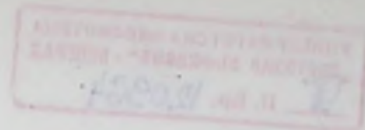


PA 17451



UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET, BEOGRAD

ID=24781327

Milija Z. Jovanović

ANALIZA EKSPRESIJE GENA KOJI OBEZBEĐUJE  
REZISTENCIJU BAKTERIJE *Escherichia coli* K12 NA  
ANTIBIOTIK NOVOBIOCIN

doktorska disertacija

Beograd, 2002.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА  
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ" - БЕОГРАД  
И. Бр. 120964

UNIVERSITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET, BEOGRAD

Milica Y. Jovanovic

ANALIZA EKSPRESIJE GENA KOD OBEZBEBUJE  
REGISTRACIJU BAKTERIJSKIH KULTURA  
AZITRIBIO



Biološki fakultet

Beograd, 2002

MENTOR: dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd

MENTOR: dr Goran Jovanović, viši naučni saradnik,  
IMGGI, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE: dr Ljubiša Topisirović, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd

dr Goran Jovanović, viši naučni saradnik,  
IMGGI, Beograd

dr Draga Simić, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd

dr Jelena Knežević, vanredni profesor,  
Biološki fakultet, Beograd

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

DATUM PROMOCIJE: \_\_\_\_\_

DOKTORAT NAUKA: \_\_\_\_\_



## ANALIZA EKSPRESIJE GENA KOJI OBEZBEĐUJE REZISTENCIJU BAKTERIJE *Escherichia coli* K12 NA ANTIBIOTIK NOVOBIOCIN

### APSTRAKT:

CysB protein je transkripcioni regulator koji deluje kao tetramer i pripada LysR familiji. On je aktivator gena cisteinskog regulona, *cbl* gena, *tauABCD* operona, *ssuEADCB* operona, *adi* gena i dr. Negativno reguliše ekspresiju sopstvenog *cysB* gena. U prethodnom radu selekcijom na azaserinu i novobiocinu su izolovani *cysB* mutanti koji su bili auktotrofi za cistein i pokazivali povećanu rezistenciju na antibiotik novobiocin. Primenom sistema  $\lambda$ placZMu fuzija identifikovan je gen *hslJ* koji je negativno regulisan CysB proteinom i uključen u mehanizam rezistencije bakterije *E. coli* na novobiocin. U ovom radu su konstruisane operonske fuzije *hslJ-lacZ* koje nose različite dužine regulatornog regiona *hslJ* gena. Merenjem aktivnosti ovih fuzija determinisan je minimalni promotorski i regulatorni region. Odreden je start transkripcije *hslJ* gena i definisan putativni  $\sigma^{70}$  promotor. CysB protein i mutirani CysB I33N izolovani su i prečišćeni na afinitetnoj Ni-NTA rezin koloni. Pokazano je da oba proteina imaju potencijal za oligomerizaciju stvarajući monomere, tetramere, heksamere i oligomere višeg reda. CysB protein i mutant CysB I33N vezuju se za minimalni regulatorni region *hslJ* gena a NAS povećava efikasnost vezivanja. Rezultati aktivnosti operonskih fuzija *hslJ-lacZ* u *cysB*<sup>+</sup> i *cysB*<sup>-</sup> sojevima kao i *in vitro* analize vezivanja CysB proteina za *hslJ* lokus govore u prilog tome da je CysB protein represor *hslJ* transkripcije. Analiza mutacija u različitim *cysB* mutanatima pokazala je da oni sadrže defektan CysB protein koji može komplementacijom sa drugim mutiranim CysB proteinom ostvariti funkcionalnu aktivnost što je praćeno rastom na minimalnoj podlozi bez cisteina i smanjenjem nivoa rezistencije na novobiocin. Ova interalelska komplementacija CysB mutanata pokazala je da se DNK vezujući mutant, CysB I33N, inače neaktivan u regulaciji *cys* regulona, aktivno vezuje za *hslJ* lokus i reprimira *hslJ* transkripciju kao i da je C-terminalni region CysB proteina odgovoran za oligomerizaciju i efikasno vezivanje CysB proteina u regulatornom regionu *hslJ* gena. Nizak nivo ekspresije *hslJ* gena strogo je kontrolisan; prisustvo *hslJ* na plazmidu sa većim brojem kopija letalno je za ćeliju. Ukoliko je *hslJ* gen prisutan na plazmidu sa malim brojem kopija dolazi do efekta genske doze i povećanja rezistencije na antibiotik novobiocin. Ovo je u direktnoj korelaciji sa povećanim nivoom transkripcije *hslJ* gena kada je represor CysB inaktivan ili slabo aktivan, što dovodi do povećanja rezistencije na novobiocin. Prema podacima kompjuterske analize, HslJ protein je najverovatnije lokalizovan u spoljašnjoj membrani ćelije. U prilog ovome idu i rezultati dobijeni merenjem aktivnosti operonske fuzije *pspA-lacZ* čija se aktivnost povećava oko pet puta ukoliko je u ćeliji na plazmidu umesto WT *hslJ* prisutan mutirani gen *hslJ:: $\Omega$ Kan* čiji izmenjeni produkt bi svojom nepravilnom lokalizacijom u membrani narušio njen integritet i aktivirao *psp* operon.

Ključne reči: *hslJ*, *cysB*, negativna regulacija, represor, *cysB* mutanti, HslJ, rezistencija na novobiocin,



# ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF GENE THAT PROVIDES THE RESISTANCE OF BACTERIA *Escherichia coli* K12 TO ANTIBIOTIC NOVOBIOCIN

## ABSTRACT

CysB is a tetrameric LysR-type transcription factor that acts as an activator of the *cys* regulon, *cbl* and *adi* genes, *tau* and *ssu* operons, etc., while *cysB* gene itself is under negative autoregulation. Previously, *cysB* auxotrophic mutants to cysteine and mutants with increased resistance to novobiocin had been isolated by screening the azaserine and novobiocin resistant colonies. *hslJ* gene whose expression is negatively regulated by CysB was identified by generating random chromosomal *lacZ* gene fusions using the  $\lambda$ *p**lacZ*Mu system. In this study, the operon fusions *hslJ-lacZ* were constructed by cloning different DNA fragments of the region upstream of the *hslJ* gene. By using these fusions placed on plasmids, the minimal promoter/regulatory region was defined. The *hslJ* transcription start site was determined and the inspection of DNA sequence revealed one putative  $\sigma^{70}$  promoter. WT CysB and CysB I33N fusion proteins, shown to be active *in vivo*, were purified on affinity chromatography columns and employed in *in vitro* studies. These fusion proteins were able to interact with potential to form tetramers, hexamers, and higher order structure oligomers. Both, CysB and its DNA-binding mutant CysB I33N bind *hslJ* minimal regulatory region and ligand, NAS, increases the efficiency of this binding. Taking together the activities of *hslJ-lacZ* chromosomal/low copy plasmids placed operon fusions introduced to either *cysB*<sup>+</sup> or *cysB*<sup>-</sup> strains, and *in vitro* studies of CysB binding in *hslJ* locus, it is very likely that CysB is a classical repressor of *hslJ* transcription. Analysis of different *cysB* mutants used in this study showed that interallelic complementation exists, and some *cysB* mutation can be reversed to functionality by the *cysB* allele mutated in different region. These results revealed that DNA-binding mutant CysB I33N otherwise inactive in regulating the *cys* regulon, binds *hslJ* minimal regulatory region and represses the transcription. Also, CysB S277Ter protein that carries the truncation of the C-terminal region, can not oligomerize, efficiently interact with DNA, and repress the *hslJ* transcription. The expression of *hslJ* is tightly controlled and very low. High number of intracellular *hslJ* gene copies is lethal but when present in low number of copies, the increased novobiocin resistance as a direct consequence exists. This is in direct correlation with the level of *hslJ* transcription and repression imposed by the CysB. When CysB is inactive the *hslJ* transcription is more effective and the resistance to novobiocin is elevated. Considering the deduced amino acid sequence and the computer analyses, the localization of the HslJ protein is predicted to be in the outer membrane of the cell. This assumption is supported by the fact that *hslJ:: $\Omega$ Kan* mutation activates the operon fusion *pspA-lacZ* shown to be sensitive to changes provoked by inappropriate outer membrane proteins localization.

**Key words:** *hslJ*, *cysB*, negative regulation, repressor, *cysB* mutants, HslJ, novobiocin resistance

# SADRŽAJ

<b>I UVOD</b>	1
1.1. Regulacija ekspresije gena	2
1.1.1. RNK polimeraza holoenzim	2
1.1.2. Promotorski region	7
1.1.3. Transkripcioni faktori	11
1.2. Specifičnost prepoznavanja DNK sekvence	20
1.3. LysR familija proteina	24
1.4. CysB protein	26
1.4.1. Biosinteza cisteina i regulacija cisteinskog regulona	30
1.4.2. Regulacija asimilacije sumpora	34
1.4.3. Regulacija <i>hslJ</i> gena	36
<b>II CILJ RADA</b>	39
<b>III MATERIJAL I METODE</b>	41
3.1. Eksperimentalni materijal	41
3.1.1. Biološki materijal - bakterijski sojevi, fazi i plazmidi	41
3.1.2. Medijumi za rast i održavanje bakterija i faga	41
3.2. Metode	45
3.2.1. Metoda transdukcije	45
Priprema P1 <i>vir</i> lizata	
Transdukcija sa P1 <i>vir</i> fazima	
3.2.2. Test osetljivosti bakterija na antibiotik novobiocin	46
3.2.3. Enzimske reakcije sa DNK	46
Sečenje DNK sa restrikcionim enzimima	
Ligiranje DNK fragmenata	
3.2.4. Transformacija	47
Priprema kompetentnih ćelija	
Transformacija plazmidnom DNK	
3.2.5. Metode za izolovanje DNK	48
Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK	
Mini-metoda za izolaciju hromozomalne DNK	
3.2.6. Sinteza DNK fragmenata PCR reakcijom	49
3.2.7. Elektroforeza i izolovanje fragmenata DNK	51
Elektroforeza i elektroelucija sa agaroznih gelova	
3.2.8. Kloniranje regulatornog regiona <i>hslJ</i> gena u vektor za operonske fuzije	
pRS415: konstrukcija plazmida pVGM3, pVGM4 i pVGM5	52
3.2.9. Konstrukcija operonskih fuzija na hromozomu	53
3.2.10. Merenje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze	54



3.2.11.	Kloniranje <i>cysB</i> <sup>-</sup> alela iz soja SY602 u vektor pUC19	55
3.2.12.	Sekvenciranje DNK	55
	Denaturacija dvolančane DNK	
	Vezivanje oligonukleotida za matricu	
	Reakcija obeležavanja DNK	
	Zaustavljanje reakcije	
3.2.13.	Elektroforeza DNK na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima	57
3.2.14.	Izolovanje RNK	57
3.2.15.	Određivanje starta transkripcije gena	58
3.2.16.	Kloniranje WT <i>cysB</i> gena i alela <i>cysB98</i> u ekspresioni plazmid pQE70: konstrukcija plazmida pVGM1 i pVGM2	59
3.2.17.	Izolacija ćelijskih ekstrakata	60
3.2.18.	Elektroforeza proteina na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima	60
3.2.19.	Amplifikacija i purifikacija CysB <sub>6His</sub> i CysB(I33N) <sub>6His</sub> proteina afinitetnom hromatografijom	61
3.2.20.	Dijaliza proteina	62
3.2.21.	Određivanje koncentracije proteina	62
3.2.22.	Određivanje molekulske težine proteina na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima	63
3.2.23.	Radioaktivno obeležavanje 5' krajeva DNK probe	64
3.2.24.	Vezivanje proteina iz ćelijskog ekstrakta za DNK probu	64
3.2.25.	Vezivanje prečišćenih proteina CysB <sub>6His</sub> i CysB(I33N) <sub>6His</sub> za DNK probu	65
3.2.26.	Određivanje mobilnosti kompleksa DNK i proteina elektroforezom na gelu	65
3.2.27.	Kompjuterske analize	66

#### IV REZULTATI

		67
4.1.	Definisanje minimalnog promotorskog regiona <i>hslJ</i> gena <i>in vivo</i>	67
4.1.1.	Deleciona analiza regulatornog regiona <i>hslJ</i> gena	67
4.1.2.	Određivanje starta transkripcije <i>hslJ</i> gena	70
4.2.	Izolovanje i prečišćavanje CysB <sub>6His</sub> i CysB(I33N) <sub>6His</sub> proteina	72
4.2.1.	Indukcija i provera funkcionalne aktivnosti fuzionih proteina CysB <sub>6His</sub> i CysB(I33N) <sub>6His</sub> <i>in vivo</i>	72
4.2.2.	Purifikacija fuzionih proteina CysB <sub>6His</sub> i CysB(I33N) <sub>6His</sub>	75
4.2.3.	Analiza molekulske težine CysB <sub>6His</sub> i CysB(I33N) <sub>6His</sub> proteina na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima	77
4.3.	Vezivanje prečišćenih CysB i CysB I33N proteina u <i>hslJ</i> lokusu	80
4.3.1.	Vezivanje CysB za regulatorni i strukturni region <i>hslJ</i> gena	80
4.3.2.	Vezivanje CysB za minimalni promotorski region <i>hslJ</i> gena	83
4.3.3.	Uticaj NAS na vezivanje CysB proteina za regulatorni region <i>hslJ</i> gena	85
4.4.	Analiza ekspresije operonske fuzije <i>hslJ-lacZ</i> u različitim <i>cysB</i> mutantima	87
4.5.	<i>cysB</i> mutanti	90
4.5.1.	Karakterizacija <i>cysB</i> mutacija	91

4.5.2.	Interaleska komplementacija različitih <i>cysB</i> mutacija	93
4.6.	Efekat genske doze <i>hslJ</i> gena na rezistenciju bakterija na novobiocin	97
4.7.	Kompjuterska analiza HslJ proteina	100
4.8.	Aktivacija <i>pspA-lacZ</i> fuzije pomoću <i>hslJ::ΩKan</i> mutacije	102

<b>V DISKUSIJA</b>		104
--------------------	--	-----

<b>ZAKLJUČCI</b>		119
------------------	--	-----

<b>LITERATURA</b>		121
-------------------	--	-----

<b>PRILOG 1</b>		
-----------------	--	--

<b>PRILOG 2</b>		
-----------------	--	--



## I UVOD

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je jedan od biološki najbolje okarakterisanih organizama što je rezultat intezivnih biohemijskih i genetičkih studija u zadnjih 50-60 godina. *E. coli* je gram-negativna bakterija štapičastog oblika i pripada familiji *Enterobacteriaceae*. Sastavni je deo nepatogene crevne flore sisara. Postoje i patogeni oblici, (enterotoksična, enteropatogena i uropatogena *E. coli*) koji uzrokuju razna oboljenja. U zavisnosti od prisustva kiseonika može se prilagoditi kako aerobnim tako i anaerobnim uslovima života. Neke od važnijih karakteristika bakterije *E. coli* koje predstavljaju prednost u odnosu na druge organizme u laboratorijskim uslovima rada su: kratko generaciono vreme, 20 minuta, koje uveliko olakšava izvođenje eksperimenata; haploidan je organizam, tj. ima samo jednu kopiju - alel svakog gena što olakšava identifikaciju ćelija sa odgovarajućim tipom mutacija; aseksualno razmnožavanje ćelijskom deobom obezbeđuje dobijanje genetički identičnih ćelija, odnosno klonova što je nemoguće postići kod organizama koji se razmnožavaju seksualnim putem; mogućnost primene selekcije, odnosno odgovarajućih uslova rasta pomoću kojih se od miliona bakterija izdvajaju željeni klonovi takode je jedna od bitnih prednosti ovog organizma. Za rad u laboratorijskim uslovima veoma je važno i njihovo lako održavanje na hranljivim podlogama, čuvanje i jednostavna manipulacija, mogućnost transformacije, konjugacije i transdukcije a ova bakterija poseduje sve ove karakteristike. Gledajući sa istorijskog aspekta *E. coli* je značajna jer je radom na ovoj bakteriji otkrivena mogućnost razmene genetičkog materijala putem konjugacije i transdukcije. Studije na *lac* genima Jacob-a i Monoe-a 60-tih godina prošlog veka dale su prvi model regulacije gena i uvele pojam operona kao "jedinice transkripcione aktivnosti... koordinisane genetičkim elementom ili operatorom." Ova i druga otkrića doprinela su i omogućila genetičku analizu ćelijskih funkcija i dalje vodila odgovorima na mnoga pitanja

molekularne genetike kao što su koncept gena, razrešenje genetičkog koda, molekularni mehanizmi regulacije gena, razrešenje biosintetskih puteva, itd.

Obzirom da je izložena različitim uticajima sredine kao što su promena temperature, pH, osmotskog pritiska, prisustvo ili odsustvo određenih nutrijenata, *E. coli* je razvila mehanizme pomoću kojih može brzo osetiti promene i efikasno odgovoriti na njih. U osnovi adaptacije na spoljašnje i unutrašnje promene je modulacija genske aktivnosti koju ćelija realizuje regulacijom ekspresije gena. Kao posledica promene u ekspresiji gena dolazi do sinteze ili razgradnje odgovarajućih molekula i makromolekula, otvaranja ili zaustavljanja metaboličkih puteva, kao i promena u brzini rasta i deobi ćelije.

## 1.1. Regulacija ekspresije gena

Ekspresija gena regulisana je na više nivoa: transkripcionom, post-transkripcionom, translacionom i na post-translacionom nivou (regulacija funkcije proteina).

U okviru transkripcije, aktivnost gena kontroliše se na nivou inicijacije transkripcije, elongacije i terminacije transkripcije (poslednja dva nivoa regulacije mogu se klasifikovati kao transkripciona atenuacija). Regulacija inicijacije transkripcije ključni je korak u kontroli ekspresije gena. Transkripcioni regulatorni elementi koji učestvuju u ovom procesu deo su regulatorne mreže koja održava homeostazis ćelije odnosno sklad između ekspresije gena i metaboličkih aktivnosti ćelije sa stimulusima koji dolaze iz spoljne i/ili unutrašnje sredine.

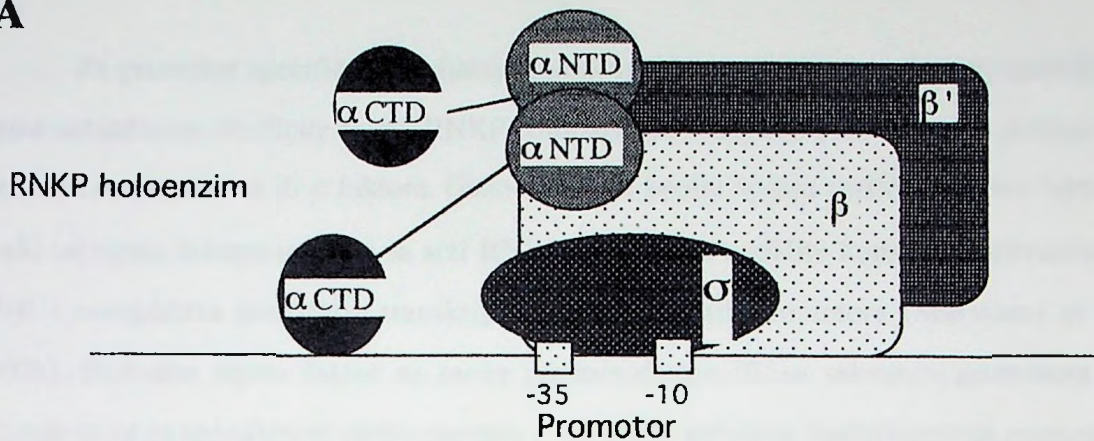
### 1.1.1. RNK polimeraza holoenzim

RNK polimeraza (RNKP) je centralni enzim u transkripciji gena. Inicijacija transkripcije počinje vezivanem holoenzima RNK polimeraze (RNKP holoenzim) za

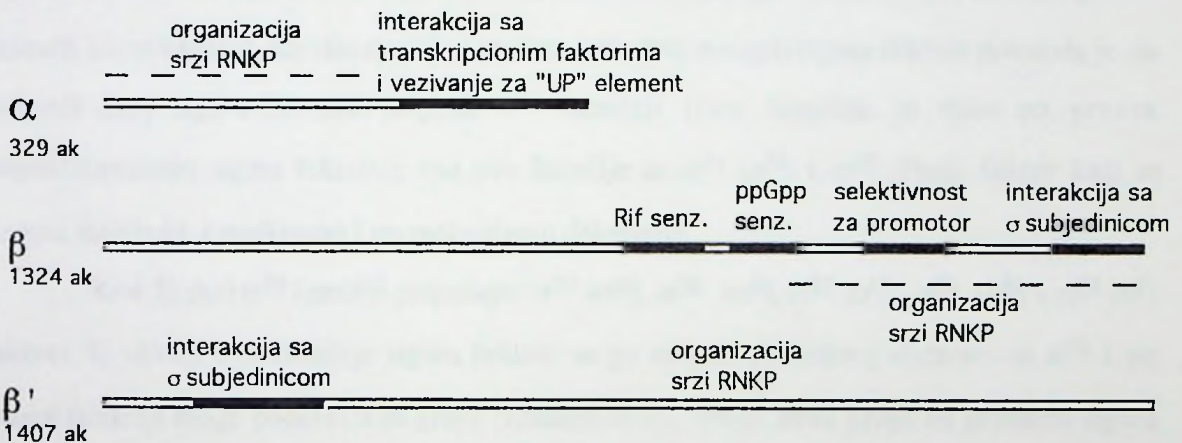


promotor-specifičnu sekvencu na DNK molekulu. Kod bakterija RNKP holoenzim sastoji se od katalitičke srži ("core", 400 kDa) i specifične sigma ( $\sigma$ ) subjedinice koja se vezuje za srž. Srž enzima čine četiri različita polipeptidna lanca, dve  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  i  $\omega$  subjedinice, ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$  je kompozicija subjedinica), koje su produkti *rpoA*, ( $\alpha$ ), *rpoB* ( $\beta$ ), i *rpoC* ( $\beta'$ ) gena (Murakami *et al.*, 2002a; Record *et al.*, 1996) (Slika 1A). Pokazano je da u *in vitro* uslovima prvo dolazi do dimerizacije  $\alpha$  subjedinica, zatim se veže  $\beta$  subjedinica i tek ovaj kompleks  $-\alpha_2\beta$  omogućava da mesto kontakta na  $\alpha$  i/ili  $\beta$  subjedinici bude izloženo za interakciju sa  $\beta'$  subjedinicom (Ishihama, 1992).  $\alpha$  subjedinica sadrži dva nezavisna domena, amino (N) i karboksi (C) terminalni domen. N-terminalni domen (NTD)  $\alpha$  subjedinice odgovoran je za dimerizaciju i interakciju sa  $\beta$  i  $\beta'$  subjedinicom dok je C-terminalni domen (CTD) odgovoran za vezivanje za specifičnu sekvencu na DNK uzvodno od promotora, tzv. "UP" element i za interakciju sa odgovarajućim transkripcionim faktorom (Ishihama, 1992; Ross *et al.*, 2001) (Slike 1A i 4).  $\beta$  subjedinica predstavlja katalitičko mesto na RNKP; C-terminalni domen  $\beta$  subjedinice odgovoran je za interakciju sa sigma faktorom i korektno pozicioniranje odgovarajućih regiona unutar sigma70 ( $\sigma^{70}$ ) faktora što omogućava njegovo vezivanje za -35 i -10 elemente promotora (Kuznedelov *et al.*, 2002) (Slika 1B). Sa  $\beta$  subjedinicom interaguje mali efektorni molekul guanozin tetrafosfat (ppGpp) vezan za "stringent response" i za mesto blisko mestu vezivanja ppGpp-a vezuje se i antibiotik rifampicin koji blokira transkripciju (Cashel *et al.*, 1996) (Slika 1B).  $\beta'$  subjedinica se nespecifično vezuje za molekul DNK i povećava stabilnost veze između RNKP i DNK; na N-terminalnom domenu  $\beta'$  subjedinice nalazi se primarno mesto interakcije RNKP sa sigma faktorom (Young *et al.*, 2001) (Slika 1B).  $\beta$  i  $\beta'$  subjedinice definišu glavne strukturne osobine RNKP i važne su za stabilnu nespecifičnu interakciju sa DNK molekulom posebno tokom procesa elongacije transkripcije (Record *et al.*, 1996). Srž RNKP može započeti sintezu RNK molekula sa krajeva, prekida ili otvorenih regiona DNK.

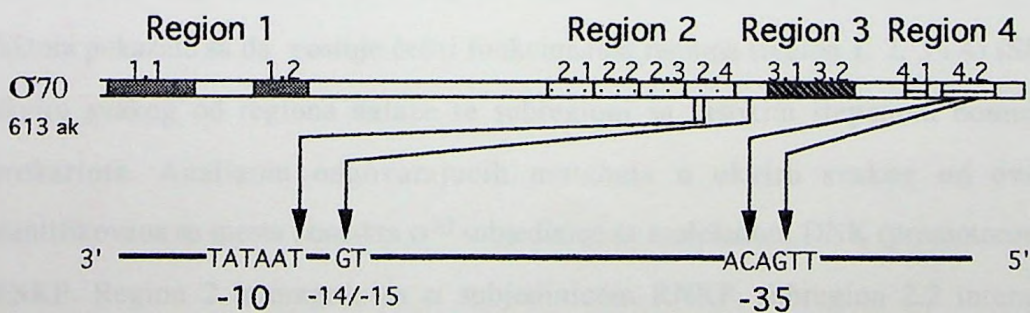
A



B



C



Slika 1. RNK polimeraza holoenzim (RNKP holoenzim). A Relativan položaj subjedinic RNKP holoenzima vezanog za promotor. B  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\beta'$  subjednice enzima RNKP i njihovi funkcionalni domeni. C  $\sigma^{70}$  subjednica sa četiri konzervirana regiona i obeleženim subregionima (videti tekst); na slici su prikazani -10 i -35 heksameri konsenzus sekvence promotora i interakcija subregiona 2.4, 2.5 i 4.2 sa ovim heksamerima.



Za promotor specifičnu inicijaciju transkripcije neophodno je prisustvo specifične sigma subjediniice. Različite forme RNKP holoenzima stvaraju se vezivanjem sa jednom od različitih  $\sigma$  subjediniica ili  $\sigma$  faktora. Genom *E. coli* kodira sedam različitih sigma faktora. Svaki od sigma faktora u sprezi sa srži RNKP prepoznaje različitu konsenzus sekvencu na DNK i omogućava inicijaciju transkripcije sa specifičnih promotora (Murakami *et al.*, 2002b). Slobodan sigma faktor ne može prepoznati specifičnu sekvencu promotora što ukazuje da su za specifičnost prepoznavanja i vezivanja presudne konformacione promene u sigma faktoru i srži RNKP do kojih dolazi tokom formiranja holoenzima (izuzetak je  $\sigma^{54}$  faktor). Identifikacija, karakterizacija i analiza sekvenci mnogih sigma faktora pokazala je da najveći broj sigma faktora pripada  $\sigma^{70}$  familiji (ime familije je dato po prvom identifikovanom sigma faktoru), van ove familije su  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) i  $\sigma^{19}$  (FecI) faktor koji se veoma razlikuju i strukturno i po mehanizmu delovanja.

Kod *E. coli*  $\sigma^{70}$  familiji pripadaju:  $\sigma^{70}$  ( $\sigma^D$ ),  $\sigma^{38}$  ( $\sigma^S$ ),  $\sigma^{32}$  ( $\sigma^H$ ),  $\sigma^{24}$  ( $\sigma^E$ ) i  $\sigma^{28}$  ( $\sigma^F$ ) faktori. U okviru ove familije sigma faktori se po svojoj strukturnoj sličnosti sa  $\sigma^{70}$  i po svojoj funkciji mogu podeliti u tri grupe (Lonetto *et al.*, 1992). Prva grupa su primarni sigma faktori- kod *E. coli* to je  $\sigma^{70}$ , koji je odgovoran za sintezu najvećeg broja RNK molekula u toku eksponencijalne faze rasta ćelija.  $\sigma^{70}$  je esencijalan za ćeliju. Strukturne analize  $\sigma^{70}$  faktora pokazale su da postoje četiri funkcionalna regiona (region 1, 2, 3 i 4) (Slika 1C). U okviru svakog od regiona nalaze se subregioni sa visokim stepenom homologije kod prokariota. Analizom odgovarajućih mutanata u okviru svakog od ovih regiona identifikovana su mesta kontakta  $\sigma^{70}$  subjediniice sa molekulom DNK (promotorom) kao i sa RNKP. Region 2 interaguje sa  $\alpha$  subjedinicom RNKP, subregion 2.2 interaguje sa  $\beta'$  subjedinicom (sa njenim "coiled-coil" elementom) dok je subregion 2.4 odgovoran za prepoznavanje "-10" heksamera promotora. Region 4 (subregion 4.2) interaguje sa " $\beta$  flap" domenom  $\beta$  subjediniice što stvara dodatne alosteričke promene i dovodi do vezivanja za -35 element promotora (Kuznedelov *et al.*, 2002) (Slika 1C). Region 4 učestvuje i u interakciji sa aktivatorom. Region 1 doprinosi stabilnosti veze između RNKP holoenzima i DNK molekula.

Region 3 interaguje sa srži RNKP (Lonetto et al., 1992). Drugoj grupi  $\sigma^{70}$  familije pripada  $\sigma^{38}$  ( $\sigma^S$ ) faktor koji je strukturno sličan  $\sigma^{70}$ . Do akumulacije  $\sigma^{38}$  faktora u ćeliji dolazi na početku stacionarne faze rasta.  $\sigma^{38}$ -RNKP omogućava transkripciju gena specifičnih za stacionarnu fazu rasta i uključen je u odgovor ćelije na osmotski i oksidativni stres. Ovaj  $\sigma$  faktor je neophodan za ekspresiju faktora virulencije kod mnogih patogenih bakterija (Gaal et al., 2001). Trećoj grupi pripadaju alternativni sigma faktori-  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{24}$  i  $\sigma^{28}$  koji su uključeni u regulaciju transkripcije specifičnih regulona.  $\sigma^{32}$  ( $\sigma^H$ ) i  $\sigma^{24}$  ( $\sigma^E$ ) faktori su odgovorni za ekspresiju gena uključenih u "heat shock" odgovor, odnosno reakciju ćelije ne samo na povišenu temperaturu već i druge stresne uslove koji dovode do narušavanja strukture već postojećih proteina, zauzimanja nepravilne strukture novosintetisanih proteina ili agregacije polipeptidnih lanaca.  $\sigma^{32}$  subjedinica kontroliše ekspresiju gena koji kodiraju šaperone, proteaze, regulatorne proteine i dr. elemente neophodne za održavanje stabilne i funkcionalne strukture proteina u citoplazmi kao i za njihovu degradaciju. Drugi sigma faktor  $\sigma^{24}$  indukuje se usled akumulacije nezrelih i nepravilno struktuiranih proteina u ekstracitoplazmatskom prostoru i reguliše ekspresiju gena čiji produkti pomažu proteinima da zauzmu aktivnu strukturu u periplazmi i spoljnoj membrani ćelije. Ovaj sigma faktor reguliše i sintezu proteaze neophodne za proteolizu nepravilno "foldovanih" periplazmatskih proteina kao i ekspresiju  $\sigma^{32}$  faktora na višim temperaturama (Erickson & Gross, 1989).  $\sigma^{28}$  faktor je odgovoran za ekspresiju gena flagele.

$\sigma^{54}$  faktor se strukturno i funkcionalno razlikuje od  $\sigma^{70}$  familije.  $\sigma^{54}$ -RNKP ( $\sigma^{54}$  interaguje sa  $\beta$  subjedinicom srži polimeraze) za inicijaciju transkripcije zahteva prisustvo pomoćnog aktivatora koji je obično vezan 100-150 nt uzvodno od starta transkripcije (Reitzer & Schneider, 2001). Ova udaljena mesta ekvivalentna su transkripcionim "enhancer" elementima kod eukariota. Aktivator stimuliše formiranje otvorenog transkripcionog kompleksa direktno interagujući sa  $\sigma^{54}$  faktorom i  $\beta'$  subjedinicom RNKP. Da bi došlo do interakcije ovako udaljenog aktivatora i RNKP neophodno je stvaranje petlje. Ovo se u većini slučajeva dešava vezivanjem IHF ("integration host factor") proteina za mesto locirano



između "enhancer" elementa i promotora na istom licu DNK.  $\sigma^{54}$  faktor je neophodan za ekspresiju gena vezanih za asimilaciju, fiksaciju i metabolizam azota, za degradaciju formata, "phage shock" odgovor i dr. (Gralla & Collado-Vides, 1996).

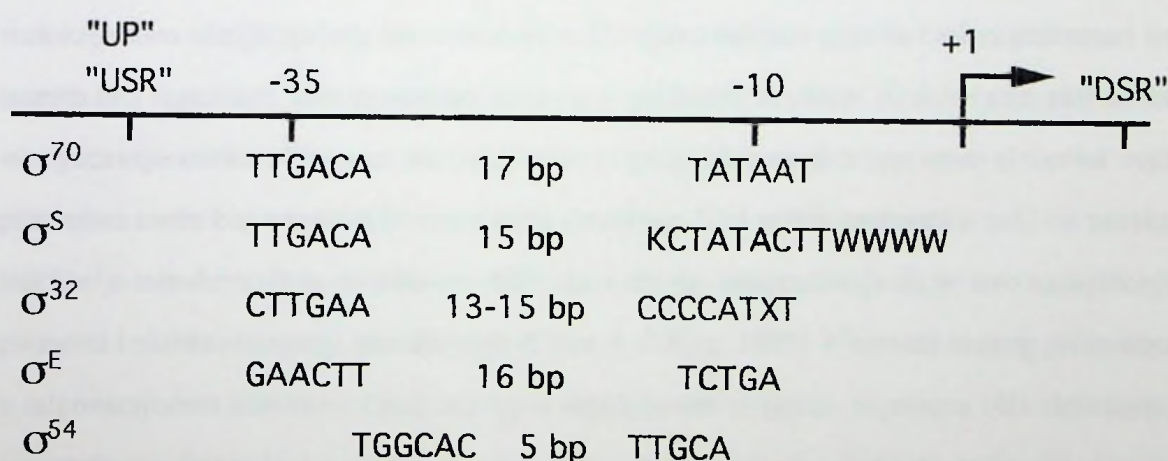
$\sigma^{19}$  faktor je uključen u transport citrata gvožđa (Record et al., 1996) i takođe ne pripada  $\sigma^{70}$  familiji.

### 1.1.2. Promotorski region

Promotor predstavlja specifičnu sekvencu na molekulu DNK za koju se veže holoenzim RNKP i od koje započinje transkripcija gena. Postojanje promotora prvi put je uočeno zahvaljujući mutacijama koje pojačavaju ili umanjuju brzinu transkripcije nekih gena. Srž promotora koje prepoznaje holoenzim  $\sigma^{70}$ -RNKP čine dva heksamera, -10 (TATAAT) i -35 (TTGACA) čije su pozicije definisane u odnosu na start transkripcije i dužina DNK molekula ("spacer" region) koja razdvaja ova dva elementa i koja obično iznosi  $17 \pm 1$  baznih parova (kod mnogih promotora postoje odstupanja od ovog broja nukleotida) (Slika 2). Sa -10 i -35 heksamerima interaguje sigma subjedinica i to sa -10 heksamerom subregionom 2.4 a sa -35 heksamerom subregionom 4.2 (Slika 1C). Pretpostavlja se da  $\beta$  subjedinica svojim " $\beta$  flap" domenom prepoznaje korektno rastojanje između heksamera ("spacer" region) i u interakciji sa sigma faktorom omogućava formiranje kompleksa sa -10 i -35 heksamerima. Faktori koji interaguju sa " $\beta$  flap" domenom i utiču na njegovu interakciju sa sigma faktorom možda olakšavaju prepoznavanje promotora sa izmenjenim "spacer" regionom i na taj način menjaju promotorsku specifičnost RNK polimeraze (Kuznedelov et al., 2002). Važan element promotora je i region udaljen oko 20 nukleotida uzvodno od -35 heksamera koji predstavlja "UP" element (ova sekvenca bogata je AT nukleotidima) (Slika 2). "UP" element prepoznaje  $\alpha$  subjedinica RNKP i vezuje se za njega svojim CTD regionom (Ross et al., 2001) (Slika 4A). Identifikovani su i brojni aktivator- ne zavisni promotori, kod



kojih za transkripcionu inicijaciju nije potrebno prisustvo -35 heksamera. Oni sadrže alternativno mesto kontakta sa RNKP holoenzimom locirano jednu bazu uzvodno od -10 heksamera. Konsenzus sekvenca ovako "produženog" -10 promotora je TGNTATAAT. Sigma subjedinica svojim subregionom 2.5 prepoznaje produženi "-10" element promotora (Barne *et al.*, 1997) (Slika 1C). Sekvence mnogih promotora značajno variraju u odnosu na datu konsenzus sekvencu koju prepoznaje određeni  $\sigma$  faktor. Za ostale članove  $\sigma^{70}$  familije identifikovane su konsenzus sekvence koje se manje ili više razlikuju od onih karakterističnih za promotore za koje se vezuje  $\sigma^{70}$  faktor (Slika 2).



Slika 2. Promotor. Na slici su obeleženi elementi promotora (-10, razmak između heksamera i -35) kao i konsenzus sekvence promotora koje prepoznaju različiti  $\sigma$  faktori. K - G ili T baza; W - A ili T baza. "USR" - uzvodni regulatorni region (na pr. "UP" element); "DSR" - nizvodni regulatorni region; +1 - start transkripcije gena

Efikasnost promotora determinisana je sa dve različite faze transkripcije. U prvoj, početnoj fazi rane inicijacije transkripcije dolazi do vezivanja holoenzima RNKP za promotor. Ovo uključuje interakciju RNKP sa opštim transkripcionim faktorima, promotor-



specifičnim faktorima kao i sekvencom na molekulu DNK ("-10" i "-35" heksameri, "spacer" region, "UP" element, zakrivljenost DNK, sekvence nizvodno od starta transkripcije). Druga faza je kasna faza inicijacije transkripcije, odnosno stvaranje stabilnih produkata koji vode dalje u elongaciju transkripcije i tzv. "čišćenje" promotora tj. pomeranje RNKP nizvodno od promotora tako da je promotor dostupan novom molekulu RNKP i drugim transkripcionim faktorima koji nanovo počinju proces transkripcije (Chamberlin & Hsu, 1996).

Na efikasnost promotora može uticati promena DNK sekvence elemenata promotora, *cis* elementi i/ili njihovu aktivnost mogu kontrolisati *trans* elementi, regulatorni proteini, odnosno transkripcioni regulatori. U zavisnosti od efikasnosti odvijanja svakog koraka u inicijaciji transkripcije promotore možemo podeliti u tri grupe: konstitutivne, jake i slabe. Kod konstitutivnih promotora DNK sekvenca i struktura promotorskih elemenata je takva da transkripciona inicijacija teče brzinom koja zadovoljava ćelijske potrebe i takvi promotori ne moraju biti regulisani. Jaki promotori zbog svoje primarne strukture ili delovanja aktivatora omogućavaju visoku efikasnost inicijacije transkripcije. Delovanjem represora aktivnost ovih promotora može biti u manjoj ili većoj meri smanjena. Kod slabih promotora neki od koraka inicijacije transkripcije su neefikasni. Aktivatori obično omogućavaju da se ovo ograničenje premosti i olakša inicijacija transkripcije (Choy & Adhya, 1996). Elementi svakog promotora u odgovarajućem kontekstu i pod uticajem regulatornih proteina, represora i/ili aktivatora, omogućavaju fini balans u ekspresiji gena koja u datom trenutku treba da zadovolji potrebe ćelije.

Prepoznavanje specifične sekvence na promotoru holoenzim RNKP počinje stvaranjem zatvorenog inicijalnog kompleksa ( $RP_{C1}$ ). Analize  $RP_{C1}$  na promotorima koje prepoznaju  $\sigma^{70}$  ili  $\sigma^{32}$  subjedinica pokazuju da holoenzim RNKP ostvaruje kontakt samo sa jednim licem dvolančanog heliksa i to od -5 do -55 nukleotida uzvodno od početka starta transkripcije (+1) (deHaseth *et al.*, 1998). Region zaštićen RNKP ne uključuje niti mesto starta transkripcije niti region inicijalne transkripcije što govori da  $\sigma^{70}$  ili  $\sigma^{32}$  subjedinice u ovom početnom kompleksu ne interaguju sa ključnim regionom promotora. U sledećem

koraku dolazi do izomerizacije zatvorenog kompleksa ( $RP_{C2}$ ), što uključuje konformacione promene kako holoenzima RNKP tako i molekula DNK. Footprinting analize  $RP_{C2}$  kompleksa na *lac UV5*, *tetR*, *T7A1* i *GroE* promotorima pokazale su da se region interakcije promotora i polimeraze širi i na nizvodne sekvence promotora i to do +20 nukleotida od starta transkripcije. Kontakt sa nizvodnim regionom, -10 do +20, holoenzim ostvaruje sa oba lanca DNK heliksa. Proces otvaranja (topljenja) DNK molekula počinje uzvodno od starta transkripcije, u -10 regionu promotora i širi se ka startu transkripcije (deHaseth et al., 1998). Kompleks između holoenzima i DNK zove se binarni otvoreni kompleks ( $RP_{O1}$ ). U okviru njega matrični lanac postaje dostupan inicijalnim nukleotidima. Sigma subjedinica ostvaruje kontakt sa "-10" i "-35" regionima promotora,  $\beta$  i  $\beta'$  subjedinice učestvuju u stvaranju kanala koji okružuje DNK, dok  $\alpha$  subjedinica ostvaruje kontakt sa "UP" elementom. Za konverziju  $RP_{O1}$  u finalni binarni kompleks ( $RP_{O2}$ ) potrebno je prisustvo  $Mg^{2+}$  jona. Kako u  $RP_{O2}$  kompleksu dolazi do dodatnog otvaranja, odmotavanja lanaca DNK joni magnezijuma verovatno neutrališu negativno naelektrisanje bočnih lanaca uključenih u formiranje fosfodiesterarskih veza (Record et al., 1996). Sledeći događaj u procesu inicijacije transkripcije je izbor mesta starta transkripcije. Svaki promotor sadrži više mesta početaka transkripcije. Tri faktora utiču na izbor odgovarajućeg starta: udaljenost od -10 heksamera, obično 6-8 nukleotida; iako bilo koji od nukleotida može biti iniciacioni to su obično purini (A ili G); osnovni elementi promotorske sekvence takođe utiču na izbor starta transkripcije. Nakon izbora starta transkripcije i vezivanja inicijalnih nukleotida sledi serija reakcija koja vodi tzv "čišćenju promotora". Čišćenje promotora (do kog dolazi nakon sinteze 7-12 nukleotida dugog transkripta) uključuje odvajanje sigma subjedinice od enzima i DNK, pomeranje RNKP nizvodno od promotora i dalju sintezu transkripta (deHaseth et al., 1998). Iako RNKP glavni kontakt sa DNK ostvaruje preko sigma subjedinice pretpostavlja se da u elongacionom kompleksu, nakon odvajanja sigma subjedinice, kontakt između  $\beta$  subjedinice i sekvence DNK nizvodno od promotora stabilizuje elongacioni kompleks (Record et al., 1996).



### 1.1.3. Transkripcioni faktori

Značajnu ulogu u regulaciji genske ekspresije na nivou inicijacije transkripcije imaju DNK vezujući proteini. Jedna od najvećih i najrazličitijih klasa DNK-vezujućih proteina su transkripcioni faktori. Svojom aktivnošću ovi proteini regulišu ćelijski razvoj, diferencijaciju, rast ćelije, i/ili omogućuju ćeliji da se adaptira na promenjene uslove sredine. Transkripcioni faktori mogu uticati na bilo koji korak u mehanizmu inicijacije transkripcije, mogu uticati na inicijalno vezivanje holoenzima RNKP za promotor i/ili izomerizaciju transkripcionog kompleksa i/ili stvaranje inicijalnih transkripata. Svi transkripcioni regulatori koji kontrolišu transkripciju gena interagujući sa holoenzimom  $\sigma^{70}$ -RNKP vežu se za mesta (uzvodni regulatorni regioni, "USR", i nizvodni regulatorni regioni, "DSR") koja omogućavaju direktan kontakt sa holoenzimom RNKP. U zavisnosti od načina kontrole ekspresije gena (da li je smanjuju, potpuno inhibiraju ili aktiviraju) transkripcioni regulatori mogu se podeliti na represore i aktivatore pa u tom kontekstu govorimo o negativnoj ili pozitivnoj regulaciji gena.

