim uslovima

Rekombinantni His₆-KgmB i His₆-Sgm proteini prečišćavani su imobilizovanom metal afinitetnom hromatografijom (Porath *et al.*, 1975) pod nativnim uslovima, a kao matriks je korišćena Ni-NTA agarosa (Ni-nitrilotriacetic acid agarose, QIAGEN). Ova tehnika se zasniva na reverzibilnoj reakciji između bočnih lanaca histidina i imobilisanih metalnih jona uz stvaranje dve nove koordinatne veze. Uzorak je nanet na Ni-NTA kolonicu prethodno ekvilibrisanu puferom za lizu. Nakon ulaska celokupnog uzorka u matriks, kolona je ispirana puferom za ispiranje (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 6.0). Protein je eluiran imidazolom rastvorenim u puferu za ispiranje. Za eluciju su korišćene koncentracije imidazola od 0.1 - 0.5 M. Sakupljene frakcije analizirane su na SDS-PAGE. Uzorci proteina su čuvani na -80°C. Radni stokovi su čuvani na -20°C.

11.3. Dijaliza proteina

Za potrebe eksperimenta u kom je praćen uticaj dodatih His₆-KgmB i His₆-Sgm proteina na *in vitro* sintezu proteina bilo je potrebno promeniti pufer u kome je His₆-KgmB protein eluiran sa Ni-NTA agarose. Određena zapremina izolovanog proteina stavljena je u crevo za dijalizu, potopljena u 1000x veću zapreminu pufera za dijalizu (50 mM HEPES-KOH, 10 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 5 mM 2-merkaptetanol, 10% glicerol) i inkubirana 4h na +4°C uz stalno mešanje. Nakon toga pufer za dijalizu je zamenjen svežim i dijaliza je nastavljena preko noći.

11.4. Ekstrakti kultura iz kojih su prečišćavani His₆-KgmB i His₆-Sgm fuzioni proteini

Prekonoćne kulture *E. coli* M15/pQEK-N ili *E. coli* M15/pQES5 su razblaživane 1000x u 10 ml LB medijuma sa ampicilinom (50 µg/ml) i kanamicinom (25 µg/ml), a uzorci dalje inkubirani na 25°C, 180 obrt/min do OD₆₀₀=0.5. Sledila je indukcija dodavanjem 0.1 mM IPTG, a istovremeno su kulturama dodavani i antibiotici rifampicin (200 µg/ml) i puromicin (50 µg/ml). Nastavljena je inkubacija pod istim uslovima u trajanju

od 30 minuta nakon čega su bakterijske ćelije sakupljane centrifugiranjem (5000 obrt/min; 10 minuta; Eppendorf 5804 R). Talozni bakterijskih kultura su resuspendovani u 0.5 ml pufera za lizu (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) sa 1 mg/ml lizozima i inkubirani na ledu u trajanju od 30 minuta. Bakterijske ćelije su razbijane na sonifikatoru "Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator" (3 pulsa u trajanju od 20 sekundi sa amplitudom koja odgovara 70% maksimalne i jednodominantnim pauzama tokom kojih se uzorci držani na ledu), nakon čega je sledilo centrifugiranje (10000 obrt/min; 10 minuta; mikrocentrifuga). Ovako dobijeni supernatant je ili korišćen direktno u eksperimentima usporedne elektroforetske pokretljivosti ili podvrgavan dodatnom centrifugiranju (14000 obrt/min; 30 minuta; mikrocentrifuga) radi dobijanja supernatanta označenog kao S30 ekstrakt, a koji će se dalje koristiti u istim eksperimentima.

12. Analiza proteina SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom

Elektroforetska analiza proteina rađena je na poliakrilamidnim gelovima pri denaturišućim uslovima u diskontinuiranom puferskom sistemu (Laemmli, 1970). Korišćen je gel za razdvajanje (*eng.* running gel) koncentracije akrilamida od 12.5% ili 10% u rastvoru sastava: 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8; 0.1% SDS; 0.001% TEMED; 0.1% amonijum persulfat. Gel za koncentrovanje proteina (*eng.* stacking gel) je nalivan nakon polimerizacije gela za razdvajanje, a sadržao je: 5% akrilamid; 0.125 M Tris-HCl pH 6.8; 0.1% SDS; 0.001% TEMED; 0.1% amonijum persulfat. Radni elektroforetski pufer se sastojao od 0.025 M Tris; 0.2 M glicin; 0.1% SDS; pH 8.3. Sastav pufera za uzorak je bio sledeći: 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β-merkaptetanol i 0.0025% bromfenol plavo. Pre nanošenja na gel uzorci su dodatno denaturisani inkubacijom od 5 minuta na 95°C. Parametri strujnog kola su podešavani u zavisnosti od veličine gela te su za gel veličine 10 cm x 8 cm iznosili: 25 mA, 130 V, 1.5 h. Detekcija proteina u gelu vršena je fiksiranjem i bojenjem u rastvoru koji sadrži 0.025% boju Coomasie Brilliant Blue (CBB) R-250, 45% metanol i 10% sirćetnu kiselinu. Gel je inkubiran u rastvoru za bojenje 1-2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon bojenja gel je odbojavan u rastvoru 45% metanola i 10% sirćetne kiseline, nekoliko sati na sobnoj

temperaturi. Potpuno obezbojavanje do pojave jasnih traka proteina postizano je ispiranjem gela u 7% sirćetnoj kiselini preko noći.

13. Određivanje koncentracije proteina

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

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

Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti je jednostavna i osetljiva metoda za određivanje interakcija između proteina i RNK. Metoda je zasnovana na razdvajanju kompleksa protein-RNK i slobodne RNK u nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Kompleksi proteina i RNK se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u odnosu na slobodnu RNK. Tokom izvođenja ovog eksperimenta prvo se sintetiše i obeležava RNK proba, potom se za nju vezuje protein i finalno određuje smanjene elektroforetske pokretljivosti kompleksa protein-RNK.

14.1. Pripremanje DNK matrice za *in vitro* transkripciju

5' UTR *kgmB* gena je umnožavan i modifikovan reakcijom PCR-a korišćenjem 5' prajmera FkgmRNA100 koji uvodi *EcoRI* restrikciono mesto i promotor za T7 RNK

polimerazu, i 3' prajmera Rev.pr.ATG, koji neposredno iza ATG start kodona uvodi *Bam*HI restrikcionno mesto. Kao matrice za PCR su korišćeni različiti plazmidi tako da se finalno *in vitro* transkripcijom dobijaju četiri različite *kgmB* RNK probe sa kombinovanim wt i mutiranim potencijalnim regulatornim sekvencama (mRS i mRS'). Sa matrice pΔKC1 je umnožen 5' UTR *kgmB* gena sa mutiranom RS i wt varijantom RS', analogno prethodno opisanom eksperimentu gde je umnožen 5' UTR *kgmB* gena sa wt varijantama RS i RS' (Marković, 2005). Potencijalna regulatorna sekvenca RS' je u PCR-u sa prajmerima FkgmRNAMutI i Rev.pr.ATG mutirana, a potom je produkt ove PCR reakcije poslužio kao matrica za drugi PCR, gde je 3' prajmer bio isti, a kao 5' prajmer je korišćen FkgmRNA100 koji uvodi *Eco*RI restrikcionno mesto i promotor za T7 RNK polimerazu. Obe PCR reakcije su izvedene pomoću *Pfu* DNK polimeraze po šemi opisanoj u poglavlju III-7. Na ovaj način je umnožen 5' UTR *kgmB* gena sa wt varijantom RS i mutiranom RS', ukoliko je korišćen pUAK1 plazmid kao matrica za prvi PCR. Kada je kao matrica za prvi PCR korišćen plazmid pΔKC1 u prvom PCR-u je umnožen 5' UTR *kgmB* gena sa obe mutirane potencijalne regulatorne sekvence (mRS i mRS'), a u drugom PCR-u je uvedeno *Eco*RI restrikcionno mesto i promotor za T7 RNK polimerazu. Dobijeni PCR produkti su, radi lakšeg čuvanja i manipulacije, uklonirani u plazmid pUC19 čime su dobijeni plazmidi pUCK-RmRS, pUCK-RmRS' i pUCK-RΔΔ (tabela 1). Ovi plazmidi su ili sečeni sa *Bam*HI, potom prečišćavani precipitacijom i finalno resuspendovani u DEPC-vodi, pa su kao takvi bili matrica za *in vitro* transkripciju, ili je iz njih *Eco*RI/*Bam*HI digestijom izdvajan odgovarajući DNK fragment koji je prečišćavan na isti način kao i sam plazmid, da bi finalno poslužio kao matrica za sintezu RNK molekula.

5' UTR *kgmB* gena je takođe umnožavan i modifikovan u reakciji PCR-a sa već pomenutim FkgmRNA100 5' prajmerom (uvodi *Eco*RI restrikcionno mesto i promotor za T7 RNK polimerazu), i *Bgl*II-kgm 3' prajmerom. Sama PCR reakcija se odvijala po šemi za PCR sa *Taq* DNK polimerazom (poglavlje III-7), a produkt PCR reakcije je nakon digestije sa *Eco*RI i *Bgl*II restrikcionim enzimima ukloniran u plazmid pUC19 i dobijen je plazmid označen kao pUKT7.

Kao matrica za sintezu RNK koja će biti nespecifični kompetitor u EMSA eksperimentima korišćen je plazmid pBluescript II SK+/- linearizovan *Xba*I ili *Eco*RV

enzimom. Na ovaj način se sa T7 promotora prepisuje polilinker plazmida pBluescript II SK+/- do mesta sečenja i dobija se u prvom slučaju RNK molekul veličine 93 nukleotida ili u drugom slučaju RNK molekul veličine 55 nukleotida.

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

Za sintezu RNK reakcijom *in vitro* transkripcije korišćen je "T7-MEGAshortscript kit" (Ambion). Reakciona smeša zapremine 20 μ l sastojala se od 2 μ l 10x koncentrovanog reakcionog pufera, po 2 μ l svakog ribonukleotida (75 mM), 2 μ l T7 enzimske smeše i 200 ng DNK matrice u slučaju eluiranog fragmenta, odnosno 5 μ g u slučaju linearizovanog plazmida. Reakcija se odvijala 3 h na 37°C. DNK je nakon reakcije *in vitro* transkripcije uklanjana tretmanom sa DNazom I prema uputstvu proizvođača. Sintetisana RNK proveravana je elektroforetski na 2% nedenaturišućim agaroznim gelovima, a tačna koncentracija RNK u ovom i svakom daljem koraku određivana je spektrofotometrijski merenjem OD₂₆₀. Po završenoj sintezi RNK molekula reakcionoj smeši je dodato 6 μ l 5 M NaCl i voda do 200 μ l. Enzim (T7 polimeraza) je uklonjen tretmanom sa fenolom po opisanoj proceduri za prečišćavanje DNK, a vodena faza je nakon toga na isti način tretirana hloroformom. RNK je iz vodene faze precipitirana dodatkom 2.5 zapremine 95% etanola (Clarke, 1999). Nakon inkubiranja 30 minuta na -80°C, precipitat je staložen centrifugiranjem (20 minuta; 13000 obrt/min; +4°C; mikrocentrifuga). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom, zatim osušen pod vakuumom i resuspendovan u vodi. Uzorci RNK čuvani su na -80°C. Za sintezu RNK je korišćen i "TranscriptAid™T7 High Yield Transcription Kit" firme Fermentas, a sama reakcija, slična prethodno opisanoj kod "T7-MEGAshortscript kit" firme Ambion, se odvijala po uputstvu proizvođača.

14.3. Defosforilacija 5' kraja RNK molekula

Da bi se sintetisani RNK molekul radiokativno obeležio na 5' kraju, neophodna je njegova defosforilacija. RNK dobijena *in vitro* transkripcijom (oko 1 μ g odnosno 200 pmol) rastvorena je u puferu za alkalnu fosfatazu (50 mM Tris-HCl, pH 9; 1 mM MgCl₂) i

inkubirana sa 1 U bakterijske alkalne fosfataze (BAPA19, Amersham Pharmacia) 1 h na 37°C. Enzim je na kraju reakcije termički inaktiviran 15 minuta na 85°C. Zatim je enzim uklonjen tretmanom sa fenolom, a RNK je iz vodene faze precipitirana po već opisanoj proceduri.

14.4. Radioaktivno obeležavanje RNK molekula

RNK molekul je radioaktivno obeležavan fosforilacijom njegovog 5' kraja, pri čemu je korišćena T4 polinukleotid kinaza i ^{32}P - γ -ATP. Reakciona smeša zapremine 15 μl je sadržavala 20-30 pmol defosforilisane RNK, 1.5 μl 10x kinaznog pufera (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M MgCl_2 , 50 mM DTT), 10U T4 polinukleotid kinaze (New England Biolabs) i 4 μl ^{32}P - γ -ATP (5000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia). Reakcija obeležavanja se odvijala 30 min na 37°C, a zaustavljena je inkubiranjem 10 min na -20°C. Zatim je obeležena RNK proba propuštana kroz Sephadex G-50 kolonice (prema uputstvu proizvođača – Amersham) kako bi se uklonili neugrađeni radioaktivni nukleotidi. Efikasnost obeležavanja merena je na scintilacionom brojaču (LKB Wallac 1219RACKBETA). Obeležena RNK proba je razblaživana vodom do koncentracije koja će dati 5000 cpm/ μl , a to je odgovaralo količini radioaktivne probe u jednoj reakciji.

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

Vezivanje prečišćenog His₆-KgmB proteina za obeleženi RNK molekul se odvijalo u reakcionoj smeši zapremine 30 μl u puferu sledećeg sastava: 10 mM HEPES pH 7.6, 40 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.01% Igepal CA-630. Količina RNK u reakciji vezivanja održavana je konstantnom, dok je količina His₆-KgmB proteina linearno povećavana da bi se odredila ona koncentracija proteina koja dovodi do pojave jasno vidljivog protein-RNK kompleksa. U reakcionu smešu dodavani su još i 4U inhibitora RNaze (RNAGuard Ribonuclease Inhibitor (Porcine), Amersham Pharmacia) i 100 ng kvaščeve tRNK kako bi se sprečilo delovanje eventualno prisutne RNaze. Reakcija vezivanja se odvijala 20 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga je dodavano 10 μl

rastvora boje (25% glicerol, 0.05% brom-fenol plavo). Ovako pripremljeni uzorci su analizirani na 8% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu, što je već prethodno opisano.

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

U kompetitivnim esejima su specifični kompetitor (neobeležena RNK proba) i nespecifični kompetitor (RNK dobijena transkripcijom polilinkera pBluescript II SK+/-plazmida) dodavani u velikom višku u odnosu na obeleženu RNK probu. U reakcionoj smeši sastava koji je već naveden u poglavlju III-14.4. je najpre 10 minuta inkubirana neobeležena kompetitivna RNK sa ili bez proteina na sobnoj temperaturi. Inkubacija je nakon dodavanja obeležene RNK probe nastavljena još 20 minuta i na kraju su uzorci, nakon dodatka rastvora boje, nanošeni na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel.

15. "Filter binding" esej

Obeleženi RNK molekul korišćen u "filter binding" esejju je pripreman na isti način kao za potrebe EMSA eksperimenata, što je detaljno opisano u odeljcima III-14.1. do III-14.4. Sama reakcija vezivanja prečišćenog His₆-KgmB proteina za obeleženi RNK molekul se takođe odvijala na način već opisan u poglavlju III-14.5. Finalno su produkti reakcije, umesto na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel, nanošeni na „Hybond-C extra“ nitroceluloznu membranu na aparatu za "dot blot" (Minifold II; Schleicher & Schuell). Nitrocelulozna membrana je pre nanošenja reakcija inkubirana 15 min u istom puferu u kome su se reakcije odvijale, kao i "Hybond-N+" najlonska membrana identičnih dimenzija koja se nalazila ispod nje. Sledilo je sušenje obe membrane i ekspozicija sa "X-ray" filmovima na temperaturi od -70°C radi detekcije signala.

16. "Toeprint" esej

Metoda "toeprint" se zasniva na "primer extension" reakciji, kada MMLV reverzna transkriptaza tokom polimerizacije spadne sa RNK molekula nakon nailaska na stabilan ternarni kompleks 30S-RNK-tRNK^{fmet}, što se detektuje u vidu trake, "toeprint" signala, na denaturišućem poliakrilamidnom gelu. U nekim slučajevima je veza 30S ribozomalne subjedinice sa RNK dovoljno stabilna i bez tRNK^{fmet}, te se reverzna transkriptaza zaustavlja i detektuje se "binarni kompleks". Preinkubiranjem RNK sa proteinom koji se ispituje, ukoliko on zaista sprečava inicijaciju translacije, pre dodavanja ostalih komponenti, sprečava se formiranje ternarnog kompleksa, što se na denaturišućem poliakrilamidnom gelu detektuje kao "hlađenje" signala. Tokom izvođenja "toeprint" eseja neophodno je najpre radioaktivno obeležiti prajmer, a potom ga vezati za odgovarajući RNK molekul. Sledi vezivanje 30S ribozomalne subjedinice u prisustvu tRNK^{fmet} i finalno, sinteza cDNK pomoću enzima reverzne transkriptaze. Radi određivanja tačne pozicije dobijenih signala neophodno je uraditi i didezoksisekvenciranje RNK molekula pomoću istog prajmera.

16.1. Radioaktivno obeležavanje prajmera

Prajmeri su radioaktivno obeležavani fosforilacijom 5' kraja, pri čemu je korišćen enzim T4 polinukleotid kinaza i ³²P-γ-ATP. Reakciona smeša ("annealing mix") zapremine 20 μl je sadržala 2 μl prajmera (5 pmol/μl), 2 μl 10x kinaznog pufera (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M MgCl₂, 50 mM DTT), 1 μl T4 polinukleotid kinaze (10U/μl, Fermentas), 3 μl ³²P-γ-ATP (5000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia) i 12 μl DEPC-vode. Reakcija obeležavanja se odvijala 45-60 minuta na 37°C, a potom je sledilo prečišćavanje obeleženog prajmera. Zapremina reakcione smeše je povećavana dodatkom 20 μl DEPC-vode, a uzorak potom propuštan kroz Sephadex G-25 kolonice (prema uputstvu proizvođača – Amersham) kako bi se oslobodio od neugrađenih radioaktivnih nukleotida. Radioaktivno obeleženi prajmer je sa G-25 kolonice eluiran u zapremini od 33 μl DEPC-vode te je finalno njegova koncentracija bila ~0.3pmol/μl. Efikasnost obeležavanja prajmera merena je na scintilacionom brojaču (LKB Wallac 1219 RACKBETA).

Tabela 4. Prajmeri korišćeni u "toeprint" eseju.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
PEkgm1 (3' prajmer, pozicioniran ispred <i>Bgl</i> III restrikcionog mesta)	5'-CTGGTAGCGCCTGCTGG-3'
PEkgm2 (3' prajmer, pozicioniran ispred <i>Bgl</i> III restrikcionog mesta)	5'-GGTTTCGGGCGCGACGC-3'
Toe1 (3' prajmer, obuhvata <i>Sal</i> I restrikciono mesto)	5'-GCGTCGACGACCTCCGCCAGCC -3'
Rev+80sgm (3' prajmer, uvodi <i>Nhe</i> I restrikciono mesto)	5'-CGGCTAGCGCCACCGTCTGGTAAC -3'

16.2. Priprema 30S ribozomalnih subjedinica

Za pripremu 30S ribozomalnih subjedinica je modifikovana ranije opisana procedura (Hartz *et al.*, 1988). Prekonoćna kultura *E. coli* MRE600 je razblaživana 100x u 11 LB medijuma i uzorak dalje inkubiran na 37°C i 180 obrt/min do OD₆₀₀=0.7-0.9. Čelije su sakupljane centrifugiranjem (10 min; +4°C; 7 000 obrt/min; Sorvall centrifuga, GS3 rotor), a potom prane 2 puta u puferu I (10 mM Hepes/KOH pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 M NH₄Cl, 6 mM β-merkaptotanol) i jednom u puferu II (10 mM Hepes/KOH pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 6 mM β-merkaptotanol). Za svako pranje koristi se 500 ml pufera na 1 litar početne kulture, a između pranja se uzorak centrifugira 10 min na +4°C i 7 000 obrt/min. Oprane ćelije su resuspendovane u puferu II (oko 10 g ćelija u 15 ml) i potom razbijane propuštanjem kroz francusku presu pri pritisku 16000 lb/in². Nakon prvog koraka mehaničkog lomljenja ćelija u lizat je dodata DNaza I do koncentracije 5 µg/ml i sledilo je dodatno razbijanje propuštanjem još dva puta kroz francusku presu. Dobijena suspenzija je najpre centrifugirana (10 min; +4°C; 12 000 obrt/min; Sorvall centrifuga, SS34 rotor), a potom je sakupljeni supernatant još jednom centrifugiran (30 min; +4°C; 12 000 obrt/min;

Sorvall centrifuga, SS34 rotor). Na ovaj način dobijena S30 frakcija je naslojavana na 1.1M saharozni jastuk i potom centrifugirana (20 sati; +4°C; 30 000 obrt/min, Beckman ultracentrifuga, TI 70 rotor). Dobijeni talog (70S) je dva puta ispran sa 2 ml pufera II i finalno resuspendovan staklenim štapićem sa zaobljenim vrhom u 2 ml istog pufera. Sledila je dijaliza suspenzije preko noći na +4 °C u 2 l pufera III (10 mM Hepes/KOH pH 7.6, 0.3 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 6 mM β-merkaptotanol) sa jednom zamenom pufera posle 2 sata dijalize. Posle dijalize je određivan OD₂₆₀ i na pripremljene linearne saharozne gradijente (10 – 30%, pufer III) je nanošeno 150 OD₂₆₀ (u zapremini od 500μl). Gradijenti su najpre centrifugirani (15 sati; +4°C; 23 000 obrt/min; Beckman ultracentrifuga, SW 28 rotor), a potom frakcionisani, pri čemu je za svaku frakciju meren OD₂₆₀. Frakcije koje sadrže 30S subjedinice su spojene, koncentracija MgCl₂ je podešavana do 10mM i na kraju je dodavan pufer II. Uzorak je pažljivo promešan pa centrifugiran preko noći (+4°C; 50 000 obrt/min; Beckman ultracentrifuga, TI 70 rotor). 30S ribozomalne subjedinice su potom rastvarane u puferu II pomoću staklenog štapića sa zaobljenim vrhom. Nakon merenja OD₂₆₀, 30S ribozomalne subjedinice su razblaživane sa puferom 1xVD+Mg²⁺ (0.01M Tris-Cl pH 7.4; 0.06M NH₄Cl; 6mM β-merkaptotanol, 0.01M Mg-acetata) do koncentracije od 2 pmol/μl i čuvane na -70°C.

16.3. "Toeprint" reakcija

Radioaktivno obeleženi prajmer je najpre vezivan za RNK sintetisanu *in vitro* (poglavlje III-14.2). Reakciona smeša zapremine 20 μl se sastojala od 4 μl 5xVD-Mg²⁺ koncentrovanog reakcionog pufera (0.05M Tris-Cl pH 7.4, 0.3M NH₄Cl, 30mM β-merkaptotanol), 2 μl RNK (0.25 pmol/μl), 3.3 μl radioaktivno obeleženog prajmera (~0.3pmol/μl) i 10.7 μl DEPC-vode. Reakciona smeša je zagrevana 3 minuta na 85°C, zatim brzo zamrzavana u tečnom azotu, i na kraju stavljena na led da se polako otapa. Dok su uzorci bili na ledu, dodavano je 5 μl 50mM Mg(CH₃COO)₂ u 1xVD+Mg²⁺ puferu (0.01M Tris-Cl pH 7.4, 0.06M NH₄Cl, 6mM β-merkaptotanol, 0.01M Mg-acetat). Ukupni volumen reakcije je bio 25 μl, a koncentracija RNK 0.02 pmol/μl.

Po završenom vezivanju radioaktivno obeleženog prajmera sledila je sinteza cDNK. U svakom uzorku finalne zapremine 8 μl (finalna zapremina se dostiže dodavanjem

potrebne količine 1xVD+Mg²⁺ pufera) se nalazilo po 2 µl "annealing mix" reakcije. Obavezno je rađen "primer extension" kontrolni uzorak gde je dodavan samo 1xVD+Mg²⁺ pufer, a ispitivana je i mogućnost formiranja binarnog kompleksa u uzorku gde je dodavano 2 µl 30S subjedinica (2 pmol/µl). Formiranje ternarnog kompleksa ("toeprint" reakcija) je testirano u uzorku u koji se sem 2 µl 30S subjedinica (2 pmol/µl) dodaje i 2 µl tRNK^{fmet} (8pmol/µl). Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 10 minuta na 37°C, a zatim je dodavano po 2 µl MMLV (Fermentas) enzimskog miksa u 1xVD+Mg²⁺ puferu i nastavljena inkubacija na istoj temperaturi još 10 do 15 minuta. Na kraju se reakcija prekida dodavanjem po 20 µl MMLV pufera za lodiranje (182 µl 10M uree, 8 µl 10xTBE, 4 µl 2% boje - bromfenol plavo i ksilencijanolo, 6 µl 0.5M EDTA). Miks četiri dNTP u 1xVD+Mg²⁺ puferu je napravljen tako što je po 3 µl 100mM komercijalnih rastvora svakog dNTP pomešano sa 16 µl 5xVD+Mg²⁺ pufera i 52 µl DEPC-vode. MMLV enzimski miksa u 1xVD+Mg²⁺ puferu je sadržao 1 µl 5xVD +Mg²⁺ pufera, 2 µl MMLV reverzne transkriptaze (200 U/µl), 2.5 µl BSA (1 mg/ml ili 2 mg/ml) u 1xVD+Mg²⁺ puferu, 2.5 µl dNTP miksa u 1xVD+Mg²⁺ puferu i 2 µl DEPC-vode.

Uticaj proteina na formiranje "toeprint" signala je testirano tako što je najpre 2 µl "annealing mix" reakcije preinkubirano sa proteinom rastvorenim u 1xVD+Mg²⁺ puferu 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se nakon dodavanja svih komponenti za "toeprint" reakciju nastavljalo dalje po već opisanoj proceduri.

Na kraju su uzorci (10 µl), prethodno denaturisani kuvanjem 3 minuta na 95°C, nanošeni na 8% denaturišući poliakrilamidni gel.

16.4. Didezoksisekvenciranje RNK

Pri didezoksisekvenciranju RNK radioaktivno obeleženi prajmer je najpre vezivan za RNK. Reakciona smeša zapremine 10 µl se sastojala od 1 µl 10xRT-Mg²⁺ koncentrovanog reakcionog pufera (0.5M Tris-Cl pH 8.3, 0.6M NaCl, 0.1M DTT), 2.4 µl RNK (0.25 pmol/µl), 4 µl radioaktivno obeleženog prajmera (~0.3pmol/µl), i 2.6 µl DEPC-vode. Reakciona smeša je zagrevana 3 minuta na 85°C, zatim brzo zamrzavana u tečnom azotu, i na kraju stavljena na led da se polako otapa. Dok su uzorci na ledu, dodavano je 2 µl 36mM MgCl₂ u 1xRT+Mg²⁺ puferu (0.05M Tris-Cl pH 8.3, 0.06M NaCl, 10mM DTT,

6mM Mg(CH₃COO)₂). Ukupni volumen reakcije je bio 12 µl, a koncentracija RNK ~0.05 pmol/µl.

Po završenom vezivanju radioaktivno obeleženog prajmera sledila je sinteza cDNK uz ugradnju odgovarajućeg didezoksinukleotida. U svakom uzorku finalne zapremine 10 µl (finalna zapremina se dostiže dodavanjem potrebne količine 1xRT+Mg²⁺ pufera) se nalazilo po 2 µl "annealing mix" reakcije i 2 µl 10xdNTP miksa u 1xRT+Mg²⁺ puferu (po 6 µl 100mM komercijalnih rastvora sva četiri dNTP se pomeša sa 16 µl 10xRT+Mg²⁺ pufera i 120 µl DEPC-vode). Kontrola je bio "primer extension" uzorak gde je dodavano 4 µl 1xRT+Mg²⁺ pufera, dok je u reakcije sekvenciranja dodavano po 2 µl 1xRT+Mg²⁺ pufera i pojedinačno po 2 µl 10x koncentrovanog rastvora svakog didezoksinukleotida u 1xRT+Mg²⁺ puferu (20 µl 10mM komercijalnog rastvora određenog nukleotida (ddGTP, ddATP, ddUTP ili ddCTP) se pomeša sa 16 µl 10xRT+Mg²⁺ pufera i 120 µl DEPC-vode). Na kraju je u reakcije dodavano po 2 µl AMV enzimskog miksa (3µl 10xRT+Mg²⁺ pufera, 1.5 µl AMV reverzne transkriptaze (10 U/µl) i 25.5 µl H₂O) i potom sledila inkubacija 10 do 15 minuta na temperaturi od 48°C. Na kraju se reakcije prekidaju dodavanjem po 20 µl AMV pufera za lodiranje (188 µl 10M uree, 8 µl 10xTBE, 4 µl 2% boje (bromfenol plavo i ksilencijanol)). Ukoliko se u AMV enzimski miks dodaju i dezoksinukleotidi (1.2 µl 10xRT+Mg²⁺ pufera, 1µl AMV reverzne transkriptaze (10 U/µl), 12 µl 10xdNTP miksa u 1xRT+Mg²⁺ puferu i 9.8 µl H₂O) onda svaka reakcija sekvenciranja sadrži, sem 2 µl "annealing mix" reakcije, i 3 µl 1xRT+Mg²⁺ pufera, 2 µl 10x koncentrovanog rastvora određenog didezoksinukleotida u 1xRT+Mg²⁺ puferu, kao i 3 µl enzimskog miksa. Na kraju su uzorci (8 µl), prethodno denaturisani kuvanjem na 95°C u trajanju od 3 minuta, nanošeni na 8% denaturišući poliakrilamidni gel.

17. "Footprint" esej sa RNazom T1

U "footprint" esiju sa RNazom T1 neobeležena RNK je najpre parcijalno sečena sa ovom RNazom, potom su produkti parcijalne digestije prevedeni u radioaktivno obeležene cDNK fragmente koji su analizirani na 8% denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Reakciji sečenja je prethodilo vezivanje radioaktivno obeleženog prajmera i RNK po šemi za

"toeprint" reakciju, što je već opisano u poglavlju III-16.3. U svakom uzorku finalne zapremine 8 μ l (finalna zapremina se dostiže dodavanjem potrebne količine 1xVD+Mg²⁺ pufera) se nalazilo po 2 μ l "annealing mix" reakcije, a kontrole su bile "primer extension" uzorak gde je dodavan samo 1xVD+Mg²⁺ pufer i uzorak kome nije dodavan protein već samo RNaza T1. Ukoliko se neki protein veže za RNK on će onemogućiti prilaz RNazi T1, te će taj deo RNK molekula biti slabije sečen, što se na poliakrilamidnom gelu uočava kao niz bleđih signala, produkata reverzne transkripcije, u poređenju sa kontrolnom reakcijom. Reakcije u kojima je analizirano vezivanje proteina za RNK su sadržale i adekvatnu količinu proteina rastvorenog u 1xVD+Mg²⁺ puferu, pri čemu je maksimalna zapremina tog rastvora bila 2 μ l, a sama inkubacija sa proteinom je trajala 20 minuta na sobnoj temperaturi. Po završenoj inkubaciji je sledila parcijalna digestija (10 min; sobna temperatura) sa RNazom T1 tako što je 2 μ l diluirane RNaze T1 u 1xVD+Mg²⁺ puferu dodavano u sve uzorke. Nakon digestije je reakcionoj smeši dodavano 2 μ l MMLV enzimskog miksa (poglavlje III-16.3) i sledila je reverzna transkripcija na temperaturi od 37°C u trajanju od 10 minuta. Na kraju se reakcije prekidaju dodavanjem po 20 μ l MMLV pufera za lodiranje (poglavlje III-16.3) i sledi analiza uzoraka (8 μ l), prethodno denaturisanih kuvanjem 3 minuta na 95°C, na 8% denaturišućem poliakrilamidnom gelu.

18. Mapiranje sekundarnih struktura

Mapiranje sekundarnih struktura unutar 5'UTR na *kgmB* i *sgm* iRNK je rađeno preko parcijalne digestije odgovarajućih *in vitro* sintetisanih RNK molekula (poglavlje III.14.2.) sa tri endonukleaze koje specifično seku jednolančane RNK molekule posle određenih nukleotida:

- ❖ RNaza T1 - GpN
- ❖ RNaza A - UpN ili CpN (preferencijalno UpA i CpA)
- ❖ RNaza CL3 – CpN

kao i sa RNazom V1 koja seče dvolančanu RNK. Eksperiment je rađen ili sa neobebeženim RNK molekulima za koje je najpre vezivan radioaktivno obeleženi prajmer, potom je

sledila parcijalna digestija RNazama i na kraju reverzna transkripcija, ili sa radioaktivno obeleženim RNK molekulima koji su parcijalno sečeni odabranim RNazama. U prvom slučaju su produkti sečenja analizirani posredno, s obzirom da su na denaturišućim akrilamidnim gelovima razdvajani produkti reverzne transkripcije, a u drugom direktno.

Za neobeleženu RNK je vezivan prajmer na način opisan u poglavlju III-16.3. ("toeprint" reakcija). U svakom uzorku finalne zapremine 8 μ l (finalna zapremina se dostiže dodavanjem potrebne količine 1xVD+Mg²⁺ pufera) se nalazilo po 2 μ l "annealing mix" reakcije i 2 μ l razblaženja određene RNaze u 1xVD+Mg²⁺ puferu. U slučaju RNaze T1 korišćena su razblaženja od 0.5, 1 i 2 U/ μ l, za RNazu V1 su bila 10⁻³, 5x10⁻³ i 10⁻² U/ μ l, za RNazu CL3 su bila 5x 10⁻², 7.5x10⁻² i 10⁻¹ U/ μ l, a u slučaju RNaze A radilo se o razblaženjima od 10⁻⁵, 5x10⁻⁵ i 10⁻⁴ U/ μ l. Rađen je i kontrolni uzorak gde je dodavan samo 1xVD+Mg²⁺ pufer. Parcijalna digestija se odvijala na sobnoj temperaturi i trajala je 10 minuta, nakon čega je reakcionoj smeši dodavano 2 μ l MMLV enzimskog miksa (poglavljje III-16.3.) i sledila je reverzna transkripcija na temperaturi od 37°C u trajanju od 10 minuta. Reakcije su prekidane dodavanjem po 20 μ l MMLV pufera za uzorak (poglavljje III-16.3.) i sledila je analiza uzoraka (8 μ l), koji su prethodno denaturisani kuvanjem 3 minuta na 95°C, na 8% denaturišućem poliakrilamidnom gelu.

Parcijalna digestija radioaktivno obeležene RNK sa RNazom V1 (Ambion), RNazom T1 (Fermentas), RNazom A (Fermentas) i RNazom CL3 (Gibco BRL) je rađena na već opisan način (Knapp, 1989; Moine *et al.*, 1998). RNK molekuli su sintetisani *in vitro*, radioaktivno obeležavani i eluirani iz gela na način opisan u odeljcima III-14.2. - 14.4. i III-9. Po ~2 μ g ovako pripremljene RNK je inkubirano u prisustvu opadajućih koncentracija RNaza pri čemu je polazna koncentracija za RNazu V1 bila 10⁻¹ U, za RNazu T1 10⁻³ U, za RNazu A 10⁻⁴ U i RNazu CL3 4U. Najpre je pravljena reakciona smeša od 5 μ l radioaktivno obeležene RNK, 4 μ l "10xStructure Buffer" (Ambion), 1 μ l kvaščeve tRNK (Ambion) i 26 μ l DEPC-vode. Po 9 μ l ovog miksa je podeljeno u četiri uzorka, a potom je u prvi dodat 1 μ l razblaženja određene RNaze polazne koncentracije. Uzorak je mešan provlačenjem kroz nastavak, a potom je 1 μ l prvog uzorka prebacivan u drugi, nakon mešanja je 1 μ l drugog uzorka prebacivan u treći i na kraju je nakon mešanja 1 μ l trećeg uzorka prebacivan u četvrti čime je polazna koncentracija RNaze sukcesivno razblaživana.

Uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi, sledila je precipitacija dodavanjem 20 μ l "Inactivation/Precipitation Buffer" (Ambion) i inkubacijom 15 minuta na -20°C . Uzorci su potom centrifugirani (15 min na sobnoj temperaturi; 13000 obrt/min; mikrocentrifuga), zatim su talozi ispirani hladnim 70% etanolom, sušeni pod vakuumom i na kraju resuspendovani u 7 μ l "Gel Loading Buffer II" (Ambion). Po 3 μ l ovako pripremljenih uzoraka je, nakon kuvanja od 5 minuta na 95°C , nanošeno na 6% ili 8% denaturišući poliakrilamidni gel. Na gel je obavezno nanošen i kontrolni uzorak sa obeleženom RNK gde nije dodavana RNaza. Na isti način su paralelno rađene i reakcije sa RNazom A i RNazom T1, ali u drugom puferu ("1X RNA Sequencing Buffer" - Ambion) i na temperaturi od 50°C . Ova reakciona smeša je pravljena od 4 μ l radioaktivno obeležene RNK, 0.75 μ l kvaščeve tRNK i 22.25 μ l "1x Sequencing Buffer" (Ambion). Po 9 μ l ove smeše je podeljeno u tri uzorka, a potom su im dodavane RNaza A i RNaza T1 na već opisan način. Reakcije su se i na dalje odvijale na isti način, sem što su uzorci inkubirani na 50°C , a isti je bio i tretman uzoraka po završenoj inkubaciji. Navedeni uslovi inkubacije dovode do „rasplitanja“ RNK i prevođenja u linearnu formu, što omogućava RNazama da prepoznaju sva specifična mesta sečenja. Produkti ovih reakcija su nanošeni na isti 6% ili 8% denaturišući poliakrilamidni gel gde su poslužili kao RNK markeri. Istovremeno je rađena i alkalna hidroliza RNK koja dovodi od njenog nespecifičnog sečenja iza svakog nukleotida te je na ovaj način generisan još jedan RNK marker koji je korišćen za mapiranje mesta sečenja. Reakciona smeša je sadržala 4 μ l iste radioaktivno obeležene RNK, 0.75 μ l kvaščeve tRNK (Ambion) i 10.25 μ l "1X Alkaline Hydrolysis Buffer" (Ambion). Po 5 μ l ovog miksa je podeljeno na 3 uzorka koji su inkubirani 2, 5 ili 15 minuta na 95°C . Po završenoj inkubaciji uzorci su stavljeni na led gde im je dodavano po 10 μ l "Gel Loading Buffer II", a po 3 μ l je, nakon kuvanja od 5 minuta na 95°C , nanošeno na 6% ili 8% denaturišući poliakrilamidni gel.

