

PD 13678

14. IX 1990.

UNIVERZITET U BEOGRADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

SVOJSTVA *in vitro* KONSTRUISANIH ELEMENATA DNK ODGOVORNIH ZA
AKTIVNOST GENA KLONIRANIH U *Escherichia coli*

-osobine novog *PLtl* promotora-

DOKTORSKA DISSERTACIJA



Miroslav Konstantinović

BEOGRAD, 1990.

Veci i deci

U ovom radu prikazani su neki od rezultata istraživanja koje smo obavili u okviru projekta "Istraživanje o uticaju različitih vrsta hrane na zdravlje ljudi".

Dr. Vladimir Stokich, dugogodišnji profesor na Medicinskom fakultetu, istaknuo je važnost pravilne ishrane za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Takođe, istaknuo je da je važno biti svesni sadržaja namirnica koje konzumiramo.

Dr. Dragica Stokich, profesorica na Medicinskom fakultetu, istaknuo je važnost pravilne ishrane za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Takođe, istaknuo je da je važno biti svesni sadržaja namirnica koje konzumiramo.

Dr. Zvezdana Stokich, profesorica na Medicinskom fakultetu, istaknuo je važnost pravilne ishrane za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Takođe, istaknuo je da je važno biti svesni sadržaja namirnica koje konzumiramo.

Biolozi na Medicinskom fakultetu istaknuo je važnost pravilne ishrane za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Takođe, istaknuo je da je važno biti svesni sadržaja namirnica koje konzumiramo.

U ovom radu prikazani su neki od rezultata istraživanja koje smo obavili u okviru projekta "Istraživanje o uticaju različitih vrsta hrane na zdravlje ljudi".

Istaknuo je važnost pravilne ishrane za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Takođe, istaknuo je da je važno biti svesni sadržaja namirnica koje konzumiramo.

U ovom radu prikazani su neki od rezultata istraživanja koje smo obavili u okviru projekta "Istraživanje o uticaju različitih vrsta hrane na zdravlje ljudi".

Istaknuo je važnost pravilne ishrane za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Takođe, istaknuo je da je važno biti svesni sadržaja namirnica koje konzumiramo.

mogućnost je da se gen sa sopstvenim inicijacionim kodonom ubaci pored prirodnog mesta vezivanja ribozoma iz *E. coli* ili sintetisanog RBS (Backman et al., 1976; Jay et al., 1981).

Kako strukturne odlike koje utiču na stabilnost proteina u *E. coli* nisu dovoljno poznate, daleko je teže kontrolisati proteinsku modifikaciju i stabilnost. Pokazano je da se eukariotske signalne sekvence prepoznaju u *E. coli* i da NH₂-terminalna fuzija eukariotskog polipeptida sa signalnom sekvencom *E. coli* rezultuje u sekreciji proteina u periplazmu posle čega dolazi do isecanja signalne sekvence (Talmadge et al., 1980a, 1980b). Postoje takođe podaci da su kratki strani polipeptidi nestabilni u *E. coli* (Itakura et al. 1977; Goeddel et al., 1979). Ovaj značajan nedostatak je otklonjen fuzionisanjem peptida za veći protein *E. coli*.

Efikasna ekspresija kloniranih gena najpre zahteva efikasnu specifičnu transkripciju DNK, zatim translaciju iRNK, i konačno u nekim slučajevima, post-translacionu modifikaciju rezultujućeg proteina. U ovom radu najviše pažnje ćemo posvetiti elementima i faktorima koji kontrolišu transkripciju kloniranog gena. Transkripcija je prvi događaj u lancu preko kojeg se genetička informacija eksprimira kao molekul nosilac novosintetisanog proteina. Događaji koji učestvuju u dobijanju transkripta nekog gena mogu se podeliti na: inicijaciju transkripcije, produženje transkripta i terminaciju transkripcije.

1.2. TRANSKRIPCIIJA

Regulacija formiranja transkripta je najdirektniji put selektivne kontrole genske ekspresije. Ona postoji kako na nivou inicijacije transkripcije tako i u kasnijim događajima transkripcionog procesa.

Od sve tri faze procesa transkripcije, inicijacija je najbolje razjašnjena i uopšteno predstavlja sledeće korake:

Eksperimenti prikazani u ovoj tezi urađeni su u Laboratoriji za genetičko inženjerstvo RO Galenika i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo pod neposrednim rukovodstvom dr Vladimira Glišina.

Dr Vladimiru Glišinu dugujem posebnu zahvalnost zbog pomoći i dragocениh saveta, a naročito zbog kritičke analize rezultata od početka izrade ovog rada pa, do konačne redakcije disertacije. Takodje mu zahvaljujem što me je uveo u izazovnu oblast genetičkog inženjerstva.

Dr Dragutinu Saviću zahvaljujem na angažovanju, korisnim sugestijama, primedbama i savetima tokom pisanja ove disertacije.

Dr Radomiru Crkvenjakovu dugujem zahvalnost za dragocene savete i pomoć u prvim fazama izrade ovog rada.

Koleginici mr Vesni Maksimović dugujem posebnu zahvalnost za nesebično angažovanje oko realizacije prvih eksperimenata i neprekidne podrške za dovršenje ovog rada.

Kolegi dr Radoju Drmancu toplo zahvaljujem na korisnim savetima tokom izrade ovog rada kao i na pomoći oko prikupljanja literature.

Iskreno zahvaljujem koleginici dr Zvezdani Popović za konstruktivne razgovore koji su ubrzali završavanje ovog rada, kao i na stvaranju dobre naučne atmosfere u Laboratoriji za ćelijsku diferencijaciju.

Posebno želim da se zahvalim koleginici mr Gordani Nikčević bez čijeg eksperimentalnog izvođenja testa za dokazivanje prisustva interferona, tumačenje dela rezultata iznesenih u ovom radu ne bi bilo izvodljivo.

Dugujem zahvalnost i svim ostalim kolegincama i kolegama koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi i finalizaciji ovog rada.



1988 Wilas

"I had absolutely no idea that it was a
stop sign."

Skraćenice:

- β -Gal, β -galaktozidaza
- bla, β -laktamaza
- bp, bazni par
- β ME, β -merkaptoetanol
- CAP, katabolički aktivirajući faktor
- CIAP, alkalna fosfataza iz creva teleta (calf intestinal alkaline phosphatase)
- DMS, dimetilsulfat
- DMSO, dimetilsulfoksid
- DTT, ditioneitol;
- EDTA, etilendiamintetrasirćetna kiselina
- EGTA, etilenbis(oksietilennitrilo)tetrasirćetna kiselina
- IF, β -interferon;
- IPTG, isopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
- iRNK, informacijska RNK
- LB, Luria Bertani medijum
- NTP, nukleotidtrifosfat
- ONPG, o-nitrofenil- β -D-galaktozid
- ori, origin replikacije
- PolIk, Klenow (veliki) fragment DNK polimeraze I iz *E. coli*;
- RBS, mesto vezivanja ribozoma (Shine-Dalgarno sekvenca)
- SD, Shine-Dalgarno sekvenca
- T₄ PNK, T₄ polinukleotidkinaza;
- Tc, tetraciklin;
- t, terminator;
- X-Gal, 5-bromo-4-hloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid;
- SDS, natrijumdodecilsulfat.

1.	UVOD	1
1.1.	PROBLEMI KOJI SE SREĆU KOD EKSPRESIJE EUKARIOTSKE DNK U <i>E. coli</i>	1
1.2.	TRANSKRIPCIJA	4
1.2.1.	<u>Vezivanje polimeraze RNK (stvaranje otvorenog kompleksa promotor-polimeraza)</u>	5
1.2.2.	<u>Pozitivna regulacija</u>	7
1.2.3.	<u>Negativna regulacija</u>	9
1.2.4.	<u>Kontrola inicijacije transkripcije repressorom</u>	10
1.2.5.	<u>Produženje transkripta</u>	11
1.2.6.	<u>Terminacija transkripcije</u>	13
1.3.	TRANSLACIJA	14
1.4.	PROMOTORI	16
1.4.1.	<u>lacUV5 promotor</u>	16
1.4.2.	<u>P_L promotor faga lambda</u>	18
1.4.3.	<u>trp promotor</u>	19
1.4.4.	<u>Hibridne konstrukcije promotora</u>	19
1.5.	KONSTRUISANJE EFIKASNOG EKSPRESIONOG SISTEMA	21
1.5.1.	<u>Osnovni dizajn ekspresionog vektora</u>	22
1.5.2.	<u>Uklapanje mesta vezivanja ribozoma</u>	23
1.5.3.	<u>Formiranje restrikcionihi mesta u tački fuzije</u>	24
1.5.4.	<u>Delecija specifičnih sekvenci DNK pomoću egzonukleaze Bal 31</u>	24
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3.	MATERIJAL I METODE	27
3.1.	MATERIJAL	27
3.1.1.	<u>Sojevi <i>E. coli</i> i plazmidi</u>	27
3.1.2.	<u>DNK</u>	28
3.1.3.	<u>Restrikcioni enzimi</u>	28
3.1.4.	<u>Radioizotopi</u>	28
3.1.5.	<u>Enzimi</u>	29
3.1.6.	<u>Hemikalije</u>	29

3.2.	<u>METODE</u>	30
3.2.1.	<u>Uzgojanje bakterijskih kultura</u>	30
3.2.2.	<u>Izolovanje plazmidne DNK</u>	30
3.2.2.1.	<u>Izolovanje manjih količina plazmidne DNK za analitičke svrhe - "Mini Prep" (1-20 µg)</u>	30
3.2.2.2.	<u>Preparativno izolovanje plazmidne DNK u većim količinama za konstruisanje vektora i kloniranje</u>	31
3.2.2.3.	<u>Modifikovana metoda izolovanja plazmidne DNK pomoću gradijenta sa cezijumhloridom</u>	33
3.2.3.	<u>Digestija plazmidne DNK restrikcionim endonukleazama</u>	34
3.2.4.	<u>Digestija DNK nukleazom Bal 31</u>	34
3.2.5.	<u>Defosforilacija 5' krajeva DNK alkalnom fosfatazom</u>	35
3.2.6.	<u>Popunjavanje uvučenih 3' krajeva DNK pomoću velikog fragmenta polimeraze I DNK (Klenow fragment)</u>	36
3.2.7.	<u>Ligacija DNK</u>	36
3.2.8.	<u>Transformacija E. coli plazmidnom DNK</u>	37
3.2.9.	<u>Elektroforeza DNK na gelu od agaroze</u>	38
3.2.10.	<u>Izolovanje i prečišćavanje DNK elektroforezom na gelu od poliakrilamida</u>	39
3.2.10.1.	<u>Prečišćavanje sintetisanih deoksioligonukleotida na gelu od poliakrilamida</u>	41
3.2.11.	<u>Prečišćavanje DNK</u>	42
3.2.11.1	<u>Sephadedex G-50</u>	42
3.2.11.2.	<u>Prečišćavanje DNK adsorpcijom na staklenim vlaknima</u>	43
3.2.12.	<u>Radioaktivno obeležavanje DNK</u>	44
3.2.13.	<u>Autoradiografija</u>	45
3.2.14.	<u>Određivanje primarne strukture (sekvenciranje) DNK</u>	46
3.2.15.	<u>Hemijska sinteza oligodeoksinukleotida</u>	47
3.2.16.	<u>Određivanje aktivnosti β-galaktozidaze</u>	47
3.2.17.	<u>Određivanje biološke aktivnosti humanog β-interferona</u>	49

4.	REZULTATI	50
4.1.	<u>Delecija egzokleazom Bal 31 5' uzvodnog regulatornog regiona i regiona koji kodira za signal peptid β-interferona</u>	50
4.2.	<u>Analiza klonova ekspresionog vektora s tac promotorom</u>	52
4.3.	<u>Konstruisanje ekspresionog plazmida s tac promotorom, genom za β-interferon i trpA terminatorom.</u>	55
4.4.	<u>Konstruisanje ekspresionog plazmida sa novim hibridnim P_{Ltl} promotorom</u>	56
4.5.	<u>Ekspresija gena za humani β-interferon pod kontrolom hibridnih tac i P_{Ltl} promotora</u>	58
4.6.	<u>Ekspresija β-interferon-lacZ genskih fuzija pod kontrolom hibridnih tac i P_{Ltl} promotora</u>	60
4.7.	<u>Efekat temperature na nivo ekspresije kloniranih gena</u>	64
5.	DISKUSIJA	66
5.1.	<u>Obrada kloniranog gena humanog β-interferona za konstrukciju ekspresionog vektora</u>	67
5.2.	<u>Ekspresija gena za humani β-interferon</u>	68
5.3.	<u>Ekspresija β-interferon-lacZ genskih fuzija</u>	71
5.4.	<u>Uticaj orijentacije kloniranog c1857 gena na nivo aktivnosti β-galaktozidaze pod kontrolom P_{Ltl} promotora</u>	75
5.5.	<u>Efekat temperature na nivo ekspresije kloniranih gena</u>	78
6.	ZAKLJUČCI	80
7.	LITERATURA	82
8.	DODATAK	94
8.1.	<u>Fizičke mape plazmida</u>	
8.2.	<u>Sekvence DNK</u>	

1. UVOD

Tehnika *in vitro* rekombinacije DNK i mogućnost transformacije i transfekcije pogodne ćelije domaćina sa rekombinantnim vektorima omogućila je da se za nepune dve decenije prikupe značajna saznanja neophodna za razjašnjavanje strukture i funkcije genoma mnogih organizama. Zahvaljujući ovim potpuno novim tehnikama, postalo je sasvim izvodljivo da se neki gen ne samo prenese u novi organizam, već da se i efikasno eksprimira ukoliko se stavi pod kontrolu genetičkih regulatornih elemenata novog domaćina.

Ovim rezultatima su omogućeni novi pristupi fundamentalnim istraživanjima. Visoka efikasnost tehnika kloniranja i ekspresije gena je učinila dostupnim da se, osim fundamentalnih aspekata, sagleda i komercijalna strana mogućnosti proizvodnje velikih količina specifičnih proteina u različitim ćelijama domaćinima.

1.1. PROBLEMI KOJI SE SREĆU KOD EKSPRESIJE EUKARIOTSKE DNK U

E. coli

Escherichia coli je najviše korišćena za ekspresiju stranih gena jer se o njenim mehanizmima kontrole genske ekspresije daleko više zna nego što je to slučaj kod drugih organizama.

Zadovoljavajuća ekspresija eukariotskog gena u *E. coli* podrazumeva da je ćelijska mašinerija tako organizovana da omogući bar isti ili i bolji nivo ekspresije nego kod prirodne varijante. Za razliku od gena poreklom iz prokariota, postojanje interventnih (intronskih) sekvenci kod eukariota koje prekidaju kodirajuće sekvence, zahteva mehanizam obrade primarnog transkripta, pri čemu se dobija

obrađena iRNK pogodna za translaciju. Kod prokariotskih gena nema introna, pa enzimi koji obavljaju funkciju obrade primarnog transkripta i ne postoje. Prema tome, genomska DNK eukariota u opštem smislu i ne može da se direktno koristi za ekspresiju u bakterijskoj ćeliji.

Dalje, transkripcioni signali kod eukariota se razlikuju od prokariota tako da ih bakterijska polimeraza RNK najčešće ne raspoznaje (Corden *et al.* 1980; Breathnach i Chambon, 1981).

Takođe se i struktura iRNK eukariota razlikuje od bakterijske. Eukariotska iRNK je poliadenilovana na 3' kraju i obično "kapovana" (capped) na 5' kraju - karakteristike koje mogu da utiču na stabilnost iRNK i vezivanje ribozoma (Breathnach i Chambon, 1981) Pored toga, iRNK kod eukariota izgleda da nema ekvivalent za SD sekvencu (Shine-Dalgarno) koja je prisutna kod iRNK prokariota (Kozak, 1981).

Dodatni problem predstavlja upotreba kodona. Kodoni informacione RNK, koji šifruju za dobro eksprimiran gen kod prokariota, nisu slučajni. Postoji značajan prioritet za određene kodone nekih aminokiselina (Grantham *et al.*, 1981, Grosjean i Fiers 1982, Gouy i Gautier, 1982). Ikemura je 1981. pokazao korelaciju između zastupljenosti kodona kod iRNK i nivoa određenih tRNK u ćeliji. Kako je prioritet za kodone različit kod gena poreklom iz eukariota, moguće je da će nivo određenih tRNK uticati na efikasnost translacije tih gena u sistemu prokariota.

Konačno, poznato je da mnogi eukariotski proteini podležu posttranslacionoj modifikaciji od koje uveliko može da zavisi stabilnost ili aktivnost datog proizvoda. Većina tih modifikacija ne postoji u prokariotskom sistemu.

Da bi se prebrodili svi ti problemi primenjene su mnoge taktike. Kada je poznata sekvencu aminokiselina, moguće je hemijski sintetisati sekvencu DNK koja će kodirati za protein, a da interventne sekvence nisu uključene, pri čemu treba imati u vidu prioritet za određene kodone. Primer je

hemijska sinteza gena za α -interferon dužine od 514 bp koji kodira za protein od 166 aminokiselina (Edge *et al.*, 1981). Mada teoretski ne postoji ograničenje za veličinu gena koji može da se hemijski sintetiše, za prevelike gene je jednostavnije izolovati dvolančanu DNK (cDNK), kopiju iRNK i klonirati u plazmidni vektor. Danas je svakako moguće dobiti oligodeoksinukleotid i od 250 baza upotrebom novih CPG (controlled pore glass) kolona automatizovanom hemijskom sintezom u dobrom prinosu, pa je hemijska sinteza nekog gena čak i od 2kb sasvim izvodljiva.

Transkripcija ovakvih gena je kontrolisana ubacivanjem DNK uz jak prokariotski promotor u ekspresionom vektoru. Sekvence DNK nazvane promotorima predstavljaju one regione na molekulima DNK koji signaliziraju početak transkripcije informacione RNK - omogućavaju interakciju DNK i polimeraze RNK. Promotori koji su najčešće eksploatisani za ekspresiju kloniranih gena, to jest, osnovni elementi njihove kontrole, biće kasnije pojedinačno opisani. Najčešće korišćeni promotori za ovakve svrhe su: *lac* promotor iz *E. coli lac* operona, *trp* promotor iz *E. coli trp* operona i P_L promotor faga lambda.

Transkripciona terminacija se može omogućiti postavljanjem transkripcionog terminatora iza kloniranog gena (Nakamura i Inouye, 1982). Mada posledice neprekinute transkripcije na malim cirkularnim plazmidima nisu poznate, verovatno mogu da budu štetne jer većina ekspresionih vektora sadrži i druge gene kao što je, recimo, gen za rezistenciju na antibiotik. Poznato je da *trp* promotor negativno utiče na transkripciju gena faga lambda ukoliko mu je orijentacija usmerena ka transkriptu koji dolazi sa P_L promotora (Hopkins *et al.*, 1976).

Problemi translacije su donekle rešeni na dva načina. Strani gen može da se fuzioniše sa prokariotskim genom u korektnom okviru čitanja tako da se inicijacija translacije obavlja preko postojećeg mesta vezivanja ribozoma. Druga

a) vezivanje polimeraze RNK prepoznavanjem određene sekvence, obično smeštene na početku operona, koja se zove promotor, b) "relaksiranje" dela promotora (odmotava se dvolančana DNK) da bi se omogućio odgovarajući kontakt polimeraze RNK sa lancem DNK koji služi kao matrica i c) polimerizacija prvih nekoliko nukleotida nascentne RNK.

1.2.1. Vezivanje polimeraze RNK (stvaranje otvorenog kompleksa promotor-polimeraza)

Fiziološki korektan transkripcioni događaj nastaje kada polimeraza (holoenzim) prepozna sekvencu na promotoru, posle čega sledi parcijalno odvijanje promotora i kao rezultat tog procesa nastaje otvoreni kompleks promotor-polimeraza. Opseg odvičenog regiona može da varira među promotorima i prosečne je dužine oko 12 nukleotida, približno u regionu -9 do +3 (Kirkegaard *et al.* 1983).

Od trenutka stvaranja otvorenog kompleksa, polimeraza počinje da spaja nukleotide i da formira nascentni transkript. Ova faza u transkripciji je poznata kao faza "odbacivanja", jer u zavisnosti od promotora kod enzima može da postoji čak i 50% verovatnoće da će proces polimerizacije biti prekinut. To se događa ili odvajanjem sa DNK ili vraćanjem u stanje otvorenog kompleksa (Carpousis i Gralla, 1980). Nije poznato zašto polimeraza pokazuje tako jaku tendenciju da prekine proces transkripcije. U funkcionalnom smislu ovaj događaj može da ima regulatornu ulogu (Reznikoff *et al.*, 1982).

Analizom sekvenci DNK 168 definisanih promotora *E. coli* u regionu -50 do +10 (Hawley i McClure, 1983) definisana su dva regiona sa homologijom smeštena približno 35 i 10 baznih parova ("-35" TTGACA i "-10" TATAAT Rosenberg i Court 1979, Siebenlist *et al.* 1980) uzvodno od početka transkripcije i RNK, a za koje se smatra da predstavljaju regione najtešnje uključene u vezivanje i orijentaciju polimeraze preko sigma faktora, tako da inicijacija sinteze počinje nizvodno. Opšti

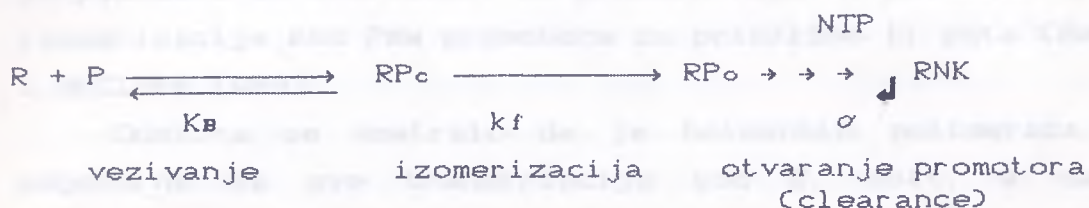
izgled jedne "idealne" konsenzus promotorske sekvence je sledeći:

TTGACA-17bp-TATAAT-5-9bp-iRNK start

Hawley i McClure (1983) definišu "-35" i "-10" regione sa po tri bazna para: TTG--- za "-35" i TA---T za "-10". Mutacije koje daju bolju aktivnost promotora najčešće, umesto nekonsenzus, uspostavljaju konsenzus sekvencu na datoj poziciji, dok one koje smanjuju njegovu aktivnost, konsenzus sekvence uglavnom pretvaraju u nekonsenzus. Utvrđeno je da rastojanje između "-10" i "-35" regiona ima znatan uticaj na efikasnost promotora (Mandecki i Reznikoff, 1982; Stefano i Gralla, 1982; Russell i Bennett, 1982). Takođe je utvrđeno da kod svih promotora čija je primarna struktura određena, ovo rastojanje iznosi između 15 i 18 bp, a da je ono najčešće 17bp (Siebenlist *et al.* 1980; Rosenberg i Court, 1979). Frekvencija inicijacije transkripcije kod *E. coli* može da varira za preko četiri reda veličine, od gena koji se transkribuju samo jedanput u generaciji, pa do gena koji se transkribuju jedanput svake sekunde (McClure, 1985).

Utvrđeno je da AT-bogati blokovi uzvodno od "-35" sekvence kod nekih jakih promotora, kao što su *trp*, *lpp*, *PL*, znatno utiču na njihovu visoku aktivnost. (Nakamura i Inouye, 1979; Vollenweider *et al.*, 1979; Horn, i Wells, 1981. a i b; Lamond, i Travers, 1983; Gourse, *et al.* 1986; ; Nishi i Itoh, 1986; Plaskon, i Wartell, 1987; Bauer *et al.*, 1988). Pokazano je, na primer, da prisustvo AT-bogatih regiona kod *trp* promotora u oblasti -55 do -85 takođe može da predstavlja važan faktor koji određuje snagu promotora (De Boer *et al.*, 1979, Nakamura i Inouye, 1979). Drugi autori pokazuju da delecijom ovih sekvenci iz *trp* promotora i ubacivanjem AT bogatih sekvenci poreklom iz *PL* promotora faga λ postižu 6 puta viši nivo ekspresije kloniranog gena (Nishi i Itoh, 1986)

Formiranje otvorenog kompleksa se opisuje interakcijom polimeraze RNK sa promotorom (Chamberlin, 1974):



Prvi korak se definiše konstantom ravnoteže K_B , a drugi, koji je spor, nazvan je izomerizacija i definisan je konstantom brzine k_f (McClure, 1980). Uopšteno, mutacije na promotoru mogu da utiču na konstantu K_B ili k_f , ili na obe (McClure, 1985), ali mutacije u "-10" regionu prvenstveno utiču na brzinu izomerizacije. *In vitro* analizama je pokazano da oba koraka u formiranju otvorenog kompleksa imaju uticaja na jačinu promotora *in vivo*, što navodi na mogućnost da u okviru promotorske sekvence postoji za svaku poziciju hijerarhija prioriteta baznog para (McClure *et al.*, 1983). Jednu ovakvu analizu su pokušali da urade Mulligan *et al.* (1984) praveći korelaciju stepena homologije sa konsenzus sekvencom i jačinom promotora. Statističkom obradom pojavljivanja određenih baznih parova u svakoj poziciji na promotoru dobijeno je iznenađujuće dobro slaganje.

1.2.2. Pozitivna regulacija.

Kada se učestćem nekog faktora povećava aktivnost promotora, govori se o pozitivnoj regulaciji.

Ovaj vid regulacije može da poveća osnovnu jačinu promotora pomoću nekoliko mehanizama: interakcijom sa proteinom aktivatorom, korišćenjem novog σ faktora za polimerazu RNK, menjanjem konformacije DNK, stanjem metilacije DNK, preko interakcije malih molekula sa promotorom ili polimerazom RNK.

Proteini aktivatori se najčešće vezuju u blizini "-35" regiona i povećavaju brzinu formiranja otvorenog kompleksa



polimeraze RNK na promotoru (Raibaud i Schwartz, 1984). Tako je pokazano da aktivator, CI protein faga λ , povećava brzinu izomerizacije kod *PRM* promotora za približno 11 puta (Hawley i McClure 1983).

Dokora se smatralo da je holoenzim polimeraza RNK odgovorna za sve transkripcije kod *E. coli*, a da je sačinjena od $\alpha\beta\beta'$ subjedinica nazvanih $E\sigma^{70}$ i da ih kodiraju geni *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* i *rpoD*. Ovakvo gledište je izmenjeno, pošto je utvrđeno da proizvod *htpR* gena funkcioniše združeno sa "core" polimerazom RNK ($\alpha\beta\beta'$) da bi se specifično diktirala sinteza sa promotora za toplotni šok (Grossman *et al.* 1984).

Što se tiče promene u konformaciji DNK i uticaja na pozitivnu regulaciju transkripcije, postoji primer korelacije između promene konformacije DNK i pozitivnog efekta na jačinu promotora. Bossi i Smith (1984) su izolovali iz bakterije *Salmonella typhimurium* promotor za $tRNK^{his}$ sa delecijom od 3 bazna para u poziciji -71 do -73 i dobili smanjenje funkcije promotora za 2,5 puta kako *in vivo* tako i u *in vitro* sistemu. Osim toga utvrdili su i neobična fizička svojstva nemutiranog promotora. Poredeći elektroforetske mobilnosti fragmenata DNK koji sadrže promotore, utvrdili su, da za razliku od mutiranog promotora, koji ima očekivanu mobilnost na gelu od poliakrilamida, promotor divljeg tipa pokazuje neuobičajeno nisku pokretljivost. Takođe je utvrđeno da interakcija CAP sa DNK rezultuje u uvijanju DNK (Wu i Crothers, 1984).

Efekat na određene promotore izazvan je i superspiralizacijom DNK. Iz superspiralizacije DNK može da proistekne povećan ili smanjen afinitet vezivanja proteina aktivatora. Tako je pokazano (Sanzey 1979) da je većina promotora koji se aktiviraju preko CAP-cAMP kompleksa osetljiva na faktore koji inaktiviraju girazu DNK.

Stanjem metilacije DNK se reguliše ekspresija mnogih gena kod *E. coli*, ali je tek nedavno prikazan direktan

efekat metilacije na interakciju polimeraze RNK sa promotorom (Roberts et al. 1985). Utvrđeno je za promotore *E. coli*, koji u "-35" regionu imaju karakterističnu sekvencu "GATC" (*trpR*, *sulA*) podložnu metilaciji (6-meAde), da je njihova transkripcija povećana dva do šest puta kod *dam*⁻ mutanta (deficitarnost za metilaciju adenina) u odnosu na *dam*⁺ domaćina. Nasuprot ovome, *mom* promotor koji ne sadrži mesto za *dam* metilaciju, ali se nalazi nizvodno od skupine od tri *dam* mesta, pokazuje dvadeset puta nižu transkripciju kod *dam*⁻ mutanta nego kod *dam*⁺ domaćina (Sternberg, 1985).

Uloga malih molekula u regulaciji inicijacije transkripcije je otvoreno pitanje. Mada nije pokazano da postoji direktan efekat, ima indikacija o pozitivnom efektu malog ppGpp molekula na neke operone, kao što je *his* operon *S. typhimurium* (Stephens et al. 1975). Travers (1980) pokazuje da u njegovom *in vitro* sistemu 20-40 μM ppGpp stimuliše transkripciju divljeg tipa gena za tRNK^{tyr}, ali nije izvesno da li istovremeno postoji stimulacija i u *in vivo* sistemu. Sekvenca GCGC, koja se kod nekih promotora (*tufB*) nalazi nizvodno od "-10" sekvence u regionu -7 do -4 (u odnosu na početak transkripcije iRNK) može da bude odgovorna za selektivnu inhibiciju transkripcije ppGpp molekulom (Mizushima-Sugano i Kaziro, 1985).

1.2.3. Negativna regulacija.

U situacijama kada se učešćem nekog faktora smanjuje aktivnost promotora, govori se o negativnoj regulaciji.

Mehanizmi negativne regulacije kod *E. coli* slični su onima kod pozitivne regulacije. Protein aktivator može da bude i represor ukoliko postoji kompeticija sa polimerazom RNK za istu sekvencu na DNK. Slično aktivatorima, i represori mogu da deluju na formiranje otvorenog kompleksa utičući na K_B ili k_f. Proučavajući interakciju CI represora faga λ sa polimerazom RNK na P_R promotoru, pokazano je da CI

smanjuje konstantu vezivanja (K_B) polimeraze RNK za promotor (Hawley *et al.*, 1985).

Blizina drugih promotora može da ima ulogu u regulaciji. Čak i sama polimeraza RNK može da odigra ulogu represora na promotoru ukoliko postoji kompeticija dva preklapajuća promotora za istu polimerazu RNK. Primer za to je *immI* region bakteriofaga P22 kod koga se promotori *Pant* i *Pmnt* preklapaju (Sauer *et al.*, 1983).

Metilacija adenina na DNK takođe može da bude uključena u negativnu kontrolu. Braun i Wright (1986) su pokazali da postoje dva mesta *dam* metilacije u okviru "-35" regiona *dnaA* promotora. Posledica toga je sledeća: ako se *dnaA* promotor nalazi u *dam*⁺ soju, dobija se dva do tri puta niža ekspresija.