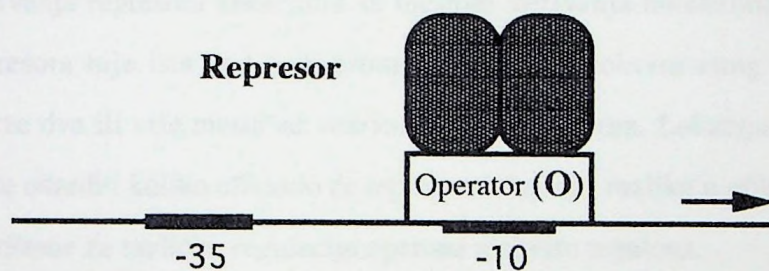
Negativna kontrola je definisana kao inhibicija ekspresije gena na nivou inicijacije transkripcije regulatornim proteinom-represorom. Postoji više molekularnih mehanizama kojima represor reguliše aktivnost promotora. Najjednostavniji način je inhibicija inicijacije transkripcije blokiranjem pristupa holoenzima RNKP specifičnoj promotorskoj sekvenci kompetitivom represora za isto ili preklapajuće mesto na operatoru koji se nalazi u promotorskom regionu, što podrazumeva da represor poseduje veći afinitet vezivanja za operatorsku sekvencu od afiniteta vezivanja RNKP holoenzima za promotor (Slika 3A). Na ovaj način deluju npr. LexA, LacI,  $\lambda$ cI represori (Choy & Adhya, 1996).

Drugi način represije uključuje simultano vezivanje represora i holoenzima RNKP i inhibiciju aktivnosti polimeraze direktnim kontaktom represora sa polimerazom. Na ovaj način represor alosterički inhibira neku od konformacionih promena transkripcionog kompleksa što onemogućava dalju transkripciju (Choy & Adhya, 1996).

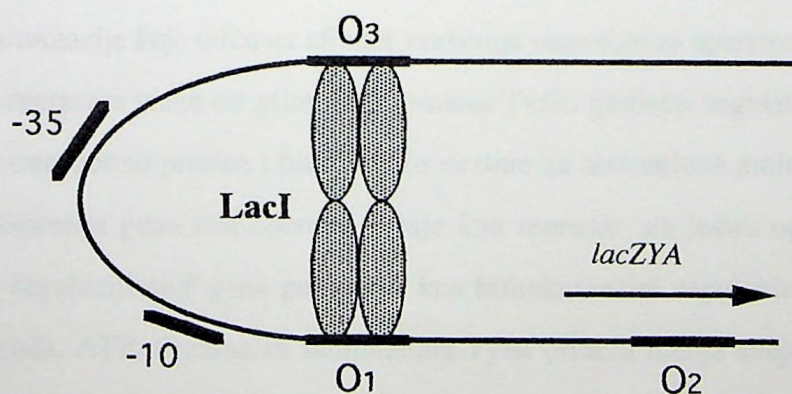


Obzirom da struktura promotora direktno utiče na inicijaciju transkripcije, regulatorni proteini svoju funkciju ostvaruju delovanjem na srž promotora, uzvodne promotorske regione, "USR" i nizvodne segmente, "DSR". Na ovaj način represor može sterički interferirati sa stvaranjem produktivnog transkripcionog inicijacionog kompleksa, ili represor može zakriviti DNK i na taj način onemogućiti kritični kontakt DNK i holoenzima RNKP.

A



B



Slika 3. Negativna regulacija inicijacije transkripcije. A Inhibicija inicijacije transkripcije vezivanjem represora za specifičnu sekvencu, operator, i mehaničko sprečavanje vezivanja RNKP holoenzima za promotor. B Shematski prikaz delovanja LacI represora. LacI tetramer nakon vezivanja za operatorske sekvence savija DNK i ne samo mehanički već i sterno sprečava vezivanje RNKP holoenzima za promotor.



Često operatori sadrže više elemenata i vezivanje za takve regulatorne sekvence ima različite biohemijske posledice. Vezivanje dva represora istovremeno za molekul DNK kao i njihova međusobna interakcija može dovesti do stvaranja petlje na molekulu DNK i tako zaustaviti dalje korake u inicijaciji transkripcije (Slika 3B).

Represor može delovati i na aktivnost nekog pozitivnog regulatora - aktivatora, naročito na slabim promotorima (tzv. represija antiaktivacijom).

Lokacija mesta za vezivanje represora je povezana sa načinom njegovog delovanja. Većina proteina koji reprimiraju ekspresiju gena vezuje se u regionu -30 i nizvodno od njega. Iako zona vezivanja represora koincidira sa mestom vezivanja holenzima RNKP pozicija vezivanja represora nije ista kod svih promotora, čak i u okviru istog regulona. Često promotori sadrže dva ili više mesta za vezivanje istog represora. Lokacija mesta vezivanja (operator) može odrediti koliko efikasno će represor delovati i razlike u efikasnosti represora mogu biti iskorištene za različitu regulaciju operona u okviru regulona.

Efikasnost vezivanja za operator zavisi i od konformacije proteina; mnogi represori su alosterični proteini i u zavisnosti od prisustva indukujućeg molekula, inducira, zauzimaju određene konformacije koje utiču na afinitet vezivanja represora za operator. Pored klasičnog sistema *Lacl* represora jedan od primera je protein *TyrR*, globalni regulator osam operona koji kodiraju transportne protine i biosintetske enzime za aromatične amino kiseline. *TyrR* protein na ekspresiju gena šest operona deluje kao represor, na jedan operon deluje kao aktivator a u regulaciji *tyrP* gena ponaša se kao bifunkcionalni regulator. U zavisnosti od prisustva liganda, ATP, tirozina ili fenilalanina *TyrR* protein menja svoju konformaciju i ponaša se kao represor ili aktivator (Wilson *et al.*, 1994). Isto tako, u odsustvu arabinoze *AraC* protein funkcioniše kao represor, a ukoliko je ligand, arabinoza, prisutna *AraC* se ponaša kao aktivator (Huo *et al.*, 1988).

Ekspresija gena može biti inhibirana i na druge načine: inhibicija genske transkripcije na opštem nivou uklanjanjem ili inaktivacijom komponenti transkripcione mašinerije, inhibicija inicijacije transkripcije malim molekulima (nukleozid tri fosfatima ili

guanozin tetrafosfatom - ppGpp, koji dovode do inhibicije sinteze RNK molekula), inhibicijom transkripcije proteolitičkim uklanjanjem transkripcionog aktivatora, narušavanjem kontinuiteta transkripcione jedinice (genskim rearanžmanima kao što je rekombinacija), zaustavljanjem transkripcije tokom elongacije pre nego što polimeraza transkribuje strukturni deo gena - atenuacija, terminacijom transkripcije tokom elongacije najčešće sprečavajući transkripciju nizvodnih gena (intraoperonska terminacija), inhibicijom transkripcije nukleolitičkim sečenjem iRNK (retroregulacija), inhibicijom inicijacije translacije translacionim represorom, narušavanjem sinteze polipeptida promenom okvira čitanja (Choy & Adhya, 1996).

Za razliku od represora čija je funkcija da smanje ili zaustave ekspresiju gena sprečavajući neku od reakcija tokom inicijacije transkripcije, aktivatori direktnom interakcijom sa holoenzimom RNKP doprinose stvaranju čvršćeg kontakta enzima sa molekulom DNK ili pospešuju dalje korake u inicijaciji transkripcije kada je enzim već vezan za promotor.

Kod prokariota kontrola aktivacije transkripcije je najčešće posledica direktne interakcije jednog proteina aktivatora sa holoenzimom RNKP. Aktivatori svoju funkciju ostvaruju vezivanjem za DNK sekvencu na odgovarajućoj udaljenosti, između -30 i -80 (najčešće oko -40) nukleotida uzvodno od starta transkripcije (izuzetak su  $\sigma^{54}$  aktivatori koji se mogu vezati i za region do -360 nt uzvodno od starta transkripcije). Vrlo retko aktivatori se vezuju u regionu daljem od -72 nt uzvodno od starta transkripcije, bez pomoći nekog drugog proteina vezanog za poziciju bližu startu transkripcije i polimerazi. Jedan od izuzetaka je CysB koji se veže za region -80 nt uzvodno od starta transkripcije ali jednim svojim delom pokriva do -50 nt uzvodno od starta transkripcije, što je dovoljno da ostvari kontakt sa holoenzimom RNKP. TyrR je jedini do sada poznati aktivator koji deluje sa distance od -66 nt uzvodno od starta transkripcije. Analize udaljenosti mesta za vezivanje aktivatora ukazuju da aktivator mora biti vezan dovoljno blizu kako bi ostvario direktan kontakt sa holoenzimom RNKP i aktivirao transkripcioni kompleks u odsustvu drugih elemenata

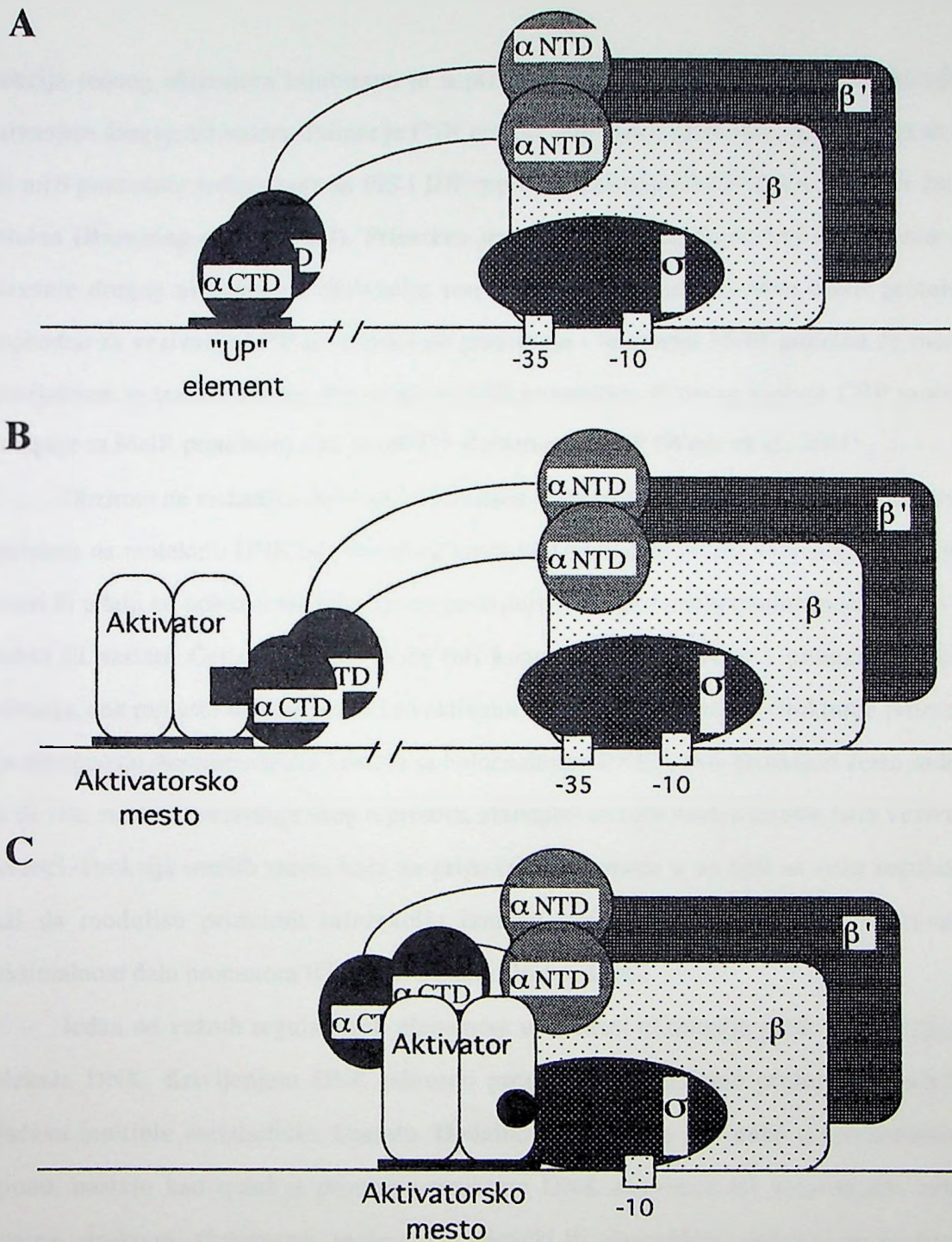


transkripcione regulacije kao što su nesavršen "-35" heksamer, odsustvo "UP" elementa, "DSR" i dr. (Gralla & Collado-Vides, 1996). Identifikovana su dva mesta na holoenzimu RNKP sa kojima interaguju transkripcioni faktori; jedno je CTD  $\alpha$  subjedinice ( $\alpha$ CTD) a drugo je C-terminalni region  $\sigma^{70}$  subjedinice, na osnovu čega su transkripcioni regulatori podeljeni na transkripcione faktore klase I (interaguju sa  $\alpha$ CTD) ili transkripcioni faktori klase II (interaguju sa  $\sigma$  faktorom) (Slika 4). Neki od transkripcionih faktora klase I su TrpI, Ada, OxyR, OmpR, CRP, IHF i dr. i oni se najčešće vezuju za DNK sekvence smeštene blizu promotora ili uzvodno od njega (Slika 4B). PhoB, CRP, AraC, MalT pripadaju klasi II i vezuju se za DNK sekvencu koja se često preklapa sa "-35" elementom promotora (Slika 4C).

U nekim slučajevima promotor sadrži jedno mesto za vezivanje aktivatora koji interaguje sa  $\alpha$  subjedinicom i drugo mesto za vezivanje drugog aktivatora koji ostvaruje kontakt sa regionom 4  $\sigma^{70}$  subjedinice (veštački konstruisan promotor za koji se vezuju CRP i  $\lambda$ cI aktivatori) (Busby & Ebright, 1994; Ishihama, 1993). Ko-zavisnost aktivnosti promotora obezbeđuje jednostavan način podešavanja nivoa transkripcije sa višestrukim stimulusima koji dolaze iz unutrašnje i spoljne sredine. Identifikovano je više različitih mehanizama ko-zavisnog dejstva aktivatora kod bakterija. Dva aktivatora mogu nezavisno jedan od drugog ostvariti kontakt sa RNKP - primer je *ansB* promotor, koji je ko-zavistan od CRP i FNR proteina; CRP i FNR interaguju sa po jednom od dve  $\alpha$  subjedinice RNKP i aktiviraju transkripciju (Scott *et al.*, 1995).

Jedan od aktivatora može zakriviti DNK i tako olakšati vezivanje drugog aktivatora koji tada može direktno interagovati sa RNKP - primer je IHF protein (svojom vezivanjem savija DNK) koji funkcioniše u sprezi sa drugim aktivatorom na mnogim  $\sigma^{54}$  zavisnim promotorima (Goosen & van de Putte, 1995; Rice *et al.*, 1996). Vezivanje jednog aktivatora može da repozicionira drugi aktivator sa lokacije gde je nesposoban da aktivira transkripciju na lokaciju gde može da aktivira transkripciju; tako CRP protein vezan uzvodno od *E. coli malK* promotora repozicionira tri molekula MalT proteina na DNK što im omogućava da aktiviraju transkripciju (Richet *et al.*, 1991).





Slika 4. Aktivacija inicijacije transkripcije. **A** Transkripcijski kompleks zavisan od "UP" elementa i interakcija  $\alpha$ CTD sa ovim elementom (videti tekst). **B** Promotor koji sadrži mesto za aktivator klase I i interakcija sa  $\alpha$ CTD (videti tekst). **C** Vezivanje aktivatora klase II za promotor i interakcija sa  $\sigma$  subjedinicom (videti tekst).



Funkcija jednog aktivatora inhibirana je u prisustvu represora, koji može biti uklonjen vezivanjem drugog aktivatora. Primer je FNR protein koji može aktivirati transkripciju sa *E. coli nirB* promotora jedino kada su FIS i IHF represori uklonjeni vezivanjem NarL ili NarP proteina (Browning *et al.*, 2000). Prisustvo jednog aktivatora može biti neophodno za vezivanje drugog aktivatora i aktivaciju transkripcije; tako je prisustvo MelR proteina neophodno za vezivanje CRP što dovodi do grupisanja i vezivanja MelR proteina na mestu esencijalnom za transkripcionu aktivaciju *melAB* promotora. U ovom slučaju CRP protein interaguje sa MelR proteinom a ne sa  $\alpha$ CTD domenom RNKP (Wade *et al.*, 2001).

Obzirom na mehaniku delovanja aktivatora i represora jasno je da je mesto vezivanja regulatora na molekulu DNK od presudnog značaja. Ukoliko se mesto vezivanja aktivatora pomeri ili udalji od uobičajene lokacije njegovo dejstvo na aktivaciju transkripcije znatno će oslabiti ili nestati. Često aktivator može biti konvertovan u represor - promenom mesta vezivanja, dok represor da bi delovao kao aktivator zahteva odgovarajuće strukturne promene koje omogućuju stereospecifični kontakt sa holoenzimom RNKP. Dok promotori često sadrže dva ili više mesta za vezivanje istog represora, aktivatori se rede vezuju za više istih vezivnih sekvenci. Funkcija ostalih mesta koja ne pripadaju promotoru a za njih se vežu regulatori služi da modulišu primarnu interakciju između polimeraze i regulatora vezanog u proksimalnom delu promotora (Gralla & Collado-Vides, 1996).

Jedan od važnih regulatornih elemenata u kontroli ekspresije gena je i krivljenje molekula DNK. Krivljenjem DNK odnosno promenom arhitekture promotora bakterija pojačava multiplu metaboličku kontrolu. Dodatno zakrivljenje sekvence u promotorskom regionu, nastalo kao rezultat primarne strukture DNK sekvence ili vezivanjem nekog proteina- strukturni sinergizam, može antagonistički ili sinergistički delovati na vezivanje transkripcionih regulatora (Perez-Martin & de Lorenzo, 1997). Jedan od primera je dejstvo IHF faktora na vezivanje PutA represora. Zakrivljenost DNK (koja je rezultat vezivanja IHF faktora) u intergenskom regionu između *putA* i *putP* promotora olakšava vezivanje PutA represora za promotorsku sekvencu (O'Brien *et al.*, 1992). Zakrivljen molekul DNK olakšava

interakciju između proteina koji su vezani za udaljene sekvence (100 i više nukleotida) u promotorskom regionu. Krivljenje DNK sekvence omogućava stvaranje petlje i dovodi prostorno u blizak kontakt dva udaljena regulatorna faktora. Često proteini kao što su CRP ili IHF svojim vezivanjem doprinose zakrivljenju sekvence (50-180°) ili povećavaju njenu fleksibilnost. Neki proteini koji dovode do krivljenja sekvence svojim vezivanjem stabilizuju DNK strukturu u odgovarajućoj konformaciji koja je potrebna za stvaranje složenijih proteinskih kompleksa; oni se zovu DNK šaperoni. Karakteristike ovakvih proteina su da se vežu nespecifično za nukleotidnu sekvencu, indukuju njeno krivljenje i na taj način omogućavaju formiranje proteinskog kompleksa, nakon toga odvajaju se od DNK i finalnog kompleksa. Na ovaj način deluje HU protein, npr. vezivanje CRP proteina i LacI represora za specifične sekvence pojačano je 10-20 puta ukoliko je vezan HU protein mada u finalnom kompleksu nije prisutan. HU olakšava vezivanje IHF faktora za "origin" replikacije *oriC* kod *E. coli* (Bonney & Rouviere-Yaniv, 1992)). Pored toga HU protein može supstituisati IHF faktor u slučaju gde IHF svojim efektom na strukturu DNK deluje kao pozitivni ili negativni koregulator; takav primer su  $\sigma^{54}$ -zavisni promotori (Perez-Martin & de Lorenzo, 1997). Proteini, koregulatori koji deluju kao arhitektonski elementi deo su regulatorne mreže jer svojom funkcijom podržavaju ili inhibiraju aktivnu konfiguraciju promotora. Jedan od takvih proteina je CRP (CRP kao i IHF dovodi do zakrivljenja na mestu interakcije sa molekulom DNK), kao koregulator deluje zajedno sa MalT proteinom na *malEp* i *malKp* promotore ili zajedno sa NagC represorom kontroliše ekspresiju divergentnog *nagE-nagBACD* operona (Perez-Martin & de Lorenzo, 1997). Jedna od posledica krivljenja DNK sekvence je i amplifikacija uticaja spoljnog signala na ekspresiju gena. Primer za ovakav tip je regulacija ekspresije *Pe* i *Pc* promotora Mu faga IHF proteinom i Mu represorom.

Superspiralizacija takode može biti jedan od opštih metaboličkih načina kontrole ekspresije gena. Kako se superspiralizovanost hromozoma menja tokom rasta, rezultujuće promene u lokalnoj arhitekturi DNK mogu biti mehanizam kojim ćelija oseća određene fiziološke promene i prevodi ih na specifične promotore (Perez-Martin & de Lorenzo, 1997).



Neki od proteina koji deluju kao opšti globalni regulatori u *E. coli* su: HU protein (heterodimer koji se ne specifično vezuje za zakrivljenu DNK, povećava fleksibilnost sekvence i olakčava njeno krivljenje); IHF protein (heterodimer, vezuje se za specifične sekvence npr. *att* mesto, krivi DNK i olakšava interakciju drugih proteina vezanih na suprotnim stranama zakrivljene sekvence); H-NS protein ("histon like polypeptide", vezuje se za ne specifične sekvence, stabilizuje zakrivljene strukture, učestvuje u kontroli superspiralizacije hromozoma); FIS protein ("factor for inversion stimulation", svojim vezivanjem za sekvence sa malim stepenom specifičnosti dovodi do oštrog krivljenja DNK, direktno stimuliše ekspresiju ribozomalnih promotora, uključen je u procese regulacije rekombinacije, replikacije i transkripcije); Lrp protein ("leucine-responsive regulatory protein", vezuje se za zakrivljene sekvence sa niskom specifičnošću, reguliše aktivnost mnogih operona, kao i IHF, Lrp reguliše transkripciju velikog broja promotora delovanjem na strukturu hromozoma) (Perez-Martin & de Lorenzo, 1997).

Iako se veliki broj gena nalazi u okviru operona, što predstavlja jednostavno rešenje organizacije koregulisanih gena koji vrše sličnu funkciju (kao što su npr. geni koji kodiraju proteine metaboličkih puteva), uvedeni su pojmovi regulona, modulona i stimulona kako bi se lakše objasnila koordinisana kontrola velikog broja gena i operona stvorena kao odgovor na široki spektar spoljašnjih i unutrašnjih stimulusa kojima je ćelija izložena. Regulon predstavlja viši nivo kontrole ekspresije gena od operona koji omogućava koordinisanu kontrolu operona zajedničkim regulatorom pri čemu svaki od operona ima svoju jedinstvenu kontrolu. Intenzitet i vreme indukcije svakog od operona u okviru regulona mogu da variraju. Tako npr. temperaturni šift indukuje "heat shock" proteine i to neke 5-7 puta a neke čak 70 puta više nego u normalnim uslovima. U okviru Lrp regulona ekspresija metabolički i fiziološki potuno različitih gena modulirana je na različite načine- stimulatorno ili inhibitorno. Načini aktivacije različitih vrsta regulatora su različiti. Do indukcije može doći kovalentnom modifikacijom (fosforilacijom ili defosforilacijom) pozitivnih ili negativnih regulatora (PhoB i NtrII), razgradnjom negativnog regulatora (LexA), povećanjem celularnog

nivoa regulatora ( $\sigma^{32}$ ) ili promenom konformacije proteina vezivanjem liganda (ciklični AMP-receptorni protein). Moduloni predstavljaju grupu nezavisnih operona (čak iako su ti operoni članovi različitih regulona) pod kontrolom jednog regulatora. Moduloni predstavljaju jedinicu globalne regulacije. Termin stimulon predstavlja grupu gena, oprona, regulona ili modulona koji odgovaraju na određeni stimulus bez obzira na njihovu regulatornu organizaciju i mehanizam indukcije (Neidhardt & Savageau, 1996).

## 1.2. Specifičnost prepoznavanja DNK sekvence

Molekularni mehanizmi koji obezbeđuju specifičnost vezivanja transkripcionih faktora za DNK sekvencu još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Iako je identifikovan veliki broj DNK-vezujućih motiva koji ostvaruju kontakt sa različitim sekvencama i strukturama na molekulu DNK ne može se definisati neko jednostavno pravilo ali opšti principi mesto-specifičnog prepoznavanja mogu se izvesti. Mesto-specifično prepoznavanje uvek uključuje kontakte sa bazama i sa kičmom DNK. Za vezivanje su bitne vodonične i jonske veze (iako ima i hidrofobnih interakcija), koje se stvaraju prvenstveno između bočnih lanaca amino kiselina proteina i baza ili kičme DNK. Nema jednostavnog načina prepoznavanja bočnih lanaca amino kiselina proteina i DNK baza sa kojima interaguju i specifičnost prepoznavanja rezultat je odgovarajuće konformacije ("folding") proteina i pozicije svakog bočnog lanca koji učestvuje u prepoznavanju specifične DNK sekvence. Većina DNK vezujućih motiva interaguje sa velikim žljebom DNK spirale i naročito su važne interakcije sa purinima (koji su veći i sa kojima je moguće ostvariti veći broj vodoničnih veza). Motivi za vezivanje proteina za DNK uglavnom imaju strukturu  $\alpha$ -heliksa koji se svojom konformacijom uklapa u veliki žljeb B-forme DNK (manje zastupljene su  $\beta$ -ploče ili neki produženi regioni polipeptidnih lanaca) i ne formiraju se nove DNK strukture ali dolazi do savijanja i distorzije DNK molekula. Za mesto specifično vezivanje obično su potrebni multipli DNK-vezujući



domeni. Isti motiv može biti upotrebljen više nego jedan put bilo da su u pitanju homodimeri i/ili homotetrameri proteina ili polipeptid koji sadrži motiv za prepoznavanje u tandemu. Takode u istom kompleksu mogu biti prisutni i drugi motivi (Pabo & Sauer, 1992).

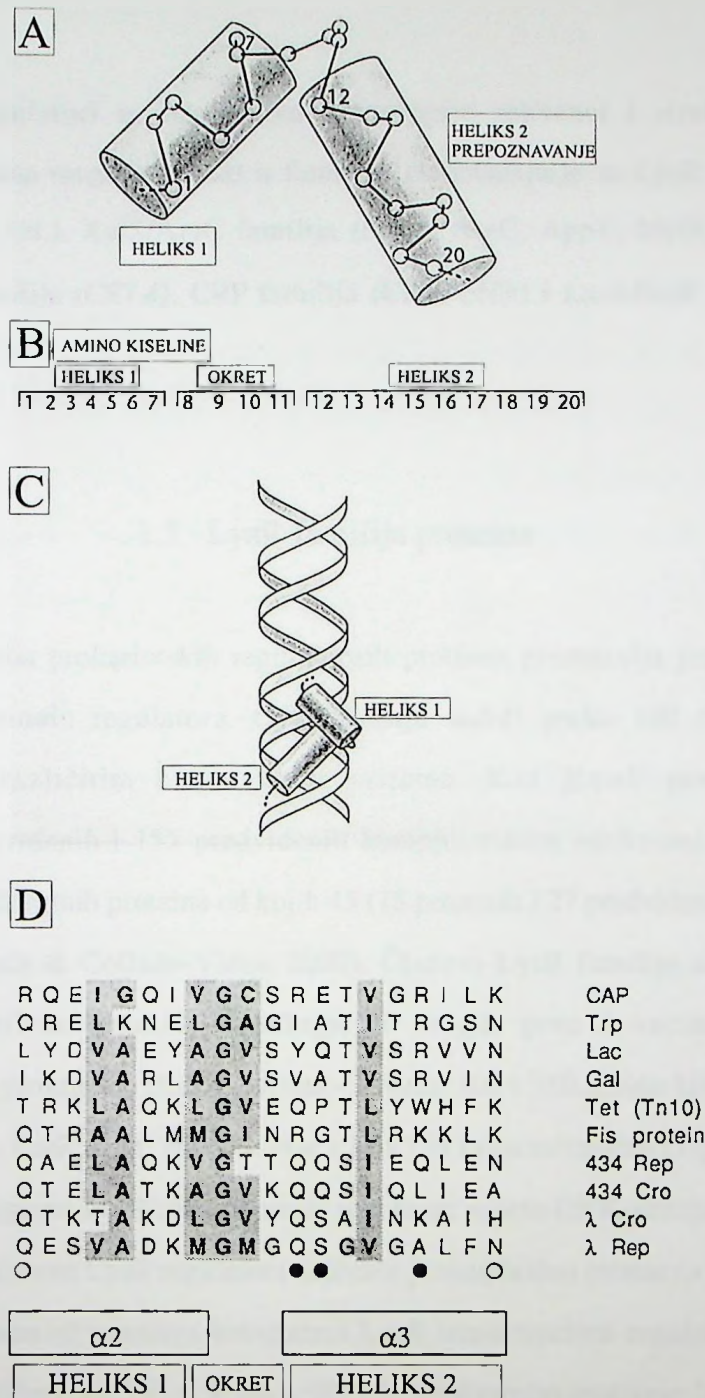
Na osnovu strukturnih analiza i poređenja amino kiselinske sekvence identifikovani su određeni strukturni motivi koje DNK-vezujući proteini koriste u interakciji sa sekvencom DNK. Na osnovu tih motiva ovi proteini se grupišu u specifične klase kao što su: "heliks-turn-heliks" ("HTH"), "β-sheet" (kao što je MalT) i "heliks loop heliks" ("HLH", kao što je ToxT) DNK-vezujući proteini koji su identifikovani kod prokariota. Kod eukariota prisutni su i homeodomeni, "zinc finger", steroidni receptori, metal vezujući proteini i "leucin zipper" proteini. Pored ovoga postoje mnogi važni DNK-vezujući proteini koji ne pripadaju niti jednoj od ovih familija (OmpR, ToxR). Veliki broj DNK vezujućih proteina su transkripcioni faktori. Mnogi DNK-vezujući proteini su homo-dimeri i homo-tetrameri i njihove DNK sekvence za koje se vezuju imaju dvostruku simetriju (C2 ili dijadna simetrija). Ovo nije opšti slučaj- neki specifično DNK-vezujući proteini, kao što je holoenzim RNKP nemaju simetrično vezane subjedinice i ne vezuju se za specifične simetrične sekvence. Najverovatnije je zajednički način prepoznavanja za sve DNK-vezujuće proteine preko α-heliksa. Neki od α-heliksa prave kontakt između bočnih lanaca i baza u velikom žljebu, dok susedni α-heliksi služe za kontakt sa kičmom DNK i služe za orjentisanje heliksa koji prepoznaju specifičnu DNK sekvencu. Neki proteini (CRP) se vezuju samo za jednu stranu duplog heliksa dok neki (λ represor) zahvaljujući fleksibilnom regionu proteina obmotava DNK odnosno vezuje se za obe strane dvostrukog DNK heliksa.

"HTH" struktura je prvi otkriveni DNK-vezujući motiv. Na osnovu poređenja i analize kristalne strukture λCro proteina, CRP proteina kod *E. coli* i λ represora utvrđeno je da se "HTH" motiv sastoji iz prvog α-heliksa, okreta (engl. -turn) i drugog α-heliksa (Slika 5). Najkonzervisanije aminokiseline u "HTH" motivu su glicin (koji je pozicioniran u okretu) i nekoliko hidrofobnih i-ili malih amino kiselina u svakom od α-heliksa (Slika 5D). Oni pomažu u održavanju stabilnosti strukture dva heliksa u okviru "HTH" kao i u održavanju

stabilnosti celog motiva u okviru proteina (Pabo & Sauer, 1992). "HTH" motiv, izdvojen iz konteksta celog proteina nije stabilna struktura. On ne može funkcionosati odvojeno od ostatka proteina i uvek se pojavljuje kao deo većeg DNK-vezujućeg domena koji kao takav predstavlja funkcionalnu jedinicu. Ovaj motiv se javlja u različitim strukturnim okruženjima  $\beta$ -ploče ili  $\alpha$ -heliksa i specifičnost interakcije sa DNK sekvencom ostvaruje se preko drugog heliksa koji se naziva heliks za prepoznavanje ("recognition heliks") (Slika 5). Međutim i ostali širi regioni DNK-vezujućeg domena imaju značajnu ulogu u vezivanju za DNK sekvencu. Analize kokristalnih struktura pokazuju da svi "HTH" protein-DNK kompleksi imaju mnoge zajedničke karakteristike: represori se vezuju kao dimeri u C2 simetriji, svaki monomer prepoznaje po jedno polumesto i simetrija DNK vezujućih mesta se reflektuje na simetriju kompleksa. "HTH" motiv ostvaruje kontakt sa DNK na svakoj polovini operatora. Prvi heliks "HTH" motiva leži iznad velikog žljeba a N-terminus ovog heliksa ostvaruje kontakt sa DNK. Drugi heliks se uklapa u veliki žljeb i N-terminalni deo ovog heliksa je bliži ivici baznih parova (Slika 5). Specifična mesta vezivanja su B-forma DNK. Bočni lanci "HTH" motiva čine specifične kontakte sa grupama u velikom žljebu. Svaki kompleks sadrži široku mrežu vodoničnih veza formiranih između proteina i DNK kičme. Neki od ovih kontakata su ostvareni preko lizina ili arginina ali većina je ostvarena preko kratkih polarnih bočnih lanaca ili -NH grupa iz polipeptidnog lanca. "HTH" proteini često sadrže dodatne domene koji imaju važnu ulogu u regulaciji aktivnosti (Pabo & Sauer, 1992).

Regulatorni proteini vrše različite funkcije, neki od njih regulišu  $\sigma^{70}$  promotore, neki  $\sigma^{54}$  ili oba tipa promotora (kao što je NtrC regulator). Neki proteini regulišu odgovarajuće metaboličke puteve (kao što je CysB protein), mnogi kontrolišu operone sa jednim ili više promotora dok su drugi uključeni u kataboličke regulone (CRP regulator) ili imaju strukturnu i regulatornu ulogu (ArgR i Fis). U nekoliko slučajeva regulatorni proteini direktno utiču na ekspresiju drugih regulatora; kod takvih proteina autoregulacija je najčešći vid kontrole ekspresije gena datog proteina.





Slika 5. DNK-vezujući motiv heliks-okret-heliks ("HTH"). **A** Strukturni izgled "HTH" motiva. **B** Najčešći broj amino kiselina koje ulaze u sastav prvog heliksa, okreta i heliksa za prepoznavanje (drugog heliksa). **C** Interakcija "HTH" motiva sa velikim žljebom DNK molekula (videti tekst). **D** Poređenje amino kiselina koje ulaze u sastav "HTH" motiva nekih poznatih fagnih i bakterijskih regulatornih proteina; na slici su zatamnjene amino kiseline koje su generalno hidrofobne ili male; beli krugovi predstavljaju mesta nespecifične interakcije sa kičmom DNK a crni krugovi mesta specifične interakcije sa bazama u velikom žljebu DNK.

Transkripcioni regulatori se na osnovu homologije sekvenci i strukturne sličnosti funkcionalnih domena mogu grupisati u familije. Najznačajnije su LysR familija (CysB, CynR, GcvA, IlvY itd.), XylS/AraC familija (SoxR, AraC, AppY, MelR, EnvY, itd.),  $\sigma$  familija, Y-box familija (CS7.4), CRP familija (CRP, FNR) i LacI-GalR familija (Ninfa, 1996).

### 1.3. LysR familija proteina

LysR familija prokariotskih regulatornih proteina predstavlja jednu od najvećih familija transkripcionih regulatora. Ova familija sadrži preko 100 članova koji su identifikovani u različitim bakterijskim vrstama. Kod *E.coli* postoji 314 (159 eksperimentalno utvrđenih i 155 predviđenih kompjuterskom analizom) DNK vezujućih transkripcionih regulatornih proteina od kojih 45 (18 poznatih i 27 predviđenih) pripada LysR familiji (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Članovi LysR familije su DNK-vezujući proteini koji pozitivno regulišu transkripciju drugih gena i većina je negativno autoregulisana. Ovi proteini su slične veličine- između 300 i 350 amino kiselina i formiraju homodimere (MetR, CatR, IlvY, NodD3, Nac i IciR) ili homotetramere (TrpI, CysB, NahR). U N-terminalnom regionu LysR transkripcioni regulatori sadrže DNK-vezujući "HTH" motiv. Za funkcionalnu aktivnost LysR regulatora najčešće je neophodno prisustvo malog molekula, koinducera. Nezavisno od prisustva koinducera LysR transkripcioni regulatori se vezuju za DNK sekvencu na sličnoj poziciji (-30 do + 50) i to strukturnim motivom "HTH". Većina je divergentno transkribovana sa promotora koji je veoma blizu i često se preklapa sa promotorom gena koji član LysR familije reguliše; zbog preklapanja, divergentni promotori dozvoljavaju simultanu bidirekcionu kontrolu transkripcije (Schell, 1993). Neki od članova LysR familije (OxyR, Nac i CysB) ne transkribuju se sa divergentnih promotora, ali su negativno autoregulisani. Dok MleR i AlsR nisu autoregulisani, MkaC, NodD i PhcA su



pozitivno autoregulisani. Obično regulatori LysR familije u prisustvu malog signalnog molekula, koinducera aktiviraju transkripciju target promotora između 6-200 puta. Izuzetak su Nac i NodD koji ne zahtevaju prisustvo koinducera i CatM, AmpR i IciA koji uglavnom deluju kao represori. CysB, OccR, Nac, OxyR i MetR pokazuju i represoru-sličan efekat na neke promotore. Osim NhaR proteina koji je vezan za membranu svi ostali regulatori LysR familije lokalizovani su u citoplazmi (Schell, 1993). Najveću sličnost aminokiselinske sekvence članovi LysR familije pokazuju u okviru prvih 66 N-terminalnih amino kiselina. Najveći procenat homologije pokazuje centralni deo ovog regiona (od 23-42 amino kiseline), skoro 40% kod svih članova LysR familije. Analizom sekundarne strukture pokazano je da se tu nalazi "HTH" DNK vezujući motiv. Ovaj motiv kod LysR familije pokazuje neke razlike u odnosu na karakteristike klasičnog "HTH", uglavnom u slabijoj konzervaciji glicina na mestu 9 u okretu ("turn") i prisustvu prolina na poziciji 13 (drugi heliks) (Slika 6A) i kod LysR familije ove pozicije su 31 i 35 u odnosu na N-terminus. Postoje još neka mesta na kojima dolazi do odstupanja od "HTH" motiva. Osim centralnog dela "HTH" i regioni koji ga okružuju su važni za vezivanje. Supstitucije nekih amino kiselina utiču na DNK vezujuću aktivnost mapiranu između aminokiselinskih ostataka 26 i 56. Ove promene dovode do smanjene mogućnosti vezivanja proteina za DNK i aktivaciju transkripcije, do smanjenja koinducerom stimulisane transkripcione aktivacije kao i do narušavanja autoregulacije (Schell, 1993). U centralnom regionu proteini LysR tipa pokazuju najnižu homologiju. Na osnovu mutacionih studija urađenih na nekim članovima ove familije pretpostavlja se da dva subdomena ovog centralnog regiona (amino kiseline 95-173 i 196-206) mogu biti uključene u prepoznavanje ili odgovor na prisustvo koinducera. Regioni uključeni u multimerizaciju nisu još dobro niti dovoljno definisani. Neki eksperimentalni rezultati dobijeni za NahR, AmpR i OxyR ukazuju da je C-terminalni domen uključen u proces oligomerizacije. Samo jedan region u C-terminalnom domenu proteina pokazuje homologiju među različitim članovima LysR familije. Amino kiseline u regionu 236-246 sadrže deo  $\beta$ -okret ("turn") - $\beta$  ligand vezujući deo. Važnost malih susednih regiona u funkcionisanju LysR transkripcionih

regulatora podržana je činjenicom da mutacije u ovom domenu ( $\beta$ -turn- $\beta$ ) uzrokuju ili promjenjen odgovor na koinducer ili gubitak vezivanja za molekul DNK.

Za nekoliko članova LysR familije, uključujući i CysB je sugerisano da pripadaju klasi I transkripcionih aktivatora, odnosno da interaguju sa  $\alpha$ CTD holoenzima RNKP, međutim do danas nije bilo studija koje bi pokazale jasne rezultate koji potvrđuju kontakt između bilo kog člana LysR familije i RNK polimeraze.

Visoka homologija između transkripcionih regulatora LysR familije kao i njihove slične tercijarne strukture ukazuju da su evoluirali od zajedničkog pretka. Velike genetičke razlike i distance između prokariota koje sadrže LysR tip transkripcionih regulatora kao i velika razlika u G+C sastavu sugerišu da se ova familija u toku evolucije prokariota javila rano. Strukturne razlike različitih koinducera koji stimulišu razne članove LysR familije takođe pokazuju da se radi o evolutivno staroj grupi proteina. Na osnovu sličnosti sekvence i filogenetskih veza LysR familija može se podeliti u nekoliko subfamilija. Članovi ovih mogućih subfamilija ne dele neke očigledne zajedničke načine funkcionisanja, nemaju iste koinducere, gene koje regulišu ili poreklo što upućuje na supstancijalnu divergentnost. Uzevši u obzir konzerviranu veličinu, organizaciju ali i međusobne razlike može se govoriti o staroj ali i efikasnoj familiji regulatora (Schell, 1993).

#### 1.4. CysB protein

CysB protein je član LysR familije transkripcionih regulatora i osnovni pozitivni faktor aktivacije većine *cys* gena uključenih u biosintezu cisteina kod bakterije *E. coli*. *cys* geni čine cisteinski regulon a njihovi produkti su uključeni u asimilaciju sulfata putem sinteze cisteina. CysB deluje takođe kao represor na transkripciju sopstvenog gena. On deluje i na promotore nekih drugih gena koji ne pripadaju cisteinskom regulonu, kao što su geni taurinskog operona *tauABCD*, *ssuEADCB* operona, *cbl*, *adi* i *lysU* geni. Divlji tip (WT) CysB



je homotetramer, sastoji se od četiri identične subjedinice od 324 amino kiseline molekulske težine 36000 D, koje kodira *cysB* gen. *cysB* gen je lociran na 28 minutu mape *E. coli* hromozoma između *trp* operona i *pyrF* gena i ne nalazi se u sastavu operona kao većina drugih gena cisteinskog regulona. CysB protein je u ćeliji zastupljen sa manje od 0.1% od svih solubilnih ćelijskih proteina i nalazi se u citoplazmi (Kredich, 1996).

Na osnovu dosadašnjih rezultata, najčešće dobijenih mutacionom analizom definisani su određeni regioni odgovorni za vezivanje CysB proteina za molekul DNK, za raspoznavanje i odgovor na dejstvo inducera, za oligomerizaciju molekula i za pozitivnu kontrolnu aktivnost (videti Prilog 1).

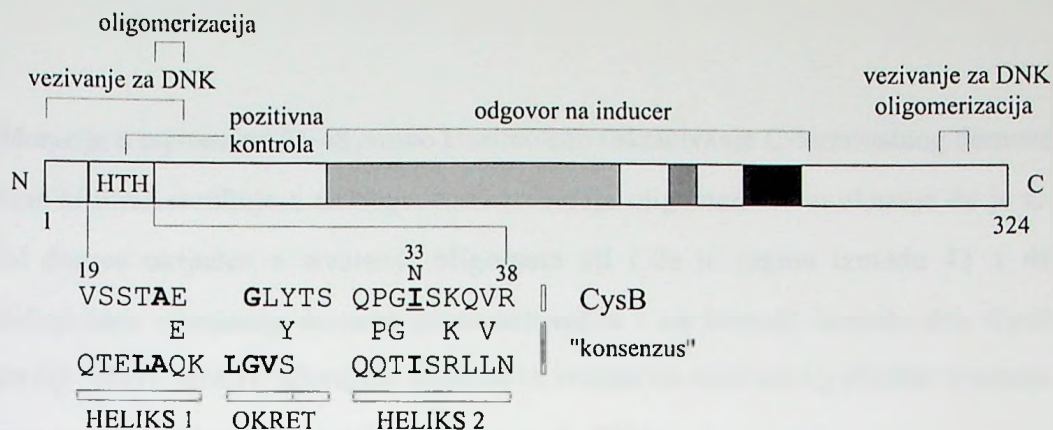
N-terminalni domen CysB proteina odgovoran je za vezivanje za DNK. "HTH" motiv koji sadrže svi članovi LysR familije (od 19 do 38 amino kiseline) kao i amino kiseline u njegovoj blizini (od 11 do 48) neophodne su za vezivanje CysB proteina za DNK (Slika 6.A). Izolovani su mutanti koji sadrže supstitucije u kodonu 33 - ATC (Ile) u AAC (Asn) i kodonu 34 - Ser u Arg (Colyer & Kredich, 1994). Ove mutacije nalaze se u drugom heliksu "HTH" DNK-vezujućeg motiva i dovode do gubitka autoregulacije kao i nemogućnosti aktivacije *cysP* promotora (promotora jednog od CysB-pozitivno regulisanih gena cisteinskog regulona (Colyer & Kredich, 1994). Takode i C-terminalni kraj proteina može biti neophodan za vezivanje za DNK jer skraćenje za 19 do 30 amino kiselina C-terminalnog domena rezultuje u gubitku represivnog dejstva CysB proteina *in vivo*. (Lochowska *et al.*, 2001) (Slika 6A). Nije pokazano da li je uticaj skraćenja na vezivanje direktan ili uloga C-terminalnog domena CysB proteina može biti indirektna, delovanjem na stabilnost proteina a možda i na sposobnost oligomerizacije (Lochowska *et al.*, 2001).