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

In vitro transkripcija i translacija su rađene u komercijalno dostupnom sistemu "*E. coli* S30 Extract System for Circular DNA" (Promega), prema uputstvu proizvođača.

Reakciona smeša za ovaj esej je bila zapremine 25 μ l i imala sledeći sastav: 2 μ g plazmidne DNK, 2.5 μ l aminokiselinske smeše bez metionina, 10 μ l S30 premiksa bez aminokiselina, 1 μ l [35 S]metionina (1200Ci/mmol na 15mCi/ml), 7.5 μ l S30 ekstrakta za cirkularnu DNK i na kraju je dodavana voda do finalne zapremine. Uzorak je nakon mešanja inkubiran 1-2 sata na 37°C, a potom reakcija zaustavljena inkubacijom na ledu u trajanju od 5 minuta. *In vitro* sintetisani proteini iz dela uzorka (5 μ l) su taloženi dodavanjem 20 μ l acetona, nakon čega je sledila inkubacija 15 min na ledu, a zatim centrifugiranje 5 min na 12000xg (mikrocentrifuga). Po odlivanju supernatanta talog je sušen 15 min pod vakuumom i na kraju resuspendovan u 20 μ l pufera za uzorak (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β -merkaptotanol; 0.0025% bromfenol plavo). Produkti *in vitro* translacije su analizirani na 10 - 12.5% SDS poliakrilamidnim gelovima na način kako je to već opisano u poglavlju III-12.

20. Test β -galaktozidaze

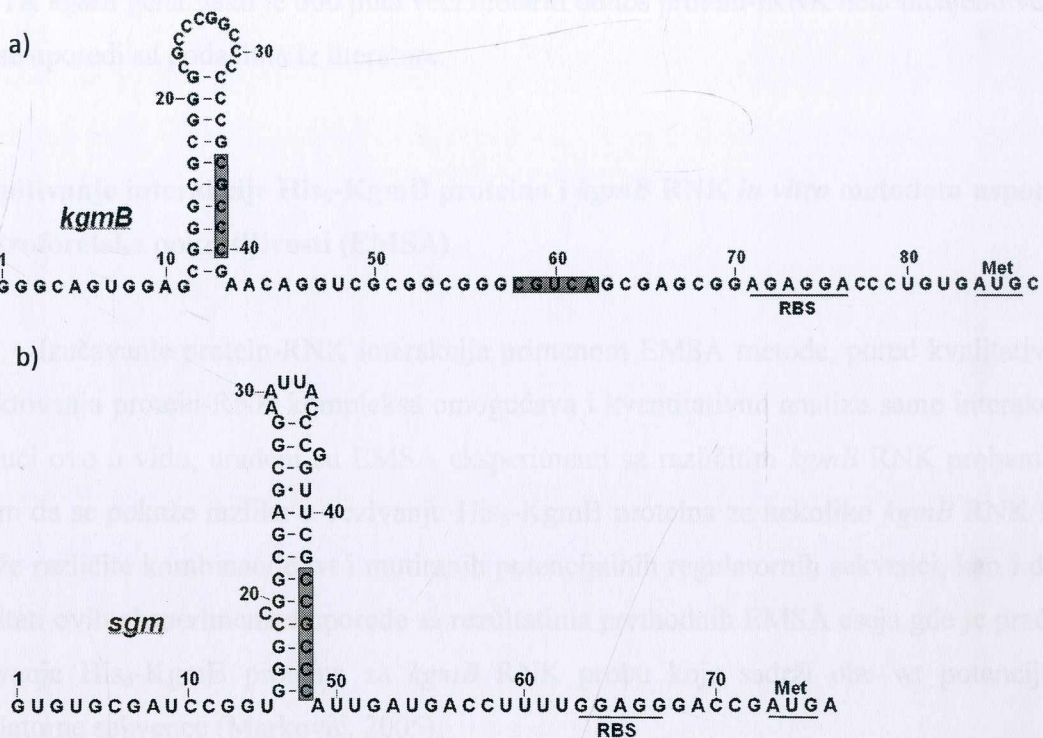
Aktivnost enzima β -galaktozidaze merena je u soju *E. coli* NM522 sa plazmidom koji nosi odgovarajuću fuziju sa *lacZ* reporter genom. Transformanti su gajeni u LB medijumu uz dodatak antibiotika odgovarajuće koncentracije. Ekspresija sa *P_ltl* promotora indukovana je 1 mM IPTG-em. Enzimski esej (Miller, 1972) je rađen na sledeći način: 0.5 ml kulture OD₆₀₀=0.3 - 0.7 pomešano je sa istom zapreminom Z pufera (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ i 50 mM β -merkaptotanol), 60 μ l 0.1% SDS-a i 90 μ l hloroforma. Smeša je snažno promešana na vorteksu i inkubirana 5 min na 28°C. Reakcija je otpočeta dodatkom 200 μ l rastvora ONPG-a (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) koncentracije 4 mg/ml, a nakon pojave žute boje zaustavljena je dodatkom 0.5 ml 1 M Na₂CO₃. Merena je apsorbancija na 420 nm i 550 nm, a specifična aktivnost β -galaktozidaze je određivana prema formuli: $1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / (t \times V \times A_{600})$, pri čemu je V zapremina kulture u ml, a t je vreme trajanja reakcije u minutima. Konačne tabelarne vrednosti dobijene su kao srednja vrednost iz najmanje tri nezavisna merenja.

IV REZULTATI

Kod bakterije *Streptomyces tenebrarius*, proizvođača nebramicinskog kompleksa aminoglikozidnih antibiotika (tobramicin, apramicin i drugi derivati kanamicina B), jedan način samozaštite, tj. rezistencije na sopstvene toksične proizvode, postiže se delovanjem KgmB metiltransferaze, koja modifikacijom G1405 nukleozida u okviru 16S rRNK obezbeđuje rezistenciju na 4,6-disubstituisane 2-deoksistreptamine (Holmes and Cundliffe, 1991). Pretpostavlja se da je za kompletnu modifikaciju 30S ribozomalnih subjedinica i obezbeđivanje rezistentnog fenotipa, potrebno svega nekoliko molekula MTaze u ćeliji. U eksperimenatima sa različitim *kgmB-lacZ* genskim i operonskim fuzijama u heterologom sistemu, NM522 soju *E. coli*, pokazano je da KgmB MTaza smanjuje nivo ekspresije fuzionog proteina kako u *in cis* tako i u *in trans* konstelaciji. Na osnovu ovih rezultata predložena je hipoteza o mehanizmu negativne autoregulacije *kgmB* gena na nivou inicijacije translacije zahvaljujući kojem se u ćeliji održava niska i konstantna koncentracija KgmB MTaze (Milojević, 1998; Vajić, 2003; Vajić *et al.*, 2004).

Data hipoteza pretpostavlja da su motivi koje KgmB MTaza prepoznaje i za koje se vezuje, primarna i/ili sekundarna struktura 5' UTR regiona na *kgmB* iRNK. 5' UTR region na *kgmB* iRNK sadrži CGUCA sekvencu (RS) 8 baznih parova ispred RBS-a, i CGCCC sekvencu (RS') 30 bp ispred RBS-a, čija uloga u translacionoj autoregulaciji *kgmB* gena je ranije testirana (Vajić, 2003; Vajić *et al.*, 2004). Oba ova pentanukleotida postoje i u delu 16S rRNK oko G1405 nukleozida koji KgmB i Sgm MTaza modifikuju. Mutacija CGUCA sekvence nije bila dovoljna da ukine efekat KgmB MTaze na nivo ekspresije fuzionog proteina što navodi na zaključak da se KgmB MTaza ili ne vezuje za ovaj motiv ili bar da se ne vezuje isključivo za njega.

Kompjutersko modelovanje 5' UTR regiona *kgmB* iRNK, kao i 5' UTR regiona na iRNK za Sgm MTazu iz soja *Micromonospora zionensis* (Kojić *et al.*, 1992), homologa KgmB proteina, pomoću Mfold programa (Kojić *et al.*, 1996; Milojević, 1998) je ukazalo na postojanje specifične sekundarne strukture tipa ukosnice koja bi mogla poslužiti kao motiv za vezivanje MTaza (slika 12).



Slika 12. Sekundarna struktura 5' kraja iRNK za KgmB i Sgm MTazu. a) Kompjuterski generisana sekundarna struktura u okviru 5' UTR na *kgmB* iRNK. Brojevima su označene pozicije nukleotida u odnosu na start transkripcije *kgmB* gena u soju *S. tenebrarius*. b) Kompjuterski generisana sekundarna struktura u okviru 5' UTR na *sgm* iRNK. Brojevima su označene pozicije nukleotida u odnosu na start transkripcije *sgm* gena u soju *M. zionensis*. Potencijalne regulatorne sekvence ((C)CGCCC i CGUCA) su prikazane unutar sivih pravougaonika. RBS i start kodon (Met) su podvučeni.

Vezivanje KgmB MTaze za *kgmB* iRNK je ispitivano i *in vitro*, u eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti ili EMSA (*eng. electrophoretic mobility shift assay*) (Marković, 2005). Reakcijama kompeticije sa specifičnim i nespecifičnim kompetitorima je

dokazano specifično vezivanje KgmB MTaze za RNK molekul koji odgovara wt varijanti 5' UTR *kgmB* gena, iako je 600 puta veći molarni odnos protein-iRNK neuobičajeno veliki, ako se uporedi sa podacima iz literature.

1. Ispitivanje interakcije His₆-KgmB proteina i *kgmB* RNK *in vitro* metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)

Izučavanje protein-RNK interakcija primenom EMSA metode, pored kvalitativnog detektovanja protein-RNK kompleksa omogućava i kvantitativnu analizu same interakcije. Imajući ovo u vidu, urađeni su EMSA eksperimenti sa različitim *kgmB* RNK probama sa ciljem da se pokaže razlika u vezivanju His₆-KgmB proteina za nekoliko *kgmB* RNK koje sadrže različite kombinacije wt i mutiranih potencijalnih regulatornih sekvenci, kao i da se rezultati ovih eksperimenata uporede sa rezultatima prethodnih EMSA eseja gde je praćeno vezivanje His₆-KgmB proteina za *kgmB* RNK probu koja sadrži obe wt potencijalne regulatorne sekvence (Marković, 2005).

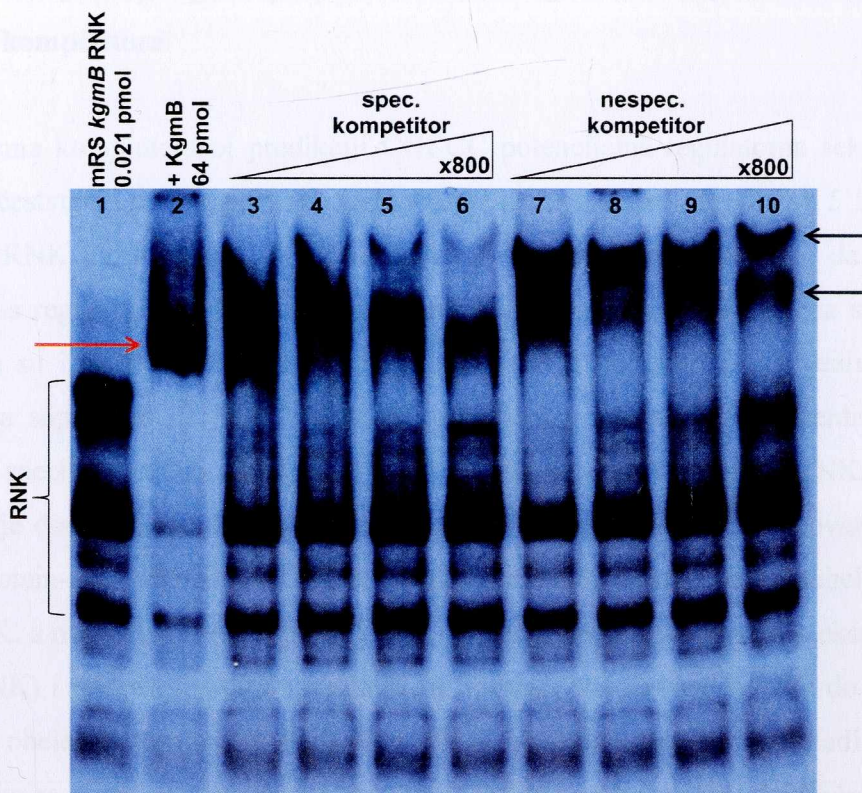
1.1. Vezivanje His₆-KgmB proteina za *kgmB* RNK dužine 114 nt

RNK probe korišćene u ovim eksperimentima sintetisane su *in vitro* transkripcijom, defosforilisane i radioaktivno obeležena na 5' kraju na način detaljno opisan u odeljcima III-14.2 - 14.4. Dobijeni RNK molekuli obuhvataju 5'UTR na iRNK *kgmB* gena sa različitim kombinacijama wt i mutiranih potencijalnih regulatornih sekvenci (mRS i mRS'), dugi su 114 nt i imaju molekulsku masu od ~37168.8 g/mol. Prvih 6 nukleotida (GGGAGA) na 5' kraju dobijenog transkripta bitni su za efikasnost transkripcije T7 RNK polimerazom (Milligan *et al.*, 1987) i ne potiču sa *kgmB* DNK matrice, već su uvedeni uzvodnim FkgmRNK100 prajmerom u PCR-u. Sve RNK probe dužine 114 nt obuhvataju region -18 do +90 u odnosu na određeni start transkripcije (Holmes and Cundliffe, 1991), odnosno -101 do +7 u odnosu na start translacije. Konstrukcije plazmida sa kojih su sintetisane ove RNK probe, a koji su proveravani sekvenciranjem, su prikazane šematski u

prilogu 1. U reakcijama je korišćen His₆-KgmB protein, prečišćen na način koji je detaljno opisan u odeljcima III-11.1. i III-11.2.

1.1.1. Vezivanje His₆-KgmB proteina za mRS *kgmB* RNK (CGUCA→GAUCC) u prisustvu kompetitora

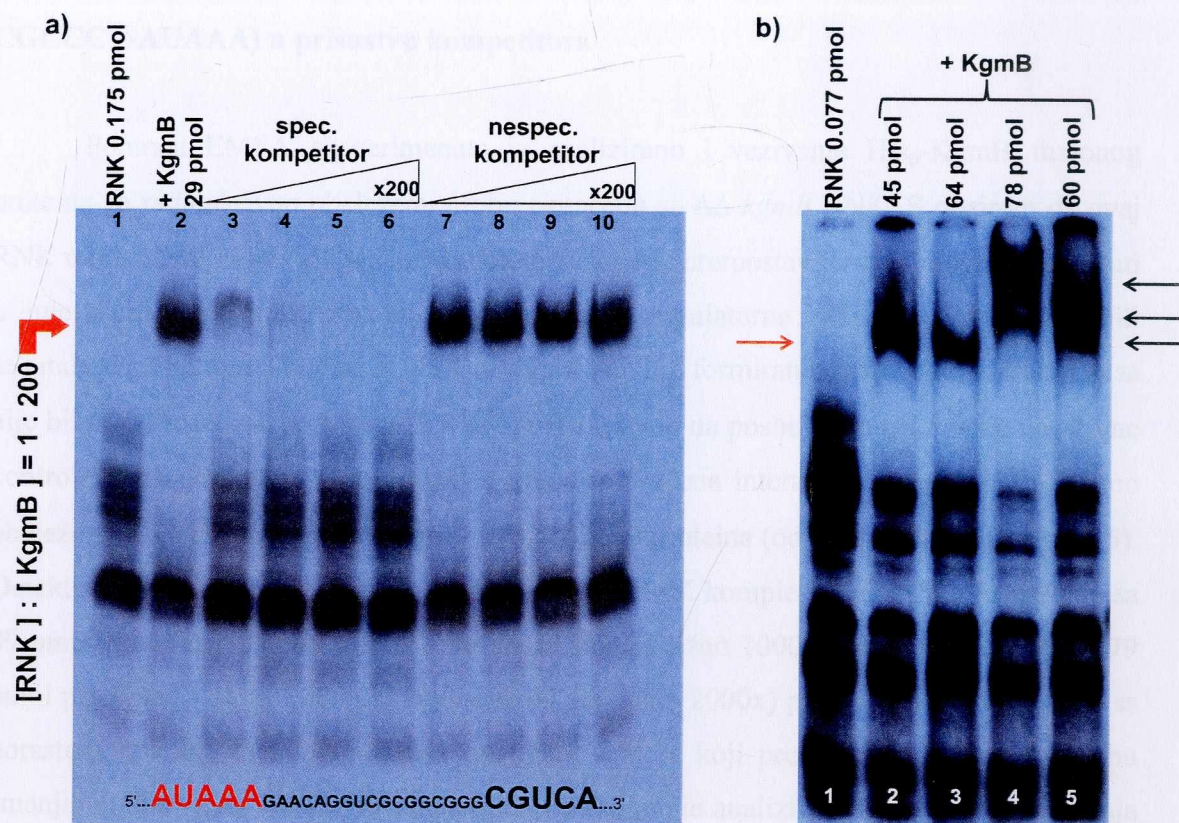
EMSA eksperiment gde je praćeno vezivanje His₆-KgmB proteina za mRS *kgmB* RNK probu sa mutiranim CGUCA motivom (mRS) je rađen na već opisan način (Marković, 2005). Najpre je određivana koncentracija proteina koja dovodi do nastanka vidljivog protein-RNK kompleksa (rezultati nisu prikazani), a potom je ispitivana specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za mRS *kgmB* RNK u prisustvu kompetitora (slika 13). U reakcijama vezivanja količina His₆-KgmB proteina koja je održavana konstantnom je iznosila 64 pmol, što praktično znači da se protein nalazi u 2700x većem molarnom odnosu u poređenju sa RNK (0.021 pmol), ukoliko se uzme u obzir stepen čistoće prečišćenog proteina. Koncentracije specifičnog (neobeležena mRS *kgmB* RNK) i nespecifičnog kompetitora (pBlue RNK) su linearno povećavane od 100 do 800x više u odnosu na obeleženu probu. Kao nespecifični kompetitor (pBlue RNK) korišćen je RNK molekul dobijen transkripcijom polilinkera pBluescript SK+/- plazmida, na način opisan u poglavlju III-14.2. Ovaj RNK molekul veličine 93 nt ne pokazuje homologiju u sekvenci i strukturi sa *kgmB* RNK (rezultati predikcije sekundarne strukture nisu prikazani). Sa slike 13 se vidi da specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za mRS *kgmB* RNK nije potvrđena, s obzirom da obe vrste kompetitora dodate u istoj količini "hlade šift" tj. smanjuju intenzitet protein-RNK kompleksa skoro podjednako. Na slici 13 se takođe može primetiti da pri "hlađenju" dolazi do razdvajanja "šifta" na dve trake, od kojih jedna ostaje približno na visini prvobitnog "šifta", dok je druga nešto viša što je naročito izraženo u slučaju nespecifičnog kompetitora. Ovi signali bi mogli da predstavljaju različite protein-RNK komplekse, ali pošto se opisani fenomen zapaža pri "hlađenju šifta" različitim RNK molekulima, na osnovu njega se ne može zaključiti ništa o specifičnom vezivanju His₆-KgmB fuzionog proteina za mRS *kgmB* RNK.



Slika 13. Vezivanje His₆-KgmB proteina za mRS *kgmB* RNK probu (114 nt). Na 8% nenedaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije kompeticije sa konstantnim koncentracijama obeležene mRS *kgmB* RNK (0.021 pmol) i His₆-KgmB fuzionog proteina (64 pmol), a rastući odnos koncentracija oba kompetitora u odnosu na obeleženu RNK označen je na slici. U prvoj koloni nalazi se slobodna RNK proba bez His₆-KgmB fuzionog proteina. Crvenom strelicom je označen "šift", a crne strelice obeležavaju različite protein-RNK komplekse.

1.1.2. Vezivanje His₆-KgmB proteina za mRS' *kgmB* RNK (CGCCC→AUAAA) u prisustvu kompetitora

Prema kompjuterskoj predikciji CGCCC potencijalna regulatorna sekvenca (RS') direktno učestvuje u formiranju sekundarne strukture tipa ukosnice u okviru 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK. Promenom CGCCC u AUAAA pentanukleotid ne samo da je mutirana potencijalna regulatorna sekvenca, već je narušena i pomenuta sekundarna struktura. Na ovaj način su izmenjena oba motiva koja bi mogla biti odgovorna za vezivanje KgmB proteina za sopstvenu iRNK. Na slici 14 je prikazan rezultat eksperimenta u kome je ispitivana specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za mRS' *kgmB* RNK. U reakcije vezivanja je dodavano po 29 pmol proteina i 0.175 pmol probe, što odgovara molarnom odnosu protein-RNK od 200x. Kao specifični kompetitor je korišćena neobeležena mRS' *kgmB* RNK, a nespecifični kompetitor je bio isti kao u prethodno opisanim eksperimentima (pBlue RNK) i njihove količine u reakciji su linearno povećavane od 25x do 200x više u odnosu na obeleženu probu. Na slici 14 se vidi da specifični kompetitor "hladi šift" gotovo potpuno ako se doda 100x više u odnosu na obeleženu probu, dok nespecifični kompetitor nema uticaja na intenzitet protein-RNK kompleksa čak i ako se doda u suvišku od 200 puta. U slobodnoj probi se uočava više formi, kao i u prethodno opisanim eksperimentima, ali samo jedan signal koji odgovara kompleksu protein-RNK. Na osnovu ovoga bi se moglo zaključiti da se His₆-KgmB protein vezuje tri puta jače za mRS' *kgmB* RNK u odnosu na wt *kgmB* RNK (Marković, 2005), a čak približno trinaest puta jače u odnosu na mRS *kgmB* RNK. Međutim, rezultati više ponovljenih, nezavisnih EMSA eksperimenata su pokazali da molarni odnos His₆-KgmB proteina i mRS' *kgmB* RNK značajno varira i da se kreće do vrednosti od 800 (slika 14b, kolona 3), a pokazano je i da kvalitet prečišćavanja proteina određuje molarni odnos i izgled signala koji odgovara kompleksu protein-RNK (slika 14b).



Slika 14. Vezivanje His₆-KgmB proteina za mRS' *kgmB* RNK.

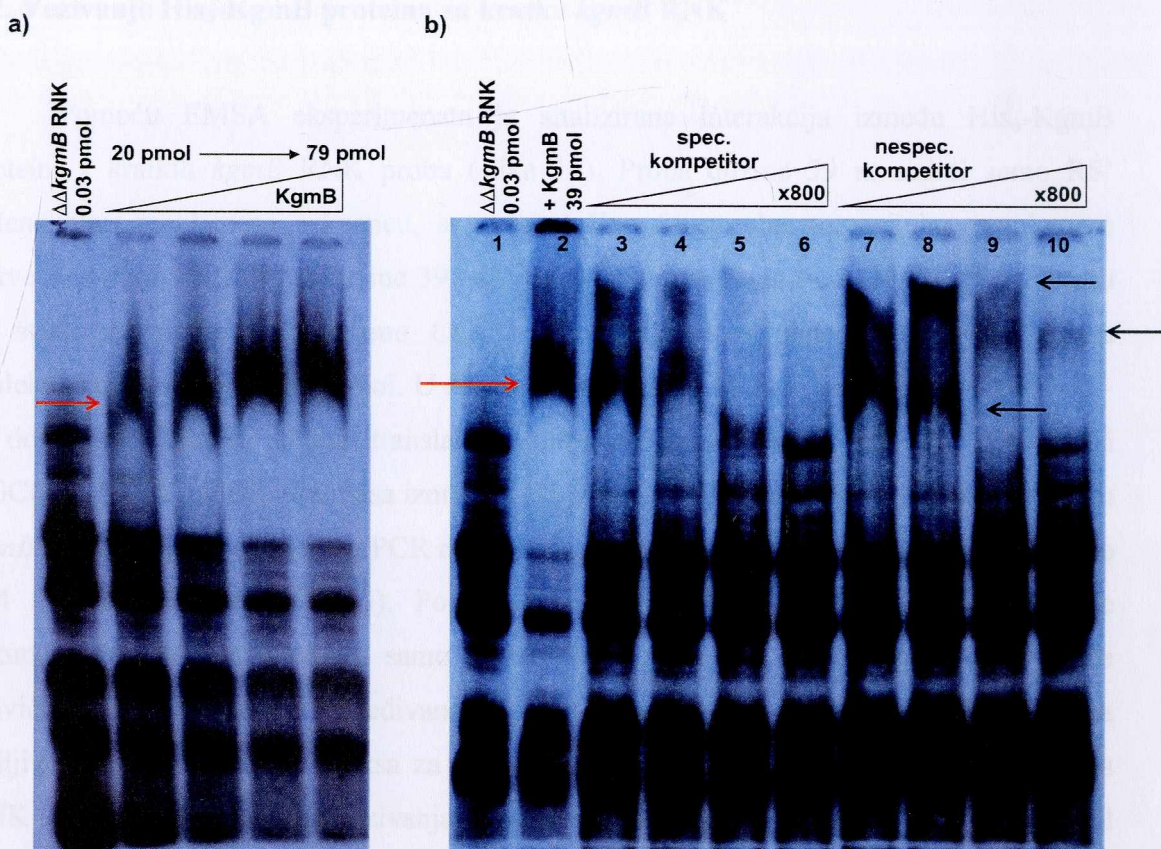
a) 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel na koji su nanete reakcije kompeticije sa konstantnom koncentracijom obeležene mRS' *kgmB* RNK (0.175 pmol) i His₆-KgmB fuzionog proteina (29 pmol), a rastući odnos koncentracija oba kompetitora u odnosu na obeleženu RNK označen je na slici.

b) 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel na koji su nanete reakcije vezivanja obeležene mRS' *kgmB* RNK (0.077 pmol) i His₆-KgmB fuzionog proteina, prečišćenog u više navrata. U prvom koloni nalazi se slobodna RNK proba bez His₆-KgmB fuzionog proteina.

Crvenim strelicama je označen „šift“, a crne strelice obeležavaju „različite“ protein-RNK komplekse.

1.1.3. Vezivanje His₆-KgmB proteina za $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK (CGUCA→GAUCC, CGCCC→AUAAA) u prisustvu kompetitora

Pomoću EMSA eksperimenata je analizirano i vezivanje His₆-KgmB fuzionog proteina za radioaktivno obeleženu probu označenu sa $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK. S obzirom da ovaj RNK molekul ne sadrži niti jedan od motiva za koje je pretpostavljeno da mogu učestvovati u interakciji sa KgmB proteinom (potencijalne regulatorne sekvence RS i RS' i/ili sekundarna struktura u okviru 5' UTR na *kgmB* iRNK), formiranje protein-RNK kompleksa nije bilo očekivano, te je $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK proba trebalo da posluži kao neka vrsta negativne kontrole. Prvo je urađen eksperiment u kome je praćena interakcija između radioaktivno obeležene $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK (0.03 pmol) i His₆-KgmB proteina (od 20 do 79 pmol) (slika 15). Detektovan je jasan signal koji predstavlja protein-RNK kompleks i u slučaju interakcije sa 39 pmol proteina (molarni odnos u vrednosti od približno 1000x), kao i u interakciji sa 79 pmol proteina (molarni odnos u vrednosti od približno 2000x) pri čemu se zapaža da se sa porastom količine dodatog proteina intenzitet signala koji predstavljaju nevezanu probu smanjuje (slika 15a). Sledili su eksperimenti u kojima je analizirana specifičnost vezivanja u prisustvu specifičnog (neobeležena $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK) i nespecifičnog kompetitora (pBlue RNK) čije su koncentracije linearno povećavane od 100 do 800x više u odnosu na obeleženu probu. Na slici 15b se vidi da specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK probu nije potvrđena pošto obe vrste kompetitora dodate u istoj količini "hlade šift" tj. smanjuju intenzitet protein-RNK kompleksa skoro podjednako. U ovom eksperimentu su takođe primećeni fenomeni prisutni i u prethodnim EMSA esejima (tj. prisustvo više formi slobodne probe i razdvajanje "šifta" na dve trake pri hlađenju).



Slika 15. Vezivanje His₆-KgmB proteina za $\Delta\Delta kgmB$ RNK probu (114 nt).

a) Na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom $\Delta\Delta kgmB$ RNK (0.03 pmol), a rastućom koncentracijom KgmB proteina (od 20 do 79 pmol).

b) Na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije kompeticije sa konstantnim koncentracijama obeležene $\Delta\Delta kgmB$ RNK (0.03pmol) i His₆-KgmB fuzionog proteina (39 pmol), a rastući odnos koncentracija oba kompetitora u odnosu na obeleženu RNK označen je na slici. U prvoj koloni nalazi se slobodna RNK proba bez His₆-KgmB fuzionog proteina.

Crvenim strelicama je označen "šift", a crne strelice obeležavaju različite protein-RNK komplekse.

1.2. Vezivanje His₆-KgmB proteina za kratke *kgmB* RNK

Pomoću EMSA eksperimenata je analizirana interakcija između His₆-KgmB proteina i kratkih *kgmB* RNK proba (slika 16). Proba dužine 39 nt sadrži samo RS' potencijalnu regulatornu sekvencu, a proba dužine 61 nt obe potencijalne regulatorne sekvence (slika 16a). Proba dužine 39 nukleotida obuhvata region od -28 do -55 u odnosu na start translacije, sadrži samo CGCCC potencijalnu regulatornu sekvencu i ima molekulska masu od 12063 g/mol. U okviru probe dužine 61 nt koja obuhvata region od -18 do -69 nt u odnosu na start translacije nalaze se obe regulatorne sekvence (CGUCA i CGCCC). Njena molekulska masa iznosi 18891 g/mol. DNK matrice za generisanje kratkih *kgmB* RNK proba su dobijene u PCR reakcijama, slično kao i kod *kgmB* RNK proba dužine 114 nukleotida (Jovičić, 2005). Pomoću programa Mfold je predviđeno postojanje sekundarnih struktura u obliku samo jedne ukosnice za obe kratke *kgmB* RNK probe (Jovičić, 2005). Najpre je određivana koncentracija proteina koja dovodi do nastanka vidljivog protein-RNK kompleksa za obe kratke *kgmB* RNK probe (slika 16b). Količina RNK molekula u reakcijama vezivanja je održavana konstantnom i iznosila je 0.129 pmol za *kgmB* RNK probu dužine 39 nt i 0.193 pmol za *kgmB* RNK probu dužine 61 nt. Količina His₆-KgmB proteina u reakciji vezivanja linearno je povećavana od 16 do 128 pmol. Na slici 16b se vidi značajna razlika u afinitetu His₆-KgmB proteina za ove dve RNK probe. Protein-RNK kompleks u vidu diskretnog signala je prisutan u slučaju interakcije sa *kgmB* RNK probom dužine 61 nt pri molarnom odnosu od oko 500x više His₆-KgmB proteina, dok je signal koji bi odgovarao protein-RNK kompleksu u slučaju *kgmB* RNK probe dužine 39 nt gotovo neprimetan, čak i pri molarnom odnosu od oko 1000x. Usledilo je ispitivanje specifičnosti vezivanja His₆-KgmB proteina za *kgmB* RNK probu dužine 61 nt u prisustvu specifičnog (neobeležena *kgmB* RNK dužine 61 nt) i nespecifičnog kompetitora (pBlue RNK dužine 55 nt), a rezultat eksperimenta je prikazan na slici 16c. Molarni odnos u vrednosti od 500x više proteina u reakcijama vezivanja sa *kgmB* RNK probom dužine 61 nt je održavan konstantnim, a koncentracije oba kompetitora su linearno povećavane od 100 do 800 puta više u odnosu na obeleženu probu. Na slici 16c se vidi da specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za 61 nt *kgmB* RNK nije potvrđena, s obzirom da

obe vrste kompetitora dodate u istoj količini "hlade šift" tj. smanjuju intenzitet protein-RNK kompleksa skoro podjednako.

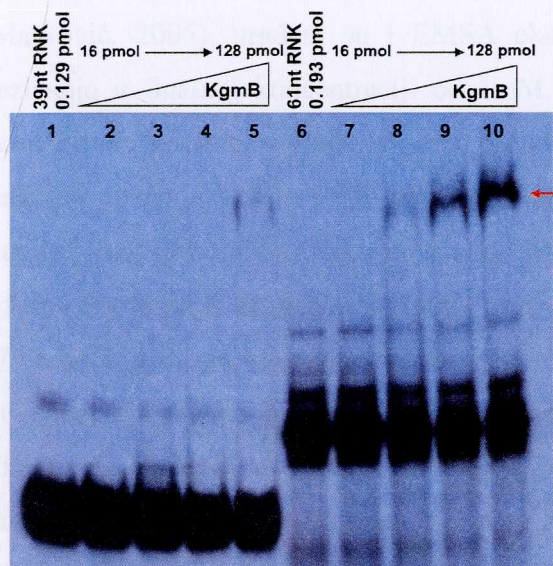
Na osnovu svih do sada opisanih EMSA eksperimenata može se zaključiti da se His₆-KgmB protein, prisutan u suvišku od 200 do 2700x u odnosu na RNK probu, sa podjednakom efikasnošću vezuje za bilo koji RNK molekul, bez obzira da li su motivi sa potencijalnom ulogom u vezivanju KgmB proteina prisutni ili ne.

a)

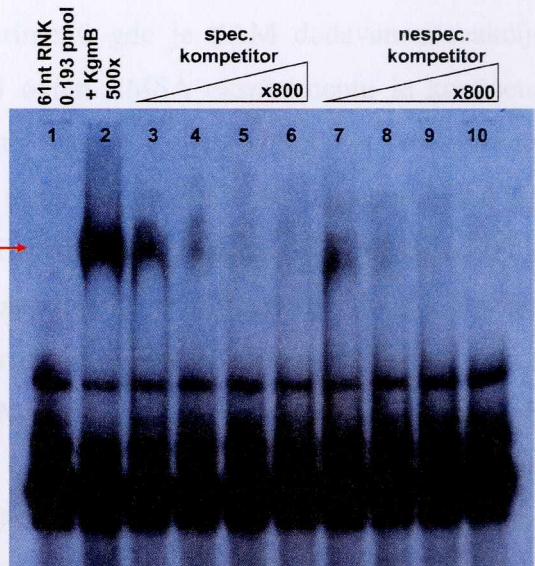
39nt RNK: 5'GGGAGACCCCCG**CGCC**GAACAGGUCGCGGGGCUAG3'

61nt RNK: 5'GGGAGAGCGGGGCCCGGCCCCCG**CGCC**GAACAGGUCGCGGGG**CGUCA**GCUCUAG3'

b)



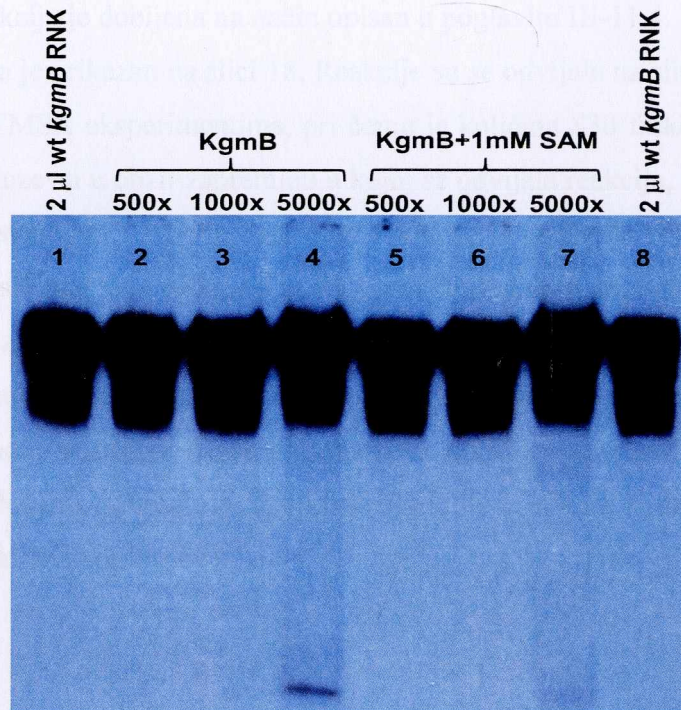
c)



Slika 16. Vezivanje His₆-KgmB proteina za kratke *kgmB* RNK. (a) sekvenca kratkih *kgmB* RNK dužine 39 i 61 nt. (b) Na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije "šifta" sa rastućom koncentracijom His₆-KgmB fuzionog proteina (kolone 2 - 5 za 39 nt *kgmB* RNK i kolone 7 - 10 za 61 nt *kgmB* RNK). U kolonama 1 i 6 su slobodne RNK probe dužine 39 nt (0.129 pmol) i 61 nt (0.193 pmol). (c) Na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije kompeticije sa konstantnom koncentracijom His₆-KgmB proteina (500x više) i obeležene 61 nt *kgmB* RNK (0.193 pmol), a rastući odnos koncentracija oba kompetitora u odnosu na obeleženu RNK označen je na slici. U prvoj koloni nalazi se slobodna RNK proba bez His₆-KgmB proteina. Crvenim strelicama je označen "šift", tj. protein - RNK kompleksi.

1.3. Vezivanje His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK dužine 114 nt u prisustvu S-adenozil-metionina (SAM)

Da bi se ispitao potencijalni uticaj SAM-a, kofaktora KgmB metiltransferaze, na specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK dužine 114 nukleotida (Marković, 2005), urađeni su i EMSA eksperimenti gde je SAM dodavan u reakcije vezivanja u finalnoj koncentraciji od 1mM. U ovom EMSA eksperimentu je korišćena radioaktivno obeležena proba prethodno eluirana iz gela, a njena količina u pojedinačnoj reakciji vezivanja je bila 0.009 pmol (procena u odnosu na količinu obeležene probe pre elucije), dok je količina dodavanog His₆-KgmB proteina povećavana od 500x do 5000x više u odnosu na RNK probu. Rezultat ovog eksperimenta je prikazan na slici 17. Na slici 17 se uočava da do blagog zaostajanja RNK probe, a ne jasno definisanog "šifra", kao u slučaju ranije urađenog EMSA eksperimenta (Marković, 2005), dolazi tek pri molarnom odnosu protein-RNK u vrednosti od 5000x, bez obzira da li je SAM prisutan ili ne. To nas navodi na zaključak da prisustvo 1mM SAM ne dovodi do povećane specifičnosti vezivanja His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK dužine 114 nukleotida.