1.2.4. Kontrola inicijacije transkripcije represorom.

Kada smo govorili o negativnoj regulaciji transkripcije, pomenuli smo da proteini aktivatori mogu da budu i represori ukoliko stupaju u kompeticiju sa polimerazom RNK za određenu sekvencu na promotoru. Jedan od takvih primera je CI represor faga λ koji istovremeno služi kao aktivator polimeraze RNK koja inicira transkripciju *cI* gena preko *P_{RM}* promotora i blokira vezivanje polimeraze RNK čiji je zadatak da preko *P_R* promotora inicira transkripciju *cro* gena (Ptashne, 1986). Primer *lexA* represora pokazuje kako jedan represor interreaguje sa operatorima čitavog seta promotora SOS regulona (*recA*, *lexA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *cloDF13*, *ssb*, *sulA*, *clef-1*) na veoma različitim pozicijama u delu uzvodno od "-35" regiona, pa sve do mesta nizvodno od tačke otpočinjanja transkripcije (Hoopes i McClure, 1987). *lexA*, koji se vezuje uzvodno od "-35" regiona kod *ssb* promotora, moguće je da blokira vezivanje nekog proteina aktivatora (Brandsma *et al.* 1985). U slučaju vezivanja *lexA* proteina nizvodno od starta transkripcije, represija ne mora uopšte da potiče od interferiranja u formiranju otvorenog

kompleksa, već od interferiranja sa procesom otvaranja (clearance) promotora (Hoopes i McClure, 1987).

Ukoliko ne postoji kontrola transkripcije represorom, konstitutivna ekspresija kloniranog gena može da dovede do usporavanja rasta ćelije domaćina zbog nagomilavanja proizvoda ekspresije, ili toksičnog efekta stranog gena na domaćina (Brosius, 1984, Takagi et al., 1988). Sistem domaćin-vektor, koji ne omogućava dovoljnu kontrolu ekspresije ubačenog gena, dovešće do destabilizacije sistema. Tako Remaut et al. (1983) na primeru β -interferona pokazuju da njegova ekspresija značajno usporava rast ćelija domaćina. Takagi et al. (1988) pokazuju da se klonirani gen za subtilizin E (serin proteaza iz organizma *Bacillus subtilis*), koji je pod kontrolom tandem *lpp-lac* promotora, 16 puta bolje eksprimira u *E. coli* ako se količina inducera IPTG-a redukuje sa 2mM na 0.005mM, a temperatura rasta ćelija spusti sa 37° C na 23° C. Pod istim uslovima uočava se i drastično bolji rast ćelija nakon indukcije. Slično tome, toksičan efekat na ćeliju domaćina pokazuje Brosius 1984. na primeru humanog insulina ekspimiranog u *E. coli*.

1.2.5. Produženje transkripta

Autori Yager i von Hippel (1987) na sledeći način posmatraju i opisuju procese produženja transkripta i njegove terminacije kod *E. coli*.

Onog trenutka kada nascentni transkript obrazuje lanac dužine od 8 ili 9 baza, dolazi do odvajanja sigma faktora od transkripcionog kompleksa i gubi se svaka tendencija polimeraze da prekine transkripciju. U tom procesu transkripcioni mehur narasta do svoje konačne veličine. Ovaj događaj obeležava ulazak polimeraze RNK u fazu produžetka transkripta.

Produženje transkripta je u izvesnom smislu enzimatski katalizovana reakcija polimerizacije jer se iz aktiviranih monomera formiraju polimeri visoke molekulske težine



(molekul RNK). U ovoj reakciji polimeraza RNK vrši selekciju monomera NTP-a po poretku koji diktira komplementarna sekvenca lanca matrice na DNK.

S druge strane, produženje transkripta se objašnjava kao topološka reakcija. Kako se polimeraza RNK kreće niz lanac DNK, lokalno relaksirani mehur na DNK putuje zajedno. U okviru tog mehura privremeno se formira RNK-DNK hibrid. Između dva lanca DNK, dva lanca RNK-DNK hibrida i, verovatno, između lanca RNK i dupleksa DNK uzvodno od transkripcionog mehura postoje pre spiralni nego linearni odnosi. Dakle, produžavanje transkripta stalno zahteva rešavanje problema odmotavanja i umotavanja. Tako rezultati Wu *et al.* (1988) ukazuju da je stanje superspiralizacije bakterijske DNK tokom transkripcije znatno izmenjeno, a da su topoizomeraze DNK regularno uključene u fazu produženja transkripta.

Treća moguća varijanta jeste da je proces produženja transkripta, katalizovanog polimerazom RNK, u potpunosti kontinualan. Jedan molekul polimeraze formira potpuni transkript postupnim dodavanjem nukleotida ne disosujući ni sa DNK ni sa nascentne RNK.

Tokom procesa transkripcije mogu se pretpostaviti dva radikalno različita modela interakcije transkripta RNK sa matricom (lancem DNK). Oba uzimaju u obzir činjenicu da su ribonukleotidi, kandidati za inkorporaciju u nascentnu RNK, odabrani po principu komplementarnosti. Zahtev za formiranje nascentne RNK je da 3' kraj hibridizuje za matricu-lanac DNK.

Kod prvog modela, dužina RNK koja je uključena u RNK-DNK hibrid, striktno je konzervirana tokom cele ili gotovo cele reakcije polimerizacije (Jehle, 1965). Ova konzervirana dužina odgovara razdaljini između 3' kraja RNK i mestu odvajanja RNK-DNK hibrida.

Kod drugog modela nema razdvajanja između RNK i matričnog lanca DNK za vreme procesa produžavanja

transkripta: hibridni dupleks dobija u dužini sve dok neki događaj (terminacija) ne izvrši zamenu nascentnog lanca RNK nematričnim lancem DNK.

Sledeće činjenice idu u prilog prvog modela. a) Znatan broj genetičkih i biohemijskih podataka govori o bliskoj vezi između transkripcije i translacije (Landick i Yanofsky, 1987), što podrazumeva da RNK odmah uzvodno od polimeraze RNK ostaje slobodna. b) Više eksperimenata je pokazalo da samo ekstremni 3' kraj transkripta tokom transkripcije leži fizički blisko matričnom lancu DNK, da je zaštićen od digestije RNKazom i da je ovaj region RNK dugačak tačno 12 nukleotida (Hanna i Meares, 1983; Stüber i Bujard, 1981). c) Transkripti se iniciraju i produžavaju na populaciji zatvorenih (dvolančanih) krugova DNK u prisustvu topoizomeraze. Ako tokom transkripcije postoji bilo kakva izmena DNK-DNK dupleksa za RNK-DNK hibrid, doći će do ugaonog odmotavanja DNK (Gamper i Hearst, 1982).

Iako nema takvih podataka, može se pretpostaviti da promene u temperaturi nesumnjivo imaju uticaja na proces produžavanja transkripta. Povećanje temperature bi moralo da pojača tendenciju labavljenja krajeva transkripcionog mehura kao i RNK-DNK hibrida (Yager i von Hippel, 1987).

1.2.6. Terminacija transkripcije

Osim faktora koji određuju funkcionisanje i jačinu promotora, važan činilac za ishod ekspresije je efikasna terminacija transkripcije. Terminacioni događaj je definisan kao jednostavan ako se odvija spontano *in vitro* bez prisustva proteinskih faktora osim polimeraze (core). Za vreme transkripcije polimeraza RNK može privremeno da zastane na određenim sekvencama kao što su GC-bogati regioni (Gilbert, 1976). U jednom od slučajeva zaustavljanje može da proistekne iz osnovne promene svojstava transkripcionog mehura. Terminacija transkripcije je kontrolisana signalima na DNK 3' nizvodno od gena sa karakterističnim regionom

dvostruke simetrije bogatim GC koji prethode terminaciji, a zatim slede AT-bogati regioni na mestu terminacije (Rosenberg i Court 1979). Ekstremna nestabilnost rU•dA sparivanja verovatno omogućava oslobađanje nascentnog transkripta i dovodi do terminacije transkripcije (Christie et al., 1981). Kompleksan proces terminacije ne može da se odvija u "minimalnom" *in vitro* sistemu, već je potrebno sudelovanje jednog ili više proteinskih faktora. Više proteinskih faktora može biti uključeno u kontrolu terminacije, a najznačajniji je ρ faktor. Antiterminacioni proteini, kao što je proizvod N gena faga lambda, mogu takođe biti uključeni u specijalizovane sisteme (Greenblatt 1981).

1.3. TRANSLACIJA

Inicijacija translacije može da se definiše kao zbir pojedinih reakcija koje vode stvaranju stabilnog kompleksa spremnog za produženje faze translacije. Iako se smatra da kompleks između 70S ribozoma, informacione RNK (iRNK) i formilmetionil-tRNK, čiji se poluživot meri satima, (Blumberg et al, 1979; Jay i Kaempfer, 1975) predstavlja krajnji produkt inicijacionog događaja, autori Gold i Stormo (1987) smatraju da i drugi kodon GCU može da olakša inicijaciju. Kako je AUG očigledan statistički izbor za inicijaciju (91% AUG, 8% GUG itd., Childs et al. 1985), može se s pravom sumnjati da će iRNK koja koristi druge kodone biti dobro translatovana. Veliki broj mutacija, koje menjaju AUG, daju niži nivo translacije (Childs et al., 1985; Munson et al., 1984). Zapravo, kada se neki AUG kodon van okvira čitanja takmiči sa GUG u fazi čitanja, pobeđuje AUG (Shinedling et al. u štampi, Gold i Stormo, 1987).

Efikasna translacija informacione RNK kod ćelije prokariota zahteva prisustvo mesta vezivanja ribozoma (RBS).

Kod većine informacionih RNK *E. coli* RBS se sastoji od dve komponente: inicijacionog AUG kodona i 3-12 baza uzvodno, sekvenca od 3-9 baza nazvane Shine-Dalgarno (SD) sekvenca. Ova sekvenca je komplementarna 3' kraju 16S RNK (5'-GAUCCUCCUUA-3' Shine i Dalgarno, 1974 i 1975). Smatralo se da hibridizacija za taj region uključuje prikačinjanje ribozomalne 30S subjedinice za informacionu RNK (Steitz 1979). Mada SD sekvenca nije identična kod svih iRNK, ipak je identifikovana (kao i kod promotorskih sekvenci) semi-konzervirana konsenzus sekvenca (Stormo *et al.*, 1982). Moguće je da razlike u SD sekvencama čine deo translacionog kontrolnog sistema. Osim toga, vezivanje ribozoma je verovatno modulirano sekundarnom strukturom na 5' kraju RNK pošto se najefikasnija translacija dešava ako su AUG i SD sekvenca slobodne za 30S ribozomalnu subjedinicu (Iserentant i Fiers 1980). U regionu -20 do +13, ako se izuzme Shine-Dalgarno region, inicijacioni i drugi kodon, A je daleko zastupljenije na račun G. Reč je verovatno o strategiji koja isključuje neodgovarajuće sparivanje sa 3' krajem 16S RNK. G se skoro nikada ne nalazi 5' od inicijacionog kodona (Stormo *et al.* 1982), a A je veoma često u poziciji -3 kod eukariotskih iRNK (Kozak, 1981).

Jedna od pojava u procesu translacije je i reinicijacija (Steege, 1977). Ukoliko nakon terminacije translacije postoji SD sekvenca i u okviru desetak baza nizvodno AUG kodon, tada može da dođe do reinicijacije translacije.

Terminacija translacije se najčešće javlja kad god se jedan od tri stop kodona sretne na iRNK sa ribozomalnim kompleksom, ukoliko aminoacilovana supresorska tRNK nije prisutna.

1.4. PROMOTORI

Uopšteno, sekvence DNK nazvane promotorima predstavljaju one regione DNK koji signaliziraju početak transkripcije - stimulišu interakciju DNK i polimeraze RNK.

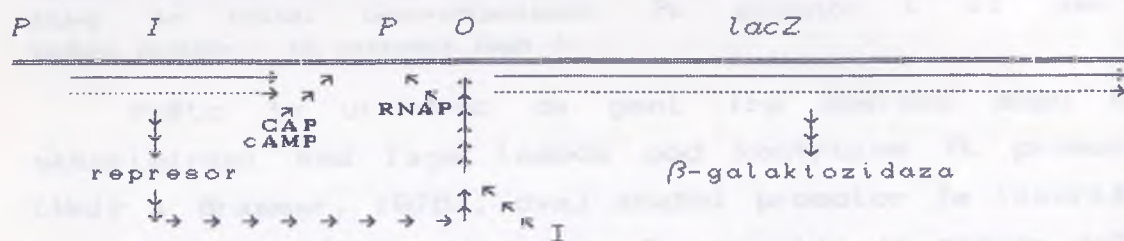
Većina proteina poreklom iz eukariota i prokariota dobijenih u velikim količinama u *E. coli*, transkribovana je sa jednog od sledeća tri promotora ili njihovih derivata: *lacUV5*, *trp* i λ PL. Razlog zašto su baš ovi promotori korišćeni jeste činjenica što su u periodu otvaranja poglavlja ekspresije eukariotskih gena u *E. coli*, pre jedne decenije, oni bili i najbolje proučeni. Osim toga, ove regulatorne sekvence su bile klonirane na derivate faga λ i plazmida pBR322, a identifikovani su i geni koji kodiraju za represorske proteine kojima su regulisane aktivnosti ovih promotora.

Izbor određenog promotora najviše zavisi od osobine proteina čija se ekspresija želi dobiti. Na primer, pokazano je da je proizvod eukariotskog gena za insulin toksičan za ćeliju *E. coli* (Brosius, 1984), ili da ekspresija humanog β -interferona znatno usporava rast ćelija domaćina (Remaut *et al.* 1983). U nekim slučajevima nije jedini preduslov da promotor pokazuje visoku aktivnost u indukovanom stanju, već je veoma važno da i u stanju represije pokazuje što nižu aktivnost. Iako su sva tri pomenuta promotora dovoljno jaka za dobijanje visokog nivoa ekspresije proteina u *E. coli*, oni se međusobno znatno razlikuju kako u načinu tako i u amplitudi indukcije.

1.4.1. *lacUV5* promotor

Jedna od najbolje proučenih regulatornih sekvenci *E. coli* je svakako *lac* promotor/operator. *lac* operon funkcioniše pomoću dva tipa kontrole. Negativna regulacija se uspostavlja u odsustvu laktoze (ili nekog drugog inducera). Operon se nalazi isključen zahvaljujući *lac* represoru, proizvodu *lacI* gena koji se vezuje za operator.

Operatorska sekvenca se nalazi nizvodno od "-10" sekvence *lac* promotora. Pozitivna regulacija se odvija preko CAP-a (katabolički aktivator protein). U odsustvu glukoze, CAP formira kompleks sa cikličnim AMP-om i takav kompleks stimuliše transkripciju vezujući se uz promotor. Promotor se aktivira u prisustvu laktoze ili pri dodavanju inducera IPTG-a (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid;) koji za razliku od laktoze ne podleže metabolizmu, a vezuje se za represor. Na njemu stvara alosteričnu promenu konfiguracije i redukuje mu afinitet vezivanja za operatorsku jedinicu i uklanja ga sa operatora (Miller i Reznikoff, 1978) .



Slika 1. Prikazan je deo *lac* operona sa *lacZ* genom i njegovim promotorom i genom za *lacI* represor. Strelicama su označena mesta vezivanja RNK polimeraze, CAP-cAMP i represora. Dvostruka linija-DNK; puna linija sa strelicom-iRNK; tačkasta linija sa strelicom-protein.

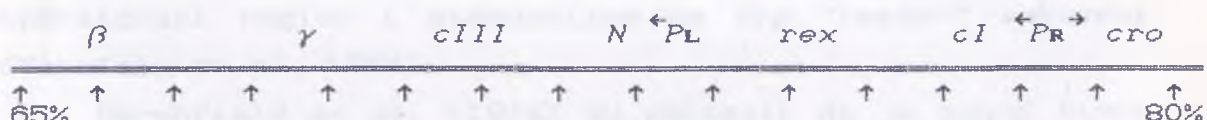
Ako je *lac* promotor kloniran na plazmidu koji se u ćeliji *E. coli* nalazi u više kopija, tada dolazi do titracije *lac* represora koji potiče sa jedne kopije *lacI* gena. Rezultat toga je derepresija preostalih kopija *lac* promotora. Kako je ovakav efekat najčešće nepoželjan, moguće je izbeći ga korišćenjem domaćina koji hiperprodukuje *lac* represor (*lacI*).

Među mutacijama u okviru sekvence *lac* promotora/operatora, *lacUV5* je najviše korišćena za regulaciju hiperprodukcije rekombinantnih proteina u *E. coli*. Kod ovog promotora, posledica mutacije u okviru "-10" sekvence ("Pribnow box", Pribnow, 1975) je ne samo povećana snaga promotora, već ono što je još važnije, dobijena je

znatno niža osetljivost na kataboličku represiju u prisustvu glukoze (Silverstone *et al*, 1970).

1.4.2. PL promotor lambda faga

Aktivnost PL promotora se odvija za vreme litičkog ciklusa faga λ , a pod represijom ga drži proizvod *cI* gena u lizogenom stanju.



Slika 2. *Eco* RI fragment (7500bp) genoma faga λ u okviru kojeg se nalazi levo-orijentisani PL promotor i *cI* gen koji kodira protein - CI represor faga λ .

Pošto je utvrđeno da geni *trp* operona mogu biti eksprimirani kod faga lambda pod kontrolom PL promotora (Moir i Brammar, 1976), ovaj snažni promotor je iskorišćen za ekspresiju kloniranih gena. PL promotor je moguće držati pod kontrolom represora pomoću proizvoda *cI* gena iz faga λ . Preimućstvo PL promotora nad *lac* promotorom je u kontroli aktivacije transkripcije. Dovoljna je samo jedna kopija *cI* gena da bi se proizveo dovoljan broj kopija CI represora za efikasno blokiranje transkripcije na višestruko kopiranom plazmidu koji sadrži PL promotor (Remaut *et al*, 1981). Ako se upotrebi temperaturno senzitivni mutant *cI* gena moguće je na temperaturi od 28°C držati promotor pod represijom, a na 42°C potpuno inaktivirati represor. Svakako, mora se imati u vidu da temperaturna aktivacija PL promotora u ćelijama koje sadrže *cI857* gen nije krajnje specifična, pošto temperaturni pomak na 42°C može takođe da indukuje transkripciju gena koji kodiraju za "heat shock" proteine (Yamamori i Yura, 1982). Kako je pokazano (Phillips *et al*, 1984) da je "heat shock" protein kodiran *lon* genom proteaza, to svakako treba imati u vidu ako se za indukciju PL promotora koristi povišenje temperature na 42°C. Moguće je efekat proteazne aktivnosti izbeći korišćenjem *htpR* mutanata

(*htpR*-pozitivni regulatorni faktor za transkripciju "heat shock" proteina, Grossman, et al., 1984) ili dvostrukih lon *htpR* mutanata (Buell et al., 1985)

1.4.3. *trp* promotor

Ekspresija pet gena *trp* operona kod *E. coli* je dvostruko regulisana: putem represora koji blokira operatorski region i atenuacijom na *trp* "leader" sekvenci (Yanofsky et al., 1984).

Hershfield et al. (1974) su pokazali da je moguć visok nivo ekspresije pet gena *trp* operona kada je operon prebačen u plazmidni vektor. Za razliku od *lac* sistema, samo jedna kopija gena *trp* represora proizvodi dovoljno proteina da drži *trp* operon pod punom represijom. Indukcija *trp* operona se vrši uklanjanjem triptofana iz sistema (Yanofsky et al., 1984). Raniji ekspresioni vektori kod kojih su ubačeni geni bili pod kontrolom *trp* promotora, sadržali su takođe i *trp* "leader" kao i delove *trpD* i *trpE* gena (Hallewell i Emtage, 1980), a kasnije konstrukcije su zadržale samo *trp* promotor/operator region i mesto vezivanja ribozoma (De Boer et al., 1983, Goeddel et al., 1980).

Ukoliko se *trp* promotor nalazi na plazmidu koji je prisutan u više umnožaka, dolazi do titracije *trp* represora, pa je i konstitutivna aktivnost, čak i u prisustvu viška triptofana, merljiva. Tako se kod *trp-lacZ* promotor-genske fuzije dobija samo dvostruko viši nivo aktivnosti β -galaktozidaze kada se poredi indukovano i neindukovano stanje (Buell i Panayotatos, 1986).

1.4.4. Hibridne konstrukcije promotora

Promotori *lac*, *trp* i *PL* ispunjavaju više kriterijuma koji ih čine atraktivnim za ekspresiju kloniranih gena u *E. coli*. Elementi ovih promotora su iskorišteni za dobijanje hibridnih konstrukcija koje poseduju osobine pogodne za određene ekspresione sisteme. Posebno važna karakteristika

jeste kontrola aktivnosti represorima koje je moguće inaktivirati u trenutku kada je poželjno dobiti ekspresiju. Takva vrsta kontrole je veoma važna ukoliko je proizvod gena koji treba da se eksprimira toksičan za ćeliju (Remaut *et al.*, 1983, Brosius, 1984, Takagi *et al.*, 1988). Razlog što znatan broj jakih promotora još nije upotrebljen za ekspresiju kloniranih gena je taj što njihove osobine još nisu u toj meri proučene kao kod *trp*, *lac* i *P_L* promotora.

Promotor za lipoprotein spoljne membrane (*lpp*) *E. coli*, jak konstitutivni promotor, iskorišćen je za konstruisanje različitih ekspresionih vektora. Da bi *lpp* promotor mogao da se kontroliše, ubačen je fragment koji sadrži *lac* promotor/operator između *lpp* promotora i gena za lipoprotein, pa je na taj način omogućena inaktivacija promotora pomoću *lacI* represora, a indukcija sa IPTG-om (Nakamura *et al.* 1982).

Jak hibridni *tac* promotor je nastao fuzionisanjem delova sekvenci koje pripadaju *trp* i *lacUV5* promotoru. Region *trp* promotora, koji obuhvata "-35" sekvencu i uzvodno od nje AT bogate blokove, fuzionisan je za sekvence koje sadrže "-10" region *lacUV5* promotora i nizvodnu *lac* operatorsku sekvencu. Prvi su ga konstruisali i opisali De Boer *et al.*, (1982), a iskorišćen je za konstruisanje više ekspresionih vektora (Russell i Bennet, 1982; Amann *et al.* 1983, 1985). Ovaj promotor se može regulisati pomoću *lacI* represora, poseduje jačinu *trp* promotora, a pet do deset puta je efikasniji od *lacUV5* promotora. Za razliku od *lacUV5*, *tac* promotoru nedostaje mesto vezivanja za CAP, pa je to najverovatnije jedan od razloga što je daleko manje osetljiv na kataboličku represiju. Ova osobina mu ujedno omogućava visoku aktivnost u medijumu bogatom glukozom.

Sličnu konstrukciju *tac* promotoru objavili su Boros *et al.* (1986), fuzionisanjem "-10" regiona *lacZ* promotora sa "-35" regionom *rrnB P₂* promotora. Rezultujući promotor je

moguće regulisati preko *lac* represora i indukovati sa IPTG-om.

Nishi i Itoh su 1986. konstruisali promotor kod kojeg su AT regioni *trp* promotora zamenjeni AT blokovima PL promotora faga λ i dobili višu aktivnost.

Ekspresioni sistem koji se sastoji od dva plazmida i funkcioniše na nivou temperaturne regulacije, konstruisali su Shinsky et al. (1981). U ovom sistemu, plazmid koji sadrži *lac* represor, na temperaturi od 42° C prestaje da se replikuje, dok se plazmid, na kome je gen pod kontrolom *lac* promotor/operator sistema, istovremeno normalno replikuje u više kopija po ćeliji.

1.5. KONSTRUISANJE EFIKASNOG EKSPRESIONOG SISTEMA

Da bi se dobila hiperprodukcija specifičnih proteina znatan broj radova je bio posvećen konstruisanju optimalnih promotora, operatora, mesta vezivanja ribozoma, transkripcionih terminatora, "origin"-a replikacije itd. Ovakvi eksperimenti su, osim krajnjeg komercijalnog cilja, svakako doprinosili daljem razumevanju molekularnih mehanizama u ćeliji.

Neki plazmidi su stekli široku primenu zahvaljujući svojoj relativno maloj veličini i velikom broju kopija. Zahvaljujući ovim svojstvima, izabrani su kao vektori za kloniranje i ekspresiju gena u bakterijama i kvascima. Slično tome, ekstrahromozomalni elementi zasnovani na virusima, u upotrebi su kod sisarskih ćelija.

Plazmidi koji su predviđeni za kloniranje gena, a konstrukciono su jednostavniji, imaju potpuno drugačije karakteristike od onih koji su predviđeni za visoku ekspresiju. Uopšteno, vektori za kloniranje služe kao prevoznici između hromozoma i ekspresionog vektora.

1.5.1. Osnovni dizajn ekspresionog vektora

U ekspresionom vektoru sadržano je nekoliko osnovnih elemenata. Ekspresioni plazmid mora da ima:

1. Region potreban za stabilnu replikaciju i kontrolu broja kopija.
2. Selekcioni marker kao što je gen koji ćeliji domaćinu pruža rezistenciju na neki antibiotik.
3. Efikasan promotor za inicijaciju i kontrolu transkripcije kloniranog gena.
4. Mesto vezivanja ribozoma (Shine-Dalgarno sekvencu) za inicijaciju translacije 5' uzvodno od odgovarajućeg ATG tripleta.

Svaki od ovih faktora, kako nezavisno tako i združeno, utiče na ekspresiju. Čak i gen za rezistenciju na antibiotik, koji bi mogao najmanje da ima uticaja na nivo ekspresije, može da dovede do nestabilnosti plazmida i da bitno utiče na ekspresiju. Zato je vrlo važno konstruisati ekspresioni sistem sa najboljom kombinacijom ovih elemenata. Na taj način, ukoliko se odgovarajući promotor, RBS ili neka druga komponenta pokaže kao nepogodna, moguće je izbaciti je i zameniti nekom drugom na jednostavan način.

Na žalost, postoji faktor koji se ne može uvek unapred predvideti, a to su svojstva proteina koji treba da se sintetiše. Na primer, veličina proteina, broj cisteina, osetljivost na povišenu temperaturu (recimo, pri indukciji PL promotora faga λ na 42°C), osobine umotavanja, toksični efekat na ćelije u kojima se proizvod kloniranog gena sintetiše i rastvorljivost u domaćinu ili medijumu morali bi da se imaju na umu prilikom konstruisanja ekspresionog sistema. Kako to nije moguće kod novih produkata gena, najbolje je da se predvidi fleksibilni vektor stvaranjem jedinstvenih restrikcionihi mesta između svih osnovnih kontrolnih elemenata. Konstruisanje promotora čije će osnovne karakteristike omogućavati visok nivo

fleksibilnosti kontrole ekspresije kloniranog gena može da bude od najvećeg značaja.

Konačno, ne treba zaboraviti da odgovarajući uslovi rasta ćelija domaćina (medijum, temperatura, momenat indukcije, itd.) mogu imati značajan uticaj na krajnji rezultat ekspresije kloniranog gena.

Većina ekspresionih sistema koristi *E. coli* kao domaćina, a derivate pBR322 kao vektore (Bolivar *et al.* 1977, Balbás *et al.* 1986). Ovaj plazmid sadrži kodirajuće regione za rezistenciju na ampicilin i tetraciklin, kao i elemente neophodne za kontrolu replikacije koji omogućavaju da se dobije 20-60 kopija po ćeliji u zavisnosti od domaćina. Bez antibiotske selekcije ne zapaža se značajan gubitak plazmida kod ćelija koje rastu čak do trideset generacija. To je razlog što rezistencija na antibiotik i region neophodan za kontrolu replikacije kod pBR322 plazmida predstavlja odličan polazni materijal za konstrukciju ekspresionog vektora. Poznata je kompletna sekvenca nukleotida plazmida pBR322 (Sutcliffe, 1978, 1979) što je omogućilo određivanje više jedinstvenih restrikcionijskih mesta za ubacivanje promotorskih sekvenci i RBS.

1.5.2. Uklapanje mesta vezivanja ribozoma

Pokazano je da efikasnost inicijacije translacije prvenstveno zavisi od stepena komplementarnosti mesta vezivanja ribozoma (RBS) sa 16S rRNK, udaljenosti od start kodona, stepena umotanosti i, konačno, stabilnosti mRNK. Drugi faktori, kao što su dodatne specifične sekvence i opšti sadržaj A + T u datom regionu, mogu da budu od značaja i dalje da komplikuju optimalno konstruisanje mesta vezivanja ribozoma. Osim toga, kako "inicijaciona struktura" translacije obuhvata sekvencu 5' regiona rRNK, efikasnost mesta vezivanja ribozoma će zavisiti od pojedinačnog gena (Buell i Panayotatos 1985). Moguće je svakako startovati sa RBS uzetim od nekog veoma efikasnog gena (na primer, gen

10 T7 faga, Olins *et al.* 1988). Ishod ovakvog pristupa je uspešna translacija ukoliko se sekvenca RBS dobro "pakuje" sa genom koji treba da se eksprimira.

1.5.3 Formiranje restrikcionih mesta u tački fuzije

Pod veoma srećnim okolnostima dolazi do formiranja jedinstvenog restrikcionog mesta na tački fuzije RBS regiona i kodirajućeg regiona gena tako da dalje manipulacije nisu potrebne. U većini slučajeva restrikciono mesto mora da se ubaci na tačnu poziciju u odnosu na start kodon.

1.5.4. Delecija specifičnih sekvenci DNK pomoću egzonukleaze Bal 31.

Ukoliko ne postoji pogodno restrikciono mesto u okolini ATG kodona kloniranog gena, željene regione DNK moguće je ukloniti kontrolisano pomoću egzonukleaze Bal 31.

Bal 31 egzonukleaza deluje tako što progresivno uklanja bazne parove linearne DNK sa oba kraja (Gray *et al.* 1975, Panayotatos i Truong, 1981). Na taj način dobija se familija progresivno skraćenih molekula DNK (na primer, linearizovanog plazmida). Ovakvom obradom molekula DNK moguće je prekrajanje i primicanje sekvencama strukturalnog gena. Ova enzimaska reakcija je značajna, jer ukoliko ne postoji pogodno restrikciono mesto u blizini ATG kodona, moguće je izvršiti uklapanje sekvence nekog strukturalnog gena poreklom iz eukariota sa regulatornim sekvencama *E. coli*.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Bakterija *Escherichia coli*, najbolje proučeni mikroorganizam, je kao domaćin za ekspresiju stranih gena umnogome doprinela da se sakupi veliki broj saznanja o regulaciji ekspresije ovih gena.

Poznato je da zadovoljavajuća ekspresija gena kloniranih u *E. coli* najčešće zahteva njihovo prekrajanje i priključivanje uz bakterijske regulatorne elemente.