Kod pozitivno regulisanih promotora CysB protein se vezuje kao tetramer u odsustvu inducera N-acetil serina (NAS) i zauzima veliki region DNK što rezultuje u zakrivljenju DNK od 100°. Ovakav strukturni kompleks protein-DNK ne favorizuje transkripcionu aktivaciju promotora. Pretpostavlja se da NAS vezivanjem za CysB protein indukuje konformacione promene koje omogućavaju proteinu da interaguje prvenstveno sa

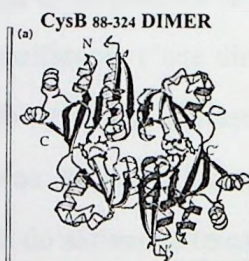
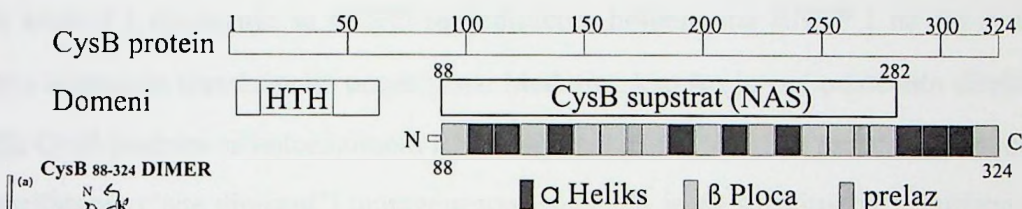
"aktivatorskim mestima" što smanjuje i zakrivljenost DNK na 50°. Stabilna interakcija CysB tetramera sa jedinstvenim aktivatorskim mestima kritična je za transkripcionu aktivaciju i možda neophodna za interakciju sa holoenzimom RNKP. Mutacije koje utiču na odgovor CysB proteina na inducer NAS (konstitutivno aktivni ili neinducibilni mutanti) mapiraju u regionu između 95-173 i 196-206 amino kiseline kao i u regionu bližem C terminalnom delu proteina 227-255 (Slika 6B). Položaj ovih mutacija odgovara strukturnom modelu fragmenta (koji je skraćen za prvih 88 amino kiselina, 88-324) CysB monomera po kom su sve mutacije lokalizovane u blizini dela molekula tzv. "džepa", za koji se vezuje inducer-NAS (Lochowska et al., 2001) (Tyrrell et al., 1997) (Slika 6).

Kristalografske analize pokazale su da je terciarna struktura CysB (iz *Klebsiella aerogenes*) bez N-terminusa (88-324) (Slika 6B) slična strukturi koju imaju periplazmatski supstrat-vezujući proteini PBP familije koji služe kao receptori za transportne sisteme odgovorne za unosenje nutrijenata kod Gram-negativnih bakterija. Svaki CysB 88-324 monomer zauzima strukturu sastavljenu od dva slična I i II domena, koji su povezani pomoću dva prelazna regiona (Slika 6B). Između ova dva domena nalazi se usek (džep) koji vezuje anjon sulfata npr. NAS (Slika 6.B). Pretpostavlja se, da se na istom mestu veže i anti-inducer tiosulfat, sprečavajući transkripcionu stimulaciju mehanizmom kompetitivne inhibicije (Keskin et al., 2000; Tyrrell et al., 1997). Slična konformacija je utvrđena i za cAMP-vezujući domen LacI represora što implicira povezanost između struktura Lac represora i LysR familije proteina. Za razliku od divljeg tipa CysB proteina koji formira tetramere, skraćena forma CysB proteina formira dimere. Pri formiranju dimera domen I jednog od monomera interaguje sa domenom II drugog monomera i obrnuto, kontakt između subjedinica je ostvaren preko vodoničnih grupa glavnih lanaca. Nasuprot Lac represoru, kod CysB proteina C2 osa simetrije koja povezuje monomere u dimer je perpendikularna a ne paralelna dužoj osi kofaktor (inducer)-vezujućeg domena. Ovo za posledicu ima postavljanje DNK-vezujućih domena i "HTH" motiva na suprotne strane molekula dimera i moguće je da uslovljava produženo vezivanje CysB za više polumesta na DNK (Koen et al., 1998).

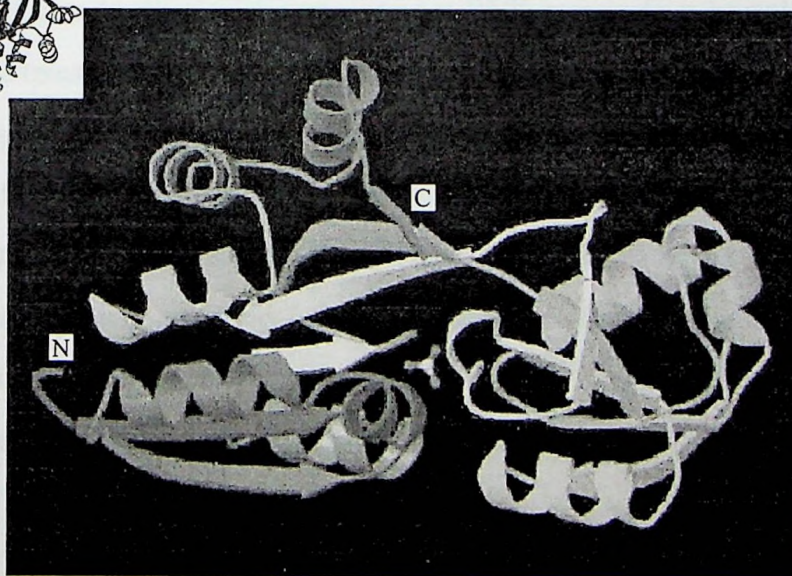




## B



Kristalna struktura CysB proteina od 88-324 ak



Slika 6. CysB protein. A Shematski prikaz funkcionalnih domena CysB proteina. Posebno je istaknut HTH motiv CysB i upoređen sa motivom sastavljenim od najčešće prisutnih ak (konsenzus) kod raznih proteina. Pokazana je i zamena ak I33N (podvučeni I) kod mutanta *cysB98*. B Shematski prikaz sekundarne strukture regiona CysB proteina od 88-324 ak koje obuhvataju domen koji vezuje inducer NAS i produženi region (videti tekst). Prikazana je i kristalna struktura monomera istog regiona sa vezanim NAS (trokraka struktura). U gornjem levom uglu nalazi se kristalna struktura dimera regiona 88-324 CysB proteina (a) koja predstavlja dva perpendikularno vezana monomera (videti tekst).

Mutacije u regionu od 41-48 amino kiseline kao i skraćivanje C-terminalnog domena za 16 amino kiselina rezultuje u nemogućnosti stvaranja oligomera. Ovo ukazuje da je C-terminalni domen uključen u stvaranje oligomera ali i da je region između 41 i 48 aminokiseline (deo vezujućeg domena proteina) važan i za kontakt između dva CysB monomera čiji "HTH" motivi interaguju direktno sa vezujućim mestima C<sub>2</sub> dijadne simetrije odgovornim za aktivaciju promotora (Lochowska et al., 2001).

Pretpostavlja se da CysB protein kao i neki drugi članovi LysR familije deluje kao aktivator klase I i interaguje sa  $\alpha$ CTD subjedinicom holoenzima RNKP i na taj način omogućava inicijaciju transkripcije target gena. Međutim, kao što je već pomenuto direktna interakcija CysB proteina sa holoenzimom RNKP nije pokazana. Analiza mutanata dobijenih mesto specifičnom ("site directed") mutagenezom pokazala je da supstitucija triptofana 27 dovodi do defekta u transkripcionoj aktivaciji. Protein je sposoban da se veže za DNK i da odgovori na dejstvo inducera kvalitativnim promenama u DNK-proteinskom kompleksu ali ne dovodi do aktivacije transkripcije. Ovi rezultati potvrđuju da N-terminalni "HTH" motiv i ceo region pored uloge u vezivanju i krivljenju molekula DNK ima i dodatnu funkciju, ostvaruje kontakt sa holoenzimom RNKP. Da do ove interakcije najverovatnije dolazi ukazuju i mutacije u *rpoA* ( $\alpha$  subjedinica RNKP) genu koje utiču na CysB zavisnu ekspresiju *cysPTWA* operona. Da bi došlo do transkripcione aktivacije izgleda da je neophodan kontakt između  $\alpha$ CTD holoenzima RNKP i odgovarajućeg aktivacionog regiona CysB proteina u kom triptofan 27 ima esencijalnu ulogu. (Lochowska et al., 2001).

#### 1.4.1. Biosinteza cisteina i regulacija cisteinskog regulona

CysB protein reguliše ekspresiju gena cisteinskog regulona kao i nekih drugih gena koji ne pripadaju ovom regulonu. Cisteinski regulon sadrži brojne gene koji su odgovorni za sulfatni transport, redukciju sulfata do sulfida i biosintezu cisteina od serina i acetil CoA kod



gram-negativnih bakterija (Slika 7A). CysB je i aktivator i represor transkripcije. Njegova aktivnost je zavisna od prisustva inducera NAS koji se formira intracelularno neenzimatskom reakcijom od cisteinskog prekursora O-acetil serina (OAS) (Slika 7B).

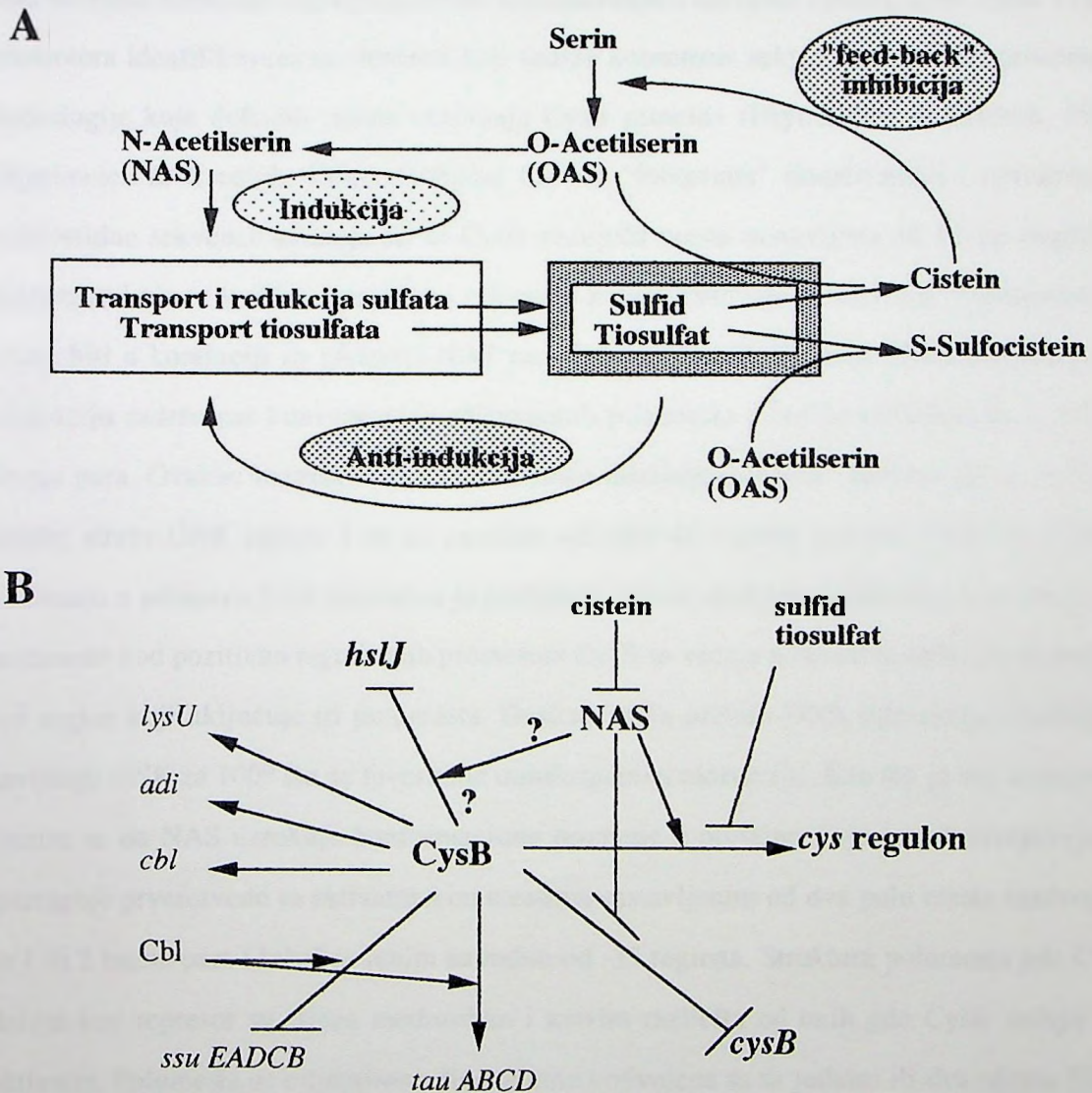
Biosinteza cisteina iz neorganskog sulfata, najčešćeg izvora sumpora kod aerobnih bakterija, je ključni metabolički put kojim bakterije, gljive i biljke mogu preuzeti sumpor. Proces biosinteze uključuje aktivni transport supstrata -sulfata u ćeliju, njegovu konverziju u adenzin-5'-fosfosulfat (APS) i 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS), redukciju sulfata do sulfita i sulfida, a zatim se sumpor iz sulfida inkorporiše u OAS pri čemu dolazi do stvaranja L-cisteina (Slika 7A). Alternativni put biosinteze cisteina je preko transporta tiosulfata iz spoljašnje sredine koji u reakciji sa OAS stvara S-sulfocistein koji se zatim redukuje u cistein (Kredich, 1996).

Dva različita enzima O-acetilserin-liaza A i O-acetilserintiol-liaza B (kodirane različitim genima - *cysK* i *cysM*) učestvuju u katalitičkoj reakciji sinteze cisteina iz OAS i sulfida. O-acetilserintiol-liaza B može u prisustvu tiosulfata (umesto sulfida) i OAS sintetisati S-sulfocistein. Krajnji produkt biosintetskog puta, cistein, direktno je uključen u regulaciju ovog biosintetskog puta - "feedback" inhibicijom serin transacetilaze, enzima koji katalizuje sintezu OAS (Slika 7A). CysB protein i inducer NAS neophodni su za transkripcionu aktivaciju gena cisteinskog regulona (Slika 7B). Visok nivo ekspresije gena cisteinskog regulona zahteva opšti nedostatak sumpora (odsustvo cisteina i sulfida iz medijuma za rast), aktivnost transkripcionog regulatora LysR tipa- CysB proteina i prisustvo inducera NAS (Kredich, 1996). Sulfid i tiosulfat su antiinduceri i oni inhibiraju transkripcionu aktivnost CysB proteina verovatno sprečavajući ili menjajući konformacione promene izazvane inducerom NAS (ne sprečavaju vezivanje NAS za CysB) (Slika 7).

Geni cisteinskog regulona nalaze se na više mesta na hromozomu. Grupisani su u operone ili se nalaze zasebno kao što su *cysB*, *cysE* i *cysK* geni. Ekspresija *cysE* gena nije regulisana CysB proteinom. *cysE* je konstitutivno eksprimiran i kodira enzim serin transacetilazu (koja katalizuje sintezu OAS). Geni i genski klasteri pozitivno regulisani CysB

proteinom uključuju *cysPTWAM*, *cysK*, *cysJIIH*, *cysDNC*, *sbp* i gene L-cisteinskog transportnog sistema CTS-1.

CysB se vezuje uzvodno od -35 regiona kod većine promotora gena čiju transkripciju aktivira. Prisustvo NAS stimuliše njegovo vezivanje (Slika 8). CysB protein takode se vezuje



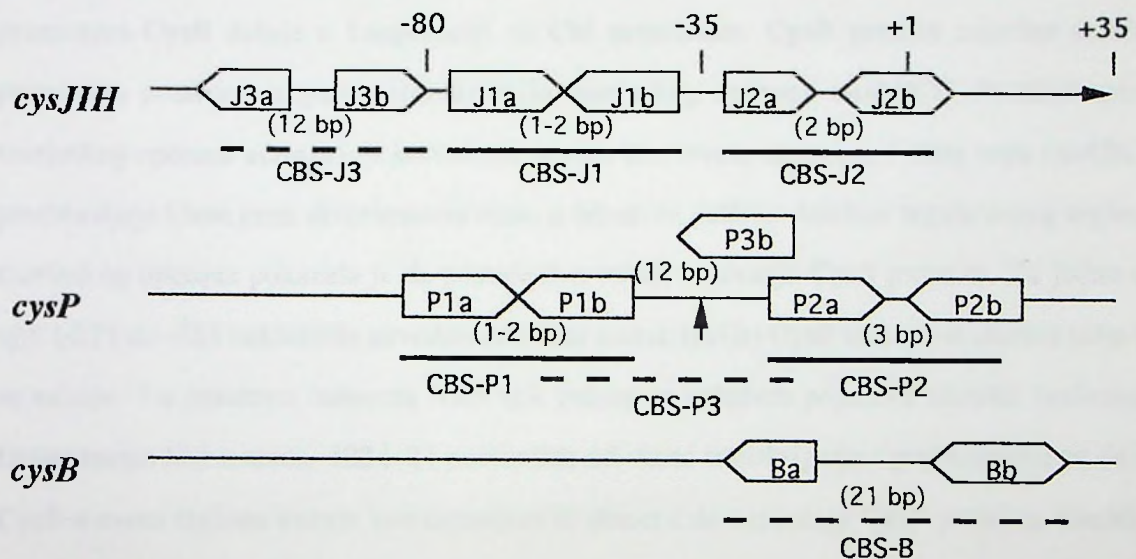
Slika 7. A Kontrolni mehanizmi u biosintezi cisteina (videti tekst). B CysB kao regulator asimilacije sumpora i kao globalni regulator (videti tekst). Strelice - pozitivna regulacija, pregrade - negativna regulacija.



za sopstveni promotor u -10 regionu promotora i tu deluje kao represor. U ovom slučaju NAS deluje kao antiinducer i smanjuje reprimirajući efekat CysB proteina destimulišući njegovo vezivanje za sopstveni promotor (Slika 8).

Interakcije CysB proteina sa promotorskom sekvencom *cys* gena veoma su kompleksne zbog postojanja višestrukih preklapajućih vezujućih mesta i odsustva jasno konzrevisane sekvence i krivljenja DNK. Uporedivanjem sekvenci *cysJIIH*, *cysP*, *cysK* i *cysB* promotora identifikovani su elementi koji sadrže konsenzus sekvence sa malim procentom homologije koje definišu mesta vezivanja CysB proteina (Hryniewicz & Kredich, 1994; Hryniewicz & Kredich, 1995). Hidroksi radikal "footprints" eksperimenti i upredivanje nukleotidne sekvence ukazuje da su CysB vezujuća mesta sastavljena od 19 bp dugačkih polumesta koja se razlikuju po dužini sekvence koja ih razdvaja i relativnoj orijentaciji koja može biti u korelaciji sa efektom NAS na vezivanje CysB proteina (Slika 8). Mesta za aktivaciju sadrže par konvergentno orijentisanih polumesta i ona su odvojena sa 1, 2 ili 3 bazna para. Ovakav razmak između polumesta dozvoljava CysB proteinu da se veže na jednoj strani DNK spirale i to na površini od oko 40 baznih parova. Povećan afinitet vezivanja u prisustvu NAS verovatno je posledica ovakve strukture polumesta. Kao što je već pomenuto kod pozitivno regulisanih promotora CysB se vezuje u odsustvu inducera za mnogo širi region koji uključuje tri polumesta. Ovakav način protein-DNK interakcije rezultuje u savijanju DNK za 100° što ne favorizuje transkripcionu aktivaciju. Kao što je već pomenuto, smatra se da NAS uzrokuje konformacione promene u proteinu koje mu dozvoljavaju da interaguje prvenstveno sa aktivatorskim mestima sastavljenim od dva polu mesta razdvojena sa 1 ili 2 bazna para i lokalizovanim uzvodno od -35 regiona. Struktura polumesta gde CysB deluje kao represor su slična međusobno i sasvim različita od onih gde CysB deluje kao aktivator. Polumesta su orijentisana divergentno i odvojena su sa jednim ili dva okreta DNK, odnosno 11, 21 ili 23 bazna para. Smatra se da ovakva struktura uzrokuje smanjenu vezujuću aktivnost represora u prisustvu NAS (Kredich, 1996).

Kod promotora *cysB* gena CysB štiti DNK region koji se poklapa sa vezujućim mestima za RNKP i ovo dovodi do represije transkripcije. U ovom slučaju NAS redukuje vezivanje CysB za DNK na taj način oslobađajući *cysB* transkripcione represije. Sulfid i tiosulfat deluju kao antiinduceri i kompetitori su NAS za vezujuće mesto u centralnom regionu CysB proteina (Slike 6B i 7). Sam cistein je inhibitor serin transacetilaze, enzima neophodnog za biosintezu OAS i konsekventno NAS.



Slika 8. Shematski prikaz konsenzus sekvenci za koje se vezuje CysB, i njihova orijentacija i veličina (videti tekst). CysB deluje kao aktivator transkripcije na prikazanim *cysJIH* i *cysP* promotorskim regionima dok autoregulise sopstveni *cysB* promotor kao represor. Podvučeno punom linijom - mesta vezivanja CysB gde NAS deluje kao inducer; podvučeno isprekidanom linijom - mesta vezivanja CysB gde NAS deluje kao anti-inducer; vertikalna strelica i podvučeno isprekidanom linijom - mesto savijanja DNK nakon vezivanja CysB osetljivo na prisustvo NAS.

#### 1.4.2. Regulacija asimilacije sumpora

CysB protein reguliše i gene koji učestvuju u asimilaciji sumpora (Slika 7.B). CysB pozitivno reguliše transkripciju *cbl* gena. *cbl* gen (*cys B*-like) kodira Cbl protein, strukturno



sličan LysR familiji transkripcionih aktivatora, koji pokazuje 40% homologije (na aminokiselinskom nivou) sa celim CysB proteinom (Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995). Cbl je pozitivan regulator gena *tauABCD* i *ssuEADCB* operona čiji su produkti uključeni u asimilaciju sumpora. Način vezivanja CysB proteina za *cbl* promotorski region nije detaljno studiran u smislu određivanja broja i pozicije CysB vezujućih mesta. Kao i kod drugih gena pozitivno regulisanih CysB proteinom, inducer, NAS utiče na vezivanje CysB proteina za *cbl* regulatorni region (Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995). Kod *tau* i *ssu* promotora CysB deluje u kooperaciji sa Cbl proteinom. CysB protein zajedno sa Cbl proteinom pozitivno reguliše transkripciju taurinskog operona *tauABCD*. Produkti gena taurinskog operona učestvuju u korišćenju taurina kao izvora sumpora, i zbog toga *tauABCD* predstavljaju klasu gena eksprimiranu samo u odsustvu sulfata. Analiza regulatornog regiona taurinskog operona pokazala je da postoje dva mesta vezivanja CysB proteina. Za jedno od njih (-221 do -183 nukleotida uzvodno od starta transkripcije) CysB ima visok afinitet tako da se vezuje i u odsustvu inducera NAS dok prisustvo inducera pojačava afinitet vezivanja. Drugo mesto leži između -122 i -11 nukleotida od starta transkripcije i pretpostavlja se da se CysB u ovom regionu vezuje kao monomer ili dimer i da vezivanje CysB proteina stimuliše prisustvo NAS i tiosulfata. Iako je Cbl primarni i esencijalni pozitivni regulator taurinskog operona njegovo prisustvo bez CysB nije dovoljno za maksimalnu aktivaciju *tau* promotora. Iako sam Cbl ne učestvuje direktno u aktivaciji vezivanje Cbl u -10 regionu promotora pomaže grupisanju CysB proteina (ili njegovom repozicioniranju) u CysB vezujućem regionu što favorizuje optimalni kontakt sa transkripcionom mašinerijom (VAN DER Ploeg *et al.*, 1997).

*ssuEADCB* klaster gena kodira proteine koji omogućavaju korišćenje sumpora od alifatičnih sulfonata i čija ekspresija je reprimirana u prisustvu sulfata. Uloga CysB proteina nije u potpunosti razjašnjena ali se zna da postoji bar jedno mesto vezivanja koje se preklapa sa -35 i -10 regionom i da vezivanje CysB za ovo mesto sprečava vezivanje holoenzima RNKP što ukazuje na moguću ulogu CysB proteina kao represora (kao represor CysB deluje

jedino na ekspresiju sopstvenog gena) (VAN DER Ploeg *et al.*, 1999). Dakle za ekspresiju *tau* i *ssu* gena neophodno je prisustvo CysB i Cbl proteina-transkripcionih regulatora LysR tipa. CysB protein je negativno autoregulisan i verovatno predstavlja glavni regulator ekspresije gena vezanih za asimilaciju sumpora kod *E. coli*, dok Cbl protein funkcioniše kao pomoćni element specifičan za regulaciju gena čiji produkti su uključeni u asimilaciju sumpora iz izvora sumpora organskog porekla.

### 1.4.3. Regulacija *hslJ* gena

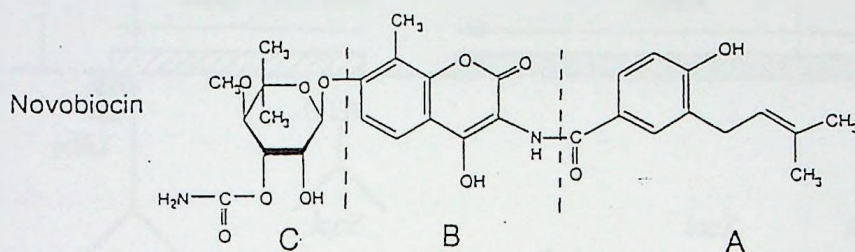
Pored uloge u regulaciji cisteinskog regulona i asimilacije sumpora, CysB protein aktivira transkripciju *adiA* i *lysU* gena koji učestvuju u odgovoru ćelije na stres izazvan povećanim pH (Hassani *et al.*, 1995). Pokazana je i uloga CysB proteina vezana za rezistenciju bakterije *E. coli* na dva antibiotika, novobiocin i mecilinam. Novobiocin je kumarinski antibiotik (Slika 9) dok mecilinam pripada grupi penicilina. *cysB* mutanti pokazuju povećanu rezistenciju na ova dva antibiotika.

Mecilinam deluje na "penicilin binding" proteine (PBP2) koji katalizuju umrežavanje disaharidnih jedinica u peptidoglikanski sloj, smešten u periplazmatskom prostoru ćelije i odgovornom za održanje oblika ćelije. Pored *cysB* mutanata povećanu rezistenciju na mecilinam pokazuju i neki aminoacil-tRNK sintetazni mutanti (Jovanovic *et al.*, 1999).

Poznato je da novobiocin deluje na GyrB subjedinicu giraze, topoizomeraze koja reguliše superspiralizaciju DNK i jedina uvodi negativne supernavoje u molekul DNK. Svojim delovanjem giraza utiče na DNK replikaciju, transkripciju i rekombinaciju. Novobiocin inhibira ATP-aznu aktivnost GyrB subjedinice. Pored *gyrB*, povećan nivo rezistencije na novobiocin pokazuju *cysB* i *cysE* mutanati (Rakonjac *et al.*, 1991) i neki amino acil-tRNK sintetazni mutanti (Jovanovic *et al.*, 1999). Pokazano je da je i *cls* gen



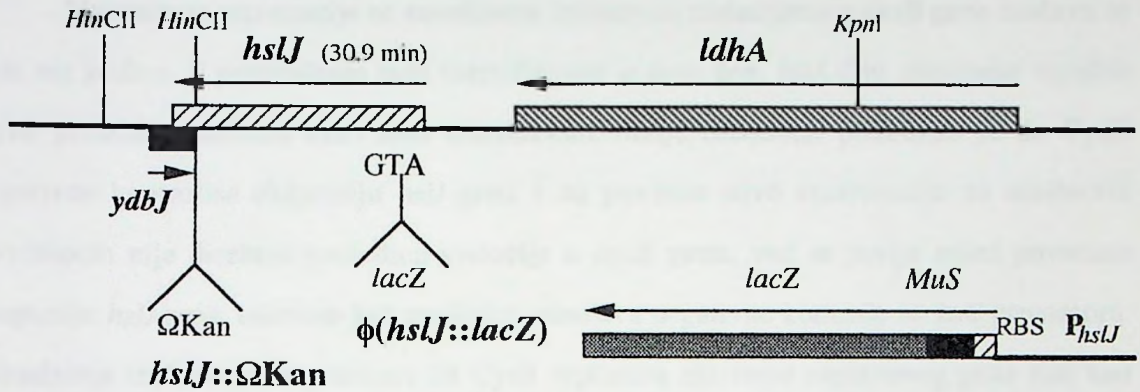
odgovoran za rezistenciju *E. coli* na ovaj antibiotik (Ivanisevic *et al.*, 1995). Način na koji novobiocin prolazi kroz membranu nije poznat a ni mehanizam rezistencije *cysB* mutanata na ovaj antibiotik nije razjašnjen.



Slika 9. Hemijska struktura antibiotika novobiocina. Delovi molekula novobiocina A-derivat benzoeve kiseline; B-kumarinski ostatak; C-šećer novioza.

Analizom aktivnosti translacionih fuzija nasumično dobijenih insercijom indikatorskog gena *lacZ* ( $\lambda$ placMu fag) u *cysB* mutantima identifikovan je gen *hslJ* koji je pod kontrolom CysB proteina (Lilic, 1998) (Slika 10, Prilog 2). Pokazano je da je za rezistenciju na novobiocin kod *cysB* mutanata neophodno prisustvo intaktnog *hslJ* gena koji mapira na 31 minutu hromozoma *E. coli* (Slika 10). Inaktivacija *hslJ* gena insercijom Kan kasete ( $\Omega$ Kan) u C-terminalni region *hslJ* (Slika 10, Prilog 2) dovodi do pada rezistencije na novobiocin kod *cysB* mutanata. Detaljnija analiza translacione fuzije *hslJ::lacZ* pokazala je da CysB negativno reguliše ekspresiju *hslJ* gena. Dakle, rezistencija *cysB* mutanata na novobiocin je posledica povećane ekspresije *hslJ* ili preciznije ukidanja negativne regulacije CysB proteinom. Nije pokazano da li se CysB direktno vezuje u regulatornom regionu *hslJ* gena i deluje kao represor. Prema nekim analizama *hslJ* je svrstan u "heat shock" inducibilne gene ali su kasnija istraživanja pokazala da ekspresija *hslJ* nije indukovana povišenom temperaturom i da je njegova transkripcija najverovatnije zavisna od  $\sigma^{70}$  faktora (Prilog 2). Iako je *hslJ* neophodan za povećanu rezistenciju na novobiocin inaktivacija *hslJ* gena ne utiče

na rezistenciju *cysB* mutanata na mecilinam. Preliminarana istraživanja ukazuju da je *hslJ* gen autoregulisan.



Slika 10. *hslJ* gen. Na slici je prikazana pozicija *hslJ* gena na hromozomu *E. coli* (Aiba, 1996a; Aiba, 1996b) kao i parcijalna restrikciona mapa tog regiona. Obeležene su: insercija  $\lambda$ placMu minifaga u A-TG start kodon *hslJ* gena i stvaranje genske (translacione) fuzije *hslJ::MuSlacZ* (*hslJ::lacZ*) kao i pozicija insercije kanamicinske kasete  $\Omega$ Kan.



## II CILJ RADA

Mehanizam rezistencije na novobiocin indukovane mutacijama u *cysB* genu izučava se duži niz godina. U prethodnom radu identifikovan je novi gen, *hslJ*, čiju ekspresiju reguliše CysB protein. Analizom aktivnosti translacione fuzije *hslJ::lacZ* pokazano je da CysB negativno kontroliše ekspresiju *hslJ* gena i da povećan nivo rezistencije na antibiotik novobiocin nije direktna posledica mutacije u *cysB* genu, već se javlja usled povećane ekspresije *hslJ* gena, odnosno kao posledica odsustva negativne kontrole na *hslJ* promotoru. Dosadašnja izučavanja su pokazala da CysB reprimira aktivnost sopstvenog gena dok kod ostalih gena cisteinskog regulona i kod nekih drugih gena i operona deluje kao aktivator transkripcije. NAS ima ulogu inducera u ostvarivanju funkcije CysB proteina kao aktivatora, dok kod autoregulacije samog *cysB* gena smanjuje efikasnost represije.

Obzirom da se CysB protein sve više posmatra kao globalni regulator a ne samo kao regulator cisteinskog regulona i da deluje prvenstveno kao aktivator, cilj ovog rada je da se utvrdi da li CysB direktno, vezivanjem za regulatorni region kontroliše ekspresiju *hslJ* gena kao represor ili postoji drugi, indirektan put negativne regulacije. Ukoliko CysB direktno reguliše ekspresiju *hslJ* gena, postavlja se i pitanje uticaja NAS na afinitet vezivanja CysB regulatora.

Cilj ovog rada je i definisanje regulatornog regiona i promotora *hslJ* gena kao i određivanje minimalnog promotorskog regiona i fragmenta *hslJ* lokusa za koji se vezuje CysB regulator.

Identifikacija i karakterizacija *cysB* mutacija koje utiču na funkcionalnost CysB proteina u regulaciji *hslJ* gena, doprineće detaljnijem upoznavanju uloge različitih funkcionalnih domena u okviru strukture ovog regulatora.

Određivanje direktne korelacije između ekspresije *hslJ* gena i rezistencije bakterije na novobiocin, strukturna analiza putativnog produkta *hslJ* gena, njegova lokalizacija u ćeliji pa samim tim i moguća funkcija HslJ u ostvarivanju mehanizma rezistencije na novobiocin takođe su cilj ovog rada.



### III MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni materijal

##### 3.1.1. Biološki materijal - bakterijski sojevi, fazi i plazmidi

U Tabeli 1 su navedeni laboratorijski sojevi i fazi bakterije *Escherichia coli* K12 korišćeni u ovom radu. Spisak plazmida koji su korišćeni u ovom radu naveden je u Tabeli 2.

##### 3.1.2. Medijumi za rast i održavanje bakterija i faga

Bakterijski sojevi su gajeni na čvrstoj podlozi (LA) koja sadrži, NaCl (5 g/l), Difco kvašćev ekstrakt (5 g/l), Difco bacto-tripton (10 g/l), Difco bacto-agar (15 g/l) ili u tečnom medijumu (LB) istog sastava bez agara. Za testiranje bakterija korišćena je minimalna A podloga (MMA) koja sadrži, Difco bacto-agar (15 g/l), glukozu (5 ml/l 40% rastvora), MgSO<sub>4</sub> (1 ml/l 20% rastvora), vitamin B1 (0.5 ml/l 1%-og rastvora) i 1 x A soli (10.5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.42 g/l Na-citrata). Aminokiseline su dodavane prema ustanovljenoj koncentraciji (Davis *et al.*, 1980). Mekani agar 0.7% (TA7) sadrži, 7 g/l Difco bacto-agara, 10 g/l Difco bacto-triptona i 5 g/l NaCl. MacConkey podloga (crveno-bela selekcija) sadrži 40 gr/l MacConkey agara i 50 ml/l 20% laktoze. Tečni medijum za gajenje λ faga TBMM sadrži, Difco bacto-tripton (10 g/l), NaCl (5 g/l) 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% maltozu i 1 mg/ml tiamina .

Antibiotici su dodavani u sledećim koncentracijama: ampicilin (Amp) 50 µg/ml (za tečni medijum) i 80 µg/ml (za čvrstu podlogu) ukoliko nije drugačije naznačeno, kanamicin

(Kan) 25 µg/ml, spektinomycin (Spc) 50 µg/ml, tetraciklin (Tet) 12.5 µg/ml i novobiocin (Nb) od 20 do 700 µg/ml.

Za detekciju aktivnosti β-galaktozidaze (plavo-bela selekcija) u podloge je dodavan 0.1 ml 10 mg/ml rastvora 5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktozida (X-Gal) rastvorenog u N,N-dimetilformamidu. Za indukciju *lac* promotora je korišćen IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) rastvoren u vodi, u naznačenim koncentracijama. Enzimski esej je raden sa supstratom ONPG (o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid).

Tabela 1. Bakterijski sojevi i fazi korišćeni u ovom radu.

Soj	Genotip	Izvor / Referenca
C600	F <sup>-</sup> <i>thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 rfbD1</i>	(Appleyard, 1954)
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD39 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 deoC1 ptsF25 rbsR fibB5301</i>	(Casadaban, 1976)
MC4100λ <sub>psp3</sub>	MC4100 λ-φ( <i>pspA-lacZ</i> )	(Dworkin <i>et al.</i> , 2000)
AB1157	F <sup>-</sup> <i>thi-1 thr-1 leuB6 Δ(gpt-proA)62 argE3 hisG4 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-51 tsx 33 rpsL31 supe44 rfbD1 mgl-51 kdgk51 rac<sup>-</sup></i>	(De Witt & Adelberg, 1962)
DHB4	F' <i>lac pro lacI<sup>q</sup> /ΔmalF3 ΔphoA phoR ΔlacX74 Δara-leu7697 araD139 galE galK</i>	Dana Boyd
DHB24	DHB4 <i>pcnB zad::Tn10</i>	Dana Boyd
RH90	MC411 <i>rpoS359::Tn10</i>	(Lange & Hengge-Aronis, 1991)
XL1-Blue	<i>endA1 hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
SY381	AB1157 <i>cysB</i> (Ts)	(Rakonjac <i>et al.</i> , 1991)
SY600	SY381 <i>Δ(argF-lac) U169</i>	(Lilic, 1998)
SY602	MC4100 <i>cysB</i>	(Lilic, 1998)
SY380	C600 <i>cysB</i>	(Rakonjac <i>et al.</i> , 1991)
EC1250	MC4100 <i>trp-3</i>	(Jagura-Burdzy & Hulanicka, 1981)
EC2275	EC1250 <i>cysB Trp<sup>+</sup></i>	(Lochowska <i>et al.</i> , 2001)
EC2549	EC1250 <i>ΔcysB Trp<sup>+</sup></i>	(Lochowska <i>et al.</i> , 2001)



Tabela 1. (Nastavak)

SY498	MC4100 $\lambda$ - $\phi$ ( <i>hslJC-lacZ</i> ) Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY499	SY602 $\lambda$ - $\phi$ ( <i>hslJC-lacZ</i> ) Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY500	EC2275 $\lambda$ - $\phi$ ( <i>hslJC-lacZ</i> ) Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY501	C600 $\lambda$ - $\phi$ ( <i>hslJC-lacZ</i> ) Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY502	SY380 $\lambda$ - $\phi$ ( <i>hslJC-lacZ</i> ) Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY503	MC4100 $\lambda$ -RS415 Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY504	SY602 $\lambda$ -RS415 Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY505	EC2275 $\lambda$ -RS415 Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY506	C600 $\lambda$ -RS415 Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY507	SY380 $\lambda$ -RS415 Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
SY508	MC4100 <i>pcnB</i> zad::Tn10	ovaj rad
SY509	SY602 <i>pcnB</i> zad::Tn10	ovaj rad
SY510	EC2275 <i>pcnB</i> zad::Tn10	ovaj rad
SY511	MC4100 <i>rpoS359</i> ::Tn10	ovaj rad
SY512	SY602 <i>rpoS359</i> ::Tn10	ovaj rad
SY513	EC2275 <i>rpoS359</i> ::Tn10	ovaj rad
SY514	EC2549 <i>rpoS359</i> ::Tn10	ovaj rad
Fazi	Relevantne karakteristike	Izvor / Referenca
$\lambda$ B305	' <i>lacZ</i> , ' <i>bla</i>	(Baron & Weisberg, 1992)
$\lambda$ B305/pRS415	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	ovaj rad
$\lambda$ B305/pVGM5	$\phi$ ( <i>hslJC-lacZ</i> ) Amp <sup>R</sup>	ovaj rad

Tabela 2. Plazmidi korišćeni u ovom radu.

Plazmid	Konstrukcija/relevantne karakteristike	Izvor / Referenca
pUC19	himerni vektor, 2.6 kb, Amp <sup>R</sup>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pQE70	himerni vektor za kloniranje pod <i>lac</i> promotor od ATG kodona, polilinker, 3.7 kb, Amp <sup>R</sup>	Qiagen Inc.
pREP4	<i>lacI<sup>q</sup></i> , Kan <sup>R</sup>	Qiagen Inc.

Tabela 2. (Nastavak)

pRS415	operonski fuzioni vektor, 10.8 kb, Amp <sup>R</sup>	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pMS421	himerni vektor, 5.5 kb, Spc <sup>R</sup>	(Grana <i>et al.</i> , 1988)
pTrc99A	himerni vektor, derivat pBR322, <i>trc</i> promotor, Amp <sup>R</sup>	Amersham Pharmacia Biotech
RFM13mp19	7.27 kb	laboratorijska kolekcija
pMH199	<i>cysB</i> gen kloniran u pTrc99A, Amp <sup>R</sup>	(Lochowska <i>et al.</i> , 2001)
pJOH1	3.17 kb WT <i>cysB</i> kloniran u pBR322 <i>EcoRI-Sall</i> mesto, Amp <sup>R</sup>	(Ostrowski <i>et al.</i> , 1987)
pHV3002	3.7 kb <i>BamHI-PstI</i> fragment iz $\lambda$ 265 kloniran u pMS421; ( <i>hslJ</i> <sup>+</sup> )	(Lilic, 1998)
pHV3004	pHV3002 sa kloniranom Kan kasetom ( $\Omega$ Kan) u <i>HincII</i> mesto; ( <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan)	(Lilic, 1998)
pVGM1	<i>SphI-BglII</i> PCR fragment WT <i>cysB</i> kloniran u pQE70	ovaj rad
pVGM2	<i>SphI-BglII</i> PCR fragment <i>cysB98</i> kloniran u pQE70	ovaj rad
pVGM3	0.665 kb <i>EcoRI-BamHI</i> PCR fragment (region A) umnožen olig. Rev. pr. i HSLJ-rev1 kloniran u pRS415	ovaj rad
pVGM4	0.150 kb <i>EcoRI-BamHI</i> PCR fragment (region B) umnožen olig. HSLJ-fw1 i HSLJ-rev1 kloniran u pRS415	ovaj rad
pVGM5	0.093 kb <i>EcoRI-BamHI</i> PCR fragment (region C) umnožen olig. HSLJ-fw2 i HSLJ-rev1 kloniran u pRS415	ovaj rad
pVGM6	6.95 kb <i>EcoRI-Sall</i> fragment iz pVGM3 kloniran u pMS421	ovaj rad
pVGM7	6.450 kb <i>EcoRI-Sall</i> fragment iz pVGM4 kloniran u pMS421	ovaj rad
pVGM8	6.384 kb <i>EcoRI-Sall</i> fragment iz pVGM5 kloniran u pMS421	ovaj rad
pVGM9	<i>SphI-BglII</i> PCR fragment <i>cysB::IS1</i> kloniran u pQE70	ovaj rad
pVGM10	<i>SphI-BglII</i> PCR fragment <i>cysB</i> <sup>-</sup> (iz soja SY380) kloniran u pQE70	ovaj rad
pVGM11	1 kb <i>BamHI-BglII</i> <i>cysB</i> (fragment iz pVGM9) kloniran u pUC19	ovaj rad
pVJ1	1.012 kb <i>KpnI-HincII</i> <i>hslJ</i> fragment iz pHV3002 kloniran u RFM13mp19	ovaj rad



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metoda transdukcije

#### Priprema $P1_{vir}$ lizata

Noćne kulture bakterijskih sojeva ( $3 \times 10^9$  bakterija/ml), donori u transdukciji, na kojima su narastani  $P1_{vir}$  fazi razblažene su 100 puta (9.25 ml LB medijuma, 0.25 ml 40% glukoze i 0.5 ml 0.1M  $CaCl_2$ ) i narastane na  $37^\circ C$  do gustine od  $3 \times 10^8$  bakterija/ml. Bakterije i fazi su mešani tako da je multiplicitet infekcije bio 0.01, 0.1 i 1, a zatim inkubirani 20 min. na  $37^\circ C$ . U ovoj fazi dolazi do adsorpcije faga i infekcije bakterija. Smeša bakterija i faga (0.5 ml) pomešana je sa 2.5 ml otopljenog mekanog agara (TA7) i razlivena na LA Petrijeve šolje. Posle inkubacije 12-16 sati na  $37^\circ C$ , sakupljen je mekani agar i promešan na vorteksu sa 0.5 ml hloroforma i 3-5 ml LB medijuma. Inkubacija sa hloroformom radena je 20 min. na sobnoj temperaturi, a zatim su mekani agar i bakterijski ostaci taloženi centrifugiranjem 10 min. na 7000 obrtaja/min. Supernatant je odvajan i čuvan na  $4^\circ C$  kao stok  $P1_{vir}$  faga.

Titar faga je određen pravljjenjem serije rastućih razblaženja fagne suspenzije u LB medijumu. Alikvoti ovih razblaženja nakapani su na LA Petrijeve šolje na koje je prethodno naneta smeša 2 ml mekanog agara i 0.1 ml preonoćne kulture bakterijskog soja koji je korišćen kao donor u transdukciji. Petrijeve šolje su inkubirane 12-16 sati na  $37^\circ C$ , a na osnovu broja plaka određen je njihov titar u 1 ml početne, nerazblažene kulture.