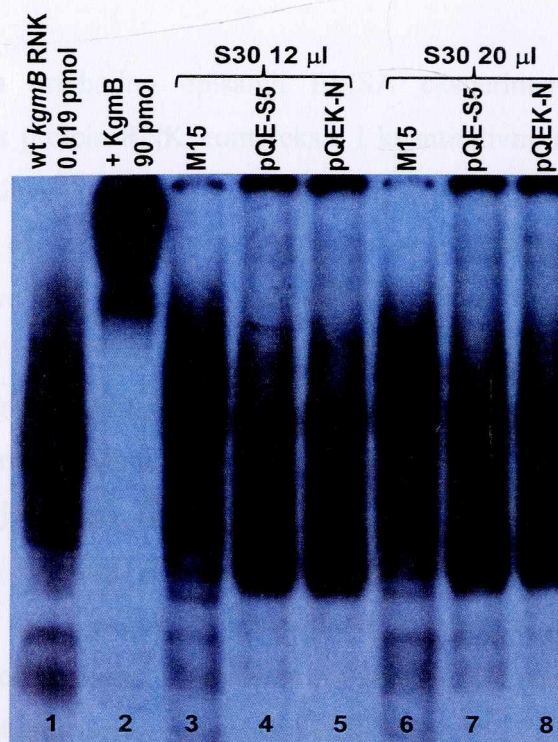


Slika 17. Vezivanje His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK probu dužine 114 u prisustvu 1mM SAM. Na 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel su nanete reakcije "šifta" sa rastućom koncentracijom His₆-KgmB proteina bez (kolone 2 – 4) ili sa 1mM SAM (kolone 5 – 7). U kolonama 1 i 8 je slobodna RNK proba (po proceni oko 0.009 pmol).

1.4. Vezivanje His₆-KgmB proteina iz S30 frakcije za wt *kgmB* RNK dužine 114 nt

Podatak da se His₆-KgmB protein nespecifično vezuje za bilo koji RNK molekul se kosi sa rezultatima *in vivo* eksperimenata koji su nedvosmisleno ukazali na postojanje negativne autoregulacije *kgmB* gena na nivou translacije (Vajić *et al.*, 2004). Moguće je da u ćeliji postoji još neki faktor koji bi mogao da utiče na specifičnost vezivanja ove MTaze

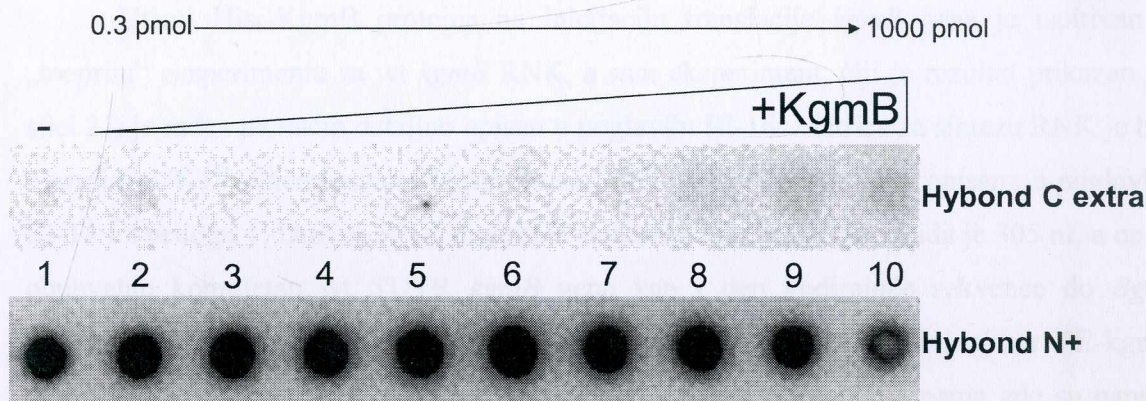
za sopstvenu iRNK, a što u svim prethodnim EMSA eksperimentima nedostaje. Da bi se proverila ova pretpostavka urađeni su EMSA eksperimenti u kojima je, umesto prečišćenog His₆-KgmB proteina, korišćena je S30 frakcija kulture iz koje je prečišćavan His₆-KgmB protein, a ova S30 frakcija je dobijena na način opisan u poglavlju III-11.4. Rezultat jednog od ovih eksperimenata je prikazan na slici 18. Reakcije su se odvijale na sličan način kao u prethodno opisanim EMSA eksperimentima, pri čemu je količina S30 frakcije varirana do maksimalne moguće, uzevši u obzir zapreminu u kojoj se odvijala reakcija, a količina RNK probe održavana konstantnom (0.019 pmol). Kao kontrola je poslužila reakcija vezivanja prečišćenog His₆-KgmB fuzionog proteina za wt *kgmB* RNK (slika 18, kolona 2). U istom eksperimentu je analizirana i interakcija S30 frakcije kulture iz koje je prečišćavan His₆-Sgm protein (Ilić-Tomić *et al.*, 2005) sa istom probom. Kompleks proten-RNK tj. „šift“ nije dobijen ni u jednom slučaju, a isti je bio rezultat i eksperimenata gde su umesto S30 frakcije korišćeni ili ćelijski ekstrakti ili S100 frakcija kulture iz koje je prečišćavan His₆-KgmB protein (rezultati nisu prikazani).



Slika 18. EMSA esej sa S30 frakcijama i radioaktivno obeleženom wt *kgmB* RNK probom (114 nt). Prikazan je 8% nedenaturišući poliakrilamidni gel na koji su nanete reakcije sa konstantnom koncentracijom RNK (0.019 pmol), a količina dodate S30 frakcije je menjana. S30 frakcija iz *E. coli* soja M15 kao kontrola (kolone 3 i 6), S30 frakcija iz *E. coli* soja M15 sa pQES-5 (Ilić-Tomić *et al.*, 2005) (kolone 4 i 7), S30 frakcija iz *E. coli* soja M15 sa pQEK-N (kolone 5 i 8).

2. Ispitivanje interakcije His₆-KgmB proteina i RNK „filter binding“ metodom

Prvobitna namena prethodno opisanih EMSA eksperimenata bila je, pored kvalitativnog detektovanja protein-RNK kompleksa, i kvantitativna analiza protein-RNK interakcija, odnosno određivanje konstante disocijacije proteina. Međutim, da bi ovo bilo moguće, niti radioaktivno obeležena RNK proba, niti protein-RNK kompleks ne smeju da pokazuju heterogenost u veličini i strukturi, što ovde nije bio slučaj. Zbog toga je rađen i dvostruki „filter binding“ esej, detaljno opisan u poglavlju III-15. Na osnovu ovog eksperimenta bilo je moguće proceniti količinu obeležene probe koja, u kompleksu sa proteinom, zaostaje na gornjoj Hybond-C extra nitroceluloznoj membrani i uporediti je sa količinom probe kojoj nije dodat protein, a vezana je za donju Hybond-N+ najlonsku membranu. Same reakcije vezivanja u kojima je praćena interakcija između radioaktivno obeležene wt *kgmB* RNK probe dužine 114 nt (0.0041 pmol) i His₆-KgmB proteina čija količina je povećavana od 0.3 do 1000 pmol (slika 19), su rađene kao u EMSA eksperimentima, što je detaljno opisano u poglavlju III-14.5.



Slika 19. „Filter binding“ esej za kompleks His₆-KgmB protein - wt *kgmB* RNK (114 nt). Količina RNK u reakcijama je bila konstantna (0.019 pmol), a His₆-KgmB protein je dodavan u rastućoj koncentraciji kako je naznačeno na slici. Slobodna RNK proba bez proteina je na poziciji 1.

Na slici 19 se vidi da, tek ako se His₆-KgmB protein doda u suvišku od čak 73000x u odnosu na probu, moguće je detektovati signal na nitroceluloznoj membrani, što se u ovom slučaju može smatrati artefaktom. Dvostruki filter „binding“ esej sa istom probom je ponovljen, ali su umesto prečišćenog His₆-KgmB proteina korišćene frakcije (S30 i S100) kulture iz koje je on prečišćavan (rezultati nisu prikazani). Međutim, niti u jednom slučaju nije detektovano značajnije zaostajanje probe u kompleksu sa His₆-KgmB proteinom iz korišćene frakcije.

3. Ispitivanje interakcije RNK i His₆-KgmB proteina „toeprint“ metodom

„Toeprint“ metoda se zasniva na činjenici da u trenutku kad reverzna transkriptaza tokom reakcije polimerizacije sa *in vitro* sintetisane RNK kao matrice, naide na 30S ribozomalnu subjedinicu vezanu za RBS, ona disosuje, što kao rezultat daje „toeprint“ signal. U slučaju da se protein, čiji se uticaj na inicijaciju translacije ispituje, veže za RNK

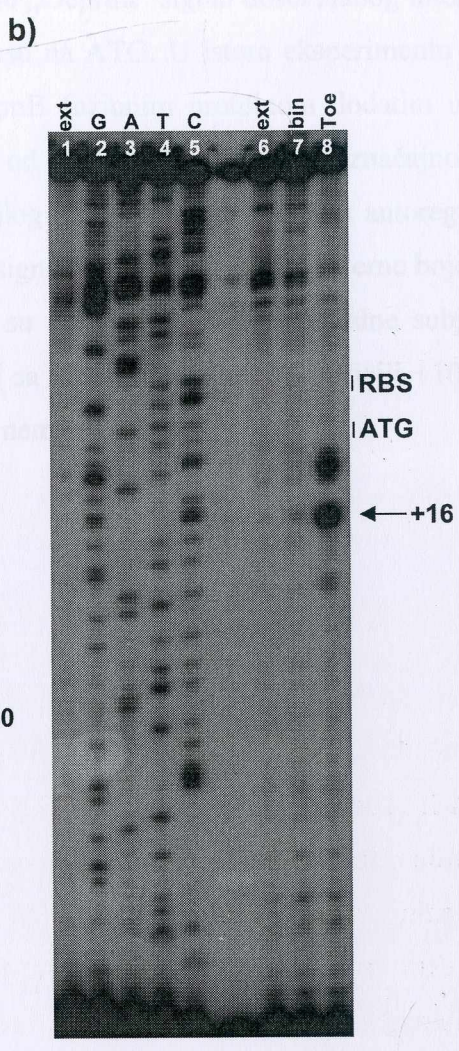
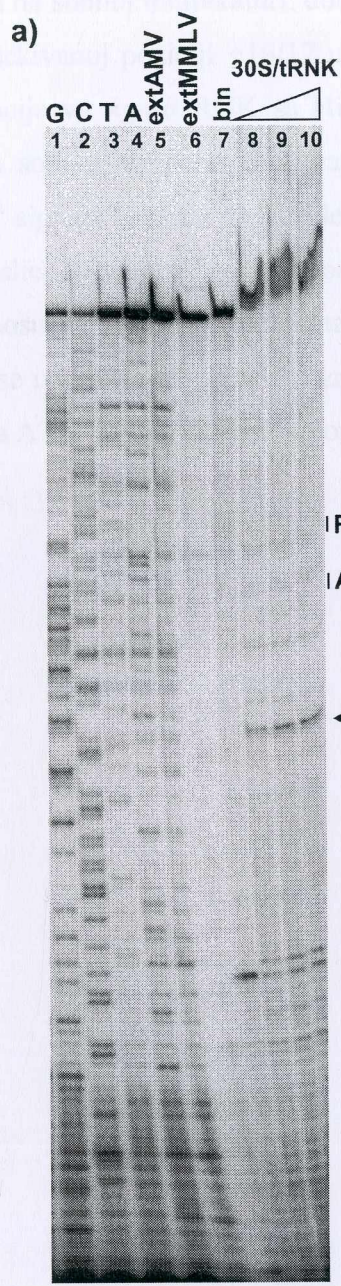
u regionu gde započinje translacija, vezivanje same 30S ribozomalne subjedinice biće otežano, a to bi dalje dovelo do slabljenja „toeprint“ signala.

Uticaj His₆-KgmB proteina na inicijaciju translacije *kgmB* gena je ispitan u „toeprint“ eksperimentu sa wt *kgmB* RNK, a sam eksperiment, čiji je rezultat prikazan na slici 21, je rađen na način detaljno opisan u poglavlju III-16. Matrica za sintezu RNK je bio plazmid pUKT7, linearizovan digestijom sa *XbaI*, čija je konstrukcija opisana u poglavlju III-14.1 i prilogu 1. Dužina RNK molekula sintetisanog sa ovog plazmida je 305 nt, a on je obuhvatao kompletan wt 5'UTR *kgmB* gena kao i deo kodirajuće sekvence do *BglII* restrikcionog mesta. Za ovu RNK je vezan radioaktivno obeleženi prajmer PE-kgm2 pomoću kog je sintetisana cDNK dužine 220 nt. Na slici 20a, u kolonama gde su nanete „toeprint“ reakcije se vidi nespecifični signal na poziciji +30, a očekivani „toeprint“ signal izostaje, čak i ako se linearno poveća količina dodatih 30S/tRNK^{fMet} komponenti. Ovaj eksperiment je ponavljan nekoliko puta pri čemu su menjani vreme inkubacije wt *kgmB* RNK sa 30S ribozomalnom subjedinicom, temperatura reakcije i radioaktivno obeleženi prajmer (rezultati nisu prikazani), ali nije detektovan 30S-RNK-tRNK^{fMet} ternarni kompleks. Paralelno je rađen i kontrolni „toeprint“ eksperiment sa *P1-sgm* RNK na već opisan način (Ilić-Tomić, 2010), gde je dobijen očekivani +16 „toeprint“ signal (slika 20b).

Slika 20. „Toeprint“ eseji na wt *kgmB* RNK i *P1-sgm* RNK.

a) 6% denaturišući akrilamidni gel sa reakcijama na wt *kgmB* RNK: sekvenciranje sa obeleženim ddNTP (kolone 1-4), „primer extension“ (kolone 5 i 6), binarni 30S-RNK kompleks (kolona 7) i ternarni 30S-RNK-tRNKfMet kompleks sa rastućom koncentracijom 30S/ tRNKfMet (kolone 8-10). Pozicija nespecifičnog +30 signala je obeležena strelicom, a vertikalnim crtama su naznačene pozicije RBS i start kodona.

b) 6% denaturišući akrilamidni gel sa reakcijama na *P1-sgm* RNK: „primer extension“ (kolone 1 i 6), sekvenciranje sa obeleženim ddNTP (kolone 2-5), binarni 30S-RNK kompleks (kolona 7) i ternarni 30S-RNK-tRNKfMet kompleks (kolona 8). Pozicija specifičnog +16 „toeprint“ signala je obeležena strelicom, a vertikalnim crtama su naznačene pozicije RBS i start kodona.



Jedino u slučaju kada je 30S ribozomalna subjedinica inkubirana sa wt *kgmB* RNK 45 minuta na sobnoj temperaturi, dobijen je „toeprint“ signal dosta slabog intenziteta (slika 21) na očekivanoj poziciji +16/17 u odnosu na ATG. U istom eksperimentu je urađena i preinkubacija wt *kgmB* RNK sa His₆-KgmB fuzionim proteinom dodatim u suvišku od 2300x na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 min. Došlo je do značajnog smanjenja „toeprint“ signala (kolona 4) što ide u prilog hipotezi o translacionoj autoregulaciji *kgmB* gena. Na slici 10 se može uočiti i dodatni signal (označen sa zvezdom crne boje) na poziciji +7 u odnosu na ATG u reakcijama gde su dodavane 30S ribozomalne subjedinice, a u koloni 5 se uočavaju tri signala (označeni sa crnim trouglom) na poziciji +10, -23 i -40 u odnosu na ATG kojih u ostalim kolonama nema.

Slika 21. „Toeprint“ esej na wt *kgmB* RNK.

a) Sekvenca wt *kgmB* RNK sa naznačenom pozicijom PE-*kgm* 2 prajmera. Potencijalne regulatorne sekvence RS i RS' (CGCCC i CGUCA) su obeležene crvenom bojom i uokvirene. Zvezdom crne boje je obeležen start transkripcije na wt *kgmB* iRNK u soju *S. tenebrarius*, a -10 region je nadvučen. Na slici su RBS i start kodon obeleženi crvenom bojom i nadvučeni. Naznačena je i pozicija +16/17 signala.

b) 6% denaturišući akrilamidni gel sa reakcijama na wt *kgmB* RNK: sekvenciranje sa obeleženim ddNTP (kolone 1-3), „primer extension“ (kolona 8), kontrola sa tRNKfMet (kolona 4), ternarni 30S-RNK-tRNKfMet kompleks sa opadajućom koncentracijom 30S/tRNKfMet (kolona 6 i 7), reakcija kompeticije između His₆-KgmB proteina i 30S subjedinice (kolona 5). Pozicija +16/17 „toeprint“ signala je označena strelicom, a vertikalnim crtama su naznačene pozicije potencijalnih regulatornih sekvenci, RBS i start kodon. Zvezdom crne boje su označeni signali prisutni u reakcijama kada se dodaju 30S ribozomalne subjedinice, a crnim trouglom su označeni signali prisutni u reakciji gde je dodat His₆-KgmB protein.

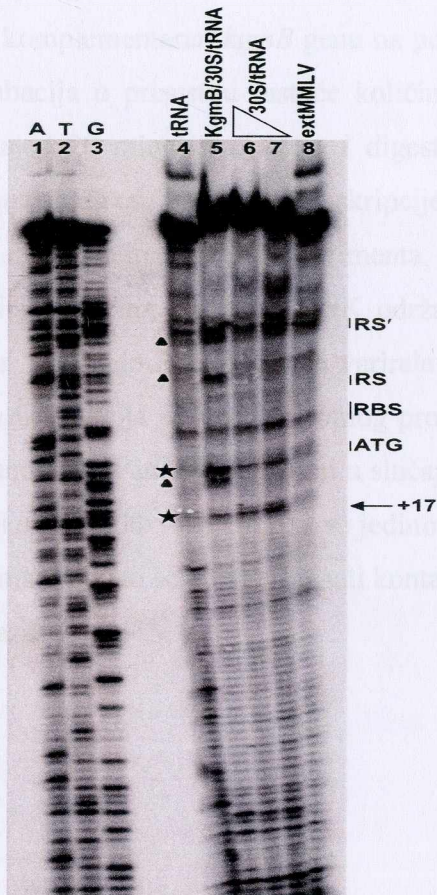
a)

```

gggagaAGCCUCGCUAGGCUGGACGGGCAGUGGAGCGGGCGCGGGCGCCCCGGCCCCC
      RS'          -10          ★          RS          RBS
CGCGCCCGAACAGGUCGCGGCGGGCGUCA GCGAGCGGAGAGGACCCUGUGAUGCC
      +16/17
GCACCCGGCUCCGGACCCGGCGAUGCCCGAGGACCCGAGGCUGGCGGAGGUCGUC
GACGCGGUCCGGUCCAGCAGGCGCUACCAGAGCGUCGCGCCCCGAAACC...
                                     ← PE-kgm2

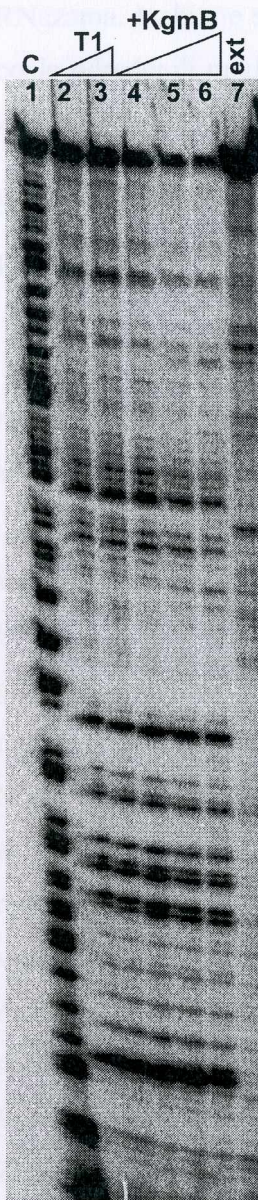
```

b)



4. Ispitivanje interakcije His₆-KgmB proteina i wt *kgmB* RNK „footprint“ metodom sa RNazom T1

Mogućnost da se His₆-KgmB fuzioni protein vezuje za wt *kgmB* RNK koja je *in vitro* sintetisana sa plazmida pUKT7, testirana je u „footprint“ eksperimentu sa RNazom T1. Za wt *kgmB* RNK dužine 305 nt je najpre vezan radioaktivno obeleženi prajmer PE-kgm 2 komplementaran *kgmB* genu na poziciji od +92 do +108 u odnosu na ATG. Sledila je inkubacija u prisustvu rastuće količine His₆-KgmB proteina na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta, a potom i digestija sa RNazom T1. Mesta sečenja su mapirana analizom produkata reverzne transkripcije na denturišućem akrilamidnom gelu. Na slici 22 je prikazan rezultat ovog eksperimenta, detaljno opisanog u poglavlju III-17. U svakoj reakciji je količina wt *kgmB* RNK održavana konstantnom u vrednosti od 0.04 pmol, a količina His₆-KgmB proteina je varirala od 4 do 200 pmol. Ukoliko se uporede profili sečenja iz reakcija sa i bez prisutnog proteina, može se zaključiti da nije došlo do zaštite ispitivanog RNK molekula čak ni u slučaju kada je His₆-KgmB prečišćeni protein dodavan u suvišku od 5000x. Na slici 11 se jedino zapaža blago slabljenje intenziteta svih signala u kolonama 5 i 6 što se može pripisati kontaminaciji His₆-KgmB prečišćenog proteina nekom od RNaza.



Slika 22. „Footprint“ esej sa RNazom T1. Sekvenciranje RNK sa ddC (1), sečenje sa 1U i 2U RNaze T1 (kolone 2 i 3), reakcije sa rastućom količinom His₆-KgmB proteina (kolone 4-6) i kontrolna reakcija „primer extension“ (kolona 7).

5. Mapiranje sekundarne strukture na 5' kraju RNK molekula parcijalnom digestijom RNazama

Kako hipoteza o autoregulaciji *kgmB* gena na translacionom nivou ne isključuje mogućnost da bi motiv koji KgmB MTaza prepoznaje mogla biti i sekundarna struktura u okviru 5' UTR na *kgmB* iRNK, njeno postojanje je testirano u eksperimentima sa različitim

RNazama. Izabrane su tri endonukleaze koje specifično seku jednolančane RNK molekule posle određenih nukleozida, na način detaljno opisan u poglavlju III-18, kao i RNaza V1 koja seče dvolančanu RNK.

5.1. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja wt *kgmB* RNK analiziranjem produkata reverzne transkripcije

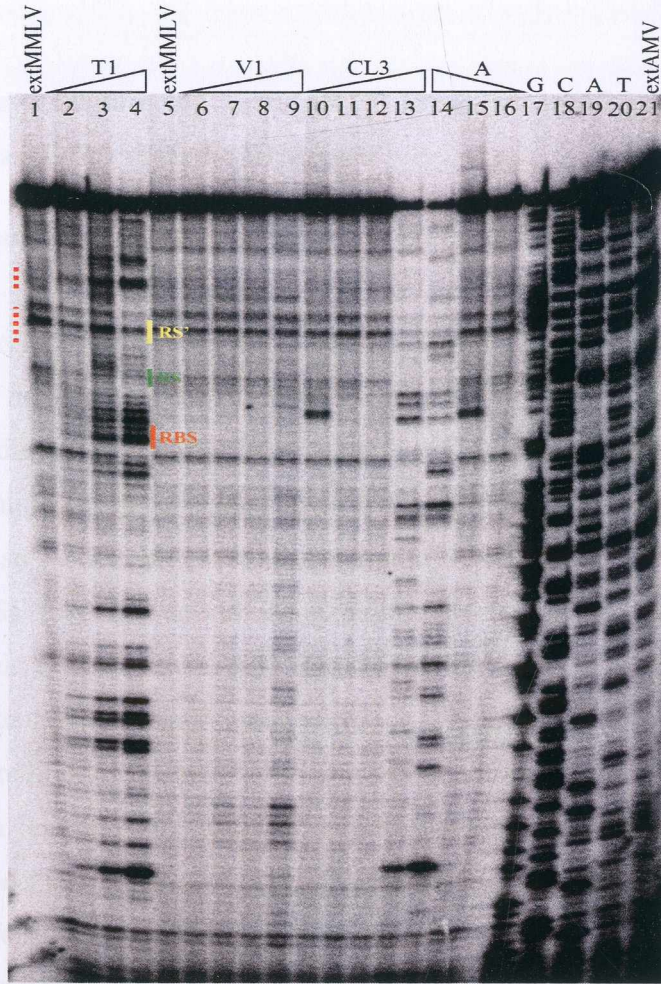
Za mapiranje sekundarne strukture odabran je već pominjani wt *kgmB* RNK molekul dužine 305 nt koji je obuhvatao kompletan wt 5' UTR region *kgmB* gena kao i deo kodirajuće sekvence do *Bgl*III restrikcionog mesta. Kao matrica za sintezu RNK poslužio je plazmid pUKT7 linearizovan digestijom sa *Xba*I, a wt *kgmB* RNK je nakon sinteze eluirana sa denaturišućeg akrilamidnog gela po proceduri detaljno opisanoj u poglavlju III-9. Za ovu RNK je najpre vezan radioaktivno obeleženi prajmer PE-kgm2 komplementaran *kgmB* genu na poziciji od +92 do +108 u odnosu na ATG. Sledila je parcijalna digestija 0.04 pmol ovako pripremljene RNK različitim RNazama, a potom reakcija sinteze cDNK pomoću MMLV reverzne transkriptaze i na kraju, analiza produkata na 6% denaturišućem akrilamidnom gelu. Rezultat ovog eksperimenta je prikazan na slici 23 gde su i sumirani rezultati mapiranja 5' kraja *kgmB* iRNK različitim RNazama (slika 23b). Na slici 23b se vidi da je minimalni region za otpočinjanje translacije (deo RNK molekula sa RBS-om i AUG start kodonom) u linearnoj formi, s obzirom da je sečen sa sve tri RNaze koje specifično prepoznaju jednolančane RNK molekule. Isto važi i za početak kodirajućeg dela *kgmB* gena, dok je region sa potencijalnom sekundarnom strukturom ostao neokarakterisan. Zbog toga je primenjen drugačiji pristup gde se radioaktivno obeleženi RNK molekuli parcijalno seku RNazama, a potom se produkti sečenja analiziraju direktno.

Slika 23. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja *kgmB* iRNK različitim RNazama posredstvom radioaktivno obeleženog prajmera.

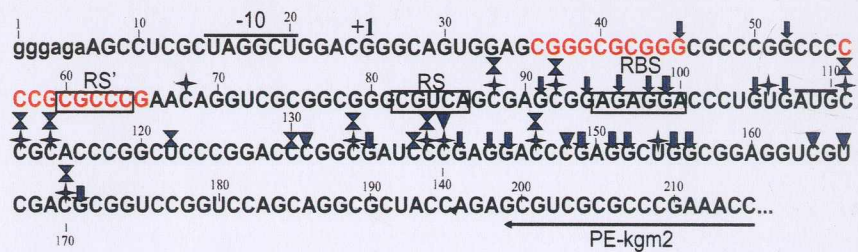
a) 8% denaturišući akrilamidni gel sa produktima parcijalne digestije različitim RNazama. „Primer extension“ reakcije sa MMLV i AMV reverznom transkriptazom (kolone 1, 5 i 21), reakcije sa rastućom koncentracijom RNaze T1 (kolone 2 - 4), reakcije sa rastućom koncentracijom RNaze V1 (kolone 6 - 9), reakcije sa rastućom koncentracijom RNaze CL3 (kolone 10 - 13), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze A (kolone 2 - 4), reakcije sekvenciranja sa ddG, ddC, ddA i ddT (kolone 17-20). Na slici su naznačeni RBS i potencijalne regulatorne sekvence RS i RS', a crvenim tačkicama je obeležena pozicija kompjuterski generisane sekundarne strukture u okviru 5' UTR na *kgmB* iRNK.

b) Sumirani rezultati mapiranja 5' kraja *kgmB* iRNK različitim RNazama. Potencijalne regulatorne sekvence RS i RS' (CGCCC i CGUCA) su uokvirene. Start transkripcije *kgmB* gena (+1) i -10 region (nadvučen) na wt *kgmB* iRNK u soju *S. tenebrarius* su naznačeni. RBS (uokviren) i start kodon (nadvučen) su takođe naznačeni. Simbolima su označena mesta sečenja različitim RNazama pri čemu se razlika u njihovoj debljini odnosi na razliku u afinitetu date RNaze. Malim slovima su predstavljeni nukleotidi poreklom iz T7 promotora. Crvenom bojom su obeleženi nukleotidi koji ulaze u sastav kompjuterski generisane sekundarne strukture.

a)



b)



- X - RNase CL3
- + - RNase A
- ↓ - T1 RNase
- ▼ - RNase V1

5.2. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja wt *kgmB* i *sgm* RNK analiziranjem produkata parcijalne digestije RNazama

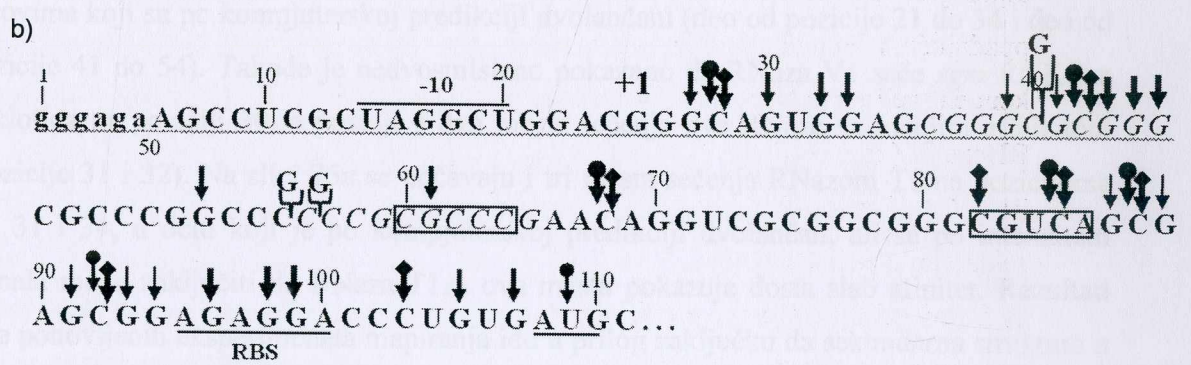
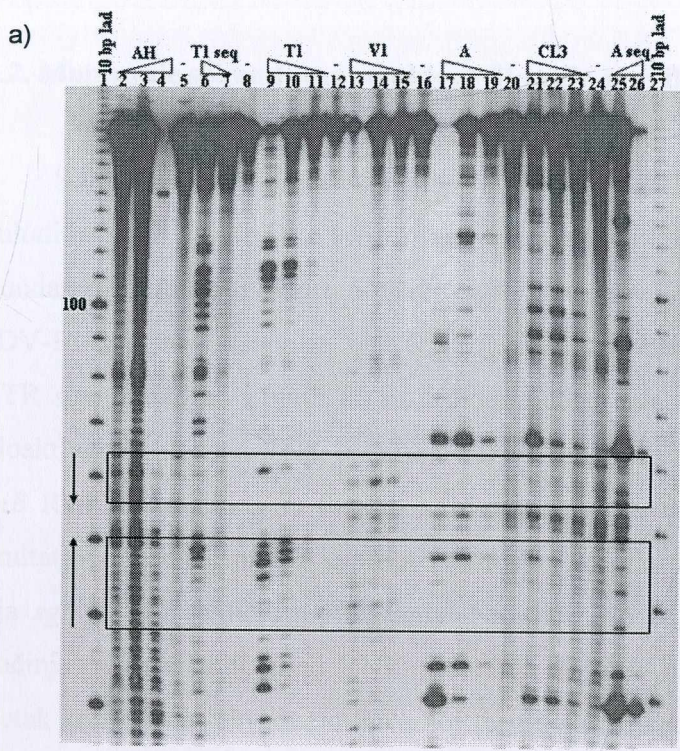
5.2.1. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja *kgmB* iRNK

Za direktno mapiranje sekundarne strukture 5' kraja *kgmB* iRNK odabran je wt *kgmB* RNK molekul dužine 198 nt sintetisan *in vitro* sa plazmida pUKT7 koji je linearizovan digestijom sa *SalI*. Parcijalna digestija radioaktivno obeležene RNK je rađena na način detaljno opisan u poglavlju III-18, a rezultat ovog eksperimenta je prikazan na slici 24 gde su i sumirani rezultati mapiranja 5' kraja *kgmB* iRNK različitim RNazama (slika 24b). Sa slike 24b se vidi da su minimalni region za otpočinjanje translacije (deo RNK molekula sa RBS-om i AUG start kodonom) i region wt *kgmB* RNK molekula koji obuhvata potencijalnu regulatornu sekvencu RS u linearnoj formi, što se poklapa sa rezultatom prethodno opisanog eksperimenta mapiranja sekundarne strukture. Međutim, uočava se da je i deo koji je po kompjuterskoj predikciji dvolančan (mesta sečenja na poziciji 39 kao i pozicijama od 41 do 45), zapravo u jednolančanoj formi. Pokazano je i da nema digestije sa RNazom V1, te se može zaključiti da postojanje kompjuterski generisane sekundarne strukture nije dokazano.

Slika 24. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja *kgmB* iRNK analiziranjem produkata parcijalne digestije.

a) 6% denaturišući akrilamidni gel sa produktima parcijalne digestije različitim RNazama. Radioaktivno obeležena 10bp lestvica (kolone 1 i 27), lestvica dobijena alkalnom hidrolizom RNK sa rastućim vremenom inkubacije (kolone 2-4), obeležena kontrolna RNK (kolone 5, 8, 12, 16, 20 i 24), lestvica dobijena parcijalnom digestijom sa RNazom T1 u denaturišućim uslovima (kolone 6 i 7), lestvica dobijena parcijalnom digestijom sa RNazom A u denaturišućim uslovima (kolone 25 i 26), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze T1 (kolone 9 - 11), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze V1 (kolone 13 - 15), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze A (kolone 17 - 19), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze CL3 (kolone 21 - 23). Vertikalne strelice i uokvireni delovi gela predstavljaju kompjuterski generisanu sekundarnu strukturu.

b) Sumirani rezultati mapiranja 5' kraja *kgmB* iRNK različitim RNazama. Potencijalne regulatorne sekvence RS i RS' (CGCCC i CGUCA) su uokvirene. Start transkripcije *kgmB* gena (+1) i -10 region (nadvučen) na wt *kgmB* iRNK u soju *S. tenebrarius* su naznačeni. RBS (uokviren) i start kodon (nadvučen) su takođe naznačeni. Simbolima su označena mesta sečenja različitim RNazama pri čemu se razlika u njihovoj debljini odnosi na razliku u afinitetu date RNaze. Malim slovima su predstavljeni nukleotidi poreklom iz T7 promotora. Kosim slovima su obeleženi nukleotidi koji ulaze u sastav kompjuterski generisane sekundarne strukture. Pozicija tri dodatna G nukleotida unutar 5' UTR *kgmB* gena je označena vitičastim zagradama.



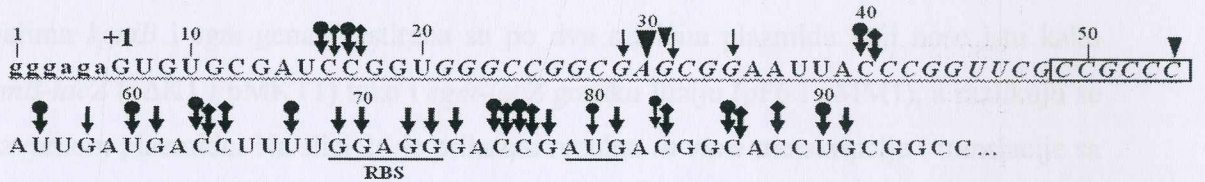
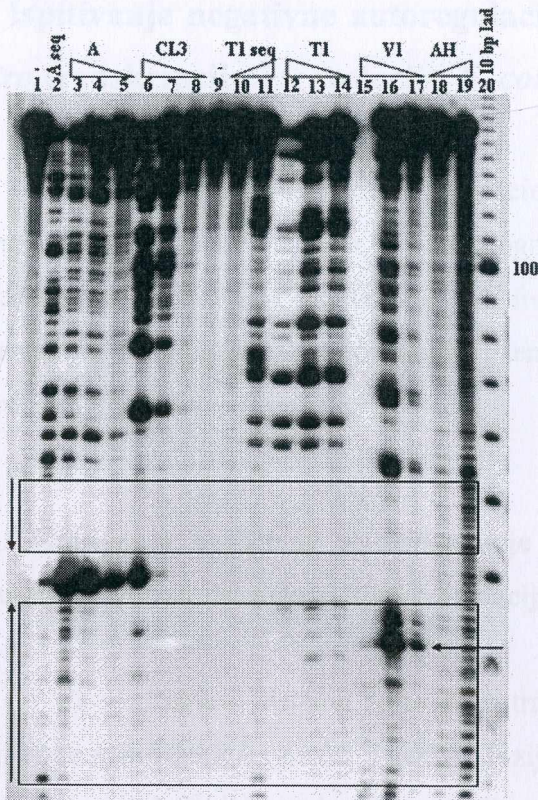
- | | |
|-----|-------------|
| ↓↓↓ | - RNase T1 |
| ↓↓↓ | - RNase A |
| ↓ | - RNase CL3 |
| ▼ | - RNase V1 |

5.2.2. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja *sgm* iRNK

S obzirom na sličnosti između *KgmB* i *Sgm* MTaza, koja je višestruko potvrđena rezultatima kako *in vivo* tako i *in vitro* eksperimenata, bilo je interesantno testirati postojanje sekundarne strukture u okviru 5' UTR regiona na *sgm* iRNK. Sa linearizovanog plazmida pHDV-P1 *sgm* sintetisana je *sgm* RNK dužine 159 nt koja je obuhvatala kompletan wt 5'UTR *sgm* gena kao i prvih 80 nt iz kodirajućeg dela sekvence (Ilić-Tomić, 2010). Ova radioaktivno obeležena RNK je sečena različitim RNazama, na isti način kao u slučaju wt *kgmB* RNK, a produkti su finalno analizirani na 6% denaturišućem akrilamidnom gelu. Rezultat ovog eksperimenta je prikazan na slici 25 gde su i sumirani rezultati mapiranja 5' kraja *sgm* iRNK različitim RNazama. Na slici 25b se vidi da su minimalni region za otpočinjanje translacije (deo RNK molekula sa RBS-om i AUG start kodonom) kao i početak kodirajuće sekvence u linearnoj formi, slično kao kod wt *kgmB* RNK. Međutim, u slučaju *sgm* RNK nema sečenja sa RNazama koje prepoznaju jednolančane RNK u delovima koji su po kompjuterskoj predikciji dvolančani (deo od pozicije 21 do 34 i deo od pozicije 41 do 54). Takođe je nedvosmisleno pokazano da RNaza V1 seče *sgm* RNK iza nuklotida na poziciji 30, a postoje i dva mesta sečenja ove RNaze sa manjim afinitetom (pozicije 31 i 32). Na slici 25a se uočavaju i tri mesta sečenja RNazom T1 na pozicijama 29, 31 i 34, u delu koji je po kompjuterskoj predikciji dvolančan, ali se po intenzitetu signala može zaključiti da RNaza T1 za ova mesta pokazuje dosta slab afinitet. Rezultati više ponovljenih eksperimenata mapiranja idu u prilog zaključku da sekundarna struktura u okviru 5' UTR na *sgm* iRNK zaista postoji.