Takođe se zna da karakteristike regulatornih sekvenci mogu značajno da utiču na ekspresiju kloniranog gena. Kako ne postoji jedna univerzalna regulatorna sekvenca koja sadrži elemente promotora i operatora koja bi efikasno poslužila za ekspresiju bilo kog kloniranog gena, tada se obično u zavisnosti od prirode proizvoda kloniranog gena i bira najpogodnija promotorska sekvenca.

Imajući u vidu navedene činjenice, istraživanja u ovom radu imala su sledeći tok.

Prvo, u našim istraživanjima kao "model gen" za ekspresiju korišćen je gen za humani β -interferon. Pre stavljanja ovog gena pod kontrolu bakterijskih regulatornih sekvenci, potrebno je bilo ukloniti prirodne eukariotske regulatorne sekvence koje se nalaze 5' uzvodno od strukturalnog gena.

Drugo, pored već dobro proučenog jakog hibridnog *tac* promotora, konstruisali smo novi hibridni P_Lt_l promotor/operator, sa ciljem da na osnovu pretpostavljenih drugačijih osobina u odnosu na postojeće prirodne ili hibridne promotor/operatorske sekvence, dobijemo fleksibilan promotor koji bi mogao da posluži za dobijanje ekspresije različitih gena čiji se proizvodi razlikuju po svojim karakteristikama.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Sojevi *E. coli* i plazmidi

Tabela I. Sojevi *E. coli*

Soj	Genotip	Poreklo
DH1	CF^- , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (Cr^- , m^+) <i>supE44</i> , <i>relA1</i> ®, λ^-)	Hanahan 1983.
JM101	Δ (<i>lac-pro</i>), <i>supE</i> , <i>thi</i> , [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985.
POP2136	<i>maltT</i> , Pr, $\underline{cI857}$, <i>malPQ</i> derivat MM294 (CF^- <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> λ)	Dobijen od dr Raibaud-a preko dr Stanley-a

Soj DH1 je korišćen kao recipijent za plazmide pBR322, pIF4 i ptac12; JM101, je korišćen kao recipijent za plazmidne konstrukcije koje sadrže regione za koje se vezuje *lacI* represor; POP2136 je korišćen kao recipijent za plazmidne konstrukcije koje sadrže *P_{Ltl}* promotor-interferon β fuziju, (dobijen je ljubaznošću dr K. Stanley-a).

Plazmid ptac12 (Amann *et al.* 1983) je korišćen za izolovanje fragmenta koji sadrži *tac* promotor; plazmid pFBI1 (Pharmacia, pFBI plasmid kit Cat. no. 27-4988) je korišćen za kloniranje fragmenta koji sadrži gen za *CIts857* represor iz faga λ ; plazmid pCON5 (De Lorenzo *et al.* 1988) je korišćen za kloniranje promotor-interferon-*lacZ* fuzija (dobijen je ljubaznošću dr V. de Lorenzo-a); plazmid pBR322 (Bolivar *et al.* 1977, Sutcliffe, 1978, 1979), je korišćen za kloniranje humanog β -interferona, što je opisano u radu Crkvenjakov *et al.* (1984), a kasnije su ga isti autori

izolovali i identifikovali kao klon pIF4 (nije objavljeno); plazmid pEMBLex2 (Sollazzo et al. 1985) je korišćen za izolovanje PL promotora faga λ .

3.1.2. DNK

DNK faga λ (BRL cat. No. 5250SA) je korišćena za izolovanje temperaturno senzitivnog represora (cI857) ili nakon digestije sa nekim restrikcionim enzimom kao standard za elektroforezu.

Poreklo plazmidne DNK je opisano u prethodnom odeljku (3.1.1.)

3.1.3 Restrikcioni enzimi

Osim komercijalnih enzima nabavljenih preko firme BRL, Biolabs, Amersham, Pharmacia, Serva i Boeringer, neke od njih (*Eco* RI, *Bgl* II i *Bam* HI) smo izolovali i koristili u toku eksperimenata kloniranja i ekspresije humanog β -interferona.

3.1.4. Radioizotopi

Sledeći izotopi su korišćeni za obeležavnje DNK.

Adenozin 5'-[γ -³²P] trifosfat, trietilamonium so (\approx 3000 Ci/mmol) Amersham (PB.10168),

Deoksiadenozin 5'-[α -³²P] trifosfat, trietilamonium so (\approx 3000 Ci/mmol) Amersham (PB.10204),

Deoksicitidin 5'-[α -³²P] trifosfat, trietilamonium so (\approx 3000 Ci/mmol) Amersham (PB.10205),

Deoksiguanozin 5'-[α -³²P] trifosfat, trietilamonium so (\approx 3000 Ci/mmol) Amersham (PB.10206),

Timidin 5'-[α -³²P] trifosfat, trietilamonium so (\approx 3000 Ci/mmol) Amersham (PB.10207),

3.1.5. Enzimi

Alkalna fosfataza (CIAP), Bal 31 nukleaza, *E. coli* DNK polimeraza I "Klenow fragment" (PolIK), T₄ DNK ligaza, T₄ polinukleotid kinaza (PNK), RNKaza su nabavljani iz sledećih firmi: Amersham, BRL, Biolabs, Pharmacia.

3.1.6. Hemikalije

Od inostranih kompanija Serva, Sigma, Aldrich i LKB nabavljane su sledeće hemikalije: adenosintrifosfat, akrilamid, albumin (BSA - bovine serum albumine), amonijumacetat, amonijumsulfat, ampicilin, bisakrilamid, bromfenolplavo, deksinukleotidtrifosfati (dNTP), dimetildihlorsilan, dimetilsulfat (DMS), dimetilsulfoksid (DMSO), EDTA, hidrazin, ksilencijanol, magnezijumacetat, magnezijumhlorid, natrijumacetat, natrijumhlorid, natrijumdodecilsulfat (SDS), natrijumhidroksid, piperidin, rubidijumhlorid, spermidin, tetraciklin, Tris, Triton X-100, i urea.

Hemikalije koje su nabavljane od domaćih proizvođača Kemika, Alkaloid: amonijumacetat, amonijumsulfat, EDTA, magnezijumacetat, magnezijumhlorid, natrijumacetat, natrijumhlorid, natrijumhidroksid i urea.

Fluorescentne ploče za tankoslojnu hromatografiju, TLC K6F Silica gel, nabavljene su od firme Whatman, (Cat No 4861-620), silikonizovana staklena vuna od firme Serva, (Cat. No 22367), membranski filtri (0,45 μ) od firme Sartorius, Mixed bed resine, AG501-X8(D) od firme Bio Rad, PEI-cellulose (TLC -Ready-Foils Ref. No. 394032) od firme Schleicher & Schüll, film za autoradiografiju - Kodak X-Omat AR (Cat. 150 6955), Film za industrijsku autoradiografiju FIR-10 Fotokemika. Reagensi za sintezu oligodeksinukleotida su nabavljani od firme Applied Biosystems.

3.2. METODE

3.2.1. Uzgojanje bakterijskih kultura

Bakterijski sojevi su kultivisani u medijumu LB (1% Bacto tryptone (Difco), 1% NaCl, 0,5% Yeast extract (Difco)) u prisustvu ampicilina 40 μ g/ml ili tetraciklina, 15 μ g/ml, ili oba (Sigma). Šolje sa čvrstom podlogom su pripremane dodatkom 1,5% Bacto-agara (Difco) u medijum LB. Kolonije koje proizvode β -galaktozidazu su detektovane razmazivanjem na šolju 40 μ l 2% X-Gal-a u dimetilformamidu i 40 μ l vodenog rastvora 100mM IPTG-a.

3.2.2. Izolovanje plazmidne DNK

Izolovanje plazmidne DNK za analitičke ili preparativne potrebe rađeno je ili po protokolima koje je objavio Maniatis et al. 1982 ili su korišćene modifikacije metoda koje su opisane u daljem tekstu.

3.2.2.1. Izolovanje manjih količina plazmidne DNK za analitičke potrebe - "mini prep" (1-20 μ g)

1. Inokulira se 20 ml medijuma (LB) i inkubira preko noći uz snažno mućkanje u prisustvu odgovarajućeg antibiotika
2. 10ml kulture se centrifugira na 1500xg (3000-4000 rpm u kliničkoj centrifugi) 15 min
3. talog se resuspenduje u 1 ml STET pufera (50mM Tris.HCl pH8,0; 50mM EDTA pH7,5-8,0; 8% Saharoza, 5% TritonX-100) i prebaci u "Eppendorf" epruvetu od 1 ml
4. doda se 2-3 μ l lizozima (10 mg/ml H₂O) i kuva 3 minuta na 90° C i centrifugira 15 minuta na 12000xg
5. supernatant se pažljivo odlije u drugu epruvetu i doda se 2-3 μ g RNKaze (RNKaza oslobođena DNKaze)* i inkubira 15-20 minuta na 37° C
6. doda se 0,67 vol 5M amonijum acetata + 0,60 vol izopropanola, dobro se promeša i nakon 10 minuta

centrifugira na 12000xg (\approx 12000 rpm u Eppendorf centrifugi)
7. talog se opere ledenim etanolom, osuši na vazduhu ili kratko u eksikatoru ili "Speed-Vac" centrifugi i resuspenduje se u 500 μ l 2M amonijum acetata na 4° C i nakon 5 minuta centrifugira 5 minuta na 12000xg (\approx 12000 rpm u Eppendorf centrifugi)

8. talog se odbaci, a supernatantu se doda 300 μ l izopropanola i drži 10 min na sobnoj temperaturi

9. centrifugira se 10 minuta na 12000xg (12000 rpm) i talog se opere ledenim etanolom, kratko prosuši i rastvori u 20-50 μ l TE pufera (10mM Tris.Cl pH7,5; 1mM EDTA pH8,0) ili dejonizovane vode i čuva se na -20° C.

Ova modifikovana metoda zahteva nešto više vremena ali obezbeđuje više plazmidne (oko 10-20 μ g) DNK čija je čistoća dovoljna da se efikasno odredi primarna struktura (redosled nukleotida) po metodi Maxama i Gilberta (1980) ili uradi više restrikcionih analiza.

*RNKaza oslobodjena prisustva DNKaze :

Rastvoriti RNKazu A (pancreatic RNase) u koncentraciji od 10 mg/ml u 10mM Tris.Cl (pH 7,5), 15mM NaCl. Zagrevati na 100° C 15 minuta i ostaviti da se hladi sporo do sobne temperature. Raspodeliti na manje alikvote i čuvati na -20° C.

3.2.2.2. Preparativno izolovanje plazmidne DNK u većim količinama za konstruisanje vektora i kloniranje.

1. 500 ml medijuma se inokulira sa 50 μ l male količine kulture koja je rasla preko noći i snažno mućka u prisustvu određenog antibiotika do optičke gustine od oko 0,5-08 A₆₀₀. Kultura se centrifugira na 1600xg (4000 rpm, Sorvall centrifuga, rotor GSA, polikarbonatne epruvete od 250 ml) 20 minuta na 4° C

2. talog se resuspenduje u 16 ml glukoznog pufera (50mM glukoza, 10mM EDTA pH 8,0; 25mM Tris.Cl pH 8,0), doda se 8mg lizozima

3. posle 15 min na 4° C doda se 45 ml 0,2M NaOH, 1% SDS, pažljivo promeša i drži 5 minuta na 4° C
4. uz lagano mešanje dodaje se 35ml 3M Na-acetata pH 4,8 i drži 30-60 minuta na 4° C
5. centrifugira se na 17000xg (15000 rpm, Sorvall centrifuga, rotor SS34, polikarbonatne epruvete od 30 ml) 10 min na 4° C
6. supernatantu se doda 0,6 zapremina izopropanola i nakon 20 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugira na 8000xg (10000 rpm, Sorvall centrifuga, rotor SS34, Corex epruvete od 30 ml) 10min na 4° C
7. talog se opere ledenim etanolom i osuši u eksikatoru pod vakuumom i rastvori u 12ml TNAC-a (50mM Tris.Cl, 100mM Na-acetat pH 8,0), a zatim se doda se 600 µg RNKase i inkubira 30 minuta na 37° C
8. sa 0,5 zapremina smeše fenol/hloroform* uradi se ekstrakcija i nakon 10 min centrifugiranja na 2000xg (5000 rpm, Sorvall centrifuga, Corex epruveta od 30 ml, rotor SS34) odvoji se vodena faza kojoj se doda 0,1 zapremina 3M Na-acetata i 0,54 zapremina izopropanola i drži 20 minuta na sobnoj temperaturi
9. centrifugira se 10 min na 8000xg (10000 rpm, Sorvall centrifuga, Corex epruvete od 30 ml, rotor SS34), i talog se opere ledenim etanolom, suši i resuspenduje u 5 ml 2M amonijumacetata
10. posle 5 minuta na 4° C, centrifugira se 5 minuta na 4° C na 8000xg (10000 rpm, Sorvall centrifuga, Corex epruvete od 15 ml, rotor SS34)
11. supernatantu se doda 0,54 zapremina izopropanola i drži 20 minuta na sobnoj temperaturi a zatim se 10min centrifugira na 8000xg (10000 rpm, Sorvall centrifuga, Corex epruvete od 15 ml, rotor SS34)
12. talog se ispira ledenim etanolom (-20 C), suši i rastvara u 100-500 µl dejonizovane H₂O ili TE pufera (10mMTris.ClpH7,5; 1mM EDTA pH 8,0) . Čuva se na -20 C.

Na ovaj način moguće je izolovati znatnu količinu plazmidne DNK (~ 300-600 µg DNK/500ml bakterijske kulture), bez kontaminacije sa RNK i hromozomalnom DNK.

*Hloroform/fenol - smeša se sastoji od 1 zapremine fenola i jedne zapremine smeše hloroform-izoamilalkohol (24:1)
Fenol se koristi predestilovan (sa dodatkom 0,1% 8-hidroksihinolina kao antioksidansa) i zasićen, obično sa 0,1M Tris.Cl pH 8,0.

3.2.2.3. Modifikovana metoda izolovanja plazmidne DNK pomoću gradijenta sa cezijum hloridom

1. Inokulira se 500ml medijuma sa kulturom koja je rasla preko noći i pusti da raste u prisustvu odgovarajućeg antibiotika do 0,7 OD A₆₀₀
2. doda se 100mg hloramfenikola i kultura raste preko noći
3. u rashlađenom rotoru obore se ćelije na 45000 rpm za 15 minuta.
4. talog se resuspenduje u 12 ml glukoznog pufera (50mM glukoza, 10mM EDTA pH 8,0; 25mM Tris.Cl pH 8,0) i prebaci u epruvete za centrifugiranje ("Corex" od 15ml).
5. doda se 2ml lizozima (20mg/ml lizozim u glukoznom puferu) i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi.
6. doda se 27,6 ml 1% SDS, 0,2M NaOH, promeša pažljivo i rashladi u ledenoj vodi 5 minuta, precipituju se proteini i hromozomalna DNK dodatkom 14 ml K-acetata (60,0ml 5M kalijumacetat; 11,5ml sirćetna kiselina-glacijalna; 28,5ml H₂O) i inkubira se u ledenoj vodi 15 minuta i centrifugira se 10 minuta na 15000 rpm
7. supernatant se prebaci u dve epruvete od 30 ml i doda se 0,5 zapremina smeše hloroform/fenol i ekstrahuje
8. centrifugira se 10 minuta na 5000 rpm i gornjoj vodenoj fazi se doda 0,6 zapremina izopropanola i precipituje se 15 minuta na ledu
9. centrifugira se 10 minuta na 10000 rpm i talog osuši. Talog se resuspenduje u 2,4 ml TE pufera, pripremi se 43% w/w CsCl (43g CsCl/100g rastvora). Doda se 8ml cezijumhlorida u plastične epruvete "Quick-seal" (Beckman)

10. doda se 4,2g CsCl u 1,2ml TE (sa uzorkom), rastvori i doda 0,4ml 10mg/ml etidijumbromida
11. formira se gradijent ubacivanjem gušćeg CsCl na dno
12. epruvete se zatope i centrifugiraju 24hr na 42K, 17hr na 50K, ili 5hr na 60K.

3.2.3. Digestija plazmidne DNK restrikcijom endonukleazama

Sve reakcije digestije plazmidne DNK su rađene prema uputstvima koja su data u laboratorijskom priručniku (Maniatis *et al.* 1982) ili prema uputstvima proizvođača. Digestija je rađena sa količinama DNK od 0,1-100 μ g u zapreminama od 10-500 μ l pufera sa 1-3 jedinice enzima po 1 μ g DNK u vremenu od 1-3 sata. U nekim eksperimentima je digestija rađena preko noći pri čemu su količine enzima redukovane deset puta. Uopšteno, u zavisnosti od restriktione endonukleaze, molarne koncentracije sastojaka pufera su se kretale u sledećim granicama: 10-20mM Tris-HCl pH 7,5-8,0; 0-150mM NaCl; 7-10mM MgCl₂; 0-7mM β ME.

3.2.4. Digestija DNK nukleazom Bal31

Kako je u našem slučaju bilo potrebno da se sa linearizovanog pIF₄ plazmida sa oba kraja "skine" približno 150bp, uslovi koje smo koristili pri digestiji sa Bal31 nukleazom bili su sledeći:

DNK (pIF ₄ , ~40 μ g)	225 μ l
BSA (5 μ g/ μ l)	15 μ l
5xBal31 pufer	60 μ l
<hr/>	
Bal31 nukleaza (Biolabs) (1U)	1 μ l

Sastav 5xBal31 pufera je sledeći:

60mM CaCl₂, 60mM MgCl₂, 2500mM NaCl, 100mM Tris.Cl pH 8,0
5mM EDTA

Nakon 4, 6 i 8 minuta digestije, uzimani su alikvoti od 100 μ l i reakcija je zaustavljena sa 20 μ l 100mM EGTA^{*}. Iz pojedinačnih zaustavljenih reakcija su uzimane alikvoti od 4 μ l, razblaživane do 20 μ l (finalno 100mM NaCl) i na osnovu

proizvoda *Eco* RI digestije vršena je procena skraćenja dvolančanog molekula DNK u pojedinim vremenskim intervalima.

*EGTA gradi helate specifično sa dvovalentnim kalcijumom i inhibira aktivnost Bal31 nukleaze, dok slobodan magnezijumov jon omogućava nesmetano dejstvo restrikcionih enzima.

3.2.5. Defosforilacija 5' krajeva DNK alkalnom fosfatazom

Defosforilacija je rađena sa alkalnom fosfatazom izolovanom iz creva teleta (calf intestinal alkaline phosphatase-CIAP) pre nego sa bakterijskom alkalnom fosfatazom (BAP) jer se inaktivacija CIAP-a uspešno vrši na temperaturi od 68° C u prisustvu SDS-a. Postupak je u potpunosti obavljen prema protokolu koji je dao Maniatis et al. (1982)

DNK 45 μ l
10xCIAP pufer* 5 μ l

CIAP enzim 0.01 jedinica/ 1pmol 5' kraja DNK

*500mM Tris.HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂; 1mM ZnCl₂; 10mM spermidin

Kod DNK sa isturenim 5' krajevima reakcija se odigrava na 37° C 30 minuta, a zatim se doda sveža količina enzima i reakcija ponovi, dok je kod DNK sa poravnatim 5' i 3' krajevima kao i uvučenim 5' krajevima nakon 15 minuta digestije na 37° C potrebno držati uzorak 15 minuta na 56° C i celu operaciju ponoviti sa svežim enzimom.

Inaktivacija enzima se radi 15 minuta na temperaturi od 68° C po dodatku 40 μ l H₂O, 10 μ l 10xSTE pufera (100mM Tris.HCl pH 8,0; 1mM NaCl; 10mM EDTA) i 5 μ l 10% SDS-a. Uzorak se ekstrahuje dva puta sa smešom fenol/hloroform i dva puta sa hloroformom i propusti kroz Sephadex G-50 kolonu.

3.2.6. Popunjavanje uvučenih 3' krajeva DNK pomoću velikog fragmenta polimeraze I DNK (Klenow fragment)

Popunjavanje uvučenih 3' krajeva lanaca DNK je rađeno primenom protokola koji je dao Maniatis *et al.* 1982,

DNK (~1pmol krajeva)	14μl
10x "Nick"-translacioni pufer [§]	2μl
dATP, dGTP, dCTP, TTP	4μl (10nmola svakog)*

PolIK 1 jedinica
Inkubira se na sobnoj temperaturi 30 minuta. Reakcija se zaustavi sa 1μl 500mM EDTA, ekstrahuje dva puta sa smešom fenol/hloroform, dva puta sa hloroformom i propusti kroz Sephadex G-50 kolonu.

*Sva četiri deoksinukleotida se dodaju samo ako su i zastupljeni u komplementarnom lancu. Takodje, u pojedinim eksperimentima je ubacivan neki od [α -³²P]dNTP ukoliko je bila potrebna obeležena DNK.

[§]500mM Tris.Cl pH 7,2; 100mM MgSO₄, 1mM DTT, 500μg/ml BSA

3.2.7. Ligacija DNK

Ligacija molekula DNK je rađena pomoću enzima T₄ DNK ligaze u puferizovanoj sredini u prisustvu Mg⁺⁺, ATP-a i DTT-a:

DNK*	14.4μl (100 fmol)
10x ligacioni pufer [§]	2.0μl
ATP 10mM	2.0μl
DTT 100mM	1.6μl

T₄ DNK ligaza (0.1 jedinica)
Inkubacija se radi preko noći na 15° C

*5' krajevi vektora su defosforilisani a molarni odnos vektor:insert = 1

[§]330mM Tris.Cl pH 7,4; 66mM MgCl₂

U slučaju kada su 5'i 3' krajevi koji treba da se ligiraju poravnati ("blunt-end"), rađena je ligacija na dva načina:

1) DNK se liofilizuje i rastvori u 5 μ l smeše koja se sastoji od 33mM Tris.Cl, pH 7,4; 6,6mM MgCl₂; 0,4mM ATP; 8,0mM DTT. Ligacija je urađena sa 100 jedinica T₄ DNK ligaze u zatopljenoj kapilari na 16°C preko noći.

Molarni odnos (defosforilisan vektor:insert) je bio 1.4, sa ukupno 3pmola "blunt-end" krajeva.

2) DNK (molarni odnos vektor:insert= 1, ukupno 2pmola "blunt-end" krajeva) je liofilizovana i rastvorena u 16 μ l H₂O.

DNK	16 μ l
5xligacioni pufer *	
("Blunt-end")	4 μ l

T₄ DNK ligaza 1 jedinica

Ligacija obavljena u "Eppendorf" epruveti od 500 μ l na temperaturi od 16°C preko noći. Na kraju se ligaciona smeša razblaži dejonizovanom H₂O do 100 μ l.

*250mMTris.HCl pH7,6; 50mMMgCl; 25%(w/v) polietilenglikol 8000; 5mM ATP; 5mM DTT

3.2.8. Transformacija E. coli plazmidnom DNK

Transformacija E. coli sa plazmidnom DNK je rađena po modifikovanoj metodi Hanahana (1983).

1. 10ml svežeg medijuma se inokulira sa 10 μ l prekonocne kulture i snažno mućka do 0.2-0.4 OD A₆₀₀. Kultura se rashladi na 4°C. Cela procedura u daljem radu se odvija na 4°C ukoliko nije drugačije naznačeno.

2. 1ml kulture se sedimentira u "Eppendorf" epruveti od 1,5ml 20-30 sekundi na 2500xg (6000rpm u Eppendorf centrifugi).

3. Čelije se isperu sa 100 μ l hladnog transformacionog pufera (Tfb) * i resuspenduju u 200 μ l Tfb.

4. Nakon 20 minuta stajanja na ledu doda se 7 μ l DMSO i posle 5 minuta doda se nova količina od 7 μ l DMSO.

Pripremanje gela za elektroforezu

1. Odmeri se određena količina agaroze i kuva sa puferom dok se agarozna ne rastvori
2. Rastvorena agarozna se hladi do 50° C uz mešanje na magnetnoj mešalici i prebaci u unapred spremljen kalup
3. Kada gel kompletno očvrstne, pažljivo se izvuče česalj, stavi se gel u kadu za elektroforezu i nalije pufer preko gela
4. Na pet zapremina uzorka se dodaje jedna zapremina pufera za uzorak (0.25% bromfenol plavo i 40% w/v saharozna u H_2O).
4. Uslovi elektroforeze: 1-5 V/cm gela
5. Etidijum bromid se dodaje u pufer za elektroforezu (0.5 μ g/ml H_2O)

3.2.10. Izolovanje i prečišćavanje DNK elektroforezom na gelu od poliakrilamida

Uzorak se seče sa odgovarajućim restrikcionim enzimom nakon čega se vrši deproteinizacija sa istom zapreminom smeše fenol/hloroform dva puta, a zatim još dva puta sa hloroformom. Između svake ekstrakcije smeša se centrifugira 3 minuta na 12000xg (12000 rpm u centrifugi tipa "Eppendorf"), vodena faza u kojoj je DNK se čuva, a organska faza se baca. Alkoholna precipitacija se radi sa 0,1 zapreminom 3M Na-acetata i 3 volumena 98% etanola. Dobro se promeša i stoji >10 min na -70° C u smeši suvi led etanol. Uzorak se zatim centrifugira 12000xg 10 minuta, opere ledenim etanolom i suši. Uzorak se rastvori u 10-30 μ l pufera za akrilamid gel elektroforezu i nanese u otvor na gelu površine 30mm² na ploču dimenzija 1,5x200x400mm. Koncentracija gela se određuje prema dimenzijama fragmenta koji treba da se izoluje.

Koncentracija poliakril- amida		Dužina lanca polinukleotida koja odgovara migraciji boje	
akrilamid	AA/bis	bromfenol plavo	ksilencijanol
8%	29:1	20	125
5%	19:1	55	170
4%	19:1	83	400
4%	29:1	100	430

Uzorak se rastvara u puferu koji sadrži:

10% glicerol

50 mM Tris-Borat pH 8,3

0.05% xylen cyanol

0.05% bromphenol blue

Uslovi elektroforeze: 40 mA, 10W

Elektroforeza traje dok boja ne pređe određenu razdaljinu.

Pozicija željenih traka DNK se određuje tako što se između ploče za tankoslojnu hromatografiju impregniranu fluorescentnom bojom i UV lampe (254nm) postavi gel.

Traka se iseče i gel sa trakom se fino izmrviti u "Eppendorf" epruveti od 1,5ml dok se ne dobije "pasta", doda se 600 μ l pufera za eluiranje (500mM amonijumacetat; 10mM magnezijumacetat; 1mM EDTA; 0.1% SDS) i drži preko noći na 37° C.

Smeša se prebaci u plastični špric od 2ml u kome se nalazi čep od silikonizovane staklene vune i supernatant propusti u silikonizovanu* "Eppendorf" epruvetu od 1,5ml centrifugiranjem na 200xg (Klinička centrifuga, Heraeus Labofuge, 1300rpm) 3 minuta.

Supernatant se 4-5 puta ekstrahuje sa jednakom zapreminom n-butanola, upari na "speed vac-u" do 100 μ l i propusti kroz Sephadex G-50 kolonu.

Ovako izolovana i prečišćena DNK može da se upotrebi za sve dalje manipulacije.

*Smeša za silikonizovanje: 5% dimetildihlorsilan u hloroformu ili ugljentetrahloridu

Zapremine osnovnih komponenti potrebnih za spravljanje poliakrilamidnog (PAA) gela različitih koncentracija.

	(% PAA gela									
	3	4	5	6	8	10	12	15	20	
	Zapremine komponenti u ml									
Akrilamid*	15	20	25	30	40	50	60	75	100	
10xTris-Borat § Dejonizovana voda	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
TEMED	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
5% amon- persulfat	2	2	2	2	2	2	2	2	2	

* 40% akrilamid (akrilamid/bis 19:1)

§ 10xTris-Borat pH 8,3: Tris baza 108g
Borna kiselina 56g
500mM EDTA pH 8,0 40ml

3.2.10.1. Prečišćavanje sintetisanih deoksioligonukleotida na gelu od poliakrilamida

Sintetisani oligonukleotidi se skidaju sa kolone sa koncentrovanim amonijakom. Uklanjanje zaštitnih grupa sa funkcionalnih grupa na bazama obavlja se u prisustvu koncentrovanog amonijaka u dobro zaptivenim posudama na 55° C najmanje šest sati. Amonijačni rastvor oligonukleotida se uparava do suva na "Speed vac"-u.

Posle skidanja sa CPG kolone i "deprotekcije" sintetisanih oligonukleotida korišćena je metoda prečišćavanja na poliakrilamidnom gelu.

U sastav poliakrilamida ulazi 7M urea, 90mM Tris-borat pH 8.3 i 2mM EDTA. Izbor koncentracije akrilamida se određuje prema sledećim kriterijumima:

<u>dužina oligomera</u>	<u>koncentracija akrilamida</u>
< 20 baza	20%
20-30 "	16%
> 30 "	12%

Napravi se poliakrilamid gel dimenzija 400x200x1,5mm sa otvorima za nanošenje uzorka od 20x1,5mm. Preporučljivo je da gel stoji preko noći ili bar nekoliko sati pre puštanja uzoraka na elektroforezu. Preelektroforeza se obavlja najmanje 30 minuta. Liofilizovan sintetisan oligomer se rastvara u minimalnoj zapremini dejonizovanog 98% formamida koji sadrži 10mM EDTA. Koncentracija uzorka je približno 1 OD (Azoo)/ μ l. Količina nanešenog uzorka varira između 3 i 6 OD (Azoo). Elektroforeza teče na 400V preko noći dok boja bromfenol plavo ne prevali razdaljinu od približno 30 cm. Po završenoj elektroforezi sečenje traka, eluiranje sa gela i dalje prečišćavanje se obavlja kao što je to opisano u proceduri za izolovanje i prečišćavanje DNK elektroforezom na poliakrilamid gelu (poglavlje Metode sekcija 3.2.9.).

3.2.11. Prečišćavanje DNK:

3.2.11.1. Sephadex G-50

Ovaj postupak donekle je modifikacija detaljno opisane procedure (Maniatis *et al.* 1982).

U plavi silikonizovani nastavak za automatsku pipetu od 1000 μ l ubaci se čep od silikonizovane staklene vune i u nastavku se formira kolona zapremine od 900 μ l Sephadex-a G-50. Kolona se formira centrifugiranjem u kliničkoj centrifugi Hereaus na 1600xg (3200rpm) tačno 3 minuta. Kolona se dva puta ispira sa 100 μ l TE pufera i između svakog ispiranja se centrifugira pod istim uslovima kao što je već opisano, a zatim se nanese 100 μ l DNK i opet centrifugira 3 minuta na 1600xg. Eluirana DNK se nalazi u zapremini od 100 μ l i može da se liofilizuje i čuva na -20° C.

3.2.11.2. Prečišćavanje DNK adsorpcijom na staklenim vlaknima

Ova metoda je rađena ili sa komercijalnom "opremom" za prečišćavanje DNK ("GENE CLEAN" KIT # 3105 "BIO 101") ili metodom koja je razvijena u našoj laboratoriji.