#### Transdukcija sa $P1_{vir}$ fazima

Transdukcije su radene metodom koju je opisao (Miller, 1972). Bakterije iz 5 ml noćne kulture (recipijent u transdukciji) taložene su centrifugiranjem 10 min. na 7000 obrtaja/minuti, a talog je resuspendovan u 10 ml MC soli (10 mM  $MgSO_4$ , 5 mM  $CaCl_2$ ) i inkubiran 15 min. na  $37^\circ C$ . Suspenzije bakterija (0.2 ml) i faga su pomešane tako da je multiplicitet infekcije bio 1. Inkubacija je radena 20 min. na  $37^\circ C$ , a dalje vezivanje faga za

bakterije i infekcija sprečeni su dodatkom iste zapremine 1 M Na-citrata. Smeša faga i bakterija je zatim pomešana sa 2 ml mekanog agara i razlivena na Petrijeve šolje sa selektivnom podlogom.

### 3.2.2. Test osetljivosti bakterija na antibiotik novobiocin

Osetljivost bakterijskih sojeva na antibiotik novobiocin određivana je grubim testom koji je korišćen u prethodnom radu (Rakonjac *et al.*, 1992). Prekonočne kulture bakterija su razmazivane na LA Petrijeve šolje sa novobiocinom u naznačenim koncentracijama i inkubirane 24 sata na 37°C ili u slučaju soja SY600 [*cysB*(Ts)] na 30°C i 42°C. Koncentracija novobiocina na kojoj raste ispitivani soj je određena kao maksimalna koncentracija u podlozi na kojoj on pokazuje potpun rast (u sloju - nema pojedinačnih kolonija).

### 3.2.3. Enzimske reakcije sa DNK

#### Sečenje DNK sa restrikcionim enzimima

Za sečenje DNK sa restrikcionim endonukleazama (Sambrook *et al.*, 1989) korišćen je "One-Phor-All Buffer PLUS" sastava: 10 mM Tris-acetat, 10 mM magnezijum-acetat, 50 mM kalijum acetat ili puferi specifični za neke restrikcione enzime (npr. *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*) (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Ligiranje DNK fragmenata

Za ligaciju krajeva DNK fragmenata korišćen je pufer sastava 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP i 5% PEG 8000. Koncentracija DNK u



reakcionoj smeši bila je oko 1  $\mu\text{g/ml}$  i dodavana je 1 jedinica T4 DNK ligaze. Fragmenti DNK su pomešani u molarnom odnosu 1:1 i inkubirani 16 sati na 16°C.

### 3.2.4. Transformacija

#### Priprema kompetentnih ćelija

Priprema kompetentnih ćelija radena je kalcijum-hloridnom metodom (Mandel & Higa, 1970). Noćne kulture bakterija ( $2-3 \times 10^9$  bakterija/ml), koje su gajene u LB medijumu, razblažene su 20 puta u istom medijumu. Bakterije su rasle do logaritamske faze ( $\text{OD}_{550}=0.3$ ), a zatim ponovo razblaživane 10 puta (ukupna zapremina 20 ml) i uzgajane do  $\text{OD}_{550}=0.5$ . Rast ćelija je zaustavljen inkubacijom 10 min. na ledu. Posle centrifugiranja, bakterijski talog je resuspendovan u hladnom 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  i inkubiran 20 min. na ledu. Bakterijski talog dobijen nakon ponovnog centrifugiranja je resuspendovan u 2 ml hladnog 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  sa 15% glicerolom, podeljen u 8 mikrotuba i čuvan na -70°C.

#### Transformacija plazmidnom DNK

Alikvoti kompetentnih ćelija su po potrebi odmrzavani na ledu i inkubirani sa DNK (50-100 ng plazmidne DNK ili 200-400 ng ligacione smeše / 0.25 ml kompetentnih ćelija) 45 min. na ledu. Bakterije su zatim inkubirane 1 min. na 42°C, a zatim 5 min. na ledu. U ovoj fazi dolazi do ulaska DNK u ćeliju. Posle dodavanja 0.75 ml LB medijuma, ćelije su rasle 1 sat na 37°C i razmazivane na LA Petrijeve šolje suplementirane sa određenim antibioticima ili X-Gal indikatorom. Petrijeve šolje su inkubirane 12 do 16 sati na 37°C, a dobijeni transformanti su prečišćavani na svežim podlogama sa istim antibioticima

### 3.2.5. Metode za izolovanje DNK

#### Mini-metoda za izolaciju plazmidne DNK

Za izolaciju plazmida iz *E.coli* korišćena je modifikovana metoda alkalne lize (Kraft *et al.*, 1988). Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 3 ml LB medijuma u koji je dodavan odgovarajući antibiotik. Talog dobijen centrifugiranjem noćne kulture resuspendovan je u 0.1 ml hladnog rastvora I koji sadrži, 50 mM glukozu, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl (pH 8) i inkubiran 5 min. na sobnoj temperaturi. Liza bakterija je vršena dodavanjem 0.2 ml hladnog rastvora II koji sadrži 0.2 N NaOH i 1% SDS i inkubacijom suspenzije 5 min. na ledu. Precipitacija SDS-proteinskog kompleksa je vršena dodavanjem 0.15 ml hladnog rastvora 3 M K-acetata (pH 4.8). Nakon mešanja na vorteksu 1 min., smeša je inkubirana 5 min. na ledu i centrifugirana 20 min. na 4°C. RNK je degradovana inkubacijom supernatanta 30 min. na 37°C sa RNazom (50 µg/ml). Iz supernatanta koji sadrži plazmidnu DNK ekstrahovani su proteini dodavanjem smeše fenol-hloroforma (1:1). Ostaci fenola su uklonjeni ponavljanjem istog postupka samo sa hloroformom. U supernatant iz poslednje ekstrakcije su dodavane dve zapremine 100% etanola i nakon centrifugiranja 20 min. plazmidna DNK je dobijana u talogu. Posle ispiranja 70% etanolom, talog je sušen i resuspendovan u 20 µl TE pufera (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA pH 8). Ukoliko je plazmidna DNK korišćena za sekvenciranje, rađeno je dopunsko prečišćavanje dodavanjem 3.2 µl 5 M NaCl i 20 µl 13% PEG-a. Posle inkubacije 40 min. na ledu, plazmidna DNK je taložena u centrifugi. Talog je opran u 70% etanolu, osušen i resuspendovan u 20 µl TE pufera.

#### Mini-metoda za izolaciju hromozomalne DNK

Hromozomalna DNK je izolovana po proceduri opisanoj od strane (Hopwood *et al.*, 1985). Bakterijski talog dobijen taloženjem 1.5 ml prekonocne kulture (2 min. 12000 obrtaja/minuti) je rastvoren u 500 µl rastvora za lizozim i inkubiran 30 min. na 37°C. Rastvor za lizozim je pripreman svež, a 1 ml pufera je dobijen mešanjem 300 µl 1 M saharoze, 25 µl



1 M Tris-HCl (pH 8), 50  $\mu$ l 0.5 M EDTA (pH 8), 630  $\mu$ l  $\text{bdH}_2\text{O}$ , 2 mg lizozima i 5  $\mu$ g RNaze. Nakon lize ćelija, dodato je 250  $\mu$ l 2% SDS-a i smeša je promešana na vorteksu 1 min. Ekstrakcija proteina je rađena dodavanjem 750  $\mu$ l fenol-hloroforma (zapreminski odnos 1:1), smeša je promešana na vorteksu 30 sekundi i centrifugirana 2 min. na 12000 obrtaja/min. Supernatant je prebačen u čiste mikrotube i postupak ponovljen 2-3 puta do gubitka proteinske interfaze. Precipitacija DNK je rađena dodavanjem 1/10 zapremina 3 M Na-acetata (pH 4.8) i iste zapremine izopropanola. Smeša je inkubirana 5 min. na sobnoj temperaturi, centrifugirana 2 min. na 12000 obrtaja/min., a supernatant je odliven. Talog je rastvoren u 500  $\mu$ l TE pufera i 25  $\mu$ l 100 mM rastvora spermidin-HCl. Nakon inkubacije 5 min. na sobnoj temperaturi i centrifugiranja 2 min. na 12000 obrtaja/min., supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 300  $\mu$ l rastvora koji sadrži 0.3 M Na-acetat i 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Hromozomalna DNK je precipitirana dodatkom 700  $\mu$ l apsolutnog etanola i inkubacijom na ledu 60 min. Nakon centrifugiranja 10 min. na 12000 obrtaja/min., supernatant je odliven a talog resuspendovan u 100  $\mu$ l TE pufera. Ovako izolovana hromozomalna DNK je čuvana na +4°C (radni stok ) ili na -20°C.

### 3.2.6. Sinteza DNK fragmenata PCR reakcijom

Reakciona smeša za PCR (lančana reakcija polimerizacije) reakciju uključuje sledeće komponente: Master mix (Qiagen, koji sadrži Taq-Gold DNK polimerazu, PCR pufer,  $\text{MgCl}_2$  i dNTP mix; ova solucija obezbeđuje finalnu koncentraciju od 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  i 200  $\mu$ M svakog dNTP-a), rastvor plazmidne DNK (40 ng) ili hromozomalne DNK (200 ng) koja se umnožava, dva oligonukleotida (100 pmola) od kojih počinje sinteza novih lanaca DNK (Tabela 3).

Za amplifikaciju WT *cysB* gena i mutiranih alela *cysB98*, *cysB::IS1* i *cysB<sup>-</sup>* korišćeni su oligonukleotidi CYSB-fw1 i CYSB-rev1 (Tabela 3, Prilog 1), a kao matrica poslužio je

plazmid pJOH1 (WT *cysB*) ili hromozomalna DNK iz sojeva EC2275 (*cysB98*), SY 602 (*cysB::IS1*) ili SY380 (*cysB*<sup>-</sup>). Nakon prvobitne denaturacije matrice na 94°C, 5 min. vezivanja oligonukleotida za matricu na 42°C, 1 min. i polimerizacije na 72°C 1 min., dalje umnožavanje fragmenata je vršeno u pet ciklusa na istim temperaturama (94/42/72)°C po 1 minut a zatim u dvadeset ciklusa (94/57/72)°C takođe po 1 minut, reakcija je završena polimerizacijom na 72°C, 10 min.

Za amplifikaciju regulatornog regiona *hslJ* gena upotrebljeni su oligonukleotidi Rev. pr. i HSLJ-rev1 za fragment od 665 bp (region A), HSLJ-fw1 i HSLJ-rev1 za fragment od 150 bp (region B) i HSLJ-fw2 i HSLJ-rev1 za fragment od 93 bp (region C) (Tabela 3, Prilog 2); kao matrica korišćen je plazmid pVJ1 koji nosi *hslJ* gen. Nakon prvobitne denaturacije templeta na 94°C 5 min., vezivanja oligonukleotida za matricu na 36°C, 1 min. i polimerizacije na 72°C 1 min. dalje umnožavanje fragmenata je vršeno u devet ciklusa na istim temperaturama (94/36/72)°C po 1 minut, a zatim u dvadeset ciklusa na (94/54/72)°C takođe 1 minut, reakcija je završena polimerizacijom na 72°C, 10 min. Ovim su generisani fragmenti veličine 665 bp, 150 bp i 93bp. Za amplifikaciju ostalih fragmenata koji sadrže regulatorni i/ili strukturni region *hslJ* gena upotrebljeni su prajmeri HSLJ-fw3 i HSLJ-rev2 za fragment od 301 bp i HSLJ-fw4 i HSLJ-rev2 za fragment od 135 bp (Tabela 3, Prilog 2). Posle jednog ciklusa denaturacije matrice, plazmida pHV3002, na 94°C 5 min., vezivanja oligonukleotida za matricu na 41°C, 1 min. i polimerizacije lanca DNK na 72°C 1 min. sledilo je 25 ciklusa umnožavanja DNK lanaca na istim temperaturama (94/41/72)°C po 1 min i reakcija je završena polimerizacijom na 72°C, 10 min. Dobijeni PCR produkti provereni su na agaroznom gelu i prečišćeni elektroelucijom.



Tabela 3. Oligonukleotidi upotrebljeni u PCR reakcijama i reakcijama sekvenciranja.

Oznaka oligonukleotida	Sekvenca	Pozicija
CYSB-fw1 <sup>a</sup>	5'-TTTAGCATGCAATTACAACAAC-3'	<i>cysB</i>
CYSB-rev1 <sup>a</sup>	5'-GAAGATCTTTTTTCCGGCAGTTT-3'	<i>cysB</i>
HSLJ-fw1 <sup>b</sup>	5'-GGAATTCTGGAAAAAGGCG-3'	regul. region <i>hslJ</i>
HSLJ-fw2 <sup>b</sup>	5'-GGAATTCCAGGGGAGCTGATTC-3'	-/-
HSLJ-fw3 <sup>c</sup>	5'-GCAAACTTAAGCAATCTGGAAAAAGGCG-3'	-/-
HSLJ-fw4 <sup>c</sup>	5'-TGAAGAAAGTAGCCGCG-3'	-/-
HSLJ-rev1 <sup>b</sup>	5'-GCCGATCCTTGTGGTTCTCAAT-3'	-/-
HSLJ-rev2 <sup>c</sup>	5'-GTCACGGGCTTACCG-3'	struktur.reg. <i>hslJ</i>
HSLJ-rev3 <sup>c</sup>	5'-GCCATCAGCAGGCTTAGC-3'	-/-
TypeIII/IV <sup>d</sup>	5'-GAATTCATTAAGAGGAGAAA-3'	T5 pr. reg. pQE70
Rev. pr. <sup>e</sup>	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	M13/pUC
"-40" <sup>e</sup>	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	M13/pUC

<sup>a</sup>IMGGI; <sup>b</sup>Operon Tech.; <sup>c</sup>Genosys; <sup>d</sup>Qiagen; <sup>e</sup>USB.

### 3.2.7. Elektroforeza i izolovanje fragmenata DNK

#### Elektroforeza i elektroelucija sa agaroznih gelova

Elektroforeza DNK je rađena na horizontalnim gelovima od agaroze, koncentracije 0.6%-1.5% u zavisnosti od veličine DNK fragmenata koji su analizirani na gelu. Za pripremanje gelova i elektroforezu korišćen je pufer 1xTBE (0.089 M Tris-borat, 0.089 M borna kiselina i 0.002 M EDTA) u koji je dodavan etidijum-bromid u koncentraciji od 0.5 mg/ml. Elektroforeza je rađena na volтажama 5 V/cm (analitička elektroforeza) i 10 V/cm (preparativna elektroforeza). Posle završetka elektroforeze, gelovi su osvetljeni na standardnom iluminatoru (UV svetlost dužine 302 nm) i fotografisani ili snimani CCD kamerom (Biorad ili Biometra).

Za izolaciju fragmenata DNK, dobijenih sečenjem restrikcionim enzimima ili u PCR reakciji, iz agaroznog gela su isecani delovi u kojima se nalazi određeni DNK fragment. Isečeni komadi gela stavljeni su u creva za dijalizu ispunjena 1xTBE puferom. Pod uticajem električnog polja, DNK je izlazila iz gela u pufer koji je sakupljen. Etidijum-bromid je

ekstrahovan sa izoamil alkoholom (zapreminski odnos 1:1), a DNK je precipitirana sa 3 M K-acetatom (zapreminski odnos 9:1) i hladnim 100% etanolom (1:2). Talog je opran sa 1 ml hladnog 70% etanola, osušen i resuspendovan u sterilnoj vodi.

### 3.2.8. Kloniranje regulatornog regiona *hslJ* gena u vektor za operonske fuzije pRS415: konstrukcija plazmida pVGM3, pVGM4 i pVGM5

Vektor pRS415 (oko 30 kopija) (Simons et al., 1987) koristi se za konstrukciju operonskih *lacZ* fuzija. pRS415 sadrži odgovarajuća mesta za kloniranje koja se nalaze između uzvodno smeštenog transkripcionog terminatora i nizvodno smeštenog *lacZ* gena koji ima sopstveni RBS ("ribosomal binding site"), ali je deletiran za transkripcione inicijacione signale (promotor). Korišćenjem prajmera Rev 1 i HSLJ-rev 1 (Tabela 3, Prilog 2) umnožen je DNK fragment koji sadrži 665 nukleotida uzvodno od *hslJ* ATG start kodona (region A), kao matrica za amplifikaciju poslužio je plazmid pVJ1. Drugi, kraći DNK fragment koji sadrži 150 nukleotida uzvodno od ATG kodona (region B) amplifikovan je korišćenjem prajmera HSLJ-fw1 i HSLJ-rev1 (Tabela 3, Prilog 2) a treći DNK fragment dužine 93 nukleotida (region C) umnožen je korišćenjem prajmera HSLJ-fw2 i HSLJ-rev1 (Tabela 3, Prilog 2). Kao matrica za amplifikaciju poslednja dva DNK fragmenta, B i C, poslužio je plazmid pHV3002. Ovi fragmenti, region B i region C poslužili su i kao probe za vezivanje proteina u određivanju mobilnosti protein-DNK kompleksa na gelu. Sva tri fragmenta na 5' kraju sadrže restrikciono mesto za enzim *EcoRI*, a na 3' kraju *BamHI* restrikciono mesto. Prečišćeni PCR fragmenti A, B i C isečeni *EcoRI* i *BamHI* enzimima klonirani su u *EcoRI-BamHI* mesta vektora pRS415 i na taj način su dobijeni odgovarajući plazmidi pVGM3 (*hslJ<sub>A</sub>-lacZ*), pVGM4 (*hslJ<sub>B</sub>-lacZ*) i pVGM5 (*hslJ<sub>C</sub>-lacZ*) (Tabela 2, Slika 11). Ove fuzije proverene su restrikcionom analizom.



Sve tri operonske fuzije subklonirane su sa vektora pRS415 (30 kopija) u vektor pMS421 (6-8 kopija). Sečenjem restrikcionim enzimima *EcoRI-Sall* plazmida pVGM3, pVGM4 i pVGM5 dobijeni su fragmenti koji nose transkripcione fuzije (*hslJA-lacZ*, *hslJB-lacZ* ili *hslJC-lacZ*) i klonirani su u *EcoRI-Sall* mesta vektora pMS421. Na ovaj način konstruisani su plazmidi pVGM6 (*hslJA-lacZ*), pVGM7 (*hslJB-lacZ*) i pVGM8 (*hslJC-lacZ*) (Tabela 2).

### 3.2.9. Konstrukcija operonskih fuzija na hromozomu

Za konstrukciju hromozomalnih operonskih *lacZ* fuzija upotrebljen je  $\lambda$ B305 fag koji je derivat  $\lambda$  faga i nosi *imm* region faga 21 kao i segmente '*lacZ*' i '*bla*' gena u svom *b* 2 regionu (Baron & Weisberg, 1992). Prisustvo '*lacZ*' i '*bla*' gena ( $Amp^R$ ) omogućava transfer već konstruisane *lacZ* fuzije na plazmidu (koji takode sadži *bla* gen) homologom rekombinacijom na  $\lambda$ B305 fag. Transfer fuzije na fag potvrđen je rekonstitucijom funkcionalne *lacZ* fuzije i *bla* gena. Odgovarajući lizogeni sojevi dobijeni su klasičnim metodom izolacije lizogena (Silhavy *et al.*, 1984). Postupak dobijanja operonskih fuzija *hslJA-lacZ*, *hslJB-lacZ* i *hslJC-lacZ* na hromozomu je sledeći: sojevi koji nose plazmide pVGM3, pVGM4 i pVGM5 su gajeni u TBMM medijumu do postizanja pune gustine populacije)  $5 \times 10^9$  bakterija/ml., zatim je 0.1 ml pune bakterijske kulture koinficiran sa 0.1 ml stoka faga  $\lambda$ B305 (titar stoka  $\lambda$ B305 faga je bio  $10^8$ - $10^9$ ), smeši je dodato 10 ml LB medijuma, 10 mM  $MgSO_4$  (finalna konc.) i ampicilin (50  $\mu$ g/ml) i sve je inkubirano 4-5 sati na 37°C uz aeraciju. Dobijenom bakterijskom lizatu dodat je 1 ml hloroforma i inkubacija je nastavljena još 10 min. na 37°C, zatim je lizat centrifugiran da bi uklonili ostatke bakterija. Različita razblaženja  $\lambda$  faga koji nose fuzije *hslJA-lacZ*, *hslJB-lacZ* ili *hslJC-lacZ* nakapavana su na Petrijeve šolje na kojima je mekani agar pomešan sa sojem recipijentom (MC4100, SY602, EC2275, C600 i SY380), X-Gal i ampicilinom (20  $\mu$ g/ml). Nakon

prekonoćne inkubacije na 37°C sa Petrijeve šolje na kojoj su se pojavile pojedinačne, plave plake (najveće razblaženje), iz zamučene sredine plave plake (mutna sredina je posledica pojave lizogena) vrhom čačkalice su uzeti lizogeni i striklovani na LA Petrijeve šolje suplementirane X-Gal i ampicilinom (20 µg/ml). Za dalji rad izabrane su Amp<sup>r</sup>, okrugle, zdrave kolonije - lizogeni, rezistentne na infekciju λB305 fagom.

### 3.2.10. Merenje aktivnosti β-galaktozidaze

Detekcija aktivnih transkripcionih i translacionih fuzija vršena je na LA Petrijevim šoljama suplementiranim sa indikatorom X-Gal, pri čijem se razlaganju formira plava boja kolonija. Za preciznije merenje aktivnosti β-galaktozidaze raden je enzimski esej (Miller, 1992), a svi eksperimenti su urađeni u bogatom LB medijumu. Enzimski esej je urađen na sledeći način: 0.5 ml kulture OD<sub>600</sub>=0.3-0.7 pomešano je sa istim volumenom Z pufera (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> i 50 mM β-merkaptetoanol), 60 µl 0.1% SDS-a i 90 µl hloroforma. Smeša je snažno promešana na vorteksu i inkubirana 15 min. na 28°C. Reakcija je otpočeta dodatkom 200 µl rastvora ONPG-a (o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid rastvoren u Z puferu koncentracije 4 mg/ml), a nakon pojave žute boje zaustavljena je dodatkom 0.5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Izmerena je apsorpcija na 420 nm i 550 nm, a specifična aktivnost β-galaktozidaze je izračunata prema formuli,  $1000 \times (A_{420} - (1.75 \times A_{550})) / t \times v \times A_{660}$  pri čemu je v zapremina kulture u ml, a t je vreme trajanja reakcije u min. Konačne vrednosti su dobijene kao srednja vrednost iz najmanje tri nezavisna merenja.



### 3.2.11. Kloniranje *cysB* alela iz soja SY602 u vektor pUC19

Hromozomalna DNK izolovana iz soja MC4100*cysB* poslužila je kao matrica u PCR reakciji u kojoj je umnožen *cysB* mutirani gen. Prajmeri korišćeni u ovoj reakciji su CYSB-fw1 (pomoću koga je na 5' kraj uvedeno mesto za *SphI* restrikcioni enzim) i CYSB-rev1 (pomoću koga je na 3' kraj uvedeno *BglII* restrikciono mesto. Prečišćen PCR fragment je isečen *BamHI* i *BglII* enzimima i kloniran u pUC19 vektor prethodno isečen *BamHI* i *BglII* restrikcionim enzimima dajući plazmid pVGM9.

### 3.2.12. Sekvenciranje DNK

Redosled nukleotida u DNK određen je metodom koju su opisali Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977). Sekvencirana je dvolančana plazmidna DNK i jednolančana DNK. Reakcija polimerizacije DNK lanaca, u koji se ugrađuje radioaktivno obeleženi sumpor  $\alpha^{35}\text{S}$  (dATP), počinje od oligonukleotida hibridizovanog sa DNK lancem koji služi kao matrica za sintezu rastućeg, komplementarnog lanca. U grupi reakcija koje su korišćene za sekvenciranje (Sequenase version 2.0 T7 DNA polymerase kit, USB), polimerizacija je katalizovana enzimom Sekvenazom 2.0 T7 DNK polimerazom. Polimerizacija se može završiti na bilo kom nukleotidu u rastućem DNK lancu i odigrava se na mestima ugradnje dideoksinukleozidtrifosfata (ddNTP). U svim reakcijama kao prajmeri su korišćeni komercijalni oligonukleotidi "-40" (za sekvenciranje *cysB::IS1* alela kloniranog u pUC19 vektor) i Type III/IV (za sekvenciranje *cysB98* alela kloniranog u pQE70 ekspresioni vektor) kao i HSLJ-Rev3 oligonukleotid (za sekvenciranje strukturnog regiona *hslJ* gena u reakciji određivanja starta transkripcije *hslJ* gena) (Tabela 3).

### Denaturacija dvolančane DNK

Pre reakcija sekvenciranja plazmidna DNK je denaturisana alkalijama (Sequenase version 2.0 Kit, prema uputstvu proizvođača). Oko 3  $\mu\text{g}$  plazmidne DNK izolovane za potrebe sekvenciranja rastvoreno je u 20  $\mu\text{l}$  vode. Nakon dodatka 2  $\mu\text{l}$  rastvora 2 M NaOH i 2 mM EDTA i inkubacije 30 min. na 37°C, pH rastvora je zatim podešen dodatkom 3  $\mu\text{l}$  3 M Na-acetata (pH 4.5). DNK je precipitirana 15 min. na -70°C sa 75  $\mu\text{l}$  hladnog apsolutnog etanola i centrifugirana 20 min. na 12000 obrtaja/minuti. Talog je ispran sa 70% etanolom, osušen i resuspendovan u vodi.

### Vezivanje oligonukleotida za matricu

Denaturisanoj dvolančanoj DNK (2-5  $\mu\text{g}$ ) dodat je oligonukleotid (2.5 pmol) i hibridizacioni pufer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM  $\text{MgCl}_2$  i 250 mM  $\text{NaCl}_2$ ). Jednolančanoj DNK (1  $\mu\text{g}$ ) dodat je oligonukleotid (1 pmol) i hibridizacioni pufer istog sastava. Smeša je inkubirana 2 min. na 65°C i postepeno ohladena do 42°C, pri čemu se oligonukleotid vezao za jednolančanu matricu.

### Reakcija obeležavanja DNK

Posle vezivanja oligonukleotida za DNK lanac, koji je služio kao matrica za sintezu novog lanca, rastvor je podeljen u 4 mikrotube i u svaku su dodati: smeša koja sadrži dGTP, dTTP, dCTP; ( $\alpha^{35}\text{S}$ )dATP (10 mCi) i Sequenase 2.0 T7 DNK polimeraza (1.6 U/ $\mu\text{l}$ ). Reakcija je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi.

### Zaustavljanje reakcije

Reakcija polimerizacije zaustavljena je dodatkom po jednog dideoksinukleozidtrifosfata (ddGTP, ddATP, ddTTP i ddCTP) u smeši sa sva 4 dNTP-a u sve četiri epruvete. Reakcije su inkubirane 5 minuta na 37°C, a zatim potpuno zaustavljene dodavanjem rastvora koji sadrži: formamid, EDTA, ksilencijanolo i bromfenolplavo.



Reakciona smeša je čuvana na  $-20^{\circ}\text{C}$ , a pre nanošenja na akrilamidni gel uradena je denaturacija 2 min. na  $80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.13. Elektroforeza DNK na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima

Obeleženi lanci DNK su razdvojeni na 5 ili 8% akrilamidnim gelovima (12 ml ili 20 ml 40% rastvora akrilamida, 42 gr uree, 10 ml 10xTBE, voda do 100 ml; u rastvorenu smešu je dodato 0.8 ml 10% amonijum-persulfata i 40  $\mu\text{l}$  TEMED-a). Za elektroforezu je korišćen puffer 1xTBE. Elektroforeza je trajala 2-6 sati, pri konstantnoj snazi od 60 W. Po završenoj elektroforezi gel je osušen 1 sat na  $80^{\circ}\text{C}$ , a zatim eksponiran 12 sati sa filmom koji je osetljiv na X-zrake.

### 3.2.14. Izolovanje RNK

Ukupna bakterijska RNK izolovana je mini-metodom (Aiba *et al.*, 1981) i (Gerendasy & Ito, 1990). U mešanoj populaciji RNK molekula (iRNK, tRNK, rRNK), ukupna ćelijska iRNK je zastupljena sa oko 5%. Izolacija je radena iz bakterijske kulture koja je gajena u minimalnom medijumu. Čelije iz 10 ml kulture prikupljane su centrifugiranjem 10 min. na 7000 obrtaja/min. u Sorvall SS34 rotoru. Talog je resuspendovan u 10 ml protoplast pufera (15 mM Tris-HCl pH 8; 0.45 M saharoza i 8 mM EDTA), a zatim je dodavano 80  $\mu\text{l}$  lizozima koncentracije 50 mg/ml. Dobijeni protoplasti prikupljeni su centrifugiranjem 10 minuta na 7000 obrtaja/minuti, a talog je zatim resuspendovan u 0.5 ml pufera za lizu (20 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NaCl; 1 mM Na-citrat; 1.5% SDS). Posle dodavanja 15  $\mu\text{l}$  DEPC-a (di-etil-pirokarbonat), suspenzija je prebacivana u Eppendorf epruvete i inkubirana 5 min. na  $37^{\circ}\text{C}$ , a zatim hladena na ledu. Posle dodavanja 250  $\mu\text{l}$  zasićenog NaCl i inkubacije 10

min. na ledu, radeno je centrifugiranje 1 sat na 12000 obrtaja/min. Odvajan je supernatant koji sadrži totalnu RNK, a proteini su ekstrahovani dodavanjem iste zapremine fenol-hloroforma (1:1). Totalna RNK je zatim precipitirana iz supernatanta dodavanjem 1 ml hladnog apsolutnog etanola i inkubiranjem na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Talog RNK, koji je dobijan centrifugiranjem 20 min. na 12000 obrtaja/min., ispiran je 70% hladnim etanolom i sušen a onda resuspendovan u 100  $\mu\text{l}$  RNasa oslobodene destilovane vode. Čistoća i koncentracija izolovane totalne RNK određene su spektrofotometrijski ( $A_{260}/A_{280}$ ) i elektroforetski na agaroznom gelu. Vodeni rastvor RNK čuvan je na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ukoliko je za dalje manipulacije (određivanje starta transkripcije) bio potreban koncentrovani rastvor, taloženje RNK je radeno dodavanjem 3 zapremine 4M Na-acetata (pH 6), inkubacijom na  $-20^{\circ}\text{C}$  i prikupljanjem RNK centrifugiranjem 20 minuta na 12000 obrtaja/min. Talog je ispiran hladnim 70% etanolom, sušen i resuspendovan u destilovanoj vodi.

### 3.2.15. Određivanje starta transkripcije gena

Start transkripcije *hslJ* gena je određen metodom koju je opisao (Sambrook et al., 1989). Za reakciju je iskorišten oligonukleotid HSLJ-rev3 komplementaran regionu od +43 do +26 nukleotida u odnosu na start kodon ATG *hslJ* gena (Prilog 2). Obeležavanje 5'-terminalnih krajeva oligonukleotida HSLJ-rev3 urađeno je enzimom polinukleotid kinazom (Materijal i Metode 3.2.34.). Obeleženi nukleotid je hibridizovan sa 100  $\mu\text{g}$  totalne RNK izolovane iz soja SY602, 5 min. na  $70^{\circ}\text{C}$ . Hibridizaciona smeša je hlađena 10-15 min. do  $55^{\circ}\text{C}$ , oborena u centrifugi i ohlađena do sobne temperature i ponovo promešana pipetiranjem kako ne bi došlo do precipitacije zbog visoke koncentracije RNK. Smeši oligonukleotida i RNK dodato je 5  $\mu\text{l}$  5x AMV RT (reverzna transkriptaza, USB) reakcionog pufera, 2.5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP smeše, 0.5  $\mu\text{l}$  ribonukleaznog inhibitora RNasin-a (40 U/ $\mu\text{l}$ ) i 1  $\mu\text{l}$  AMV RT (10 U/ $\mu\text{l}$ ) i vode do finalnog volumena od 25  $\mu\text{l}$ , sve je ponovo promešano pipetiranjem i



komplementarna DNK (cDNK) je sintetisana na 42°C 60 minuta. Nakon inkubacije dodato je 15 µl stop solucije i pred nanošenje uzorci su denaturisani na 95°C 2-3 minuta. Produkt ove reakcije i smeša bez RNK pušteni su na 5% polakrilamidni gel za sekvenciranje zajedno sa nukleotidnom sekvencom sintetisanom pomoću istog neobebeženog prajmera HSLJ-Rev3 sa matrice pVJ1.

### 3.2.16. Kloniranje WT *cysB* gena i alela *cysB98* u ekspresioni plazmid pQE70: konstrukcija plazmida pVGM1 i pVGM2

Ekspresioni plazmid pQE70 koristi se za indukciju, overprodukciju i purifikaciju proteina metodom afinitetne hromatografije. On ima jak promotor faga T5 koji sadrži dva *lac* operatora, što omogućava dobru kontrolu ekspresije kloniranog gena *LacI* represorom. U prisustvu inducera (IPTG) dolazi do skidanja represora sa operatorskih mesta i transkripcije gena, dok je u odsustvu inducera transkripcija gena blokirana represorom (koji je kodiran *lacI<sup>q</sup>* genom sa plazmida pREP4). Korišćenjem prajmera CYSB-fw1 i CYSB-rev1 u PCR reakciji su umnoženi DNK fragmenti koji nose kompletan strukturni region WT *cysB* gena ili mutiranog *cysB98* alela. Kao matrica za amplifikaciju WT *cysB* gena poslužio je plazmid pJOH1 a za umnožavanje *cysB98* alela kao matrica u PCR reakciji poslužila je hromozomalna DNK izolovana iz soja EC2275. Takođe na isti način su umnoženi mutirani *cysB* aleli iz sojeva SY602 ili SY380. Svi fragmenti na 5' kraju sadrže restrikciono mesto za enzim *SphI* (GCATGC) nastalo uvođenjem jedne nukleotidne zamene u drugom kodonu (A u C) u odnosu na originalnu sekvencu *cysB* (ova mutacija uvedena je pomoću prajmera CYSB-fw1). Na 3' kraju oba PCR fragmenta nalazi se *BglII* restrikciono mesto koje je uvedeno pomoću prajmera CYSB-rev1. Niti jedan od ovako umnoženih gena ne sadrži stop kodon. Prečišćeni PCR fragmenti isečeni *SphI* i *BglII* enzimima klonirani su u *SphI*-*BglII* mesta plazmida pQE70, a zatim je ovim konstruktima transformisan *cysB<sup>-</sup>* soj SY380/pREP4.

Kloniranjem u ova dva restrikciona mesta WT *cysB* gen i *cysB*<sup>-</sup> aleli su postavljeni u fazi čitanja nizvodno od hetrolognog T5 promotora i uzvodno od polipeptidnog nosača od 6 histidina (genska fuzija sa His nosačem) iza koga sledi stop kodon i terminator transkripcije (Slika 13).

### 3.2.17. Izolacija ćelijskih ekstrakata

Noćna kultura bakterija je taložena centrifugiranjem na 12000 obrtaja/min. Dobijeni talog je resuspendovan u rastvoru 0.8 ml Tris-HCl (pH 8) sa 1 mg/ml lizozima. Rastvor je inkubiran na ledu 30 min., a fragmentisanje ćelijskih membrana je vršeno naizmeničnim zamrzavanjem na suvom ledu (-70°C) i odmrzavanjem na +4°C. Ovaj postupak je ponavljan dva puta, a nakon poslednjeg odmrzavanja na ledu rastvoru je dodat 20% glicerol i centrifugiran je na 7000 obrtaja/min. na +4°C. Supernatant koji sadrži ćelijski ekstrakt sa proteinima je podeljen u nekoliko mikrotuba i čuvan na -70°C. Kvalitet i koločina izolovanih proteina je proverena na 8% denaturišućem poliakrilamidnom gelu.

### 3.2.18. Elektroforeza proteina na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima

Svi izolovani proteini su provereni elektroforezom na SDS-poliakrilamidnim gelovima (PAGE) metodom koju je opisao (Laemmli, 1970). Korišćen je diskontinuiran sistem pufera, koji se sastoji od gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje proteina. Korišćen je 5% gel za koncentrovanje uzoraka (20 ml gela je pripremljeno mešanjem 3.3 ml 30% stoka poliakrilamid-bisakrilamid, 2,5 ml 1M Tris-HCl pH 6.8, 0.1 ml 20% SDS-a i 14.1 ml sterilne vode, smeši je dodato pred nalivanje gela 0.14 ml 10% amonijum persulfata i 0.01 ml TEMED-a). Gel za razdvajanje uzoraka je bio 10% (30 ml gela je pripremljeno



mešanjem, 10 ml 30% stoka poliakrilamid-bisakrilamid, 11.25 ml 1M Tris-HCl pH 8.8, 0.15 ml 20% SDS-a i 8.3 ml vode, pred nalivanje gela u smešu je dodato 0.3 ml 10% amonijum persulfata i 0.03 ml TEMED-a). Pufer za elektroforezu je pripremljen rastvaranjem 3.02 gr Tris-a, 18.8 gr glicina i 5 ml 20% stoka SDS-a u vodi/1000 ml. Proteinski uzorci su pre nanošenja na gel pomešani sa istim volumenom 2x koncentrovanog pufera za nanošenje uzorka i denaturisani 5 min. na 90°C. Elektroforeza je puštana pri konstantnoj struji 10 mA, a prekidana je pre izlaska boje bromfenol plavo iz gela.

Gelovi su obojeni sa bojom "Coomassie blue" (za 500 ml rastvora: 10 ml metanola, 3 ml sirćetne kiseline, 487 ml vode i 0.75 gr "Coomassie blue") 30 min. na 65°C. Odbojavanje je urađeno sa 100 ml odbojivača (za 500 ml, 35 ml metanola, 10 ml sirćetne kiseline, 455 ml vode) 1 sat na 65°C. Ovaj postupak je ponavljan 3 do 4 puta do pojave jasnih proteinskih traka.

### 3.2.19. Amplifikacija i purifikacija CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> proteina afinitetnom hromatografijom

Prekonoćna kultura sojeva SY380/pREP4/pVGM1 i SY380/pREP4/pVGM2) ( $2-3 \times 10^9$  bakterija/ml) je razblažena 100 puta i inkubirana na 37°C u LB medijumu suplementiranom odgovarajućim antibioticima do  $OD_{600}=0.3$ , zatim je ekspresija WT *cysB* i *cysB98* gena indukovana dodavanjem 1mM IPTG-a i inkubirana tri sata na 37°C. Pre sledećeg koraka indukcija fuzionih proteina proverena je na denaturišućoj proteinskoj elektroforezi. Čelije su centrifugirane i rastvorene u sonikacionom puferu (50 mM Na-fosfat, pH 8.0, 300 mM NaCl), razbijene lizozimom (1 mg/ml) kao i naizmeničnim smrzavanjem i topljenjem i sonikacijom u dva pulsa (60 Hz, 30 i 20 sec). Lizat je zatim tretiran sa DNazom I (5 $\mu$ g/ml) 15 minuta na ledu, propušten kroz tanku iglu i centrifugiran 20 minuta na 13000 obrtaja/minuti. Supernatant je nanet na Ni-NTA rezin kolonu (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA), opran

sa 50 mM Na-fosfatom, 300 mM NaCl, 10% glicerolom pH6.0 i eluiran sa imidazolom rastvorenim u puferu za pranje. Za eluciju su korišćene različite koncentracije imidazola u opsegu od 0.1-0.5 M. Frakcije CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> proteina su sakupljene i analizirane na 12.5% SDS/PAGE (Laemmli, 1970). Utvrđeno je da oba proteina imaju čistoću oko 95%. Uzorci su čuvani na -75°C u originalnom puferu ili dijalizirani u 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA i 20% glicerolu. Radni stokovi su čuvani na -20°C.

### 3.2.20. Dijaliza proteina

Za određene eksperimente bilo je potrebno promeniti pufer I (50 mM Na-fosfat, 300 mM NaCl, 10% glicerol i 0.3 M imidazol) u kome su se proteini nalazili, tako da je određena zapremina izolovanog proteina stavljena u creva za dijalizu, potopljena u tristotine puta veću zapreminu pufera II (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA i 20% glicerol ), i inkubirana 45 min. na 4°C uz stalno mešanje. Ovaj postupak ponovljen je još dva puta s tim što je poslednji put dijaliza vršena preko noći.

### 3.2.21. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija prečišćenih proteina određena po proceduri opisanoj od strane Bradford-a (Bradford, 1976). Izolovani protein je razblažen u vodi kao i protein bovin serum albumina (BSA, frakcija V) koji je korišćen za pravljenje standardne krive (1 do 10 µl stoka 3 mg/ml). U ova razblaženja je dodato po 800 µl Bradford reagensa (BioRad Protein Assay Kit) i uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 30 min. Izmerena je absorbcija na 595 nm, a na osnovu vrednosti koje su dobijene za BSA napravljena je standardna kriva. Iz standardne krive je određena koncentracija prečišćenog proteina.



### 3.2.22. Određivanje molekulske težine proteina na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima

Određivanje molekulske težine proteina uradeno je po metodi koju je opisao (Bryan, 1977). Purifikovani CysB<sub>6His</sub>, CysB(133N)<sub>6His</sub> proteini i proteinski markeri- proteini odgovarajućih poznatih molekulskih težina rastvoreni su u puferu koji sadrži 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl (20 mg) (Nondenaturated protein molecular weight marker kit, Sigma). Proteini i proteinski markeri nanešeni su na nedenaturišuće poliakrilamidne gelove različitih koncentracija (6%, 7%, 8.5% i 10%). Kao proteinski standardi upotrebljeni su  $\alpha$ -laktalbumin (14200 Da), karbon anhidraza (2900 Da), pileći albumin (45000 Da), bovin serum albumin (66000 Da-monomer, 132000 Da-dimer), ureaza (272000 Da-trimer, 545000 Da-heksamer). Korišćen je diskontinuiran sistem pufera koji se sastojao od gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje. Za koncentrovanje uzoraka korišćen je 4.5% gel, 2 ml gela je pripremljeno mešanjem 0.31 ml 1 M Tris-HCl pH 8.8, 0.28 ml akrilamida i 1.9 ml vode. Smeši je pred nalivanje gela dodato 3  $\mu$ l TEMED-a i 10  $\mu$ l 10% amonijum persulfata. Gel za razdvajanje uzoraka (različitih koncentracija -6%, 7%, 8.5% i 10%), pripremljen je mešanjem (za zapreminu od 6 ml) 1.5 ml 1M Tris-HCl pH 8.8, 0.9 (6%)/ 1.050 (7%)/ 1.275 (8.5%)/ 1.5 (10%) ml akrilamida i odgovarajuće količine vode do ukupne zapremine 6 ml. Pred nalivanje gela smeši je dodato 3  $\mu$ l TEMED-a i 30  $\mu$ l 10% amonijum persulfata. Po završenoj elektroforezi gelovi su bojeni sa bojom Coomassie blue. Nepoznata molekulska težina ispitivanog proteina određuje se indirektno, elektroforezom proteina poznate molekulske težine (standarda) i proteina koji se ispituje na setu gelova različitih poliakrilamidnih koncentracija. Relativna pokretljivost proteina ( $R_f$ ), koja je potrebna za dalji rad, određena je pomoću jednačine:  $R_f = \text{distanca proteinske migracije (predeni put od vrha gela za razdvajanje do trake proteina)} / \text{distanca migracije boje (predeni put boje od vrha gela za razdvajanje do trake boje)}$ . Vrednosti dobijene jednačinom  $100(\text{Log}(R_f \times 100))$  za svaki protein nanešene su na ordinatu standardnog grafika dok su na apscisi

obeležene koncentracije gela. Kriva dobijena na ovaj način ima svoj nagib koji se zove koeficijent retardacije ( $K_R$ ). Koeficijent retardacije određen je za svaki protein. Vrednost logaritma negativne vrednosti  $K_R$  ("-slope") nanosi se na ordinatu grafika na čijoj apscisi se nalaze logaritamske vrednosti poznatih molekularskih težina proteinskih standarda. Na ovaj način konstruisana je linearna kriva pomoću koje ekstrapolacijom može da se odredi molekularska težina proteina koji je analiziran ukoliko je određen  $K_R$  na prethodno opisan način.

### 3.2.23. Radioaktivno obeležavanje 5' krajeva DNK probe

U reakcionoj smeši za radioaktivno obeležavanje DNK pomešani su: DNK (40 ng u 2  $\mu$ l rastvora); 1  $\mu$ l 10x kinazni pufer (0.5 M Tris-HCl pH 7.6; 0.1 M  $MgCl_2$ ; 50 mM DTT); 1 mM spermidin; 1 mM EDTA; 3  $\mu$ l ( $\gamma$ - $^{32}P$ )ATP (10 mCi/ml) i 1  $\mu$ l enzima polinukleotid kinaze (10 jedinica/ $\mu$ l, New England Biolabs). Nakon inkubacije 30 minuta na 37°C smeša je zamrznuta 30 min. da bi se zaustavila reakcija. Smeša je zatim odmrznuta i razblažena 5-10 puta. Ovako pripremljen rastvor propušten je kroz kolone za prečišćavanje od neinkorporiranog radioaktivnog nukleotida (TE Midi Select, G-25). Količina inkorporiranog radioaktiviteta izmerena je na scintilacionom brojaču.