Slika 25. Mapiranje sekundarne strukture 5' kraja *sgm* iRNK analiziranjem produkata parcijalne digestije RNazama. a) 6% denaturišući akrilamidni gel sa produktima parcijalne digestije različitim RNazama. Obeležena kontrolna RNK (kolone 1 i 9), lestvica dobijena parcijalnom digestijom sa RNazom A u denaturišućim uslovima (kolona 2), lestvica dobijena parcijalnom digestijom sa RNazom T1 u denaturišućim uslovima (kolone 10 i 11), lestvica dobijena alkalnom hidrolizom RNK sa rastućim vremenom inkubacije (kolone 18 i 19), radioaktivno obeležena 10bp lestvica (kolona 20), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze A (kolone 3 - 5), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze CL3 (kolone 6 - 8), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze T1 (kolone 12 - 14), reakcije sa opadajućom koncentracijom RNaze V1 (kolone 15 - 17). Vertikalne strelice i uokvireni delovi gela predstavljaju kompjuterski generisanu sekundarnu strukturu. Mesto sečenja sa RNazom V1 je naznačeno horizontalnom strelicom.

b) Sumirani rezultati mapiranja 5' kraja *sgm* iRNK različitim RNazama. Potencijalna regulatorna sekvenca RS (CCGCC) je uokvirena. Start transkripcije *sgm* gena (+1) u soju *M. zionensis* je naznačen. RBS i start kodon (podvučeni) su takođe naznačeni. Simbolima su označena mesta sečenja različitim RNazama pri čemu se razlika u njihovoj debljini odnosi na razliku u afinitetu date RNaze. Malim slovima su predstavljeni nukleotidi poreklom iz T7 promotora. Kosim slovima su obeleženi nukleotidi koji ulaze u sastav kompjuterski generisane sekundarne strukture.



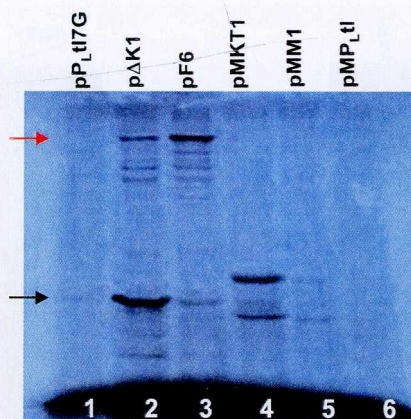
- ↓↓↓ - RNase T1
- ↓↓↓ - RNase A
- ↓↓↓ - RNase CL3
- ▼▼ - RNase VI

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

S obzirom da je hipoteza o translacionoj autoregulaciji *kgmB* gena postavljena na osnovu *in vivo* eksperimenata u heterologom domaćinu, NM522 soju *E. coli*, bilo je interesantno testirati ovu hipotezu u „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju. Od komercijalno dostupnih sistema je izabran „*E. coli* S30 Extract System for Circular DNA“ firme Promega.

6.1. Ispitivanje negativne autoregulacije *kgmB-lacZ* i *sgm-lacZ* genskih fuzija u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju *E. coli*

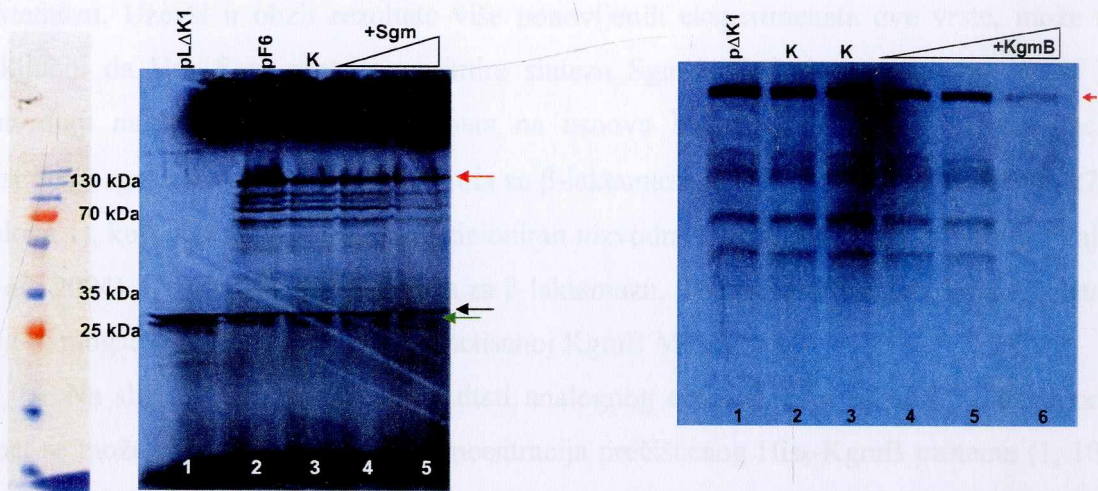
Za testiranje u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju su odabrani plazmidi koji nose *kgmB-lacZ* i *sgm-lacZ* genske fuzije i sa kojih se *in vivo* sintetišu odgovarajući fuzioni proteini (Kojić *et al.*, 1996; Vajić *et al.*, 2004). U ovim plazmidima transkripcija zavisi od P_{Ltl} promotora (Konstantinović *et al.*, 1991), a translacija se odvija zahvaljujući signalima *kgmB* i *sgm* gena. Testirana su po dva različita plazmida koji nose istu kako $\Delta kgmB-lacZ$ (p $\Delta K1$ i pMKT1) tako i *sgm-lacZ* gensku fuziju (pF6 i pMM1), a razlikuju se po izvornom plazmidu. Na slici 26 je prikazan rezultat *in vitro* transkripcije i translacije sa ovih plazmida, a kao kontrole su korišćeni izvorni plazmid pP_{Ltl}7G i derivat pMS421 izvornog plazmida označen sa pMP_{Ltl} (Prilog 2). Očekivani fuzioni protein u oba slučaja bi težio oko 123 kDa, a na slici 26 se signal te težine uočava samo u kolonama 2 i 3. To znači da je *in vitro* translacijom sa plazmida p $\Delta K1$ sintetisan KgmB-lacZ fuzioni protein, a *in vitro* translacijom sa plazmida pF6 sintetisan Sgm-lacZ fuzioni protein. U ovim kolonama se uočava i signal na poziciji od oko 31kDa, a pošto je prisutan i u kontrolnoj reakciji sa plazmidom pP_{Ltl}7G može se zaključiti da odgovara β -laktamazi, selektivnom markeru navedenih plazmida. Lako se uočava i razlika u intenzitetu produkata translacije sa p $\Delta K1$ i pF6 plazmida gde je u prvom slučaju signal koji odgovara β -laktamazi mnogo jači u poređenju sa signalom za fuzioni protein, a u drugom slučaju je situacija obrnuta.



Slika 26. *In vitro* translacija Sgm-lacZ i KgmB-lacZ fuzionih proteina.

Na 10% SDS-poliakrilamidni gel su nanete reakcije *in vitro* translacije sa plazmida: pP_Ltl7G (kolona 1), pΔK1 (kolona 2), pF6 (kolona 3), pMKT1 (kolona 4), pMM1 (kolona 5) i pMP_Ltl (kolona 6). Pozicija fuzionih proteina sintetisanih *in vitro* je naznačena crvenom strelicom, a pozicija β-laktamaze crnom.

Sledili su eksperimenti u kojima je praćen uticaj dodatih prečišćenih His₆-KgmB i His₆-Sgm proteina na sintezu adekvatnih fuzionih proteina. Pošto je sinteza KgmB-lacZ fuzionog proteina manje efikasna u poređenju sa Sgm-lacZ fuzionim proteinom, koncentracija matrice, pΔK1 plazmida (2 μg) u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju je bila duplo veća od koncentracije pF6 plazmida. Sami eksperimenti su izvedeni na način detaljno opisan u poglavlju III-19, a na slici 27 su prikazani rezultati dva ovakva eksperimenta.



Slika 27. Uticaj His₆-KgmB i His₆-Sgm proteina na *in vitro* sintetisane Sgm-lacZ i KgmB-lacZ fuzione proteine.

a) 10% SDS- poliakrilamidni gel sa reakcijama *in vitro* translacije sa plazmida pF6 bez i u prisustvu dodatog prečišćenog His₆-Sgm proteina: pLAK1 kao kontrola za β-laktamazu (kolona 1), pF6 (kolona 2), pF6 sa dodatim puferom za dijalizu (kolona 3), pF6 u prisustvu rastuće koncentracije prečišćenog His₆-Sgm proteina (kolone 4 i 5). Pozicija fuzionih proteina sintetisanih *in vitro* je naznačena crvenom strelicom, pozicija β-laktamaze crnom, a pozicija koja odgovara Sgm metiltransferazi zelenom. Kao marker je korišćen "PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder" (Fermentas).

b) 10% SDS- poliakrilamidni gel sa reakcijama *in vitro* translacije sa plazmida pAK1 bez i u prisustvu dodatog prečišćenog His₆-KgmB proteina: pAK1 (kolona 1), pAK1 sa dodatim puferom za dijalizu (kolone 2 i 3), pAK1 u prisustvu rastuće koncentracije prečišćenog His₆-KgmB proteina (kolone 4-6). Pozicija fuzionih proteina sintetisanih *in vitro* je naznačena crvenom strelicom.

Na slici 27a se vidi da u prisustvu rastuće koncentracije prečišćenog His₆-Sgm proteina (3.35 i 33.5 pmol) dolazi do značajnijeg smanjenja intenziteta signala za Sgm-lacZ

fuzioni protein u poređenju sa smanjenjem intenziteta signala za unutrašnju kontrolu, β -laktamazu. Uzevši u obzir rezultate više ponovljenih eksperimenata ove vrste, može se zaključiti da His₆-Sgm protein reprimira sintezu Sgm-lacZ fuzionog proteina, čime se potvrđuju nalazi *in vivo* eksperimenata na osnovu kojih je hipoteza o autoregulaciji ekspresije *sgm* gena utemeljena. Kontrola za β -laktamazu je bio plazmid p Δ K1 (slika 27a, kolona 1), koji nosi ceo *kgmB* gen pozicioniran nizvodno u odnosu na *P_{Ltl}* promotor (Vajić *et al.*, 2004). U koloni 1, ispod signala za β -laktamazu, uočava se još jedan dodatni signal, koji bi mogao da odgovara *in vitro* sintetisanoj KgmB MTazi.

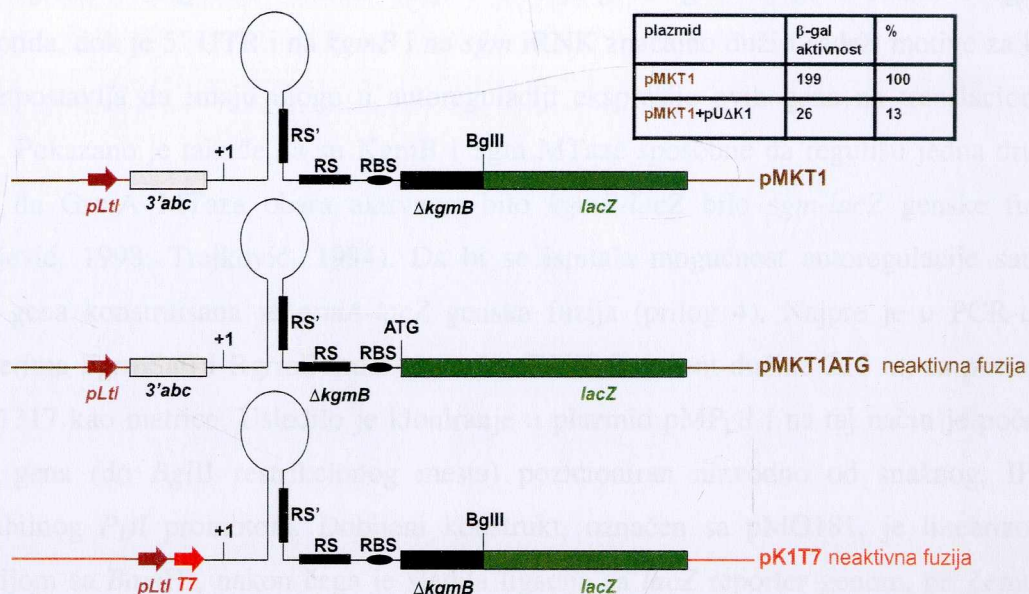
Na slici 27b su prikazani rezultati analognog eksperimenta sa p Δ K1 plazmidom. Opet se može zaključiti da rastuća koncentracija prečišćenog His₆-KgmB proteina (1, 10 i 30 pmol) dovodi do smanjenja intenziteta signala za KgmB-lacZ fuzioni protein. Može se zaključiti da je u „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju pokazano da His₆-KgmB protein reprimira sintezu KgmB-lacZ fuzionog proteina, što je u skladu sa rezultatima *in vivo* eksperimenta gde je ovaj fenomen prvi put opisan.

7. Ispitivanje negativne autoregulacije *kgmB* gena *in vivo*

Polazna hipoteza o mehanizmu negativne autoregulacije *kgmB* gena na nivou inicijacije translacije je postavljena na osnovu *in vivo* eksperimenata sa *kgmB-lacZ* genskim i operonskim fuzijama (Vajić *et al.*, 2004). Plazmidi p Δ K1 i pMKT1 su nosili istu Δ *kgmB-lacZ* gensku fuziju ispred koje je bio lociran i deo potencijalnog ABC transportera, eksprimiranu sa snažnog, IPTG inducibilnog *P_{Ltl}* promotora (Slika 28). Sam fuzioni protein je na svom N terminusu sadržao 65 amino kiselina KgmB proteina, a njegova translacija je vršena sa iRNK koja nosi sve potencijalne translacione regulatorne sekvence sadržane na *kgmB* iRNK do *Bgl*III restrikcionog mesta. Pokazano je da prisustvo ekstra kopije *kgmB* gena (plazmid pU Δ K1), u *in trans* konstelaciji u odnosu na Δ *kgmB-lacZ* gensku fuziju (plazmid pMKT1), dovodi do značajnog pada aktivnosti fuzije (slika 28). Konstrukcija pMKT1ATG plazmida koji nosi Δ *kgmB-lacZ* gensku fuziju sa wt potencijalnim regulatornim sekvencama RS i RS' je opisana u prilogu 3. Najpre je u PCR-u sa prajmerima p_{Ltl}2 i Rev.pr.ATG, gde je kao matrica korišćen plazmid p Δ K1 (wt Δ *kgmB-lacZ* genska

fuzija), umnožen DNK fragment dužine 493 nt. Ovaj DNK fragment je obuhvatao P_{Ltl} promotor i nizvodno od njega region prisutan i kod plazmida p Δ K1 sve do ATG start kodona. Radi lakše manipulacije je ovaj DNK fragment ukloniran u plazmid pUC 19 (generisan plazmid pU Δ K1ATG), a potom je usledilo kloniranje u plazmid pMP $_{Ltl}$ čime je konstruisan plazmid pM Δ K1ATG. Konstrukcija plazmida pMP $_{Ltl}$ koji nosi P_{Ltl} promotor i koji je poslužio kao vektor za sklapanje fuzija je opisana u prilogu 3. Poslednji korak je bila ligacija plazmida pM Δ K1ATG linearizovanog digestijom sa *Bgl*III i *lacZ* reporter gena na *Bam*HI fragmentu, gde su start kodon *kgmB* gena i *lacZ* gen uklopljeni u fazu. Aktivnost ovako generisane Δ *kgmB-lacZ* genske fuzije (pMKT1ATG) u NM522 soju *E. coli* je testirana u β -gal esej (Miller, 1972), gde je pokazano da fuzija nije aktivna, iako je razlika u odnosu na ranije pominjanu Δ *kgmB-lacZ* gensku fuziju sa plazmida pMKT1 samo po odsusutvu kodirajućeg dela *kgmB* gena (slika 28).

Takođe je bilo planirano da se paralelno sa ranije opisanim EMSA esejima sa četiri različite *kgmB* RNK dužine 114 nt paralelno urade i *in vivo* eksperimenti gde bi se DNK matrice sa kojih su prepisivane date RNK probe iskoristile za konstrukciju genskih fuzija sa *lacZ* reporter genom. Najpre je konstruisana Δ *kgmB-lacZ* genska fuzija označena sa pK1T7, šematski prikazana na slici 28, koja se razlikuje od ranije pominjane Δ *kgmB-lacZ* genske fuzije pMKT1 po odsusutvu dela potencijalnog ABC transportera 5' u odnosu na fuziju, a prisustvu T7 promotora (Lidija Vuković, neobjavljeni rezultati). Kao i u slučaju pMKT1ATG plazmida, β -gal esej je pokazao da fuzija pK1T7 nije aktivna. Važno je napomenuti da je pokušana ekspresija iste fuzije sa T7 promotora u *E. coli* soju ER2566 koji nosi gen za T7 polimerazu, ali da fuzija opet nije bila aktivna (rezultati nisu prikazani).



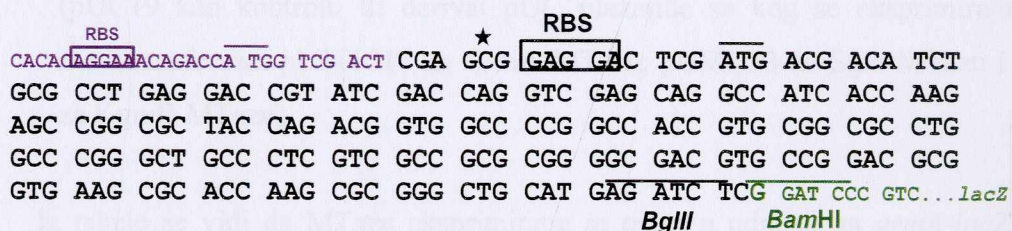
Slika 28. Šematski prikaz različitih $\Delta kgmB$ -*lacZ* genskih fuzija.

Na slici su simbolima RS i RS' obeležene potencijalne regulatorne sekvence, a naznačen je i RBS. Strelicama različite boje su naznačeni različiti promotori, a imena plazmida su prikazana različitom bojom u zavisnosti od kog vektora potiču (derivat pP_{Lti}7G ili pMS421 plazmida).

8. Ispitivanje negativne autoregulacije *grmA* gena *in vivo*

Pokazano je da su geni odgovorni za sintezu nekoliko specifičnih 16S rRNK MTaza, zahvaljujući čijem dejstvu se proizvođači aminoglikozidnih antibiotika štite od sopstvenih toksičnih proizvoda, u značajnoj meri slični. Konkretno, između GrmA MTaze iz soja *Micromonospora purpurea* i KgmB MTaze iz soja *S. tenebrarius* postoji 51.8% identičnosti na aminokiselinskom nivou, a ako se uporede GrmA i Sgm MTaza iz soja *M. zionensis* stepen identičnosti se penje do 89.8%. Međutim, bitna razlika se uočava kod 5'

UTR regiona ovih gena s obzirom da je u slučaju *grmA* gena njegova dužina svega 11 nukleotida, dok je 5' UTR i na *kgmB* i na *sgm* iRNK značajno duži i sadrži motive za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u autoregulaciji ekspresije ovih gena na translacionom nivou. Pokazano je takođe da su KgmB i Sgm MTaze sposobne da regulišu jedna drugu, kao i da GrmA MTaza obara aktivnost bilo *kgmB-lacZ* bilo *sgm-lacZ* genske fuzije (Milojević, 1998; Trajković, 1994). Da bi se ispitala mogućnost autoregulacije samog *grmA* gena konstruisana je *grmA-lacZ* genska fuzija (prilog 4). Najpre je u PCR-u sa prajmerima FgrmSalI i RgrmBamHI umnožen DNK fragment dužine 216 nt, sa plazmida pLST1317 kao matrice. Usledilo je kloniranje u plazmid pMPLtl i na taj način je početak *grmA* gena (do *Bgl*III restrikcionog mesta) pozicioniran nizvodno od snažnog, IPTG inducibilnog *P_{Ltl}* promotora. Dobijeni konstrukt, označen sa pMG181, je linearizovan digestijom sa *Bam*HI, nakon čega je sledila ligacija sa *lacZ* reporter genom, pri čemu se vodilo računa da start kodon *grmA* gena i *lacZ* gen budu uklopljeni u fazu (slika 29).



Slika 29. Uklapanje u fazu *grmA* i *lacZ* gena sa naznačenim relevantnim restrikcionim mestima. Slovicima crne boje je označena sekvenca *grmA* gena, zelene boje *lacZ* gena, a ljubičastom bojom je označen deo iz vektora. Start kodon *grmA* gena je nadvučen, RBS je uokviren, a start transkripcije u soju *M. purpurea* je obeležen zvezdicom. Na isti način su obeleženi i RBS i ATG poreklom iz vektora.

Aktivnost ovako generisane *grmA-lacZ* genske fuzije (pMG) je najpre testirana u β -gal eseju (Miller, 1972), a potom je na isti način praćen uticaj GrmA, KgmB i Sgm MTaze na aktivnost ove fuzije. Rezultati ovih eksperimenata su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Analiza β -gal aktivnosti pMG transformanata i odgovarajućih kotransformanata.

plazmid	β -galaktozidazna aktivnost (U)*	R (%)**
pMG	698	100
pMG + pLST1317	749	107
pMG + pUMK33	904	129
pMG + p Δ K1	591	85
pMG + pUC19	853	122

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

** R – odnos β -galaktozidazne aktivnosti NM522 soja *E. coli* koji sadrži samo plazmid pMG i NM522 soja *E. coli* koji, sem plazmida pMG, sadrži i drugi plazmid (pUC19 kao kontrolu ili derivat pUC plazmida sa kog se eksprimira neka od metiltransferaza: pLST1317 za GrmA MTazu, pUMK33 za Sgm MTazu i pU Δ K1 za KgmB MTazu).

Iz tabele se vidi da MTaze eksprimirane *in trans* u odnosu na *grmA-lacZ* gensku fuziju ne dovode do značajnijeg smanjenja njene aktivnosti. Doduše, do slabog smanjenja aktivnosti fuzije dolazi u NM522 soju *E. coli* koji nosi plazmide pMG i p Δ K1 tj. u slučaju kada se prati uticaj KgmB MTaze na aktivnost *grmA-lacZ* genske fuzije, ali se ovaj efekat može zanemariti, pogotovo ako se ima u vidu da KgmB MTaza smanjuje aktivnost Δ *kgmB-lacZ* genske fuzije (pMKT1) na svega 13% (slika 28).

IV DISKUSIJA

Životni ciklus aktinomiceta se odvija u uslovima koji stalno variraju, te je za ove bakterije karakteristična neverovatna mogućnost adaptacije na brojne promene. One su sposobne da kao odgovor na uslove sredine pređu iz faze ekspanzionalnog rasta (primarnog metabolizma) u stacionarnu fazu (sekundarni metabolizam) (Challis and Hopwood, 2003). Jedna od najupečatljivijih karakteristika sekundarnog metabolizma je raznolikost i kompleksnost njegove regulacije (Bibb, 2005).

Aktinomicete, a posebno streptomicete, predstavljaju konstantan predmet interesovanja naučnika jer su bogat izvor sekundarnih metabolita od medicinskog značaja (antibiotici, antitumorna jedinjenja, imunosupresori, antihelmintici i dr.). Pošto su antibiotici, tipični produkti sekundarnog metabolizma, često toksični i za samu bakteriju koja ih proizvodi, mikroorganizmi koji ih proizvode moraju da se naoružaju različitim odbrambenim mehanizmima pre nego što proizvodnja antibiotika otpočne. Ukoliko se rezistencija postiže delovanjem metiltransferaza, neophodno je da ovi enzimi već budu prisutni u određenoj količini kada sinteza antibiotika počne. Obično su biosintetski geni za određeni antibiotik i geni za rezistenciju locirani unutar istog klastera (Arya, 2007), a proizvodnja antibiotika je regulisana na više nivoa preko brojnih multifunkcionalnih signalnih molekula koji kontrolišu i proizvodnju antibiotika i opšti fiziološki odgovor ćelije. Međutim, brojni detalji transdukcije signala tokom ovih procesa još uvek su nepoznati. Ovo važi i za ekspresiju MTaza o čijoj se regulaciji tokom prelaska bakterije na sekundarni metabolizam vrlo malo zna.

Pokazano je da se transkripcija *sgm* gena kod bakterije *Micromonospora zionensis*, proizvođača aminoglikozidnog antibiotika G-52 (6-N-metilsisomicin), odvija sa tandemskih promotora koji se razlikuju po snazi, što bi moglo omogućiti različit nivo ekspresije Sgm MTaze u proizvođaču (Kojić *et al.*, 1992). Sem na nivou transkripcije, primarnog i za ćeliju najekonomičnijeg načina genske regulacije, ekspresija Sgm MTaze je regulisana i na translacionom nivou. Za ovu MTazu, kao i za ostale enzime koji na isti način modifikuju ribosome, važi pravilo da nije neophodna maksimalna ekspresija gena da bi se postigla potpuna zaštita. Pretpostavlja se da je svega nekoliko molekula funkcionalnog

enzima potrebno da se modifikuju svi targeti. Stoga je mehanizam negativne autoregulacije ekspresije, kao način da se koncentracija enzima održi na konstantnom i vrlo niskom nivou, sasvim opravdan. Sam model translacione autoregulacije *sgm* gena je zasnovan na *in vivo* analizi regulacije u heterologom domaćinu, *Escherichia coli*, korišćenjem *sgm-lacZ* genskih i operonskih fuzija (Kojić *et al.*, 1996). Ovaj pristup je bio opravdan činjenicom da nije bilo moguće dobiti detektabilnu količinu Sgm MTaze iz *E. coli* mini ćelija. I pored toga, Sgm MTaza eksprimirana u heterologom domaćinu dovodi do uspostavljanja gentamicin rezistentnog fenotipa. Prema predloženom modelu, Sgm MTaza nakon što izvrši kompletnu modifikaciju svog primarnog targeta 16S rRNK, i obezbedi ćeliji rezistenciju na antibiotik, prepoznaje i vezuje se za sopstvenu iRNK, čime je onemogućena dalja translacija. Kompjuterskom analizom je pokazano da isti heksanukleotid (CCGCCC) postoji kako u 5'UTR regionu *sgm* iRNK 14 nt ispred RBS, gde ulazi u sastav sekundarne strukture u vidu ukosnice, tako i u A-mestu u okviru heliksa 44 na 3' kraju 16S rRNK koje je i mesto vezivanja aminoglikozodnih antibiotika. Na osnovu toga izneta je hipoteza po kojoj Sgm MTaza prepoznaje isti heksanukleotid prisutan na primarnoj i sekundarnoj ciljnoj RNK ovog proteina, tj. 16S rRNK i *sgm* iRNK (Kojić *et al.*, 1996). U prilog hipotezi govori i rezultat eksperimenta sa *sgm-lacZ* genskom fuzijom kod koje je deletiran skoro ceo 5'UTR, uključujući i pretpostavljenu CCGCCC regulatornu sekvencu, gde je pokazano da Sgm MTaza, sintetisana sa istog plazmida, ne reprimira aktivnost β -galaktozidaze. Ovaj rezultat je ukazivao na to da bi heksanukleotid CCGCCC mogao biti neophodan za translacionu represiju. U prilog regulaciji *sgm* gena na nivou inicijacije translacije govore i rezultati *in vivo* eksperimenata, gde je pokazana veza između ekspresije sekundarnog targeta (5'UTR *sgm* gena) i rezistencije na gentamicin u *E. coli* i *Micromonospora melanospora* (Kojić *et al.*, 2007). Povećana ekspresija 5' UTR regiona *sgm* gena, prisutnog na plazmidu pod kontrolom inducibilnog *P_{Ltl}* promotora, redukuje rezistenciju na gentamicin kod *E. coli*. Sem toga, postoji direktna korelacija između senzitivnosti ćelija na gentamicin sa nivoom indukcije *P_{Ltl}* promotora. Takođe, eksperimenti urađeni u mikromonospori su pokazali da do veće senzitivnosti ćelija na gentamicin dolazi ukoliko se 5'UTR *sgm* gena eksprimira sa jačeg promotora. Prema ovim rezultatima, višak sekundarnog targeta titrira određenu količinu Sgm proteina, dovodeći do smanjenja broja

molekula neophodnih za obezbeđivanje visokog nivoa rezistencije. Na osnovu ovoga se moglo zaključiti da je vezivanje Sgm proteina za sopstvenu iRNK, tj. sekundarni target jače od vezivanja istog proteina za 30S ribozomalnu subjedinicu, odnosno primarni target, što se kosilo sa opšte poznatim podacima.

Za KgmB MTazu iz bakterije *S. tenebrarius*, proizvođača nebramicinskog kompleksa aminoglikozida, predviđen je model negativne autoregulacije na nivou inicijacije translacije (Milojević, 1998), sličan opisanom modelu za regulaciju Sgm MTaze iz *M. zionensis* (Kojić *et al.*, 1996). Sam model je zasnovan na *in vivo* eksperimentima sa *kgmB-lacZ* genskom fuzijom gde je pokazano da KgmB MTaza, eksprimirana *in cis* ili *in trans* u odnosu na samu fuziju, drastično smanjuje njenu aktivnost. U okviru 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK nalaze se dve potencijalne regulatorne sekvence: RS' (CGCCC), 30 nt ispred RBS-a i RS (CGUCA), 8 nt ispred RBS-a (REZULTATI, slika 12a). Obe pentanukleotidne sekvence nalaze se i u A-mestu u okviru heliksa 44 na 3' kraju 16S rRNK, mestu delovanja aminoglikozida, a čak se i preklapaju (UVOD, slika 6). Eksperimentima sa različito mutiranim *kgmB-lacZ* genskim fuzijama je pokazano da je za regulaciju bitnija sekvenca CGCCC, jer mutacija sekvence CGUCA ne dovodi do gubitka autoregulacije (Vajić *et al.*, 2004). Može se zaključiti da i Sgm i KgmB MTaza prepoznaju isti motiv na sopstvenim iRNK, (C)CGGGG, čime bi se objasnila pojava da ove dve metiltransferaze mogu da regulišu jedna drugu (Milojević, 1998). Ukoliko se uzme u obzir autoregulacija važno je napomenuti da *sgm* i *kgmB* gen međusobno hibridizuju (Kojić, 1992), da stepen identičnosti na aminokiselinskom nivou između KgmB i Sgm MTaze iznosi 55.4%, kao i da postoji ukrštena reakcija anti-Sgm antitela sa KgmB MTazom (Ilić-Tomić *et al.*, 2005; Marković *et al.*, 2005).

Pojava da regulatorni proteini prepoznaju slične strukture, odnosno sekvence na sopstvenoj iRNK i na RNK sa kojom primarno interaguju uočena je kod mnogih ribozomalnih proteina, kao i enzima treonil-tRNK sintetaze, ErmC MTaze i KsgA MTaze, o čemu je više reči bilo u Uvodu. U svim navedenim slučajevima autoregulacija je moguća zahvaljujući mimikriji između iRNK za dati protein i njegovog RNK targeta, bilo da je reč o karakterističnim sekvencama ili specifičnim sekundarnim strukturama. Vezivanjem proteina za iRNK ometena je inicijacija translacije neovisno o kom tipu ciljne sekvence na

iRNK se radi, a pretpostavlja se da postoji veći afinitet ovih regulatornih proteina za vezivanje primarnih targeta, u odnosu na sekundarne.

Imajući u vidu rezultate *in vivo* eksperimenata sledeći korak u proučavanju modela za autoregulaciju *kgmB* gena je bilo njegovo testiranje u *in vitro* eksperimentima gde bi se i preciznije okarakterisao kompleks između KgmB MTaze i njenog sekundarnog targeta i ispitaio značaj potencijalnih regulatornih sekvenci, ali i sekundarne strukture u okviru koje se CGCCC pentanukleotid, po predikciji, nalazi.

Najpre je KgmB MTaza eksprimirana i prečišćena u aktivnoj formi, a potom je praćena interakcija KgmB-iRNK *in vitro* metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA metodom), gde je pokazano da se KgmB protein vezuje u 600 puta većem molarnom odnosu za iRNK (Marković, 2005; Marković *et al.*, 2005). U reakcijama kompeticije sa specifičnim i nespecifičnim kompetitorima dokazano je specifično vezivanje KgmB MTaze za sopstvenu iRNK.

Iz *in vivo* eksperimenata sa *kgmB-lacZ* genskim fuzijama izveden je zaključak da je za regulaciju ekspresije *kgmB* gena neophodno prisustvo dela uzvodnog regiona *kgmB* gena sa CGCCC i CGTCA pentanukleotidima i da je za autoregulaciju bitan CGCCC pentanukleotid, ali i da se ne može u potpunosti isključiti potencijalna uloga CGUCA pentanukleotida u fenomenu autoregulacije (Vajić, 2003). Imajući ovo u vidu, kao i rezultat eksperimenta gde je EMSA metodom dokazano specifično vezivanje KgmB MTaze za *in vitro* sintetisanu RNK koja sadrži obe wt potencijalne RS, odlučeno je da se na isti način ispita vezivanje KgmB proteina za nekoliko *kgmB* RNK proba sa ciljem da se uradi kvantitativna analiza same interakcije i pokaže razlika u vezivanju. U reakcijama je korišćen His₆-KgmB protein, pošto je prethodno pokazano da nije bilo razlike u vezivanju dve varijante KgmB proteina, sa i bez His₆ repića na N terminusu, za wt *kgmB* RNK, a takođe je metilacionim esejom potvrđeno da je ovakav protein funkcionalan kao enzim (neobjavljeni rezultati).

Potpuna karakterizacija nekog protein - RNK kompleksa podrazumeva određivanje afiniteta (preko ravnotežne konstante vezivanja datog proteina), stabilnosti kompleksa (određen konstantom brzine disocijacije) i specifičnosti vezivanja proteina (analizira se u reakcijama vezivanja sa različitim koncentracijama neobebeženog specifičnog i

nespecifičnog kompetitora). Svaki protein - RNK kompleks se nalazi u stanju ravnoteže sa određenom koncentracijom slobodnih komponenti, RNK i proteina (Setzer, 1999). U ravnoteži, raspodela komponenti između vezane i slobodne forme je određena ravnotežnom konstantom vezivanja K_d (ili konstantom afiniteta K_a , $K_a=1/K_d$). Ravnotežna konstanta vezivanja za takav kompleks se izračunava po formuli $K_d=[R][P]/[RP]$ gde je $[R]$ koncentracija RNK, a $[P]$ koncentracija proteina. Takođe, ravnotežna konstanta vezivanja se može posmatrati i kao odnos konstanti brzina disocijacije (k_{off}) i brzine asocijacije (k_{on}) protein-RNK kompleksa, $K_d=k_{off}/k_{on}$. Najpre je analizirano vezivanje His₆-KgmB proteina za mRS *kgmB* RNK probu sa mutiranim CGUCA motivom (mRS). Iz više nezavisno urađenih eksperimenata je zaključeno da optimalni molarni odnos proteina prema RNK, koji dovodi do nastanka vidljivog protein - RNK kompleksa, iznosi čak 2700:1, što je oko 4.5x više u odnosu na molarni odnos 600:1, dobijen pri analizi vezivanja His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK probu. Ovi rezultati govore u prilog tome da His₆-KgmB protein ima mali afinitet za mRS *kgmB* RNK tj. da ima malu konstantu afiniteta K_a , ili pak, ovi rezultati govore u prilog tome da je His₆-KgmB - mRS RNK kompleks nestabilan, pa ima veliku konstantu brzine disocijacije k_{off} . Na osnovu ovoga bi se moglo zaključiti da je za vezivanje His₆-KgmB proteina neophodno prisustvo CGUCA pentanukleotida. Međutim, već je odnos protein-RNK u vrednosti od 600x drastično veći u poređenju sa literaturnim podacima za druge RNK vezujuće proteine i mogao bi da ukazuje na slab afinitet vezivanja KgmB proteina za sopstvenu iRNK.

Kod bakterija nije neuobičajeno da globalni regulatori onemogućavaju inicijaciju translacije vezivanjem za 5'UTR regione gena targeta. Jedan od njih je i CsrA (*eng.* carbon storage regulation) protein iz *E. coli*, zahvaljujući čijem delovanju su reprimirani procesi kao glukoneogeneza, metabolizam glikogena, transport peptida i formiranje biofilma (Dubey *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2002; Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 1996). EMSA eksperimentima je utvrđeno da se na sličan način, tj. sličnim afinitetom ovaj protein vezuje za različite target RNK, bez obzira da li poseduju jedno (*hfq* gen), četiri (*glgC* i *cstA* geni) ili šest (*pgaA* gen) CsrA vezujućih mesta, pri čemu se vidljivi protein - RNK kompleksi formiraju već sa dodatkom svega par desetina puta više CsrA proteina u odnosu na RNK probu (Baker *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2003; Wang

et al., 2005). O drugom poznatom globalnom regulatoru, Hfq proteinu iz *E. coli*, bilo je više reči u Uvodu, ali je bitno istaći da i ovaj protein ima sposobnost autoregulacije na translacionom nivou, koja je proverena i u EMSA eksperimentima gde je pokazano da se vidljivi protein - RNK kompleks formira kada se u reakciju vezivanja doda samo duplo više proteina (Večerek *et al.*, 2005). S druge strane, pokazano je da se S1 ribozomalni protein vezuje za sopstveni 5'UTR region prisutan kod *rpsA* iRNK pri relativno visokom molarnom odnosu protein - RNK (300:1) (Boni *et al.*, 2001). Ovo je ukazivalo na nizak afinitet datog proteina za iRNK, koji bi se mogao uporediti sa vrednošću dobijenom za KgmB protein. Takođe je utvrđeno da S1 ribozomalni protein ima značajnu ulogu i u samoj inicijaciji translacije jer pokazuje visok afinitet vezivanja za jednolančane, U ili A/U bogate sekvence unutar 5'UTR regiona, koje nisu strogo konzervisane, a nalaze se na brojnim iRNK (Boni, 2006). Pokazano je i da se KsgA MTaza, sa skoro jednakim afinitetom, vezuje za svoj primarni target, tzv. kolicinski fragment sa 3' kraja 16S rRNK i sekundarni target, tj. RNK dužine 400 nt koja sadrži deo 5'UTR regiona *ksgA* gena i deo kodirajuće sekvence (van Gemen *et al.*, 1989).