1. Iseče se traka sa agaroznog gela i izmeri masa (ili zapremina ako je uzorak DNK u rastvoru) i gel iseče na manje komadiće.
 2. Doda se dvostruka zapremina rastvora natrijumjodida*
 3. Ako je uzorak u agaroznom gelu zagreva se na 45° do 55° C 5 minuta ili duže dok se agarozna kompletno ne rastvori
 4. Doda se 1 μ l suspenzije staklenih vlakana u vodi/ μ g DNK i promućka na "vorteks" mešalici
 5. Inkubira se 5 min na 4° C
 6. Centrifugira se 15 sekundi na 12000xg (12000rpm u "Eppendorf" centrifugi)
 7. Talog se resuspenduje i ispira tri puta sa 10-50 zapremina smeše za ispiranje (etanol/voda/Tris/EDTA)* i centrifugira između svakog ispiranja na 12000xg 15 sekundi
 8. Talog se resuspenduje u vodi i zagreva na 45-50° C nekoliko minuta
 9. Centrifugira se na 12000xg 1-3 min
 10. Supernatant se pažljivo uzme i tačka 8-10 ponovi.
- Prečišćeni fragment DNK posle ovakve procedure je oslobođen proteina, RNK i malih molekula.

*rastvor natrijumjodida: (6M NaJ/0.2M Na-sulfit)

rastvoriti 1.2g Na-sulfita u 40 ml dejonizovane vode na 40-70° C. Polako se dodaje u rastvor koji se meša 45 g NaJ. Rastvor se konačno filtrira i čuva u tamnoj boci na 4° C.

*smeša za ispiranje: Etanol, 50% (v/v); Tris.Cl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0

Staklena vlakna (grade 106 Schleicher & Schull):

Staklena vlakna se u porculanskom avanu dobro samelju i sprae i sa dejonizovanom vodom se napravi emulzija (1mg/ μ l) čuva se na 4° C.

3.2.12. Radioaktivno obeležavanje DNK

Obeležavanje DNK smo vršili enzimskom reakcijom fosforilacije 5' hidroksilne grupe korišćenjem adenzin 5'-[γ -³²P] trifosfata kao prekursora i enzima T4 polinukleotid kinaze. Druga metoda se zasniva na popunjavanju uvučenih 3' krajeva dvolančane DNK sa 5'-[α -³²dNTP] kao prekursorima i enzimom "Klenow fragment" polimeraze DNK korišćenjem slobodnog 5' kraja dvolančane DNK kao templa.

Obeležavanje 5' hidroksilnih krajeva DNK:

DNK (defosforilisana)	5 μ l (do 50 pmola 5' krajeva)
dejonizovana voda	35 μ l
500mM Tris.HCl pH 7.6,	
100mM MgCl ₂ , 50mM DTT,	
1mM spermidin, 1mM EDTA	5 μ l
[γ - ³² P]-ATP, >3000 Ci/mmol	
50pmola ili više	5 μ l

1-10 jedinica PNK 30 min na 37° C

Obeležavanje popunjavanjem uvučenih 3' krajeva DNK:

DNK (1 pmol)	13 μ l
dNTP (2nmola svakog)	4 μ l
[α - ³² P]-dNTP >3000Ci/mmol	1 μ l

"Klenow fragment" 1 jedinica

30 min na sobnoj temperaturi

Kod oba načina obeležavanja reakcija se zaustavlja dodavanjem EDTA da finalna koncentracija bude 10mM. Kvalitet obeležavanja se proverava na tankoslojnoj hromatografiji na PEI celulozi pri čemu se kao rastvarač za eluiranje koristi 400mM NaH₂PO₄ pH 3.5. Ekspozicijom Röntgen filma dobijaju se tačke koje odgovaraju pokretljivosti - radiaktivnih komponenti. Pri tome R_f za ortofosfat treba da iznosi 0,6, za ATP 0,3 i za DNK 0,0.

3.2.13. Autoradiografija

Autoradiografija se u principu vrši prislanjanjem Röntgen (X-Ray) filma na gel, filter ili TLC pločicu gde se obeležena DNK nalazi. Dužina ekspozicije se određuje empirijski prema specifičnoj aktivnosti DNK. Upotreba jednog ili dva "SCREEN"-a za intenziviranje na temperaturama do -70° C može desetak puta da pojača intenzitet signala na filmu. Po završenoj ekspoziciji film se razvija u nekom od komercijalnih razvijaača ili u razvijaaču za Röntgen filmove sledećeg sadržaja:

NEGATIV RAZVIJAČ (X RAY)

VODA	750ml
METOL	3.5g
Na ₂ SO ₃	60.0g
HIDROHINON	9.0g
Na ₂ CO ₃	40.0g
KBr	3.5g

Dopuni se destilovanom vodom do 1000ml
 Film se razvija 5-7 minuta na 20° C

3.2.14. Odredjivanje primarne strukture (sekvenciranje) DNK

Odredjivanje primarne strukture DNK je radjeno po metodi Maxam-a i Gilbert-a (1980) prema sledećem skraćenom protokolu:

G	A&G	T&C	C
200µl G-puf*	10µl H ₂ O	10µl H ₂ O	15µl 5MNaCl
5µl DNK	10µl DNK	10µl DNK	5µl DNK
1µl DMS	2µl pf*	30µl hidrazin	30 µl hidrazin
20° C 6min	37° C 30 min	20° C 10±5min	20° C 10±5min
50µl DMS stop*	-70° C	200µl HZ stop*	200µl HZ stop*
750µl etanol	liofiliz.	750µl etanol	750µl etanol
5min -70° C		5min -70° C	5min -70° C
12000G 10min talog	20µl H ₂ O	12000G 10min talog	12000G 10min talog
	liofiliz.		
250µl NaAc		250µl NaAc	250µl NaAc
750µl etanol		750µl etanol	750µl etanol
5min -70° C		5min -70° C	5min -70° C
12000G 10min talog		12000G 10min talog	12000G 10min talog
etanol pranje sušenje		etanol pranje sušenje	etanol pranje sušenje
piperidine 0.1M 150µl	piperidine 0.1M 150µl	piperidine 0.1M 150µl	piperidine 0.1M 150µl
90° C 30min	90° C 30min	90° C 30min	90° C 30min
liofiliz. >2 časa	liofiliz. >2 časa	liofiliz. >2 časa	liofiliz. >2 časa
50µl H ₂ O	50µl H ₂ O	50µl H ₂ O	50µl H ₂ O
liofiliz. >2 časa	liofiliz. >2 časa	liofiliz. >2 časa	liofiliz. >2 časa
40µl H ₂ O	40µl H ₂ O	40µl H ₂ O	40µl H ₂ O
liofiliz. >1 čas	liofiliz. >1 čas	liofiliz. >1 čas	liofiliz. >1 čas
5µl boja formamid-NaOH	5µl boja formamid-NaOH	5µl boja formamid-NaOH	5µl boja formamid-NaOH
90° C 30min	90° C 30min	90° C 30min	90° C 30min
0° C	0° C	0° C	0° C
ELFO	ELFO	ELFO	ELFO

G-pufer: 50mM natrijumkakodilat pH 8,0; 1mM EDTA

DMS: dimetilsulfat

pf: piperidin/format pH 2,0 (4% mravlja kiselina doterana na pH 2.0 sa piperidinom)

DMS stop: 1.5M natrijumacetat pH 7,0; 1,0M β -merkaptoetanol; 100 μ g/ml tRNK

Hz stop: 0,3M natrijumacetat; 0,1M EDTA; 25 μ g/ml tRNK

3.2.15. Hemijska sinteza oligodeoksinukleotida

Sinteza oligodeoksinukleotida je rađena automatski na mašini firme Applied Biosystems model 381A. Sinteze su rađene na kolonama sa staklenim zrcima sa kontrolisanim porama na kojima je vezan prvi deoksinukleotid preko 3' hidroksilne grupe u količini od 0,2 μ mola (CPG- controlled pore glass). Sintetisani oligodeoksinukleotid je skidan sa kolone i prečišćavan kako je opisano u sekciji 3.2.9.1. Koncentrovanim amonijakom sa kolone su skinuti sintetisani oligonukleotidi a zatim je 10 do 12 sati rađena "deprotekcija" zaštićenih funkcionalnih grupa na 55° C u koncentrovanom amonijaku. Uzorak u amonijaku je zatim uparen do suva na "Speed Vac-u" i sintetisani oligodeoksinukleotid je prečišćavan elektroforezom na gelu od poliakrilamida kao što je opisano u poglavlju 3.2 Metode (sekcija 3.2.9.1.)

3.2.16. Određivanje aktivnosti β -galaktozidaze

Aktivnost β -galaktozidaze je merena po metodi Miller-a (1972)

1. Zasadi se 50 μ l kulture koja je rasla preko noći u medijumu LB u prisustvu odgovarajućeg antibiotika u 5ml 1X MEDIJUMA*

2. Mućka se u erlenmajeru od 50 ml do optičke gustine od oko 0.1-0.2 A_{600} , nakon čega se vrši indukcija (IPTG, temperaturni pomak,...).

3. Posle 100 do 120 min. indukcije kultura se stavi na led i meri se gustina ćelija na A_{600} .

4. Istovremeno se odvoji 0.1ml kulture i doda 0.9 ml "Z"-pufera§. Za niže vrednosti β -galaktozidaze može da se uzme 0.5 ml uzorka i 0.5 ml "Z"-pufera.
5. Dodaju se dve kapi hloroforma i jedna kap 0.1% SDS-a i promeša na "Vortex" mešalici.
6. Stave se epruvete u vodeno kupatilo na 28° C 10 min.
7. Reakcija počinje dodavanjem 0.2 ml ONPG-a (4mg/ml)
8. Vreme se meri štopericom (dok se ne razvije žuta boja)
9. Reakcija se prekida dodavanjem 0.5ml 1M Na₂CO₃ (5-20 min.)
10. Meri se optička gustina na 420 nm i 550 nm

*

1X MEDIJUM:

		10X M63	pH 7.0 (KOH)	
10X M63	100 ml	KH ₂ PO ₄	(1M)	136 g
20% glukoza	10 ml	(NH ₄) ₂ SO ₄		20 g
1M MgSO ₄	1 ml	FeSO ₄ · 7H ₂ O		5 mg
0.337% Tiamin	5 ml	H ₂ O		do 1000 ml
H ₂ O	884 ml			

§

"Z" pufer

16.10g	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	(0.06M)	pH 7.0
5.50g	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	(0.04M)	
0.75g	KCl	(0.01M)	
0.246g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	(0.001M)	
2.7 ml	β -merkaptoetanol	(0.05M)	

Jedinice β -galaktozidaze se izračunavaju prema sledećoj formuli:

$$\text{Jedinica } \beta\text{-galaktozidaze} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t- vreme inkubacije sa ONPG-om

v- zapremina uzorka

3.2.17. Određivanje biološke aktivnosti β -interferona

Određivanje biološke (antivirusne) aktivnosti je rađeno na sledeći način.

Kada kultura koja sadrži klon koji produkuje β -interferon stigne u ranu stacioniranu fazu otpočinje se indukcija 1mM IPTG-om, temperaturnim pomakom ili na oba načina u vremenu od dva sata. Centrifugiraju se "Eppendorf" epruveti 3 minita na 12000xg (12000 rpm u "Eppendorf" centrifugi) na 4° C količine indukovane kulture koje sadrže po 1.5 OD A550. Talog se resuspenduje u 250 μ l rastvora za liziranje ćelija (lizozim, 10 μ g/ml; Tris.Cl, 10mM pH 7,0; EDTA 10mM pH 8.0) i nakon jednog sata stajanja u ledenom kupatilu (smeša led/voda) uzorak se četiri puta zamrzava u tečnom azotu i otapa stajanjem u ledenom kupatilu, a potom se deset puta propusti pomoću šprica od 1 ml kroz insulinsku iglu (26G). Uzorak se zatim centrifugira 10 minuta na 12000xg na 4° C a supernatant koji se čuva na -20° C je spreman za određivanje antivirusne aktivnosti interferona. Antivirusna aktivnost interferona je vršena na osnovu inhibicije citopatogenog efekta na humanim WISH ćelijama po metodi Rubinstein et al. (1981).

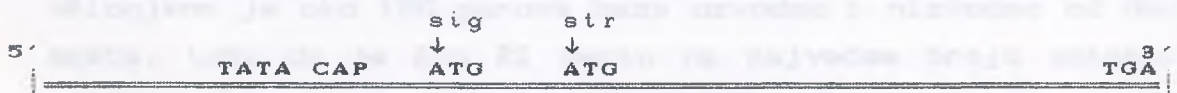
4. REZULTATI

4.1. Delecija egzonukleazom Bal 31 5' uzvodnog regulatornog regiona i regiona koji kodira za signal peptid β -interferona

S obzirom da se ishodni gen humanog β -interferona nalazio na vektoru koji u tom obliku nije bio aktivan, neophodno je bilo da se obave dve bitne operacije s ciljem da se dobije ekspresioni vektor i biološki funkcionalan proizvod kloniranog gena:

1. da se uklone regulatorni eukariotski delovi DNK i sekvenca koja kodira za signal peptid
2. da se klonirani gen sa odstranjenim nepotrebnim nizovima DNK stavi pod direktnu kontrolu bakterijskih regulatornih sekvenci.

Da bi se kodirajući region za humani β -interferon stavio direktno pod kontrolu bakterijskog promotora, osnovna ideja je bila da se sa Bal 31 egzonukleazom ukloni na ishodnom plazmidu pIF4 odgovarajući region na kome se nalazi prirodna regulatorna sekvenca i kodirajući region za signal peptid gena za humani β -interferon.



Slika 3. Shematski prikaz fragmenta od 921 parova baza koji sadrži 5' regulatornu sekvenca (TATA blok i CAP mesto), 3' nizvodno od prvog ATG kodona sekvenca za signal peptid (sig) i 3' nizvodno od drugog ATG kodona sekvenca strukturalnog gena (str) za zreli β -interferon. Stop (TGA) kodon se nalazi na 3' kraju. Vertikalne tačkaste linije označavaju na 5' kraju Eco RI a na 3' kraju Sau 3A restrikciono mesto. Označena mesta na shemi nisu proporcionalno prikazana.

Činjenica da naš klon pIF4 u regulatornoj sekvenci između TATA regiona i CAP mesta sadrži sekvencu (bp 269-274, CCATGG) koju prepoznaje *Nco* I endonukleza, [što smo utvrdili restrikcijom analizom klona, a različita je od sekvence koju su referisali Ohno i Taniguchi, 1981, (bp 269-274, CCACGG) dok je u saglasnosti sa autorima, Lawn *et al.* 1981, Gross *et al.*, 1981, Degrave *et al.*, 1981, Tavernier *et al.* 1983] omogućila nam je da na pogodnom mestu linearizujemo plazmid. Ovo restrikciono mesto je izabrano kao najpogodnije jer je jedinstveno na plazmidu pIF4, a istovremeno je udaljeno od start kodona (ATG) strukturalnog gena za β -interferon za samo 150 parova baza, dok je udaljenost do *Eco* RI mesta na drugoj strani 269 parova baza (Slika 4).



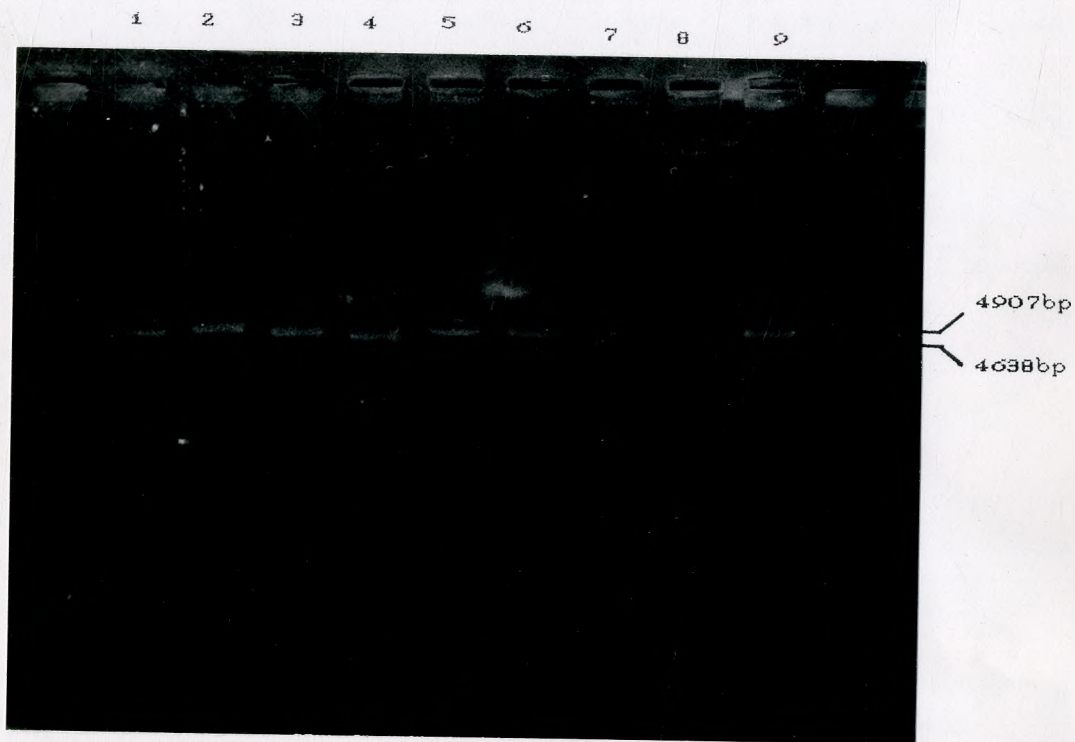
Slika 4. Shematski prikaz fragmenta od 419 parova baza (ukviren *Eco* RI mestom i drugim ATG kodonom) koji sadrži 5' regulatornu sekvencu i sekvencu za signal peptid.

Ovakva asimetrična pozicija *Nco* I mesta je omogućila da se egzonukleazom sa jedne od strana primakne do ATG kodona, a da se istovremeno sačuva *Eco* RI mesto. Ova pogodnost je znatno olakšavala dalji tok u konstruisanju ekspresionog vektora. Kontrolisanom digestijom sa *Bal* 31 egzonukleazom uklonjeno je oko 150 parova baza uzvodno i nizvodno od *Nco*I mesta, tako da je *Eco* RI mesto na najvećem broju molekula ostalo očuvano za buduću digestiju. Ovo je onda znatno olakšavalo kasnije ubacivanje promotorske sekvence.

Slika 5. prikazuje digestiju linearizovanog (*Nco* I) plazmida pIF4 sa *Bal* 31 egzonukleazom u različitim vremenskim intervalima (4, 6 i 8 minuta). U različitim intervalima digestije dobijene su smeše progresivno skraćenih molekula. Krajevi DNK su obrađeni sa polimerazom I DNK (*Pol*I κ), smeša fragmenata sa optimalnim skraćenjem je posle digestije sa *Eco* RI endonukleazom prečišćena i

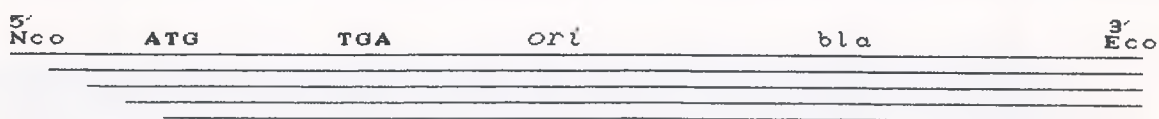
Slika 5. Elektroforeza na gelu od agaroze delova plazmida pIF4 skraćenih egzonukleazom Bal 31.

Pozicija na gelu, 1, 5 i 9: Standard DNK 4907bp i 4638bp (plazmid pIF4 sečen sa Eco RI odnosno Eco RI + Nco I). Pozicija 2, 3 i 4: DNK posle 4, 6 i 8 minuta digestije sa egzonukleazom Bal 31. Pozicije 6, 7 i 8: isto kao i kod pozicija 2, 3 i 4, ali uz dodatnu digestiju sa endonukleazom Eco RI.



Slika 5.

upotrebljena za konstruisanje ekspresionog vektora. Na slici 6. shematski je prikazana smeša finalno obradjenih fragmenata spremna za konstrukciju ekspresionog vektora.



Slika 6. Shematski prikaz smeše deletiranih fragmenata posle digestije sa *Eco* RI.

Na shemi su prikazane približne pozicije start i stop kodona (ATG i TGA) gena za β -interferon, "origin"-a replikacije (*ori*) i gena za rezistenciju na ampicilin (*bla*).

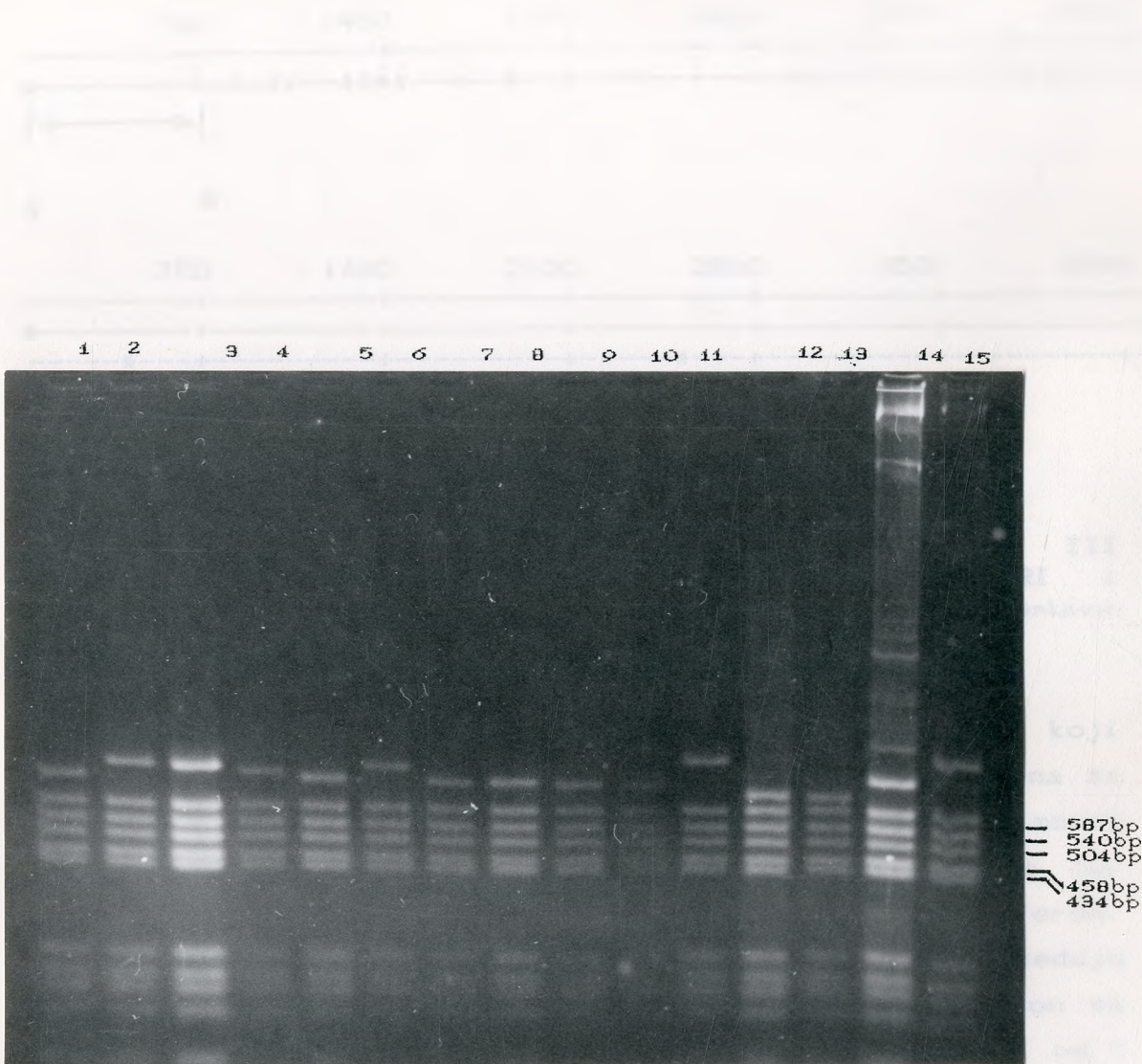
Smeši 5' deletiranih fragmenata ubačen je *Eco* RI-*Pvu* II fragment (275bp) DNK koji sadrži sekvencu *tac* promotora (Slika 10 i 12.). Ligacijom komponenata ove smeše i transformacijom *E. coli* dobijeno je 596 klonova, označenih kao plazmidi PDF pod brojevima od 50 do 646.

4.2. Analiza klonova ekspresionih vektora s *tac* promotorom

Od 596 dobijenih klonova izolovano je oko 150 rekombinativnih plazmida "mini-prep" metodom. Restrikcijom analizama sa *Hae* III enzimom, kao i dvostrukom digestijom sa *Eco* RI, *Pvu* II enzimima, procenjen je stepen delecije sa egzonukleazom *Bal* 31 te su odabirani oni klonovi čija je najsporija traka sadržavala oko 690 (*Hae* III), odnosno najbrža 409 (*Eco* RI-*Pvu* II) parova baza. Naime, u okviru fragmenata ovih dužina nalazi se *tac* promotor i deo sekvence DNK koja sadrži gen za β -interferon sa različitim delecijama na 5' krajevima, te se upravo ovi fragmenti različitih dužina nalaze kod analiziranih klonova, dok su preostali 21 fragment posle *Hae* III digestije i dva posle *Eco* RI-*Pvu* II digestije istovetni (Slika 7). Slike 8. i 9. ilustruju ove analize.

Slika 8. Elektroforeza restrikcionih fragmenata DNK na gelu od agaroze.

pDF klonovi su digerirani sa Hae III enzimom. Skupina traka DNK, označena na slici strelicama, (čije su dimenzije istovetne kod svih klonova i iznose 587, 540, 504, 458, i 434 parova baza) je poslužila za konstruisanje standardne krive. Pomoću ove standardne krive je procenjivana veličina najeporije trake i obim delecije DNK nukleazom Bal 31. Pozicije na gelu od 1 do 15 se odnose na sledeće pDF klonove: 69, 73, 74, 81, 83, 89, 90, 92, 93, 100, 104, 117, 118, 120 i 130.



Slika 8.

Bal31 egzonukleaza → → →

270

C ATGGAGAAAG GACATTCTAA CTGCAACCTT
NcoI

301 TCGAAGCCTT TGCTCTGGCA CAACAGGTAG TAGGGGACAC TGTTCTGTGT
TaqI

351 GTCAACATGA CCAACAAGTG TCTCCTCCAA ATTGCTCTCC TGTGTGTGCTT
HincII

74,115 94 75 81 637 78 98
401 CTCCACTACA GCTCTTTCCA TGAGCTACAA CTTGCTTGGG TTCCTACAAA---
HinfI

Slika 10. Deo sekvence humanog β -interferona u okviru koje je radjena digestija sa egzonukleazom Bal31. Strelicama iznad sekvence su označena mesta do kojih je išla delecija, a brojevi označavaju odgovarajuće sekvencirane klonove. Debela linija iznad sekvence označava ATG kodone za signal peptid i za zreli interferon. Isprekidana linija ispod sekvence označava mesta prepoznavanja odgovarajućih restrikcionihi endonukleaza.

Slika 11. shematski prikazuje postupak konstruisanja ekspresionog klona pDF81. Ovaj klon je korišćen za konstrukciju ekspresionog plazmida sa *trpA* terminacionom sekvencom na kraju gena i za ekspresiju β -interferona pod kontrolom *tac* promotora.

Sekvenciranjem je utvrđeno da je kod plazmidnog klona broj 81 (označen kao pDF81, Slika 8, 9, 10, 11 i 12) delecija sa egzonukleazom Bal 31 zaustavljena tačno do ATG kodona i da rastojanje između SD sekvence i start kodona iznosi 5bp. Ovaj klon je pokazao antivirusnu aktivnost kakvu inače daje autentični humani β -interferon¹.

¹ Rezultat nije prikazan jer je biološka aktivnost humanog β -interferona pokazana na plazmidnoj konstrukciji pDFT koja je derivat konstrukcije pDF81.



Slika 7. Grafički prikaz digestije pDF klonova sa *Hae* III endonukleazom i dvostruke digestije endonukleazama *Eco* RI i *Pvu* II. Tačke A i B uokviruju fragmente promenljivih dimenzija.

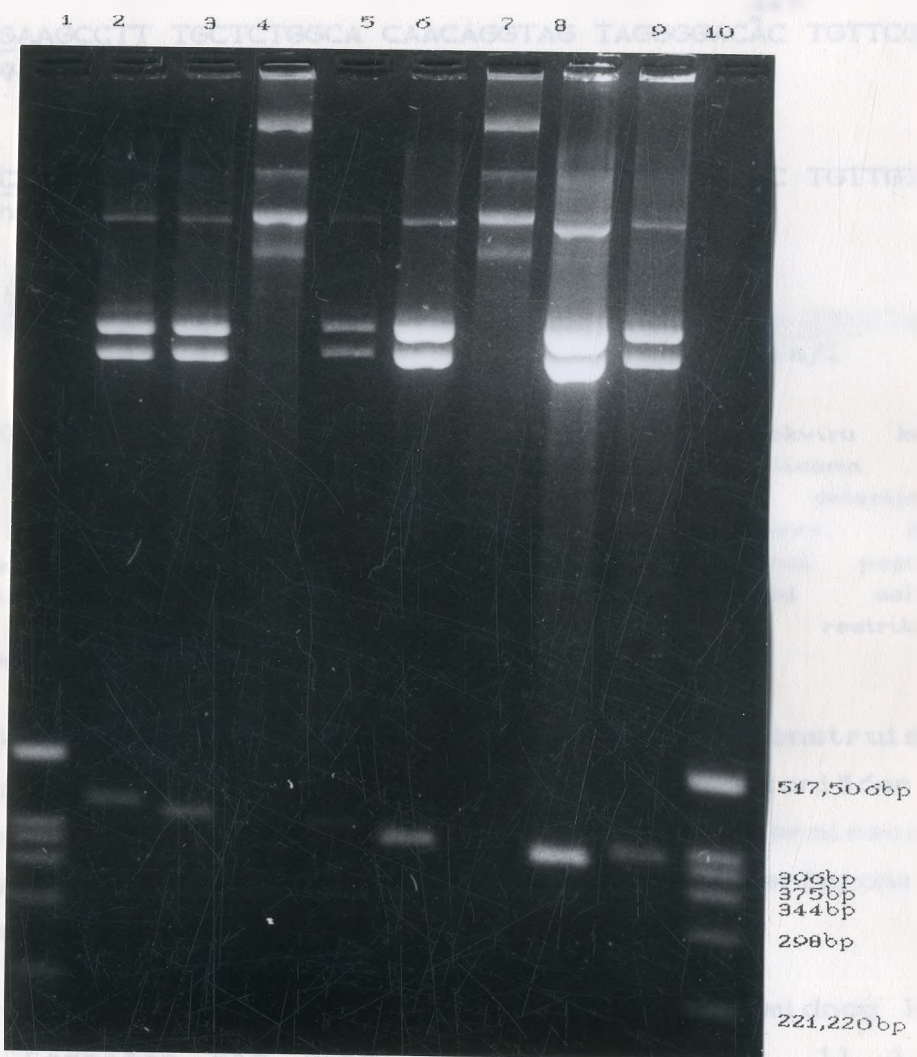
Na osnovu procene optimalne dužine fragmenata koji sadrže sekvencu *tac* promotora i kodirajućeg regiona gena za β -interferon, odabrali smo 9 klonova i odredili primarnu strukturu (sekvencu) regiona kontakta između 3' kraja *tac* promotora i 5' kraja strukturalnog gena za β -interferon. Sekvenciranjem je utvrđeno da šest klonova poseduju integralnu sekvencu DNK koja kodira za zreli interferon sa različitim dužinama 5' uzvodnih regiona od ATG kodona (od 0 do 80 bp), dok je kod tri klona delimično nedostajao 5' region kodirajuće sekvence (Slika 10).