### 3.2.24. Vezivanje proteina iz ćelijskog ekstrakta za DNK probu

Vezivanje proteina za DNK je rađeno prema proceduri koja je opisana (Prentki *et al.*, 1987). U 2  $\mu$ l ćelijskog ekstrakta dodata je nespecifična kompetitorska DNK, poly (dI-dC) (Pharmacia), koja se dodaje u višku (500 puta više u odnosu na količinu probe) i 25  $\mu$ l pufera za vezivanje (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 1 mM EDTA,



12.5% glicerol, 0.1% Triton X-100). Ovako pripremljen rastvor inkubiran je 30 min. na sobnoj temperaturi. Nakon ovoga, dodavana je radioaktivno obeležena specifična DNK proba (1 ng) i smeša je inkubirana 20-40 min. na sobnoj temperaturi. Po završenoj reakciji dodavan je pufer za nanošenje na elektroforezu (50% glicerol, 0.1% ksilen-cijanol i 0.1% brom-fenol-plavo). Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na nedenaturišući poliakrilamidni gel.

### 3.2.25. Vezivanje prečišćenih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> za DNK probu

Vezivanje prečišćenih proteina za DNK je radeno prema proceduri koja je opisana (Prentki et al., 1987). 1-2 ng svakog od obeleženih DNK fragmenata specifične probe je inkubirano na 25°C sa odgovarajućim koncentracijama CysB<sub>6His</sub> ili CysB(I33N)<sub>6His</sub> proteina, u reakcijama gde je bilo potrebno dodati su NAS u odgovarajućoj koncentraciji ili specifična i/ili nespecifična hladna proba u višku (100 puta). Pufer za vezivanje sadržao je 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 12.5% glicerol, 0.1% Triton X-100. Po završenoj reakciji dodavan je pufer za nanošenje na elektroforezu (50% glicerol, 0.1% ksilen-cijanol i 0.1% brom-fenol-plavo). Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na nedenaturišući poliakrilamidni gel.

### 3.2.26. Određivanje mobilnosti kompleksa DNK i proteina elektroforezom na gelu

Elektroforeza je rađena na 5% nedenaturišućem akrilamidnom gelu (8.33 ml 30% stoka poliakrilamida - akrilamid : bisakrilamid u težinskom odnosu 29 : 1, 2.5 ml 10 x TBE, 39,17 ml dH<sub>2</sub>O; u smešu je dodato 400 µl 10% amonijum-persulfata i 20 µl TEMED-a) na +4°C. Kao pufer za elektroforezu korišćen je 0.5xTBE. Preelektroforeza je trajala 2 sata pri konstantnoj struji od 20 mA, a elektroforeza je trajala oko 4 sata pri konstantnoj struji od 30

mA. Nakon toga je gel osušen 1 sat na 80°C i eksponiran 3 do 48 sati na -70°C sa filmovima osetljivim na X-zrake.

### 3.2.27. Kompjuterske analize

Nukleotidna sekvenca je analizirana korišćenjem programa "Strider 1.1" i "GenInfo network BLAST server" (BLASTN, BLASTP i BLASTX) (Altschul *et al.*, 1990). Prisustvo direktnih i invertovanih ponovaka u nukleotidnoj sekvenci analizirano je korišćenjem programa "PCgene". Pretraživanje konzerviranih proteinskih domena i motiva urađeno je korišćenjem "NCBI" programa dok je prisustvo konsenzusa za lipoprotein određeno programom "SignalP V1.1". Određivanje hidropatije proteina i pI urađeno je korišćenjem programa "DNA star 3.87-Protean", "TopPred 2 - Stockholm university" i algoritma iz literature (Kyte & Doolittle, 1982). Sekundarna struktura proteina analizirana je programima "DNA star 3.87-Protean", "Profile network prediction Heidelberg" i "NCBI- MMDB Structure Summary" i algoritma iz literature (Garnier *et al.*, 1978). Prisustvo signalne sekvence i mesto sečenja unutar proteina određeno je programom "SignalP V1.1" i korišćenjem algoritma (Nielsen *et al.*, 1997). Postojanje transmembranskih regiona i analiza topologije proteina određeni su programima "SignalP V1.1", "HMMTOP" i "TopPred 2- Stockholm university". Predikcije nalaženja strukture navoja - "coils", odnosno "leucine zipper"-a urađeni su korišćenjem programa "HMMTOP". Vizuelizacija i analiza kristalne strukture proteina urađena je u programu "ExpASy - NiceProt View of SWISS-PROT".

Originalni gelovi i autoradiografije su snimljeni CCD kamerom ili skenirani i slike su sačuvane i prenesene korišćenjem programa "Adobe Photoshop 5.0" i "CorelDraw 9.0".



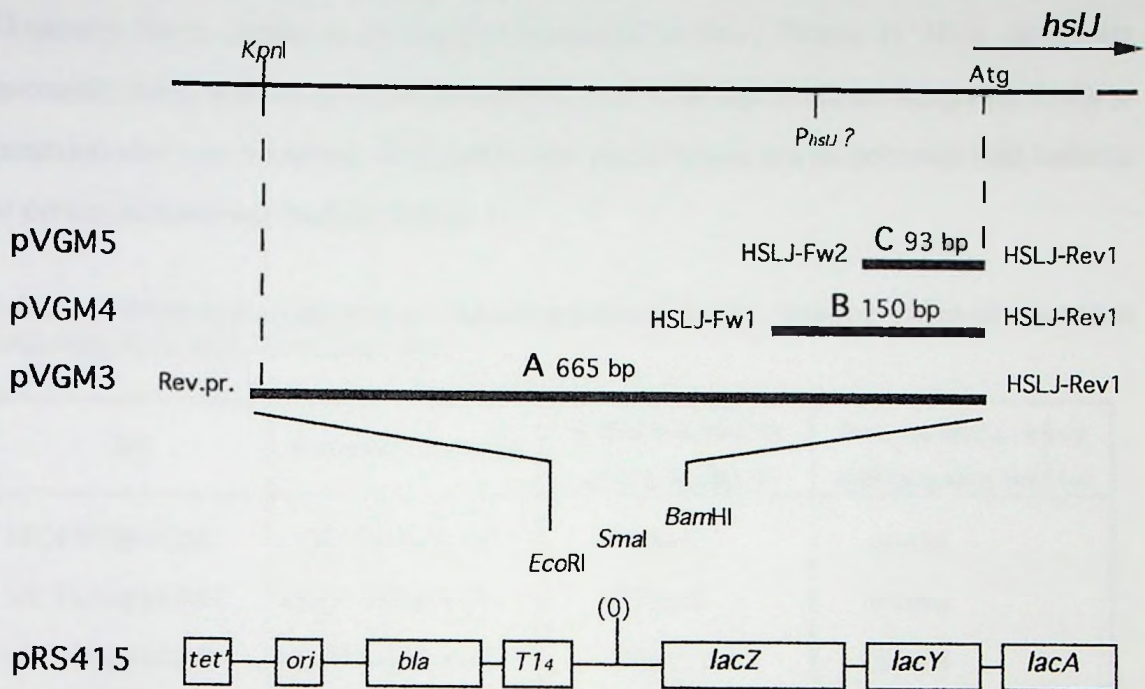
## IV REZULTATI

### 4.1. Definisanje minimalnog promotorskog regiona *hslJ* gena *in vivo*

Prethodna istraživanja pokazala su da je ekspresija *hslJ* gena negativno regulisana CysB proteinom (Lilic, 1998). Merenjem aktivnosti genske fuzije *hslJ::LacZ* utvrđeno je da je i u *cysB* mutantu *hslJ* gen veoma slabo eksprimiran. U cilju detaljnije studije regulatornog i promotorskog regiona *hslJ* gena konstruisane su i analizirane operonske (transkripcione) fuzije *hslJ-lacZ*.

#### 4.1.1. Deleciona analiza regulatornog regiona *hslJ* gena

Operonske fuzije *hslJ<sub>A</sub>-lacZ* (pVGM3), *hslJ<sub>B</sub>-lacZ* (pVGM4) i *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* (pVGM5) konstruisane su kao što je opisano u poglavlju Materijal i Metode 3.2.8. (Prilog 2) i proverene restrikcijom analizom. Fuzije se međusobno razlikuju u dužini regulatornog regiona uzvodno od starta translacije tako da na 3' kraju sve tri fuzije sadrže A nukleotid iz start ATG kodona *hslJ* gena dok se 5' kraj *hslJ<sub>A</sub>-lacZ* fuzije nalazi 665 bp uzvodno od ATG kodona (region A), *hslJ<sub>B</sub>-lacZ* fuzija sadrži 150 bp uzvodno od ATG kodona (region B) a *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* fuzija obuhvata region C od 93 bp uzvodno od ATG kodona (Slika 11). Ovi regulatorni regioni klonirani su u vektor za operonske fuzije pRS415 koji je poslužio i kao negativna kontrola u ovim analizama. Regioni A i B sadrže ranije definisani promotor  $P_{hslJ}$  dok se on ne nalazi u regionu C. Aktivnost fuzija je ispitivana u sojevima MC4100 (*cysB*<sup>+</sup>) i SY602 (*cysB*<sup>-</sup>). Dobijeni konstrukti MC4100/pVGM3, MC4100/pVGM4 i MC4100/pVGM5 kao i njihovi *cys*<sup>-</sup> izogeni SY602/pVGM3, SY602/pVGM4 i SY602/pVGM5 striklovani su na MacConkey agaroznu podlogu suplementiranu laktozom i ampicilinom (razliku u ekspresiji *hslJ* gena



Slika 11. Konstrukcija operonskih fuzija *hslJ-lacZ*. Na slici je prikazan regulatorni region *hslJ* gena i pozicija restrikcionog mesta za *KpnI* enzim. Regioni A (665 bp), B (150 bp) i C (93 bp) su dobijeni PCR reakcijom uz korišćenje parova prajmera prikazanih uz fragmente. DNK fragmenti su klonirani u *EcoRI-BamHI* mesta na vektoru pRS415 koji se koristi za konstrukciju operonskih fuzija i dobijeni su rekombinantni plazmidi pVGM3 (*hslJ<sub>A</sub>-lacZ*, nosi region A), pVGM4 (*hslJ<sub>B</sub>-lacZ*, nosi region B) i pVGM5 (*hslJ<sub>C</sub>-lacZ*, nosi region C). Svi regioni nose A nukleotid iz *hslJ* start kodona. Regioni A i B nose ranije definisani promotor *P<sub>hslJ</sub>* dok se on ne nalzi u regionu C (Slika 10, Prilog 2). DNK fragmenti- regioni B i C, iskorišćeni su i kao probe u reakcijama eseja retardacije na gelu.

između soja koji nosi *cysB<sup>-</sup>* alel i soja koji nosi *cysB<sup>+</sup>* alel nije moguće zapaziti striklovanjem kolonija na LA podlogu suplementiranu X-Gal indikatorskom bojom jer su razlike u intenzitetu plave boje teško uočljive). Na čvrstoj indikatorskoj MacConkey podlozi razlika u ekspresiji fuzija u MC4100 i SY602 sojevima može se zapaziti na osnovu intenziteta boje kolonija, sojevi MC4100/pVGM3, MC4100/pVGM4 i MC4100/pVGM5 daju kolonije crvene boje dok u soju SY602 (*cysB<sup>-</sup>*) transformisanim sa istim plazmidima kolonije tamno crvene



boje su proizvod veće aktivnosti fuzija (Tabela 4). Svi sojevi gajeni su u LB medijumu. Ekspresija fuzija izmerena je  $\beta$ -galaktozidaznim esejom (Tabela 4). Nivo ekspresije operonskih fuzija kod sva tri fuzionna konstrukta u MC4100 soju je sličan. Ekspresija fuzija je generalno viša u *cysB* mutantu ali ta razlika nije tako izražena kao što pokazuje boja kolonija na čvrstoj indikatorskoj podlozi (Tabela 4).

Tabela 4. Određivanje minimalnog promotorskog regiona *hslJ* gena merenjem aktivnosti operonskih fuzija *hslJA-lacZ*, *hslJB-lacZ*, *hslJC-lacZ*.

Soj	Relevantni genotip	$\beta$ -galaktozidazna aktivnost (MU) <sup>a</sup>	boja na MacConkey indikatorskoj podlozi
MC4100/pVGM3	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJA-lacZ</i>	764±32	crvena
MC4100/pVGM4	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJB-lacZ</i>	770±29	crvena
MC4100/pVGM5	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJC-lacZ</i>	758±35	crvena
MC4100/pRS415 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>+</sup>	55±5	bela
SY602/pVGM3	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>hslJA-lacZ</i>	877±35	tamno crvena
SY602/pVGM4	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>hslJB-lacZ</i>	903±38	tamno crvena
SY602/pVGM5	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>hslJC-lacZ</i>	876±41	tamno crvena
SY602/pRS415 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup>	46±7	bela

<sup>a</sup> Vrednosti date u Milerovim jedinicama (MU) predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja prikazanu sa standardnim devijacijama

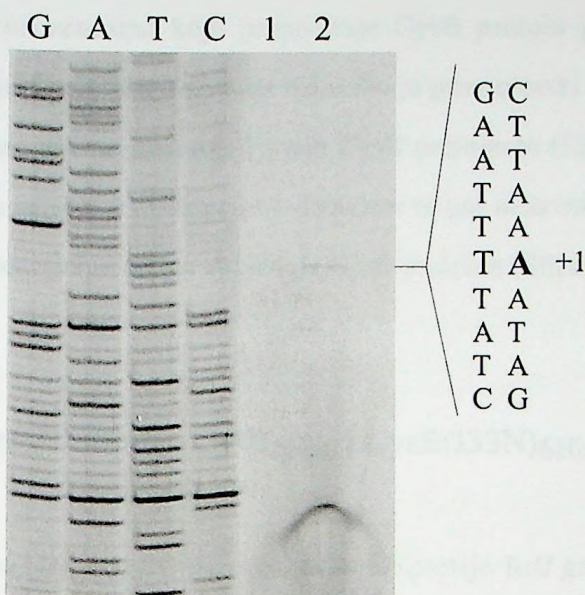
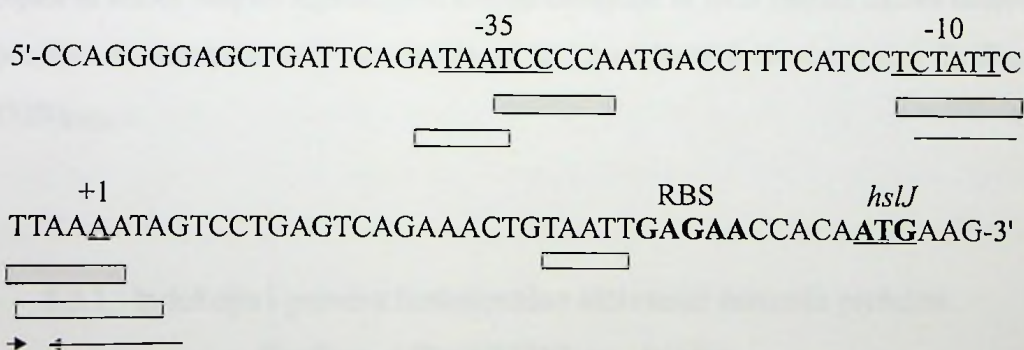
<sup>b</sup> Kao kontrola za rezidualnu  $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost iskorišćeni su recipijentni sojevi MC4100 i SY602 transformisani vektorom pRS415

Rezultati rasta na čvrstoj podlozi i rezultati merenja aktivnosti enzima  $\beta$ -galaktozidaze pokazuju da se minimalni promotorski region *hslJ* gena nalazi u okviru najkraćeg fuzionog fragmenta - region C koji obuhvata 93 bp uzvodno od ATG start kodona *hslJ* gena.

#### 4.1.2. Određivanje starta transkripcije *hslJ* gena

U prethodnom radu pokazano je da se start transkripcije *hslJ* gena nalazi 82 nukleotida uzvodno od start kodona *hslJ* gena i 7 nukleotida nizvodno od identifikovanog potencijalnog  $\sigma^{70}$  promotora (Lilic, 1998) (Slika 11, Prilog 2). Merenjem aktivnosti operonske fuzije *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* (Slika 11), koja ne sadrži prethodno određeni putativni promotorski region *hslJ* gena, pokazano je da je fuzija i dalje aktivna (Tabela 4) što je ukazalo da se putativni promotor nalazi bliže start kodonu *hslJ* gena. Zbog ove razlike ponovljen je eksperiment određivanja starta transkripcije *hslJ* gena na način opisan u poglavlju Materijal i Metode 3.2.15. Za određivanje starta transkripcije korišćen je oligonukleotid 18-mer (obeležen  $\gamma$ -<sup>32</sup>P na svom 5' kraju), komplementaran regionu koji se nalazi u strukturnom delu *hslJ* gena od +127 do +109 nukleotida (Prilog 2). Isti oligonukleotid korišćen je i kao prajmer u reakciji sekvenciranja *hslJ* gena čija je sekvenca istovremeno puštana na gelu da bi se odredila pozicija starta transkripcije *hslJ* gena. Ukupna RNK upotrebljena za određivanje starta transkripcije izolovana je iz prekonocne kulture soja SY602 (*cysB*<sup>-</sup>) na način opisan u poglavlju Materijal i Metode 3.2.14. Identifikovan je jedan start transkripcije (Slika 12A). Start transkripcije koji pokazuje slab signal, nalazi se 36 nukleotida uzvodno od startnog ATG kodona *hslJ* gena (Slika 12). Sekvenca "-10" elementa potencijalnog (putativnog) promotora definisanog ovim startom transkripcije je TCTATT a "-35" elementa je TAATCC, region između ova dva elementa sadrži 17 nukleotida (Slika 12B). U ovom regionu nalazi se i sekvenca koja odgovara konsenzus sekvenci potencijalnog  $\sigma^S$  promotora; "-10" region ovog putativnog promotora je TCTATTCTTAAAA dok je "-35" region TCCCCA; sekvenca DNK između ova dva regiona iznosi 14 bp (Slika 12B). Analiza aktivnosti *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* fuzije u sojevima koji nose deleciju *rpoS* gena koji kodira  $\sigma^S$  faktor, SY511, SY512, SY513 i SY514, pokazala je da ekspresija *hslJ* gena nije pod kontrolom  $\sigma^S$  faktora (rezultat nije prikazan).



**A**

**B**


Slika 12. Određivanje starta transkripcije *hslJ* gena. A RNK izolovana iz soja SY602 (*cysB*<sup>-</sup>) (kolona 2) sa oligonukleotidom HSLJRev3 korišćena je u reakciji određivanja starta transkripcije. Kao kontrola (kolona 1) na gel je puštena reakciona smeša u kojoj nije bilo RNK. Isti oligonukleotid HSLJ-Rev3 iskorišćen je u reakciji sekvenciranja *hslJ* gena (kolone GATC). B Sekvenca regulatornog regiona (region C) *hslJ* gena. Prikazana sekvenca (93 bp) obuhvata region od -50 do +39 nt u odnosu na određeni start transkripcije sa naznačenom pozicijom starta transkripcije (nt +1), "-35" i "-10" sekvencama  $\sigma^{70}$  promotora, kao i Shine-Dalagarn-ovom sekvencom (SD, RBS),  $\sigma^S$  promotor- sivi pravougaonici, AT bogati regioni- beli pravougaonici, invertovani ponovci (IR) su obeleženi strelicama.

Nakon analize šireg promotorskog regiona *hslJ* gena nije nađena homologija sa do sada poznatim konsenzus sekvencama koje prepoznaje CysB protein pri vezivanju za regulatorne regione u okviru cisteinskog regulona osim što je promotorski region bogat AT nukleotidima, što je slučaj kod većine gena regulisanih CysB proteinom (Slika 12B). Između nukleotida -10 i +5 u odnosu na start transkripcije (+1) nalazi se par nesavršenih invertovanih ponovaka koji mogu biti potencijalno mesto vezivanja CysB proteina (Slika 12B).

#### 4.2. Izolovanje i prečišćavanje CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> proteina

Uloga CysB proteina kao negativnog regulatora ekspresije *hslJ* gena poznata je iz ranijih istraživanja (Lilic, 1998), međutim nije poznato da li CysB protein svoju ulogu ostvaruje direktnim vezivanjem u promotorskom regionu *hslJ* gena ili indirektnim putem, interagujući sa nekim drugim regulatorom. U cilju detaljnije *in vitro* analize načina delovanja CysB proteina na ekspresiju *hslJ* gena izolovani su i prečišćeni fuzioni proteini CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub>.

##### 3.2.1. Indukcija i provera funkcionalne aktivnosti fuzionih proteina

###### CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> *in vivo*

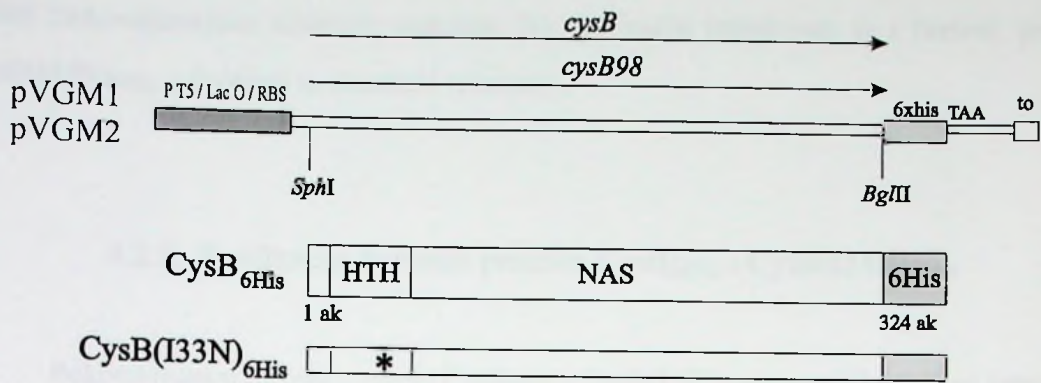
Ekspresioni plazmidi koji nose WT *cysB* gen - pVGM1 i mutirani *cysB98* alel koji kodira CysB-DNK vezujući mutant - pVGM2, konstruisani su na način opisan u poglavlju Materijal i Metode 3.2.16. (Slika 13A). Kod oba konstrukta *cysB* aleli nalaze se pod kontrolom heterologog T5 promotora pa se nivo njihove ekspresije može regulisati dodavanjem odgovarajuće koncentracije inducera IPTG-a. Pri konstrukciji oba plazmida u strukturnom delu *cysB* gena u drugom kodonu izmenjen je prvi nukleotid (A u C) što je



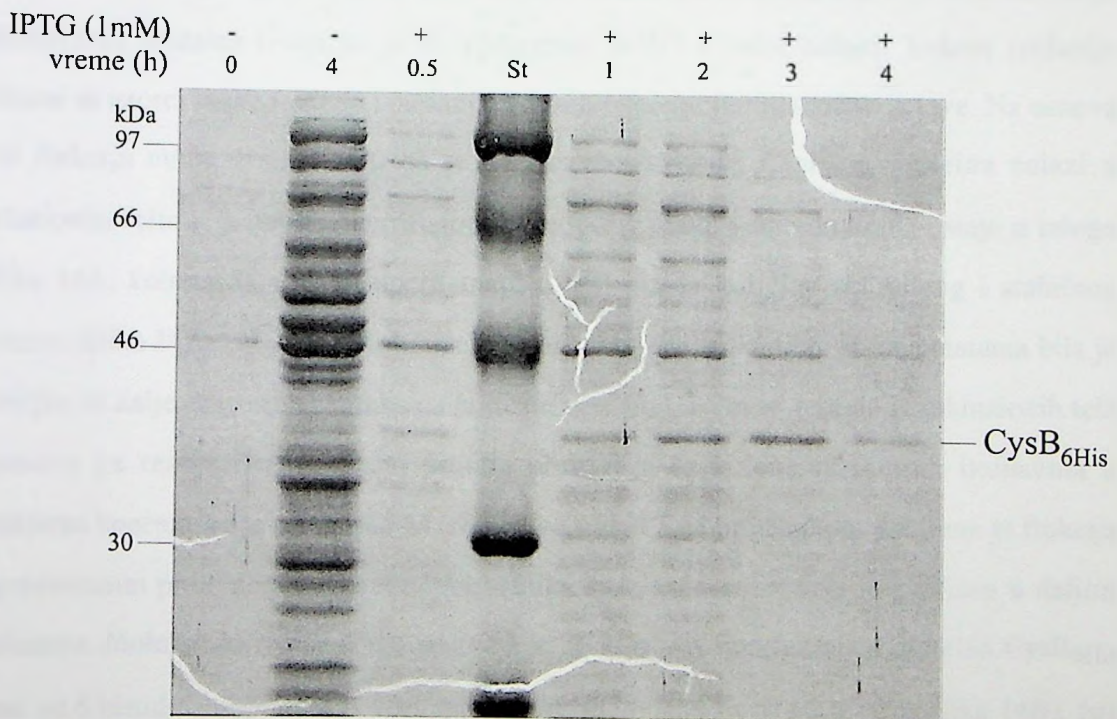
dovelo do promene druge amino kiseline, lizina (polarna-pozitivno naelektrisana) u glutamin (polarna-nenaelektrisana). Kako je region odgovoran za vezivanje CysB proteina za DNK, "HTH" motiv smešten u okviru N-terminalnog domena CysB proteina fuzioni proteini konstruisani su tako da se nosač od šest histidina neophodan za izolaciju proteina afinitetnom hromatografijom na Ni-NTA rezinu nalazi na 3' kraju gena odnosno vezan za C-terminalni domen proteina što smanjuje mogućnost eventualnog uticaja pozitivno naelektrisanog, baznog histidinskog polipeptidnog lanca na funkcionalnu aktivnost "HTH" DNK-vezujućeg motiva (Slika 13A). Aktivnost fuzionog proteina CysB<sub>6His</sub> proverena je *in vivo*, transformacijom soja C600*cysB*<sup>-</sup>/pREP4 (*lacI*<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>, auktotrof za cistein) plazmidom pVGM1 (*cysB*<sup>+</sup>, Amp<sup>r</sup>). Rast transformanata C600*cysB*<sup>-</sup>/pREP4/pVGM1 na minimalnoj podlozi bez cisteina pokazao je da izmene na CysB<sub>6His</sub> fuzionom proteinu ne utiču na njegovu funkcionalnu aktivnost kao aktivatora gena cisteinskog regulona. U ovim ispitivanjima nije vršena indukcija IPTG molekulom jer i pored prisustva LacI represora na pREP4 plazmidu jačina T5 promotora je dovoljna za ekspresiju *cysB*<sup>+</sup> gena sa plazmida pVGM1 i komplementaciju cisteinske auktotrofije. Plazmid pVGM2 nosi *cysB98* alel (nosi mutaciju na 98 nt, A u T) koji kodira CysB(I33N)<sub>6His</sub>, fuzioni protein koji nosi mutaciju na amino kiselinu 33 (ATC u AAC odnosno Ile u Asn) (Slika 13A, Prilog 1). Ova mutacija onemogućava vezivanje CysB(I33N)<sub>6His</sub> za promotore cisteinskog regulona pa i mogućnost provere konstrukta komplementacijom cisteinske auktotrofije tako da je intaktnost ovog konstrukta proverena sekvenciranjem (Materijal i Metode 3.2.12.).

Za dalji rad bilo je potrebno izolovati veću količinu rekombinantnih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> tako da je ekspresija *cysB* gena povećana korišćenjem inducera IPTG. Čelije koje nose plazmide pVGM1 i pVGM2 indukovane su 1mM IPTG-om (videti Materijal i Metode 3.2.19.) u različitim vremenskim intervalima (0.5, 1, 2, 3 i 4 sata), izolovan je ćelijski ekstrakt i analiziran na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (Slika 13B). Najbolji prinos proteina dostignut je nakon tri sata indukcije 1mM IPTG-om, što je u daljem radu primenjivano. Nakon četiri sata indukcije ćelije liziraju i više nije moguće

A



B



Slika 13. Konstrukcija i indukcija fuzionih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub>. A Shema relevantnih regiona plazmida pVGM1 i pVGM2 upotrebljenih za ekspresiju fuzionih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub>. Kontrolni regioni plazmida pVGM1: PT5- promotor faga T5; *LacO*-sekvence dva *lac* operatora; RBS- mesto vezivanja za ribozom; 6xhis- histidinski nosač; TAA- stop kodon; to- terminator transkripcije, izgled fuzionih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub>. HTH- "helix-turn-helix" motiv za vezivanje za DNK; NAS- mesto vezivanja za DNK; 6His- polipeptid koji sadrži 6 histidina; zvezdica- zamena amino kiseline I33N kod DNK vezujućeg mutanta. B Izgled ćelijskih lizata soja koji nosi pVGM1 plazmid pre i nakon indukcije sa IPTG inducerom. Standardi molekularnih težina proteina (St) prikazani su pored slike. Elektroforeza je radena na 12.5% SDS poliakrilamidnom denaturišućem gelu.

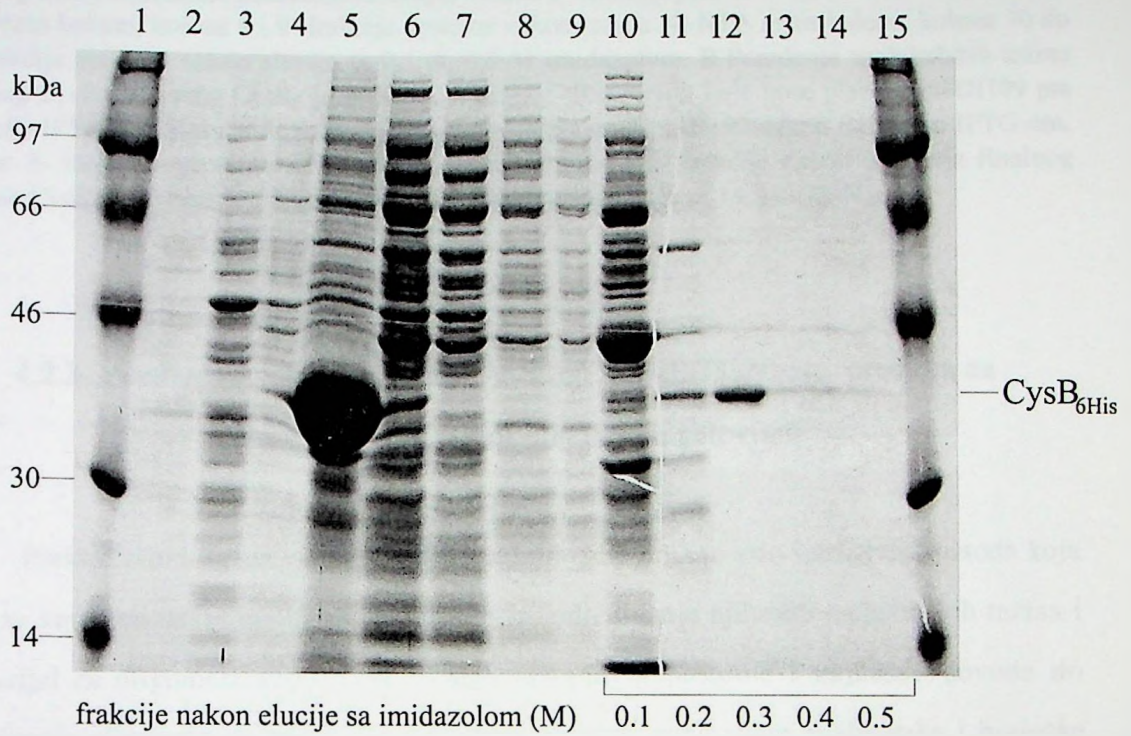


dobiti zadovoljavajuću količinu proteina. Na isti način indukovan je i fuzioni protein CysB(I33N)<sub>6His</sub>, i dobijeni su identični rezultati.

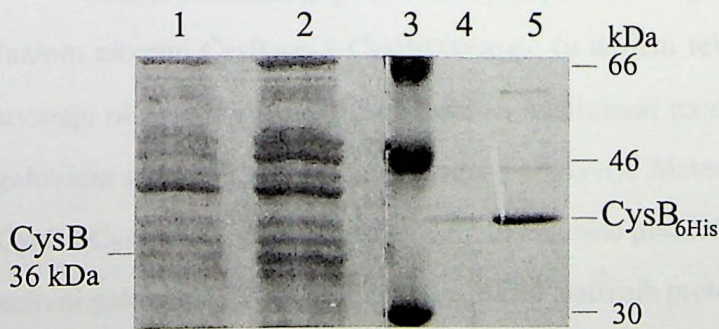
#### 4.2.2. Purifikacija fuzionih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub>

Rekombinantni fuzioni proteini CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> purifikovani su metodom afinitetne hromatografije do čistoće veće od 95% (Materijal i Metode 3.2.19.). Prečišćavanje indukovanih proteina izvedeno je na afinitetnoj Ni-NTA rezin koloni. Tokom izolacije uzimani su uzorci svake frakcije i puštani na denaturišuće poliakrilamidne gelove. Na osnovu ovih frakcija može se zaključiti da se najviše indukovanog CysB<sub>6His</sub> proteina nalazi u inkluzionim telima, jer posle centrifugiranja ćelijskog lizata velika količina ostaje u talogu (Slika 14A, kolona 5), dok u supernatantu ostaje manja količina solubilnog i stabilnog proteina (Slika 14A, kolona 6). Količina proteina dobijena izolacijom iz supernatanta bila je dovoljna za dalje eksperimente tako da nije bilo potrebno izolovati protein iz inkluzionih tela i ponovo ga renaturisati. Fuzioni protein eluiran je sa kolone rastvorom imidazola u gradijentu koncentracije od 0.1-0.5 M. Nakon elucije 0.3 M imidazolom dobijena je frakcija sa prečišćenim proteinom (od preko 95%) (Slika 14A, kolona 12) koji je korišćen u daljim analizama. Molekulska težina CysB proteina je 36 kDa dok kod fuzionog proteina CysB<sub>6His</sub> nosač od 6 histidina doprinosi povećanju molekulske težine za oko 2.0 kDa (Slika 14B). Isti postupak primenjen je tokom izolacije fuzionog proteina CysB(I33N)<sub>6His</sub> i najčišća frakcija ovog proteina takode je izolovana elucijom sa 0.3 M imidazolom (Slika 14C). Tokom purifikacije oba proteina uzimani su uzorci koji su zatim provereni na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima. Za dalji rad prečišćeni proteini su dijalizirani čime je promenjen pufer u kome su se uzorci proteina nalazili nakon eluiranja sa kolone, određena je njihova koncentracija (videti Materijal i Metode 3.2.21.) i takvi uzorci su čuvani na -80°C ili -20°C (radni stok).

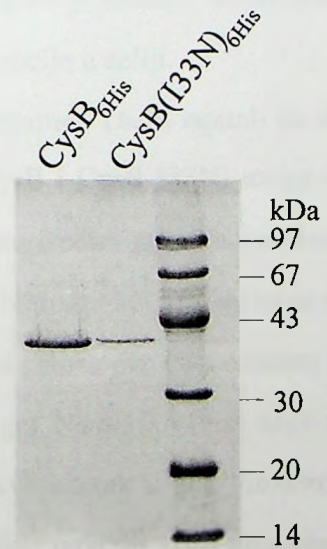
A



B



C



Slika 14. Izolacija CysB fuzionog proteina na afinitetnoj hromatografiji. A Izolacija proteina CysB<sub>6His</sub>. Kolone 1 i 15 - standardi molekulskih težina proteina; kolone 2 i 3- ekstrakt ćelija koje nisu indukovane IPTG inducerom u vremenu t=0 h (2) i t=3 h (3); kolona 4- ekstrakt ćelija nakon indukcije 1 mM IPTG-om, t=3h; kolone 5 i 6- ćelijske frakcije izolovane iz taloga (5) i supernatanta (6)



ćelijskog lizata nakon lize indukovanih ćelija; kolona 7- frakcija proteina koji se nisu vezali za Ni-NTA rezin kolonu; kolone 8 i 9- frakcije proteina nakon pranja Ni-NTA rezin kolone; kolona 10 do 14- frakcije proteina nakon elucije sa 0.1 do 0.5 M imidazolom. **B** Poređenje molekulskih težina nativnog CysB i fuzionog CysB<sub>6His</sub> proteina. Kolona 1- lizat ćelija koje nose plazmid pMH199 pre indukcije IPTG-om. Kolona 2- lizat ćelija koje nose plazmid pMH199 nakon indukcije IPTG-om. Kolona 3- standardi proteina molekulskih težina. Kolona 4-5- frakcije nakon eluiranja finalnog proteina CysB<sub>6His</sub> **C** Poređenje prečišćenih fuzionih proteina CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub>.

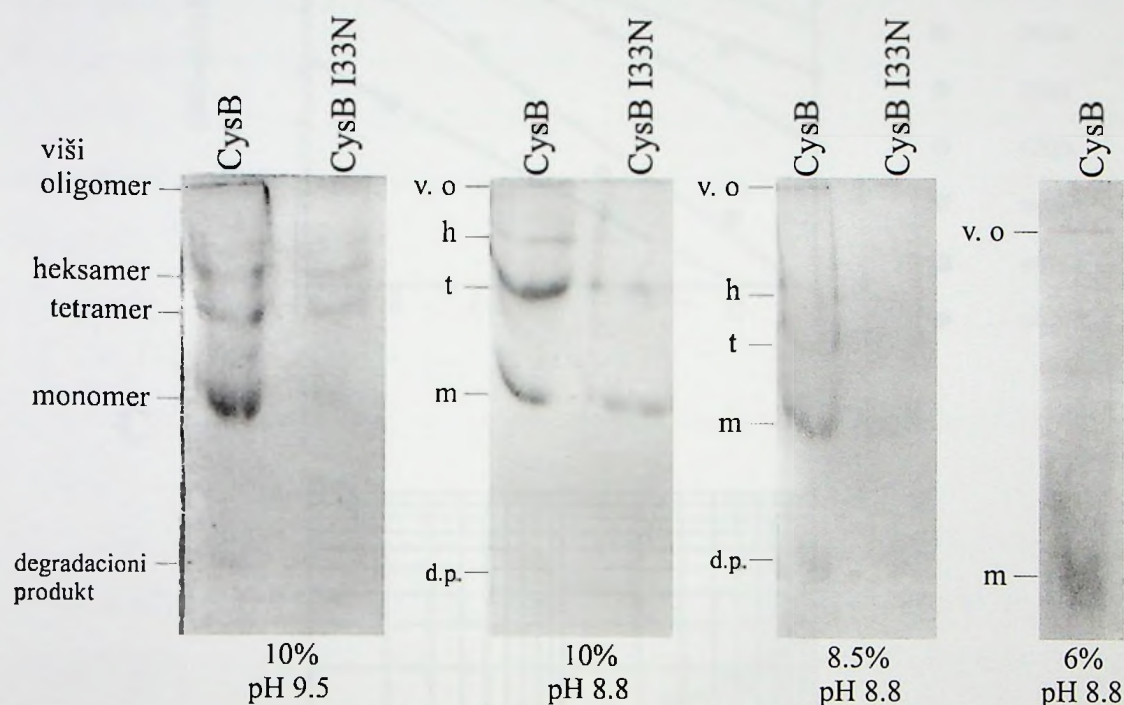
#### 4.2.3. Analiza molekulske težine CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> proteina na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima

Elektroforeza na nativnim poliakrilamidnim gelovima je vrlo senzitivna metoda koja služi za karakterizaciju malih količina proteina, određivanje njihovih molekulskih težina i potencijal za oligomerizaciju. Urea i SDS denaturišu proteine i najčešće dovode do disocijacije oligomera na monomere pri čemu proteini gube svoje enzimske i biološke funkcije. Upotrebom nedenaturišućih poliakrilamidnih gelova moguće je odrediti molekulsku težinu nativnog proteina, odnosno njegov potencijal za oligomerizaciju u ćeliji.

Podaci iz literature govore da CysB protein deluje kao tetramer. Da bi ispitali da li i fuzioni proteini CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> (u daljem tekstu CysB i CysB I33N) mogu da stvaraju oligomere, prečišćeni uzorci su analizirani na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima na način kao što je opisano u poglavlju Materijal i Metode 3.2.22. Obzirom da CysB i CysB I33N proteini imaju  $pI=7.16$  odnosno  $pI=6.98$ , pored gelova pH 8.8 korišćeni su nativni gelovi pH 9.5 da bi se olakšao ulazak nativnih proteina u gel. Na pH 9.5 (više nego na pH 8.8) COO<sup>-</sup> grupe su negativno naelektrisane što omogućava ulazak u gel. Analizom gelova utvrđeno je da CysB protein oligomeriše od struktura nižeg reda do viših oligomera (Slika 15A). Takode je pokazano da i mutirani CysB I33N protein stvara oligomere istih veličina (Slika 15A). Trake i mobilnost struktura u gelu su kvantifikovane (Slika 15B i C) i pokazano je da oba proteina oligomerišu od strukture monomera, preko tetramera, heksamera do struktura višeg reda. Na gelovima su najizraženije trake monomera, tetramera i

heksamera. Viši oligomeri slabo ulaze u gel (osim na nativnom 6% PAGE) a vidljive su i trake oligomera između heksamera i viših oligomera ali one nisu uzete za kvantifikaciju.

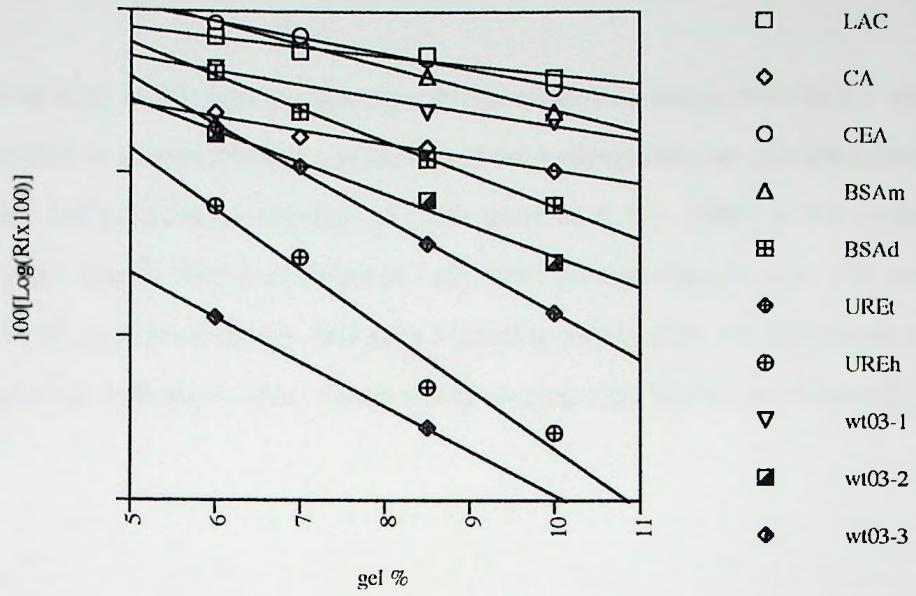
**A**



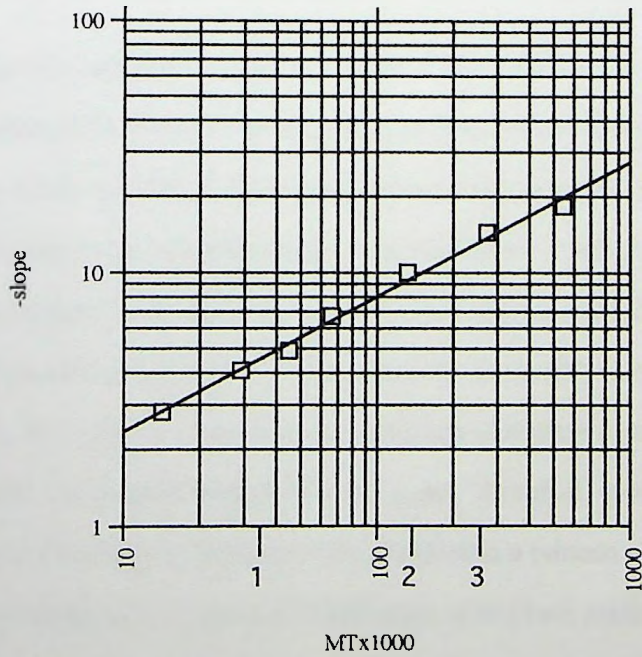
Slika 15. Određivanje molekularnih težina CysB i CysB I33N proteina na nenedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima. **A** Purifikovani CysB i CysB I33N proteini i proteinski standardi odgovarajućih molekularnih težina su pušteni na nativne proteinske poliakrilamidne gelove a zatim bojeni Coomassie plavim. Mobilnost nativnih CysB i CysB I33N proteina na 10% poliakrilamidnom gelu pri vrednosti pH 8.8 i pH 9.5 kao i na 8.5% i 6% gelovima pH 8.8 **B** Vrednosti dobijene iz jednačine  $100(\text{Log}(\text{Rfx}100))$  gde je Rf relativna pokretljivost proteinskih standarda i CysB proteina su nanešene na ordinatu dok se na apscisi nalaze koncentracije poliakrilamidnih gelova za svaki protein zasebno. **C** Na osnovu prethodnih vrednosti dobijene su krive iz kojih je izračunat koeficijent retardacije (Kr). On se nalazi na ordinati grafika C dok se na apscisi nalaze  $\text{MT} \times 1000$ . Upotrebljeni proteinski standardi su: LAB- " $\alpha$ -lactalbumin" (Kr=3.8), CA- "carbonic anhydrase" (Kr=4.0), ACE- "chicken egg albumin" (Kr=4.8), BSAm- "bovine serum albumin" (monomer) (Kr=6.8), BSAd- "bovine serum albumin" (dimer) (Kr=11.2), UREt- urease (trimer) (Kr=17.0) i UREh- "urease" (heksamer) (Kr=24.7); wt 03-1-3 su pozicije monomera, tetramera i heksamera CysB proteina, koje odgovaraju određenim molekularnim težinama na grafiku C: 1- 34 kDa- monomer, 2- 140 kDa- tetramer, 3- 240 kDa- heksamer.