Pri analizi interakcije His₆-KgmB proteina sa mRS *kgmB* RNK probom treba imati u vidu da se ne radi o apsolutnoj vrednosti molarnog odnosa, jer se His₆-KgmB protein vezuje istim afinitetom i za neobeleženi RNK molekul koji obavezno zaostaje nakon reakcije obeležavanja i ne može se detektovati. Sem toga, preračunata i dodata koncentracija proteina u svakoj reakciji vezivanja je relativna. Mada su korišćene frakcije proteina čistoće oko 95%, treba imati u vidu prisustvo kontaminirajućih proteina, kao i prisustvo neaktivnih His₆-KgmB molekula. Metilacionim esejom je pokazano da His₆-KgmB protein nakon prečišćavanja zadržava svoju enzimsku aktivnost, ali se može očekivati da će ipak jedan deo biti nektivan, što može biti posledica ili njegove denaturacije prilikom prečišćavanja ili denaturacije tokom čuvanja.

U reakcijama gde je ispitivana specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za mRS *kgmB* RNK koncentracije specifičnog (neobeležena mRS *kgmB* RNA) i nespecifičnog kompetitora (pBlue RNK) su linearno povećavane od 100 do 800x više u odnosu na obeleženu probu. Sa slike 13, u delu REZULTATI, se vidi da specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za mRS *kgmB* RNK nije potvrđena s obzirom da obe vrste

kompetitora dodate u istoj količini "hlade" šift tj. smanjuju intenzitet protein-RNK kompleksa skoro podjednako. Može se zaključiti da KgmB protein ima skoro identičan afinitet za vezivanje oba kompetitorska RNK molekula. Ovaj rezultat se razlikuje od rezultata eksperimenta sa wt *kgmB* RNK gde je potvrđena specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za dati RNK molekul, s obzirom da dodatkom istog nespecifičnog kompetitora čak i u 1200x većoj koncentraciji od obeležene RNK probe ne dolazi do smanjenja intenziteta protein-RNK kompleksa, dok specifični kompetitor (neobeležena wt *kgmB* RNK) već pri 800x većoj koncentraciji skoro potpuno "hladi" šift (Marković, 2005).

Na slici 13 se takođe može primetiti da pri "hlađenju" dolazi do razdvajanja "šifta" na dve trake, od kojih jedna ostaje približno na visini prvobitnog "šifta", dok je druga nešto viša, što je naročito izraženo u slučaju nespecifičnog kompetitora. Dve trake predstavljaju dva različita protein - RNK kompleksa. Protein - RNK kompleks koji sporije putuje mogao bi da bude posledica različitih protein - protein interakcija ili interakcija između kompleksa KgmB proteina formiranog sa obeleženom RNK probom i onog formiranog sa istim, a neobeleženim RNK molekulom.

Model translacione autoregulacije *sgm* gena je testiran istim *in vitro* metodama, kao u slučaju *kgmB* gena, i ispostavilo se da nema specifičnog vezivanja Sgm MTaze za RNK molekul koji reprezentuje deo 5'UTR regiona *sgm* gena (Ilić-Tomić, 2010). Koncentracije nespecifičnog kompetitora, identične kao koncentracije primenjene u reakcijama sa specifičnim kompetitorom, takođe dovode do slabljenja kompleksa Sgm - RNK, iako ne potpuno u istoj meri, kao kod *kgmB* gena. Na osnovu dodatnih eksperimenata je zaključeno da Sgm protein sa podjednakim afinitetom može da veže bilo koju kratku iRNK.

Nasuprot ovome, pri kompetitivnim EMSA eksperimentima, u kojima je analizirana interakcija prethodno pominjanog CsrA proteina sa 5'UTR regionom *glgC* gena, gde je protein dodavan u suvišku od čak 2000x „pokupio“ svu obeleženu RNK probu, pokazano je da je bilo dovoljno dodati samo 10x više iste, ali neobeležene RNK, da dođe do potpunog "hlađenja" šifta (Baker *et al.*, 2002).

Ilustrativan primer je formiranje nekoliko različitih protein - RNK kompleksa pri vezivanju upravo CsrA proteina, globalnog regulatora, za ciljne sekvence u okviru 5'UTR regiona različitih iRNK (Mercante *et al.*, 2009). Prvo je pokazano da se CsrA protein

vezuje za dve ciljne sekvence u okviru 5'UTR *glgC* transkripta, od kojih se jedna nalazi u ukosnici, a druga, nizvodna, se preklapa sa SD sekvencom i jednolančana je (Baker *et al.*, 2002). Tada je pretpostavljeno da, kada se po jedan molekul CsrA proteina veže za oba mesta na iRNK, nastaju teži protein - RNK kompleksi usled CsrA - CsrA interakcija, što daje karakterističan šablon traka nakon elektroforeze. Kasnije se ispostavilo da se CsrA protein za ciljne sekvence vezuje u formi dimera, da jedan dimer može da veže dva različita RNK molekula, kao i da jedan dimer može da se veže za dve ciljne sekvence na istom RNK molekulu i formira „most“, što sve doprinosi povećanju broja mogućih protein - RNK kompleksa u vidu različitih traka nakon elektroforeze (Mercante *et al.*, 2009). Pretpostavlja se da bi način na koji CsrA reguliše ekspresiju *glgC* gena mogao da predstavlja univerzalni mehanizam represije ovim proteinom. Inicijalno se CsrA protein vezuje za primarnu ciljnu sekvencu većeg afiniteta, i u slučaju *glgC* gena to je jedna od dve uzvodne (u odnosu na SD sekvencu) sekundarne strukture tipa petlje. Nakon toga bi lokalno povećanje koncentracije ovog proteina doprinelo njegovom vezivanju za ciljnu sekvencu nižeg afiniteta koja se preklapa sa SD sekvencom. Na ovaj način vezan CsrA protein blokira vezivanje ribozoma i onemogućava inicijaciju translacije. Inače, CsrA protein se vezuje za dve male nekodirajuće RNK, CsrB i CsrC (Liu *et al.*, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003), koje deluju kao njegovi antagonisti. U okviru male CsrB RNK prisutne su brojne sekundarne strukture tipa ukosnice koje podsećaju na ciljne sekvence CsrA proteina te zahvaljujući njima, kao i osobini CsrA proteina da se kao „most“ vezuje za razdvojene ciljne sekvence, formira se globularni CsrA-CsrB nukleoproteinski kompleks (Mercante *et al.*, 2009).

Zanimljivo je da je isti fenomen razdvajanja na dve trake uočen i pri "hlađenju šifra" sa wt *kgmB* RNK probom, u reakcijama sa specifičnim kompetitorom (Marković, 2005). Tada je postojanje različitih protein-RNK kompleksa objašnjeno mogućnošću da KgmB protein prepoznaje ili CGCCC pentanukleotid ili sekundarnu strukturu u okviru koje se on, po kompjuterskoj predikciji nalazi, i da se KgmB MTaza najpre vezuje za jedan od ovih motiva, što bi olakšalo vezivanje drugom KgmB molekulu za CGUCA pentanukleotid, ili se pak vazuje za nizvodni jednolančani fragment u blizini SD sekvence što bi kao krajnji rezultat dalo različite komplekse. KgmB MTaza bi mogla sterno da ometa vezivanje 30S subjedinice i sprečava dalju translaciju mehanizmom kompeticije, karakterističnim za

treonil-tRNK sintetazu, kao i za brojne ribozomalne proteine. Bez obzira što su „teži“ i „lakši“ protein-RNK kompleksi uočeni u EMSA eksperimentima sa mRS *kgmB* RNK probom, slični kompleksima koji se formiraju sa wt *kgmB* RNK probom, činjenica da se opisani fenomen zapaža samo pri "hlađenju šifta", i to sa različitim RNK molekulima, kao i izuzetno visok molarni odnos od 2700x više proteina, navode na zaključak da se na osnovu rezultata ovih eksperimenata ne može reći ništa o specifičnom vezivanju His₆-KgmB fuzionog proteina za mRS *kgmB* RNK probu kod koje je CGUCA pentanukleoid zamenjen sa GAUCC.

Sledili su eksperimenti sa mRS' *kgmB* RNK probom, kod koje ne samo da je mutirana potencijalna regulatorna sekvenca (CGCCC → AUAAA), već je narušena i sekundarna struktura u okviru koje se RS' po kompjuterskoj predikciji nalazi. Na osnovu prethodno opisanog EMSA eksperimenta sa mRS *kgmB* RNK moglo se posredno zaključiti da je upravo prisustvo CGCCC pentanukleotida ključno za pojavu autoregulacije. Najpre su određene optimalne količine His₆-KgmB proteina i mRS' *kgmB* RNK probe pri kojima dolazi do formiranja vidljivog protein-RNK kompleksa i ustanovljen je molarni odnos protein-RNK od samo 200x više proteina. U EMSA eksperimentima, u kojima je proveravana specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina, kao specifični kompetitor korišćena je neobeležena mRS' *kgmB* RNK, a nespecifični kompetitor je bio isti kao u prethodno opisanim eksperimentima (pBlue RNK). U reakcijama su količine kompetitora linearno povećavane od 25 do 200x više u odnosu na obeleženu probu. Sa slike 14a, u delu REZULTATI, se vidi da specifični kompetitor "hladi" šift gotovo potpuno, ako se doda 100x više u odnosu na obeleženu probu, dok nespecifični kompetitor nema uticaja na intenzitet protein-RNK kompleksa, čak i ako se doda u suvišku od 200 puta. Na osnovu do sada opisanih EMSA eksperimenata moglo bi se zaključiti da se KgmB protein vezuje tri puta jače za mRS' *kgmB* RNK u odnosu na wt *kgmB* RNK, a čak približno trinaest puta jače u odnosu na mRS *kgmB* RNK. Ovo bi značilo da se KgmB protein sa najvećim afinitetom vezuje za RNK molekul koji ne sadrži sekvencu i/ili strukturu čiji je značaj za pojavu autoregulacije nekoliko puta potenciran. Međutim, rezultati više puta ponovljenih, nezavisnih EMSA eksperimenata su pokazali da molarni odnos His₆-KgmB proteina i mRS' *kgmB* RNK značajno varira i ide do vrednosti od 800 (slika 14b, uzorak 3). Na istoj

slici se može uočiti i da kvalitet nezavisno prečišćavanog proteina značajno utiče na pokretljivost signala koji predstavlja pojedinačni protein-RNK kompleks. Ukoliko se približno iste količine nezavisno prečišćavanog His₆-KgmB proteina dodaju u reakcije sa mRS' *kgmB* RNK probom, mogu se dobiti teži ili lakši kompleksi, a moguće je u jednoj reakciji dobiti i dva signala (slika 14b, uzorak 4). U eksperimentu vezivanja His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* iRNK, pri povećanju koncentracije proteina iznad one koja dovodi do pojave jasnog protein-RNK kompleksa, takođe je uočeno više signala, tj. kompleksa sa razlikama u pokretljivosti. Ova pojava je tumačena kao vezivanje više molekula His₆-KgmB proteina pa su kompleksi koji sporije putuju mogli bili posledica kooperativnog vezivanja KgmB proteina za dve potencijalne regulatorne sekvence na wt *kgmB* RNK ili posledica protein-protein interakcija. Na osnovu eksperimenata umrežavanja KgmB proteina u prisustvu agensa za umrežavanje – glutaraldehida (neobjavljeni rezultati), zaključeno je da proteinski kompleksi koji se uočavaju na SDS-poliakrilamidnom gelu verovatno nastaju usled umrežavanja agregiranih KgmB proteina, a da je manje verovatno da oni odgovaraju funkcionalnim oligomerima KgmB MTaze, jer su SAM-zavisne MTaze uglavnom monomerni proteini (Schubert *et al.*, 2003). Međutim, ako se uzmu u obzir rezultati do sada opisanih EMSA eksperimenata sa različitim *kgmB* RNK probama, malo je verovatno da se His₆-KgmB protein specifično vezuje za bilo koju od pretpostavljenih regulatornih sekvanci.

U prilog poslednjem zaključku idu i rezultati EMSA eksperimenata sa $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK probom. S obzirom da ovaj RNK molekul ne sadrži ni jedan od motiva za koje je pretpostavljeno da mogu učestvovati u interakciji sa KgmB proteinom (potencijalne regulatorne sekvence RS i RS' i/ili sekundarna struktura u okviru 5'UTR na *kgmB* iRNK), formiranje protein - RNK kompleksa nije bilo očekivano i $\Delta\Delta$ *kgmB* RNA proba je trebala da posluži kao neka vrsta negativne kontrole. Nasuprot očekivanjima, detektovan je jasan signal koji predstavlja protein - RNK kompleks pri molarnom odnosu od 1000 do 2000x više proteina u odnosu na probu, a sa porastom količine dodatog proteina se zapaža i smanjenje intenziteta signala koji predstavljaju nevezanu probu (REZULTATI, slika 15a). Sledili su eksperimenti gde je analizirana specifičnost vezivanja u prisustvu specifičnog (neobeležena $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK) i nespecifičnog kompetitora (pBlue RNK) čije su

koncentracije linearno povećavane od 100 do 800x više u odnosu na obeleženu probu. Sa slike 15b se vidi da specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK probu nije potvrđena, pošto obe vrste kompetitora dodate u istoj količini "hlade" šift tj. smanjuju intenzitet protein - RNK kompleksa skoro podjednako.

U eksperimentima sa $\Delta\Delta$ *kgmB* RNK probom su takođe primećeni fenomeni prisutni i u prethodnim EMSA eksperimentima: razdvajanje "šifta" na dve trake pri hlađenju, o čemu je već bilo reči, i prisustvo više formi slobodne probe. Više različitih formi wt *kgmB* RNK probe je ranije objašnjavano mogućnošću da one predstavljaju različite konformacije koje RNK molekul zauzima u rastvoru i u nenedenaturišućem poliakrilamidnom gelu (Marković, 2005). Ovakav zaključak je podržavala kompjuterska predikcija sekundarne strukture korišćenog wt *kgmB* RNK molekula koja je dala veliki broj mogućih struktura, kao i rezultati CD spektropolarimetrije, koji su najjasnije pokazali da ovaj RNK molekul u zavisnosti od prisustva različitih katjona prelazi u različite konformacije (neobjavljeni rezultati). Moguće je da su različiti protein-RNK kompleksi, nastali vezivanjem His₆-KgmB za svaku od do sada opisanih *kgmB* RNK proba, zapravo nastali vezivanjem proteina za elektroforetski različite forme svake probe, pošto RNK vezujući proteini mogu da prepoznaju primarnu, sekundarnu i tercijarnu strukturu RNK. RNK forme koje sporije putuju kroz nativni poliakrilamidni gel bi, prema podacima iz literature, mogle biti one u kojima preovlađuje sekvenca, a ne struktura (Liu and Romeo, 1997). Pri analizi interakcije CsrA proteina sa *glgC* RNK probom eksperimentima denaturacije RNK je pokazano da se CsrA protein vezuje za sve RNK forme *glgC* transkripta, ali da umereno pokretljiva RNK forma, u kojoj je zastupljenija primarna struktura, efikasnije zadržava CsrA protein pri hlađenju. Sličan fenomen je uočen i u EMSA eksperimentima gde je ispitivana specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za različite *kgmB* RNK probe (REZULTATI, slike 13, 14a i 15b). Može se primetiti razlika pri hlađenju gde se jedna forma *kgmB* RNK probe oslobađa više u odnosu na drugu. To bi značilo da postoji i razlika u afinitetu KgmB proteina prema različitim formama.

Kao dobar primer gde RNK vezujući protein pokazuje razliku u afinitetu prema različitim konformacijama ciljne RNK, može da posluži mehanizam represije translacije a operona ribozomalnim proteinom S4 iz *E. coli* (Schlax *et al.*, 2001). Postoje dve

elektroforetski različite konformacije 5' dela iRNK α operona, ali protein S4 se vezuje samo za jednu, koja je nazvana neaktivnom, jer vezan za nju dovodi do zarobljavanja 30S subjedinice. Nasuprot tome, 30S subjedinica može da se veže za obe ove RNK forme u odsustvu S4 proteina. Zaključeno je da S4 kao alosterni efektor dovodi do pomeranja ravnoteže od aktivne ka formi neaktivnoj za formiranje produktivnog inicijacionog kompleksa. U skladu sa ovim načinom regulacije, moglo bi se diskutovati o mogućnosti postojanja više formi različitih *kgmB* RNK proba koje zauzimaju stabilne konformacije sa razlikom u potencijalu za vezivanje KgmB MTaze, a samim tim i ulogom u regulaciji. Kako u svim do sada opisanim EMSA eksperimentima dodatkom His₆-KgmB proteina u reakcijama vezivanja nastaje jedan definisan kompleks, moguće je da različite konformacije RNK, usled indukovano prilagodavanja prelaze u istu vezanu konformaciju.

Razlog za veliki broj različitih konformacija *kgmB* RNK probe bi prvenstveno mogla biti njegoja veličina. Za analizu protein - RNK interakcija najbolje je izabrati RNK fragment minimalne veličine koji će zadržati karakteristike bitne za datu analizu. Transkript od 114 molekula pored toga što ne odgovara pravom *kgmB* transkriptu (Holmes and Cundliffe, 1991), jer je duži na 5' kraju za 24 nt, svojom dužinom omogućava formiranje velikog broja sekundarnih struktura inače G+C bogatog fragmenta.

Međutim, neopohodno je reći i da postoji mogućnost da svi RNK molekuli u slobodnoj probi zapravo nisu iste dužine. Pri analizi produkata *in vitro* transkripcije na denaturišućem poliakrilamidnom gelu je uočen dominantan signal koji odgovara očekivanoj dužini produkta, ali su bili prisutni i kraći RNK molekuli. Ovo je mogla biti npr. posledica prerane terminacije tokom *in vitro* transkripcije koja se dešava zbog formiranja različitih sekundarnih struktura, „lažnih“ terminatora, čemu ide u prilog kompjuterska predikcija velikog broja različitih sekundarnih struktura unutar svih *kgmB* RNK proba dužine 114 nt. Produkti *in vitro* transkripcije očekivane dužine su eluirani iz denaturišućeg poliakrilamidnog gela, nakon čega je sledila defosforilacija i radioaktivno obeležavanje RNK proba, ali su pri ponovljenoj analizi svake ove RNK probe na denaturišućem gelu opet uočene kraće RNK (rezultati nisu prikazani).

S obzirom da se svi prethodno diskutovani fenomeni zapažaju pri analizi vezivanja His₆-KgmB proteina za različite *kgmB* RNK probe, jasno je da se na osnovu njih ne može

bilo šta zaključiti o specifičnom vezivanju za svaku od njih pojedinačno. Nedvosmisleno je pokazano da se His₆-KgmB protein, prisutan u suvišku od 600 do 2700x u odnosu na RNK probu, sa podjednakom efikasnošću vezuje za sve analizirane RNK, bez obzira da li su motivi sa potencijalnom ulogom u vezivanju KgmB proteina prisutni ili ne. Ovaj zaključak je dodatno potkrepljen i rezultatima EMSA eksperimenata koji ovde nisu prikazani, a koji su pokazali da se His₆-KgmB fuzioni protein vezuje na sličan način kako za *sgm* RNK (5'UTR *sgm* gena), tako i za PKS RNK (sintetisana sa plazmida koji nosi deo sekvence za poliketid sintazu poreklom iz *Streptomyces durmitorensis*). Važno je naglasiti i da je prvobitna namena prethodno opisanih EMSA eksperimenata bila, pored kvalitativnog detektovanja protein - RNK kompleksa, i kvantitativna analiza protein - RNK interakcija, odnosno određivanje konstante disocijacije proteina. Međutim, da bi ovo bilo moguće, niti radioaktivno obeležena RNK proba, niti protein - RNK kompleks ne smeju da pokazuju heterogenost u veličini i strukturi, što ovde nije bio slučaj.

Pomoću EMSA eksperimenata je dalje analizirana interakcija između His₆-KgmB proteina i dve kraće *kgmB* RNK probe. Obe probe su na svom 5' kraju sadržale samo 6 nt koji su bili neophodni za njihovu efikasnu *in vitro* sintezu, a ne 24 nt kao *kgmB* RNK probe dužine 114 nt, dok je preostali deo obe probe obuhvatao region koji pripada pravom *kgmB* transkriptu (Holmes and Cundliffe, 1991). Obe probe su po kompjuterskoj predikciji zauzimale samo jednu sekundarnu strukturu tipa ukosnice, a proba dužine 39 nt je sadržala samo RS' potencijalnu regulatornu sekvencu, dok je proba dužine 61 nt sadržala obe potencijalne regulatorne sekvence (REZULTATI, slika 16). Pokazana je značajna razlika u afinitetu His₆-KgmB proteina za dve kratke RNK probe i zaključeno je da se His₆-KgmB protein za probu dužine 39 nt ne vezuje, dok se pri molarnom odnosu od oko 500x više His₆-KgmB proteina zapaža jedan diskretan signal koji predstavlja protein - RNK kompleks, u reakcijama sa 61 nt *kgmB* RNK probom. Međutim, specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za 61 nt *kgmB* RNK probu nije potvrđena, s obzirom da i neobeležena *kgmB* RNK proba dužine 61 nt kao specifični kompetitor i pBlue RNK adekvatne dužine kao nespecifični kompetitor, dodate u istoj količini, "hlade šift", tj. smanjuju intenzitet protein-RNK kompleksa skoro podjednako (REZULTATI, slika 16c). I u ovom slučaju je zapaženo više formi slobodne probe, kao kod svih *kgmB* RNK proba

dužine 114 nt, ali je ovaj put po intenzitetu ubedljivo dominirao samo jedan signal. Rezultat EMSA eksperimenta sa kratkim *kgmB* RNK probama je samo potvrdio da se His₆-KgmB protein sa podjednakom efikasnošću vezuje za bilo koji RNK molekul.

Podatak da se KgmB protein nespecifično vezuje za bilo koji RNK molekul se kosi sa rezultatima *in vivo* eksperimenata koji su nedvosmisleno ukazali na postojanje negativne autoregulacije *kgmB* gena na nivou translacije (Vajić *et al.*, 2004). Postojala je mogućnost da će se specifičnost vezivanja KgmB MTaze povećati ukoliko se u reakcije doda njen kofaktor, S-adenozil-metionin. S obzirom da KgmB MTaza ima sposobnost autoregulacije jasno je da u sebi ima objedinjene dve funkcije – katalitičku i regulatornu. Katalitička funkcija je odgovorna za karakterističan profil rezistencije na aminoglikozide i ostvaruje se specifičnom metilacijom mesta vezivanja ovih antibiotika na 16S rRNK. Pod regulatornom funkcijom KgmB MTaze se podrazumeva njena osobina da sprečava sopstvenu translaciju specifičnim vezivanjem MTaze za regulatorni region na *kgmB* iRNK. Do sada je 3D struktura u kompleksu sa SAM i SAH kofaktorima određena samo za Sgm MTazu, jedinu od G1405 16S rRNK MTaza poreklom iz bakterija proizvođača antibiotika (Husain *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2009). Ispostavilo se da je u saglasnosti sa ranijim kompjuterskim predikcijama tercijarne strukture ovog proteina (Maravić-Vlahoviček *et al.*, 2008). Aktivno mesto, locirano u C-terminusu koji interaguje sa SAM i SAH, poprima „Rossmann-fold“ strukturu tipičnu za klasu I metiltransferaza i sastoji se od centralne sedmolančane β ploče koju okružuju tri α heliksa sa svake strane. Iako za KgmB MTazu još nije određena 3D struktura, modelovanje KgmB MTaze pomoću različitih kompjuterskih programa je rađeno u više navrata (Bujnicki and Rychlewski, 2001; Marković, 2005). Po svim predikcijama ovaj protein bi takođe spadao među SAM-zavisne MTaze klase I. Za prepoznavanje ciljane RNK odgovoran bi bio N-terminalni region, koji se odlikuje prisustvom α-heliksa, dok bi SAM-vezujući, C-terminalni domen imao formu β-pločice od više β-lanaca (pet ili šest, zavisi od modela). Na osnovu podataka iz literature bi se moglo zaključiti da bi KgmB MTaza mogla da prepoznaje sekundarne strukture tipa dvolančanog RNK heliksa A forme, što važi u slučaju proteina kod kojih su RNK-vezujući domeni sastavljeni od α-heliksa (Draper, 1999). Logično je pretpostaviti da vezivanje SAM-a može da dovede do određene konformacione promene KgmB MTaze, zahvaljujući kojoj bi se povećala specifičnost ovog

proteina za *kgmB* RNK. Da bi se ispitao potencijalni uticaj SAM-a, kofaktora KgmB MTaze, na specifičnost vezivanja His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK dužine 114 nt (Marković, 2005), urađeni su EMSA eksperimenti gde je SAM dodavan u reakcije vezivanja u finalnoj koncentraciji od 1mM. Količina His₆-KgmB proteina u reakciji je varirana od 500x do 5000x više u odnosu na RNK probu, ali jasno definisan "šift", kao u slučaju ranije urađenog EMSA eksperimenta (Marković, 2005), nije pokazan, bez obzira da li je SAM prisutan ili ne. Na osnovu ovog eksperimenta se može zaključiti da prisustvo SAM-a nema uticaja na povećanje specifičnosti vezivanja His₆-KgmB proteina za wt *kgmB* RNK.

Postoji mogućnost da se u ćeliji nalazi neki faktor koji bi eventualno mogao da utiče na specifičnost vezivanja KgmB MTaze za sopstvenu iRNK, a što u svim prethodnim *in vitro* eksperimentima nedostaje. Da bi se proverila ova pretpostavka urađeni su EMSA eksperimenti u kojima je, umesto His₆-KgmB fuzionog proteina, korišćena S30 frakcija kulture iz koje je prečišćavan ovaj protein, dok je wt *kgmB* RNK korišćena kao proba (REZULTATI, slika 18). Međutim, ni u ovom EMSA eksperimentu, kao ni u analognim eksperimentima bilo sa ćelijskim ekstraktom, bilo sa sa S100 frakcijom kulture iz koje je prečišćavan His₆-KgmB fuzioni protein, nije detektovano značajnije zaostajanje probe, tj. šift koji bi odgovarao očekivanom kompleksu.

Paralelno EMSA eksperimentima rađen je dvostruki „filter binding“ esej sa nekim *kgmB* RNK probama u cilju kvantitativne analize protein-RNK interakcije. Rezultat eseja sa wt *kgmB* RNK probom dužine 114 nt, koji je prikazan na slici 19, u delu REZULTATI, kao i rezultati analognih „filter binding“ eseja sa drugim *kgmB* RNK probama, koji nisu prikazani, nisu se bitno razlikovali od rezultata prethodno opisanih EMSA eksperimenata. Značajnije zaostajanje *kgmB* RNK probe u kompleksu sa His₆-KgmB proteinom nije detektovano niti u jednom slučaju.

Ukoliko se sumiraju rezultati svih EMSA eksperimenata, kao i „filter binding“ eseja, rađenih sa različitim *kgmB* RNK probama, jasno je da ne idu u prilog hipotezi po kojoj vezivanje KgmB proteina za sekvencu i/ili sekundarnu strukturu u okviru 5'UTR regiona *kgmB* gena, omogućava ovom proteinu da reprimira sopstvenu ekspresiju. Naravno,

ne treba isključiti ni mogućnost da ove metode nisu dovoljno osetljive za dokazivanje iznete hipoteze.

Sama hipoteza podrazumeva da KgmB MTaza reprimira translaciju u fazi inicijacije i da postoji kompeticija između represora, tj. KgmB proteina i 30S ribozomalnih subjedinica, za vezivanje za ciljno mesto (primarna ili sekundarna struktura) u 5'UTR regionu unutar *kgmB* iRNK, koje se nalazi u blizini mesta vezivanja ribozoma. S obzirom na iznete pretpostavke sledeći logičan korak u testiranju hipoteze o autoregulaciji *kgmB* gena je bila „toeprint“ metoda. Na osnovu „toeprint“ signala moguće je precizno odrediti poziciju vezane 30S ribozomalne subjedinice, a i dokazati kompetitivni mehanizam represije ukoliko, usled vezivanja KgmB MTaze za specifične motive u okviru 5'UTR na *kgmB* iRNK, dođe do slabljenja „toeprint“ signala. Vezivanje 30S ribozomalne subjedinice je praćeno u „toeprint“ eksperimentu sa wt *kgmB* RNK dužine 305 nt, a paralelno je rađen i kontrolni eksperiment sa *PI-sgm* RNK na već opisan način (Ilić-Tomić, 2010). U slučaju kada se reakcija vezivanja 30S ribozomalne subjedinice odvijala na 37°C kod wt *kgmB* RNK su detektovani nespecifični signali, ali ne i očekivani „toeprint“ signal, za razliku od *PI-sgm* RNK gde je dobijen očekivani +16 „toeprint“ signal (REZULTATI, slika 20). Zanimljivo je što se u ovom slučaju prvi put uočava jasna razlika u rezultatu eksperimenta rađenog na isti način, a na dva gena za 16S rRNK MTaze, *sgm* i *kgmB*. Do sada je više puta povlačena paralela između ovih proteina koji sem što modifikuju isti nukleozid u okviru 16S rRNK (G1405), dele i bitne strukturne karakteristike, što je potvrđeno unakrsnom reakcijom anti-Sgm antitela sa KgmB MTazom (Ilić-Tomić *et al.*, 2005; Marković *et al.*, 2005). Na osnovu *in vivo* eksperimenata sa *kgmB-lacZ* i *sgm-lacZ* genskim fuzijama izveden je zaključak da je ekspresija ova dva gena regulisana na sličan način, što je opet potkrepljeno činjenicom da KgmB i Sgm MTaza mogu da regulišu jedna drugu (Milojević, 1998; Vajić *et al.*, 2004). Za ovaj fenomen bi bila odgovorna sekvenca (C)CGCCC iz 5'UTR regiona oba gena i/ili sekundarna struktura tipa ukosnice unutar koje se ona nalazi. Postoji bitna razlika između dve RNK sa kojima je rađen „toeprint“ esej, pošto *PI-sgm* RNK ima dužinu 159 nt, a wt *kgmB* RNK je dužine 305 nt. Možda je kod wt *kgmB* RNK SD sekvenca blokirana unutar neke nespecifične sekundarne strukture, a za očekivati je da G+C bogat fragment ove dužine zaista formira veliki broj sekundarnih struktura.

Jedino u slučaju kada je 30S ribozomalna subjedinica inkubirana sa wt *kgmB* RNK 45 minuta na sobnoj temperaturi, dobijen je „toeprint“ signal dosta slabog intenziteta na očekivanoj poziciji +16/17 u odnosu na ATG (REZULTATI, slika 21). Uticaj His₆-KgmB proteina na inicijaciju translacije *kgmB* gena je ispitivan u „toeprint“ eseju sa wt *kgmB* RNK preinkubiranom u molarnom suvišku proteina od 2300x. Došlo je do značajnog smanjenja „toeprint“ signala (slika 21, kolona 4) što ide u prilog hipotezi o translacionoj autoregulaciji *kgmB* gena. Međutim, pošto je molarni odnos protein - RNK i u ovom slučaju, kao i kod EMSA eseja, ekstremno visok u poređenju sa primerima iz literature, jedino što se može pouzdano zaključiti je da ne postoji visok afinitet vezivanja proteina za ponuđenu RNK.

U više navrata je bilo reči o Hfq proteinu, globalnom regulatoru, čija je ekspresija regulisana na translacionom nivou. Pomoću „toeprint“ metode je direktno pokazano da ovaj protein inhibira formiranje aktivnog inicijatorskog kompleksa na sopstvenoj iRNK time što sprečava vezivanje ribozoma (Večerek *et al.*, 2005). Ukoliko u reakciji Hfq proteina ima samo 20x više u odnosu na iRNK, intenzitet „toeprint“ signala, koji odgovara ternarnom kompleksu 30S - iRNK - tRNK^{fmet} i iznosi +15 u odnosu na A iz AUG start kodona, dramatično opada. Pošto je ekspresija *hfq* gena regulisana na translacionom novou pomoću CsrA proteina, istim tipom eksperimenta je pokazano da ukoliko se *hfq* iRNK inkubira sa samo 8x više CsrA proteina, pre vezivanja 30S ribozomalne subjedinice, dolazi do potpunog gubljenja signala koji odgovara ternarnom kompleksu 30S - iRNK - tRNK^{fmet} (+15 u odnosu na A iz AUG start kodona) (Baker *et al.*, 2007). Poznato je da stabilne sekundarne strukture, koje se formiraju unutar analizirane RNK, mogu da zaustave reverznu transkripciju, što kao rezultat daje „toeprint“ signal u kontrolnoj „primer extension“ reakciji. Ovakav fenomen je uočen i pri analizi vezivanja CsrA proteina za *hfq* iRNK. U reakcijama gde je dodavan samo CsrA protein zapaženo je da se intenzitet „toeprint“ signala koji odgovaraju i inače prisutnim sekundarnim strukturama pojačava, tj. da CsrA protein dodatno stabilizuje date sekundarne strukture.

Kada je wt *kgmB* RNK preinkubirana sa His₆-KgmB fuzionim proteinom uočeni su i „toeprint“ signali na pozicijama +10, -23 i -40 u odnosu na ATG. To bi značilo da His₆-KgmB protein zaista interaguje sa wt *kgmB* RNK na način koji remeti sintezu cDNK i

uzrokuje pojavu opisanih signala, ali prava priroda ove interakcije za sada ostaje nepoznata. Poziciju -40 i osnovu kompjuterski generisane ukosnice u okviru koje se nalazi CGCCC pentanukleotid razdvajaju svega dva nukleotida. Da je isti signal, znatno slabijeg intenziteta, prisutan i u kontrolnoj „primer extension“ reakciji, moglo bi se pretpostaviti da His₆-KgmB protein, slično CsrA proteinu, dodatno stabilizuje prisutnu sekundarnu strukturu, a ovako, poreklo tog „toeprint“ signala ostaje nerazjašnjeno. Na slici 21, u delu REZULTATI, se može uočiti još jedan „toeprint“ signal na poziciji +7 u odnosu na ATG u reakcijama gde su dodavane 30S ribozomalne subjedinice, koji nije bilo moguće adekvatno objasniti. Njegovo postojanje još više dovodi u pitanje validnost opisanog „toeprint“ signala na poziciji +16/17 u odnosu na ATG. Postavlja se pitanje da li ovaj signal zaista odgovara granici vezane 30S ribozomalne subjedinice, naročito u poređenju sa ubedljivim „toeprint“ signalom na *PI-sgm* RNK.

Na osnovu „toeprint“ eseja moguće je zaključiti još i po kom mehanizmu represije translacije, kompetitivnom ili mehanizmom klopke, je neki gen regulisan. Mehanizam kompeticije ili „izmeštanja“ je u literaturi opisan na primeru većeg broja gena za ribozomalne proteine kao i kod gena za treonil sintetazu *E. coli*, o čemu je već bilo reči u uvodnom delu. Sve navedene primere karakteriše postojanje kompleksnih sekundarnih struktura u 5'UTR regionu koje prepoznaje i za koje se vezuje protein represor. Često se prepoznavanje regulatornih struktura u sopstvenoj iRNK od strane represora, odvija slično prepoznavanju primarnog targeta, tj. zahvaljujući molekularnoj mimikriji dva targeta. Kod L20 ribozomalnog proteina, kao i kod većine gena za ribozomalne proteine, molekularna mimikrija se ogleda u postojanju sekundarnih struktura unutar iRNK koje oponašaju sekundarne strukture u rRNK, primarnom targetu ribozomalnih proteina (Guillier *et al.*, 2005). Pošto S1 ribozomalni protein u formiranju ribozoma učestvuje preko protein - protein interakcija, a ne vezivanjem primarno za 16 i 23S rRNK, bitno se razlikuje od većine ribozomalnih proteina. Međutim, i S1 protein je sposoban da prepozna sopstvenu iRNK, među ostalim iRNK, i reprimira sopstvenu sintezu na nivou inicijacije translacije (Boni *et al.*, 2001). Eksperimentalno je pokazano da S1 protein, prisutan u suvišku od oko 20x u odnosu na sopstvenu iRNK, onemogućava formiranje 30S - *rpsA* iRNK - tRNK^{fmet} ternarnog kompleksa, tj. dovodi do slabljenja „toeprint“ signala. U slučaju treonil-tRNK

sintetaze, postoji izražena mimikrija dva targeta pošto dva domena u 5'UTR iRNK imitiraju antikodon ručicu tRNK^{thr} za koje se vezuje treonil-tRNK sintetaza kao homodimer, čime je onemogućen pristup 30S subjedini i inicijacija translacije (Springer *et al.*, 1998). Ovaj jednostavni mehanizam kompeticije između proteina i ribozomalne subjedini je takode eksperimentalno potvrđen „toeprint“ esejom, gde ThrRS, sprečava formiranje čak i binarnog kompleksa 30S - iRNK, a ne samo ternarnog kompleksa 30S - iRNK - tRNK^{fmet}.

Pretpostavljena regulatorna sekvenca (C)CGCCC, koja se nalazi u 5'UTR regionu *kgmB* gena 30 nt uzvodno od RBS sekvence i 5'UTR regionu *sgm* gena 14 nt uzvodno od RBS sekvence, u oba slučaja je, po kompjuterskoj predikciji, locirana u okviru sekundarne strukture u vidu ukosnice. Ista sekvenca je prisutna i u konzervisanom A mestu u okviru 16S rRNK, koje je primarni target za obe MTaze. Poređenjem ovog konzervisanog regiona sa 5'UTR regionima oba gena, uočen je izvestan stepen sličnosti na nivou sekundarne strukture, tako da bi hipoteza o molekularnoj mimikriji mogla biti primenjena i kod KgmB i Sgm MTaza. Međutim, ukoliko se osvrnemo na rezultat prethodno opisanog „toeprint“ eseja u prisustvu His₆-KgmB proteina, kao i na rezultat analognog eksperimenta sa Sgm MTazom (Ilić-Tomić, 2010), jasno je da hipoteza o autoregulaciji ovih MTaza zahvaljujući molekularnoj mimikriji primarnog i sekundarnog targeta, nema eksperimentalnu potvrdu.