Slika 9. Elektroforeza restrikcionih fragmenata DNK na gelu od agaroze.

pDF klonovi su digerirani sa enzimima Eco RI i Pvu II. Pozicija 1 i 10: standard DNK - fragmenti plazmida pIF4 digeriranog sa endonukleazom Hinf I dimenzija 517, 506 (dublet), 396, 375, 344, 298, 221, 220 (dublet). Pozicija 2-8: restrikcioni fragmenti klonova 73, 75, 94, 81, 94, 86 i 137.

Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

C. ATYPICALIS (NCAT111A) STRAIN



Slika 9.

Bal31 egzonukleaza → → →

270

C ATGGAGAAAG GACATTCTAA CTGCAACCTT
NcoI

301 TCGAAGCCTT TGCTCTGGCA CAACAGGTAG TAGGGGACAC TGTTCTGTGT
TaqI

351 GTC AACATGA CCAACAAGTG TCTCCTCCAA ATTGCTCTCC TGTGTGCTT
HincII

74,115 94 75 81 637 78 98
401 CTCCACTACA GCTCTTTCCA TGAGCTACAA CTTGCTTGGG TICCTACAAA---
HinfI

Slika 10. Deo sekvence humanog β -interferona u okviru koje je radjena digestija sa egzonukleazom Bal31. Strelicama iznad sekvence su označena mesta do kojih je išla delecija, a brojevi označavaju odgovarajuće sekvencirane klonove. Debela linija iznad sekvence označava ATG kodone za signal peptid i za zreli interferon. Isprekidana linija ispod sekvence označava mesta prepoznavanja odgovarajućih restriktionih endonukleaza.

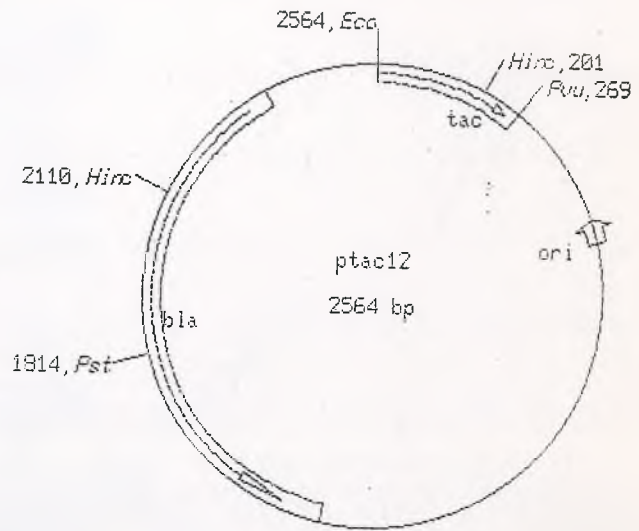
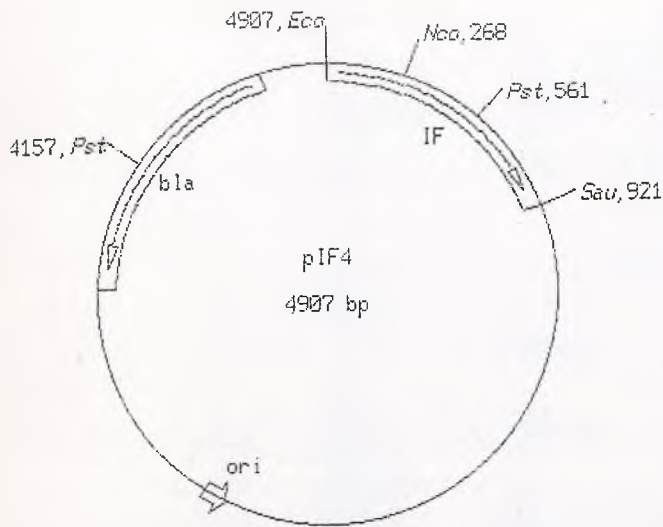
Slika 11. shematski prikazuje postupak konstruisanja ekspresionog klona pDF81. Ovaj klon je korišćen za konstrukciju ekspresionog plazmida sa *trpA* terminacionom sekvencom na kraju gena i za ekspresiju β -interferona pod kontrolom *tac* promotora.

Skvenciranjem je utvrđeno da je kod plazmidnog klona broj 81 (označen kao pDF81, Slika 8, 9, 10, 11 i 12) delecija sa egzonukleazom Bal 31 zaustavljena tačno do ATG kodona i da rastojanje između SD sekvence i start kodona iznosi 5bp. Ovaj klon je pokazao antivirusnu aktivnost kakvu inače daje autentični humani β -interferon¹.

¹ Rezultat nije prikazan jer je biološka aktivnost humanog β -interferona pokazana na plazmidnoj konstrukciji pDFT koja je derivat konstrukcije pDF81.

Slika 11. Konstruisanje ekspresionog plazmida koji sadrži fuziju *tac* promotora i strukturalnog gena za humani β -interferon.

Plazmid pIF4 je presečen i linearizovan na jedinom *Nco* I mestu. Digestijom sa *Bal* 31 egzonukleazom dobijena je familija progresivno skraćenih molekula. Krajevi molekula DNK su zatim poravnati polimerazom I DNK (PolIk), a zatim je uradjena digestija sa enzimom *Eco* RI. Nakon digestije, fragmenti željenih dužina su defosforilisani i prečišćeni. Ovako obrađeni fragmenti su ligirani za *tac* promotor koji je izolovan iz plazmida p*tac*12 kao *Eco* RI - *Pvu* II (0,27 kb) fragment. Sa ovom konstrukcijom je transformisan soj DH1, a kolonije su selektovane na podlozi sa ampicilinom (40 μ g/ml). Posle restriktione analize i analize primarne strukture DNK u okolini mesta fuzije, odabran je klon sa deletiranom kompletnom sekvencom prirodnog regulatornog regiona i sekvencom za signal peptid i označen kao klon pDF81. Oznake za restriktiona mesta na plazmidima su date skraćeno: *Eco*, *Eco* RI; *Nco*, *Nco* I; *Pst*, *Pst* I; *Sau*, *Sau* 3A; *Pvu*, *Pvu* II. Orijentacije gena su označene strelicama. Brojevi označavaju pozicije restriktionih mesta i dimenzije plazmida u parovima baza. Grafički prikaz medjusobnih dimenzija plazmida nije proporcionalan.

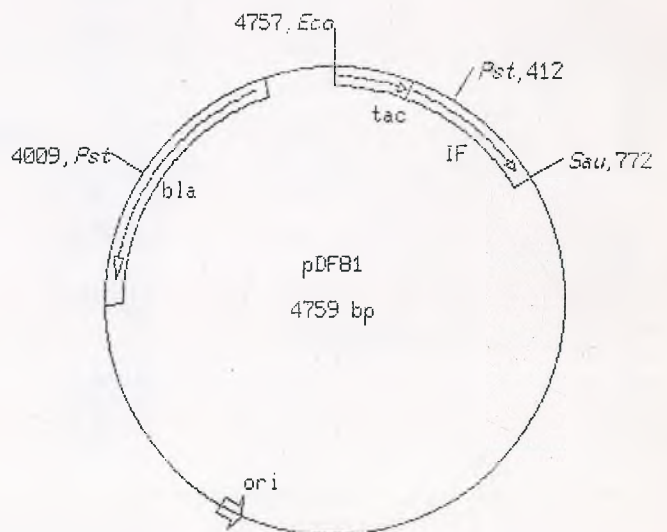


- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Nco I 2. DAI 31 3. Polik 4dMIP 4. Eco RI 5. CIAP 6. Izoluje se smesa velikih fragmenata | <ol style="list-style-type: none"> 1. Eco RI 2. Pvu II 3. Izoluje se manji fragment |
|---|--|

1. Ligacija
2. Transformacija

Analiziran je i odabran klon sa sekvencom u okolini mesta pocetka translacije:

--AGGAAACAGATGAGC--
SD



Slika 11.

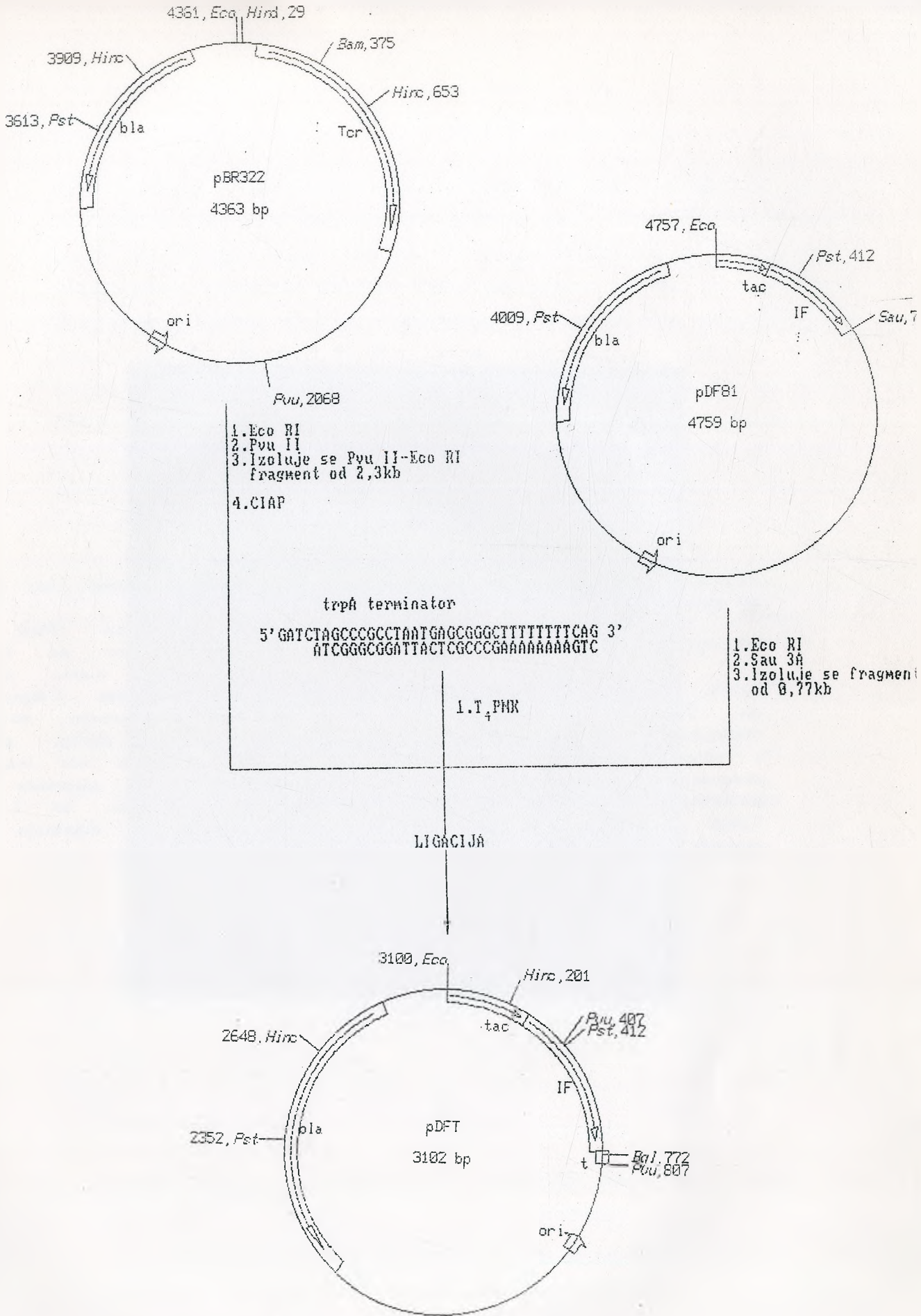
Slika 12. Autoradiogram DNK dela sekvence klona pDF81.

Sekvenca klona pDF81 je radjena po proceduri Maxam-a i Gilbert-a (1980). Plazmidni klon pDF81 je digeriran sa *Hinf* I endonukleazom, na gelu od poliakrilamida izolovana je najsporija traka od 1289bp i defosforilisani 5' krajevi su obeleženi sa P^{32} reakcijom kinaziranja sa T4 kinazom. Obeleženi fragment je zatim digeriran sa endonukleazom *Hinc* II i elektroforezom na gelu od akrilamida izolovan i prečišćen fragment dužine 88bp. Reakcijama za sekvenciranje, elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu i autoradiografijom, analiziran je redosled nukleotida donjeg komplementarnog lanca (Slika 13) u okviru pozicija 294 (*Hinf* I) - 203 (*Hinc* II).

Slika 14. Konstrukcija ekspresionog plazmida koji sadrži fuziju *tac* promotora, strukturalnog gena za humani β -interferon i sekvencu *trpA* terminatora.

Klon *pDF81* je iskorišćen za konstruisanje ekspresionog plazmida koji sadrži na 3' kraju gena za β -interferon *trpA* terminator. Izolovan je *Pvu* II - *Eco* RI fragment (2,3 kb) iz plazmida *pBR322* koji sadrži "origin" replikacije i gen za β -laktamazu (rezistencija na ampicilin), *Eco* RI - *Sau* 3A (0,77 kb) fragment izolovan iz plazmida *pDF81* koji sadrži *tac* promotor i gen za β -interferon i sintetisan je dvolančani fragment koji sadrži sekvencu *trpA* terminatora

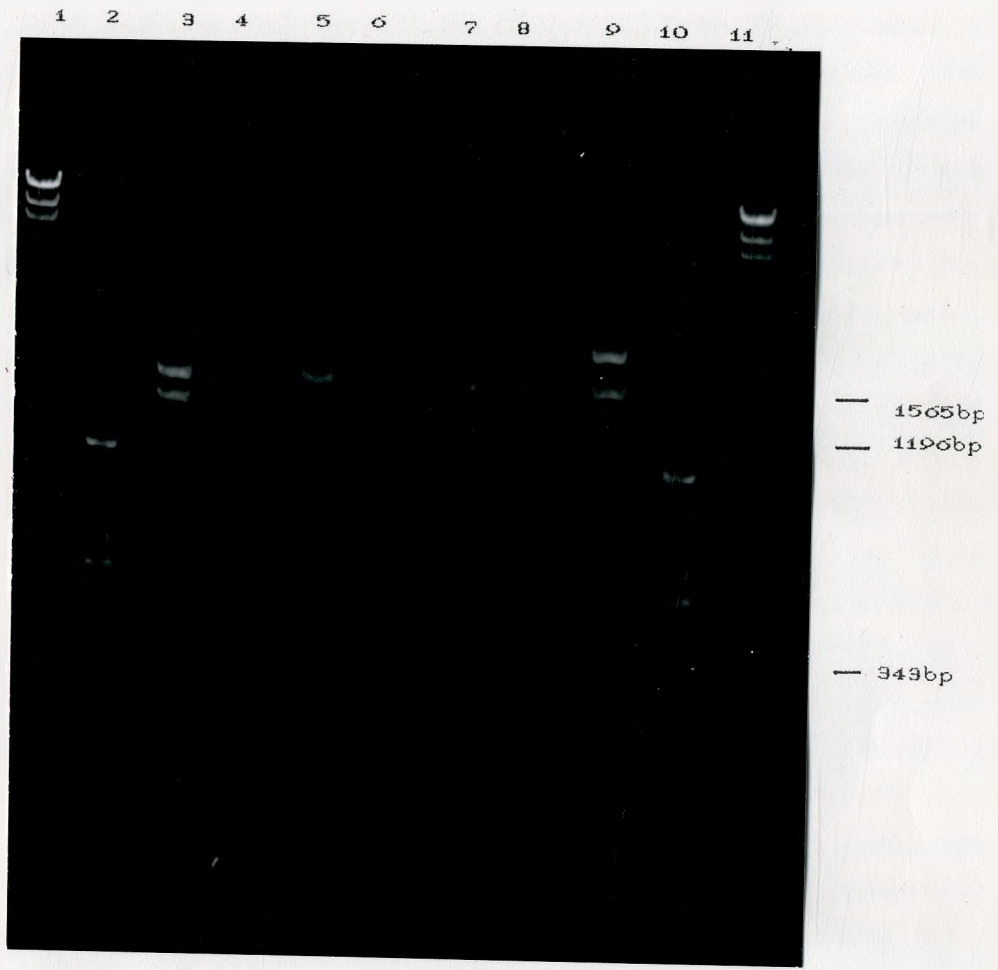
(*GATCTAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTCAG-ATCGGGCGGATTACTCGCCCGAAAAAAAAGTC*). Sekvence 5' i 3' kraja su sintetisane tako, da se ligacijom rekonstituiše *Bgl* II odnosno *Pvu* II mesto. Navedeni fragmenti su pomešani i ligirani pri čemu su rekonstituisana *Eco* RI, *Bgl* II i *Pvu* II mesta. Sa ovom konstrukcijom je transformisan soj *JM101*, a kolonije su selektovane na podlozi sa ampicilinom (40 μ g/ml). Nakon transformacije jedan od odabranih klonova (*pDFT*) koji je posedovao sve naznačene elemente iskorišćen je za ekspresiju kao i za dobijanje drugih konstrukcija. Oznake za restrikciona mesta na plazmidima su date skraćeno: *Eco*, *Eco* RI; *Bam*, *Bam* HI; *Pst*, *Pst* I; *Sau*, *Sau* 3A; *Bgl*, *Bgl* II; *Hinc*, *Hinc* II; *Pvu*, *Pvu* II. Orijentacije gena su označene strelicama. Brojevi označavaju pozicije restrikcionih mesta i dimenzije plazmida u parovima baza. Grafički prikaz međusobnih dimenzija plazmida nije proporcionalan.



Slika 14.

Slika 15. Elektroforeza restrikcionih fragmenata DNK na gelu od agaroze.

Izolovana plazmidna DNK je digerirana sa *Rsa* I endonukleazom. Pozicija 1 i 11: λ DNK (digerirana sa *Hind* III sa trakama dimenzija 23kb; 9,4kb; 6,6kb; 4,3kb; 2,3kb; 2,0kb; 0,56kb i 0,13kb); pozicija 2 i 10: pBR322 (digeriran sa *Hinf* I i *Hind* III sa trakama dimenzija 1029bp, 603bp, 517bp, 506bp, 396bp, 344bp, 298bp, 221bp, 220bp, 154bp i 75bp); pozicija 3: pIF4T (*Rsa* I digestija sa trakama dimenzija 1565bp, 1344bp i 343bp, videti mapu plazmida u poglavlju DODATAK); pozicija 4-8 klonovi 1, 6, 11, 15 i 21 (*Rsa* I digestija); pozicija 9: pDF81 (*Rsa* I digestija sa trakama dimenzija 1565bp, 1196bp i 341bp).



Slika 15.

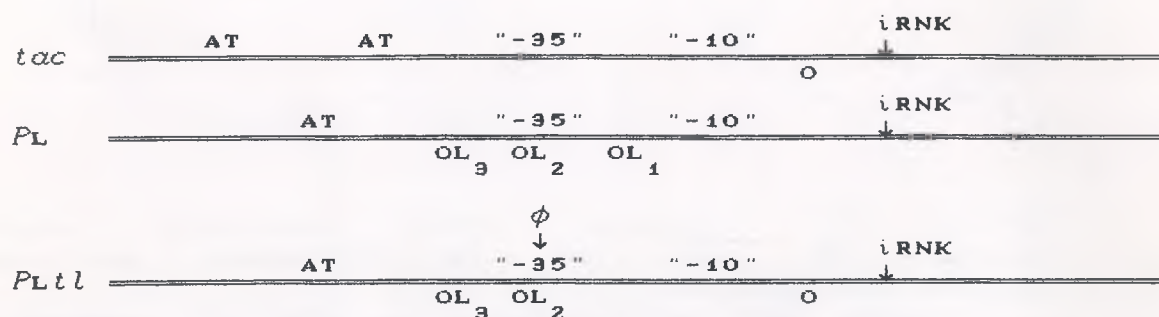
smo dobili sintezom dva jednolančana komplementarna oligodeoksinukleotidna lanca (Slika 14). Transformacijom *E. coli* sa ligacionom smešom i restrikcijom analizom DNK izolovanih klonova (Slika 15), pokazano je da su dobijene očekivane konstrukcije. Usporedna restrikcijna analiza (sa *Rsa* I endonukleazom) novih konstrukcija sa plazmidima pIF4T (videti u poglavlju DODATAK fizičku mapu plazmida pIF4T i pDF81) i pDF81 pokazala je istovetne fragmente od 1565bp kod svih konstrukcija, istovetni fragment od 1196bp sa plazmidom pDF81 i fragment od 343bp sa plazmidom pIF4T. Na osnovu ovih kriterijuma i sekvenciranog dela fuzije gena β -interferona i *trpA* terminatora (nije prikazano), inicijalni klon broj 6 a označen u daljem radu kao pDFT, poslužio je za ekspresiju β -interferona i konstruisanje ekspresionog vektora sa hibridnim *PLtl* promotorom (opisano dalje u tekstu).

Ova konstrukcija je u odnosu na pDF81 imala nekoliko prednosti. Osim ubačene sekvence za terminaciju transkripcije, ona je siromašnija za jedno restrikciono mesto koje prepoznaje *Hinc* II endonukleaza što je opet značajno pojednostavilo konstruisanje ekspresionog vektora sa novim *PLtl* promotorom. Pravljenjem ove konstrukcije uklonjen je fragment od 1657bp (u okviru koga se nalazi *rop* gen - "repressor of primer"), a smatra se da se kao posledica toga dobija povećanje broja kopija plazmida sa prosečnih 18 na 30 kopija po hromozomu (Soberon *et al.*, 1980; Twigg i Sherratt, 1980 i Hanahan u laboratorijskom priručniku Maniatis *et al.*, 1982) Antivirusna aktivnost proizvoda ekspresije gena za humani β -interferon kod ove konstrukcije pokazana je na tabeli I.

4.4. Konstruisanje ekspresionog plazmida sa novim hibridnim *PLtl* promotorom.

Za konstruisanje novog hibridnog promotora poslužili su nam delovi sekvence *tac* promotora izvodno od "-35" regiona i *PL* promotora faga λ izvodno od "-35" regiona (Slika 13 i

16 i videti sekvencu PL promotora faga λ u poglavlju 8 DODATAK). Pošto novi *PLtl* promotor sadrži elemente poreklom od *PL* promotora faga λ , *trp* i *lac* promotora za njegov naziv su iskorišćena njihova početna slova.

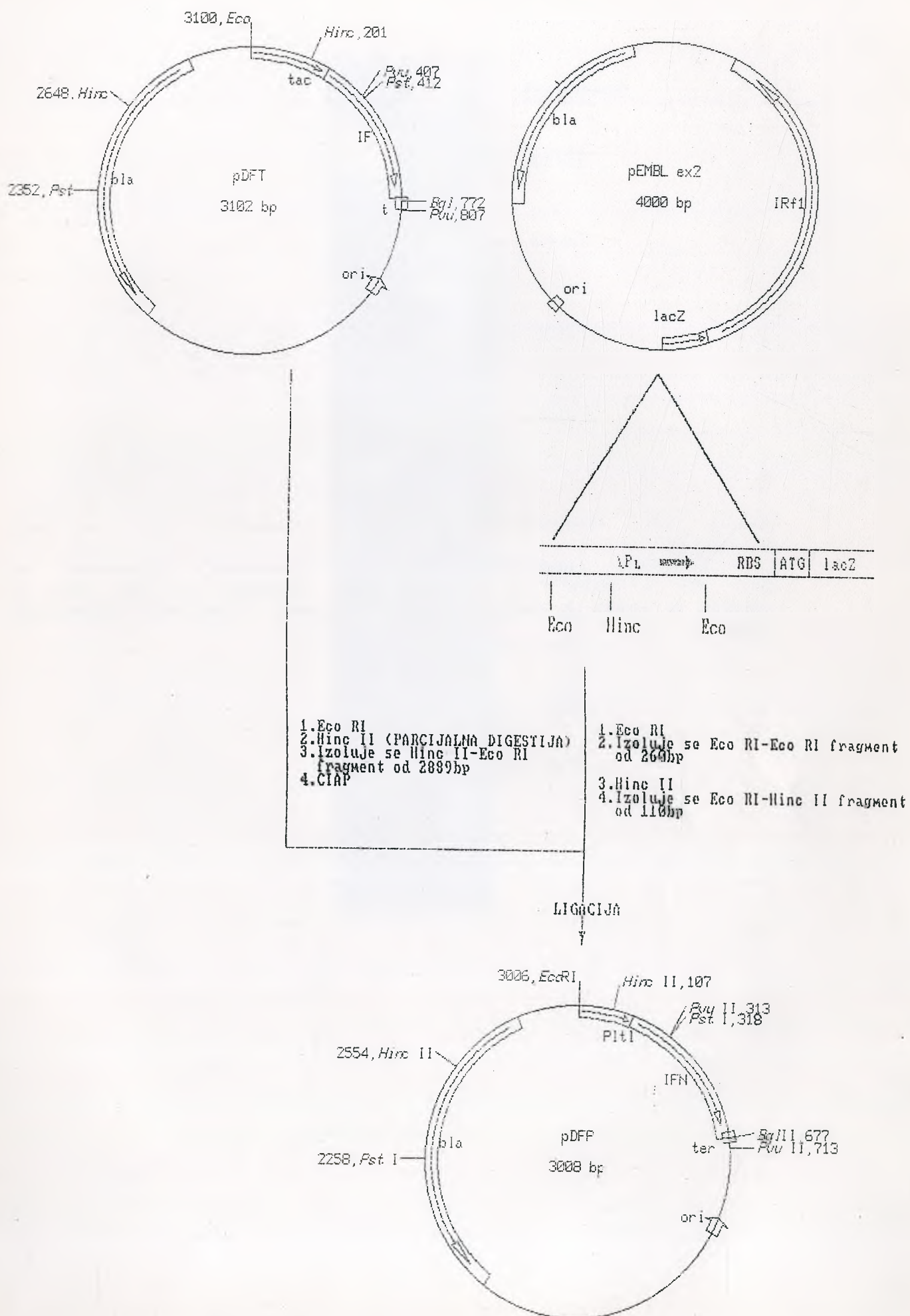


Slika 16. Schematski prikaz osnovnih elemenata koji su sadržani kod *tac*, *PL* i *PLtl* promotora. AT: AT bogate sekvence; (OL₃, OL₂, OL₁ i O): operatorski regioni za vezivanje represora λ faga i *lac* represora; iRNK: mesto otpočinjanja sinteze primarnog transkripta; (ϕ): mesto fuzije promotora.

Deo linearizovanog plazmida pDFT kod koga je parcijalnom digestijom sa *Hinc* II endonukleazom izolovan fragment kome nedostaje 5' uzvodni region od "-35" sekvence *tac* promotora, vezan je sa fragmentom DNK izolovanim iz plazmida pEMBLEx2 koji sadrži sekvence *PL* promotora uzvodno od "-35" regiona. Izolovan je klon broj 6 i okarakterisan restrikcijom analizom i sekvenciranjem promotorskog regiona i označen u daljem radu kao pDFP (Slika 17, 18, 19 i 20).

Slika 17. Shematski prikaz konstrukcije ekspresionog plazmida koji sadrži gen za β -interferon pod kontrolom hibridnog *PLt1* promotora.

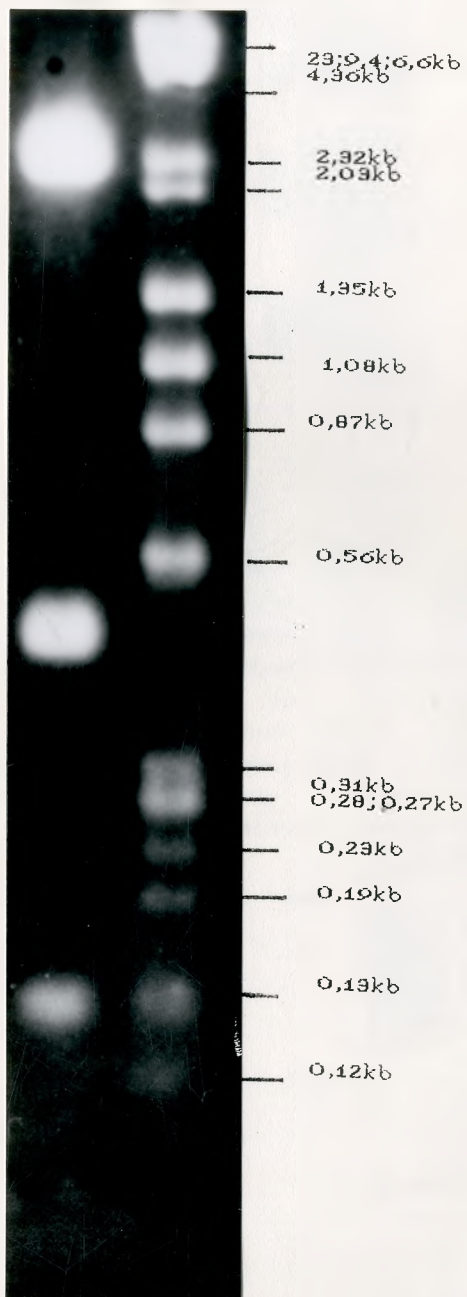
Plazmid *pDFT* je linearizovan sa *Eco* RI endonukleazom i urađena je parcijalna digestija endonukleazom *Hinc* II. Izolovan je i defosforilisan fragment *Hinc* II-*Eco* RI (2899 bp) i ligiran sa (*Eco* RI-*Hinc* II) fragmentom od 110 bp koji je izolovan iz plazmida *pEMBLEX2*, a sadrži region λ *PL* promotora uzvodno od "-35" regiona. Sa ovom konstrukcijom je transformisan soj *JM101*, a kolonije su selektovane na podlozi sa ampicilinom (40 μ g/ml). Oznake za restrikciona mesta na plazmidima su date skraćeno: *Eco*, *Eco* RI; *Pst*, *Pst* I; *Bgl*, *Bgl* II; *Hinc*, *Hinc* II;. Orientacije gena su označene strelicama. Brojevi označavaju pozicije restrikcionih mesta i dimenzije plazmida u parovima baza. Grafički prikaz međusobnih dimenzija plazmida nije proporcionalan.



Slika 17.

Slika 18. Elektroforeza restrikcionih fragmenata DNK na gelu od agaroze.