**B**



**C**



Slika 15. (Nastavak)

### 4.3. Vezivanje prečišćenih CysB i CysB I33N proteina u *hslJ* lokusu

U dosadašnjim istraživanjima merenje aktivnosti genske fuzije *hslJ::lacZ* i analiza retardacije kompleksa protein-DNK na poliakrilamidnim nenedenurišućim gelovima pokazali su da ekspresija *hslJ* gena zavisi od prisustva CysB proteina (Lilic, 1998). U tim analizama korišćen je ukupni ćelijski lizat a ne izolovan i prečišćen protein tako da nije bilo moguće utvrditi da li CysB protein ekspresiju *hslJ* gena kontroliše vezivanjem za regulatorni region *hslJ* gena ili postoji indirektan uticaj preko nekog drugog regulatora kontrolisanog CysB proteinom.

#### 4.3.1. Vezivanje CysB za regulatorni i strukturni region *hslJ* gena

Analiza pokretljivosti kompleksa (Mat. i Met. 3.2.25 i 3.2.26.) dobijenih reakcijom ćelijskog ekstrakta soja MC4100 (izolovanog iz prekonoćne kulture ovog soja gajene u LB medijumu) sa probom DNK "301" koja obuhvata regulatorni i strukturni region *hslJ* gena (Slika 16A i Prilog 2) kao i kombinacije sa prečišćenim CysB proteinom sa istom probom DNK "301" prikazana je na Slici 16B, sekcija A. Ćelijski ekstrakt iz *cysB*<sup>-</sup> soja sa probom "301" daje komplekse A1-A5. Ćelijski ekstrakt iz *cysB*<sup>+</sup> soja sa probom "301" daje komplekse A3, A5 i slab A6. Kombinacija ćelijskog ekstrakta *cysB*<sup>-</sup> soja i prečišćenog CysB sa probom "301" daje jače komplekse A5 i A6. Rezultati pokazuju da prisustvo CysB proteina povećava intenzitet stvaranja viših kompleksa u odnosu na ćelijski ekstrakt. Takođe, i ekstrakt iz MC4100 *cysB* mutanta (SY602) daje veliki broj različitih kompleksa sa probom "301". Paterni vezivanja *cysB*<sup>+</sup> ekstrakta i prečišćenog CysB proteina su znatno sličniji i razlikuju se od *cysB* mutanta.

Proba "135" obuhvata 135 nt strukturnog dela gena (Slika 16A, Prilog 2) tako da je iskorišćena u reakcijama vezivanja sa ćelijskim lizatom sojeva MC4100, SY602 (*cysB*<sup>-</sup>) kao



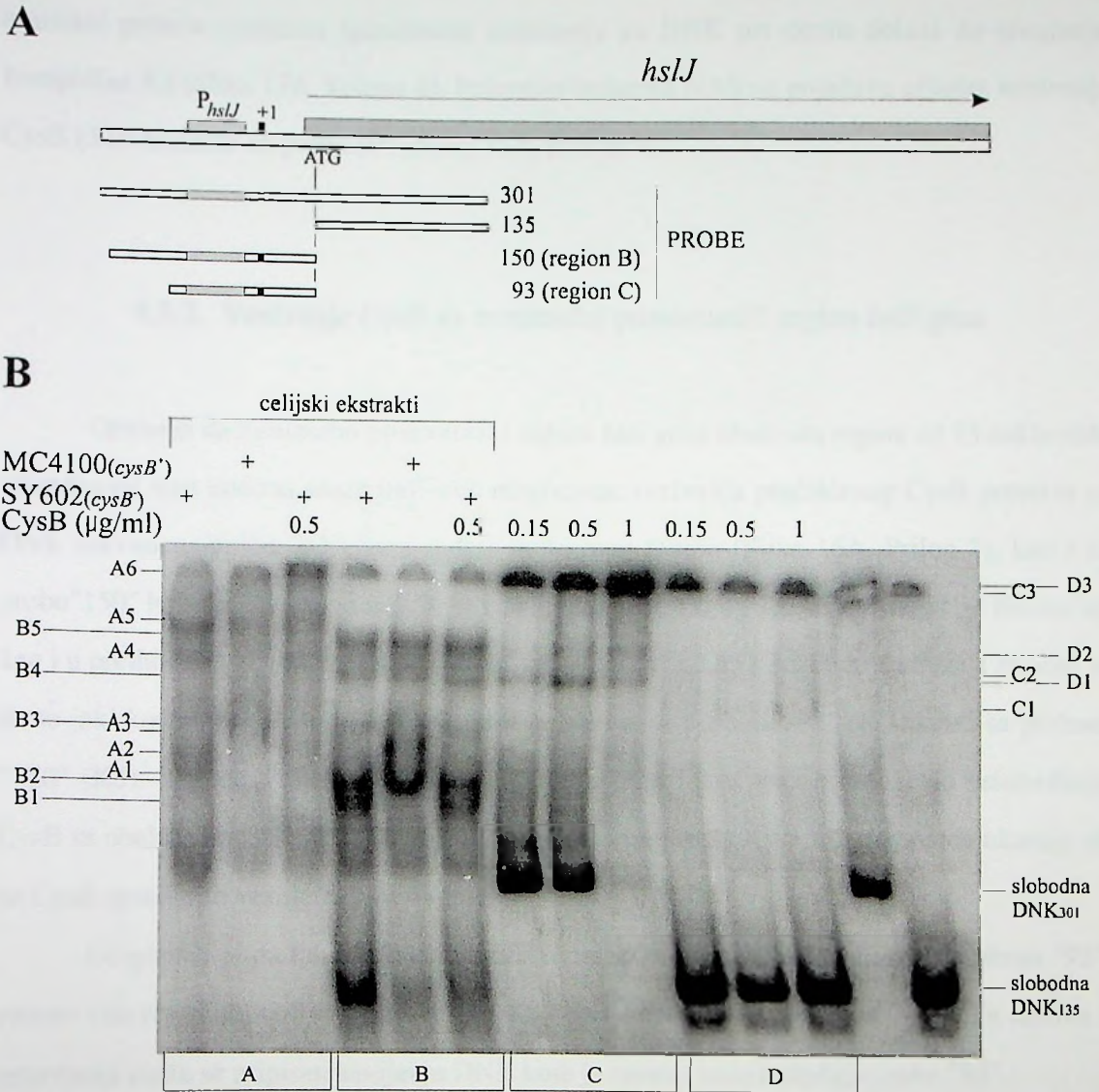
i sa kombinacijom prečišćenog CysB proteina (Slika 16B, sekcija B). Ćelijski ekstrakt iz *cysB*<sup>-</sup> soja sa probom "135" daje komplekse B1, B2, slab B3, B4 i B5. Ćelijski ekstrakt iz *cysB*<sup>+</sup> soja sa probom "135" daje jak kompleks B2 i slabije B4 i B5. Kombinacija ćelijskog ekstrakta iz *cysB*<sup>-</sup> soja i prečišćenog proteina CysB sa probom "135" daje komplekse identične kompleksima ćelijskog ekstrakta *cysB*<sup>-</sup> soja sa probom "135". Kao i kod probe "301", ekstrakt iz *cysB*<sup>-</sup> mutanta (SY602) daje veći broj kompleksa i vezuje se za probu "135".

Na Slici 16B, sekcija C, prikazano je vezivanje CysB proteina za probu "301". U zavisnosti od koncentracije CysB dolazi do stvaranja kompleksa C1-C3. Pri nižim koncentracijama jači je C1 kompleks a pri višim, C1 kompleks nestaje a izraženije je stvaranje viših C2 i C3 kompleksa. Rezultati govore u prilog tome da se CysB snažno vezuje za probu "301" i stvara komplekse višeg reda u direktnoj zavisnosti od koncentracije proteina.

Na Slici 16B, sekcija D, prikazano je vezivanje prečišćenog CysB proteina za probu "135". Samo pri višim koncentracijama proteina dolazi do stvaranja slabih D1 i D2 kompleksa što pokazuje da se CysB protein vrlo slabo vezuje za strukturni region *hslJ* gena.

Generalno, profili kompleksa koji stvaraju ćelijski ekstrakti sa probama, slični su onima dobijenim sa prečišćenim CysB proteinom ali su nešto teži. Potencijal CysB proteina da pri većim koncentracijama formira sa specifičnom probom komplekse višeg reda, pokazan je na Slici 17A (kolone 1 i 2) gde dolazi do stvaranja mega kompleksa K3 i K4 što je u saglasnosti sa rezultatom koji pokazuje da nativni CysB protein ima afinitet ka stvaranju viših oligomera. "Hlađenje" specifičnim neobebeženim probama "301" i "150" (region B) dodatim u višku otkriva niže komplekse K1 i K2 koji se stvaraju kada se smanji "aktivna" koncentracija CysB proteina koji se vezuje za obeleženu probu (Slika 17A, kolone 3 i 4).

Kako je ćelijski ekstrakt izolovan iz soja SY602 pokazao sposobnost vezivanja za *hslJ* lokus analizirano je i vezivanje prečišćenog CysB I33N proteina (koji nosi mutaciju u DNK-vezujućem "HTH" motivu) za *hslJ* lokus. Kao proba upotrebljen je fragment "301". I ovako



Slika 16. Vezivanje CysB proteina u *hslJ* lokusu. A Shematski prikaz pozicija proba "301", "135", "150" (region B) i "93" (region C) u *hslJ* lokusu, korišćenih u eksperimentima pokretljivosti protein-DNK kompleksa u gelu. Za konstrukciju proba videti Materijal i Metode 3.2.6. B Esej mobilnosti protein-DNK kompleksa u gelu. Sekcija A: Stvaranje protein-DNK kompleksa A1-A6 između ćelijskog ekstrakta *cysB*<sup>-</sup> soja, *cysB*<sup>+</sup> soja i ćelijskog ekstrakta *cysB*<sup>-</sup> soja zajedno sa prečišćenim CysB proteinom i probe "301". Sekcija B: Stvaranje protein-DNK kompleksa B1-B5 između ćelijskog ekstrakta *cysB*<sup>-</sup> soja, *cysB*<sup>+</sup> soja i ćelijskog ekstrakta *cysB*<sup>-</sup> soja zajedno sa prečišćenim CysB proteinom i probe "135". Sekcija C: protein-DNK kompleksi C1-C3 dobijeni interakcijom prečišćenog CysB proteina različitih koncentracija i probe "301". Sekcija D: protein-DNK kompleksi D1 i D2 dobijeni interakcijom prečišćenog CysB proteina i probe "135". U poslednje dve kolone su prikazane slobodne obeležene DNK probe "301" i "135" (poly (dI-dC) - nespecifični DNK kompetitor je svuda dodat u višku od 500 puta)



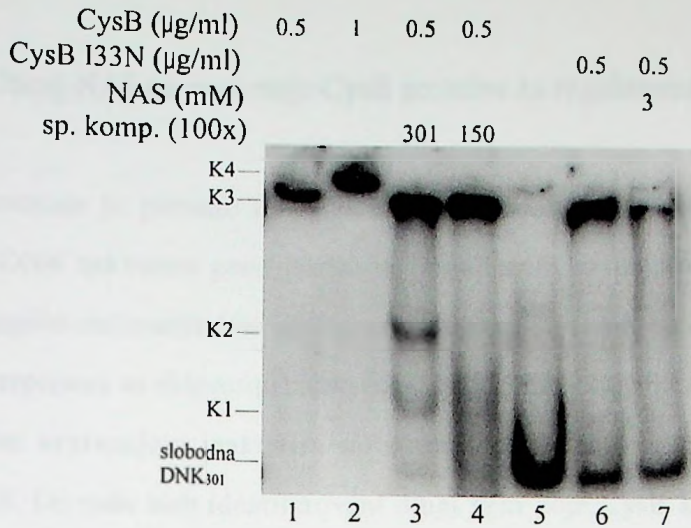
mutirani protein zadržava sposobnost vezivanja za DNK pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa K3 (Slika 17A, kolona 6). Prisustvo inducera NAS ne pojačava afinitet vezivanja CysB I33N mutanta za probu 301 (Slika 17A, kolona 7).

#### 4.3.2. Vezivanje CysB za minimalni promotorski region *hslJ* gena

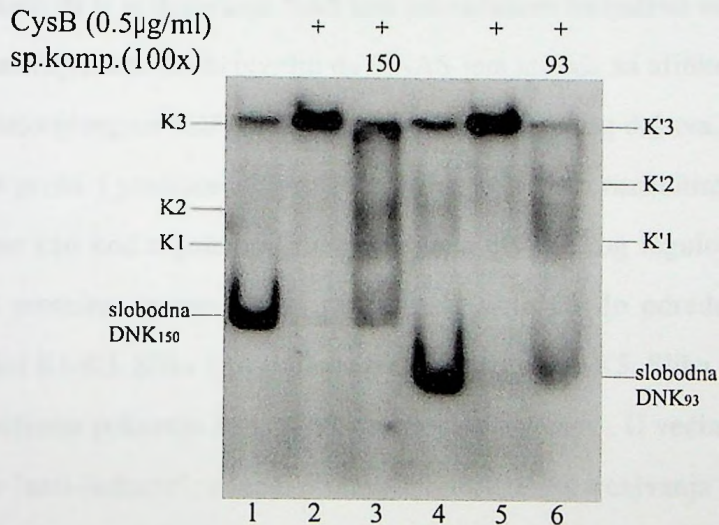
Obzirom da minimalni promotorski region *hslJ* gena obuhvata region od 93 nukleotida uzvodno od start kodona analizirali smo mogućnost vezivanja prečišćenog CysB proteina za DNK sekvencu- proba "93", koja sadrži samo ovaj region (Slika 16A, Prilog 2), kao i za probu "150" koja na 5' kraju sadrži 54 nt više (Slika 16A, Prilog 2). Uslovi reakcije bili su isti kao i u prethodnim eksperimentima (Materijal i Metode 3.2.25 i 3.2.26.). Na Slici 17B vidi se da se jaki kompleksi stvaraju sa CysB koji se vezuje sa probom "93" (K'3) kao i sa probom "150" (K3). Takođe, "hladenjem" sa istim neobebeženim probama dolazi do oslobađanja CysB sa obebeženih "93" ili "150" proba i stvaranja kompleksa K'1 i K'2 što takođe ukazuje da se CysB specifično vezuje za ove fragmente.

Očigledno je da kompleksi K'1 i K'2, iako stvoreni sa CysB i manjom probom "93", znatno više retardiraju od kompleksa K1 i K2 dobijenih sa CysB i probom "150". Ta razlika u retardaciji može se pripisati savijanju DNK koje je znatno veće u slučaju probe "93".

A



B

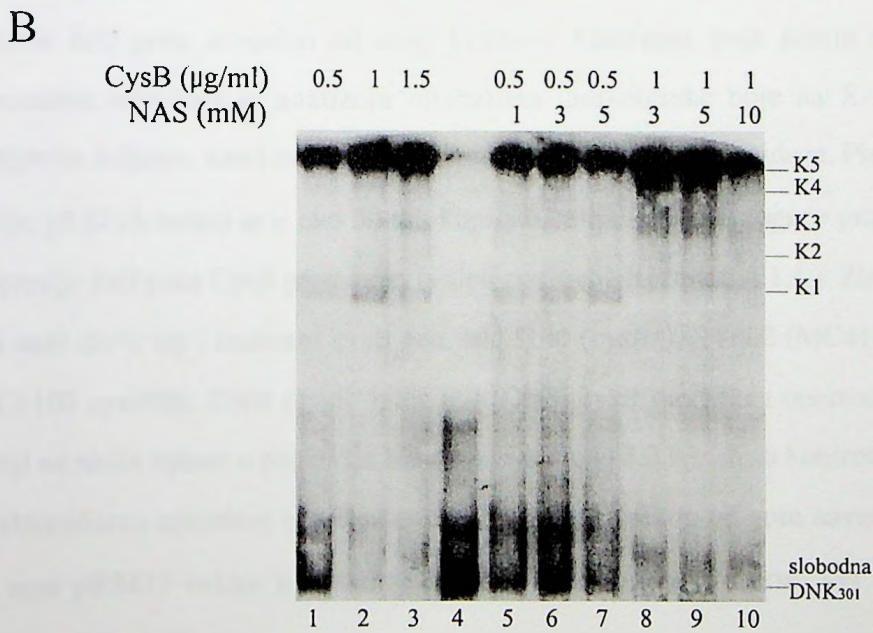
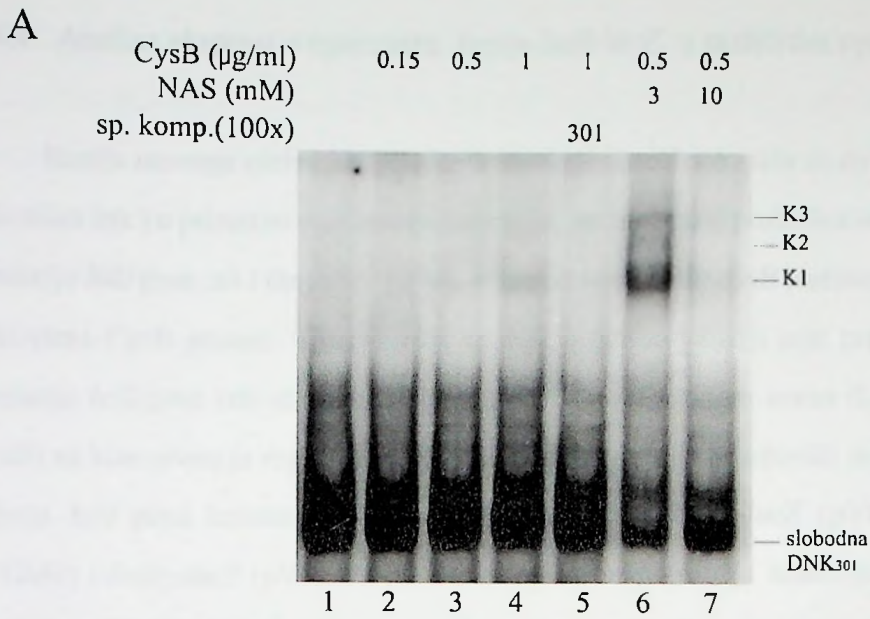


Slika 17. **A** Vezivanje CysB i CysB I33N DNK vezivnog mutanta u *hsIJ* lokusu. Protein-DNK kompleksi: kolona 1: vezivanjem CysB prečišćenog proteina za probu-"301" stvara se kompleks K3; kolona 2: vezivanjem CysB prečišćenog proteina za probu-"301" stvara se kompleks K4; kolona 3: Hlađenje K3 kompleksa sa neobežeženom specifičnom probom, kompetitorom "301" dodatom u višku od 100 puta; kolona 4: hlađenje K3 kompleksa sa specifičnim kompetitorom "150" (region B) dodatom u višku od 100 puta; kolona 5: slobodna obeležena DNK proba "301"; kolona 6: vezivanjem CysB I33N prečišćenog proteina za probu- "301" stvara se kompleks K3; Kolona 7: vezivanjem CysB I33N prečišćenog proteina za probu-"301" u prisustvu NAS stvara se kompleks K3. **B** Vezivanje CysB za minimalni promotorski region *hsIJ* gena Protein-DNK kompleksi: kolona 1: slobodna obeležena DNK proba "150"; kolona 2: vezivanje prečišćenog CysB proteina za probu "150" dovodi do stvaranja kompleksa K3; kolona 3: hlađenje K3 kompleksa sa neobežeženom specifičnom kompetitorskom probom "150" dodatom u višku od 100 puta dovodi do stvaranja kompleksa K1 i K2; kolona 4: slobodna obeležena DNK proba "93"; kolona 5: vezivanje prečišćenog CysB proteina za probu "93" dovodi do stvaranja kompleksa K'3; kolona 6: "hlađenje" kompleksa K'3 sa neobežeženom specifičnom kompetitorskom probom "93" dodatom u višku od 100 puta dovodi do stvaranja kompleksa K'1 i K'2



#### 4.3.3. Uticaj NAS na vezivanje CysB proteina za regulatorni region *hslJ* gena

Iz literature je poznato da inducer NAS olakšava vezivanje CysB proteina za regulatornu DNK sekvencu gena pozitivno regulisanih ovim proteinom i na taj način pojačava njegovo delovanje kao aktivatora transkripcije dok sprečava delovanje CysB proteina kao represora na ekspresiju sopstvenog *cysB* gena delujući kao anti-inducer. Takođe cistein svojim vezivanjem inaktivira serin transacetilazu koja katalizuje sintezu OAS odnosno NAS. Do sada nisu identifikovani drugi geni koje CysB kontroliše na negativan način i nije poznato da li je delovanje NAS kao antiinducera isključivo vezano za aktivnost CysB proteina kao represora. Da bi utvrdili da li NAS ima uticaja na afinitet vezivanja CysB proteina za regulatorni region *hslJ* gena i kakav je efekat njegovog dejstva, u reakcionu smešu pored obeležene probe i prečišćenog proteina dodat je NAS u različitim koncentracijama (Slika 18). Slično kao kod regulatornih regiona gena cisteinskog regulona NAS stimuliše vezivanje CysB proteina za regulatorni region *hslJ* gena ali do određene koncentracije (5mM); kompleksi K1-K3, Slika 18A, kolona 6 i kompleksi K1-K5, Slika 18B, kolone 5-9 u većim koncentracijama pokazuju kako NAS deluje kao "inducer". U većim koncentracijama NAS deluje kao "anti-inducer", odnosno smanjuje efikasnost vezivanja CysB proteina za regulatorni region *hslJ* gena (Slika 18A, kolona 7 i Slika 18B, kolona 10).



Slika 18. NAS stimuliše vezivanje CysB za regulatorni region *hslJ* gena. **A** Esej mobilnosti protein-DNK kompleksa u gelu u zavisnosti od koncentracije CysB proteina i koncentracije dodatog NAS. Kompleksi K1-K3 vide se u kolonama 4, 6 i 7; kompleks K1 u koloni 3. Koncentracije CysB proteina, NAS i specifičnog "hladnog" kompetitora- probe "301", date su iznad slike. **B** Kao i na slici iznad ali uz korišćenje viših koncentracija CysB i NAS. kolona 1-3: kompleksi K1-K3 i K5; kolona 4: slobodna obeležena DNK proba "301"; kolone 8 i 9: kompleksi K3-K5 i slabi kompleksi K1 i K2; kolona 10: kompleks K5 i slabi kompleksi K1-K4. Koncentracija CysB i NAS date su iznad slike gela.



#### 4.4. Analiza ekspresije operonske fuzije *hslJ-lacZ* u različitim *cysB* mutantima

Ranija merenja aktivnosti genske fuzije *hslJ::LacZ* pokazala su da je ekspresija *hslJ* gena niska čak i u prisustvu mutiranog *cysB* gena, što može biti posledica strogo kontrolisane regulacije *hslJ* gena, ali i činjenice da niti jedan od ispitivanih *cysB* mutanata ne nosi potpuno inaktiviran CysB protein. Obzirom da se radi o genskoj fuziji nije razjašnjeno da li se regulacija *hslJ* gena vrši na transkripcionom i/ili translacionom nivou (Lilic, 1998). Da bi utvrdili na kom nivou je regulisana ekspresija *hslJ* gena i da bi odredili dužinu regulatornog regiona *hslJ* gena konstruisane su operonske fuzije *hslJ<sub>A</sub>-lacZ* (pVGM3), *hslJ<sub>B</sub>-lacZ* (pVGM4) i *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* (pVGM5) (na način opisan u poglavlju Materijal i Metode 3.2.8., videti Sliku 11). Fuzije se razlikuju u dužini nukleotidne sekvence potencijalnog regulatornog regiona *hslJ* gena uzvodno od start kodona. Aktivnost ovih fuzija u različitim *cysB* mutantima određena je analizom intenziteta indikatorske boje na X-Gal i MacConkey Petrijevim šoljama, kao i merenjem aktivnosti enzima  $\beta$ -galaktozidaze. Plazmid koji nosi ove fuzije, pRS415, nalazi se u oko 30-tak kopija u ćeliji, pa je nemoguće pratiti finu regulaciju ekspresije *hslJ* gena CysB proteinom (videti poglavlje Rezultati 4.1.1.). Zbog toga su u sojeve koji nose divlji tip i mutirani *cysB* gen, MC4100 (*cysB*<sup>+</sup>), SY602 (MC4100 *cysB*<sup>-</sup>), EC2275 (MC4100 *cysB98*), C600 (*cysB*<sup>+</sup>), SY380 (C600 *cysB*<sup>-</sup>) uvedene operonske fuzije u jednoj kopiji na način opisan u poglavlju Materijal i Metode 3.2.9.). Kao kontrola za rezidualnu  $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost konstruisani su  $\lambda$  lizogeni svakog od gore navedenih sojeva gde  $\lambda$  fag nosi pRS415 vektor koji sadrži *lacZ* reporter gen bez inserta. Svi sojevi gajeni su u bogatom LB medijumu.

Dobijeni rezultati  $\beta$ -galaktozidaznog eseja su pokazali da je aktivnost fuzija koje nose različite regulatorne regione *hslJ* gena (*hslJ<sub>A</sub>-lacZ*, *hslJ<sub>B</sub>-lacZ* i *hslJ<sub>C</sub>-lacZ*) u istom soju podjednaka, tako da su prikazani rezultati dobijeni sa fuzijom koja nosi C fragment *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* koji obuhvata minimalni promotorski region *hslJ* gena. Vrednosti dobijene merenjem aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze pokazuju da je ekspresija fuzije najviša u soju SY602 (MC4100

*cysB*<sup>-</sup>), zatim u SY380 (C600 *cysB*<sup>-</sup>), dok je u soju EC2275 (MC4100 *cysB98*) aktivnost fuzije slična aktivnosti fuzija u *cysB*<sup>+</sup> sojevima, C600 i MC4100 (Tabela 5). Kod svih *cysB*<sup>-</sup> sojeva zapaža se razlika u aktivnosti fuzije na čvrstoj podlozi određenoj prema intenzitetu indikatorske boje i aktivnosti dobijene β-galaktozidaznim esejom, ta razlika je najuočljivija kod soja EC2275 naime, vrednosti dobijene merenjem aktivnosti β-galaktozidaze ukazuju da je ekspresija *hslJ* gena približno ista kao ekspresija *hslJ* u WT *cysB* soju, odnosno da se možda CysB I33N protein vezuje za promotorski region *hslJ* gena isto tako efikasno kao i WT CysB. Plava boja na X-Gal indikatorskoj podlozi govori da se *hslJ* gen eksprimira podjednako dobro kao i u soju MC4100 *cysB*<sup>-</sup> (Tabela 5).

Tabela 5. Uticaj *cysB*<sup>+</sup> i mutiranih *cysB*<sup>-</sup> alela na ekspresiju operonske fuzije *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* na hromozomu.

Soj	Relevantni genotip	β-galaktozidazna aktivnost (MU) <sup>a</sup>	boja na X-Gal indikatorskoj podlozi
SY498	<i>cysB</i> <sup>+</sup> φ( <i>hslJ<sub>C</sub>-lacZ</i> )	130± 12	svetlo plavo
SY503 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>+</sup> λB305/pRS415	17± 3	belo
SY499	<i>cysB</i> <sup>-</sup> φ( <i>hslJ<sub>C</sub>-lacZ</i> )	193± 19	plavo
SY504 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup> λB305/pRS415	19± 6	belo
SY500	<i>cysB98</i> φ( <i>hslJ<sub>C</sub>-lacZ</i> )	129± 8	plavo
SY505 <sup>b</sup>	<i>cysB98</i> λB305/pRS415	23± 4	belo
SY501	<i>cysB</i> <sup>+</sup> φ( <i>hslJ<sub>C</sub>-lacZ</i> )	137± 9	svetlo plavo
SY506 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>+</sup> λB305/pRS415	43± 6	svetlo plavo
SY502	<i>cysB</i> <sup>-</sup> φ( <i>hslJ<sub>C</sub>-lacZ</i> )	185± 11	plavo
SY507 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup> λB305/pRS415	39± 3	svetlo plavo

<sup>a</sup> Vrednosti date u Milerovim jedinicama (MU) predstavljaju srednju vrednost pet nezavisnih merenja (sa standardnim devijacijama)

<sup>b</sup>Kao kontrola za rezidualnu β-galaktozidaznu aktivnost iskorišćeni su recipijentni sojevi λ lizogeni (fag nosi pRS415 vektor koji sadrži *lacZ* reporter gen bez inserta) MC4100, SY602, EC2275, C600 i SY380



Rezultati govore u prilog tome da CysB reprimira transkripciju *hslJ* gena ali i da u odsustvu regulacije kod različitih *cysB* mutanata postoji gradacija u nivou ekspresije *hslJ* što može biti posledica različite aktivnosti CysB proteina kodiranih ovim mutiranim *cysB* alelima.

Sa ciljem da razlike u ekspresiji fuzije *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* u *cysB*<sup>+</sup> i *cysB*<sup>-</sup> sojevima postanu uočljivije tokom merenja aktivnosti β-galaktozidaze, operonska *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* fuzija je klonirana u vektor pMS421 (pMS421 je vektor sa malim brojem kopija 6 do 8 kopija po ćeliji) (videti Materijal i Metode 3.2.8.). Aktivnost fuzije ispitana je u *cysB*<sup>+</sup> i *cysB*<sup>-</sup> sojevima ali i u soju EC2549 koji nosi deletiran *cysB* gen. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 6. Ponovo su dobijene slične vrednosti aktivnosti fuzije kao one u prethodnom merenju, međutim i u soju EC2549, deletantu za *cysB*, aktivnost fuzije je niska kao i u *cysB* mutantima, što ukazuje na strogu kontrolu ekspresije *hslJ* gena i na još neki način regulacije osim CysB proteinom.

Takode je u *cysB*<sup>+</sup> i *cysB*<sup>-</sup> sojeve koji nose fuziju *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* na plazmidu pRS415 uvedena *pcnB* mutacija transdukcijom pomoću P1<sub>vir</sub> faga. Svi sojevi gajeni su u bogatom LB medijumu preko noći zatim su uzorci razblaženi i aktivnost fuzije je merena β-galaktozidaznim esejom, Tabela 6. Rezultati se ne razlikuju od rezultata dobijenih u prethodnim merenjima. *pcnB* gen (3.4 min. na hromozomu *E. coli*) kodira enzim poliA polimerazu (PAPI) koja dodaje adenine na 3' kraj mnogih RNK molekula, pa se tako poliadenilovane RNK degraduju mnogo brže nego njihovi neadenilovani transkripti. Kontrola frekvence replikacije Cole1 plazmida regulisana je malim RNK molekulom RNK I, tako da je kod *pcnB* mutanata kontrola frekvence plazmidne replikacije sa RNKP smanjena i plazmid se u ćelijama koje nose *pcnB* mutaciju nalazi u manjem broju kopija. (slični rezultati dobijeni su i u minimalnom medijumu kao i u LB medijumu suplementiranom cisteinom). Promenom uslova gajenja prekonocnih kultura sojeva koji nose fuziju *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* (u prisustvu cisteina, u minimalnom medijumu ili merenjem aktivnosti fuzije u stacionarnoj fazi) nisu dobijene razlike u odnosu na merenje u LB medijumu.

Aktivnost operonskih fuzija pokazuje da je ekspresija *hslJ* gena regulisana na transkripcionom nivou CysB proteinom. Kao i kod genskih fuzija (Lilic, 1998) nivo ekspresije je vrlo nizak čak i u odsustvu CysB represora (Tabela 6, soj  $\Delta cysB/hslJ_C-lacZ$ ).

Tabela 6. Ekspresija operonske *hslJ\_C-lacZ* fuzije na plazmidu sa smanjenim brojem kopija.

Soj	Relevantni genotip	$\beta$ -galaktozidazna aktivnost (MU) <sup>a</sup>	boja na XGal indikatorskoj podlozi
MC4100/pVGM8	<i>cysB<sup>+</sup>/hslJ_C-lacZ</i>	114±6	svetlo plavo
SY602/pVGM8	<i>cysB<sup>-</sup>/hslJ_C-lacZ</i>	140±8	plavo
EC2275/pVGM8	<i>cysB98/hslJ_C-lacZ</i>	121±8	plavo
EC2549/pVGM8	$\Delta cysB/hslJ_C-lacZ$	145±5	plavo
C600/pVGM8	<i>cysB<sup>+</sup>/hslJ_C-lacZ</i>	134±10	svetlo plavo
SY380/pVGM8	<i>cysB<sup>-</sup>/hslJ_C-lacZ</i>	157±9	plavo
SY508/pVGM5	<i>pcnB cysB<sup>+</sup>/hslJ_C-lacZ</i>	197±11	svetlo plavo
SY508/pRS415	<i>pcnB cysB<sup>+</sup>/pRS415</i>	31±4	belo
SY509/pVGM5	<i>pcnB cysB<sup>-</sup>/hslJ_C-lacZ</i>	250±23	plavo
SY509/pRS415	<i>pcnB cysB<sup>-</sup>/pRS415</i>	28±7	belo
SY510/pVGM5	<i>pcnB cysB98/hslJ_C-lacZ</i>	191±12	plavo
SY510/pRS415	<i>pcnB cysB98/pRS415</i>	30±4	belo

<sup>a</sup> Vrednosti date u Milerovim jedinicama predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja (sa standardnim devijacijama)

#### 4.5. *cysB* mutanti

U prethodnom radu spontani *cysB* mutanti izolovani su selekcijom na azaserinu SY380 (C600 *cysB*) i SY600 [(AB1157 *cysB*(Ts)] i selekcijom na novobiocinu SY602



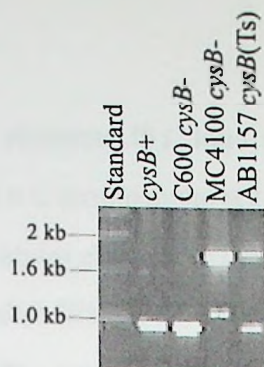
(MC4100 *cysB*) (Tabela 1). Ovi mutanti ne mogu da rastu u minimalnom medijumu bez cisteina i pokazuju povećanu rezistenciju na antibiotik novobiocin. Nije bilo poznato gde mutacije mapiraju niti o kakvom tipu mutacija se radi. Iz literature je poznato da je nemogućnost funkcionisanja CysB proteina kao pozitivnog ili negativnog regulatora rezultat mutacija koje utiču na domen za vezivanje za DNK, na domen osetljiv na inducer ili na domen odgovoran za interakciju sa RNKP. Kako za mutacije u sojevima SY380, SY602 i SY600 (Ts) nije poznato da li se radi o nultim mutacijama u *cysB* genu ili se produkt *cysB* mutiranog gena ipak sintetiše i pokazuje funkcionalnu aktivnost bilo je od interesa identifikovati i okarakterisati ove različite *cysB* mutacije. Na mogućnost prisustva delimično funkcionalnog CysB proteina u *cysB* mutantima ukazivali su i rezultati merenja  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti operonskih fuzija *hsIJ-lacZ* koji se nisu bitno razlikovali u *cysB*<sup>+</sup> i *cysB*<sup>-</sup> sojevima. Takođe i ćelijski ekstrakti MC4100 *cysB*<sup>-</sup> (SY602) mutanta, pokazali su vezivanje za regulatorni ("301") i strukturni ("135") region *hsIJ* gena (Rezultati 4.3.1., Slika 16B).

#### 4.5.1. Karakterizacija *cysB* mutacija

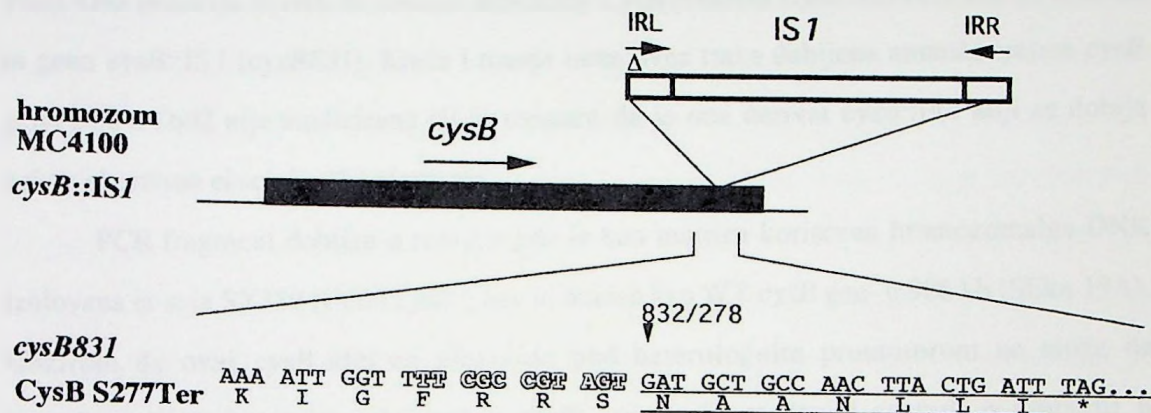
Hromozomalna DNK izolovana je iz *cysB*<sup>+</sup> soja i sojeva SY602 (MC4100*cysB*<sup>-</sup>), SY380 (C600 *cysB*<sup>-</sup>) i SY600 (AB1157  $\Delta$ *lac cysB*(Ts)). Korišćenjem CYSB-fw1 i CYSB-rev1 oligonukleotida hromozomalni fragmenti koji nose mutirane *cysB* gene su amplifikovani, klonirani u pQE70 vektor (videti Materijal i Metode 3.2.6. i 3.2.16.) i restrikciono analizirani.

PCR fragment *cysB* gena izolovan iz soja SY602 veći je je od WT *cysB* gena (koji je upotrebljen kao kontrola) za oko 0.75 kb što je ukazivalo da se radi o inserciji (Slika 19A). Primećuje se i slabija traka nešto veća od WT *cysB* gena. Kloniranjem i sekvenciranjem oba lanca ovog fragmenta (Materijal i Metode 3.2.11. i 3.2.12.) identifikovana je insercija

**A**

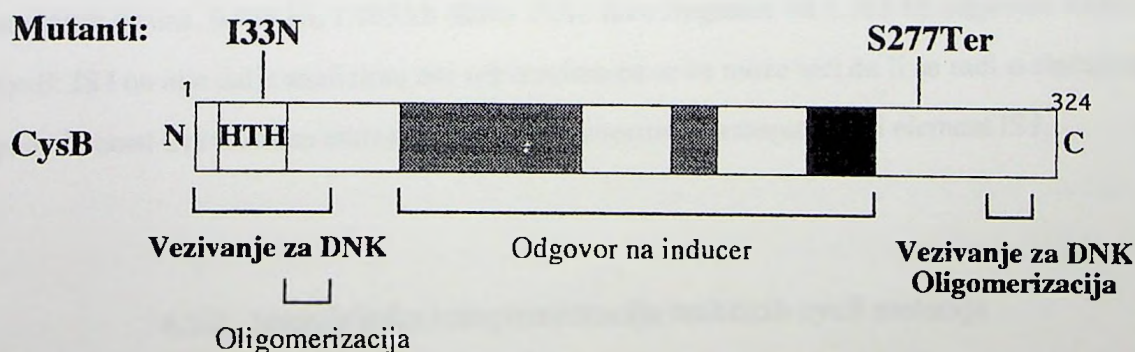


**B**



IRLΔGGT:\*\*\*gATG\*CTgCC... ; IRR: GGTaATGaCT\*CC...

**C**



Slika 19. Karakterizacija *cysB* mutacija. A slika elektroforeze na 0.8% agaroznom gelu sa *cysB* alelima dobijenim nakon PCR reakcija. B Shematski prikaz insercije IS1 elementa u *cysB* alel soja SY602. IRL- levi invertovani ponovak (5'); IRR- desni invertovani ponovak (3'); Δ - delecija GGT tripleta u IRL; nukleotidna sekvenca: strelica pokazuje mesto IS1 insercije; ošćenjeni nukleotidi predstavljaju 11 nt dupliciranih tokom insercije IS1; amino kiselinska sekvenca - podvučene su amino kiseline kodirane od strane IRL; zvezdica - novoformirani stop kodon. C Shematski prikaz funkcionalnih domena CysB proteina i pozicija mutacija I33N u "HTH" motivu i S277Ter.



transpozabilnog elementa *IS1*, koja se nalazi na 832-om nukleotidu (nakon 277 amino kiseline - serina) u C-terminalnom regionu CysB proteina (Slika 19B).

Transpozabilni element *IS1* je insercijom u 832 nt doveo do duplikacije susednih 11 nt *cysB* gena (videti Sliku 19B). Orijentacija *IS1* elementa u *cysB* genu je 5'-*cysB*'::IR<sub>L</sub>-IR<sub>R</sub>-3' (Slika 19B). IR<sub>L</sub>- invertovani ponovak *IS1* elementa ima deleciju prva 3 nt (GGT) (Slika 19B). Ova insercija dovodi do sinteze skraćenog CysB proteina CysB S277Ter koji je kodiran sa gena *cysB*::*IS1* (*cysB831*). Kraća i manje intenzivna traka dobijena umnožavanjem *cysB* gena soja SY602 nije analizirana ali je moguće da je ona derivat *cysB*::*IS1* koji se dobija nakon abortivne ekscizije *IS1* elementa.

PCR fragment dobijen u reakciji gde je kao matrica korišćena hromozomalna DNK izolovana iz soja SY380 (C600 *cysB*<sup>-</sup>) iste je dužine kao WT *cysB* gen- 0.986 kb (Slika 19A). Obzirom da ovaj *cysB* alel na plazmidu pod heterolognim promotorom ne može da komplementira cisteinsku auktotrofiju *cysB*<sup>-</sup> soja najverovatnije se radi o mutaciji u strukturnom a ne u regulatornom regionu *cysB* gena. Mutacija u ovom genu nije definisana sekvenciranjem.

Amplifikacijom *cysB* gena iz soja SY600 (*cysB*(Ts)) dobijena su dva fragmenta različitih dužina, 0.986 kb, 1.765 kb (Slika 19A). Iako fragment od 1.765 kb odgovara dužini *cysB*::*IS1* on nije dalje analiziran niti sekvenciran pa se ne može reći da li se radi o slučajnoj podudarnosti dva različita mutanta ili je i ovde insertovan transpozabilni element *IS1*.

#### 4.5.2. Interaleleska komplementacija različitih *cysB* mutacija

Obzirom da je poznato da je moguće rekonstituisati aktivan CysB protein komplementacijom *in trans* sintetisanih monomera koji nose mutacije u različitim funkcionalnim domenima CysB proteina (Colyer & Kredich, 1994; Lochowska *et al.*, 2001), *cysB* aleli (koji nose različite mutacije) iz sojeva, SY380 (*cysB*<sup>-</sup>), SY600 (*cysB*(Ts)),

EC2275 (*cysB98*) i EC2549 ( $\Delta$ *cysB*) su analizirani testom komplementacije. Svaki od sojeva transformisan je sa plazmidima koji nose ili WT *cysB* gen ili ostale *cysB*<sup>-</sup> alele. Moguća rekonstitucija funkcionalnog CysB proteina praćena je analizom rasta sojeva (koji zbog prisustva i ekspresije oba alela nose hibridni CysB oligomer) na minimalnoj podlozi bez cisteina i na podlozi sa različitim koncentracijama novobiocina (Tabela 7, Slika 20). Rast na minimalnoj podlozi govori o funkcionalnosti CysB proteina kao aktivatora cisteinskog regiona, dok rezisncija na novobiocin indirektno govori o funkcionalnosti CysB proteina kao regulatora, represora ekspresije *hsIJ* gena. WT *cysB* gen i mutirani *cysB* aleli klonirani su u plazmid pQE70 (Mat. i Met. 3.2.16.) i nalaze se pod jakim, inducibilnim heterologim promotorom T5 koji omogućava ekspresiju gena i u odsustvu IPTG molekula i sprečava autoregulaciju koja postoji u prisustvu homologog *cysB* promotora. Transformanti su selektirani kao Amp<sup>R</sup> kolonije, prečišćeni na istoj podlozi i gajeni u bogatom LB medijumu suplementiranom ampicilinom. Noćne kulture ovih sojeva kao i soja recipijenta (kontrola za test komplementacije) striklovani su na LB Petrijeve šolje suplementirane novobiocinom rastućih koncentracija (20  $\mu$ g/ml - 500  $\mu$ g/ml) i na minimalne šolje suplementirane cisteinom i bez cisteina.