Kod proteina koji regulišu gensku ekspresiju „mehanizmom klopke“, o čemu je više bilo reči u uvodnom delu, represor ne sprečava vezivanje ribozoma direktno. Ribozomalni proteini S4 i S15, vrše represiju inicijacije translacije tako što na sopstvenoj iRNK „zarobljavaju“ 30S ribozomalne subjedini. Same 30S subjedini mogu da vežu kako aktivnu iRNK, tako i neaktivnu formu iRNK, dok se regulatorni proteini vezuju samo za neaktivnu formu na kojoj je prisutna sekundarna struktura u vidu pseudočvora (Philippe *et al.*, 1993; Schlx *et al.*, 2001). Eksperimentalno je pokazano da se na iRNK za S15 ribozomalni protein, sem očekivanog “toeprint” signala na poziciji +17, koji odgovara ternarnom kompleksu, detektuje i signal na poziciji + 10 u odnosu na ATG start kodon, koji odgovara binarnom kompleksu i predstavlja 3' kraj pseudočvora, čije prisustvo je neophodno za vezivanje ribozoma. Pokazano je i da S15 stabilizuje binarni 30S - iRNK

kompleks, a da se u prisustvu rastuće količine ovog proteina signal koji odgovara ternarnom kompleksu progresivno smanjuje, dok intenzitet signala koji odgovara binarnom kompleksu raste. Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da S15 protein sprečava formiranje funkcionalnog ternarnog kompleksa 30S - iRNK - tRNK^{fmet} tako što zarobi ribosome unutar preinicijacionog kompleksa. "Toeprint" eseji su i kod S4 ribozomalnog proteina pokazali da binarni 30S-iRNK kompleks zaustavlja reverznu transkriptazu, blizu 3' kraja pseudočvora, verovatno stabilizacijom same sekundarne strukture (Spedding *et al.*, 1993).

Prema našim eksperimentalnim podacima, *kgmB* iRNK nije prisutna u dve alternativne konformacije, niti KgmB MTaza deluje tako što blokira tranziciju preinicijacionog binarnog kompleksa u aktivni inicijacioni ternarni kompleks, što važi i za Sgm MTazu (Ilić-Tomić, 2010). Nije bilo moguće detektovati, kao u slučaju S4 i S15 ribozomalnih proteina, signal koji bi odgovarao binarnom kompleksu 30S - iRNK, pod različitim eksperimentalnim uslovima (rezultati nisu prikazani). Iako je po kompjuterskoj predikciji u 5'UTR regionu *kgmB* iRNK prisutna stabilna sekundarna struktura, rezultati „toeprint“ eksperimenata ne govore u prilog tome da 30S ribozomalna subjedinica stabilizuje tu sekundarnu strukturu. Na slici 21, u delu REZULTATI, se zaista može uočiti još jedan „toeprint“ signal na poziciji +7 u odnosu na ATG u reakcijama, ali ovde se ne radi o binarnom 30S - iRNK kompleksu, pošto je u reakciji bila prisutna i tRNK^{fMet}. Uočava se i prisustvo više signala koji bi mogli da nastanu usled spadanja MMLV reverzne transkriptaze sa iRNK nakon nailaska na sekundarne strukture, a jedan od njih bi mogao da potiče od sekundarne strukture koja odgovara kompjuterskoj predikciji (signal u nivou RS', slika 21). Međutim, isti signali su primećeni i u kontrolnoj reakciji „primer extension“, gde nisu dodate 30S subjedinice. Polazna osnova za hipotezu o autoregulaciji ekspresije *kgmB* gena bila je pretpostavka da je mali broj molekula ovog enzima dovoljan da modifikuje primarni terget, 16S rRNK, i potom blokira sopstvenu sintezu u fazi inicijacije translacije. Bez obzira da li se za objašnjenje represije na nivou inicijacije translacije koristi termodinamički ili kinetički pristup, kod kojih postoji razlika u pretpostavci da li se izomerizacija neaktivnog u aktivni inicijatorski kompleks postiže brzo ili ne, oba su saglasna da je u slučaju inhibicije translacije preko mehanizma klopke potrebna niža

koncentracija represora, u poređenju sa mehanizmom kompeticije, da bi se postigao isti efekat (Schlax and Worhunsy, 2003). Zbog toga bi se možda moglo očekivati da KgmB MTaza inhibira sopstvenu translaciju preko mehanizma klopke, ali kako prethodno opisani „toeprint“ eksperimenti nisu nedvosmisleno pokazali da KgmB MTaza inhibira sopstvenu ekspresiju na nivou inicijacije translacije, nema ni osnove za procenu mogućeg mehanizma represije.

Obično se pri analizi interakcije RNK vezujućih proteina i njihovih targeta rade ili hemijski „footprint“ eksperimenti, ili „footprint“ eksperimenti koji se izvode pomoću različitih RNaza, sa ciljem da se precizno mapira mesto vezivanja proteina. Tako su dva mesta vezivanja Hfq proteina na *hfq* iRNK definisana pomoću hemijskog „footprint“ eksperimenta hidrosilnim radikalima (Večerek *et al.*, 2005), a više mesta na *cstA* iRNK za koja se vezuje CsrA protein mapirano je „footprint“ eksperimentom sa RNazom T1, RNazom T2 i RNazom A (Dubey *et al.*, 2003). Mogućnost da se His₆-KgmB fuzioni protein vezuje za *in vitro* sintetisanu wt *kgmB* RNK dužine 305 nt testirana je u „footprint“ eksperimentu sa RNazom T1. Analiza rezultata ovog eksperimenta nije ukazala na postojanje zaštićenih regiona na wt *kgmB* RNK. Blago slabljenje intenziteta svih signala pri inkubaciji sa rastućom koncentracijom His₆-KgmB proteina pripisano je kontaminaciji nekom od RNaza, koja se verovatno desila tokom prečišćavanja His₆-KgmB proteina. Može se zaključiti da se His₆-KgmB protein ne vezuje za testiranu RNK, što je u skladu sa prethodno analiziranim rezultatima EMSA i „toeprint“ eksperimenata.

Hipoteza o autoregulaciji *kgmB* gena na translacionom nivou ne isključuje mogućnost da bi motiv koji KgmB MTaza prepoznaje mogla biti i sekundarna struktura, po kompjuterskoj predikciji prisutna u okviru 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK. Da li ova sekundarna struktura zaista postoji, moguće je bilo utvrditi samo u eksperimentima mapiranja strukture 5' kraja *kgmB* iRNK pomoću različitih RNaza. Izabrane su tri endonukleaze koje specifično seku jednolančane RNK molekule posle određenih nukleotida (RNaza T1, RNaza A i RNaza CL3) i RNaza V1 koja seče dvolančanu RNK. Za analizu produkata korišćena su dva pristupa. U prvom slučaju su analizirani produkti reverzne transkripcije sa RNK fragmenata nastalih parcijalnom digestijom različitim RNazama (slika 23, REZULTATI), a u drugom slučaju su direktno analizirani produkti

parcijalne digestije (slika 24, REZULTATI). Na osnovu sumiranih rezultata ovih eksperimenata može se zaključiti da su minimalni region za otpočinjanje translacije (deo RNK molekula sa RBS-om i AUG start kodonom), i deo 5'UTR regiona *kgmB* gena koji obuhvata potencijalnu regulatornu sekvencu RS u linearnoj formi, što je u skladu sa kompjuterskom predikcijom. Značajno odstupanje se uočava u regionu koji je po kompjuterskoj predikciji dvolančan, s obzirom na postojanje ubedljivih signala koji odgovaraju mestima sečenja sa sve tri RNaze, specifične za jednolančane regione unutar RNK. Još jedna potvrda da ovaj region zapravo ima jednolančanu formu je i odsustvo digestije sa RNazom V1. Na osnovu ovoga se može zaključiti da postojanje kompjuterski generisane sekundarne strukture unutar 5'UTR regiona *kgmB* gena, prikazane na slici 12a, nije dokazano. Međutim, važno je napomenuti i da u uzvodnom regionu u odnosu na RS regulatornu sekvencu, nije dobijen uniformni raspored mesta sečenja RNazama, što je bilo za očekivati ukoliko je on u jednolančanoj formi, tj. da je prisutan neočekivano mali broj mesta sečenja sa bilo kojom od navedenih RNaza (slika 24b). Pregled literature je pokazao da se obično za precizno mapiranje sekundarnih struktura kombinuju dva pristupa, tj. da se koriste enzimatsko i hemijsko mapiranje, a njihovi rezultati kombinuju. Taj princip je upotrebljen i kod mapiranja struktuiranog 5'UTR regiona na *rpsO* iRNK, gde su istom metodom pokazane i razlike između dve alternativne konformacije ovog regiona, jedne koja sadrži dve ukosnice i druge, kod koje je prisutan pseudočvor neophodan za vezivanje S15 ribozomalnog proteina (Philippe *et al.*, 1995). Enzimatsko i hemijsko mapiranje je korišćeno i u slučaju vrlo preciznog određivanja sekundarnih struktura kod regulatorne male RNK MicA, zatim 5'UTR regiona unutar *ompA*, njene ciljne RNK, kao i kompleksa koji se formira između ove dve RNK (Udekwu *et al.*, 2005). Možda bi pre donošenja konačnog zaključka o prisustvu sekundarnih struktura unutar 5'UTR regiona *kgmB* gena trebalo uraditi i hemijsko mapiranje ovog regiona i dobijene rezultate uporediti sa prethodno opisanim eksperimentima enzimatskog mapiranja.

S obzirom na više puta pominjanu i višestruko potvrđenu analogiju u ponašanju između *KgmB* i *Sgm* MTaze, bilo je interesantno testirati postojanje sekundarne strukture u okviru 5'UTR regiona unutar *sgm* iRNK. Ovaj eksperiment je urađen po istom principu kao i u slučaju *kgmB* iRNK, ali je krajnji rezultat eksperimenta bio drugačiji. I u ovom slučaju

su minimalni region za otpočinjanje translacije (deo RNK molekula sa RBS-om i AUG start kodonom) i početak kodirajuće sekvence u linearnoj formi, slično kao kod *kgmB* iRNK. Međutim, odsustvo sečenja sa RNazama specifičnim za jednolančane regione, u delu *sgm* RNK koji je po kompjuterskoj predikciji dvolančan, kao i prisustvo signala koji odgovaraju sečenju sa RNazom V1 u istom regionu, svakako idu u prilog zaključku da kompjuterski generisana sekundarna struktura zaista postoji. Mora se reći da postoje i kontradiktorni signali koji odgovaraju mestima sečenja RNazom T1, a koji se ne očekuju ako je zaista sekundarna struktura prisutna (REZULTATI, slika 25a, uokvireni deo). Njihovo postojanje je objašnjeno nestabilnošću same sekundarne structure usled G - U sparivanja i prisustva nesparenih G nukleotida (REZULTATI, slika 12b). Rezultati više ponovljenih, a na sličan način izvedenih eksperimenata mapiranja, idu u prilog zaključku da sekundarna struktura u okviru 5'UTR na *sgm* iRNK zaista postoji. Međutim, važno je napomenuti i da u regionu koji odgovara petlji na kompjuterski generisanoj sekundarnoj strukturi tipa ukosnice nismo dobili uniformni raspored mesta sečenja različitim RNazama, kao kod dela 5'UTR regiona *kgmB* gena. Moguće objašnjenje se nalazi u nesavršenosti same tehnike kojom se eksperiment mapiranja RNazama izvodi. Naime, neophodno je vrlo precizno podesiti uslove za parcijalnu digestiju RNazama, da ne bi došlo do potpune nespecifične degradacije analizirane RNK, a da bi se postiglo specifično sečenje iza svakog nukleotida. Verovatno je rešenje u ponavljanju eksperimenta mapiranja sekundarnih struktura unutar 5'UTR regiona *kgmB* i *sgm* gena, uz variranje uslova i možda uz upotrebu *in vitro* sintetisanih RNK različite dužine koje sadrže 5'UTR regione ovih gena.

Krajnji rezultati mapiranja sekundarnih struktura unutar 5'UTR regiona *kgmB* i *sgm* gena još jednom su doveli u pitanje analogiju između ovih gena, koja je više puta potvrđivana u *in vivo* i *in vitro* sistemima, ali i opovrgnuta u „toeprint“ eksperimentu.

5'UTR region *kgmB* gena je bio testiran i *in silico*, pomoću programa www.RiboSW.com, a sa ciljem da se utvrdi eventualno prisustvo nekog SAM ili SAH vezujućeg ribosviča. U uvodnom delu je bilo više reči o inhibiciji translacije preko *cis* regulatornih elemenata, tj. ribosvičeva, gde SAM/SAH ligandi obično svojim vezivanjem stabilizuju sekundarne strukture tipa ukosnice u kojima je zarobljena SD sekvenca, a krajnji efekat je sprečavanje vezivanja ribozoma i inicijacija translacije. Pošto u različitim *in vitro*

eksperimentima nije potvrđeno da se KgmB MTaza zaista vezuje za 5'UTR region *kgmB* gena, što je bila osnova hipoteze o autoregulaciji, postavljene na osnovu *in vivo* analiza, postojala je mogućnost da SAM, kofaktor ovog enzima, ima regulatornu ulogu. Pretraživanjem sekvence 5'UTR regiona *kgmB* gena za prisustvo ribosviča, nije pronađena ni jedna od poznatih klasa ribosvičeva za SAM, što je u skladu sa rezultatima iste analize urađene za 5'UTR region *sgm* gena (Ilić-Tomić, 2010). Međutim, treba istaći i da, bez obzira što nisu pronađeni *cis* regulatorni elementi takvog tipa, ne znači da oni ne postoje u okviru 5'UTR *kgmB* gena, s obzirom da je broj noootkrivenih ribosvičeva u stalnom porastu. Isto tako je važno osvrnuti se i na činjenicu da ribosvičeve karakteriše vrlo precizna strukturna uređenost zahvaljujući kojoj se prepoznaju skoro sve funkcionalne grupe liganda preko direktnih ili indirektnih interakcija, a da definitivni sud o struktuiranosti 5'UTR regiona *kgmB* gena nije donešen, već da je samo na osnovu mapiranja pomoću različitih RNaza zaključeno da specifična kompjuterski generisana sekundarna struktura unutar 5'UTR regiona *kgmB* gena ne postoji.

Treba istaći i da prisustvo ribosvičeva koji mogu da vezuju antibiotik i dalje modulišu gensku ekspresiju kod bakterija još uvek nije utvrđeno, ali da su u literaturi opisani veštački dobijeni ribosvičevi - aptameri koji vezivanjem antibiotika regulišu gensku ekspresiju *in vivo*. To su ribosvičevi za tetraciklin (Hanson *et al.*, 2003; Suess *et al.*, 2004) i aminoglikozidni antibiotik neomicin (Weigand *et al.*, 2008). Logično je pretpostaviti da se na ovaj način može regulisati genska ekspresija kod bakterija i prirodno, samo je verovatno pitanje trenutka kada će se za to naći dokazi. Mogućnost da se unutar 5'UTR regiona *sgm* gena nalazi neki nepoznati ribosvič je ostavljena otvorenom (Ilić-Tomić, 2010). Za razliku od *kgmB* gena, postojanje sekundarne strukture u vidu ukosnice u 5'UTR regionu *sgm* gena je potvrđeno, a da li ona zaista može da funkcioniše kao *cis* regulatorni element i utiče na ekspresiju *sgm* gena, ostaje da se vidi.

Kako svi do sada opisani *in vitro* eksperimenti nisu uspjeli da dokažu polaznu hipotezu o translacionoj autoregulaciji *kgmB* gena, postavlja se pitanje da li je to uopšte i bilo moguće, tj. da li su sve opisane *in vitro* metode dovoljno osjetljive za dokazivanje polazne hipoteze. S obzirom da je navedena hipoteza o translacionoj autoregulaciji *kgmB* gena postavljena na osnovu *in vivo* eksperimenata u heterologom domaćinu, soju *E. coli*,

dalji eksperimenti su bili usmereni ka njenom testiranju u komercijalnom „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju. Za testiranje u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju su odabrani plazmidi koji nose *kgmB-lacZ* i *sgm-lacZ* genske fuzije, zahvaljujući kojima je u *in vivo* uslovima polazna hipoteza o translacionoj autoregulaciji gena za ove dve 16S rRNK MTaze i postavljena. U ovim plazmidima transkripcija zavisi od *P_{Ltl}* promotora, a translacija se odvija zahvaljujući signalima *kgmB* i *sgm* gena. Važno je reći i da plazmid koji nosi *kgmB-lacZ* gensku fuziju nije konstruisan tako da sadrži samo prirodni 5'UTR region *kgmB* gena dužine 83 nt, već sadrži i region uzvodno od *kgmB* gena dužine 181 nt, kao i kodirajući region *kgmB* gena dužine 193 nt. Prema podacima dobijenim iz *in vivo* eksperimenata unutar ova tri regiona se nalaze bilo primarne, bilo sekundarne strukture odgovorne za autoregulaciju *kgmB* gena (Vajić *et al.*, 2004). Na plazmidu koji nosi *sgm-lacZ* gensku fuziju fragment *sgm* gena dužine 382 nt, koji obuhvata deo 5'UTR regiona od P1 promotora *sgm* gena dužine 70 nt, 135 nt uzvodne sekvence u odnosu na P1 promotor i 177 nt kodirajućeg dela *sgm* gena, fuzionisan je sa *lacZ* reporter genom. *In vivo* analiza je pokazala da se unutar ovih 382 nt *sgm* gena nalaze bilo primarne, bilo sekundarne strukture odgovorne za njegovu autoregulaciju (Kojić, 1994). Testirana su po dva različita plazmida koji nose istu kako *kgmB-lacZ* tako i *sgm-lacZ* gensku fuziju, a razlikuju se po izvornom plazmidu. Pokazano je da se *in vitro* transkripcijom i translacijom samo sa derivata pP_{Ltl}7G plazmida dobijaju oba fuzionna proteina (slika 26). Ostaje nejasno zbog čega je to tako, pošto su signali i za otpočinjanje transkripcije i za inicijaciju translacije na različitim plazmidima koji nose istu fuziju identični.

Nakon ovog eksperimenta *in vitro* transkripcije i translacije sledili su analogni eksperimenti u kojima je praćen uticaj rastuće koncentracije prečišćenog His₆-KgmB proteina na sintezu KgmB-lacZ fuzionog proteina, kao i prečišćenog His₆-Sgm proteina na sintezu Sgm-lacZ fuzionog proteina (slika 27). S obzirom da je u oba slučaja uočeno smanjenje intenziteta signala koji odgovaraju fuzionim proteinima, može se reći da se u prisustvu prečišćenih His₆-KgmB i His₆-Sgm proteina sintetiše manje adekvatnih fuzionih proteina. Uzevši u obzir rezultate više ponovljenih eksperimenata ove vrste, može se zaključiti da obe MTaze reprimiraju sintezu adekvatnih fuzionog proteina, što je u skladu

sa *in vivo* eksperimentima na osnovu kojih je hipoteza o autoregulaciji ekspresije *kgmB* i *sgm* gena utemeljena.

Važno je reći i da je prvobitna namera bila da se rezultati ovih eksperimenata kvantifikuju, tj. da se precizno odredi stepen smanjenja sinteze fuzionih proteina, u poređenju sa kontrolnom reakcijom. Postoji više razloga zbog kojih ovo nije bilo moguće. Jedan od njih je slaba efikasnost sinteze fuzionih proteina u ovom sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju. Novosintetisani radioaktivno obeleženi proteini se pre nanošenja na 10% SDS-poliakrilamidni gel talože iz celokupne zapremine jedne reakcije, čime se zapravo stalože i svi ostali proteini prisutni u „cell-free“ sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju. To je razlog što se signali tokom elektroforeze „šire“, nisu homogeni i time kvantitativna analiza pomoću kompjuterskih programa postaje nemoguća (REZULTATI, slika 27a). I pored ovoga se na gelu može primetiti da intenzitet koji odgovara unutrašnjoj kontroli, tj. β laktamazi, sintetisanoj sa istog plazmida kao i Sgm-lacZ fuzioni protein, u prisustvu His₆-Sgm proteina opada slabije, ako se uporedi sa intenzitetom koji odgovara fuzionom proteinu. Međutim, usled nemogućnosti kvantitativne analize, ovaj zaključak ostaje u domenu slobodne procene.

Da bi se postigla veća homogenost signala, reakcije *in vitro* sinteze KgmB-lacZ fuzionog proteina su pre nanošenja na 10% SDS-poliakrilamidni gel prečišćene propuštanjem kroz G50 Sephadex kolonu, nakon čega je usledila precipitacija proteina acetonom. Na taj način su signali za KgmB-lacZ fuzioni protein bili jasnije definisani (REZULTATI, slika 27b), ali je uveden još jedan korak gde može doći do greške. To je naročito uočljivo u kolonama označenim sa 2 i 3 koje sadrže identične kontrolne reakcije gde je dodavan samo pufer u kome su His₆-KgmB i His₆-Sgm proteini dijalizirani, ali se intenzitet signala neznatno razlikuje. U ovom slučaju zbog tehničke nesavršenosti nije bilo moguće uraditi kvantifikaciju signala za KgmB-lacZ fuzioni protein i odrediti stepen smanjenja njegove sinteze u prisustvu His₆-KgmB proteina.

U ovom trenutku je bitno još istaći da bi za testiranje hipoteze o autoregulaciji KgmB MTaze u „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju najadekvatnije bilo zapravo preskočiti korak transkripcije. To bi značilo da se umesto cirkularnih DNK matrica u reakcije dodaje *in vitro* sintetisana kompletna *kgmB* iRNK i

prati sinteza KgmB MTaze. Ovaj eksperiment je zapravo i urađen, ali do sinteze proteina nije došlo, što je u skladu sa rezultatima analognog eksperimenta za Sgm MTazu (Ilić-Tomić, 2010). Moguće objašnjenje za odsustvo sinteze proteina u oba slučaja može biti sama terciarna struktura ovih iRNK, tj. nedostupnost signala bitnih za odpočinjanje translacije, verovatno zarobljenih unutar sekundarnih struktura.

U literaturi postoje primeri gde je u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju praćen uticaj proteina regulatora na sintezu fuzionih proteina. Tako je pokazano da CsrA protein reguliše *cstA* gen, tj. da je u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju u prisustvu CsrA proteina inhibirana sinteza CstA-lacZ fuzionog proteina (Dubey *et al.*, 2003). Međutim, adekvatnije bi bilo pratiti uticaj regulatora na sintezu samog proteina koji je regulisan. U ovom trenutku je važno pomenuti i eksperimente *in vitro* transkripcije i translacije u istom „cell-free“ *E. coli* sistemu gde je pokušana sinteza obe MTaze sa dve vrste cirkularnih matrica (Ilić-Tomić, 2010). Pokazano je da se KgmB MTaza u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju sintetiše samo ako je matrica pQEK-N plazmid, a Sgm MTaza je sintetisana samo sa pQES-5 plazmida. U oba slučaja su i transkripcija i translacija pod kontrolom signala iz samog komercijalnog pQE vektora. *In vitro* transkripcija i translacija sa cirkularnih DNK matrica, derivata pUC18 plazmida, u kojima su geni za obe MTaze bili pod kontrolom *lacZ* promotora, nije bila uspešna. Naročito je zanimljiv podatak da su identični delovi *kgmB* i *sgm* gena, korišćeni za konstrukciju *kgmB-lacZ* i *sgm-lacZ* genskih fuzija, prisutni i kod ovih derivata pUC18 plazmida, naravno uz ostatak kodirajuće sekvence za obe MTaze. U istom „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju, gde se translacija odvija zahvaljujući signalima *kgmB* i *sgm* gena, a transkripcija zahvaljujući *P_{Ltl}* promotoru, sintetišu se očekivani fuzioni proteini. Ostaje nejasno zašto do translacije sa istih signala za inicijaciju ne dolazi, ako se kao matrice koriste derivati pUC18 plazmida sa kompletnim *kgmB* i *sgm* genima, kod kojih se transkripcija odvija sa *lacZ* promotora.

Ukoliko se sumiraju rezultati opisanih eksperimenata u „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju, može se zaključiti da oni potvrđuju rezultate *in vivo* eksperimenata i da KgmB i Sgm MTaza zaista imaju sposobnost autoregulacije na translacionom nivou.

Međutim, isto tako se može reći da uz pomoć primenjenih *in vitro* metoda nije bilo moguće precizno odrediti koje motive na sopstvenoj iRNK KgmB MTaza prepoznaje, kao ni zahvaljujući kom mehanizmu se postiže autoregulacija *kgmB* gena na translacionom nivou. Možda je razlog previsok prag osetljivosti ovih metoda da bi se uz njihovu pomoć dao odgovor na postavljena pitanja, ili je pak mehanizam autoregulacije *kgmB* gena isuviše sofisticiran. Hipoteza o autoregulaciji *kgmB* gena je postavljena na osnovu *in vivo* analiza sa *kgmB-lacZ* genskom fuzijom eksprimiranom sa dva različita plazmida, pΔK1 i pMKT1 (Milojević, 1998; Vajić *et al.*, 2004). Ova fuzija je sem 5'UTR regiona *kgmB* gena sadržala i deo kodirajuće sekvence, kao i deo uzvodnog regiona *kgmB* gena. Na osnovu rezultata prethodnih *in vivo* analiza, urađenih u našoj laboratoriji, nije bilo moguće definisati da li su zaista svi ovi regioni neophodni da bi do autoregulacije ekspresije *kgmB* gena došlo. Zbog toga je bio logičan korak da se u *in vivo* analizama definiše minimalni region odgovoran za autoregulaciju *kgmB* na nivou translacije.

Sa tim ciljem je konstruisana *kgmB-lacZ* genska fuzija (pMKT1ATG), koja se u odnosu na ranije pominjanu *kgmB-lacZ* gensku fuziju (pMKT1) razlikuje samo po odsustvu kodirajućeg dela *kgmB* gena (REZULTATI, slika 28). S obzirom da je pretpostavljeno da su motivi koje KgmB MTaza prepoznaje smešteni unutar 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK, očekivao se isti efekat KgmB MTaze na aktivnost ove fuzije, kao kod kontrolne (pMKT1). Međutim, uticaj KgmB MTaze na aktivnost *kgmB-lacZ* genske fuzije pMKT1-ATG nije ni mogao biti analiziran, pošto neočekivano sama fuzija nije pokazala aktivnost u β-gal esejju.

Konstruisana je i *kgmB-lacZ* genska fuzija koja se razlikuje od ranije pominjane *kgmB-lacZ* genske fuzije (pMKT1) po odsustvu regiona koji se nalazi uzvodno u odnosu na *kgmB*, kao i činjenici da njena ekspresija zavisi od T7 promotora. Ova fuzija je konstruisana tako što je samo 5'UTR region *kgmB* gena fuzionisan sa *lacZ* reporter genom. Isti region, preveden u RNK, je korišćen u EMSA esejjima koji su prethodno opisani. Na ovaj način je bilo moguće uporediti rezultate *in vitro* eksperimenata, gde je direktno određivan afinitet vezivanja KgmB MTaze za *kgmB* RNK probu koja je nosila wt regulatorne sekvence, sa rezultatima *in vivo* eksperimenata. Prvobitna namera je bila da se *kgmB-lacZ* genska fuzija bez dela uzvodnog regiona *kgmB* gena eksprimira u *E. coli* soju ER2566 koji nosi gen za T7 polimerazu, ali se ispostavilo da fuzija nije aktivna. Pošto su

sve do sada aktivne *kgmB-lacZ* genske fuzije eksprimirane sa snažnog IPTG inducibilnog *P_{Ltl}* promotora, odlučeno je da se i *kgmB-lacZ* genska fuzija bez dela uzvodnog regiona *kgmB* gena klonira nizvodno od istog promotora (pK1T7, slika 28, REZULTATI). Međutim, ni u ovom slučaju nije bilo moguće detektovati aktivnost fuzije u β -gal eseju, tj. ekspresija fuzije ni sa *P_{Ltl}* promotora nije bila uspešna. Na ovaj način je pokazano da razlog neaktivnosti fuzije nije *T7* promotor, već nešto drugo.

S obzirom da je prisustvo KgmB-lacZ fuzionog proteina, koji se prati preko β -gal eseja, rezultat najpre transkripcije sa cirkularnih DNK matrica, a potom i translacije u *in vivo* sistemu, postavlja se pitanje u kojoj od ove dve faze postoji problem, tj. zašto nema sinteze krajnjeg produkta. Signali za inicijaciju transkripcije su isti kod svih *kgmB-lacZ* genskih fuzija, pa verovatno razloge za neaktivnost konkretnih *kgmB-lacZ* genskih fuzija ne treba tražiti na nivou transkripcije, što je u skladu sa rezultatima RT-PCR analize urađene u slučaju nekih ranije konstruisanih, a neaktivnih *kgmB-lacZ* genskih fuzija (Vajić, 2003). Sve *kgmB-lacZ* genske fuzije nose i kanonski RBS *kgmB* gena, tj. SD sekvencu na adekvatnoj udaljenosti uzvodno u odnosu na ATG start kodon, pa je pitanje zašto do inicijacije translacije, tj. vezivanja ribozoma za ovaj RBS ne dolazi.

Neaktivnost pK1T7 fuzije bi mogla značiti i da je za efikasnu inicijaciju translacije *kgmB* gena neophodno i prisustvo uzvodnog regiona. Ponekad kanonska SD sekvenca nije dovoljna za vezivanje ribozoma, pa se tako kod *thrS* gena ribozomi vezuju, sem za kanonsku SD sekvencu, i za segment koji je lociran 40 nukleotida uzvodno od SD sekvence, o čemu je bilo više reči u uvodnom delu.

Takođe, postoji mogućnost i da je neophodna aktivna translacija u uzvodnom regionu, da bi translacija sa signala *kgmB* gena za inicijaciju translacije otpočela. U Uvodu je već pomenuto da spregnuta translacija više gena nije retka kod bakterija i da postoje primeri gde se stop kodon jednog gena preklapa sa start kodonom sledećeg (*UGAUG*) i da to zapravo olakšava reinicijaciju translacije. U uzvodnom regionu *kgmB* gena postoji ORF za potencijalni ABC transporter, čiji se stop kodon preklapa sa start kodonom *kgmB* gena (Milojević, 1998; Vajić, 2003). Moguće je da preklapanje stop kodona potencijalnog ABC transportera kodiranog sa uzvodnog ORF-a *kgmB* gena i start kodona samog *kgmB* gena ima funkcionalni zanačaj u originalnom domaćinu, bakteriji *S. tenebrarius*. Neophodnošću

translacije uzvodnog regiona bi se moglo objasniti i zašto u sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju, u slučaju kada transkripcija zavisi od *lac* promotora, nema translacije, a u slučaju kada transkripcija zavisi od *P_{Ltl}* promotora, do translacije dolazi. Isti signali za inicijaciju translacije *kgmB* gena su prisutni u oba primera, ali samo nizvodno od *P_{Ltl}* promotora postoji i kanonski RBS, na adekvatnoj udaljenosti ispred ATG start kodona iz *NcoI* restrikcionog mesta, a time i mogućnost da se sa ovog start kodona inicira translacija uzvodnog regiona *kgmB* gena. Međutim, kod spregnute translacije je obično RBS drugog gena u nizu blokiran unutar stabilne sekundarne strukture, te je translacija prvog gena neophodna da bi se ova sekundarna struktura destabilizovala, čime bi RBS drugog gena postao dostupan ribozomima. Može se reći da spregnuta translacija nije adekvatno objašnjenje fenomena vezanih za ekspresiju *kgmB* gen, naročito ako se imaju u vidu rezultati mapiranja sekundarnih struktura pomoću RNaza koji su nedvosmisleno pokazali da je minimalni region za otpočinjanje translacije *kgmB* gena u linearnoj formi.

Na osnovu opisanih *in vivo* analiza, a ako se uzmu u obzir i ranije konstruisane neaktivne *kgmB-lacZ* genske fuzije (Milojević, 1998; Vajić, 2003), može se reći da je za uspešnu inicijaciju translacije sa kanonskog RBS regiona *kgmB* gena neophodno prisustvo i kodirajuće sekvence ovog gena, kao i dela uzvodnog regiona.

Opisana *in vivo* analiza nije dala odgovor na pitanje u kom regionu su prisutni motivi odgovorni za autoregulaciju *kgmB* gena, već se priča o samoj ekspresiji dodatno usložnjava. Posredni dokaz bi mogla biti *in vivo* analiza uticaja *KgmB* MTaze na aktivnost *grm-lacZ* genske fuzije. Više puta je isticana analogija između tri 16S rRNK MTaze, *KgmB*, *Sgm* i *Grm* MTaze, u funkcionalnom i strukturnom smislu, kao i da *Grm* MTaza obara aktivnost *kgmB-lacZ* i *sgm-lacZ* genskih fuzija, iako 5'UTR *grm* gena sadrži svega nekoliko nukleotida, pored kanonske SD sekvence. Ukoliko se zajednički motivi koje sve tri MTaze prepoznaju, sa potencijalnom ulogom u regulaciji genske ekspresije, zaista nalaze unutar 5'UTR regiona *kgmB* i *sgm* gena, onda bilo koja od tri funkcionalne MTaze ne bi imala nikakav uticaj na *grm-lacZ* gensku fuziju. Da bi se testirala ova pretpostavka konstruisana je *grm-lacZ* genska fuzija i zaista se ispostavilo da sve tri MTaze eksprimirane *in trans* u odnosu na samu fuziju ne dovode do značajnijeg smanjenja njene aktivnosti

(REZULTATI, tabela 5). Izvesno smanjenje aktivnosti u slučaju kada je praćen uticaj KgmB MTaze na aktivnost *grm-lacZ* genske fuzije nije pripisano uticaju same MTaze, već činjenici da NM522 soj u kome koegzistiraju dva plazmida, jedan koji nosi *grm-lacZ* gensku fuziju i drugi sa kompletnim *kgmB* genom, iz nekog razloga raste sporije, ako se uporedi sa drugim sojevima kod kojih sem plazmida sa *grm-lacZ* genskom fuzijom postoji i plazmid sa *sgm* ili *grm* genima. Iako se apsolutne vrednosti aktivnosti *grm-lacZ* genske fuzije razlikuju, u zavisnosti kako se sam β -gal esej izvodi, tj. da li se polazi od 10x razblaženih prekonocnih kultura ili se one razblažuju 1000x pa narastaju do izvesnog stepena i onda radi β -gal esej, efekat sve tri MTaze na aktivnost *grm-lacZ* genske fuzije je približno isti u svim nezavisnim eksperimentima.

Ukoliko se sumiraju rezultati svih opisanih eksperimenata može se reći da su KgmB i Sgm MTaza autoregulisane na translacionom novou, što je u skladu sa ranije postavljenom hipotezom (Kojić *et al.*, 1996; Vajić *et al.*, 2004). Međutim, isto tako se može reći da su detalji mehanizma po kome se autoregulacija ekspresije ovih gena odvija za sada nepoznati. Rezultati pretdno opisanih eksperimenata uglavnom podržavaju analogiju između KgmB i Sgm MTaze u funkcionalnom i strukturnom smislu, ali postoji i nekoliko bitnih razlika. Za razliku od Sgm MTaze, KgmB MTaza je u izvornom domaćinu eksprimirana samo sa jednog promotora (Holmes and Cundliffe, 1991). Takođe, eksperimenti mapiranja sa različitim RNazama su pokazali da kompjuterski generisana sekundarna struktura tipa ukosnice u okviru 5'UTR regiona na *kgmB* iRNK ne postoji, a u okviru 5'UTR regiona na *sgm* iRNK je prisutna. Pri analizi aktivnosti *sgm* gena *in vivo* konstruisana je *sgm-lacZ* genska fuzija kod koje ne samo da je deletirana potencijalna regulatorna sekvence (CCGCCC), već i kompletan 5'UTR region uzvodno od nje (Kojić *et al.*, 1996). Na aktivnost ove fuzije Sgm MTaza nije imala uticaja i time je istaknut značaj deletiranog dela 5'UTR regiona za samu autoregulaciju. Međutim, *kgmB-lacZ* genska fuzija kod koje je deletiran 5'UTR region nije bila aktivna, što govori o značaju ovog regiona za

samu inicijaciju translacije, pre nego samo za regulaciju ekspresije na nivou inicijacije translacije (Vajić, 2003).

Jasno je da se mehanizam prepoznavanja regulatornih signala u okviru sopstvene iRNK od strane ovih MTaza može dovesti u vezu sa mehanizmom prepoznavanja primarnog targeta, tj. 16S rRNK. 3D struktura proteina u kompleksu sa SAM i SAH kofaktorima, određena je samo za Sgm MTazu (Husain *et al.*, 2010). U istom radu je na osnovu „footprint“ analize, koja pokazuje zaštitu nukleotida u prisustvu Sgm proteina, zaključeno da je kod ovog proteina prisutno prepoznavanje targeta na nivou cele 30S ribozomalne subjedinice. Najverovatnije Sgm MTaza prepoznaje i vezuje sekundarni target, tj. sopstvenu iRNK vrlo slično kao što prepoznaje i vezuje primarni target, tj. 16S rRNK. Pretpostavlja se da Sgm MTaza u oba slučaja prepoznaje najpre specifičnu konformaciju RNK molekula, koja se u slučaju 30S subjedinice održava zahvaljujući ribozomalnim proteinima, i da baš zato ne metiluje голу 16S rRNK (Ilić-Tomić, 2010). Malo je verovatno da je sekundarna struktura prisutna u okviru 5'UTR regiona na *sgm* iRNK, zaista dovoljno slična struktuiranom A mestu u 16S rRNK, i da kao takva može biti mesto prepoznavanja i vezivanja Sgm MTaze. U ranijem radu je pretpostavljeno da bi Sgm MTaza mogla da zauzima konformaciju pogodnu za prepoznavanje sekundarnog targeta, tek nakon što metiluje 16S rRNK i oslobodi kofaktor, pa da u takvom stanju dovodi do strukturnih rearanžmana unutar iRNK i njenog zaključavanja za efikasnu inicijaciju translacije (Ilić-Tomić, 2010). Ukoliko ova pretpostavka važi i kog KgmB MTaze, možda je to razlog zašto se primenom *in vitro* metoda nije mogao bliže okarakterisati mehanizam autoregulacije ekspresije obe MTaze.