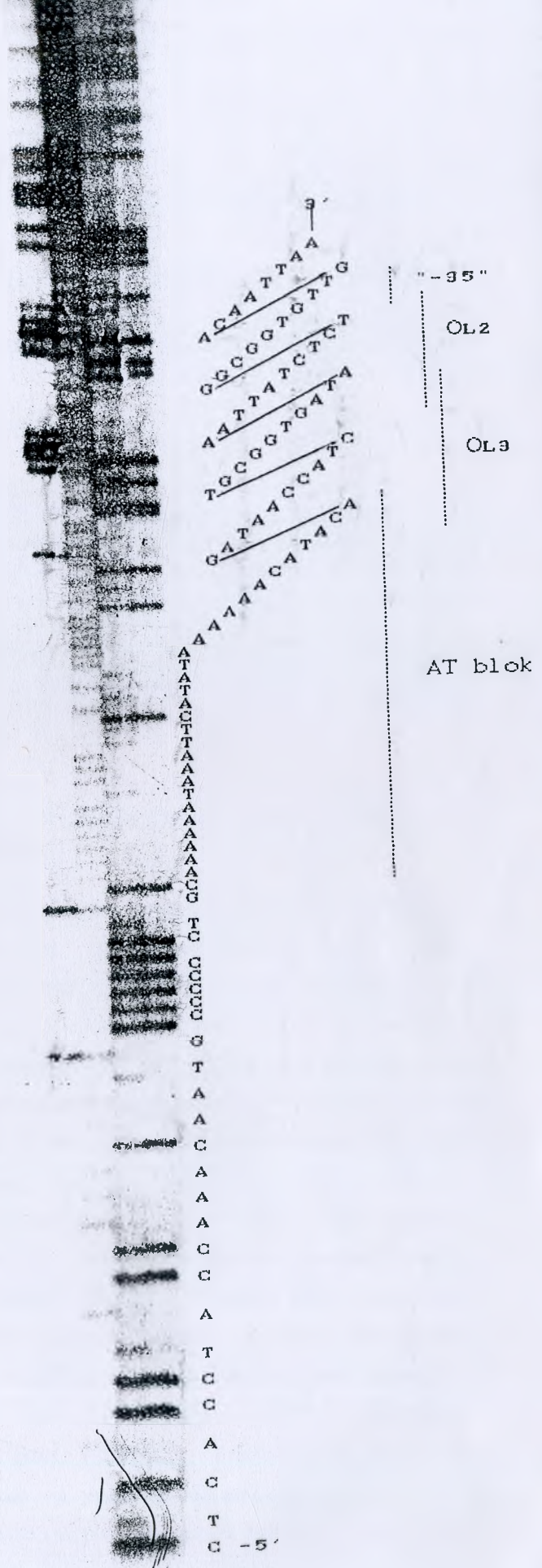
Izolovana plazmidna DNK je dvostruko digerirana sa *Eco* RI i *Hinc* II endonukleazama. Pozicija 1 klon broj 6; pozicija 2: smeša λ DNK (*Hind* III digest) i ϕ X174RF (*Hae* III digest).



Slika 18.

Slika 19. Autoradiogram DNK dela sekvence klona pDFP.

Sekvenca klona pDFP je radjena po proceduri Maxam-a i Gilbert-a (1980). Plazmidni klon pDFP je digeriran sa *Eco* RI endonukleazom i defosforilisan. 5' krajevi su obeleženi sa P^{32} reakcijom kinaziranja sa T4 kinazom. Obeleženi fragment je zatim digeriran sa endonukleazom *Pvu* II i elektroforezom na gelu od poliakrilamida izolovan je i prečišćen fragment dužine 315bp. Reakcijama za sekvenciranje, elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu i autoradiografijom, analiziran je redosled nukleotida gornjeg lanca DNK u okviru pozicija 13 - 118 (Slika 20).



"-95"

OL2

OL3

AT blok

Slika 19.

```

1  AATTCCCGGG ATCTCTCACC TACCAAACAA TGCCCCCCTG CAAAAAATAA

51  ATTCATATAA AAAACATACA GATAACCATC TGCGGTGATA AATTATCTCT
      OL3                                OL2
      -35                                -10 lac operator
101  GCGGGTGTGTT GACAATTAATC ATCGGCTCGT ATAATGTGTG GAATTGTGAG
      HincII                                >>>> iRNK

151  CGGATAACAA TTTACACACAG GAAACAG
      SD

```

Slika 20. Deo sekvence klona pDFP

Prikazana je sekvence *PLtl* promotora fuzionisanog za strukturalni gen humanog β -interferona. Pune linije ispod sekvence označavaju mesta prepoznavanja redosleda nukleotida odredjenih endonukleaza. Tačkaste linije iznad sekvence označavaju operatorske regione za vezivanje *lac* represora i represora faga λ . Isprekidane linije iznad sekvence označavaju "-35", "-10" regione i mesto vezivanja ribozoma (SD). Horizontalne strelice označavaju sintezu primarnog transkripta (iRNK).

4.5. Ekspresija gena za humani β -interferon pod kontrolom hibridnih *tac* i *PLtl* promotora.

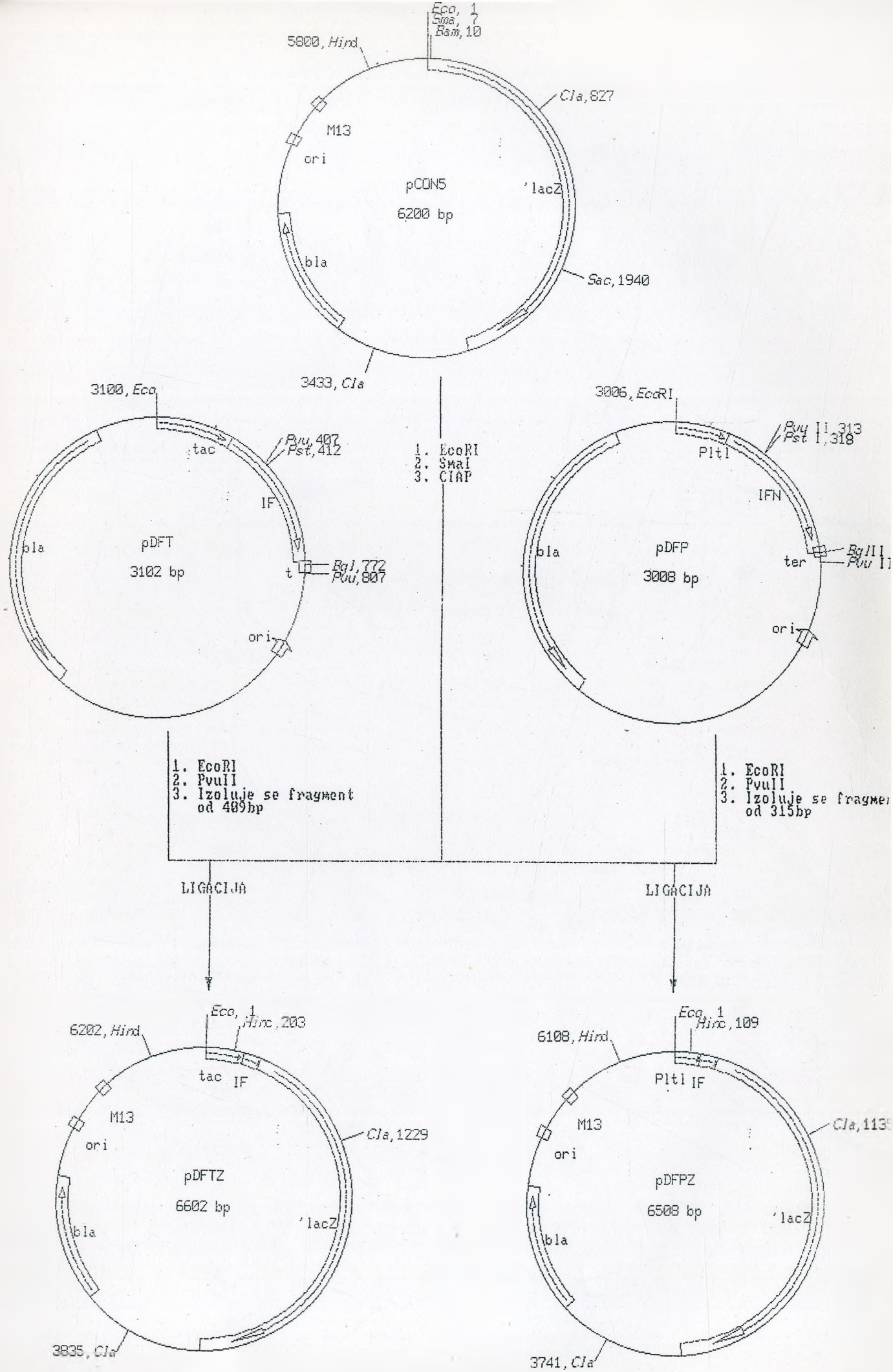
Osobine *tac* i *PLtl* promotora su ispitivane poređenjem nivoa ekspresije gena humanog β -interferona kod dva rekombinantna plazmida pDFT (konstrukcija koja sadrži *tac* promotor) i pDFP (konstrukcija koja sadrži *PLtl* promotor) (Slika. 14 i 17). Pažnju smo posebno obratili na to da oba konstruisana plazmida budu gotovo identična, izuzev onog dela promotora koji kontroliše i aktivira transkripciju gena za humani β -interferon. S obzirom da *PLtl* promotor, pored regiona za vezivanje *lac* represora (proizvoda *lacI* gena) sadrži i region za vezivanje temperaturno senzitivnog represora faga λ (proizvoda *cI857* gena), dvostruka kontrola represije i derepresije je bila moguća kada je soj POP2136, koji sadrži gen *cI857* u svom hromozomu, poslužio kao domaćin za plazmid pDFP, dok je za plazmid pDFT korišćen soj-domaćin JM101 (ne sadrži gen *cI857*). Indukcija je kod oba ekspresiona sistema rađena u ranoj stacioniranoj fazi rasta ćelija domaćina. Za indukciju je korišćen 1 mM IPTG

Slika 21a i b. Konstruisanje promotor-interferon-*lacZ* fuzija.

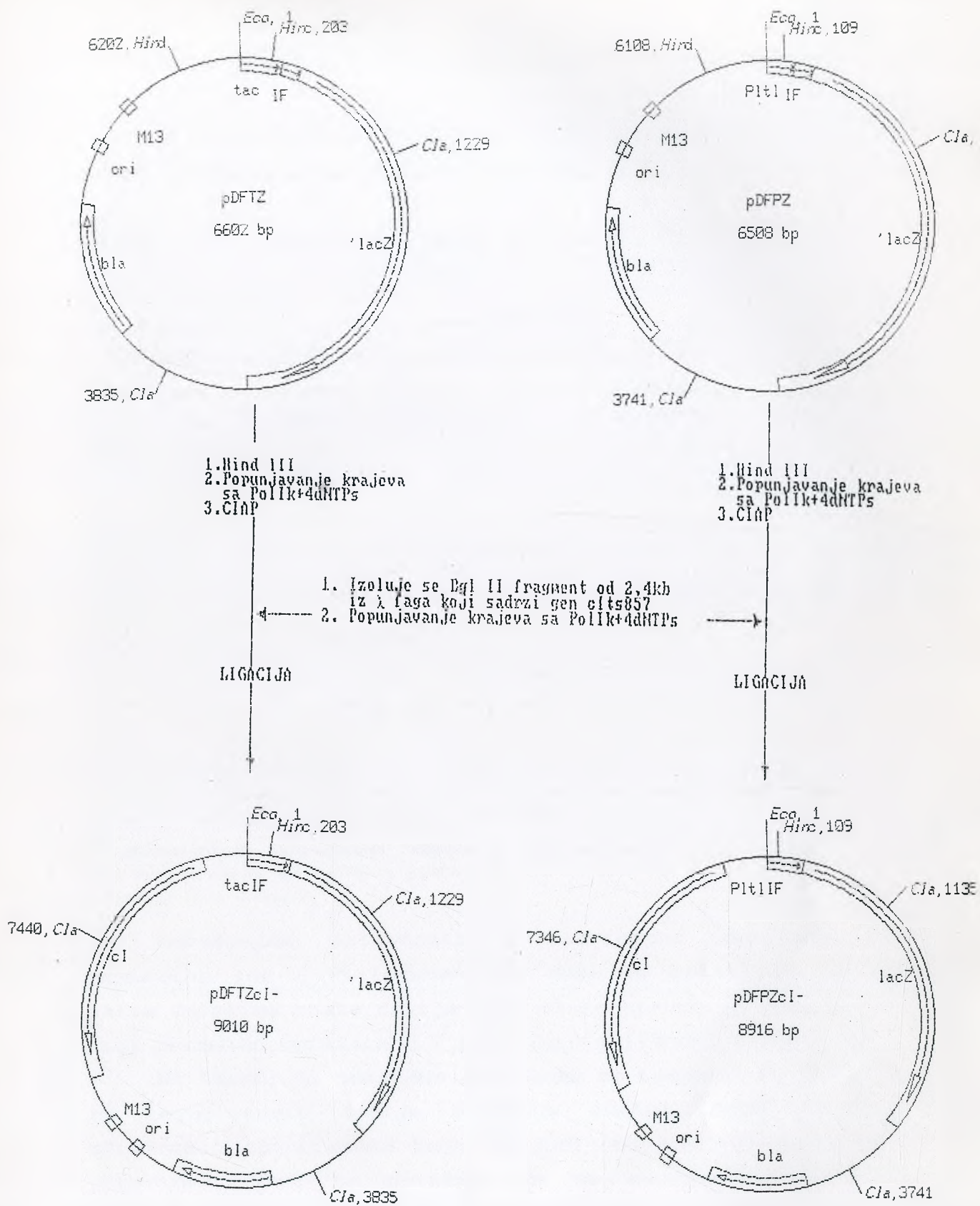
a) Plazmidi pDFP i pDFT su iskorišćeni pri konstruisanju *lacZ* fuzija. Fragmenti koji sadrže odgovarajući promotor i prvih 46 kodona gena za β -interferon i koji su ograničeni sa *Eco* RI i *Pvu* II mestima, fuzionisani su u fazi čitanja sa *lacZ* genom ubacivanjem u defosforilisana *Eco* RI, *Sma* I mesta plazmida pCONS. Sa ovim plazmidnim konstrukcijama je transformisan soj JM101 a selekcija kolonija je radjena na podlogama sa ampicilinom (40 μ g/ml). Kolonije koje proizvode β -galaktozidazu su detektovane razmazivanjem na šolje x-Gal-a. Rezultujuće plazmidne konstrukcije pDFTZ i pDFPZ su dalje iskorišćene za upoređivanje jačina promotora preko aktivnosti β -galaktozidaze.

b) Iste konstrukcije su u daljem radu poslužile da se u *Hind* III mesto plazmida pDFTZ i pDFPZ ubaci fragment *Bgl* II od 2.4 kb izolovan iz faga λ a sadrži *cI857* represor. Restrikciona mesta *Hind* III i *Bgl* II pošto, ne sadrže elemente komplementarnosti, pre reakcije ligacije poravnata su popunjavanjem uvučenih 3' krajeva enzimskom reakcijom sa polimerazom I DNK (polIK). Sa ovim plazmidnim konstrukcijama je transformisan soj JM101 a selekcija kolonija je radjena na podlogama sa ampicilinom (40 μ g/ml). Kolonije koje proizvode β -galaktozidazu su detektovane razmazivanjem na šolje x-Gal-a. Rezultujući plazmidi (pDFTZcI i pDFPZcI) sadrže *cI* gen za temperaturno senzitivni represor faga λ .

Oznake za restrikciona mesta na plazmidima su date skraćeno: *Eco*, *Eco* RI; *Pst*, *Pst* I; *Bgl*, *Bgl* II; *Hinc*, *Hinc* II; *Sma*, *Sma* I; *Cla*, *Cla* I; *Sac*, *Sac* I; . Orijentacije gena su označene strelicama. Brojevi označavaju pozicije restrikcionih mesta i dimenzije plazmida u parovima baza. Grafički prikaz medjusobnih dimenzija plazmida nije proporcionalan.



Slika 21a.



Slika 21b.

kod obe plazmidne konstrukcije, a kod plazmidne konstrukcije pDFT, povišenjem temperature medijuma na 42° C.

Tabela I. Ekspresija gena za humani β -interferon pod kontrolom *tac* i *PLtl* promotora.

promotor/ konstrukt ^a	temperatura ^b	indukcija ^c		IFN aktivnost ^d	RAP ^e
		IPTG	42°		
<i>tac</i> /pDFT	37	+	-	3,2x10 ⁵	1,0
"	37	-	-	5,3x10 ⁴	0,2
<i>PLtl</i> /pDFT	37	+	+	8,5x10 ⁵	2,7
"	30	+	+	2,1x10 ⁵	0,7
"	30	-	+	1,6x10 ⁵	0,5
"	30	-	-	5,1x10 ⁴	0,2

^a videti Slike 13. i 16. na kojima je opisan tok konstruisanja ekspresionih vektora. Konstrukcija s *tac* promotorom je kao domaćina koristila soj JM101, a sa *PLtl* promotorom POP2136.

^{b,c} Kultura koja sadrži plazmidne konstrukcije sa *tac* promotorom je rasla u medijumu na 37° C, a sa *PLtl* promotorom na 30° i 37° C do rane stacionarne faze, a potom indukovana 120 minuta sa 1mM IPTG-om ili podizanjem temperature na 42° ili na oba načina i dalje obradjena za merenje antiviralne aktivnosti kao što je opisano u poglavlju METODE.

^d Interferonska antiviralna aktivnost je prikazana kao broj jedinica po optičkoj gustini (1 OD) na 550 nm u jednoj litri kulture

Poređenjem aktivnosti β -interferona dobijene pod kontrolom *tac* i *PLtl* promotora može se uočiti da je pod istim uslovima rasta ćelija (37° C) konstrukcija koja sadrži *PLtl* promotor pokazala 2.7 puta veću aktivnost (Tabela I).

Na Tabeli I. pokazano je takođe da temperatura medijuma na kojoj rastu ćelije domaćina znatno utiče na nivo aktivnosti interferona koja je dobijena pod kontrolom *PLtl* promotora. Tako je pokazano da se maksimalna aktivnost postiže pod kontrolom *PLtl* promotora kada se indukcija vrši povišenjem temperature medijuma sa 37° C na 42° C u prisustvu 1mM IPTG-a. Pod istim uslovima indukcije i pod kontrolom istog promotora dobijena je četverostruko manja

Slika 22. Aktivnosti β -galaktozidaze dobijene sa ekspresionih plazmida pDFPZ i pDFTZ.

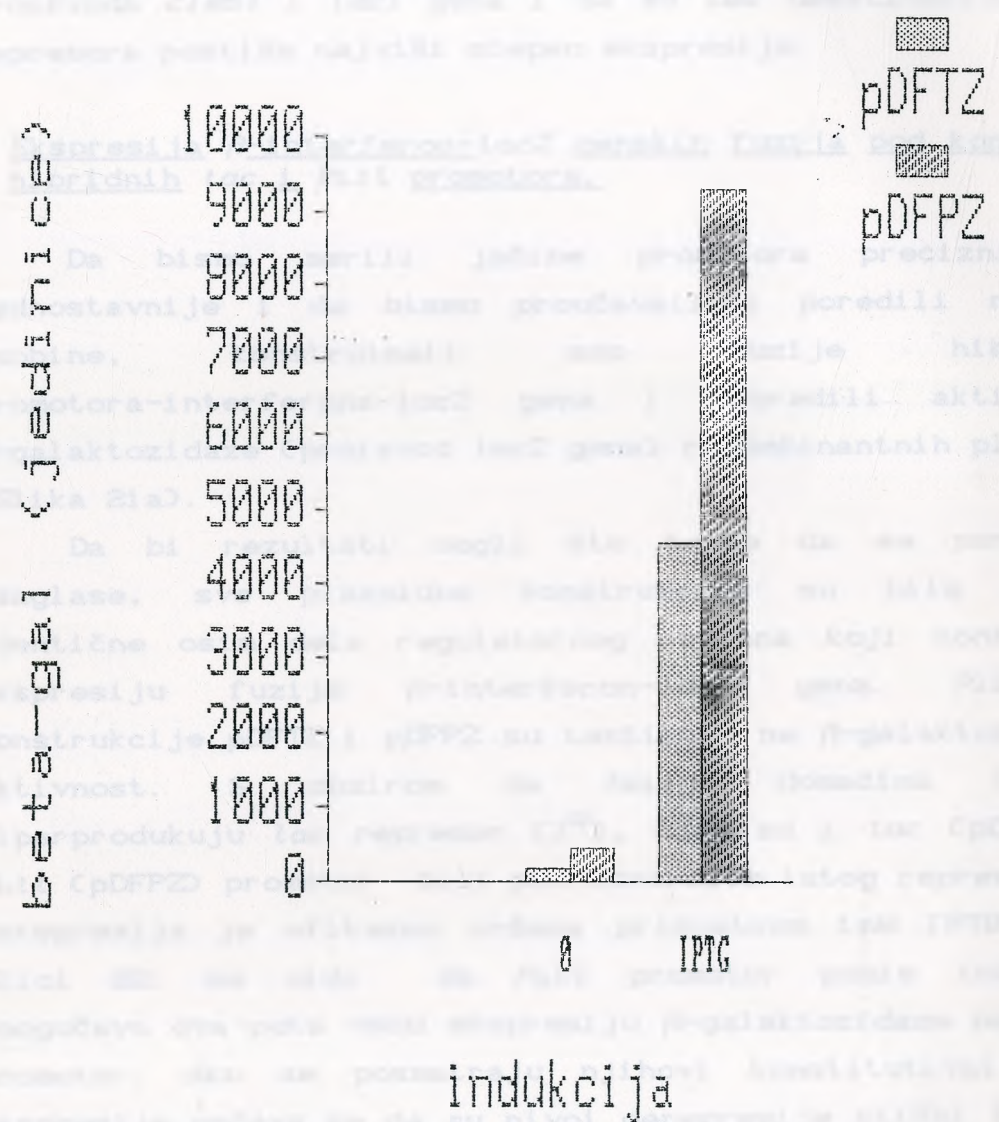
Kultura koja sadrži plazmide pDFPZ i pDFTZ je rasla na 37° C dok nije dostigla približno $0,2$ OD 600 . Tada je indukovana dva sata sa 1mM IPTG-om. Aktivnost β -galaktozidaze je merena kako je objašnjeno u poglavlju METODE. X-osa; 0: neindukovano stanje, IPTG: indukcija sa 1mM IPTG-om. Y-osa; Aktivnosti izražene u jedinicima β -galaktozidaze.

Činjenica da, pored regiona za vezivanje *lac* represora, *PLtl* promotor sadrži i region za vezivanje represora faga λ (CI represor), ukazivala je da ubacivanje ovog represora u sistem može znatno da izmeni karakteristike promotora. Da bi eksperimentalno potkrepili ovu tvrdnju i proučili stvarni efekat ove karakteristične sekvence na regulaciju promotorske aktivnosti, kao i da bi ovakav dvostruki sistem represije-derepresije mogli da poredimo sa dobro proučenim *tac* promotorom, ubacili smo *cI857* gen faga λ u ćelije domaćina (JM101) koje sadrže *tac*-IF-*lacZ* i *PLtl*-IF-*lacZ* fuzije i to na dva načina: 1) kotransformacijom sa plazmidom *pcI* (na kome je kloniran gen *cI857*) (Slika 23), ili 2) kloniranjem u restrikciono mesto *Hind* III plazmida *pDFPZ* i *pDFTZ* (Slika 21b).

Temperaturu medijuma na kojoj su rasle ćelije držali smo na 30° C ili na 37° C, a indukcija je vršena sa 1mM IPTG-om ili podizanjem temperature medijuma na 42° C, ili na oba načina. Slike 24a i 24b prikazuju rezultate dobijene rastom ćelijske kulture na temperaturi medijuma od 30° C i 37° C kada se na posebnim plazmidima u ćeliji nalaze represor faga λ i jedna od konstrukcija promotor-IFN-*lacZ* fuzija. Jasno je da i *lac* i CI represor efikasno kontrolišu *PLtl* promotor pokazujući združeni efekat represije i njihove derepresije, posebno na temperaturi medijuma od 30° C.

Dakle, pojedinačna indukcija na ovoj temperaturi samo delimično aktivira promotor, a jasan efekat indukcije se postiže tek nakon inaktivacije oba represora. Konstrukcija koja sadrži *tac* promotor pokazuje znatno niži nivo aktivnosti β -galaktozidaze. Rastom ćelija domaćina koje sadrže konstrukciju sa *PLtl* promotorom, na temperaturi medijuma od 37° C, dobija se isti efekat aktivacije promotora dvostrukom derepresijom. Inaktivacijom samo *lac* represora postiže se uočljivo viši nivo aktivnosti *PLtl* promotora, što može da se protumači kao posledica delimične

...transkripcija gena...
 ...beta-gal...
 ...IPTG...



Slika 22.

aktivnost u slučaju kada ćelije domaćina rastu na temperaturi medijuma od 30° C. Iz tabele se jasno vidi da je transkripcija preko *PLtl* promotora kontrolisana preko proizvoda *cI857* i *lacI* gena i da se tek deaktivacijom oba represora postiže najviši stepen ekspresije.

4.6. Ekspresija β -interferon-*lacZ* genskih fuzija pod kontrolom hibridnih *tac* i *PLtl* promotora.

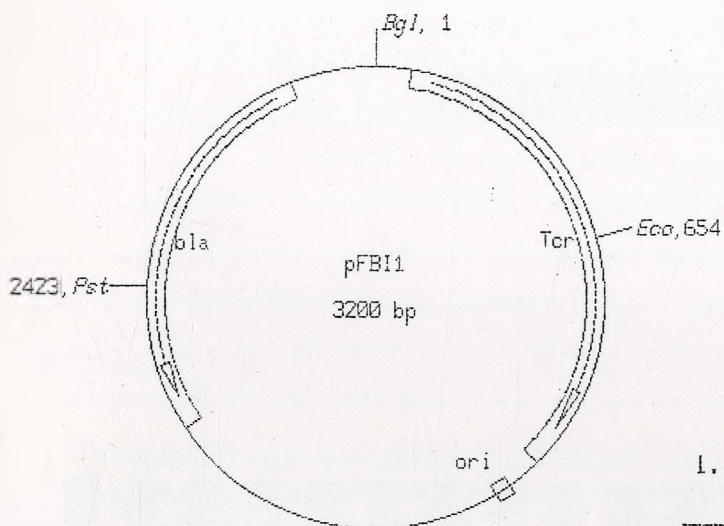
Da bismo merili jačine promotora preciznije i jednostavnije i da bismo proučavali i poredili njihove osobine, konstruisali smo fuzije hibridnih promotora-interferona-*lacZ* gena i uporedili aktivnosti β -galaktozidaze (proizvod *lacZ* gena) rekombinantnih plazmida (Slika 21a).

Da bi rezultati mogli što bolje da se porede i usaglase, sve plazmidne konstrukcije su bile gotovo identične osim dela regulatornog regiona koji kontroliše ekspresiju fuzije β -interferon-*lacZ* gena. Plazmidne konstrukcije pDFTZ i pDFPZ su testirane na β -galaktozidaznu aktivnost. S obzirom da ćelije domaćina (JM101) hiperprodukuju *lac* represor (*I^q*), onda su i *tac* (pDFTZ) i *PLtl* (pDFPZ) promotor bili pod kontrolom istog represora, a derepresija je efikasno vršena prisustvom 1mM IPTG-a. Na Slici 22. se vidi da *PLtl* promotor posle indukcije omogućava dva puta veću ekspresiju β -galaktozidaze nego *tac* promotor. Ako se posmatraju njihovi konstitutivni nivoi ekspresije uočava se da su nivoi derepresije slični kod oba promotora: 21 za *PLtl* i 25 puta za *tac* promotor.

Pod ovim eksperimentalnim okolnostima smo dakle pokazali da je hibridni *PLtl* promotor jači u poređenju sa hibridnim *tac* promotorom, ali da ima i značajno povišenu konstitutivnu ekspresiju. Odnos jačina promotora je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za aktivnosti promotora sa konstrukcijama sa kojima je merena antivirusna aktivnost β -interferona.

Slika 23. Kloniranje *cI857* gena za temperaturno senzitivni represor faga λ u plazmid pFBII.

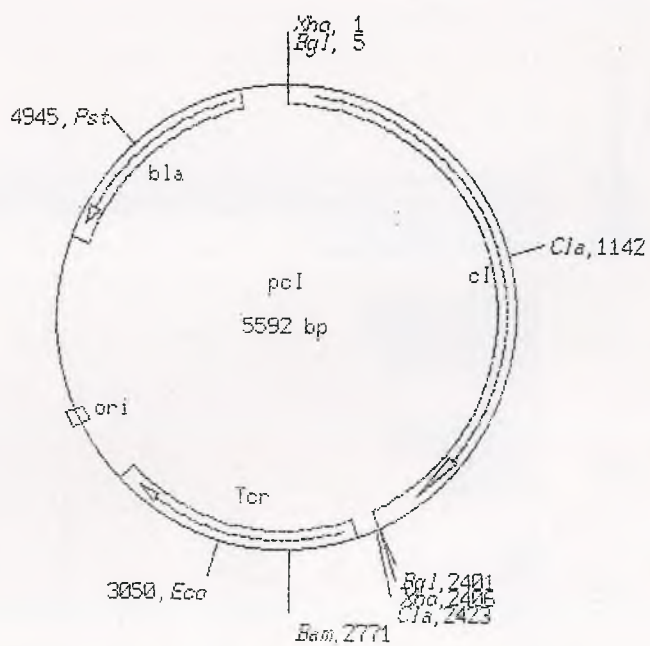
Plazmid pFBII je linearizovan endonukleazom *Bgl* II defosforilisan alkalnom fosfatazom i recirkularizivan ubacivanjem *Bgl* II fragmenta od 2,4 kbp, izolovanog iz λ faga, koji sadrži gen *cI857*. Sa ovom konstrukcijom transformisan je soj JM101 i kolonije selektovane na podlogama sa ampicilinom (40 μ g/ml) i tetraciklinom, (15 μ g/ml). Ova plazmidna konstrukcija je poslužila za kotransformaciju soja JM101 koji sadrži plazmidne konstrukcije pDFTZ ili pDFPZ. Kolonije koje su rasle na podlozi sa ampicilinom (40 μ g/ml) i tetraciklinom, (15 μ g/ml) i istovremeno sa x-Gal-om davale plavu boju odabirane su za merenje aktivnosti promotora. Oznake za restrikciona mesta na plazmidima su date skraćeno: *Eco*, *Eco* RI; *Pst*, *Pst* I; *Bgl*, *Bgl* II. Orijentacije gena su označene strelicama. Brojevi označavaju pozicije restrikcionih mesta i dimenzije plazmida u parovima baza. Grafički prikaz međusobnih dimenzija plazmida nije proporcionalan.