Na osnovu dobijenih rezultata vidimo da u soju SY380 koji sadrži *cysB*<sup>-</sup> gen, komplementacija alelima *cysB::ISI*, *cysB98*, dovodi do smanjenja nivoa rezistencije na novobiocin (sa 400  $\mu$ g/ml na 200 odnosno 100  $\mu$ g/ml novobiocina) i mogućnosti rasta na minimalnoj podlozi bez cisteina, dok WT *cysB* gen vraća nivo rezistencije na nivo ishodnog soja C600 40  $\mu$ g/ml i takođe omogućava rast na minimalnoj podlozi bez cisteina (Tabela 7, Slika 20). Soj C600 (*cysB*<sup>+</sup>) transformisan plazmidima koji nose različite *cysB*<sup>-</sup> alele, ne menja nivo rezistencije na novobiocin i prototrof je za cistein što govori da nema dominantnog negativnog efekta mutiranih alela nad WT genom što je karakteristično i za sve ostale ispitane sojeve (rezultati nisu prikazani).



Tabela 7. Sposobnost različitih *cysB* alela na plazmidu da komplementiraju *in trans* mutaciju u hromozomalnom *cysB* genu sojeva SY380, SY600, EC2275 i EC2549.

Soj	Relevantni genotip	Nivo rezistencije na novobiocin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rast na minimalnoj podlozi bez cisteina <sup>a</sup>
C600	<i>cysB</i> <sup>+</sup>	40	+
SY380/pVGM11	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>cysB</i> ::IS1	200	+
SY380/pVGM2	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>cysB</i> 98	100	+
SY380/pVGM1	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>cysB</i> <sup>+</sup>	40	+
SY380	<i>cysB</i> <sup>-</sup>	400	-
SY600 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> <sup>+</sup>	100	+
SY600/pVGM11 <sup>c</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>cysB</i> ::IS1	400	-
SY600/pVGM2 <sup>c</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>cysB</i> 98	400	-
SY600/pVGM1 <sup>c</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>cysB</i> <sup>+</sup>	200	-?
SY600 <sup>c</sup>	<i>cysB</i> <sup>-</sup>	400	-
MC4100	<i>cysB</i> <sup>+</sup>	60	+
EC2275/pVGM11	<i>cysB</i> 98/ <i>cysB</i> ::IS1	200	-
EC2275/pVGM12	<i>cysB</i> 98/ <i>cysB</i> <sup>-</sup>	200	-
EC2275/pVGM1	<i>cysB</i> 98/ <i>cysB</i> <sup>+</sup>	60	+
EC2275	<i>cysB</i> 98	300	-
EC2549	$\Delta$ <i>cysB</i> / <i>cysB</i> ::IS1	280	-
EC2549	$\Delta$ <i>cysB</i> / <i>cysB</i> 98	280	-
EC2549	$\Delta$ <i>cysB</i> / <i>cysB</i> <sup>-</sup>	280	-
EC2549	$\Delta$ <i>cysB</i> / <i>cysB</i> <sup>+</sup>	60	+
EC2549	$\Delta$ <i>cysB</i>	300	-

<sup>a</sup> minimalni medijum je suplementiran treoninom i leucinom

<sup>b</sup> ćelije su inkubirane na 30°C

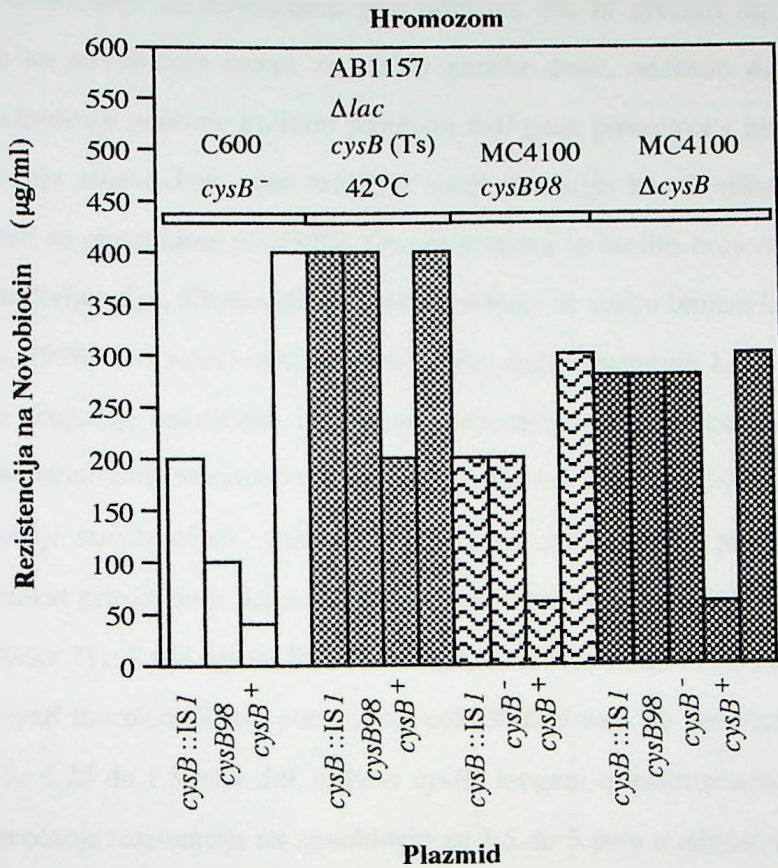
<sup>c</sup> ćelije su inkubirane na 42°C

Soj SY600 nosi *cysB*(Ts) gen. Na permisivnoj temperaturi (30°C) ovaj soj se ponaša kao *cysB*<sup>+</sup> a nivo rezistencije na novobiocin je 100 µg/ml, dok se na nepermisivnoj temperaturi (42°C) ponaša kao mutant za cistein i nivo rezistencije na novobiocin je povećan na 400 µg/ml. Ukoliko soj SY600 transformišemo bilo kojim od plazmida koji nose *cysB*<sup>-</sup> alele (*cysB98*, *cysB::IS1*, *cysB*<sup>-</sup> iz C600 mutanta) neće doći do promene nivoa rezistencije na novobiocin, on ostaje na nepermisivnoj temperaturi isti kao i kod recipijenta, 400 µg/ml i ponaša se kao auktotrof za cistein (Tabela 7, Slika 20). Soj SY600 transformisan plazmidom pVGM1 (*cysB*<sup>+</sup>) pokazuje smanjenu rezistenciju na novobiocin na nepermisivnoj temperaturi, 200 µg/ml što je još uvek viši nivo od nivoa rezistencije soja SY600 na 30°C, 100 µg/ml.

Soj EC2275 (*cysB98*) transformisan ili sa pVGM9 (*cysB::IS1*) ili sa pVGM10 (*cysB*<sup>-</sup> iz soja SY380) pokazuje smanjenje nivoa rezistencije na novobiocin, sa 300 na 200 µg/ml, i dalje je auktotrof za cistein, dok transformacija sa plazmidom pVGM1 koji nosi WT *cysB* gen dovodi do smanjenja rezistencije na nivo ishodnog soja MC4100, 60 µg/ml i omogućava rast na minimalnoj podlozi bez cisteina (Tabela 7, Slika 20).

*cysB* deletant, EC2549 (rezistentan na 300 µg/ml) koji je transformisan sa bilo kojim od *cysB*<sup>-</sup> alela pokazuje samo blago smanjenje rezistencije na novobiocin (sa 300 na 280 µg/ml) (Tabela 7, Slika 20). Na minimalnoj podlozi ovi transformanti mogu da rastu jedino u prisustvu cisteina. WT *cysB* gen vraća rezistenciju na novobiocin na nivo ishodnog soja (MC4100) 60 µg/ml i mogućnost rasta na minimalnoj podlozi bez cisteina.





Slika 20. Interaleska komplementacija različitih *cysB* mutacija. Na gornjem delu grafika dat je relevantan genotip recipijenta na hromozomu. Na donjem delu grafika prikazani su *cysB* aleli klonirani na plazmide. Interaleska komplementacija je praćena promenom nivoa rezistencije na novobiocin kod transformanata u odnosu na recipijente. Za detalje videti tekst.

#### 4.6. Efekat genske doze *hslJ* gena na rezistenciju bakterija na novobiocin

U ranijim istraživanjima pokazano je da povećan nivo rezistencije na antibiotik novobiocin kod *cysB* mutanata u odnosu na ishodni soj *cysB*<sup>+</sup> zavisi od prisustva WT *hslJ* gena, odnosno da inaktivacija *hslJ* gena kod *cysB* mutanata smanjuje rezistenciju na novobiocin na nivo soja *cysB*<sup>+</sup> (Lilic, 1998). Na koji način produkt *hslJ* gena doprinosi

povećanoj rezistenciji na novobiocin nije poznato. Da bi utvrdili da li je mehanizam rezistencije na novobiocin vezan za efekat genske doze, odnosno da li se srazmerno povećanoj ekspresiji odnosno količini produkta *hslJ* gena povećava i nivo rezistencije na novobiocin, niz sojeva koji nose različite *cysB* mutacije kao i njihovi *cysB*<sup>+</sup> izogeni transformisani su plazmidom pVH3002. Ovo je plazmid sa malim brojem kopija (6-8) koji nosi *hslJ* gen divljeg tipa. Kloniranje *hslJ* gena u vektore sa većim brojem kopija je letalno za ćeliju (Lilic, 1998). Svi sojevi inkubirani su preko noći u bogatom LB medijumu na 37°C ukoliko nije drugačije naznačeno. Analizom rezistencije na novobiocin na LA Petrijevim šoljama suplementiranim sa rastućim koncentracijama novobiocina (10-700 µg) je pokazano da na povećanje novobiocinske rezistencije direktno utiče količina produkta *hslJ* gena, tj. prisutan je efekat genske doze, kako u sojevima koji nose *cysB*<sup>+</sup> alel tako i u *cysB*<sup>-</sup> sojevima (Tabela 8 i Slika 21). Kada sojeve SY380, SY602, EC2275, EC2549 i SY600 (42°C) koji su mutanti za *cysB* transformišemo plazmidom pHV3002 dolazi do povećanja rezistencije na novobiocin za 1.25 do 1.5 puta dok njihovi *cysB*<sup>+</sup> izogeni transformisani istim plazmidom pokazuju povećanje rezistencije na novobiocin za 1.5 do 3 puta u odnosu na recipijentni soj (Tabela 8 i Slika 21). Međutim, nivo rezistencije *cysB*<sup>+</sup>/*hslJ* transformanata ne dostiže nivo rezistencije koji imaju isti sojevi sa mutiranim *cysB* genom, što može biti posledica prisustva CysB proteina, negativnog regulatora *hslJ* gena. Kao kontrole korišćeni su sojevi transformisani plazmidom pHV3004 koji nosi inaktivirani *hslJ* gen (*hslJ*::ΩKan). Ovi sojevi pokazuju isti nivo rezistencije na novobiocin kao i recipijenti (Tabela 8).

Na Slici 21 lako se uočava da najveću rezistenciju na novobiocin imaju *cysB* mutanti, derivati soja C600 (SY380) zatim *cysB*(Ts) mutanti na 42°C, derivati soja AB1157 (SY600), i konačno *cysB* mutanti derivati sojeva MC4100 (EC2275, EC2549 i SY602).

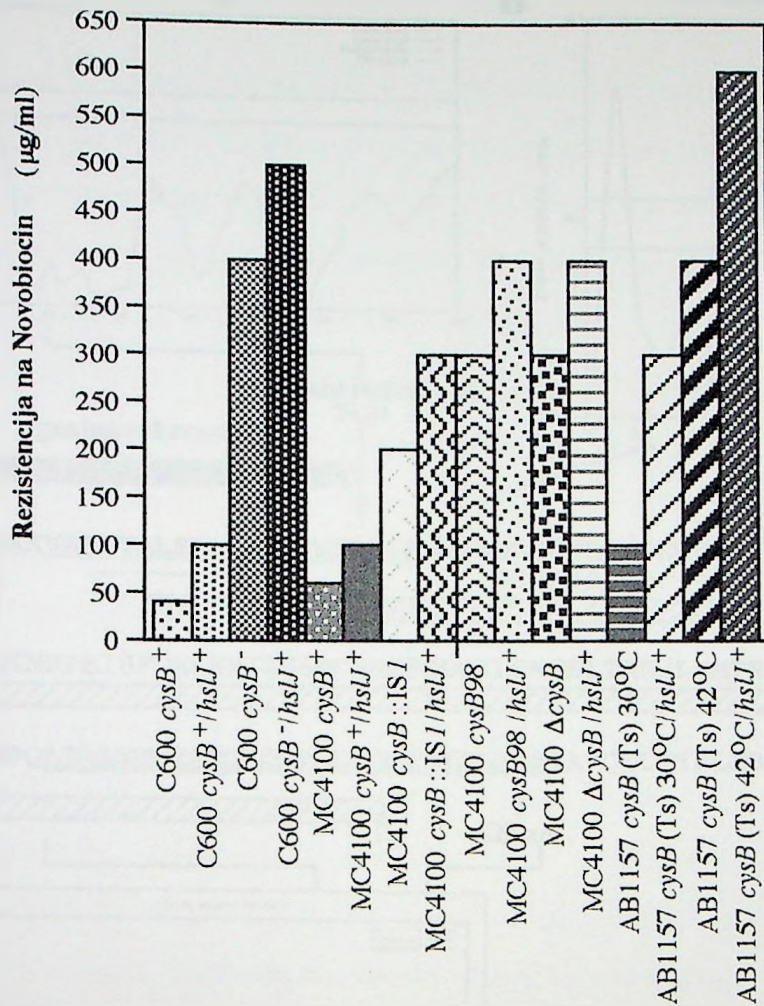


Tabela 8. Sposobnost *hslJ* gena na plazmidu da utiče na povećanje rezistencije na novobiocin u sojevima C600, SY380, MC4100, SY602, EC2275, EC2549 i SY600.

Soj	Relevantni genotip	Nivo rezistencije na novobiocin ( $\mu\text{g/ml}$ )
C600	<i>cysB</i> <sup>+</sup>	40
C600/pVH3002	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	100
C600/pVH3004	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	40
SY380	<i>cysB</i> <sup>-</sup>	400
SY380/pVH3002	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	500
SY380/pVH3004	<i>cysB</i> <sup>-</sup> / <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	400
MC4100	<i>cysB</i> <sup>+</sup>	60
MC4100/pVH3002	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	100
MC4100/pVH3004	<i>cysB</i> <sup>+</sup> / <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	60
SY602	<i>cysB</i> :: $\Delta$ S 1	200
SY602/pVH3002	<i>cysB</i> :: $\Delta$ S 1/ <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	300
SY602/pVH3004	<i>cysB</i> :: $\Delta$ S 1/ <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	200
EC2275	<i>cysB</i> 98	300
EC2275/pVH3002	<i>cysB</i> 98/ <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	400
EC2275/pVH3004	<i>cysB</i> 98/ <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	300
EC2549	$\Delta$ <i>cysB</i>	300
EC2549/pVH3002	$\Delta$ <i>cysB</i> / <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	400
EC2549/pVH3004	$\Delta$ <i>cysB</i> / <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	300
SY600 <sup>a</sup>	<i>cysB</i> (Ts)	100
SY600 /pVH3002 <sup>a</sup>	<i>cysB</i> (Ts)/ <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	300
SY600 /pVH3004 <sup>a</sup>	<i>cysB</i> (Ts)/ <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	100
SY600 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> (Ts)	400
SY600 /pVH3002 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> (Ts)/ <i>hslJ</i> <sup>+</sup>	600
SY600 /pVH3004 <sup>b</sup>	<i>cysB</i> (Ts)/ <i>hslJ</i> :: $\Omega$ Kan	400

<sup>a</sup> ćelije su inkubirane na 30°C

<sup>b</sup> ćelije su inkubirane na 42°C

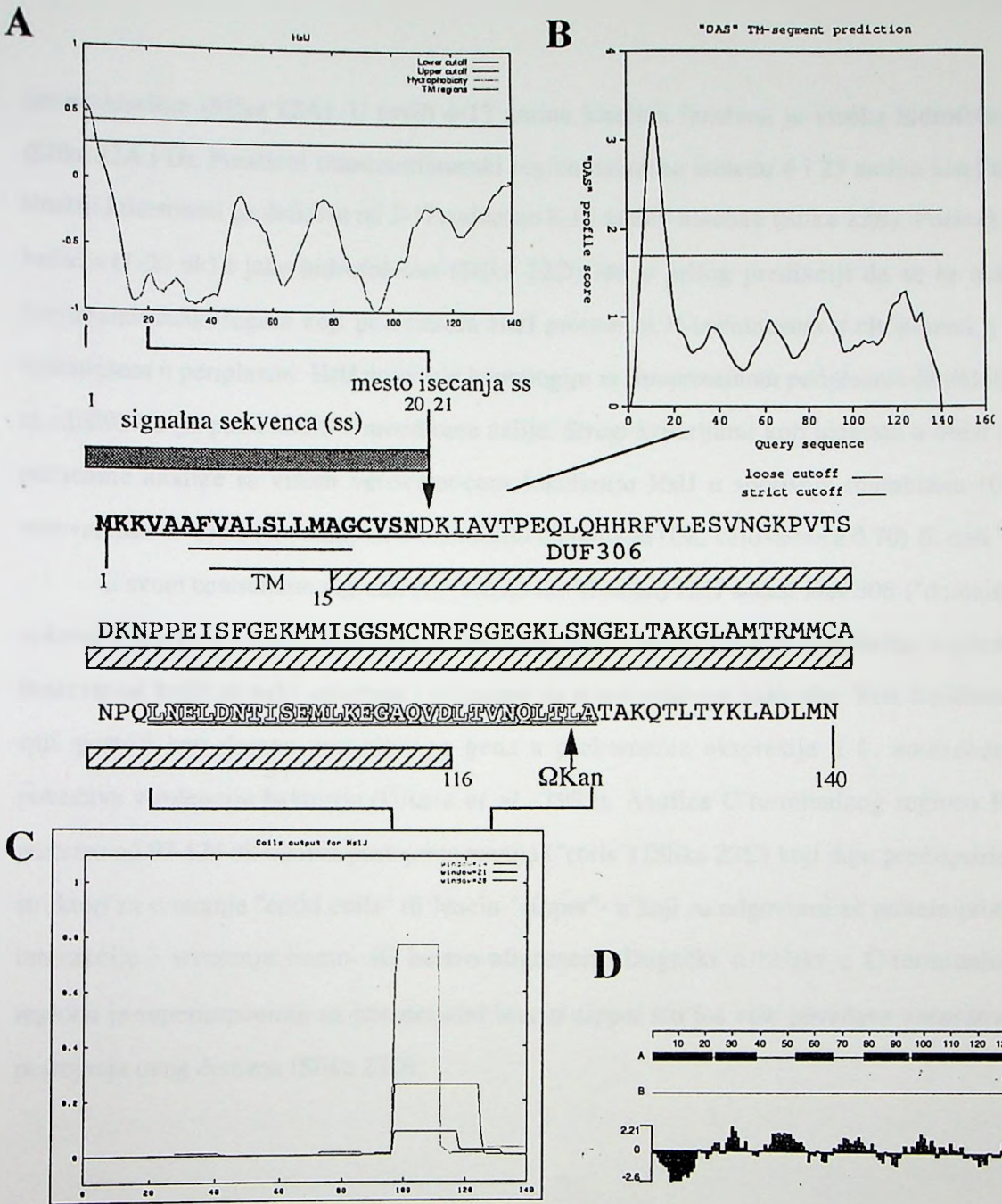


Slika 21. Rezistencija na novobiocin zavisi od genske doze *hsIJ* gena koji se eksprimira u različitim *cysB* mutantima (videti tekst).

#### 4.7. Kompjuterska analiza HsIJ proteina

*hsIJ* gen kodira HsIJ protein od 140 amino kiselina, molekulske težine 15 kDa sa izoelektričnom tačkom pI=7.15. Analiza amino kiselinske sekvence proteina (videti Materijal i Metode 3.2.27. i Prilog 2) pokazala je da se od 1-20 amino kiseline nalazi signalana sekvenca za translokaciju proteina a mesto na kom se iseca ova sekvenca je između 20 i 21





Slika 22. Putativni domeni i sekvence HslJ proteina A Profil amino kiseline sekvence i predikcija postojanja hidrofobnog regiona i signalne sekvence (zadebljana slova). B profil amino kiseline sekvence i predikcija postojanja transmembranskog regiona u tri okvira verovatnoće (podvučene amino kiseline na sekvenci - TM). C Predikcija postojanja navoja (coils) i leucin zipper-a u tri okvira verovatnoće (osencene amino kiseline). D Predikcija postojanja  $\alpha$ -heliksa (A) i  $\beta$ -ploča (B) poređena sa plotom za hidrofilitnost HslJ proteina. DUF (306) - domen nepoznate funkcije (domain of unknown function) 15 - 116 amino kiselina- šrafirani boks;  $\Omega$ Kan - Kanamicinska kasetna; strelica obeležava mesto insercije kanamicinske kasete u *hslJ* genu.

amino kiseline (Slika 22A). U prvih 4-17 amino kiselina izražena je visoka hidrofobnost (Slika 22A i D). Putativni transmembranski region nalazi se između 4 i 25 amino kiselina a strožiji kriterijumi ga definišu od 7-17, odnosno 8-15 amino kiselina (Slika 22B). Pozicija  $\alpha$ -heliksa (1-20 ak) i jaka hidrofobnost (Slika 22D) idu u prilog predikciji da se tu nalazi transmembranski region koji pozicionira HslJ protein sa N-terminusom u citoplazmi a C-terminusom u periplazmi. HslJ pokazuje homologiju sa lipoproteinom periplazme (Parkhill & al., 2000) što ga pozicionira u membranu ćelije. Strogi kriterijumi koji uzimaju u obzir sve pomenute analize sa višom verovatnoćom lokalizuju HslJ u spoljnjju membranu (OM, verovatnoća 0.79) i nešto manjom u unutrašnju membranu (IM, verovatnoća 0.70) *E. coli*.

U svom centralnom regionu (15-116 amino kiselina) HslJ sadži Duf 306 ("domain of unknown function") (Slika 22). Ovo je mala familija domena nađena u proteina nepoznate funkcije od kojih se neki sekretuju i uključeni su u pokretljivost bakterije. Kod *Leishmania spp.* postoji kao domen esencijalnog gena a prekomerna ekspresija u *L. amazonensis* povećava virulenciju bakterije (Uliana *et al.*, 1999). Analiza C-terminalnog regiona HslJ proteina od 97-124 ak otkriva postojanje navoja ("coils") (Slika 22C) koji daju predispoziciju strukturi za stvaranje "coiled coils" ili leucin "zipper"- a koji su odgovorni za protein-protein interakcije i stvaranje homo- ili hetero-oligomera. Dugački  $\alpha$ -heliks u C-terminalnom regionu je superimponiran na potencijalni leucin-zipper što još više povećava verovatnoću postojanja ovog domena (Slika 22D).

#### 4.8. Aktivacija *pspA-lacZ* fuzije pomoću *hslJ:: $\Omega$ Kan* mutacije

*psp* ("phage-shock-protein") - operon aktivira se kao odgovor na različite spoljašnje i unutrašnje promene koje kao posledicu daju ili su i sami posledica narušavanja integriteta najčešće spoljašnje membrane. Stimulusi koji indukuju *psp* operon su na primer visoka temperatura (50°C), tretman 10% etanolom, hiper-osmotski šok, tretman slobodnim masnim



kiselinama, tretman jonoforama (na pr. CCCP) i dr (Model *et al.*, 1997). Transkripciju operona takode specifično indukuje infekcija filamentoznim fazima (f1, M13), ili preciznije gen IV filamentoznih faga koji kao 14-omer formira kanale u spoljašnjoj membrani kroz koje zreli fazi izlaze van ćelije (Model *et al.*, 1997). Indukcija je moguća i samim prekomernim produkovanjem pIV proteina (bez infekcije) kao i prekomernom ekspresijom nekih porina defektnih u nekom aspektu integracije kao trimera u spoljnu membranu. Dakle, indukcija *psp* operona bi mogla poslužiti za detekciju stvaranja većih pora ili nepravilno ugradivanje proteina u spoljašnju membranu.

Obzirom da kompjuterska analiza daje sa najvećom verovatnoćom predikciju lokalizacije HslJ proteina u spoljašnju membranu, i da se insercija kanamicinske kasete ( $\Omega$ Kan) koja funkcionalno inaktivira HslJ protein i dovodi do pada rezistencije na novobiocin nalazi upravo unutar potencijalnog "coiled-coil" ili "leucine-zipper" domena (Slika 22D) (Lilic, 1998) koji bi mogao biti odgovoran za stvaranje HslJ oligomera, provereno je da li HslJ i/ili njegov mutant mogu indukovati *psp* operon. U tom smislu, soj MC4100 $\lambda$ psp3 koji nosi operonsku *pspA-lacZ* fuziju (Dworkin *et al.*, 2000) transformisan je plazmidima pHV3002 (*hslJ*<sup>+</sup>) ili pHV3004 (*hslJ*: $\Omega$ Kan) (videti Uvod 1.4.3., Slika 10). Izmerena aktivnost *pspA-lacZ* fuzije pokazala je da se u soju koji nosi divlji tip *hslJ* gena na plazmidu ne indukuje *psp* operon i da fuzija pokazuje aktivnost od 86 MU što korespondira već pokazanoj bazalnoj aktivnosti fuzije (Dworkin *et al.*, 2000). U soju koji nosi *hslJ*: $\Omega$ Kan aktivnost *pspA-lacZ* fuzije se indukuje oko pet puta i pokazuje vrednost od 423 MU. Ovo je još jedan od rezultata koji ide u prilog pretpostavci da je HslJ protein najverovatnije lokalizovan i ostvaruje svoju funkciju u spoljašnjoj membrani ćelije.

## IV DISKUSIJA

CysB protein je prvobitno okarakterisan kao pozitivni regulator aktivnosti gena cisteinskog regulona i negativni regulator sopstvenog CysB gena (Kredich, 1996), međutim on je i zajednički regulator gena uključenih u asimilaciju sumpora, *cbl* (Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995), *tauABCD* i *ssuEADCB* (Bykowski *et al.*, 2002) a takođe reguliše ekspresiju *adiA*, *lysU* i još nekih gena uključenih u odgovor ćelije na promenu pH (Rowbury, 1997). U dosadašnjem radu pokazano je da *cysB* mutanti auksotrofi za cistein, imaju povećan nivo rezistencije na novobiocin. Upotrebom sistema za konstruisanje genskih fuzija -  $\lambda$ placMu faga, identifikovan je novi gen *hslJ* čija je ekspresija povećana u *cysB* mutantima odnosno, koji je negativno regulisan CysB proteinom. Pokazano je da nivo rezistencije na novobiocin kod *cysB* mutanata zavisi od prisustva intaktnog, WT *hslJ* gena (Lilic, 1998). Detaljnija analiza kontrole ekspresije *hslJ* gena CysB proteinom nije bila izučena niti su u literaturi postojali podaci o mogućoj ulozi *hslJ* gena odnosno funkciji njegovog proizvoda HslJ proteina u ćeliji.

Konstrukcija i merenje aktivnosti operonskih fuzija *hslJ-lacZ* koje sadrže različite fragmente regiona uzvodno od *hslJ* gena omogućilo je determinisanje minimalnog promotorskog regiona ovog gena kao i detaljnije izučavanje regulacije ekspresije *hslJ* gena na transkripcionom nivou. U prethodnom radu determinisan je start transkripcije 82 nt uzvodno od start kodona ATG *hslJ* gena i putativni  $\sigma^{70}$  promotor (Lilic, 1998). Rezultati ove studije su pokazali da aktivnost operonske fuzije *hslJ-lacZ* koja ne sadrži već određeni potencijalni promotor i koja obuhvata 93 bp (region C) uzvodno od starta translacije *hslJ* gena ukazala je na mogućnost postojanja promotora lociranog bliže ATG kodonu u odnosu na prethodno definisani promotor. Određivanjem starta transkripcije pokazano je da se novo definisani start transkripcije (A nukleotid) nalazi lociran 36 bp uzvodno od ATG kodona (46 nukleotida nizvodno od prethodno definisanog). Analiza uzvodne DNK sekvence i određivanje



homologije sa drugim promotorima pokazala je da putativni promotor *hslJ* gena pripada grupi promotora koje prepoznaje  $\sigma^{70}$  subjedinicu. Nizak stepen homologije elemenata ovog promotora "-10" (TCTATT) i "-35" (TAATCC) sa konsenzus sekvencom  $\sigma^{70}$  promotora govori da se radi o slabom promotoru i niskoj ekspresiji *hslJ* gena. Promena nukleotida na drugoj poziciji u "-10" regionu koji predstavlja uži konsenzus "-10" elementa (umesto TANNNT promotor *hslJ* gena sadrži (TCNNNT) verovatno najviše doprinosi slaboj efikasnosti ovog promotora. Ovaj rezultat je međutim u dobroj korelaciji sa jako slabom ekspresijom *hslJ-lacZ* fuzije oslobođene represije CysB proteina u  $\Delta$ *cysB* soju.

U promotorskom regionu *hslJ* gena nalazi se sekvenca veoma slična konsenzus sekvenci "-10" elementa promotora za koju se vezuje  $\sigma^S$  faktor, što bi značilo da *hslJ* gen može biti pod kontrolom  $\sigma^S$ -RNKP holoenzima. Analize aktivnosti *hslJ-lacZ* fuzija u  $\sigma^S$  mutantu bilo u logaritamskoj bilo u stacionarnoj fazi (rezultati nisu prikazani) pokazale su da se ekspresija *hslJ* gena ne menja u zavisnosti od prisustva ili odsustva  $\sigma^S$  faktora, odnosno da *hslJ* gen nije pod njegovom kontrolom. Takođe, *hslJ-lacZ* fuzije koje nose region C, regulisane su negativno CysB proteinom.

Analiza sekvence promotorskog i regulatornog regiona *hslJ* gena nije pokazala sličnost sa nekom do sada određenom sekvencom za koju se vezuje CysB protein. Potencijalno mesto vezivanja CysB proteina u *hslJ* lokusu predstavlja par nesavršenih invertovanih ponovaka veličine 7 bp (Slika 12) koji se nalaze u regionu -10 do +5. Iako su ova mesta vezivanja mnogo manja od do sada utvrđenih mesta vezivanja CysB (19 bp dugačka) njihova lokacija u okviru minimalnog promotorskog regiona, prisustvo AT bogatih sekvenci kao i razmak između invertovanih ponovaka od jednog nukleotida može da predstavlja mesto vezivanja CysB represora. Generalno, u promotorskom regionu se najčešće vezuju represori koji mehanički sprečavaju vezivanje RNKP holoenzima a time i inicijaciju transkripcije. Interakcije CysB proteina sa do sada ispitanim promotorskim regionima veoma su kompleksne. DNK regioni identifikovani kao "CysB-vezujuća mesta" pokazuju slabu sekvencnu homologiju. Globalno oni dele konfiguraciju nesavršene dijadne simetrije između

19 bp dugih polu-mesta, ali broj, razmak i aranžman polu-mesta varira od promotora do promotora. Možda najveću sličnost CysB pokazuje sa AraC regulatorom (koji je funkcionalno aktivan kao dimer) koji takode prepoznaje polu-mesta od 17 bp sa razmakom od 4 bp, a može da se veže i za polu-mesta aranžirana bilo kao direktni ili kao invertovani ponovci (Lochowska *et al.*, 2001). CysB se kao represor vezuje u promotorskom regionu *cysB* gena od -10 do +40 bp u odnosu na start transkripcije (Ostrowski & Kredich, 1991). Mada su mesta vezivanja CysB proteina kod gena cisteinskog regulona definisana, u slučaju *cbl* gena (Iwanicka-Nowicka & Hryniewicz, 1995) i gena taurinskog operona (VAN DER Ploeg *et al.*, 1997) sekvence za koje se vezuje CysB ne odgovaraju prethodno definisanim konsenzus sekvencama. Nepostojanje prave konsenzus sekvence za vezivanje CysB proteina može biti konsekvencija neobične strukture CysB dimera i opzito postavljenih "HTH" motiva, odnosno tetramera koja se značajno razlikuje od poznatih struktura DNK-vezujućih proteina, kao i različit efekat inducera (NAS) na vezivanje proteina za DNK. Takode sve ukazuje i na mogućnost indirektnog uticaja CysB preko nekog drugog proteina regulisanog sa CysB. Iz literature je poznato da na nekim promotorima (*tau* i *ssu*) CysB deluje u kooperaciji sa drugim LysR aktivatorom npr. Cbl proteinom, koji pokazuje visoku homologiju sa CysB proteinom i koji je pozitivno regulisan sa CysB (VAN DER Ploeg *et al.*, 1997). Još uvek nije poznata molekularna osnova ove kooperacije. Tačno mesto vezivanja CysB proteina u promotorskom regionu *hslJ* gena moglo bi se utvrditi "foot printing" analizom, ali dosadašnji rezultati na drugim sistemima pokazuju jako tešku analizu mesta vezivanja CysB za DNK.

Negativan uticaj CysB na ekspresiju *hslJ* gena direktnim putem - vezivanjem za *hslJ* lokus, odnosno regulatorni region kao represora a ne indirektno, regulacijom preko nekog drugog proteina regulatora (kao što je slučaj sa Cbl proteinom koga CysB pozitivno reguliše) pokazano je u *in vitro* eksperimentima određivanja mobilnosti kompleksa protein-DNK. Purifikovan je CysB<sub>6His</sub> protein koji ima karakteristike WT CysB proteina; on pozitivno reguliše gene cisteinskog regulona *in vivo* i zadržava sposobnost oligomerizacije. U ovom radu je po prvi put pokazano da CysB protein ima potencijal da *in vitro* oligomeriše odmah



do struktura tetramera bez nekog vidljivog postojanja formi dimera koje su inače karakteristične za DNK-vezujuće proteine sa "HTH" motivom obzirom na poznatu neobičnu strukturu CysB dimera, tetramer je struktura izbora za efikasno vezivanje za DNK. Iako je iz literature poznato da CysB deluje kao tetramer ovde je pokazano da on osim monomera i tetramera može da formira i heksamere kao i oligomere višeg reda. Što nije karakteristika ostalih članova LysR familije. Takode, rekombinantni, prekomerno eksprimiran, visoko prečišćen CysB protein je moguće dobiti u rastvorenoj formi što često predstavlja ograničenje za izučavanje drugih proteina članova LysR familije (koji su nerastvorni ukoliko se prekomerno eksprimiraju).

Direktno vezivanje CysB proteina za *hslJ* lokus i specifičnost vezivanja pokazani su u reakcijama vezivanja prečišćenog CysB proteina za DNK fragmente koji nose uzvodni, regulatorni region *hslJ* gena različitih dužina: fragment koji obuhvata uzvodni i deo strukturnog regiona *hslJ* gena - proba "301"; ili fragment koji nosi samo strukturni deo *hslJ* - proba "135"; probe "150", "93" koje su identične fragmentima u *hslJ<sub>B</sub>-lacZ* i *hslJ<sub>C</sub>-lacZ* fuzijama, regionima B i C unutar kojih se nalazi definisani minimalni promotorski region. Rezultati su pokazali da se prečišćeni CysB protein vezuje specifično i efikasno za regulatorni region *hslJ* gena dok ima veoma slab afinitet vezivanja za fragment koji sadrži strukturni region *hslJ* gena.

Razlike u mobilnosti kompleksa dobijene interakcijom prečišćenog CysB proteina i proba "301", "150" i "93" govore da vezivanjem verovatno za isto mesto na ovim fragmentima (jer svi sadrže minimalni promotorski region) CysB dovodi do stvaranja kompleksa različitih struktura što se ogleda u različitoj mobilnosti u poliakrilamidnom gelu. Iz literature je poznato da CysB kod pozitivno regulisanih promotora u odsustvu NAS zauzima veliki region DNK molekula što rezultuje u krivljenju DNK za oko 100° i ne olakšava aktivaciju transkripcije datog promotora. Pretpostavlja se da NAS svojim vezivanjem indukuje konformacione promene u CysB koje čine kontakt proteina sa aktivatorskim mestima specifičnijim i smanjuju zakrivljenost na 50°, što dalje favorizuje

transkripciju. Razlika u mobilnosti potiče verovatno od različitog položaja mesta gde do zakrivljenja dolazi, tako da kod probe "150" do zakrivljenja dolazi negde pri kraju fragmenta a kod probe "93" zakrivljenje je locirano u centralnom delu fragmenta što kompleks protein-DNK čini sporijim.

Jedna od karakteristika CysB proteina koja je poznata iz literature (Kredich, 1996) a pokazana je i u ovom radu je njegoova sposobnost oligomerizacije. CysB protein u ćeliji deluje kao tetramer ali je pokazano analizom na nedenaturišućim poliakrilamidnim gelovima da CysB protein može formirati strukture od monomera preko tetramera, heksamera do viših oligomera (Slika 15). Potencijal za oligomerizaciju vidi se i u eksperimentima retardacije na gelu. Interakcijom CysB proteina sa bilo kojom od tri pomenute probe ("301", "150" i "93") dolazi do formiranja tri kompleksa različitih mobilnosti. Povećanjem koncentracije proteina lakši kompleksi nestaju i prelaze u teže. Ovo može biti posledica stvaranja oligomera koje CysB protein formira. Osim što povećanjem koncentracije proteina nestaju brži a stvaraju se sporiji kompleksi takode dolazi do stvaranja kompleksa koji ostaju na početku gela, ne mogu da uđu u gel, što verovatno predstavlja oligomere višeg reda (Slika 16). Sporiji kompleksi koji nastaju povećanjem koncentracije proteina mogu biti rezultat vezivanja CysB proteina za određeno mesto na gelu i oligomerizacije proteina u već formiranom kompleksu protein-DNK kao i dodatnog vezivanja CysB proteina za neke druge sekvence za koje CysB nema tako visok afinitet vezivanja. Poznato je iz ranijih analiza interakcije CysB sa *cysJ*, *cysK* i *cysP* kontrolnim regionima da se CysB vezuje za DNK kao tetramer formirajući komplekse koji se na gelu najbrže kreću sa mobilnošću 0.6 do 0.7 u odnosu na samu slobodnu probu koja je veličine 320 bp (VAN DER Ploeg et al., 1997). Najbrži kompleks dobijen interakcijom CysB proteina sa probom "301" pokazuje sličnu relativnu mobilnost što govori da se CysB u nižoj koncentraciji za probu "301" vezuje kao tetramer. Obzirom da sve tri probe sadrže minimalni promotorski region i par nesavršenih invertovanih ponovaka i da njihova lokacija odgovara prethodno opisanom mogućem mestu vezivanja CysB proteina ovo je još jedan dokaz koji ide u prilog tome da se CysB vezuje baš u ovom regionu.



Eksperimenti vezivanja CysB za *hslJ* lokus pokazuju da se on specifično vezuje za fragmente DNK koji nose minimalni promotorski region. Ovo bi značilo da je samim tim definisan i minimalni regulatorni region *hslJ* gena.

NAS predstavlja inducer za vezivanje CysB proteina za specifične sekvence ukoliko CysB deluje kao aktivator ekspresije gena, dok smanjuje efikasnost vezivanja CysB proteina za *cysB* promotorski region (Kredich, 1996). Analiza efikasnosti vezivanja CysB za *hslJ* lokus u prisustvu različitih koncentracija NAS pokazala je da NAS olakšava vezivanje CysB do koncentracije 5mM. Na većim koncentracijama (10 mM) NAS pokazuje negativan efekat na vezivanje. Ovako visoke koncentracije NAS nisu fiziološke. Nije poznata tačna koncentracija NAS u ćeliji ali se zna da on pokazuje svoj uticaj na vezivanje CysB za promotore cisteinskog regulona u konc. 0.1 do 5 mM. Spektroskopske analize pokazale su da se vezuje jedan molekul NAS za jednu subjedinicu proteina (Kredich, 1996). Obzirom da uloga *hslJ* gena nije poznata, osim što se zna da njegova inaktivacija dovodi do smanjenja nivoa rezistencije ćelije na antibiotik novobiocin ne može se reći precizno niti kakav je značaj pozitivnog delovanja NAS na vezivanje CysB proteina u *hslJ* lokusu. Iz literature je poznato da je u slučaju gena taurinskog operona vezivanje CysB kao aktivatora stimulirano ne samo acetil serinom već i tiosulfatom. Za tiosulfat je ranije pokazano da deluje kao potentni anti-inducer CysB u acetilserin zavisnoj inicijaciji transkripcije gena cisteinskog regulona. Moguće je da efekat tiosulfata dobijen kod gena taurinskog operona rezultuje usled "zaključavanja" CysB proteina u konformaciju koja favorizuje multiple kontakte sa velikim regionima DNK uključujući i zakrivljenje DNK, ali ne favorizuje vezivanje CysB za jedinstvena aktivirajuća CysB mesta (VAN DER Ploeg et al., 1997).

Prethodni eksperimenti pokazali su da vezivanje za *hslJ* lokus zavisi od prisustva CysB proteina u ćeliji. Vezivanje ćelijskog ekstrakta soja *cysB*<sup>+</sup> za probu "301" koja obuhvata regulatorni i strukturni deo *hslJ* gena ili za probu "135" koja sadrži samo strukturni deo *hslJ* gena rezultuje u stvaranju kompleksa različite mobilnosti. Manja mobilnost kompleksa dobijenih sa probom "135" u odnosu na one dobijene sa probom "301" govori o

mogućem mestu vezivanja proteina, odnosno za probu "135" protein se najverovatnije vezuje pri sredini fragmenta, dok u slučaju probe "301" mesto vezivanja se nalazi bliže nekom od krajeva DNK fragmenta, što dovodi do stvaranja protein-DNK kompleksa koji se brže kreću u poliakrilamidnom gelu. Iako kompleksi dobijeni sa ćelijskim ekstraktom generalno sporije putuju od kompleksa nastalih između prečišćenog CysB proteina i istih DNK proba razlike u mobilnosti kompleksa sa probom "301" i "135" karakteristične su i za komplekse dobijene sa prečišćenim CysB proteinom. Manji broj kompleksa dobijenih sa prečišćenim proteinom u odnosu na komplekse dobijene sa ćelijskim ekstraktom kao i to što kompleksi dobijeni sa ćelijskim ekstraktom sporije putuju na akrilamidnom gelu, govori da verovatno postoji još nešto pored CysB proteina što se vezuje za *hslJ* lokus. Dobro vezivanje ćelijskog ekstrakta za strukturni region govori da je za stvaranje tih kompleksa odgovorno vezivanje ili nekog drugog proteina ili CysB u kooperaciji sa drugim proteinom. Tome u prilog ide i činjenica da su kompleksi dobijeni i sa ćelijskim ekstraktom soja MC4100 *cysB*<sup>-</sup>. Međutim ovaj podatak ukazuje i na mogućnost postojanja defektnog CysB proteina ali još uvek sposobnog da se veže za *hslJ* lokus. Da li se radi o defektnom CysB proteinu ili nekom drugom regulatoru pokazalo bi poređenje kompleksa dobijenih sa ćelijskim ekstraktom soja koji nosi deletiran *cysB* gen i gde bi uticaj CysB proteina bio isključen.

U ovom radu izolovan je i prečišćen CysB I33N protein koji nosi mutaciju u HTH regionu odgovornom za vezivanje proteina. CysB I33N se ne vezuje za promotore cisteinskog regulona bilo kao aktivator ili represor. Analiza vezivanja CysB I33N za probu "301" pokazala je da se on veže za *hslJ* lokus iako ne sa istim intenzitetom kao WT CysB. Nepostojanje DNK konsenzus sekvence za vezivanje CysB proteina govori da je za interakciju odgovarajućih struktura CysB proteina ("HTH") i DNK možda potreban kompleksan signal koji uključuje i sekvencu i određenu strukturu DNK molekula.

Dosadašnji rezultati pokazali su da je "HTH" motiv (18-38 amino kiselina) CysB proteina neophodan za vezivanje ovog proteina za DNK. Većina N-terminalnih amino kiselina identifikovanih kod CysB proteina (važna za DNK vezivanje) visoko je konzervisana



među članovima LysR familije. Međutim, neke amino kiseline kod CysB proteina nisu konzervisane kod drugih LysR članova (Glu11 i Thr22) pa se smatra da su možda ove amino kiseline važne za specifičnost DNK-CysB interakcije (Lochowska et al., 2001). Takođe je i deo C-terminusa bitan za vezivanje CysB proteina za DNK jer uklanjanje 19-30 C-terminalnih amino kiselina rezultuje u gubitku represivnog potencijala CysB proteina *in vivo*. Međutim rezultati drugih studija (Lochowska et al., 2001) pokazali su da mutacije u "HTH" regionu ne moraju uticati na sposobnost proteina da se veže za određenu DNK sekvencu ali mogu imati efekta na neke druge funkcije proteina (na sposobnost oligomerizacije ili odgovora na inducer) (Lochowska et al., 2001).