Analiza načina regulacije *kgmB* gena, opisana u ovom radu, nije razjasnila kako ovaj mehanizam funkcioniše, a istakla je nove detalje zbog kojih se priča o autoregulaciji *kgmB* gena dodatno komplikuje, što je u skladu sa zaključcima paralelne analize regulacije

ekspresije *sgm* gena (Ilić-Tomić, 2010). Ipak, uzevši u obzir potrebu za razvojem inhibitora MTaza, čijom primenom bi se uspešno izborili sa rastućom rezistencijom na aminoglikozide kod patogenih bakterija, dodatni napor koji treba uložiti za puno razumevanje mehanizma autoregulacije *kgmB* gena ne čini se uzaludnim, ne samo u fundamentalnom smislu, već i u smislu primene. Da bi se ovaj cilj postigao, neophodno je detaljno razumevanje ekspresije KgmB MTaze i njenog mehanizma delovanja, razrešenje tercijarne strukture ove 16S rRNK MTaze u kompleksu sa njenim kofaktorom, kao i određivanje strukture 30S - KgmB MTaza kompleksa.

VI ZAKLJUČCI

1. Metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analizirana je interakcija His₆-KgmB fuzionog proteina sa 5'UTR regionom *kgmB* iRNK kod kog je ili CGUCA motiv zamenjen sa GAUCC (mRS), ili CGCCC motiv zamenjen sa AUAAA (mRS'), ili su pak oba motiva mutirana ($\Delta\Delta$). Pokazano je da se His₆-KgmB protein, prisutan u suvišku od 600 do 2700x u odnosu na RNK probu, sa podjednakom efikasnošću, tj. malim afinitetom, vezuje za sve analizirane RNK, bez obzira da li su motivi sa potencijalnom ulogom u vezivanju KgmB proteina prisutni ili ne. Specifičnost vezivanja u reakcijama kompeticije je potvrđena samo kod mRS' *kgmB* RNK probe kod koje je CGCCC pentanukleotid zamenjen sa AUAAA, dok je CGUCA očuvan.

2. EMSA metodom je analizirana interakcija His₆-KgmB fuzionog proteina sa RNK probom dužine 39 nt, koja sadrži samo CGCCC potencijalnu regulatornu sekvencu, kao i sa RNK probom dužine 61 nt koja sadrži obe potencijalne regulatorne sekvence (CGUCA i CGCCC). Zaključeno je da se His₆-KgmB protein za RNK probu dužine 39 nt ne vezuje, kao i da se ovaj protein za RNK probu dužine 61 nt vezuje slabim afinitetom, s obzirom da je kompleks protein-RNK detektovan pri molarnom odnosu od 500x više proteina. Nespecifična priroda ovog vezivanja je pokazana u reakcijama kompeticije.

3. U EMSA eksperimentima je analiziran uticaj S-adenozil-metionina (SAM) na interakciju His₆-KgmB fuzionog proteina sa 5'UTR regionom *kgmB* iRNK kod kog su prisutne obe wt potencijalne regulatorne sekvence (CGUCA i CGCCC). Na osnovu rezultata ovog eksperimenta je zaključeno da prisustvo SAM nema uticaja na povećanje specifičnosti vezivanja His₆-KgmB proteina.

4. Uticaj drugih faktora na vezivanje His₆-KgmB fuzionog proteina za 5'UTR region *kgmB* iRNK koji sadrži obe wt potencijalne regulatorne sekvence, testiran je EMSA metodom, pomoću S30 frakcije izolovane iz soja u kome je His₆-KgmB fuzioni protein

ekspimiran. Nije potvrđeno da neki nepoznati faktor iz S30 frakcije može da poveća specifičnost vezivanja His₆-KgmB fuzionog proteina za datu RNK probu.

5. U dvostrukom „filter binding“ eseju nije pokazano specifično vezivanje His₆-KgmB fuzionog proteina za odabrane *kgmB* RNK probe te kvantifikacija interakcije nije bila moguća.

6. „Toeprint“ metodom je praćeno vezivanje ribozoma za *kgmB* iRNK, ali nije bilo moguće dovoljno pouzdano odrediti mesto vezivanja ribozoma, kao ni precizan mehanizam regulacije *kgmB* gena.

7. Interakcija His₆-KgmB fuzionog proteina sa 5'UTR regionom *kgmB* iRNK kod kog su prisutne obe wt potencijalne regulatorne sekvence (CGUCA i CGCCC) je analizirana u „footprint“ eksperimentu sa RNazom T1 gde je pokazano je da se His₆-KgmB protein ne vezuje za testiranu RNK,.

8. Postojanje sekundarnih struktura unutar 5'UTR regiona *kgmB* i *sgm* iRNK, koje su generisane na osnovu kompjuterske predikcije, testirano je u eksperimentima mapiranja sa različitim RNazama. Pokazano je da ne postoji specifična sekundarna struktura tipa ukosnice unutar 5'UTR regiona *kgmB* iRNK, ali nije isključena mogućnost da unutar ovog regiona dolazi do interakcija drugog tipa. U slučaju 5'UTR regiona *sgm* iRNK su eksperimenti mapiranja potvrdili postojanje kompjuterski generisane sekundarne strukture.

9. Translaciona autoregulacija *kgmB* i *sgm* gena je testirana u komercijalnom „cell-free“ *E. coli* sistemu za *in vitro* transkripciju i translaciju. U prisustvu prečišćenih His₆-KgmB i His₆-Sgm proteina sintetisano je manje odgovarajućeg fuzionog proteina. Može se zaključiti da obe MTaze reprimiraju sintezu odgovarajućeg fuzionog proteina, što je u skladu sa *in vivo* eksperimentima na osnovu kojih je hipoteza o autoregulaciji ekspresije *kgmB* i *sgm* gena postavljena.

10. Konstruisane su *kgmB-lacZ* genske (pMKT1ATG i pK1T7) fuzije kojima je nedostajao po jedan region prisutan u *kgmB-lacZ* genskoj fuziji (pMKT1) na osnovu čije aktivnosti je hipoteza o autoregulaciji ekspresije *kgmB* gena postavljena. S obzirom da ove fuzije nisu bile aktivne, *in vivo* analiza nije mogla da precizira da li je region sa motivima odgovornim za autoregulaciju prisutan u kodirajućem delu *kgmB* gena ili u uzvodnom regionu ovog gena.

11. Na osnovu *in vivo* analize je pokazano da KgmB, Sgm i Grm MTaze, eksprimirane *in trans* u odnosu na *grm-lacZ* gensku fuziju, ne dovode do značajnijeg smanjenja njene aktivnosti. Ovim je pokazano da odsustvo 5'UTR regiona kod *grm* gena podrazumeva i nemogućnost regulacije ekspresije.

12. Kako rezultati svih do sada opisanih *in vivo* i *in vitro* eksperimenata nisu uspeali da ukažu koji su motivi odgovorni za autoregulaciju *kgmB* ekspresije, postoji mogućnost da je predloženi model neadekvatan, ili pak mnogo kompleksniji, te da postoji faktor, čija je priroda za sada nepoznata, sa ključnom ulogom u fenomenu autoregulacije *kgmB* gena.

VII REFERENCE

- Afonyushkin, T., B. Večerek, I. Moll, U. Bläsi and V. R. Kaberdin (2005). "Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB." Nucleic Acids Res **33**(5): 1678-89.
- Agalarov, S. C., G. Sridhar Prasad, P. M. Funke, C. D. Stout and J. R. Williamson (2000). "Structure of the S15,S6,S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain." Science **288**(5463): 107-13.
- Aiba, H. (2007). "Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs." Curr Opin Microbiol **10**(2): 134-9.
- Allemand, F., J. Haentjens, C. Chiaruttini, C. Royer and M. Springer (2007). "*Escherichia coli* ribosomal protein L20 binds as a single monomer to its own mRNA bearing two potential binding sites." Nucleic Acids Res **35**(9): 3016-31.
- Altuvia, S., D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow and G. Storz (1997). "A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator." Cell **90**(1): 43-53.
- Argaman, L. and S. Altuvia (2000). "*fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex." J Mol Biol **300**(5): 1101-12.
- Arya, D. P. (2007). Aminoglycoside antibiotics: From chemical biology to drug discovery. Hoboken, New Yersey, Wiley-Interscience.
- Aseev, L. V., A. A. Levandovskaya, L. S. Tchufistova, N. V. Scaptsova and I. V. Boni (2008). "A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the *rpsB-tsfc* expression *in vivo*." RNA **14**(9): 1882-94.
- Baker, C. S., I. Morozov, K. Suzuki, T. Romeo and P. Babitzke (2002). "CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **44**(6): 1599-610.
- Baker, C. S., L. A. Eory, H. Yakhnin, J. Mercante, T. Romeo and P. Babitzke (2007). "CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence." J Bacteriol **189**(15): 5472-81.
- Bakker, E. P. (1992). "Aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics: hygromycin B is an atypical bactericidal compound that exerts effects on cells of *Escherichia coli* characteristics for bacteriostatic aminocyclitols." J Gen Microbiol **138**(3): 563-9.
- Basturea, G. N., K. E. Rudd and M. P. Deutscher (2006). "Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family." RNA **12**(3): 426-34.
- Beauclerk, A. A. and E. Cundliffe (1987). "Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides." J Mol Biol **193**(4): 661-71.
- Bechhofer, D. H. (1990). "Triple post-transcriptional control." Mol Microbiol **4**(9): 1419-23.
- Bejerano-Sagie, M. and K. B. Xavier (2007). "The role of small RNAs in quorum sensing." Curr Opin Microbiol **10**(2): 189-98.

- Bibb, M. J. (2005). "Regulation of secondary metabolism in streptomycetes." Curr Opin Microbiol **8**: 208-15.
- Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." Methods Enzymol **100**: 243-55.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Boni, I. V. (2006). "Diverse Molecular Mechanisms of Translation Initiation in Prokaryotes." Mol Biol **40**(4): 587-96.
- Boni, I. V., V. S. Artamonova and M. Dreyfus (2000). "The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control." J Bacteriol **182**(20): 5872-9.
- Boni, I. V., D. M. Isaeva, M. L. Musychenko and N. V. Tzareva (1991). "Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1." Nucleic Acids Res **19**(1): 155-62.
- Boni, I. V., V. S. Artamonova, N. V. Tzareva and M. Dreyfus (2001). "Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1." Embo J **20**(15): 4222-32.
- Borovinskaya, M. A., R. D. Pai, W. Zhang, B. S. Schuwirth, J. M. Holton, G. Hirokawa, H. Kaji, A. Kaji and J. H. Cate (2007). "Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling." Nat Struct Mol Biol **14**(8): 727-32.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding." Anal Biochem **72**(1-2): 248-54.
- Brandi, L., S. Marzi, A. Fabbretti, C. Fleischer, W. E. Hill, C. O. Gualerzi and J. Stephen Lodmell (2004). "The translation initiation functions of IF2: targets for thiostrepton inhibition." J Mol Biol **335**(4): 881-94.
- Brantl, S. (2002). "Antisense RNAs in plasmids: control of replication and maintenance." Plasmid **48**(3): 165-73.
- Brantl, S. (2007). "Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs." Curr Opin Microbiol **10**(2): 102-9.
- Breidt, F. and D. Dubnau (1990). "Identification of *cis*-acting sequences required for translational autoregulation of the *ermC* methylase." J Bacteriol **172**(7): 3661-8.
- Brown, L. and T. Elliott (1996). "Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene." J Bacteriol **178**(13): 3763-70.
- Bujnicki, J. M. and L. Rychlewski (2001). "Sequence analysis and structure prediction of aminoglycoside-resistance 16S rRNA:m7G methyltransferase." Acta Microbiol Pol **50**(1): 7-17.
- Butkus, M. E., L. B. Prundeanu and D. B. Oliver (2003). "Translocon "pulling" of nascent SecM controls the duration of its translational pause and secretion-responsive *secA* regulation." J Bacteriol **185**(22): 6719-22.
- Butler, J. S., M. Springer and M. Grunberg-Manago (1987). "AUU-to-AUG mutation in the initiator codon of the translation initiation factor IF3 abolishes translational autocontrol of its own gene (*infC*) *in vivo*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(12): 4022-5.

- Bycroft, M., T. J. Hubbard, M. Proctor, S. M. Freund and A. G. Murzin (1997). "The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold." Cell **88**(2): 235-42.
- Cabanas, M. J., D. Vazquez and J. Modolell (1978). "Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition." Eur J Biochem **87**(1): 21-7.
- Caillet, J., T. Nogueira, B. Masquida, F. Winter, M. Graffe, A. C. Dock-Bregeon, A. Torres-Larios, R. Sankaranarayanan, E. Westhof, B. Ehresmann, C. Ehresmann, P. Romby and M. Springer (2003). "The modular structure of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase as both an enzyme and a regulator of gene expression." Mol Microbiol **47**(4): 961-74.
- Carter, A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan (2000). "Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics." Nature **407**(6802): 340-8.
- Challis, G. L. and D. A. Hopwood (2003). "Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(Suppl 2): 14555-61.
- Champney, W. S. (2006). "The other target for ribosomal antibiotics: inhibition of bacterial ribosomal subunit formation." Infect Disord Drug Targets **6**(4): 377-90.
- Cheah, M. T., A. Wachter, N. Sudarsan and R. R. Breaker (2007). "Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches." Nature **447**(7143): 497-500.
- Chen, G. and C. Yanofsky (2003). "Tandem transcription and translation regulatory sensing of uncharged tryptophan tRNA." Science **301**(5630): 211-3.
- Chen, G. and C. Yanofsky (2004). "Features of a leader peptide coding region that regulate translation initiation for the anti-TRAP protein of *B. subtilis*." Mol Cell **13**(5): 703-11.
- Cheng, X. and R. M. Blumenthal (1999). S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structures and functions. Singapore, World Scientific.
- Chiaruttini, C., M. Milet and M. Springer (1996). "A long-range RNA-RNA interaction forms a pseudoknot required for translational control of the IF3-L35-L20 ribosomal protein operon in *Escherichia coli*." Embo J **15**(16): 4402-13.
- Chopra, I., P. M. Hawkey and M. Hinton (1992). "Tetracyclines, molecular and clinical aspects." J Antimicrob Chemother **29**(3): 245-77.
- Christiansen, J. K., M. H. Larsen, H. Ingmer, L. Sogaard-Andersen and B. H. Kallipolitis (2004). "The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence." J Bacteriol **186**(11): 3355-62.
- Clarke, P. A. (1999). Labeling and purification of RNA synthesized by *in vitro* transcription. Methods in Molecular Biology. Haynes, S R. Totowa, NJ, Humana Press Inc. **118: RNA-protein interaction protocols: 1-10**.
- Comer, M. M., J. Dondon, M. Graffe, O. Yarchuk and M. Springer (1996). "Growth rate-dependent control, feedback regulation and steady-state mRNA levels of the threonyl-tRNA synthetase gene of *Escherichia coli*." J Mol Biol **261**(2): 108-24.
- Conn, G. L., M. Savić and R. Macmaster (2008). Antibiotic resistance in bacteria through modification of nucleosides in 16S ribosomal RNA. DNA and RNA Modification

Enzymes: Comparative Structure, Mechanism, Functions, Cellular Interactions and Evolution. Grosjean, H. Austin, Texas, Landes Bioscience.

- Connolly, K., J. P. Rife and G. Culver (2008). "Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA." Mol Microbiol **70**(5): 1062-75.
- Corbino, K. A., J. E. Barrick, J. Lim, R. Welz, B. J. Tucker, I. Puskarz, M. Mandal, N. D. Rudnick and R. R. Breaker (2005). "Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria." Genome Biol **6**(8): R70.
- Cundliffe, E. (1990). Recognition sites for antibiotics within rRNA. The Ribosome: Structure, Function and Evolution. Hill, W E, Dahlberg, A, Garrett, R A, Moore, P B, Schlessinger, D and Warner, J R. Washington DC, ASM: 479-90.
- Čubrilo, S., F. Babić, S. Douthwaite and G. Maravić Vlahoviček (2009). "The aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm impedes RsmF methylation at an adjacent rRNA nucleotide in the ribosomal A site." RNA **15**(8): 1492-7.
- Dahlquist, K. D. and J. D. Puglisi (2000). "Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site." J Mol Biol **299**(1): 1-15.
- Dann, C. E., C. A. Wakeman, C. L. Sieling, S. C. Baker, I. Irnov and W. C. Winkler (2007). "Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA." Cell **130**(5): 878-92.
- Day, J. M. and G. R. Janssen (2004). "Isolation and characterization of ribosomes and translation initiation factors from the gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans*." J Bacteriol **186**(20): 6864-75.
- De Lay, N. and S. Gottesman (2009). "The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior." J Bacteriol **191**(2): 461-476.
- de Smit, M. H. and J. van Duin (1994a). "Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction." J Mol Biol **235**(1): 173-84.
- de Smit, M. H. and J. van Duin (1994b). "Control of translation by mRNA secondary structure in *Escherichia coli*. A quantitative analysis of literature data." J Mol Biol **244**(2): 144-50.
- Dean, D., J. L. Yates and M. Nomura (1981). "*Escherichia coli* ribosomal protein S8 feedback regulates part of *spc* operon." Nature **289**(5793): 89-91.
- Decatur, W. A. and M. J. Fournier (2002). "rRNA modifications and ribosome function." Trends Biochem Sci **27**(7): 344-51.
- Deckman, I. C. and D. E. Draper (1987). "S4-alpha mRNA translation regulation complex: II. Secondary structures of the RNA regulatory site in the presence and absence of S4." J Mol Biol **196**(2): 323-32.
- Deckman, I. C., D. E. Draper and M. S. Thomas (1987). "S4-alpha mRNA translation repression complex: I. Thermodynamics of formation." J Mol Biol **196**(2): 313-22.
- Desai, P. M. and J. P. Rife (2006). "The adenosine dimethyltransferase KsgA recognizes a specific conformational state of the 30S ribosomal subunit." Arch Biochem Biophys **449**(1-2): 57-63.
- Ding, Y., B. M. Davis and M. K. Waldor (2004). "Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression." Mol Microbiol **53**(1): 345-54.

- Doi, Y., D. de Oliveira Garcia, J. Adams and D. L. Paterson (2007). "Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 852-6.
- Doi, Y., K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato and Y. Arakawa (2004). "Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides." Antimicrob Agents Chemother **48**(2): 491-6.
- Douthwaite, S., D. Fourmy and S. Yoshizawa (2005). Nucleotide methylation in rRNA that confer resistance to ribosome-targeting antibiotics. Fine-tuning of RNA functions by modification and editing. Grosjean, H. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin: 285-307.
- Draper, D. E. (1999). "Themes in RNA-Protein recognition." J Mol Biol **293**(2): 255-70.
- Du, H. and P. Babitzke (1998). "trp RNA-binding attenuation protein-mediated long distance RNA refolding regulates translation of trpE in *Bacillus subtilis*." J Biol Chem **273**(32): 20494-503.
- Dubey, A. K., C. S. Baker, T. Romeo and P. Babitzke (2005). "RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction." RNA **11**(10): 1579-87.
- Dubey, A. K., C. S. Baker, K. Suzuki, A. D. Jones, P. Pandit, T. Romeo and P. Babitzke (2003). "CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, cstA, by blocking ribosome access to the cstA transcript." J Bacteriol **185**(15): 4450-60.
- Edwards, T. E. and A. R. Ferre-D'Amare (2006). "Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition." Structure **14**(9): 1459-68.
- Ehresmann, C., B. Ehresmann, E. Ennifar, P. Dumas, M. Garber, N. Mathy, A. Nikulin, C. Portier, D. Patel and A. Serganov (2004). "Molecular mimicry in translational regulation: the case of ribosomal protein S15." RNA Biol **1**(1): 66-73.
- Epshtein, V., A. S. Mironov and E. Nudler (2003). "The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5052-6.
- Ermolenko, D. N., P. C. Spiegel, Z. K. Majumdar, R. P. Hickerson, R. M. Clegg and H. F. Noller (2007). "The antibiotic viomycin traps the ribosome in an intermediate state of translocation." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 493-7.
- Eustice, D. C. and J. M. Wilhelm (1984). "Fidelity of the eukaryotic codon-anticodon interaction: interference by aminoglycoside antibiotics." Biochemistry **23**(7): 1462-7.
- Faridani, O. R., A. Nikraves, D. P. Pandey, K. Gerdes and L. Good (2006). "Competitive inhibition of natural antisense Sok-RNA interactions activates Hok-mediated cell killing in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **34**(20): 5915-22.
- Folichon, M., V. Arluison, O. Pellegrini, E. Huntzinger, P. Regnier and E. Hajnsdorf (2003). "The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation." Nucleic Acids Res **31**(24): 7302-10.
- Fozo, E. M., M. R. Hemm and G. Storz (2008). "Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them." Microbiol Mol Biol Rev **72**(4): 579-89.

- Franch, T., A. P. Gulyaev and K. Gerdes (1997). "Programmed cell death by *hok/sok* of plasmid R1: processing at the *hok* mRNA 3'-end triggers structural rearrangements that allow translation and antisense RNA binding." J Mol Biol **273**(1): 38-51.
- Franch, T., T. Thisted and K. Gerdes (1999). "Ribonuclease III processing of coaxially stacked RNA helices." J Biol Chem **274**(37): 26572-8.
- Fuchs, R. T., F. J. Grundy and T. M. Henkin (2006). "The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase." Nat Struct Mol Biol **13**(3): 226-33.
- Fuchs, R. T., F. J. Grundy and T. M. Henkin (2007). "S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the SMK box translational riboswitch RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 4876-4880.
- Galimand, M., P. Courvalin and T. Lambert (2003). "Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2565-71.
- Gaynor, M. and A. S. Mankin (2003). "Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance." Curr Top Med Chem **3**(9): 949-61.
- Geissmann, T. A. and D. Touati (2004). "Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator." Embo J **23**(2): 396-405.
- Georgopoulos, C., K. Liberek, M. Zylicz and D. Ang (1994). Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones Morimoto, R I, Tissieres, A and Georgopoulos, C. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 209-49.
- Gerdes, K. and E. G. Wagner (2007). "RNA antitoxins." Curr Opin Microbiol **10**(2): 117-24.
- Gilbert, S. D. and R. T. Batey (2006). "Riboswitches: Fold and function." Chem Biol **13**(8): 805-7.
- Gollnick, P., P. Babitzke, A. Antson and C. Yanofsky (2005). "Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*." Annu Rev Genet **39**: 47-68.
- Gonzalez-Zorn, B., T. Teshager, M. Casas, M. C. Porrero, M. A. Moreno, P. Courvalin and L. Dominguez (2005). "*armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*." Emerg Infect Dis **11**(6): 954-6.
- Gonzalez, A., A. Jimenez, D. Vazquez, J. E. Davies and D. Schindler (1978). "Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes." Biochim Biophys Acta **521**(2): 459-69.
- Gorke, B. and J. Vogel (2008). "Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars." Genes Dev **22**: 2914-25.
- Gottesman, S. (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." Trends Genet **21**(7): 399-404.
- Gourse, R. L., R. A. Sharrock and M. Nomura (1986). Control of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. Structure, Function, and Genetics in Ribosomes. Hardesty, B and Kramer, G. New York, Springer-Verlag: 766-88.

- Graffe, M., J. Dondon, J. Caillet, P. Romby, C. Ehresmann, B. Ehresmann and M. Springer (1992). "The specificity of translational control switched with transfer RNA identity rules." Science **255**(5047): 994-6.
- Green, N. J., F. J. Grundy and T. M. Henkin (2010). "The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule." FEBS Lett **584**(2): 318-24.
- Green, R. and H. F. Noller (1997). "Ribosomes and translation." Annu Rev Biochem **66**(1): 679-716.
- Greenfield, T. J., T. Franch, K. Gerdes and K. E. Weaver (2001). "Antisense RNA regulation of the *par* post-segregational killing system: structural analysis and mechanism of binding of the antisense RNA, RNAII and its target, RNAI." Mol Microbiol **42**(2): 527-37.
- Gualerzi, C. O., A. M. Giuliadori and C. L. Pon (2003). "Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes." J Mol Biol **331**(3): 527-39.
- Gualerzi, C. O., L. Brandi, E. Caserta, C. Garofalo, M. Lammi, A. La Teana, D. Petrelli, R. Spurio, J. Tomsic and C. L. Pon (2001). "Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **66**: 363-76.
- Guillier, M., F. Allemand, F. Dardel, C. A. Royer, M. Springer and C. Chiaruttini (2005). "Double molecular mimicry in *Escherichia coli*: binding of ribosomal protein L20 to its two sites in mRNA is similar to its binding to 23S rRNA." Mol Microbiol **56**(6): 1441-56.
- Hammer, B. K. and B. L. Bassler (2007). "Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11145-9.
- Han, Q., Q. Zhao, S. Fish, K. B. Simonsen, D. Vourloumis, J. M. Froelich, D. Wall and T. Hermann (2005). "Molecular recognition by glycoside pseudo base pairs and triples in an apramycin-RNA complex." Angew Chem Int Ed Engl **44**(18): 2694-700.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hanson, S., K. Berthelot, B. Fink, J. E. McCarthy and B. Suess (2003). "Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast." Mol Microbiol **49**(6): 1627-37.
- Hartz, D., D. S. McPheeters, R. Traut and L. Gold (1988). "Extension inhibition analysis of translation initiation complexes." Methods in Enzymology **164**: 419-25.
- Heath, J. D. and G. M. Weinstock (1991). "Tandem duplications of the *lac* region of the *Escherichia coli* chromosome." Biochimie **73**(4): 343-52.
- Heidrich, N. and S. Brantl (2003). "Antisense-RNA mediated transcriptional attenuation: importance of a U-turn loop structure in the target RNA of plasmid pIP501 for efficient inhibition by the antisense RNA." J Mol Biol **333**(5): 917-29.
- Helser, T. L., J. E. Davies and J. E. Dahlberg (1972). "Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*." Nat New Biol **235**(53): 6-9.
- Hendrick, J. P. and F. U. Hartl (1993). "Molecular chaperone functions of heat-shock proteins." Annu Rev Biochem **62**: 349-84.
- Henkin, T. M. (2008). "Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism." Genes Dev. **22**: 3383-90.
- Hoe, N. P. and J. D. Goguen (1993). "Temperature sensing in *Yersinia pestis*: Translation of the LcrF activator protein is thermally regulated." J Bacteriol **175**(24): 7901-9.

- Holmes, D. J. and E. Cundliffe (1991). "Analysis of a ribosomal RNA methylase gene from *Streptomyces tenebrarius* which confers resistance to gentamicin." Mol Gen Genet **229**(2): 229-37.
- Holmes, D. J., D. Drocourt, G. Tiraby and E. Cundliffe (1991). "Cloning of an aminoglycoside-resistance-encoding gene, *kamC*, from *Saccharopolyspora hirsuta*: comparison with *kamB* from *Streptomyces tenebrarius*." Gene **102**(1): 19-26.
- Husain, N., K. L. Tkaczuk, S. R. Tulsidas, K. H. Kaminska, S. Čubrilo, G. Maravić-Vlahoviček, J. M. Bujnicki and J. Sivaraman (2010). "Structural basis for the methylation of G1405 in 16S rRNA by aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm from an antibiotic producer: a diversity of active sites in m7G methyltransferases." Nucleic Acids Res **38**(12): 4120-32.
- Ilić-Tomić, T. (2010). Izučavanje translacione autoregulacije *sgm* gena *in vitro*. Beograd, Univerzitet u Beogradu. **PhD**.
- Ilić-Tomić, T., S. Marković and B. Vasiljević (2005). "Expression and purification of the Sgm protein from *E. coli*." J Serb Chem Soc **70**(6): 817-22.
- Inokuchi, Y., A. Hirashima, Y. Sekine, L. Janosi and A. Kaji (2000). "Role of ribosome recycling factor (RRF) in translational coupling." Embo J **19**(14): 3788-98.
- Jackson, D. W., K. Suzuki, L. Oakford, J. W. Simecka, M. E. Hart and T. Romeo (2002). "Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*." J Bacteriol **184**(1): 290-301.
- Jackson, R. J. (2000). A comparative view of initiation site selection mechanisms. Translational Control of Gene Expression. Sonnenberg, N, Hershey, J W B and Mathews, M B. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 127-83.
- Jacob, W. F., M. Santer and A. E. Dahlberg (1987). "A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S RNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins." Proc Natl Acad Sci USA **84**(14): 4757-61.
- Jenner, L., P. Romby, B. Rees, C. Schulze-Briese, M. Springer, C. Ehresmann, B. Ehresmann, D. Moras, G. Yusupova and M. Yusupov (2005). "Translational operator of mRNA on the ribosome: how repressor proteins exclude ribosome binding." Science **308**(5718): 120-3.
- Johansen, J., A. A. Rasmussen, M. Overgaard and P. Valentin-Hansen (2006a). "Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigma^E regulon: Role in down-regulation of outer membrane proteins." J Mol Biol **364**(1): 1-8.
- Johansen, S. K., C. E. Maus, B. B. Plikaytis and S. Douthwaite (2006b). "Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs." Mol Cell **23**(2): 173-82.
- Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer and P. Cossart (2002). "An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*." Cell **110**(5): 551-61.
- Jonas, K., A. N. Edwards, I. Ahmad, T. Romeo, U. Romling and O. Melefors (2010). "Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella typhimurium*." Environ Microbiol **12**(2): 524-40.
- Jovičić, A. (2005). *In vitro* sinteza RNK molekula sa potencijalnim regulatornim sekvencama *kgmB* gena, Univerzitet u Beogradu. **Dipl**.

- Kaberdin, V. R. and U. Bläsi (2006). "Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs." FEMS Microbiol Rev **30**(6): 967-79.
- Kawano, M., L. Aravind and G. Storz (2007). "An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin." Mol Microbiol **64**(3): 738-54.
- Kawano, M., T. Oshima, H. Kasai and H. Mori (2002). "Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a *cis*-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **45**(2): 333-49.
- Knapp, G. (1989). "Enzymatic approaches to probing of RNA secondary and tertiary structure." Methods Enzymol **180**: 192-212.
- Kojić, M. (1992). Kloniranje i karakterizacija gena za rezistenciju na gentamicin bakterije *Micromonospora zionensis*. Beograd, Univerzitet u Beogradu. **MSc**.
- Kojić, M. (1994). Analiza regulatornih regiona i ekspresija *sgm* gena bakterije *Micromonospora zionensis*. Beograd, Univerzitet u Beogradu. **PhD**.
- Kojić, M., L. Topisirović and B. Vasiljević (1992). "Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*." J Bacteriol **174**(23): 7868-72.
- Kojić, M., L. Topisirović and B. Vasiljević (1996). "Translational autoregulation of the *sgm* gene from *Micromonospora zionensis*." J Bacteriol **178**(18): 5493-8.
- Kojić, M., N. Milojević and B. Vasiljević (1999). "Gentamicin-resistance determinants confer background-dependent hygromycin B resistance." Microb Drug Resist **5**(3): 177-82.
- Kojić, M., S. Vojnović, N. Vukov and B. Vasiljević (2007). "Overexpression of *sgm* 5' UTR mRNA reduces gentamicin resistance in both *Escherichia coli* and *Micromonospora melanosporea* cells." Arch Biol Sci **59**(4): 273-80.
- Komarova, A. V., L. S. Tchufistova, E. V. Supina and I. V. Boni (2002). "Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation." RNA **8**(9): 1137-47.
- Komarova, A. V., L. S. Tchufistova, M. Dreyfus and I. V. Boni (2005). "AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(4): 1344-9.
- Konstantinović, M., V. Maksimović, G. Nikčević and V. Glišin (1991). "Hybrid PLtI promoter with dual regulation control." DNA Cell Biol **10**: 389-395.
- Kotra, L. P., J. Haddad and S. Mobashery (2000). "Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3249-56.
- Kozak, M. (1999). "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." Gene **234**(2): 187-208.
- Kozak, M. (2005). "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." Gene **361**: 13-37.
- Kubodera, T., M. Watanabe, K. Yoshiuchi, N. Yamashita, A. Nishimura, S. Nakai, K. Gomi and H. Hanamoto (2003). "Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae thiA* requires splicing of the intron containing a riboswitchlike domain in the 5'-UTR. ." FEBS Lett. **555**(3): 516-20.

- Lacalle, R. A., J. A. Tercero, J. Vara and A. Jimenez (1993). "Identification of the gene encoding an N-acetylpuromycin N-acetylhydrolase in the puromycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces alboniger*." J Bacteriol **175**(22): 7474-8.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-5.
- Laursen, B. S., H. P. Srensen, K. K. Mortensen and H. U. Sperling-Petersen (2005). "Initiation of protein synthesis in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **69**(1): 101-23.
- Legewie, S., D. Dienst, A. Wilde, H. Herzog and I. M. Axmann (2008). "Small RNAs establish delays and temporal thresholds in gene expression." Biophys J **95**(7): 3232-8.
- Lenz, D. H., K. C. Mok, B. N. Lilley, R. V. Kulkarni, N. S. Wingreen and B. L. Bassler (2004). "The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*." Cell **118**(1): 69-82.
- Lesage, P., H. N. Truong, M. Graffe, J. Dondon and M. Springer (1990). "Translated translational operator in *Escherichia coli*. Auto-regulation in the *infC-rpmI-rplT* operon." J Mol Biol **213**(3): 465-75.
- Lesage, P., C. Chiaruttini, M. Graffe, J. Dondon, M. Milet and M. Springer (1992). "Messenger RNA secondary structure and translational coupling in the *Escherichia coli* operon encoding translation initiation factor IF3 and the ribosomal proteins, L35 and L20." J Mol Biol **228**(2): 366-86.
- Levine, E., Z. Zhang, T. Kuhlman and T. Hwa (2007). "Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA." PLoS Biol. **5**(9): e229.
- Liu, M. Y. and T. Romeo (1997). "The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein." J Bacteriol **179**(14): 4639-42.
- Liu, M. Y., H. Yang and T. Romeo (1995). "The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability." J Bacteriol **177**(10): 2663-72.
- Liu, M. Y., G. Gui, B. Wei, J. F. Preston, L. Oakford, U. Yuksel, D. P. Giedroc and T. Romeo (1997). "The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*." J Biol Chem **272**(28): 17502-10.
- Lu, C., A. M. Smith, R. T. Fuchs, F. Ding, K. Rajashankar, T. M. Henkin and A. Ke (2008). "Crystal structures of the SAMIII/SMK riboswitch reveal the SAM-dependent translation inhibition mechanism." Nat Struct Mol Biol **15**(10): 1076-83.
- Macmaster, R., N. Zelinskaya, M. Savić, C. R. Rankin and G. L. Conn (2010). "Structural insights into the function of aminoglycoside-resistance A1408 16S rRNA methyltransferases from antibiotic-producing and human pathogenic bacteria." Nucleic Acids Res **38**(21): 7791-9.
- Magnet, S. and J. S. Blanchard (2005). "Molecular insights into aminoglycoside action and resistance." Chem Rev **105**(2): 477-98.
- Majdalani, N., S. Chen, J. Murrow, K. St John and S. Gottesman (2001). "Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA." Mol Microbiol **39**(5): 1382-94.

- Mandal, M., B. Boese, J. E. Barrick, W. C. Winkler and R. R. Breaker (2003). "Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria." Cell **113**(5): 577-86.
- Mandal, M., M. Lee, J. E. Barrick, Z. Weinberg, G. M. Emilsson, W. L. Ruzzo and R. R. Breaker (2004). "A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression." Science **306**(5694): 275-9.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-62.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Maravić-Vlahoviček, G., S. Čubrilo, K. L. Tkaczuk and J. M. Bujnicki (2008). "Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm." Biochim Biophys Acta **1784**(4): 582-90.
- Marković, S. (2005). Analiza autoregulacije KgmB metilaze iz soja *Streptomyces tenebrarius*. Beograd, Univerzitet u Beogradu. MSc.
- Marković, S., S. Vojnović, M. Jovanović and B. Vasiljević (2005). "Different expression level of two KgmB-His fusion proteins." J Serb Chem Soc **70**(12): 1401-7.
- Martin, J. L. and F. M. McMillan (2002). "SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold." Curr Opin Struct Biol **12**(6): 783-93.
- Marzi, S., A. G. Myasnikov, A. Serganov, C. Ehresmann, P. Romby, M. Yusupov and B. P. Klaholz (2007). "Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome." Cell **130**(6): 1019-31.
- Masse, E. and S. Gottesman (2002). "A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4620-5.
- Masse, E., C. K. Vanderpool and S. Gottesman (2005). "Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(20): 6962-71.
- Masse, E., H. Salvail, G. Desnoyers and M. Arguin (2007). "Small RNAs controlling iron metabolism." Curr Opin Microbiol **10**(2): 140-5.
- Mattheakis, L., L. Vu, F. Sor and M. Nomura (1989). "Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 448-52.
- Mattheakis, L. C. and M. Nomura (1988). "Feedback regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*: translational coupling and mRNA processing." J Bacteriol **170**(10): 4484-92.
- McDaniel, B. A., F. J. Grundy and T. M. Henkin (2003). "Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3083-8.
- Mehta, P., S. Goyal and N. S. Wingreen (2008). "A quantitative comparison of sRNA-based and protein-based gene regulation." Mol Syst Biol **4**: e221.
- Mehta, R. and W. S. Champney (2002). "30S ribosomal subunit assembly is a target for inhibition by aminoglycosides in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **46**(5): 1546-9.

- Mercante, J., A. N. Edwards, A. K. Dubey, P. Babitzke and T. Romeo (2009). "Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression." J Mol Biol **392**(2): 511-28.
- Merino, E., P. Babitzke and C. Yanofsky (1995). "*trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP)-*trp* leader RNA interactions mediate translational as well as transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis trp* operon." J Bacteriol **177**(22): 6362-70.
- Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics (Cold Spring Harbor Laboratory). NY, Cold Spring Harbor.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, G. W. Witherell and O. C. Uhlenbeck (1987). "Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template." Nucleic Acids Res **15**(21): 8783-8798.
- Milojević, N. (1998). Regulacija ekspresije gena za različite metilaze 16S rRNK kod proizvođača aminoglikozidnih antibiotika. Beograd, Univerzitet u Beogradu. MSc.
- Miljković, M. and B. Vasiljević (2002). "In trans regulation of the *sgm::lacZ* fusion." Arch Biol Sci **54**: 1-2.
- Miranda-Rios, J., M. Navarro and M. Soberon (2001). "A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria." Proc Natl Acad Sci USA **98**(17): 9736-41.
- Mironov, A. S., I. Gusarov, R. Rafikov, L. E. Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov and E. Nudler (2002). "Sensing small molecules by nascent RNA: A mechanism to control transcription in bacteria." Cell **111**(5): 747-56.
- Moine, H., B. Ehresmann, C. Ehresmann and P. Romby (1998). Probing RNA structure and function in solution. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moll, I., G. Grill, A. Gründling and U. Bläsi (2002). "Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the Dead/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **44**(5): 1387-96.
- Moll, I., G. Hirokawa, M. C. Kiel, A. Kaji and U. Bläsi (2004). "Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs." Nucleic Acids Res **32**(11): 3354-63.
- Moll, I., D. Leitsch, T. Steinhauser and U. Bläsi (2003). "RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein." EMBO Rep **4**(3): 284-9.
- Moller-Jensen, J., T. Franch and K. Gerdes (2001). "Temporal translational control by a metastable RNA structure." J Biol Chem **276**(38): 35707-13.
- Moller, T., T. Franch, P. Hojrup, D. R. Keene, H. P. Bachinger, R. G. Brennan and P. Valentin-Hansen (2002). "Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction." Mol Cell **9**(1): 23-30.
- Montange, R. K. and R. T. Batey (2006). "Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element." Nature **441**(7097): 1172-5.
- Morita, M., M. Kanemori, H. Yanagi and T. Yura (1999a). "Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure." J Bacteriol **181**(2): 401-10.
- Morita, M. T., Y. Tanaka, T. S. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi and T. Yura (1999b). "Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor." Genes Dev **13**(6): 655-65.