1. Izoluje se *Bgl* II fragment od 2,4kb iz λ faga koji sadrzi gen *clt505?*

1. *Bgl* II
2. *Cla*P

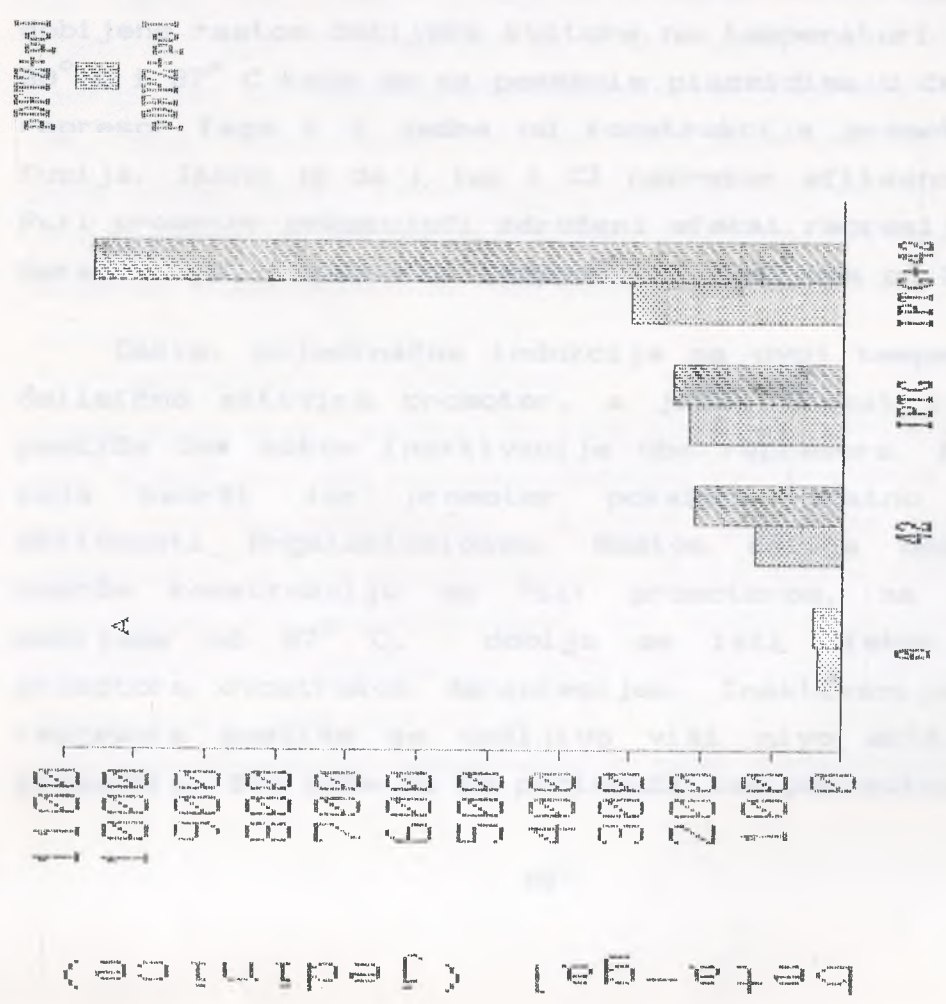
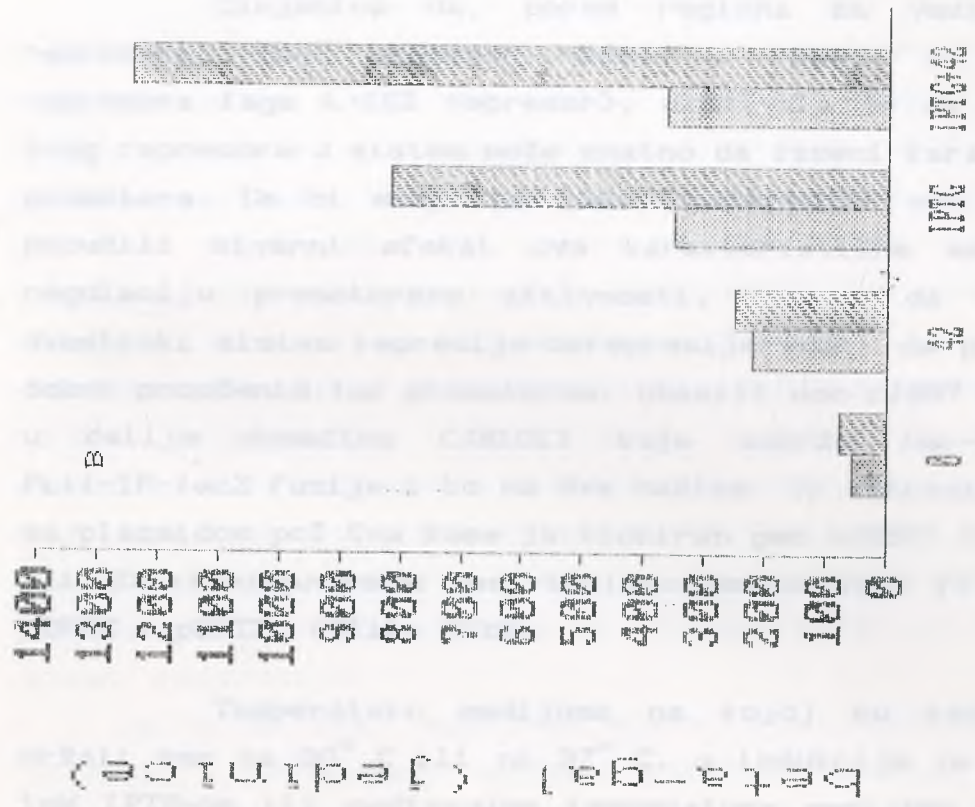
LIGACIJA



Slika 23.

Slika 24. Aktivnosti β -galaktozidaze dobijene sa ekspresionih plazmida pDFPZ i pDFTZ u prisustvu plazmida pCI.

Kultura je rasla na 30° C (a) ili 37° C (b) do približno 0,2 OD na 600 i indukovana je sledeća dva sata sa 1mM IPTG-om ili temperaturnim pomakom na 42° C, ili na oba načina. Aktivnost β -galaktozidaze je merena kako je objašnjeno u poglavlju METODE. X-osa; 0: bez indukcije, 42: indukcija temperaturnim pomakom, IPTG: indukcija sa 1mM IPTG-om, IPTG+42: indukcija sa 1mM IPTG-om i temperaturnim pomakom. Y-osa: Aktivnosti izražene u jedinicama β -galaktozidaze.



indukcija

indukcija

Činjenica da, pored regiona za vezivanje *lac* represora, *PLtl* promotor sadrži i region za vezivanje represora faga λ (CI represor), ukazivala je da ubacivanje ovog represora u sistem može znatno da izmeni karakteristike promotora. Da bi eksperimentalno potkrepili ovu tvrdnju i proučili stvarni efekat ove karakteristične sekvence na regulaciju promotorske aktivnosti, kao i da bi ovakav dvostruki sistem represije-derepresije mogli da poredimo sa dobro proučenim *lac* promotorom, ubacili smo *cI857* gen faga λ u ćelije domaćina (JM101) koje sadrže *lac*-IF-*lacZ* i *PLtl*-IF-*lacZ* fuzije i to na dva načina: 1) kotransformacijom sa plazmidom *pcI* (na kome je kloniran gen *cI857*) (Slika 23), ili 2) kloniranjem u restrikciono mesto *Hind* III plazmida *pDFPZ* i *pDFTZ* (Slika 21b).

Temperaturu medijuma na kojoj su rasle ćelije držali smo na 30° C ili na 37° C, a indukcija je vršena sa 1mM IPTG-om ili podizanjem temperature medijuma na 42° C, ili na oba načina. Slike 24a i 24b prikazuju rezultate dobijene rastom ćelijske kulture na temperaturi medijuma od 30° C i 37° C kada se na posebnim plazmidima u ćeliji nalaze represor faga λ i jedna od konstrukcija promotor-IFN-*lacZ* fuzija. Jasno je da i *lac* i CI represor efikasno kontrolišu *PLtl* promotor pokazujući združeni efekat represije i njihove derepresije, posebno na temperaturi medijuma od 30° C.

Dakle, pojedinačna indukcija na ovoj temperaturi samo delimično aktivira promotor, a jasan efekat indukcije se postiže tek nakon inaktivacije oba represora. Konstrukcija koja sadrži *lac* promotor pokazuje znatno niži nivo aktivnosti β -galaktozidaze. Rastom ćelija domaćina koje sadrže konstrukciju sa *PLtl* promotorom, na temperaturi medijuma od 37° C, dobija se isti efekat aktivacije promotora dvostrukom derepresijom. Inaktivacijom samo *lac* represora postiže se uočljivo viši nivo aktivnosti *PLtl* promotora, što može da se protumači kao posledica delimične

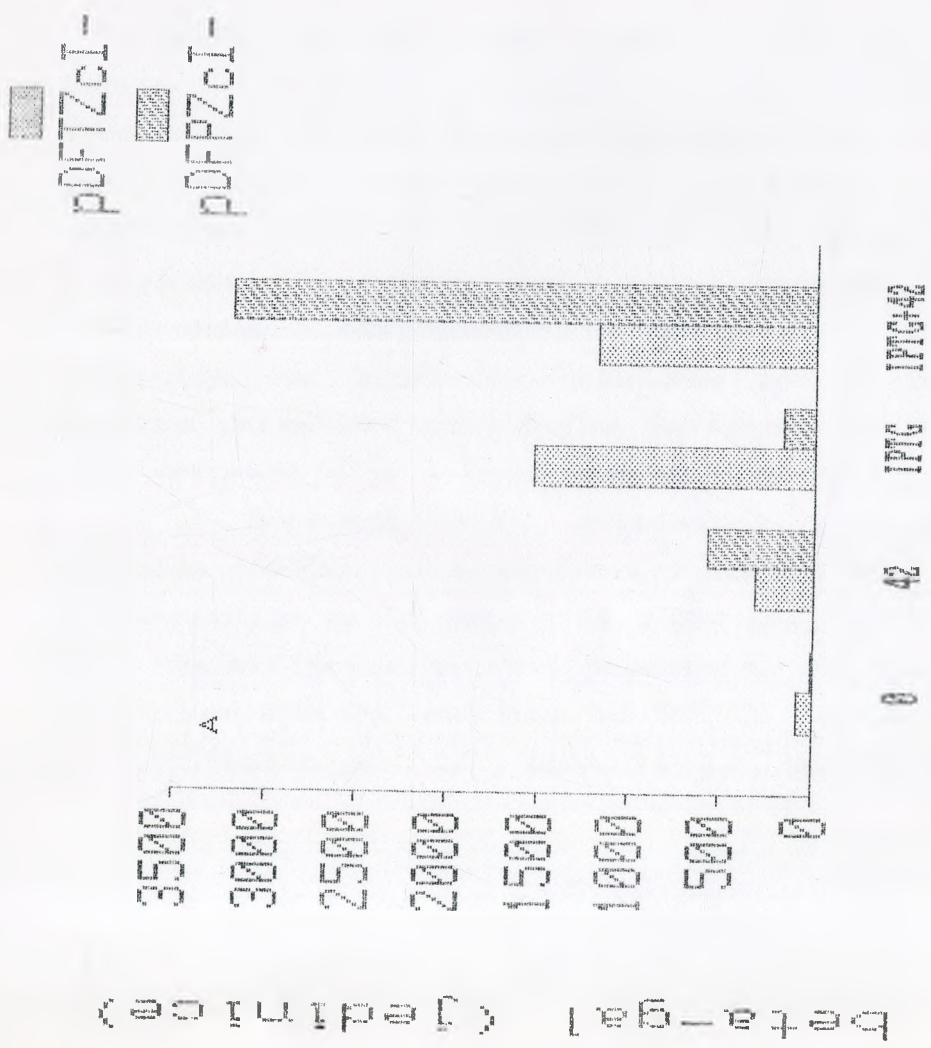
inaktivacije CI represora na temperaturi medijuma od 37° C. Pod istim uslovima, konstrukcija pod kontrolom *tac* promotora je pokazala nekoliko puta niži nivo ekspresije β -galaktozidaze, a λ represor nema nikakav značajan efekat. Istovremeno, ako se poredi sa sistemom koji ne sadrži λ represor (Slika 22 i 24.), jasno se uočava skoro za ceo red veličine niži nivo ekspresije β -galaktozidaze pod kontrolom oba promotora. Dakle ubacivanjem gena za CI represor na posebnom plazmidu, a u istu ćeliju domaćina, postignut je efekat regulacije transkripcije preko *P_{L_tl}* promotora. Međutim, nivo ekspresije drastično je smanjen i to za čitav red veličine kod oba ekspresiona vektora. Svakako da ubacivanje dva plazmida, koji se istovremeno nalaze u više kopija u istoj ćeliji, može da ima samo negativno dejstvo na ishod ekspresije.

Da bi se ovaj negativni efekat dva različita plazmida uklonio, a istovremeno zadržala kontrola nad *P_{L_tl}* promotorom preko λ represora, u sledećoj fazi istraživanja smo u *Hind* III mesto postojećih plazmidnih konstrukcija pDFTZ i pDFPZ klonirali *Bgl* II fragment od 2,4kb poreklom iz faga λ koji sadrži gen za temperaturno senzitivni represor (Slika 21b). Cilj ovog eksperimenta je bio dobijanje jednog sistema koji može lakše da se kontroliše, jer je sistem sa samo jednim plazmidom koji se nalazi u velikom broju kopija po ćeliji sigurno stabilniji, pa se može očekivati da i sam ishod ekspresije bude povoljniji.

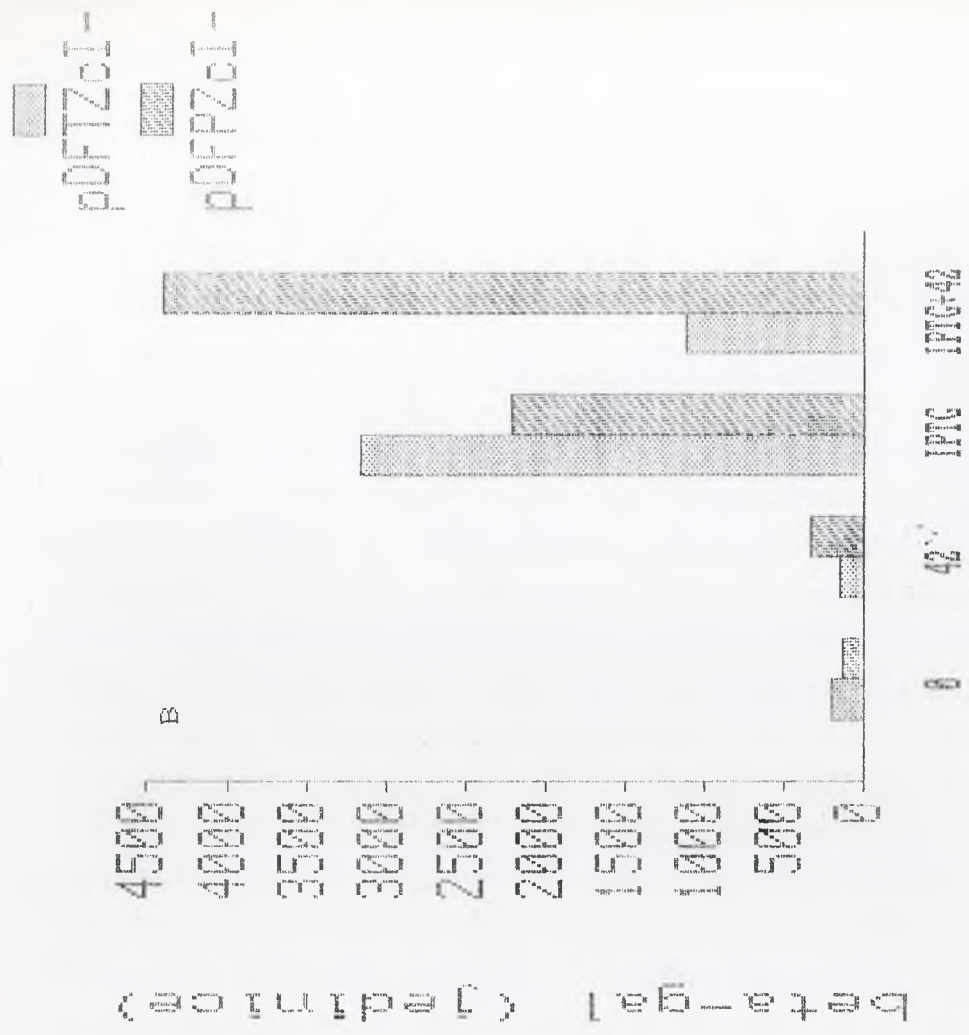
Aktivnosti promotora, izražene u jedinicama β -galaktozidaze, merene su kod plazmida pDFTZcI(-) kada je gen *cI857* bio orijentisan obrnuto od kretanja kazaljke na satu (- orijentacija), a kod plazmida pDFPZcI(-) i pDFPZcI(+) u obe orijentacije. Slika 25a i 25b prikazuju aktivnosti β -galaktozidaze sa plazmidnim konstrukcijama pDFTcI(-) i pDFPZcI(-) pri rastu ćelija domaćina na temperaturi medijuma od 30° C i 37° C. Uočava se da je kod obe ove plazmidne konstrukcije nivo β -galaktozidaze znatno

Slika 25. Aktivnosti β -galaktozidaze dobijene sa ekspresionih plazmida pDFPZcI i pDFTZcI.

Kultura je rasla na 30° C (a) ili 37° C (b) do približno 0,2 OD na 600 i indukovana je sledeća dva sata sa 1mM IPTG-om, ili temperaturnim pomakom na 42° C, ili na oba načina. Aktivnost β -galaktozidaze je merena kako je objašnjeno u poglavlju METODE. X-osa; 0: bez indukcije, 42: indukcija temperaturnim pomakom, IPTG: indukcija sa 1mM IPTG-om, IPTG+42: indukcija sa 1mM IPTG-om i temperaturnim pomakom. Y-osa: Aktivnosti izražene u jedinicima β -galaktozidaze.



indukcija



indukcija



viši nego u sistemu koji sadrži dva različita ekspresiona plazmida u istoj ćeliji domaćinu. Kod ovih konstrukcija, gde je genska fuzija pod kontrolom *P_{Ltl}* promotora, združeni efekat dva represora je izrazit. Pri rastu ćelija domaćina na temperaturi medijuma od 30° C, pojedinačnom inaktivacijom represora nivo ekspresije se delimično povećava, dok je potpun efekat derepresije jasno izražen tek nakon inaktivacije oba represora. Tako se inaktivacijom *lac* represora postiže derepresija od 20 puta, a inaktivacijom *CI* represora 70 puta, dok se potpunom inaktivacijom oba represora postiže derepresija od čak 400 puta. Na temperaturi medijuma od 37° C faktor totalne derepresije je znatno niži i iznosi samo 36. Ovakva razlika u stepenu derepresije je očigledno vezana za delimičnu inaktivaciju temperaturno senzitivnog represora na povišenoj temperaturi, što se posebno ogleda u nivou aktivnosti β -gal nakon inaktivacije *lac* represora koja je četiri puta veća nego na temperaturi od 30° C (Slika 25a i 25b).

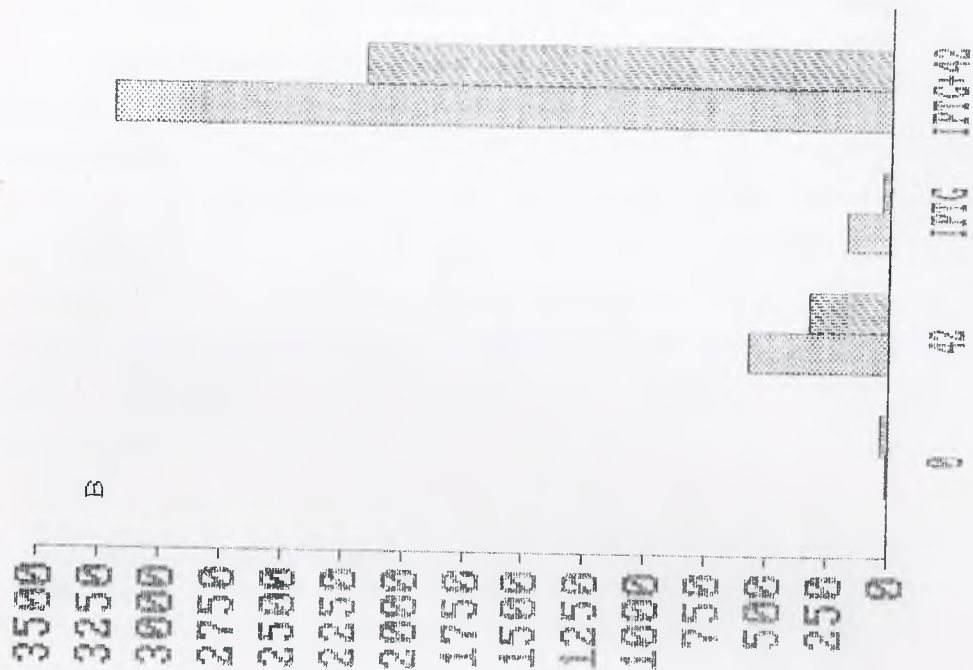
Dakle, na višoj temperaturi medijuma na kojoj su rasle ćelije domaćina nalazimo i viši konstitutivni nivo ekspresije. To može da bude posledica delimične temperaturne inaktivacije *CI* represora, ali je i nivo ekspresije nakon dvostruke indukcije (inaktivacije oba represora) za 35% veći u odnosu na onaj pri nižoj temperaturi medijuma. Istovremeno, ekspresioni plazmid koji se nalazi pod kontrolom *tac* promotora, kao što se i očekivalo, nije pokazao primetnu inducibilnu zavisnost od λ represora, a nivo ekspresije je niži u poređenju sa *P_{Ltl}* promotorom.

Poredeći nivo ekspresije β -galaktozidaze kod plazmida *pDFPZcI(-)* i *pDFPZcI(+)* (Slika 26a i 26b.), gde se transkripcija sa *cI* gena vrši u obe orijentacije u odnosu na smer transkripcije sa *P_{Ltl}* promotora, utvrdili smo sledeće: a) na temperaturi medijuma od 30° C, konstrukcija kod koje je orijentacija *cI* gena (-), pokazuje niži nivo



Slika 26. Aktivnosti β -galaktozidaze dobijene sa ekspresionih plazmida pDFPZcI(-) i pDFPZcI(+).

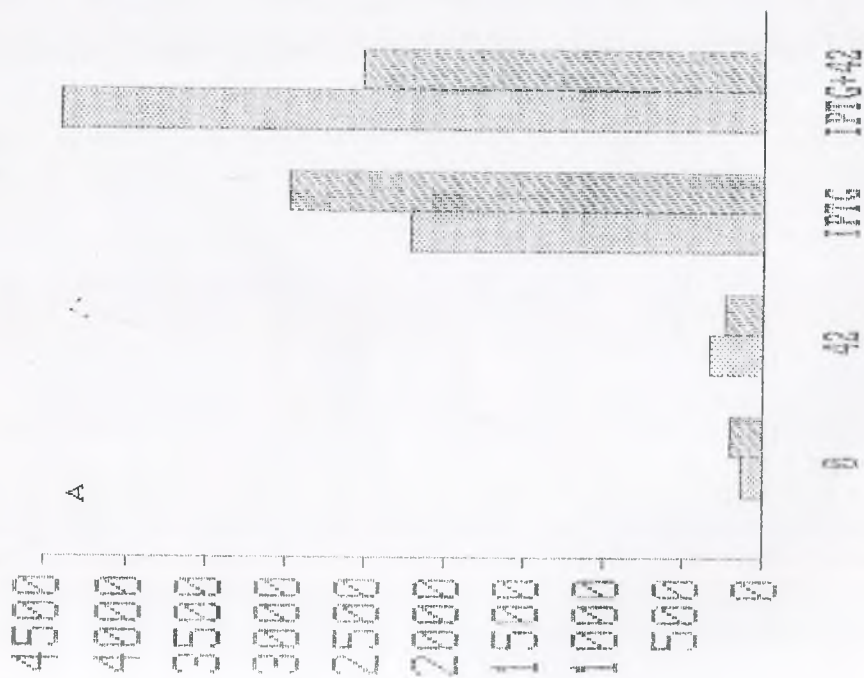
Kultura je rasla na 30° C (a) ili 37° C (b) do približno 0,2 OD na 600 i indukovana je sledeća dva sata sa 1mM IPTG-om ili temperaturnim pomakom na 42° C, ili na oba načina. Aktivnost β -galaktozidaze je merena kako je objašnjeno u poglavlju METODE (sekcija n). X-osa; 0: bez indukcije, 42: indukcija temperaturnim pomakom, IPTG: indukcija sa 1mM IPTG-om, IPTG+42: indukcija sa 1mM IPTG-om i temperaturnim pomakom. Y-osa: Aktivnosti izražene u jedinicima β -galaktozidaze.

 pDFFPZci-
 pDFFPZci+



(0011100) (0010100)

 pDFFPZci-
 pDFFPZci+



(0011100) (0010100)

indukcija

indukcija

konstitutivne ekspresije, dok je nivo aktivnosti β -galaktozidaze pri punoj derepresiji 50% viši u odnosu na (+) orijentaciju, b) inaktivacija kako *CI* tako i *lac* represora je izrazitija kod (-) orijentacije, c) da je na temperaturi medijuma od 37° C aktivnost β -galaktozidaze pri kompletnoj derepresiji za 30% viša kod konstrukcije sa (-) orijentacijom *cI* gena, d) kod konstrukcije sa (+) orijentacijom *cI* gena maksimalna sinteza β -galaktozidaze se dobija ako se indukcija obavlja samo sa 1mM IPTG-om, dok se pri kompletnoj derepresiji u stvari dobija 16% niža aktivnost

4.7. Efekat temperature na nivo ekspresije kloniranih gena.

Pod svim okolnostima, bilo da je merena ekspresija β -interferona ili β -interferon-*lacZ* fuzije i nezavisno od promotora koji je kontrolisao ekspresiju, najviši nivo ekspresije je dobijan na temperaturi medijuma od 37° C. Pokazano je da je nivo β -gal bio maksimalno ispoljen kod oba promotora nakon inaktivacije *lac* represora kao jedinog prisutnog u sistemu, a da su pod istim uslovima inaktivacije pri povišenoj temperaturi (42° C) oba promotora ispoljila 65% svoje maksimalne aktivnosti (Tabela II). Interesantno je da se i konstitutivni nivo ekspresije smanjuje za 20% nakon povećanja temperature na 42° C. Ovakav efekat je uočljiv i kod konstrukcije koja sadrži *lac* promotor i *cI* gen (Slika 25b).

TABELA II.

Aktivnosti promotora prikazane u jedinicama β -galaktozidaze^a

PROMOTOR/ KONSTRUKT ^b	indukcija ^e			
	37° C ^c	42° C ^d	37 C°	42 C°
<i>PLtl/pDFPZ</i>	449	369	9311	6013
<i>tac/pDFTZ</i>	166	131	4545	2969

^a Videti poglavlje METODE^b videti Sliku 13 i 16^c Soj JM101 hiperprodukuje *lacI* represor i vezuje se za operatorske regione kod oba promotora. Aktivnost promotora je odredjivana na 37° C u neindukovanom stanju.^d Kultura ćelija je uzgajana na 37° C do približno 0,2 OD na A600 a zatim je 120 minuta držana na temperaturi medijuma od 42° C, a zatim merena aktivnost β -galaktozidaze.^e Indukcija je vršena na naznačenim temperaturama 120 minuta sa 1mM IPTG-om.

5. DISKUSIJA

Iako već postoji obilje podataka i saznanja o ekspresiji kloniranih gena u *E. coli*, još uvek ne postoji jedna uopštena shema za dobijanje najefikasnije ekspresije bilo kog kloniranog gena ili radi fundamentalnih istraživanja ili za potrebe industrije. To je svakako razlog što se u mnogim svetskim laboratorijama svakodnevno konstruišu nove varijante ekspresionih vektora. Mogućnosti poboljšanja i iznalaženja novih varijanti vektora gotovo su neograničene. Plazmidni vektor pBR322 (Bolivar *et al.* 1977), zbog svojih izuzetnih svojstava, predstavlja jedan od najviše korišćenih vektora. Zanimljivo je što je za relativno kratko vreme, od kako je konstruisan, ovaj vektor dobio preko sto pedeset svojih derivata (Balbás *et al.* 1986).

Svaka laboratorija rešavajući svoje pojedinačne probleme najčešće konstruiše specijalizovane plazmidne vektore, koji zatim mogu da efikasno posluže i širim zahtevima, ili kao gotov vektor za kloniranje, ekspresiju nekog gena, ili za proučavanje regulatornih sekvenci. Takođe, često se samo delovi plazmida sa određenim specifičnim elementima koriste za konstruisanje novih specijalizovanih plazmida. Naš hibridni promotor je upravo i nastao povezivanjem elemenata poreklom iz različitih ekspresionih plazmida. Dakle, cilj nam je bio s jedne strane, optimizacija ekspresije kloniranog gena za humani β -interferon (kao model-gena) regulacijom na nivou transkripcije, a s druge strane, konstruisanje jednog fleksibilnog promotora koji bi mogao da pokrije širi spektar specifičnih zahteva za ekspresiju različitih gena.

5.1. Obrada kloniranog gena humanog β -interferona za konstrukciju ekspresionog vektora.

Naš pristup je bio da model gen - humani β -interferon, oslobodimo prirodnih regulatornih sekvenci kao i sekvence za lider peptid skraćivanjem molekula sa egzonukleazom i da se na taj način dovoljno približimo sekvenci strukturalnog gena. Ovaj postupak predstavlja jedan od uslova za dobijanje ekspresije kloniranih eukariotskih gena u *E. coli* i opisan je u poglavlju 4. REZULTATI.

Poznato je da egzonukleaza Bal 31 skraćuje jednolančane i dvolančane krajeve DNK stvarajući smešu progresivno kraćih molekula. Rezultujuća smeša nije homogena već se statistički gledano, dobija najveći broj molekula sa G-C baznim parom kao terminalnim nukleotidima (Guo i Wu, 1983).

Mi smo analizirali sekvence osam odabranih klonova kod kojih se delecija odvijala približno do ATG kodona. Sekvenciranjem datih regiona kod odabranih klonova je utvrđeno da su se sve delecije nalazile u okviru 19bp uzvodno i nizvodno od ATG kodona. Konstatovali smo, ako se naravno ograničimo na ovaj region od "±19bp", da je u šest (75%) slučajeva 5' terminalni nukleotid bio C, a da su se dva (25%) terminalna 5' kraja završavala sa nukleotidom A. Interesantno je navesti da, mada je G u okviru ovog regiona dvostruko ređe zastupljeno od C, nijedan analizirani klon nije imao G na 5' terminusu. Posmatrajući sekvencu u okviru ovog regiona, vidi se da u sedam slučajeva iza nukleotida C nizvodno sledi nukleotid T, dok u šest slučajeva su to A ili C. Normalno bi, znači, bilo i očekivati sličnu distribuciju redosleda nukleotida i kod analiziranih klonova. Ipak, od šest klonova koji su kao 5' kraj imali nukleotid C, kod pet klonova je drugi nukleotid nizvodno bio T, a samo je kod jednog klona bio A. Ako se sada posmatra nukleotid koji prethodi nukleotidu C, vidi se da se T i A svaki u datom regionu pojavljuju po četiri puta, dok se G i C pojavljuju 3

odnosno dva puta. Ovakav odnos je znatno drugačiji kod analiziranih klonova: C se ne pojavljuje ni jedanput, A se pojavljuje kod jednog klona, T se pojavljuje kod dva klona, a G se pojavljuje kod tri klona. Dakle, u okviru analiziranog regiona od "±19bp" sekvenca 5' GCT 3' je zastupljena ukupno tri puta i upravo su se među osam analiziranih klonova našla sva tri kod kojih je delecija išla do C u okviru ove sekvence.