Analiza aktivnosti fuzija na bromozomu ne pokazuje značajnu razliku u WT soju i *cysB* mutantu. Postojanje nesavršenih "-10" i "-35" elemenata u promotorskom regionu *hslJ* gena ukazuje da je ekspresija ovog gena vrlo niska. Kao što je već pomenuto rezultati aktivnosti fuzije *hslJ-lacZ* u  $\Delta$ *cysB* soju potvrđuju ovu tvrdnju. Vrlo niska aktivnost operonskih *hslJ-lacZ* fuzija u saglasnosti je sa prvobitnim rezultatima dobijenim analizom aktivnosti genske fuzije *hslJ::lacZ*, slične vrednosti aktivnosti ovih fuzija ukazuju da je ekspresija *hslJ* gena regulisana na transkripcionom nivou i da predstavlja najverovatnije jedini način kontrole. Međutim, analiza tri operonske fuzije koje nose regione različitih dužina (665, 150 i 93 bp) uzvodno od starta translacije pokazala je da nema razlike u aktivnosti između ove tri fuzije i da u regionu uzvodno od regiona C nema mesta za koje bi se vezivao aktivator. Najverovatnije je priroda produkta *hslJ* gena odgovorna za strogu regulisanost ekspresije samog gena. Na ovo ukazuju i podaci o nemogućnosti kloniranja *hslJ* gena na plazmid sa visokim brojem kopija (Lilic, 1998). Takođe, razlike u vrednostima merenja aktivnosti operonskih i genskih fuzija nisu velike ali postoje pa se ne može izbaciti mogućnost da je *hslJ* regulisan i na posttranskripcionom nivou, možda svojim produktom HslJ proteinom ili nekim drugim regulatorom.

Razlika u aktivnosti fuzija dobijena na osnovu intenziteta indikatorske boje X-Gal ili dobijene na MacConkey podlozi u odnosu na aktivnost dobijenu u  $\beta$ -galaktozidaznom eseju

može se objasniti činjenicom da u određenoj fazi rasta ćelije dolazi do ekspresije *cysB* gena koji pored cisteinskog regulona utiče na ekspresiju *hslJ* gena, dok u eseju, gajenjem kulture u tečnom medijumu nisu stvoreni uslovi u kojima dolazi do aktivacije *cysB* gena pa samim tim i dodatne represije *hslJ* gena (Anton, 2000). Iz dosadašnjih rezultata zna se da se cisteinski regulon indukuje blizu kraja eksponencijalne i u logaritamskoj fazi rasta. Sigma faktor aktivan u stacionarnoj fazi  $\sigma^S$  nije uključen u regulaciju gena cisteinskog operona. Indukcija cisteinskog regulona zavisi od uslova rasta tako da do indukcije dolazi kada kultura koja se gaji u LB medijumu dostigne optičku gustinu od 1.5 merenu na 650 nm (Anton, 2000). Do indukcije ne dolazi ukoliko nema dovoljno kiseonika ili na temperaturama nižim od 19°C. Dodavanjem cistina u manjim koncentracijama do indukcije dolazi kasnije a ukoliko se doda u većoj koncentraciji cisteinski regulon se ne indukuje (Anton, 2000).

Karakterizacija mutacija izolovanih *cysB* mutanata pokazala je da niti jedna od mutacija nije nulta mutacija za *cysB*, svaki od mutiranih gena kodira produkt koji je ili deletiran (*cysB831*) ili nosi tačkastu mutaciju kao što je *cysB98*, mutacija u *cysB*<sup>-</sup> genu soja SY380 nije definisana ali rezultati komplementacione analize govore da je produkt ovog mutiranog gena delimično aktivan obzirom da komplementacija sa drugim mutiranim *cysB* genima dovodi do ukidanja auktotrofije za cistein kao i sniženja rezistencije na novobiocin. Prema rezultatima tih komplementacija pretpostavlja se da se mutacija u ovom alelu nalazi u regionu odgovornom za interakciju sa inducerom NAS. Soj SY602 ima *cysB* alel koji nosi *IS1* sekvencu insertovanu iza 831 nukleotida *cysB* gena. Levi invertovani ponovak ima deletirana tri nukleotida na 5' kraju tako da je dalja ekscizija i transpozicija ovog transpozabilnog elementa dalje onemogućena. Poznato je da u okviru *E. coli* genoma postoji oko 5-6 *IS1* sekvenci i da su one razasute po hromozomu. Ovaj mutant dobijen je selekcijom na novobiocinu. Do sada nije poznato da li novobiocin na neki način indukuje insertovanje različitih insercionih sekvenci, kao hipoteza insercija *IS1* u *cysB* genu može se objasniti mogućim dejstvom novobiocina na superspiralizovanost hromozoma i možda na taj način indirektno transpozicijom *IS1* transpozona na druga mesta u hromozomu.



Na osnovu aktivnosti fuzije merene u SY602 soju kao i kompleksa dobijenih vezivanjem ćelijskog ekstrakta izolovanog iz soja SY602 može se reći da do vezivanja deletiranog CysB S277Ter proteina za *hslI* lokus ipak dolazi mada slabije u odnosu na WT protein. Iako je u slučaju *cysB* i *cysP* gena pokazano da se protein ne vezuje za DNK, u *hslI* lokusu i ovako deletirani protein može da se veže i spreči inicijaciju transkripcije i ekspresiju *hslI* gena. Ne postojanje sličnosti sa konsenzus sekvencom za vezivanje CysB proteina može se pretpostaviti da je u slučaju *hslI* gena specifičnost vezivanja determinisana ne sekvencom nego strukturnim karakteristikama kako molekula DNK tako i samog proteina i njegove interakcije sa NAS.

Na osnovu veličine dva PCR fragmenta dobijena umnožavanjem matrice izolovane iz Ts soja SY600 pretpostavlja se da i ovaj mutant u *cysB* genu ima insertovanu IS1 sekvencu ali da pored nje sadrži i WT gen. Sa druge strane ova mutacija ne može biti komplementirana niti jednim drugim mutiranim alelom što govori da se možda radi o potpuno različitoj mutaciji.

Ranija istraživanja su pokazala da CysB protein sadrži više funkcionalnih domena koji se u pojedinim regionima ovog proteina poklapaju. Postoje takode i neke sličnosti sa drugim članovima LysR familije proteina (OxyR, AmpR). CysB S277Ter nosi deleciju od 57 amino kiselina u svom C-terminalnom domenu. Ovaj domen važan je za oligomerizaciju ali i za vezivanje CysB proteina za DNK. Značaj C-terminusa za vezivanje pokazan je i kod drugih članova LysR familije kao što su OxyR, NahR i AmpR, za razliku od MetR i Nad regulatora koji i pored deletiranog C-terminusa mogu da se vežu za određenu DNK sekvencu (Lochowska et al., 2001).

Mutant SY380 *cysB* (izolovan selekcijom na azaserinu) koji nosi mutaciju koja nije okarakterisana i koja se nalazi u strukturnom delu *cysB* gena poslužio je kao recipijent u testu komplementacije. Mutirani aleli *cysB98* i *cysB::IS1* u kombinaciji sa njim dovode do ukidanja auktotrofije za cistein i u manjem ili većem stepenu smanjenja rezistencije na novobiocin, što govori da mutacija koju nosi *cysB* gen soja SY380 omogućava sintezu

mutiranog CysB proteina koji u interakcijama drugim CysB mutantima može ostvariti delimično ili potpuno funkcionalnu aktivnost WT proteina. Obzirom da ova mutacija može biti komplementirana DNK-vezujućim mutantom CysB I33N kao i proteinom koji nosi mutaciju u C-terminalnom regionu odgovornom za oligomerizaciju i DNK vezivanje proteina, može se pretpostaviti da se mutacija u *cysB*<sup>-</sup> alelu iz soja SY380 nalazi u centralnom regionu odgovornom za vezivanje inducera.

Analiza aktivnosti fuzije u multom *cysB* mutantu pokazala je da i u odsustvu CysB proteina ekspresija *hslJ* gena nije visoka i da osim CysB proteina postoji još neki vid negativne regulacije ili je za nisku ekspresiju dovoljno prisustvo neefikasnog promotora kakav je promotor *hslJ* gena. Prisustvo korepresora ide u prilog rezultatima dobijenim analizom aktivnosti operonskih fuzija kao i činjenici da je *hslJ* letalan za ćeliju u većoj koncentraciji, na ovaj način bi postojala dvostruka kontrola gena *hslJ* što je verovatno u skladu sa fiziološkim potrebama ćelije.

Do danas funkcija produkta *hslJ* gena nije poznata, jedino su rezultati tehnike opšteg transkripcionog mapiranja gena koji ogovaraju na toplotni šok pokazali da *hslJ* (*hslJ* -heat shock lokus) predstavlja jedan od gena čija se ekspresija povećava nakon izlaganja ćelije temperaturnom šoku (Blattner). Istraživanja aktivnosti genske fuzije *hslJ::lacZ* nakon izlaganja ćelija različitim temperaturama pokazala je da ovaj podatak nije tačan, odnosno da *hslJ* ekspresija nije temperaturno zavisna.

Podatak da *hslJ* gen ukoliko je prisutan na plazmidu sa manjim brojem kopija doprinosi povećanju rezistencije na novobiocin govori da najverovatnije količina produkta HslJ direktno doprinosi povećanju rezistencije na novobiocin. Nivo rezistencije različitih sojeva se razlikuje što je verovatno posledica njihovog različitog genotipa. Doprinos *hslJ* gena na plazmidu povećanju rezistencije veći je kod WT sojeva (i do tri puta) nego kod njihovih *cysB* mutanata (oko 0.5 puta) što se može objasniti činjenicom da je nivo produkta *hslJ* gena kod *cysB* mutanata dostigao zasićenje i da veća količina u ćeliji više ne može doprineti povećanju rezistencije. Čak i u prisustvu *hslJ* gena na plazmidu nivo rezistencije



WT sojeva ne dostiže nivo mutanta što se može objasniti prisustvom CysB proteina koji i dalje donekle reprimira ekspresiju *hslJ* gena na plazmidu.

Prisustvo *hslJ* na plazmidu sa većim brojem kopija nije vijabilno za ćeliju što ukazuje na njegovu moguću lokalizaciju u membrani ukoliko nije toksičan na neki drugi način. Pretraživanje baze podataka za proteine slične HslJ nisu dali nikakve rezultate. Jedini podatak vezan za homologiju sekvenci vezan je za DUF306 domen nepoznate funkcije koji se nalzi kod proteina nekih patogenih bakterija koji se transportuju van ćelije (Uliana *et al.*, 1999). Podaci kompjuterske analize pokazali su da je produkt *hslJ* gena membranski protein, tako da se može pretpostaviti da on lociran u membrani ćelije ima strukturnu ulogu u mehanizmu rezistencije na novobiocin. Ona može biti onemogućavanje ulaska ovog antibiotika u unutrašnjost ćelije ili HslJ može biti sastavni deo sistema koji deluje kao pumpa i izbacuje antibiotik u spoljašnju sredinu. Najnoviji rezultati govore da postoji dvo-komponentni regulatorni sistem BaeSR u kome je regulator BaeR odgovoran za aktiviranje pumpe koja izbacuje iz ćelije novobiocin i deoksiholat i time dovodi do povećanja rezistencije na novobiocin (Baranova & Nikaido, 2002). Ova pumpa pripada familiji "multidrug" transportera (Nishino & Yamaguchi, 2001). Rezultati kompjuterske analize su takode pokazali da se produkt *hslJ* gena nalazi najverovatnije u spoljašnjoj membrani a po nekim manje strogim kriterijumima da je svojim N-terminalnim regionom lokalizovan u unutrašnjoj membrani a da se C-terminus nalazi u periplazmi. Ovakav položaj HslJ proteina, ukoliko i sam nije senzor, bi omogućio interakciju sa nekim drugim proteinom-senzorom koji informiše ćeliju o promeni koncentracije novobiocina. Ukoliko je HslJ integralni protein unutrašnje membrane na šta po najstrožijim kriterijumima ukazuje postojanje jednog trans-membranskog domena u N-terminalnom regionu, njegova pozicija neophodna za funkcionisanje u mehanizmu rezistencije na novobiocin bi bila u saglasnosti sa rezultatima koji pokazuju da promena sastava unutrašnje membrane, specifično kardilipina dovodi do smanjenja rezistencije na novobiocin (Ivanisevic *et al.*, 1995). Takode, HslJ protein je svrstan u lipoproteine (Parkhill & al., 2000). Međutim, podatak koji ide u prilog pretpostavci da je

produkt *hslJ* gena membranski protein je i aktivacija *psp* operona. Ekspresija *psp* operona je indukovana mnogim stimulusima i agensima koji narušavaju integritet spoljašnje membrane bakterije (Model *et al.*, 1997). Takođe *psp* operon je specifično indukovano i pIV proteinom koji formira pore na spoljašnjoj membrani kroz koje izlaze filamentozni fazi (Kazmierczak *et al.*, 1994). Kod patogenih bakterija pIV homolozi koji su odgovorni za pravljenje kanala za eksport toksina takođe indukuju *psp* operon. Najzad nepravilna lokalizacija mnogih proteina koji se integrišu u spoljašnju membranu indukuje *psp* operon. Indukcija *psp* operona je ovde praćena merenjem *pspA-lacZ* fuzije koja odgovara na stimulse koji indukuju *psp* operon.. Ova fuzija se aktivira ukoliko se u ćeliju uvede povećan broj kopija *hslJ::ΩKan* alela. Indukcija prouzrokovana ovim alelom može biti posledica nepravilne lokalizacije HslJ mutiranog proteina u spoljašnju membranu ćelije. Sam WT *hslJ* ne aktivira *psp* operon. Ovo je u saglasnosti sa prethodnom pretpostavkom jer bi u tom slučaju produkt *hslJ* gena bio pravilno lokalizovan i ne bi ometao normalno funkcionisanje ćelije.

Kompjuterske analize HslJ proteina su predvidele postojanje navoja ("coils") u C-terminalnom regionu. Takva struktura obuhvata karakteristično rasporedene amino kiseline predstavljene slovima a-b-c-d-e-f-g, gde su a/d pozicije hidrofobne amino kiseline, koje daju sekundarnu strukturu  $\alpha$  heliksa. Takva primarna i sekundarna struktura je karakteristika "coiled-coil" proteina koji inače imaju prevashodno eukariotsko poreklo (Delahay & Frankel, 2002). Ovi proteini imaju potencijal da stvaraju homo- i hetero-oligomere preko ovakvih namotaja ("coiled-coils" interakcije). Većina ovakvih proteina kod prokariota su sastavni deo sekrecionog sistema tipa tri (Gauthier & Finlay, 2002). Ovakve proteine poseduju patogeni sojevi *E. coli*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* i dr. i oni su uključeni u organizaciju membranskih sistema neophodnih za translokaciju raznih faktora virulencije. Npr. SipC protein kod *Salmonelle* je sastavni deo Tip III sekrecionog sistema i modularni protein sa specifičnim N- i C-terminalnim domenima. C-terminalni domen sadrži "coiled-coil" segment koji je važan za trimerizaciju ovog proteina i integraciju u spoljašnju membranu bakterije. Tačkasta mutacija unutar ovog segmenta rezultira u defektnoj membranskoj lokalizaciji SipC



što može biti posledica odsustva interakcije i stvaranja homo-trimera ili hetero-oligomera. Obzirom da HslJ može biti "coiled-coil" protein i da njegova lokalizacija može biti u spoljašnjoj membrani, funkcija u ostvarivanju rezistencije bakterije na novobiocin vezana za HslJ protein bi mogla biti ostvarena i jednostavnim stvaranjem homo-oligomera i pora na spoljašnjoj membrani kroz koje bi mogao da se ostvari transport novobiocina u spoljašnju sredinu. Efekat genske doze, odnosno povećana količina HslJ proteina koja direktno utiče na povećanje rezistencije na novobiocin idu u prilog ovoj hipotezi.

Najzad, postoji kompjuterska predikcija koja sa visokom verovatnoćom predviđa pšostojanje signalne sekvence. Ovo bi lokalizovalo HslJ protein bilo u periplazmu bilo u spoljašnju membranu. Međutim, po svim postojećim kriterijumima uzetim u obzir HslJ bi morao biti membranski protein i ukoliko zaista poseduje aktivnu signalnu sekvencu našao bi se u spoljašnjoj membrani ćelije. Svi ovi rezultati i predikcije o lokalizaciji HslJ proteina su važni za određivanje funkcije HslJ proteina u mehanizmu rezistencije na novobiocin. Naravno ovaj fenotip je možda sekundaran dok bi prava uloga HslJ mogla biti vezana za neke druge procese koji se ostvaruju na membrani ćelije (translokacija, signalna transdukcija i sl.).

Prema tome, izuzetno je važno odrediti tačnu poziciju HslJ proteina u ćeliji, odnosno precizno utvrditi njegovu lokalizaciju. To se može učiniti eksperimentima sa PhoA fuzijama.

Konstrukcijom PhoA fuzija koje bi sadržale *hslJ* gen sa i bez signalne sekvence moglo bi se utvrditi da li je ova signal sekvencu aktivna odnosno da li se HslJ protein translocira kroz unutrašnju membranu i biva lokalizovan u periplazmi ili spoljašnjoj membrani ćelije. Ukoliko umesto signalne sekvence ima transmembranski domen koji je predikcijom lociran na isto mesto (Slika 22) on bi bio bio integralni protein unutrašnje membrane. Odgovor na pitanje da li HslJ protein izlazi iz citoplazme dobio bi se merenjem aktivnosti PhoA fuzije gore opisanih konstrukata. Ukoliko je PhoA fuzija aktivna precizna pozicija HslJ proteina bi mogla da se utvrdi frakcionacijom bakterijske ćelije koja nosi PhoA fuziju. Frakcionacijom ćelije bi se dobili odvojeni kompartmenti koji sadrže rastvorljive i ne rastvorljive frakcije. Rastvorljiva frakcija bi se dalje podelila na citoplazmatsku i periplazmatsku dok bi

nerastvorljiva bila podeljena na unutrašnju membranu, spoljašnju membranu i proteinske agregate. Merenjem aktivnosti PhoA fuzije u pojedinačnim kompartmentima bi se dobila tačna lokalizacija HslJ proteina. Preliminarna istraživanja koja obuhvataju konstruisanje PhoA fuzija i koja nisu prikazana u ovom radu i rezultat da je WT HslJ protein u većem broju kopija toksičan za ćeliju anticipiraju da budući eksperimenti određivanja lokalizacije HslJ proteina moraju biti radeni sa vektorima koji imaju nizak i strogo kontrolisan broj kopija kao i/ili sa skraćenim HslJ proteinom koji nije toksičan.



## ZAKLJUČCI

- 1) Ekspresija *hslJ* gena je pod kontrolom jednog putativnog  $\sigma^{70}$  promotora. Start transkripcije *hslJ* gena nalazi se 36 bp uzvodno od *hslJ* ATG start kodona. Minimalni promotorski i regulatorni region nalaze se u okviru 93 bp uzvodno od starta translacije (ATG).
- 2) Afinitetnom hromatografijom prečišćeni su fuzioni proteini CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> koji su rastvorljivi, stabilni i aktivni.
- 3) Prečišćeni CysB<sub>6His</sub> i CysB(I33N)<sub>6His</sub> mogu da oligomerišu i to od monomera preko strukture tetramera, heksamera do oligomera višeg reda.
- 4) Prečišćeni aktivni fuzioni protein CysB<sub>6His</sub> vezuje se efikasno za minimalni regulatorni region *hslJ* gena (-56 do +37 nt u odnosu na start transkripcije), dok pokazuje slab afinitet za strukturni region *hslJ* gena (od +36 do +171 nt u odnosu na start transkripcije).
- 5) NAS povećava afinitet vezivanja CysB proteina za regulatorni region *hslJ* gena i pozitivno utiče na sposobnost oligomerizacije.
- 6) Merenje aktivnosti različitih operonskih *hslJ-lacZ* fuzija u *cysB*<sup>+</sup> i *cysB*<sup>-</sup> sojevima i komparativna analiza vezivanja CysB regulatora za *hslJ* lokus pokazali su da CysB transkripcioni faktor ima ulogu represora *hslJ* transkripcije.
- 7) Karakterizacija *cysB* mutanata pokazala je da mutirani *cysB* gen u soju SY602 kodira defektan CysB protein sa delcijom od 76 amino kiselina u njegovom C-terminalnom regionu nastalom insercijom transpozabilnog elementa IS1; *cysB* mutirani gen u soju SY380 nosi mutaciju u strukturnom regionu gena koja može biti funkcionalno komplementirana mutiranim CysB proteinom iz sojeva SY602 i EC2275.

- 8) Definisana je uloga pojedinih funkcionalnih domena CysB, odnosno, DNK-vezujućeg motiva (HTH) i C-terminalnog domena u regulaciji ekspresije *hslJ*. Mutacija u HTH motivu (I33N) koja poništava vezivanje CysB I33N za regulatorne regione *cys* regulona i za sopstveni promotor ima znatno manji uticaj na vezivanje CysB za *hslJ* lokus. Mutacija *cysB::IS1* u 3' regionu gena, odnosno C-terminalnom regionu CysB proteina (S277Ter), najverovatnije onemogućava oligomerizaciju proteina i samim tim efikasno vezivanje za DNK.
- 9) Moguća je interalelska komplementacija analiziranih *cysB::IS1*, *cysB98* i *cysB<sup>-</sup>* mutanata i vraćanje funkcionalne aktivnosti takvih mutiranih heterooligomera.
- 10) Povećan nivo transkripcije *hslJ* gena u različitim *cysB* mutantima kao i efekat genske doze *hslJ* direktno povećava rezistenciju bakterije *E. coli* na antibiotik novobiocin. Represija *hslJ* transkripcije divljim tipom CysB proteina je dominantna i dovodi do pada rezistencije bakterije na novobiocin.
- 11) Prema podacima kompjuterske analize produkt *hslJ* gena je protein koji je najverovatnije lociran u membrani. Nešto je veća verovatnoća da je HslJ protein lokalizovan u spoljašnjoj membrani ćelije a nešto manja da se nalazi u unutrašnjoj membrani i to svojim N-terminalnim delom u citoplazmi a C-terminalnim delom u periplazmi.
- 12) Ekspresija operonske fuzije *pspA-lacZ* je indukovana u prisustvu povećane doze inaktiviranog *hslJ* gena, *hslJ::ΩKan* ali ne i WT *hslJ* gena što govori u prilog predikciji da je HslJ protein lociran u spoljašnjoj membrani ćelije.



## LITERATURA

- Aiba, H., Adhya, S. & de Crombrughe, B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 11905-11910.
- Aiba, H. e. a. (1996a). A 570-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 28.0-40.1 min region on the linkage map. *DNA research* **3**, 363-377.
- Aiba, H. e. a. (1996b). A 570-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 28.0-40.1 min region on the linkage map (Supplement). *DNA research* **3**, 435-440.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Anton, D. N. (2000). Induction of the cysteine regulon of *Salmonella typhimurium* in LB medium affects the response of *cysB* mutants to mecillinam. *Curr. Microbiol.* **40**, 72-77.
- Appleyard, R. K. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **39**, 440-452.
- Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, J. W. & Minchin, S. D. (1997). Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit is responsible for the recognition of the extended  $-10'$  motif at promoters. *EMBO J.* **16**, 4034-4040.
- Baranova, N. & Nikaido, H. (2002). The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J. Bacteriol.* **184**, 4168-4176.
- Baron, J. & Weisberg, R. A. (1992). Mutations of the phage lambda *nutL* region that prevent the action of Nun, a site-specific transcription termination factor. *J. Bacteriol.* **174**, 1983-1989.
- Bonnefoy, E. & Rouviere-Yaniv, J. (1992). HU, the major histone-like of *E. coli*, modulates the binding of IHF to *oriC*. *EMBO J.* **11**, 4489-4496.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **12**, 248-254.
- Browning, D., Cole, J. & Busby, S. (2000). Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly. *Mol. Microbiol.* **37**, 1258-1269.
- Bryan, J. K. (1977). Molecular weights of protein multimers from polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **78**, 513-519.
- Bullock, W. O., Fernandez, M. & Shotr, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.

- Busby, S. & Ebricht, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**, 743-746.
- Bykowski, T., VAN DER Ploeg, J. R., Iwanicka-Nowicka, R. & Hryniewicz, M. (2002). The switch from inorganic to organic sulphur assimilation in *Escherichia coli*: adenosine 5'-phosphosulphate (APS) as a signalling molecule for sulphate excess. *Mol. Microbiol.* **43**, 1347-1358.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes in the selected phenotypes in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J. & Vinella, D. (1996). *The stringent response. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (al., I. N. F. C. e., Ed.)<sup>^</sup>Eds.), 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Chamberlin, M. J. & Hsu, L. M. (1996). *RNA chain initiation and promoter escape by RNA polymerase. Regulation of gene expression in Escherichia coli* (Lin, E. C. C. & Lynch, A. S., Ed.) Eds., R. G. Landes Company and Chapman and Hall, Austin, Texas.
- Choy, H. & Adhya, S. (1996). *Negative control. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (al., I. N. F. C. e., Ed.)<sup>^</sup>Eds.), 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Colyer, T. E. & Kredich, N. M. (1994). Residue threonine-149 of the *Salmonella typhimurium* CysB transcription activator: mutations causing constitutive expression of positively regulated genes of the cysteine regulon. *Mol. Microbiol.* **13**, 797-805.
- Davis, R. W., Botstein, D. & Roth, J. R. (1980). *A manual for genetic engineering*. Advanced bacterial genetics, Cold Spring Harbor, New York.
- deHaseh, P. L., Zupancic, M. L. & Record, J. M. T. (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **180**, 3019-3025.
- Delahay, R. M. & Frankel, G. (2002). Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol. Microbiol.* **45**, 905-916.
- De Witt, S. K. & Adelberg, E. A. (1962). The occurrence of genetic transposition in a strain of *Escherichia coli*. *Genetics* **47**, 577-585.
- Dworkin, J., Jovanovic, G. & Model, P. (2000). The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of  $\sigma^{54}$ -dependent transcription. *J. Bacteriol.* **182**, 311-319.
- Erickson, J. W. & Gross, C. A. (1989). Identification of the  $\sigma^E$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase; a second alternate  $\sigma$  factor involved in high temperature gene expression. *Genes Dev.* **3**, 1462-1471.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S. T., Nguyen, L. H., Burgess, R. R. & Gourse, R. L. (2001). Promoter recognition and discrimination by  $E\sigma^S$  RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **42**, 939-954.



- Garnier, J., Osguthorpe, D. J. & Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.
- Gauthier, A. & Finlay, B. B. (2002). Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials. *ASM News* **68**, 383-387.
- Gerendasy, D. & Ito, J. (1990). Nucleotide sequence and transcription of the right early region of bacteriophage PRD1. *J. Bacteriol.* **172**, 1889-1898.
- Goosen, N. & van de Putte, P. (1995). The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol. Microbiol.* **16**, 1-7.
- Gralla, D. J. & Collado-Vides, J. (1996). *Organization and function of transcription regulatory elements. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (al., I. N. F. C. e., Ed.) Eds., 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Grana, D., Gardella, T. & Susskind, M. M. (1988). The effect of mutations in the *ant* promoter of phage P22 depend on context. *Genetics* **120**, 312-327.
- Hassani, M., Bennet, G. N. & Hirshfield, I. N. (1995). The effects of *cysB*, *himA* and *himD* mutations on the induction of *lysU* and other acid-inducible genes in *Escherichia coli*. *Abstracts of the American Society for Microbiology* **22**, 393-396.
- Hopwood, D. A., Bibb, J. M., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, M., Lydiate, J. D., Smith, C. P., Ward, J. M. & Schrepf, H. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces, a laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Hryniewicz, M. M. & Kredich, N. M. (1994). Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJIIH*, *cysK* and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 3673-3682.
- Hryniewicz, M. M. & Kredich, N. M. (1995). Hydroxyl radical footprints and half-site arrangements of binding sites for the CysB transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**, 2343-2353.
- Huo, L., Martin, J. & Schleif, R. (1988). Alternative DNA loops regulate the arabinose operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5444-5448.
- Ishihama, A. (1992). Role of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit in transcription activation. *Mol. Microbiol.* **6**, 3283-3288.
- Ishihama, A. (1993). Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J. Bacteriol.* **175**, 2483-2489.
- Ivanisevic, R., Milic, M., Ajdic, D., Rakonjac, J. & Savic, D. J. (1995). Nucleotide sequence, mutational analysis, transcriptional start site, and product analysis of *nov*, the gene which affects *Escherichia coli* K 12 resistance to the gyrase inhibitor novobiocin. *J. Bacteriol.* **177**, 1766-1771.
- Iwanicka-Nowicka, R. & Hryniewicz, M. M. (1995). A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli cys* regulon. *Gene* **166**, 11-17.

- Jagura-Burdzy, G. & Hulanicka, D. (1981). Use of gene fusions to study expression of *cysB*, the regulatory gene of the cysteine regulon. *J. Bacteriol.* **147**, 744-751.
- Jovanovic, M., Lilic, M., Janjusevic, R., Jovanovic, G. & Savic, D. J. (1999). tRNA synthetase mutants of *Escherichia coli* K12 are resistant to the gyrase inhibitor novobiocin. *J. Bacteriol.* **181**, 2979-2983.
- Kazmierczak, B. I., Mielke, D. L., Russel, M. & Model, P. (1994). pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer. *J. Mol. Biol.* **238**, 187-198.
- Keskin, O., Jernigan, R. L. & Bahar, I. (2000). Proteins with similar architecture exhibit similar large-scale dynamic behavior. *Biophysical Journal* **78**, 2093-2106.
- Koen, H. G. V., Tyrrell, R., Dodson, E. J., Murshudov, N., Addy, C. & Wilkinson, A. J. (1998). An unexpected symmetry in the LysR-type transcriptional activator, CysB. *Gen. Physiol. Biophys.* **17**, 43-46.
- Kraft, R., Tardiff, J., Krauter, K. S. & Leinwand, L. A. (1988). Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with sequenase<sup>TM</sup>. *Bio Techniques* **6**, 544-546.
- Kredich, N. M. (1996). *Biosynthesis of cysteine. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (al., I. N. F. C. e., Ed.)<sup>Eds.</sup>, 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Kuznedelov, K., Minakhin, L., Niedziela-Majka, A., Dove, L. S., Rogulja, D., Nickeles, E. B., Hochschild, A., Heyduk, T. & Severinov, K. (2002). A role for interaction of the RNA polymerase flap domain with the  $\sigma$  subunit in promoter recognition. *Science* **295**, 855-857.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-690.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor  $\sigma^S$  (*rpoS*). *J. Bacteriol.* **173**, 4474-4481.
- Lilic, M. M. (1998). Regulacija ekspresije novog gena odgovornog za rezistenciju bakterije *Escherichia coli* K12 na antibiotik novobiocin. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D. & Hryniewicz, M. M. (2001). Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. *J. Biol. Chem.* **276**, 2098-2107.
- Lonetto, M., Gribskov, M. & Gross, A. C. (1992). The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**, 3843-3849.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 154-158.



- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, J. H. (1992). In *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 72-74. .
- Model, P., Jovanovic, G. & Dworkin, J. (1997). The *Escherichia coli* phage shock protein (*psp*) operon. *Mol. Microbiol.* **24**, 255-261.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O. & Darst, S. A. (2002b). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **295**, 1285-1290.
- Murakami, K. S., Masuda, S. & Darst, S. A. (2002a). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**, 1280-1284.
- Neidhardt, F. C. & Savageau, M. A. (1996). *Regulation beyond the operon. Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (al., I. N. F. C. e., Ed.)^Eds.), 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
- Ninfa, A. J. (1996). *Regulation of gene transcription by extracellular stimuli. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* (al., I. N. F. C. e., Ed.)^Eds.), 1, American Society for Microbiology Press,, Washington, D.C.
- Nishino, K. & Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 5803-5812.
- O'Brien, K., Deno, G., Otrovský de Spicer, P., Gardner, J. F. & R., M. S. (1992). Integration host factor facilitates repression of the put operon in *Salmonella typhimurium*. *Gene* **118**, 13-19.
- Ostrowski, J., Jagura-Burdzy, G. & Kredich, N. M. (1987). DNA sequences of the *cysB* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 5999-6005.
- Ostrowski, J. & Kredich, N. M. (1991). Negative autoregulation of *cysB* in *Salmonella typhimurium*: in vitro interactions of CysB protein with the *cysB* promoter. *J. Bacteriol.* **173**, 2212-2218.
- Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Parkhill, J. & al., e. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**, 665-668.
- Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1997). Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 593-628.
- Perez-Rueda, E. & Collado-Vides, J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1838-1847.

- Prentki, P., Chandler, M. & Galas, D. J. (1987). *Escherichia coli* integration host factor bends the DNA at the ends of IS1 and in an insertion hotspot with multiple IHF binding sites. *EMBO* **6**, 2479-2487.
- Rakonjac, J., Milic, M. & Savic, D. J. (1991). *cysB* and *cysE* mutants of *Escherichia coli* K12 show increased resistance to novobiocin. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 307-311.
- Rakonjac, J., Milic, M., Ajdic-Predic, D., Santos, D., Ivanisevic, R. & Savic, D. J. (1992). *nov*, a new genetic locus that affects the response of *Escherichia coli* K-12 to novobiocin. *Mol. Microbiol.* **6**, 1219-1229.
- Record, M. T. J., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. & Schlax, P. J. (1996). *Escherichia coli* RNA polymerase ( $\sigma^{70}$ ), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology (ed. I. N. F. C. e., Ed.)<sup>^</sup>Eds.), 1., American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Reitzer, L. & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of  $\sigma^{54}$ -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 422-444.
- Rice, P. A., Yang, S., Mizuuchi, K. & Nash, H. A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**, 1295-1306.
- Richet, E., Vidal-Ingigliardi, V. & Raibaud, O. (1991). A new mechanism for coactivation of transcription: repositioning of an activator triggered by the binding of a second activator. *Cell* **66**, 1185-1195.
- Ross, W., Ernst, A. & Gourse, R. L. (2001). Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions:  $\alpha$  subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.* **15**, 491-506.
- Rowbury, R. J. (1997). Regulatory components, including integration host factor, CysB and H-NS, that influence pH responses in *Escherichia coli*. *Lett. App. Microbiol.* **24**, 319-328.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR Family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 597-626.
- Scott, S., Busby, S. & Beacham, I. (1995). Transcriptional co-activation at the *ansB* promoters: involvement of the activating regions of CRP and FNR when bound in tandem. *Mol. Microbiol.* **18**, 521-531.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. & Enquist, L. W. (1984). *Experiments with gene fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.



- Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.
- Tyrrell, R., Verschueren, H. K., Dodson, E. J., Murshudov, G. N., Addy, C. & Wilkinson, A. J. (1997). The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure* **5**, 1017-1032.
- Uliana, S. R., Goyal, N., Freymuller, E. & Smith, D. F. (1999). Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp. Parasitol.* **92**, 183-191.
- VAN DER Ploeg, J. R., Iwanicka-Nowicka, R., Kertesz, M. A., Leisinger, T. & Hryniewicz, M. M. (1997). Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the *tauABCD* operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 7671-7678.
- VAN DER Ploeg, J. R., Iwanicka-Nowicka, R., Bykowski, T., Hryniewicz, M. M. & Leisinger, T. (1999). The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *J. Biol. Chem.* **274**, 29358-29365.
- Wade, J. T., Belyaeva, T. A., Hyde, E. I. & Busby, S. J. W. (2001). A simple mechanism for co-dependence on two activators at an *Escherichia coli* promoter. *EMBO J.* **20**, 7160-7167.
- Wilson, T. J., Maroudas, P., Howlett, G. J. & Davidson, B. E. (1994). Ligand-induced self association of the *Escherichia coli* regulatory protein TyrR. *J. Mol. Biol.* **238**, 309-318.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp19 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Young, B. A., Anthony, L. C., Gruber, T. M., Arthur, T. M., Heyduk, E., Lu, C. Z., Sharp, M. M., Heyduk, T., Burgess, R. R. & Gross, C. A. (2001). A coiled-coil from the RNA polymerase  $\beta'$  subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by  $\sigma^{70}$ . *Cell* **105**, 935-944.



# PRILOG 1.

U Prilogu 1. je prikazana sekvenca *cysB* gena i izvedene sekvence CysB proteina (GenBank database). Na sekvenci su **označene** pozicije mesta za sečenje restrikcionim enzimima *Bam*III i *Eco*RV (podvučeni nukleotidi) i pozicije i orijentacije prajmera (oligonukleotida) CYSB-fw1 i CYSB-rev1 (strelice). Prajmer CYSB-fw1 nosi baznu zamenu A4C (podvučeni A nt) chime menja ak lys u gln. DNK-vezujući motiv "HTH" **nalazi** se na poziciji od 19 do 38 ak. Domen za odgovor na inducer obuhvata ak 88-282. Bazna zamena T98A koja kao konsekvencu ima zamenu ak I33N (Ile33Asn) prikazana je u Bold stilu dok je mesto insercije IS1 elementa u A832 označeno zvezdicom.

CYSB-fw1 →

```

1/1 C
ATG AAA TTA CAA CAA CTT CGC TAT ATT GTT GAG GTG GTC AAT CAT AAC CTG AAT GTC TCA
Met lys leu gln gln leu arg tyr ile val glu val val asn his asn leu asn val ser
61/21
TCA ACA GCG GAA GGA CTT TAC ACA TCA CAA CCC GGG ATC AGT AAA CAA GTC AGA ATG CTG
ser thr ala glu gly leu tyr thr ser gln pro gly ile ser lys gln val arg met leu
121/41
GAA GAC GAG CTA GGC ATT CAA ATT TTT TCC CGA AGC GGC AAG CAC CTG ACG CAG GTA ACG
glu asp glu leu gly ile gln ile phe ser arg ser gly lys his leu thr gln val thr
181/61
CCA GCA GGG CAA GAA ATA ATT CGT ATC GCT CGC GAA GTC CTG TCG AAA GTC GAT GCC ATA
pro ala gly gln glu ile ile arg ile ala arg glu val leu ser lys val asp ala ile
241/81
AAA TCG GTT GCC GGA GAG CAC ACC TGG CCG GAT AAA GGT TCA CTG TAT ATC GCC ACC ACG
lys ser val ala gly glu his thr trp pro asp lys gly ser leu tyr ile ala thr thr
301/101
CAT ACC CAG GCA CGC TAC GCA TTA CCA AAC GTC ATC AAA GGC TTT ATT GAG CGT TAT CCT
his thr gln ala arg tyr ala leu pro asn val ile lys gly phe ile glu arg tyr pro
361/121
CGC GTT TCT TTG CAT ATG CAC CAG GGC TCG CCG ACA CAA ATT GCT GAT GCC GTC TCT AAA
arg val ser leu his met his gln gly ser pro thr gln ile ala asp ala val ser lys
421/141
GGC AAT GCT GAT TTC GCT ATC GCC ACA GAA GCG CTG CAT CTG TAT GAA GAT TTA GTG ATG
gly asn ala asp phe ala ile ala thr glu ala leu his leu tyr glu asp leu val met
481/161
TTA CCG TGC TAC CAC TGG AAT CGG GCT ATT GTA GTC ACT CCG GAT CAC CCG CTG GCA GGC
leu pro cys tyr his trp asn arg ala ile val val thr pro asp his pro leu ala gly
541/181
AAA AAA GCC ATT ACC ATT GAA GAA CTG GCG CAA TAT CCG TTG GTG ACA TAT ACC TTC GGC
lys lys ala ile thr ile glu glu leu ala gln tyr pro leu val thr tyr thr phe gly
601/201
TTT ACC GGA CGT TCA GAA CTG GAT ACT GCC TTT AAT CGC GCA GGG TTA ACG CCG CGT ATC
phe thr gly arg ser glu leu asp thr ala phe asn arg ala gly leu thr pro arg ile
661/221
GTT TTC ACG GCA ACG GAT GCT GAC GTC ATT AAA ACT TAC GTC CGG TTA GGG CTG GGG GTA
val phe thr ala thr asp ala asp val ile lys thr tyr val arg leu gly leu gly val
721/241
GGG GTC ATT GCC AGC ATG GCG GTG GAT CCG GTC GCC GAT CCC GAC CTT GTG CGT GTT GAT
gly val ile ala ser met ala val asp pro val ala asp pro asp leu val arg val asp
781/261
GCT CAC GAT ATC TTC AGC CAC AGT ACA ACC AAA ATT GGT TTT CGC CGT AGT ACT TTC TTG
ala his asp ile phe ser his ser thr thr lys ile gly phe arg arg ser thr phe leu
841/281
CGC AGT TAT ATG TAT GAT TTC ATT CAG CGT TTT GCA CCG CAT TTA ACG CGT GAT GTC GTT
arg ser tyr met tyr asp phe ile gln arg phe ala pro his leu thr arg asp val val
901/301
GAT GCG GCT GTC GCA TTG CGC TCT AAT GAA GAA ATT GAG GTC ATG TTT AAA GAT ATA AAA
asp ala ala val ala leu arg ser asn glu glu ile glu val met phe lys asp ile lys
961/321
CTG CCG GAA AAA TAA
leu pro glu lys OCH

```

← CYSB-rev1



## PRILOG 2.

U Prilogu 2. je prikazana sekvenca regulatornog i strukturnog regiona *hslJ* gena kao i izvedena sekvenca HslJ proteina, ak 1-140 (GenBank database). *hslJ* gen: 166-588 nt. Na sekvenci su oznaceni putativni  $\sigma 70$  promotori (stare i nove -Bold -10 i -35 konsenzus sekvence), stari i novo-definisani start transkripcije (+1) *hslJ* gena (Bold-stil) kao i Shine-Dalgarno sekvenca vezujućeg mesta za ribozom (RBS-ribosome binding site). Strelicama su oznacene pozicije i orijentacije navedenih prajmera (oligonukleotida) a takodje su prikazana i restrikciona mesta *KpnI* i *HinCII*. Lokacija insercije *lacZ* reporter gena ( $\lambda$ *placMu* fag) data je zvezdicom (pozicija 167 nakon A iz ATG start kodona *hslJ* gena). Mesto insercije Kan kasete ( $\Omega$ Kan) u *HinCII* restrikciono mesto, oznaceno je uz *HinCII* poziciju. Putativna signal sekvenca se nalazi od 1-21 ak a mesto isecanja je izmedju 20 i 21 ak. Pozicija Domena Nepoznate Funkeije 306, DUF306 ("Domain of Unknown Function"), je predvidjena od 15-116 ak. Predikcija za "Leucin zipper" domen ili domen sa nanotajima ("coils") data je za sekvencu od 98-125 ak.

```

-485 (KpnI)          1/0          HSLJ-fw3          HSLJ-fw1
5' - GGTACCGTAAAAT//GCA AAA CTT AAG CAA TCT GGA AAA AGG CGA AAC CTG CCC GAA CGA

ACT GGT TTA ATC TTG CCG CTC CCC TGC ATT CCA GGG GAG CTG ATT CAG ATA ATC CCC AAT
-35          -10          +1          +1          -35
GAC CTT TCA TCC TCT ATT CTT AAA ATA GTC CTG AGT CAG AAA CTG TAA TTG AGA ACC ACA
*          HSLJ-fw4          HSLJ-rev3          RBS
166/1          196/11
ATG AAG AAA GTA GCC GCG TTT GTT GCG CTA AGC CTG CTG ATG GCG GGA TGT GTA AGT AAT
Met lys lys val ala ala phe val ala leu ser leu leu met ala gly cys val ser asn

226/21          256/31
GAC AAA ATT GCT GTT ACG CCA GAA CAG CTA CAG CAT CAT CGC TTT GTG CTG GAA AGC GTA
asp lys ile ala val thr pro glu gln leu gln his his arg phe val leu glu ser val

HSLJ-rev2
286/41          316/51
AAC GGT AAG CCC GTG ACC AGC GAT AAA AAT CCG CCA GAA ATC AGC TTT GGT GAA AAA ATG
asn gly lys pro val thr ser asp lys asn pro pro glu ile ser phe gly glu lys met

346/61          376/71
ATG ATT TCC GGC AGC ATG TGT AAC CGC TTT AGC GGT GAA GGC AAA CTG TCT AAT GGT GAA
met ile ser gly ser met cys asn arg phe ser gly glu gly lys leu ser asn gly glu

406/81          436/91
CTG ACA GCC AAA GGG CTG GCA ATG ACC CGT ATG ATG TGC GCT AAC CCG CAG CTT AAT GAA
leu thr ala lys gly leu ala met thr arg met met cys ala asn pro gln leu asn glu

466/101          496/111
CTC GAT AAC ACC ATT AGC GAA ATG CTG AAA GAA GGT GCA CAA GTG GAT CTG ACC GTG AAC
leu asp asn thr ile ser glu met leu lys glu gly ala gln val asp leu thr val asn

HinCII / $\Omega$ Kan          556/131
526/121
CAG TTA ACG CTG GCG ACC GCA AAA CAG ACA TTA ACT TAT AAG CTG GCG GAT TTA ATG AAT
gln leu thr leu ala thr ala lys gln thr leu thr tyr lys leu ala asp leu met asn

586/141
TAA - 3'
OCH

```