- Morita, T., Y. Mochizuki and H. Aiba (2006). "Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction." Proc Natl Acad Sci USA **103**(13): 4858-63.
- Muffler, A., D. Fischer and R. Hengge-Aronis (1996). "The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*." Genes Dev **10**(9): 1143-51.
- Nakamoto, T. (2007). "The initiation of eukaryotic and prokaryotic protein synthesis: a selective accessibility and multisubstrate enzyme reaction." Gene **403**(1-2): 1-5.
- Nakamoto, T. (2009). "Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis." Gene **432**: 1-6.
- Narberhaus, F. (2010). "Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs." RNA Biol **7**(1): 84-9.
- Narberhaus, F., T. Waldminghaus and S. Chowdhury (2006). "RNA thermometers." FEMS Microbiol Rev **30**(1): 3-16.
- Nevskaya, N., S. Tishchenko, A. Gabdoulkhakov, E. Nikonova, O. Nikonov, A. Nikulin, O. Platonova, M. Garber, S. Nikonov and W. Piendl (2005). "Ribosomal protein L1 recognizes the same specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA." Nucleic Acids Res **33**(2): 478-85.
- Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis." Science **289**(5481): 920-30.
- Nocker, A., N. P. Krstulovic, X. Perret and F. Narberhaus (2001a). "ROSE elements occur in disparate rhizobia and are functionally interchangeable between species." Arch Microbiol **176**(1-2): 44-51.
- Nocker, A., T. Hausherr, S. Balsiger, N. P. Krstulovic, H. Hennecke and F. Narberhaus (2001b). "A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes." Nucleic Acids Res **29**(23): 4800-7.
- Nogueira, T. and M. Springer (2000). "Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria." Curr Opin Microbiol **3**(2): 154-8.
- Nogueira, T., M. de Smit, M. Graffe and M. Springer (2001). "The relationship between translational control and mRNA degradation for the *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene." J Mol Biol **310**(4): 709-22.
- Noller, H. F. (2005). "RNA structure: reading the ribosome." Science **309**(5740): 1508-14.
- O'Connor, M., T. Asai, C. L. Squires and A. E. Dahlberg (1999). "Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8973-8.
- O'Farrell, H. C., J. N. Scarsdale and J. P. Rife (2004). "Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in *Escherichia coli*." J Mol Biol **339**(2): 337-53.
- O'Farrell, H. C., N. Pulicherla, P. M. Desai and J. P. Rife (2006). "Recognition of a complex substrate by the KsgA/Dim1 family of enzymes has been conserved throughout evolution." RNA **12**(5): 725-33.
- O'Donnell, S. M. and G. R. Janssen (2002). "Leaderless mRNAs Bind 70S Ribosomes More Strongly than 30S Ribosomal Subunits in *Escherichia coli*." J Bacteriol **184**: 6730-3.

- Ogle, J. M. and V. Ramakrishnan (2005). "Structural insights into translational fidelity." Annu Rev Biochem **74**(1): 129-77.
- Ogle, J. M., D. E. Brodersen, W. M. J. Clemons, M. J. Tarry, A. P. Carter and V. Ramakrishnan (2001). "Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit." Science **292**(5518): 897-902.
- Okamoto, S., A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki and K. Ochi (2007). "Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria." Mol Microbiol **63**(4): 1096-106.
- Owens, R. M., G. Pritchard, P. Skipp, M. Hodey, S. R. Connell, K. H. Nierhaus and C. D. O'Connor (2004). "A dedicated translation factor controls the synthesis of the global regulator Fis." Embo J **23**(16): 3375-85.
- Pardo, J. M., F. Malpartida, M. Rico and A. Jimenez (1985). "Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygrosopicus*-the producing organism." J Gen Microbiol **131**(6): 1289-98.
- Perichon, B., P. Courvalin and M. Galimand (2007). "Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **51**(7): 2464-9.
- Pfister, P., M. Risch, D. E. Brodersen and E. C. Bottger (2003). "Role of 16S rRNA Helix 44 in Ribosomal Resistance to Hygromycin B." Antimicrob Agents Chemother **47**(5): 1496-502.
- Philippe, C., F. Eyermann, L. Benard, C. Portier, B. Ehresmann and C. Ehresmann (1993). "Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4394-8.
- Philippe, C., L. Benard, C. Portier, E. Westhof, B. Ehresmann and C. Ehresmann (1995). "Molecular dissection of the pseudoknot governing the translational regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein S15." Nucleic Acids Res **23**(1): 18-28.
- Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite (2005). "The bacterial ribosome as a target for antibiotics." Nat Rev Microbiol **3**(11): 870-81.
- Poiata, E., M. M. Meyer, T. D. Ames and R. R. Breaker (2009). "A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria." RNA **15**(11): 2046-56.
- Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." Nature **258**: 598-9.
- Prevost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J. F. Jacques, E. Phaneuf and E. Masse (2007). "The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis." Mol Microbiol **64**(5): 1260-73.
- Repoila, F., N. Majdalani and S. Gottesman (2003). "Small non-coding RNAs, coordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm." Mol Microbiol **48**(4): 855-61.

- Ringquist, S., S. Shinedling, D. Barrick, L. Green, J. Binkley, G. D. Stormo and L. Gold (1992). "Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site." Mol Microbiol **6**(9): 1219-29.
- Robertson, G. T. and R. M. J. Roop (1999). "The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice." Mol Microbiol **34**(4): 690-700.
- Romby, P. and M. Springer (2003). "Bacterial translational control at atomic resolution." Trends Genet **19**(3): 155-61.
- Romby, P., F. Vandenesch and E. G. H. Wagner (2006). "The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression." Curr Opin Microbiol **9**(2): 229-36.
- Romby, P., C. Brunel, J. Caillet, M. Springer, M. Grunberg-Manago, E. Westhof, C. Ehresmann and B. Ehresmann (1992). "Molecular mimicry in translational control of *E. coli* threonyl-tRNA synthetase gene. Competitive inhibition in tRNA aminoacylation and operator-repressor recognition switch using tRNA identity rules." Nucleic Acids Res **20**(21): 5633-40.
- Romeo, T., M. Gong, M. Y. Liu and A. M. Brun-Zinkernagel (1993). "Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties." J Bacteriol **175**(15): 4744-55.
- Sabnis, N. A., H. Yang and T. Romeo (1995). "Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*." J Biol Chem **270**(49): 29096-104.
- Sacerdot, C., J. Caillet, M. Graffe, F. Eyermann, B. Ehresmann, C. Ehresmann, M. Springer and P. Romby (1998). "The *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene contains a split ribosomal binding site interrupted by a hairpin structure that is essential for autoregulation." Mol Microbiol **29**(4): 1077-90.
- Sankaranarayanan, R., A. C. Dock-Bregeon, P. Romby, J. Caillet, M. Springer, B. Rees, C. Ehresmann, B. Ehresmann and D. Moras (1999). "The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site." Cell **97**(3): 371-81.
- Savić, M. (2009). Structural basis of aminoglycoside antibiotics resistance through ribosomal RNA methylation. Manchester, UK, University of Manchester. **PhD**.
- Savić, M., T. Ilić-Tomić, R. Macmaster, B. Vasiljević and G. L. Conn (2008). "Critical residues for cofactor binding and catalytic activity in the aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm." J Bacteriol **190**(17): 5855-61.
- Savić, M., J. Lovrić, T. I. Tomić, B. Vasiljević and G. L. Conn (2009). "Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics." Nucleic Acids Res **37**(16): 5420-31.
- Schlax, O. J. and D. J. Worhunsky (2003). "Translational repression mechanisms in prokaryotes." Mol Microbiol **48**(5): 1157-69.
- Schlax, P. J., K. A. Xavier, T. C. Gluick and D. E. Draper (2001). "Translational repression of the *Escherichia coli* alpha operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex." J Biol Chem **276**(42): 38494-501.

- Schlunzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath and F. Franceschi (2001). "Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria." Nature **413**(6858): 814-21.
- Schmitt, E., M. Galimand, M. Panvert, P. Courvalin and Y. Mechulam (2009). "Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases." J Mol Biol **388**(3): 570-82.
- Schnappinger, D. and W. Hillen (1996). "Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms." Arch Microbiol **165**(6): 359-69.
- Schneider, R., R. Lurz, G. Luder, C. Tolksdorf, A. Travers and G. Muskhelishvili (2001). "An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA." Nucleic Acids Res **29**(24): 5107-14.
- Schneider, T. D., G. D. Stormo, L. Gold and A. Ehrenfeucht (1986). "Information content of binding sites on nucleotide sequences." J Mol Biol **188**(3): 415-31.
- Schubert, H. L., R. M. Blumenthal and X. Cheng (2003). "Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence." Trends Biochem Sci **28**(6): 329-35.
- Sengupta, J., R. K. Agrawal and J. Frank (2001). "Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 11991-6.
- Serganov, A. (2010). "Determination of riboswitch structures: light at the end of the tunnel?" RNA Biol **7**(1): 98-103.
- Serganov, A. and D. J. Patel (2007). "Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins." Nat Rev Genet **8**(10): 776-89.
- Serganov, A., A. Polonskaia, A. T. Phan, R. R. Breaker and D. J. Patel (2006). "Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch." Nature **441**(9097): 1167-71.
- Setzer, D. R. (1999). Measuring equilibrium and kinetic constants using gel retardation assays. Methods in Molecular Biology. Haynes, S R. Totowa, NJ, Humana Press Inc. **118**: 115-28.
- Shandrick, S., Q. Zhao, Q. Han, B. K. Ayida, M. Takahashi, G. C. Winters, K. B. Simonsen, D. Vourloumis and T. Hermann (2004). "Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site." Angew Chem Int Ed Engl **43**(24): 3177-82.
- Sharma, C. M., F. Darfeuille, T. H. Plantinga and J. Vogel (2007). "A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites." Genes Dev **21**(21): 2804-17.
- Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare and G. H. Miller (1993). "Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes." Microbiol Rev **57**(1): 138-63.
- Shimoni, Y., G. Friedlander, G. Hetzroni, G. Niv, S. Altuvia, O. Biham and H. Margalit (2007). "Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: A quantitative view." Mol Syst Biol **3**: e138.
- Shine, J. and L. Dalgarno (1974). "The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosomal binding sites." Proc Natl Acad Sci USA **71**(4): 1342-6.

- Shokeen, S., S. Patel, T. J. Greenfield, C. Brinkman and K. E. Weaver (2008). "Translational regulation by an intramolecular stem-loop is required for intermolecular RNA regulation of the *par* addiction module." J Bacteriol **190**(18): 6076-83.
- Shultzaberger, R. K., R. E. Bucheimer, K. E. Rudd and T. D. Schneider (2001). "Anatomy of *Escherichia coli* ribosome binding sites." J Mol Biol **313**(1): 215-28.
- Skeggs, P. A., D. J. Holmes and E. Cundliffe (1987). "Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes." J Gen Microbiol **133**(4): 915-23.
- Sledjeski, D. D., C. Whitman and A. Zhang (2001). "Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA." J Bacteriol **183**(6): 1997-2005.
- Sonnleitner, E., S. Hagens, F. Rosenau, S. Wilhelm, A. Habel, K. E. Jager and U. Bläsi (2003). "Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1." Microb Pathog **35**(5): 217-28.
- Sorensen, M. A., J. Fricke and S. Pedersen (1998). "Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli* *in vivo*." J Mol Biol **280**(4): 561-9.
- Spedding, G. and D. E. Draper (1993). "Allosteric mechanism for translational repression in the *Escherichia coli* alpha operon." Proc Natl Acad Sci USA **90**(10): 4399-403.
- Spedding, G., T. C. Gluick and D. E. Draper (1993). "Ribosome initiation complex formation with the pseudoknotted alpha operon messenger RNA." J Mol Biol **229**(3): 609-22.
- Sprengart, M. L., E. Fuchs and A. G. Porter (1996). "The downstream box: an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*." Embo J **15**(3): 665-74.
- Sprengel, R., B. Reiss and H. Schaller (1985). "Translationally coupled initiation of protein synthesis in *Bacillus subtilis*." Nucleic Acids Res **13**(3): 893-909.
- Springer, M. (1996). Translational regulation in *E. coli* and bacteriophage. Regulation of Gene Expression in E. coli. Lin, E C C and Lynch, A S. Austin: RG Landes: 85-126.
- Springer, M., C. Portier and M. Grunberg-Manago (1998). RNA Mimicry in the Translational Apparatus. RNA Structure and Function. Simons, R W and Grunberg-Manago, M. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 377-413.
- Steitz, J. A. and K. Jakes (1975). "How ribosomes select initiator regions in mRNA: Base pair formation between the 3'-terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli* " Proc Natl Acad Sci USA **72**(12): 4734-8.
- Subramanian, A. R. (1983). "Structure and functions of ribosomal protein S1." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **28**: 101-42.
- Sudarsan, N., J. E. Barrick and R. R. Breaker (2003). "Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes." RNA **9**(6): 644-7.
- Sudarsan, N., M. C. Hammond, K. F. Block, R. Welz, J. E. Barrick, A. Roth and R. R. Breaker (2006). "Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions." Science **314**(5797): 300-4.

- Suess, B., B. Fink, C. Berens, R. Stentz and W. Hillen (2004). "A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression *in vivo*." Nucleic Acids Res **32**(4): 1610-4.
- Svenningsen, S. L., C. M. Waters and B. L. Bassler (2008). "A negative feedback loop involving small RNAs accelerates *Vibrio cholerae*'s transition out of quorum-sensing mode." Genes Dev **22**(2): 226-38.
- Takyar, S., R. P. Hickerson and H. F. Noller (2005). "mRNA helicase activity of the ribosome." Cell **120**(1): 49-58.
- Tamura, T., Y. Ishida, M. Otaguro, K. Hatano and K. Suzuki (2008). "Classification of '*Streptomyces tenebrarius*' Higgins and Kastner as *Streptoalloteichus tenebrarius* nom. rev., comb. nov., and emended description of the genus *Streptoalloteichus*." Int J Syst Evol Microbiol **58**(3): 688-91.
- Tang, C. K. and D. E. Draper (1990). "Evidence for allosteric coupling between the ribosome and repressor binding sites of a translationally regulated mRNA." Biochemistry **29**(18): 4434-9.
- Tchufistova, L. S., A. V. Komarova and I. V. Boni (2003). "A key role for the mRNA leader structure in translational control of ribosomal protein S1 synthesis in gamma-proteobacteria." Nucleic Acids Res **31**(23): 6996-7002.
- Tercero, J. A., J. C. Espinosa, R. A. Lacalle and A. Jimenez (1996). "The biosynthetic pathway of the aminonucleoside antibiotic puromycin, as deduced from the molecular analysis of the *pur* cluster of *Streptomyces alboniger*." J Biol Chem **271**(3): 1579-90.
- Thisted, T. and K. Gerdes (1992). "Mechanism of post-segregational killing by the *hok/sok* system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates *hok* gene expression indirectly through the overlapping *mok* gene." J Mol Biol **223**(1): 41-54.
- Thore, S., M. Leibungut and N. Ban (2006). "Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand." Science **312**(5777): 1208-11.
- Tinsley, R. A., J. R. Furchak and N. G. Walter (2007). "*Trans*-acting *glmS* catalytic riboswitch: locked and loaded." RNA **13**(4): 468-77.
- Toledo-Arana, A., F. Repoila and P. Cossart (2007). "Small noncoding RNAs controlling pathogenesis." Curr Opin Microbiol **10**(2): 182-8.
- Tomić, T. I., I. Morić, G. L. Conn and B. Vasiljević (2008). "Aminoglycoside resistance genes *sgm* and *kgmB* protect bacterial but not yeast small ribosomal subunits *in vitro* despite high conservation of the rRNA A-site." Res Microbiol **159**(9-10): 658-62.
- Torres-Larios, A., A. C. Dock-Bregeon, P. Romby, B. Rees, R. Sankaranarayanan, J. Caillet, M. Springer, C. Ehresmann, B. Ehresmann and D. Moras (2002). "Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase." Nat Struct Biol **9**(5): 343-7.
- Trajković, S. (1994). Uticaj *grm* gena na ekspresiju *sgm-lacZ* fuzije. Beograd, Univerzitet u Beogradu. **Dipl.**
- Tsui, H. C., G. Feng and M. E. Winkler (1997). "Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **179**(23): 7476-87.

- Tu, D., G. Blaha, P. B. Moore and T. A. Steitz (2005). "Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance." *Cell* **121**(2): 257-70.
- Tu, K. C., C. M. Waters, S. L. Svenningsen and B. L. Bassler (2008). "A small-RNA-mediated negative feedback loop controls quorum-sensing dynamics in *Vibrio harveyi*." *Mol Microbiol* **70**(4): 896-907.
- Tzareva, N. V., V. I. Makhno and I. V. Boni (1994). "Ribosome-messenger recognition in the absence of the Shine-Dalgarno interactions." *FEBS Lett* **337**(2): 189-94.
- Udekwu, K. I., F. Darfeuille, J. Vogel, J. Reimegard, E. Holmqvist and E. G. Wagner (2005). "Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA." *Genes Dev* **19**(19): 2355-66.
- Urbanowski, M. L., L. T. Stauffer and G. V. Stauffer (2000). "The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **37**(4): 856-68.
- Vajić, S. (2003). Analiza regulatornih sekvenci *kmgB* gena bakterije *Streptomyces tenebrarius*. Beograd, Univerzitet u Beogradu. MSc.
- Vajić, S., N. Anastasov and B. Vasiljević (2004). "The *kmgB* gene, encoding ribosomal RNA methylase from *Streptomyces tenebrarius*, is autogenously regulated." *Arch Microbiol* **182**(6): 475-81.
- Valbuzzi, A., P. Gollnick, P. Babitzke and C. Yanofsky (2002). "The anti-trp RNA-binding attenuation protein (Anti-TRAP), AT, recognizes the tryptophan-activated RNA binding domain of the TRAP regulatory protein." *J Biol Chem* **277**(12): 10608-13.
- Valentin-Hansen, P., J. Johansen and A. A. Rasmussen (2007). "Small RNAs controlling outer membrane porins." *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 152-5.
- van Gemen, B., J. Twisk and P. H. van Knippenberg (1989). "Autogenous regulation of the *Escherichia coli ksgA* gene at the level of translation." *J Bacteriol* **171**(7): 4002-8.
- Vasiljević, B. and E. Cundliffe (1990). "Cloning of *grm*, a gentamicin resistance gene from *Micromonospora purpurea*." *J Cell Biochem* **14A**: 12.
- Večerek, B., I. Moll and U. Bläsi (2005). "Translational autocontrol of the *Escherichia coli hfq* RNA chaperone gene." *RNA* **11**(6): 976-84.
- Večerek, B., I. Moll and U. Bläsi (2007). "Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding." *Embo J* **26**(4): 965-75.
- Večerek, B., I. Moll, T. Afonyushkin, V. Kaberdin and U. Bläsi (2003). "Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **50**(3): 897-909.
- Vester, B. and S. Douthwaite (2001). "Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(1): 1-12.
- Vicens, Q. and E. Westhof (2003). "RNA as a drug target: the case of aminoglycosides." *ChemBiochem* **4**(10): 1018-23.
- Vila-Sanjurjo, A., B. S. Schuwirth, C. W. Hau and J. H. Cate (2004). "Structural basis for the control of translation initiation during stress." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1054-9.
- Vojnović, S., T. Ilić-Tomić, M. Savić, S. Bajkić, I. Morić and B. Vasiljević (2010). Comparative analysis of 16S rRNA methyltransferases conferring resistance to aminoglycoside antibiotics in producing strains. *Current Research, Technology and*

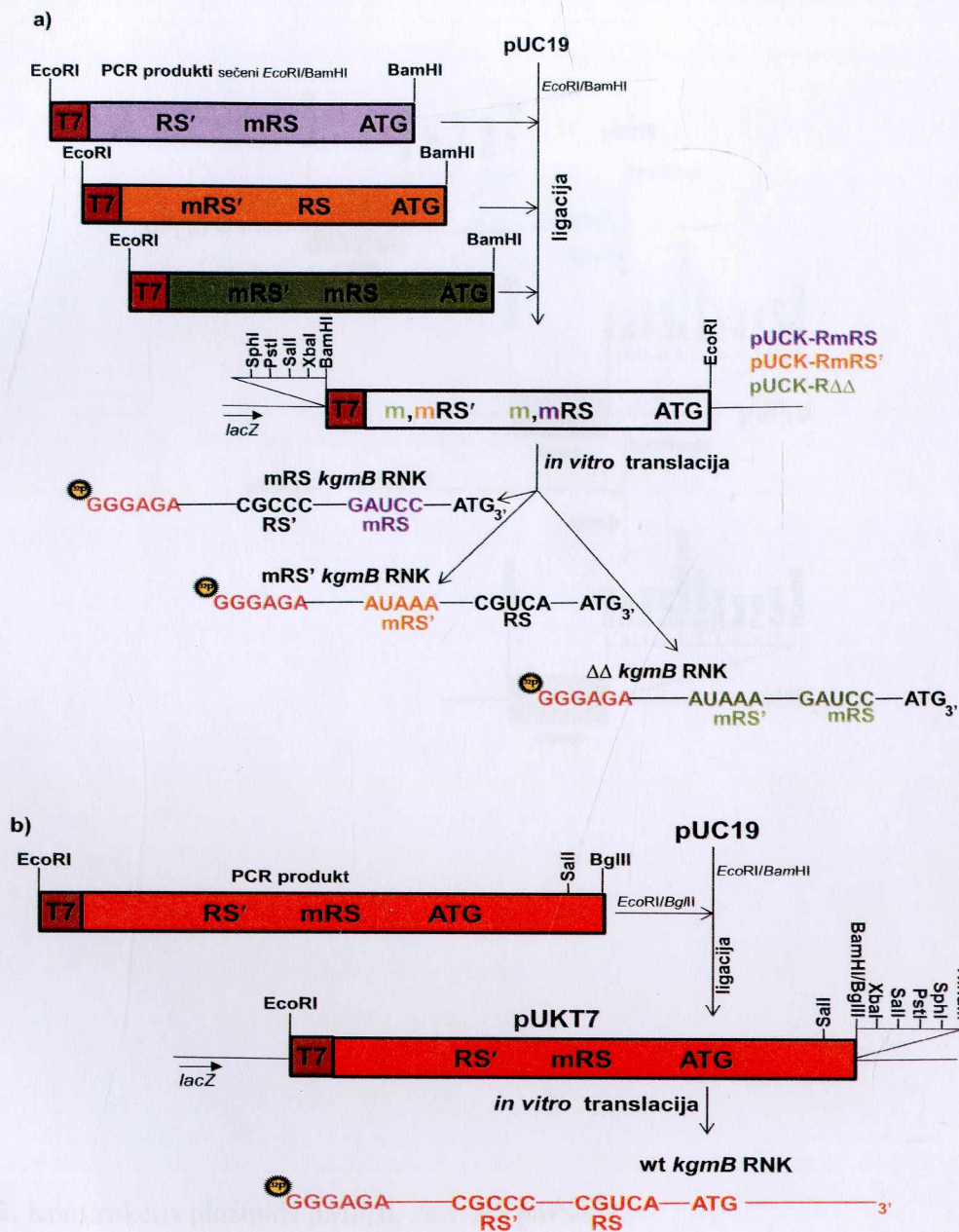
- Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Mendez-Vilas, A, Formatex Research Center: 501-8.
- Vytvytska, O., I. Moll, V. R. Kaberdin, A. von Gabain and U. Bläsi (2000). "Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding." Genes Dev **14**(9): 1109-18.
- Wachino, J., K. Shibayama, H. Kurokawa, K. Kimura, K. Yamane, S. Suzuki, N. Shibata, Y. Ike and Y. Arakawa (2007). "Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides." Antimicrob Agents Chemother **51**(12): 4401-9.
- Wachino, J., K. Yamane, K. Shibayama, H. Kurokawa, N. Shibata, S. Suzuki, Y. Doi, K. Kimura, Y. Ike and Y. Arakawa (2006). "Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides." Antimicrob Agents Chemother **50**(1): 178-84.
- Wang, J. X. and R. R. Breaker (2008). "Riboswitches that sense S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine." Biochem Cell Biol **86**(2): 157-68.
- Wang, X., A. K. Dubey, K. Suzuki, C. S. Baker, P. Babitzke and T. Romeo (2005). "CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **56**(6): 1648-63.
- Waters, L. and G. Storz (2009). "Regulatory RNAs in bacteria." Cell **136**(4): 615-28.
- Weaver, K. E., K. D. Jensen, A. Colwell and S. I. Sriram (1996). "Functional analysis of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded stability determinant *par*." Mol Microbiol **20**(1): 53-63.
- Weaver, K. E., E. A. Ehli, J. S. Nelson and S. Patel (2004). "Antisense RNA regulation by stable complex formation in the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 *par* addiction system." J Bacteriol **186**(19): 6400-8.
- Wei, B. L., A. M. Brun-Zinkernagel, J. W. Simecka, B. M. Pruss, P. Babitzke and T. Romeo (2001). "Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **40**(1): 245-56.
- Weigand, J. E., M. Sanchez, E. B. Gunnesch, S. Zeiher, R. Schroeder and B. Suess (2008). "Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation." RNA **14**(1): 89-97.
- Weilbacher, T., K. Suzuki, A. K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C. S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke and T. Romeo (2003). "A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **48**(3): 657-70.
- Weinberg, Z., E. E. Regulski, M. C. Hammond, J. E. Barrick, Z. Yao, W. L. Ruzzo and R. R. Breaker (2008). "The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches." RNA **14**(5): 822-8.
- Weisblum, B. (1995). "Erythromycin resistance by ribosome modification." Antimicrob Agents Chemother **39**(3): 577-85.
- Weyens, G., D. Charlier, M. Roovers, A. Pierard and N. Glansdorff (1988). "On the role of the Shine-Dalgarno sequence in determining the efficiency of translation initiation

- at a weak start codon in the *car* operon of *Escherichia coli* K12." J Mol Biol **204**(4): 1045-8.
- Wilson, D. N. and K. H. Nierhaus (2007). "The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(3): 187-219.
- Winkler, W., A. Nahvi, N. Sudarsan, J. Barrick and R. R. Breaker (2003). "An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine." Nat Struct Biol **10**(9): 701-7.
- Winkler, W. C. and R. R. Breaker (2005). "Regulation of bacterial gene expression by riboswitches." Annu Rev Microbiol **59**(1): 487-517.
- Winkler, W. C., A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins and R. R. Breaker (2004). "Control of gene expression by a natural metabolite-binding ribozyme." Nature **428**(6980): 281-6.
- Wu, C. J. and G. R. Janssen (1997). "Expression of a streptomycete leaderless mRNA encoding chloramphenicol acetyltransferase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(21): 6824-30.
- Xu, Z., H. C. O'Farrell, J. P. Rife and G. M. Culver (2008). "A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis." Nat Struct Mol Biol **15**(5): 534-6.
- Yakhnin, A. V. and P. Babitzke (2002). "NusA-stimulated RNA polymerase pausing and termination participates in the *Bacillus subtilis trp* operon attenuation mechanism *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11067-72.
- Yakhnin, A. V., H. Yakhnin and P. Babitzke (2006). "RNA polymerase pausing regulates translation initiation by providing additional time for TRAP-RNA interaction." Mol Cell **24**(4): 547-57.
- Yamanaka, K. (1999). "Cold shock response in *Escherichia coli*." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(2): 193-202.
- Yamane, K., Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato and Y. Arakawa (2004). "Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2069-74.
- Yang, H., M. Y. Liu and T. Romeo (1996). "Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product." J Bacteriol **178**(4): 1012-7.
- Yanish-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1984). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**: 103-19.
- Yoshizawa, S., D. Fourmy and J. D. Puglisi (1998). "Structural origins of gentamicin antibiotic action." Embo J **17**(22): 6437-48.
- Yoshizawa, S., D. Fourmy and J. D. Puglisi (1999). "Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA." Science **285**(5434): 1722-5.
- Yousef, M. R., F. J. Grundy and T. M. Henkin (2005). "Structural transitions induced by the interaction between tRNA^{Gly} and the *Bacillus subtilis glyQS* T box leader RNA." J Mol Biol **349**(2): 273-87.
- Yu, F., L. Wang, J. Pan, D. Yao, C. Chen, T. Zhu, Q. Lou, J. Hu, Y. Wu, X. Zhang, Z. Chen and D. Qu (2009). "Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella*

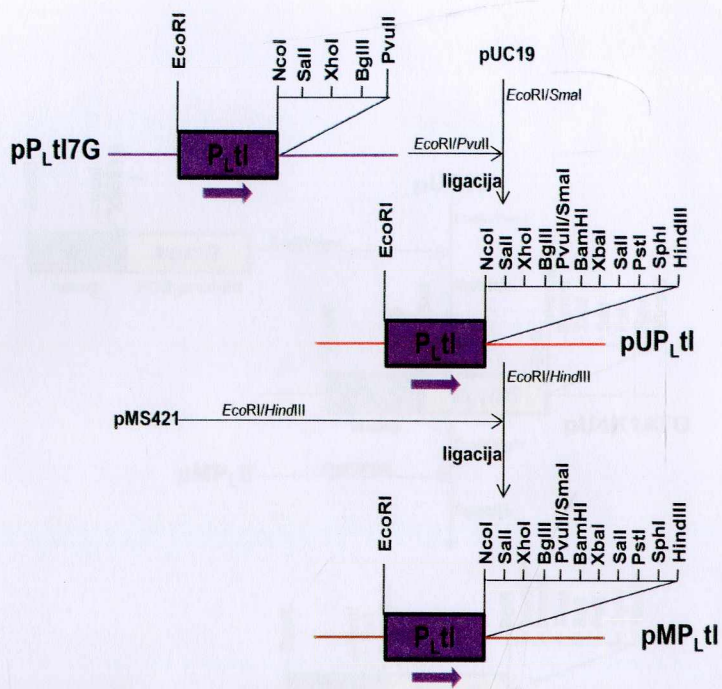
- pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate." Diagn Microbiol Infect Dis **64**(1): 57-63.
- Yu, J. S., S. Madison-Antenucci and D. A. Steege (2001). "Translation at higher than an optimal level interferes with coupling at an intercistronic junction." Mol Microbiol **42**(3): 821-34.
- Yusupova, G. Z., M. M. Yusupov, J. H. Cate and H. F. Noller (2001). "The path of messenger RNA through the ribosome." Cell **106**(2): 233-41.
- Zelinskaya, N., C. R. Rankin, R. Macmaster, M. Savić and G. L. Conn (2011). "Expression, purification and crystallization of adenosine 1408 aminoglycoside-resistance rRNA methyltransferases for structural studies." Protein Expr Purif **75**(1): 89-94.
- Zengel, J. M. and L. Lindahl (1994). "Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **47**: 331-70.
- Zhang, A., K. M. Wassarman, J. Ortega, A. C. Steven and G. Storz (2002). "The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs." Mol Cell **9**(1): 11-22.
- Zhang, J. and M. P. Deutscher (1992). "A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2605-9.



PRILOZI

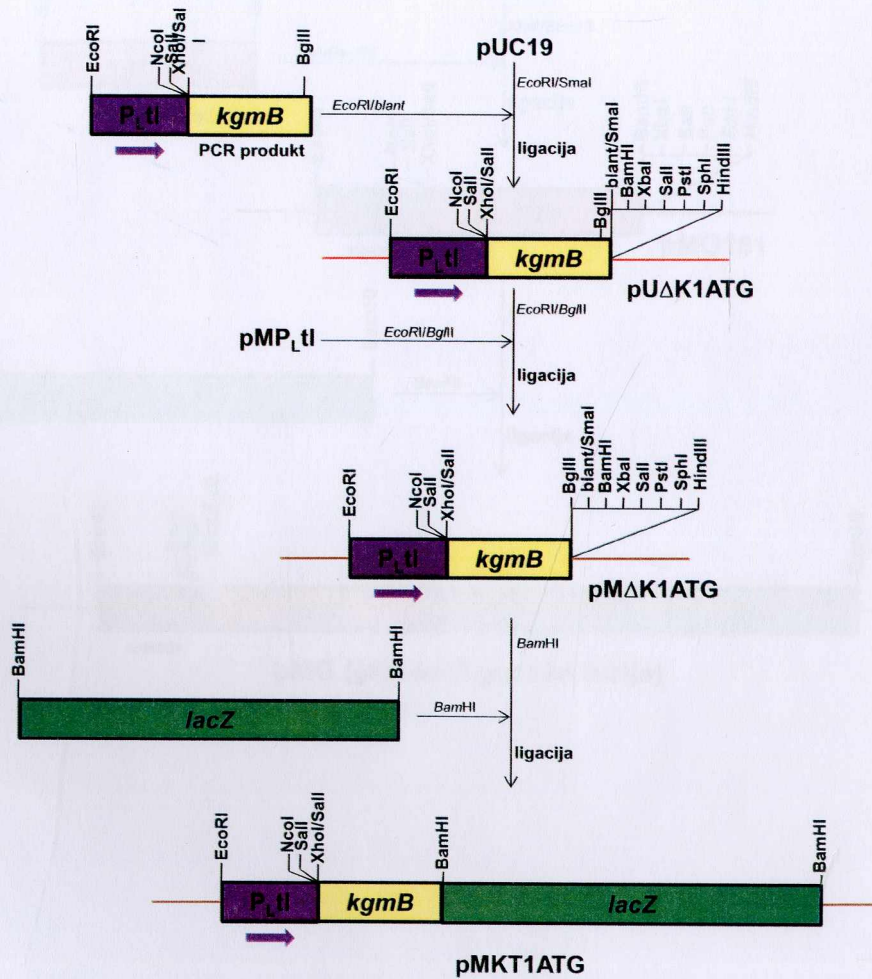


Prilog 1. Konstrukcija vektora sa kojih su sintetisani različiti RNK molekuli korišćeni u *in vitro* eksperimentima. a) Konstrukcija plazmida pUCK-RmRS (matrica za mRS *kgmB* RNK), pUCK-RmRS' (matrica za mRS' *kgmB* RNK) i pUCK-RΔΔ (matrica za ΔΔ *kgmB* RNK). b) Konstrukcija plazmida pUKT7 sa kog se sintetiše wt *kgmB* RNK različite dužine: 305 nt (pUKT7 linearizovan sa *XbaI*) i 198 nt (pUKT7 linearizovan sa *SalI* iz kodirajućeg dela gena).

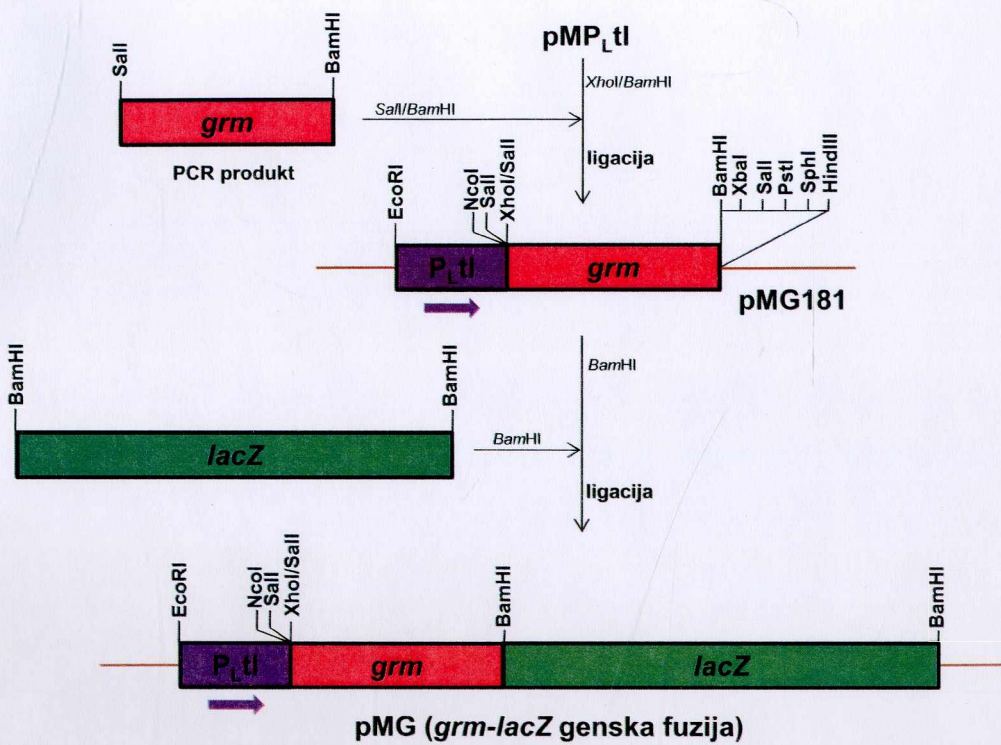


Prilog 2. Konstrukcija plazmida pMP_Ltl, derivata pMS421.

Prilog 3. Konstrukcija plazmida pMKT18TD. Priloženo je na 2. sliki nekoliko genotipičkih shema za stvaranje plazmida pMKT18TD. Priloženo je i shema za stvaranje plazmida pMKT18TD. Priloženo je i shema za stvaranje plazmida pMKT18TD.



Prilog 3. Konstrukcija plazmida pMKT1ATG gde je *lac Z* reporter gen fuzionisan sa *kgmB* genom odmah nakon ATG start kodona.



Prilog 4. Konstrukcija plazmida pMG koji nosi *grmA-lac Z* gensku fuziju.