Naravno, teško je na osnovu ovako malog broja analiziranih klonova izvući uopšteni zaključak koje sekvence prvenstveno "prigušuju" aktivnost egzonukleaze Bal 31, ali je sigurno da specifične sekvence diktiraju "nagomilavanje" određenih dužina deletiranih fragmenata. Ovo treba imati u vidu prilikom planiranja skraćivanja fragmenata DNK egzonukleazom Bal 31 na unapred definisane dužine. Tako se može zaključiti da se u našem primeru delecije 5' regiona uzvodno od sekvence za β -interferon, aktivnost Bal 31 egzonukleaze u 63% slučajeva zaustavljala (u okviru "±19bp") na sekvencama: $\left(\begin{smallmatrix} G \\ T \end{smallmatrix} \right)CT$. Prema tome, vrlo je moguće, ukoliko u okviru planiranog mesta skraćivanja molekula egzonukleazom ne postoji navedena sekvenca $\left(\begin{smallmatrix} G \\ T \end{smallmatrix} \right)CT$, ili opštije NT , da se mora računati na neophodno pretraživanje znatno većeg broja klonova da bi se pronašao molekul DNK sa željenim skraćanjem.

5.2. Ekspresija gena za humani β -interferon.

U poglavlju REZULTATI (4.1). i u prethodnom delu poglavlja DISKUSIJA govorili smo o problemu "čišćenja" sekvenci koje se nalaze uzvodno od strukturalnog gena (poreklom iz eukariota) sa ciljem da se dobije njegova ekspresija pod kontrolom prokariotskog promotora u bakteriji *E. coli*. Među klonovima koje smo analizirali restrikcijom i mapiranjem i sekvenciranjem, odabrali smo onaj kod koga je bila odstranjena kompletna regulatorna sekvenca i sekvenca

za signal peptid. Kod ovog klona (pDF81) preostala sekvenca koja kodira za zreli β -interferon uključujući i ATG kodon stavljena je pod kontrolu hibridnog bakterijskog *tac* promotora sa SD sekvencom udaljenom 5bp od ATG kodona. Funkcionalnost ovakvog ekspresionog sistema smo potvrdili biološkim testom na antivirusnu aktivnost koja je određena inhibicijom citopatogenog efekta VS virusa na WISH ćelije. Proizvod ekspresije sa plazmida pDF81 je u ovom testu pokazao da klonirani i obrađeni fragment sa genom koji kodira za humani β -interferon pokazuje biološku aktivnost autentičnog β -interferona iz humanih fibroblasta.³ Pošto je pokazao biološku aktivnost β -interferona, ekspresioni plazmid pDF81 je poslužio za konstruisanje ekspresionog plazmida pDFT. Ovaj novi plazmid je nastao uklapanjem fragmenta DNK poreklom iz dva različita plazmida i jednog sintetisanog dvolančanog fragmenta: a) fragmenta od 772bp (poreklom iz plazmida pDF81) koji sadrži *tac* promotor i gen za interferon, b) fragmenta od 2294bp, poreklom iz plazmida pBR322, koji sadrži "origin" replikacije i gen za rezistenciju na ampicilin i c) fragmenta od 36bp koji određuje terminaciju transkripcije (sintetisani *trpA* terminator). Ovu konstrukciju odlikuje nekoliko novih karakteristika u poređenju sa prethodnom: a) poseduje *trpA* terminator nizvodno od 3' kraja gena za β -interferon b) delecijom od 1657bp uklonjen je *rop* gen - "repressor of primer" i c) uklonjeno je i *Hinc* II restrikciono mesto u položaju 1049 plazmida pDF81. Ovo poslednje pojednostavilo je konstruisanje ekspresionog sistema sa novim hibridnim *PLtl* promotorom (pDFP).

U daljem radu smo uporedili nivo ekspresije gena za β -interferon kada se on nalazi pod kontrolom dva hibridna promotora: *tac*, koji se nalazi na plazmidu pDFT i *PLtl* na plazmidu pDFP (Slike 14. i 17.).

³ Rezultat nije prikazan jer je biološka aktivnost humanog β -interferona pokazana na plazmidnoj konstrukciji pDFT koja je derivat konstrukcije pDF81.

U poglavlju REZULTATI smo u Tabeli I. prikazali nivo ekspresija za obe konstrukcije pod različitim uslovima indukcije i rasta ćelija domaćina. Očigledno je, da u uslovima rasta ćelija domaćina na istoj temperaturi medijuma od 37° C, konstrukcija pod kontrolom *PLtl* promotora daje oko 2,7 puta veću aktivnost. S obzirom da se ova dva promotora jedino razlikuju u regionu uzvodno od "-35" sekvence, to se ova razlika u stepenu ekspresije može tumačiti postojanjem jednog kontinualnog dugog (27bp) AT-bogatog niza kod *PLtl* promotora, dok je kod *lac* promotora AT-bogati region sastavljen od dva kraća dela (12 i 14bp) odvojena segmentom od 25bp.

Činjenica da su ekspresioni plazmidi koristili različite domaćine, takođe je mogla da ima uticaja na razliku u stepenu ekspresije. Za konstrukciju sa *lac* promotorom korišćen je soj-domaćin JM101 koji se odlikuje hiperprodukcijom *lac* represora, dok je za konstrukciju sa *PLtl* promotorom korišćen soj POP2136, koji opet u okviru svog hromozoma sadrži gen koji kodira za temperaturno senzitivni represor faga λ . Pošto *PLtl* promotor sadrži operatorske regione *PL* promotora preko kojih se regulacija transkripcije vrši vezivanjem ili inaktivacijom temperaturno senzitivnog represora, osnovni princip je da se rast ćelija odvija na nižim temperaturama od 28-30° C, a indukcija povišenjem temperature medijuma na 40-42° C.

Eksperimenti su pokazali da se nakon rasta ćelija na 30° C i punom indukcijom na 42° C i 1mM IPTG-om, dobija samo 25% ekspresije β -interferona pod kontrolom *PLtl* promotora u odnosu na eksperiment sa istovetnim načinom indukcije, ali posle rasta ćelija na 37° C. Ovako snižena vrednost ekspresije na nižoj temperaturi medijuma u kome su rasle ćelije, najverovatnije u našem sistemu potiče ili od fiziološki niske temperature za optimalno funkcionisanje ćelija domaćina, ili od suboptimalne temperature za

vezivanje polimeraze RNK za sekvencu na promotoru. Konstrukcija koja sadrži *P_{Ltl}* promotor, pored IPTG-om, pokazuje i očekivanu temperaturno-zavisnu indukciju.

5.3. Ekspresija β -interferon-*lacZ* genskih fuzija.

Svakako, jednostavniji i precizniji način određivanja jačine promotora i njegove regulacije je korišćenje *lacZ* gena kao "gena reportera". Zbog toga su konstruisane fuzije koje su sadržale jedan od promotora, sekvencu koja kodira za prvih 46 aminokiselina β -interferona i u fazi čitanja sekvencu *lacZ* gena. Na ovaj način smo poredili stepen ekspresije oba promotora pod identičnim uslovima: a) u ćelijama istog domaćina i b) korišćenjem istih konstrukcionih sklopova izuzev delova koje pokrivaju promotori.

Upoređivanjem aktivnosti oba promotora pri rastu ćelija domaćina na temperaturi medijuma od 37° C, a pod kontrolom samo *lac* represora, dobijen je dvostruko viši nivo aktivnosti β -galaktozidaze, bilo konstitutivni, bilo indukovan, kod konstrukcije sa *P_{Ltl}* promotorom (Slika 22.). S obzirom da su obe konstrukcije koristile istog domaćina za ekspresiju, za razliku od eksperimenata sa ekspresijom β -interferona, to je svaka sumnja da izbor domaćina može da utiče na toliku razliku u ekspresiji eliminisana. Dakle, ovaj rezultat ukazuje da sekvence koje se nalaze uzvodno od "-35" regiona sigurno utiču na efikasnost transkripcije. Pošto se AT-bogati regioni nalaze u navedenoj oblasti i razlikuju se kod ovih promotora kako po veličini regiona koji obuhvataju, tako i po njihovom mestu, najverovatnije je da su oni i najtešnje uključeni sa drugim elementima u kompleks faktora koji utiču na efikasnost jednog promotora.

P_{Ltl} promotor sadrži uzvodno od "-35" regiona, pored AT bogate sekvence, i dva operatorska mesta (*O_{L2}* i *O_{L3}*) za vezivanje represora faga λ (CI represor). Zahvaljujući ovoj

karakteristici, posle uvođenja u sistem gena koji kodira za temperaturno senzitivni represor, mogli smo P_{Ltl} promotor da kontrolišemo pomoću dva različita represora: λ i λ represora. Da bismo maksimalno usaglasili oba promotorska sistema, onda smo represor faga λ , bez obzira na njegovu funkciju da se vezuje samo za operatorske regione O_L2 i O_L3 P_{Ltl} promotora, ubacivali i u sistem koji sadrži λ promotor. U sistemu u kome smo merili aktivnosti oba promotora koristili smo istog domaćina koji hiperprodukuje λ represor. Za izvor λ represora korišćen je poseban plazmid sa kloniranim $cI857$ genom za temperaturno senzitivni represor. Dakle, u ovom slučaju smo imali u jednoj ćeliji dva različita plazmida: jedan je nosio ekspresioni sistem sa λ ili P_{Ltl} promotorom, dok se na drugom nalazio gen koji kodira za λ represor.

Aktivnosti oba promotora smo poredili na obe temperature medijuma u kome su rasle ćelije domaćina, 30°C i 37°C i to pomoću oba načina indukcije, sa 1mM IPTG-om i temperaturnim pomakom na 42°C (Slika 24.). Združeni efekat dvostruke indukcije P_{Ltl} promotora na obe temperature na kojima smo vršili merenje aktivnosti β -galaktozidaze je očigledan. Na temperaturi od 30°C , jasno se uočava samo delimična derepresija pojedinačnom inaktivacijom represora a puna derepresija inaktivacijom oba represora. Na temperaturi od 37°C situacija je nešto drugačija. Na višoj temperaturi (37°C) indukcija samo IPTG-om je znatno izrazitija, dok se efekat samo temperaturne ili kompletne indukcije suštinski ne razlikuje od rezultata na nižoj temperaturi (30°C). Ovaj efekat se svakako mora tumačiti delimičnom inaktivacijom temperaturno senzitivnog represora faga λ . Postupnim smanjenjem temperature medijuma u kome rastu ćelije domaćina, svakako bi se mogla postići i gradacija nivoa ekspresije ukoliko λ represor nije prisutan ili je inaktiviran. Postepena simultana inaktivacija oba represora

postupnim povišenjem temperature bila bi moguća ukoliko bi se umesto "divljeg tipa" koristio temperaturno senzitivni mutant *lac* represora.

Istovremeno, ako se posmatra ekspresija kod konstrukcije sa *lac* promotorom (Slika 24.) može se uočiti da pored očekivanog povećanja ekspresije nakon inaktivacije *lac* represora, postoji i izvesno povećanje konstitutivne ekspresije povišenjem temperature na 42° C. Aditivni temperaturni efekat i efekat IPTG-a je neznatan, ali ipak zapažen. Kako nam nije poznato da u okviru sekvence *lac* promotora postoji mesto tolikog stepena homologije za koju bi se vezivao λ represor, ovakav efekat temperature pre možemo da pripišemo faktorima koji su vezani za postojanje dva plazmida u jednoj ćeliji domaćina, nego za funkcionalnu korelaciju represora faga λ i *lac* promotora.

Ako uporedimo vrednosti aktivnosti β -galaktozidaze kod sistema koji je kontrolisan samo *lac* represorom (Slika 22.) sa onim kod koga je prisutan i drugi represorski molekul koji produkuje *cI* gen na posebnom plazmidu u ćeliji (Slika 24.), vidimo da se, bez obzira na tip promotora u plazmidnoj konstrukciji, dobijaju za čitav red veličine niže vrednosti kod ekspresionog sistema sa dva plazmida. Ovakav sistem sa dva plazmida je svakako veoma nepovoljan ukoliko je osnovni cilj dobijanje efikasne ekspresije nekog gena.

Da bi smo eliminisali očigledno nepovoljan efekat dva različita plazmida kada se oni nalaze istovremeno u istoj ćeliji-domaćinu, klonirali smo u postojeće ekspresione plazmide pDFTZ i pDFPZ fragment sa genom koji kodira za temperaturno senzitivni represor faga λ . Pod istim eksperimentalnim uslovima, pratili smo aktivnosti β -galaktozidaze dobijene pod kontrolom *lac* i *PLtl* promotora na dve temperature medijuma u kome su rasle ćelije domaćina: 30° C i 37° C (Slika 25). Slično, kao i u prethodnom sistemu sa dva plazmida, konstrukcija koja sadrži *PLtl* promotor je

pokazala na obe temperature izvesno povišenje aktivnosti β -galaktozidaze posle pojedinačne inaktivacije represora i vrlo jasan združeni efekat nakon pune indukcije (inaktivacije oba represora). Ovde je sasvim jasan efekat delimične inaktivacije λ represora nakon indukcije P_{Ltl} promotora sa IPTG-om na temperaturi od 37° C.

Ono što se najpre uočava kod ovih rezultata jeste nivo konstitutivne ekspresije P_{Ltl} promotora na obe temperature medijuma (Slika 25a i b). Za razliku od svih naših prethodnih konstrukcija sistema za ekspresiju (Slike 22 i 24), gde je konstitutivna ekspresija β -galaktozidaze pod kontrolom P_{Ltl} promotora znatno viša nego kod *tac* promotora, ovde je situacija obrnuta. Na nižoj temperaturi rasta ćelija domaćina, P_{Ltl} promotor pokazuje neznatnu konstitutivnu ekspresiju, pa bi moglo da se kaže da je aktivnost promotora pod potpunom kontrolom oba represora. U poređenju sa prethodnim dvostrukim plazmidnim sistemom, kod obe promotorske konstrukcije se pod punom indukcijom postiže znatno viši nivo ekspresije β -galaktozidaze.

Sada je jasno da je sistem koji sadrži samo jedan plazmid daleko superiorniji iz nekoliko razloga. Prvo, ukoliko se oba plazmida proizvode u više kopija po ćeliji, tada usled kompeticije može da dođe do smanjenja populacije ćelija koje sadrže oba plazmida. Drugo, antibiotski pritisak može da stvara negativnu selekciju favorizovanjem samo jednog tipa plazmida. Treće, moguće je nagomilavanje molekula u ćeliji koji ne predstavljaju proizvod željenog gena, već različite proizvode transkripcije i translacije poreklom sa oba plazmida.

Plazmidna konstrukcija koja sadrži *tac* promotor, posle pune indukcije pokazuje, kao i u prethodnim slučajevima, nižu aktivnost β -galaktozidaze u poređenju sa P_{Ltl} promotorom. Ukoliko se tokom indukcije *tac* promotora sa IPTG-om, temperatura medijuma povisi na 42° C, javlja se

inhibitorni efekat na ekspresiju. Ovaj efekat je naročito izražen nakon povećanja temperature medijuma u kome rastu ćelije sa 37°C na 42°C. Ovaj rezultat (Slika 25) je u potpunoj saglasnosti sa onim koji je dobijen kada se *tac* promotor nalazi u sistemu koji sadrži samo *lac* represor (Tabela II.). U slučaju sistema sa dva plazmida imamo obrnutu situaciju (Slika 24). Kada smo diskutovali rezultat dobijen indukcijom *tac* promotora uz dodatno povišenje temperature na 42° C, a u sistemu sa dva plazmida, pretpostavili smo da je povećana ekspresija manje verovatno rezultat funkcionalne korelacije temperaturno senzitivnog λ represora i *tac* promotora, već pre efekat koji je najpre izazvan postojanjem dva različita plazmida u jednoj ćeliji. Dva nezavisna eksperimenta svakako idu u prilog ovoj pretpostavci. Prvo, sa *tac* promotorom, u sistemu gde je prisutan samo *lac* represor, povišenjem temperature na 42° C, (sa ili bez indukcije IPTG-om), konstatuje se snižavanje nivoa ekspresije (Tabela II.). Drugo, isti efekat dobijamo i kod sistema kod koga se gen za represor faga λ nalazi na istom ekspresionom plazmidu sa *tac* promotorom (Slika 25B.). Iz ovoga može da se zaključi, da u slučaju kada bi postojala funkcionalna zavisnost λ represora i *tac* promotora, da bi tada povećanje ekspresije morali dobiti posle temperaturne indukcije i kod plazmidne konstrukcije sa *ci* genom (pDFTZcI).

Dakle, upoređivanjem aktivnosti ova dva promotora kod sva tri tipa ekspresionih konstrukcija (Slike 22, 24 i 25) zapažamo jasno izraženu veću aktivnost hibridnog *PLtl* promotora, očiglednu i vrlo efikasnu kontrolu ovog promotora sa dva nezavisna represora i fleksibilnost koja podrazumeva pojedinačno ili združeno korišćenje osobina promotora od kojih je nastao.

Iz prethodnih rezultata (Slike 22, 24 i 25) se vidi da ekspresioni sistem koji ne sadrži λ represor sintetishe najveću količinu β -galaktozidaze u odnosu na bilo koju drugu konstrukciju.

5.4. Uticaoj orijentacije kloniranog *cI857* gena na stepen aktivnosti β -galaktozidaze pod kontrolom *Pltl* promotora.

Sva merenja i poređenja aktivnosti β -galaktozidaze preko oba promotora kod konstrukcija koje sadže *cI857* gen su vršena sa klonovima gde je orijentacija ovog gena bila orijentisana obrnuto smeru transkripcije promotor-interferon-*lacZ* fuzije ("-" orijentacija). Osim toga izabrali smo jedan klon u konstrukciji sa *Pltl* promotorom koji je imao kloniran fragment sa *cI857* genom u istoj orijentaciji sa transkripcijom *Pltl*-interferon-*lacZ* fuzije ("+" orijentacija).

Na temperaturi od 30° C, osim konstitutivne ekspresije, koja je niža, kod pojedinačnih inaktivacija represora, kao i kod kompletne indukcije, dobili smo znatno viši nivo ekspresije sa konstrukcijom koja sadrži "-" orijentaciju. Na višoj temperaturi (37° C) dobili smo istu sliku, izuzev u slučaju indukcije sa IPTG-om gde "+" orijentacija pokazuje veću sintezu β -galaktozidaze.

Rezultati (Slika 26) pokazuju da i sama orijentacija represora ima značajan uticaoj na ishod ekspresije. Fragment faga λ od 2,4kb sadži *PR* promotor i prvih 60bp *cro* gena. Nasuprot tome, na komplementarnom lancu odmah pored *PR* promotora nalazi se *PRM* promotor i nizvodno sekvenca *cI857* gena, a u nastavku kompletan *rexA* i *rexB* gen (Slika 27).



Slika 27. Fragment od 2.4kb iz λ faga oivičen *BglII* restrikcionim mestima koji sadrži gen koji kodira za *cI* represor.

Znači da fragment koji smo koristili kao izvor represora sadrži i gene koji se eksprimiraju zajedno sa CI represorom, a nemaju funkcionalnu vezu sa našim hibridnim promotorom. Dakle, ovako kloniran fragment, hiperprodukujući proizvode *cI*, *rexA* i *rexB* gena, osim uloge kontrole našeg promotora, može da ima znatan nepovoljni uticaj na neke procese u ćeliji. Temperaturnom inaktivacijom CI represora, koji je aktivator inicijacije transkripcije preko *PRM* promotora, istovremeno se aktivira transkripcija preko *PR* promotora. Sve ove činjenice ne možemo zanemariti pri tumačenju rezultatata dobijenih sa konstrukcijama koje sadrže ovaj fragment. Zato razliku u stepenu ekspresije među klonovima koji sadrže *cI* gen u različitim orijentacijama možemo tumačiti dvojako. Moguće je da se kod "+" orijentacije, inaktivacijom CI represora i aktivacijom transkripcije preko jakog *PR* promotora koji je okrenut u smeru obrnutom od smera transkripcije sa *PLtl* promotora, remeti efikasna ekspresija *lacZ* gena, pa se dobija niža aktivnost β -galaktozidaze u odnosu na "-" orijentaciju. Ovakav efekat je najverovatnije posledica negativne superspiralizacije koja je izazvana aktivacijom dva jaka, obrnuto usmerena promotora (Wu *et al.* 1988). Drugo tumačenje bi moglo biti da kod "-" orijentacije imamo jak *PR* promotor usmeren ka hibridnom *PLtl* promotoru i da se njegovom aktivacijom tokom indukcije postiže aditivni efekat aktivnosti dva promotora, te se tako dobija povišen stepen ekspresije u odnosu na "+" orijentaciju. Rezultat koji se dobija na temperaturi od 37° C sa konstrukcijom koja ima "+" orijentaciju pre ide u prilog prvog tumačenja. Naime, posle indukcije samo sa IPTG-om, dobija se maksimalna aktivnost β -galaktozidaze, dok se inaktivacijom oba represora dobija smanjenje aktivnosti. Rezultat je prilično neočekivan u poređenju sa ostalim, izuzev ako se prihvati ideja da na 37° C imamo delimičnu inaktivaciju CI represora, a samim tim i delimičnu aktivaciju *PR* promotora. Ovakvom

delimičnom aktivacijom P_R promotora dobijamo i proporcionalno niži njegov inhibitorni efekat. Tek sa punom temperaturnom indukcijom potpuno aktiviramo P_R promotor pa dobijamo i sniženje aktivnosti β -galaktozidaze.

5.5. Efekat temperature na nivo ekspresije kloniranih gena.

Složenost tumačenja rezultata se još više povećava kada se u sve uvrsti još jedan faktor, koji svakako u našim rezultatima ne sme da se mimoide. To je efekat temperature na ishod ekspresije.

Rezultati koje smo dobili se odnose na dve temperature medijuma u kome su rasle ćelije domaćina, 30°C i 37°C . Videli smo iz tabele I. i Slike 22., 24. i 25. da je optimalna temperatura 37°C , bez obzira na promotor koji kontroliše ekspresiju i bez obzira da li je u pitanju ekspresija eukariotskog (interferona), ili gena prokariota (β -galaktozidaze).

Temperatura od 42°C je korišćena za inaktivaciju temperaturno senzitivnog represora koji se radi upoređivanja rezultata nalazio u konstrukcijama sa oba promotora. Aktivnost β -galaktozidaze testirana je kada su promotori bili pod kontrolom *lac* represora posle povišenja temperature na 42°C i u prisustvu i odsustvu IPTG-a (Tabela II.). Kod oba promotora jasno je uočljiv inhibitorni efekat povišene temperature na ekspresiju. Pošto se aktivnost $P_{L\lambda}$ promotora pored *lac* represora reguliše i inaktivacijom temperaturno senzitivnog represora faga λ , tada, povišenjem temperature na 42°C , sasvim normalno bi bilo da očekujemo i povećanje nivoa ekspresije. Ovakav efekat i dobijamo kod svih konstrukcija, izuzev one koja sadrži "+" orijentaciju CI represora (Slika 26B). Ovaj rezultat smo prethodno tumačili inhibitornim efektom posebno regulisanog P_R promotora, mada je moguće da kod ovakve konstrukcije imamo još i dodatni efekat temperaturne inhibicije. Upoređivanjem stepena

ekspresije *Pltl* promotora kod različitih konstrukcija možemo da konstatujemo da se najviši stepen ekspresije postiže kod ekspresionog sistema koji je kontrolisan samo *lac* represorom (Slika 22). Videli smo da podizanjem temperature medijuma na 42° C kod iste konstrukcije smanjujemo nivo ekspresije (Tabela II). Ako sada taj rezultat uporedimo sa stepenom ekspresije kod "najuspešnije" konstrukcije koja sadrži λ represor (pDFPZcI-), možemo zaključiti da su te vrednosti vrlo slične (Tabela II i Slika 25). Mogući mehanizam regulacije *Pltl* promotora bi onda mogao biti sledeći: Ukoliko su prisutna oba represora, bazna aktivnost je veoma niska. Onoga momenta kada se inaktivira jedan od represora dolazi do delimične aktivacije. Podizanjem temperature na 42° C, a u prisustvu IPTG-a, represore potpuno inaktiviramo i promotor se aktivira. Istovremeno povišena temperatura inhibira punu aktivnost promotora, što verovatno potiče od toga jer se smanjuje efikasnost vezivanja polimeraze RNK za odgovarajuću sekvencu na promotoru. Rezultat je, sa jedne strane, vrlo efikasna inaktivacija promotora represorom, ali je sa druge strane žrtvovana puna aktivnost promotora. Obrnuto, kod sistema kod koga samo *lac* represor kontroliše *Pltl* promotor, imamo slabiju inaktivaciju promotora represorom, ali zato daleko kompletniju aktivnost jer se potpuna indukcija odvija na povoljnijoj temperaturi, tj. na temperaturi od 37° C.

6. ZAKLJUČCI

1. Konstruisan je novi hibridni *PLtl* promotor koji je sastavljen od "-10" regiona *lacUV5* promotora, okoline "-35" regiona poreklom od *trp* promotora i uzvodnog regiona od "-35" sekvence *PL* promotora faga λ . Novi promotor sadrži dva operatorska regiona za koje se represor faga λ i *lac* represor vezuju nezavisno jedan od drugog.

2. Upoređivanjem jačine *tac* promotora sa našim *PLtl* promotorom u model sistemima u kojima su oni bili vezani sa genom za humani β -interferon ili sa β -interferon-*lacZ* genskom fuzijom, ovaj poslednji je znatno jači.

3. Pokazano je da se na temperaturi medijuma od 30° C tj. u slučaju, kada su oba represora aktivna, postiže veoma efikasna represija *PLtl* promotora. Za razliku od *tac* promotora, pod ovim uslovima konstitutivna ekspresija β -galaktozidaze je zanemarljiva. U slučajevima kada bi proizvod kloniranog gena mogao biti toksičan za ćeliju domaćina, ova osobina bi bila od značaja za odgovarajuću biotehnološku proizvodnju.

4. U slučaju kada bi se u ekspresionom sistemu umesto divljeg tipa nalazio temperaturno senzitivni mutant *lacI* gena (Bukrinsky *et al.* 1988) predviđamo, da bi tada bilo moguće da se *PLt1* promotor umesto sa pojedinačnom indukcijom IPTG-om i povišenjem temperature, aktivira istovremenom temperaturnom inaktivacijom oba represora.

5. Mogućnost da se za kontrolu promotora koriste oba ili da se odabere samo jedan željeni represor, pruža slobodniji izbor i načina indukcije *PLt1* promotora, i temperature na kojoj se kultivišu ćelije domaćina.

6. Na osnovu navedenih karakteristika, *PLt1* promotor sa svojom fleksibilnom kontrolom ekspresije gena moći će da se koristi za proizvodnju i onih proteina koji zbog svojih biohemijskih svojstava ne bi mogli da se sintetišu posredstvom nekog drugog promotora.

7. LITERATURA

- Amann, E., Brosius, J., and Ptashne, M., (1983), Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 25, 167-178.
- Amann, E. and Brosius, J., (1985), "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40, 183-190.
- Backman, K., Ptashne, M. and Gilbert, W. (1976), Construction of plasmids carrying the CI gene of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 4174-4178.
- Balbás, P., Soberon, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N. and Bolivar, F., (1986), Plasmid vector pBR 322 and its special-purpose derivatives -a review. *Gene*, 50, 3-40.
- Bauer, B. F., Kar, E. G., Elford, R. M. and Holmes, W. M. (1988), Sequence determinants for promoter strength in the *leuV* operon of *Escherichia coli*. *Gene*, 63, 123-134.
- Blumberg, B. M., Nakamoto, T. and Epstein, R. H. (1979), Kinetics of initiation of bacterial protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 251-255.
- Boros, I., Lukascovits, T., Baliko, G. and Venetianer, P. (1986), Expression vectors based on the *rac* fusion promoter. *Gene*, 42, 97-100.
- De Boer, H. A., Gilbert, S. F. and Nomura, M. (1979). DNA sequences of promoter regions of rRNA operons *rrnE* and *rrnA* in *E. coli*. *Cell*, 17, 201-209.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J., Yansura, D. G. and Heynecker, H. L. Construction of a tandem *trp-lac* promoter and a hybrid *trp-lac* promoter for efficient and controlled expression of the human growth hormone gene in *Escherichia coli*, in Rodriguez, R. L. and Chamberlin, M. J. (Eds.), *Promoters, Structure and Function*, Praeger, New York, 1982, pp 462-481.
- De Boer, H. A., Comstock, L. J. and Vasser, M. (1983), The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 21-25.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S. (1977), Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2, 95-113.

Bossi, L. and Smith, D.M. (1984), Conformation change in the DNA associated with unusual promoter mutation in a tRNA gene of *Salmonella*. *Cell* 39, 643-652.

Brandsma, J.A., Bosch, D., de Ruyter, M. and van de Putte, P. (1985), Analysis of the regulatory region of the *ssb* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 13, 5095-5109.

Braun, R. and Wright, A. (1986), DNA methylation differentially enhances the expression of one of the two *E. coli dnaA* promoters *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 246-250.

Breathnach, R. and Chambon, P. (1981), Organisation and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 349-383.

Brosius, J., (1984), Toxicity of an overproduced foreign gene product in *Escherichia coli* and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. *Gene*, 27, 161-172.

Buell, G. and Panayotatos, N. In "From Gene to Protein: Steps Dictating the Maximal Level of Gene Expression" Reznikoff, W.S. and Gold, L. (eds), 1985 Benjamin/Cummings, New York.

Buell, G., Schulz, M.-F., Selzer, G., Chollet, A., Movva, N.R., Semon, D., Escanez, S. and Kawashima, E. (1985), Optimizing the expression in *E. coli* of a synthetic gene encoding somatomedin-C (IGF-I). *Nucleic Acids Res.* 13, 1923-1938.

Buell, G. and Panayotatos, N. (1986), Mechanism and practise in Reznikoff, W., Gold, L. (Ed.), (1986), Maximizing gene expression, pp. 345-363., Butterworths Publishers.

Bukrinsky, M.I., Barsov, E.V. and Shilov, A.A. (1988), Multicopy expression vector based on temperature-regulated *lac* repressor: expression of human immunodeficiency virus *env* gene in *Escherichia coli*. *Gene*, 70, 415-417.

Bushman, F.D. and Ptashne, M. (1988), Turning λ Cro into transcriptional activator. *Cell*, 54, 191-197.

Carpousis, A.J., and Gralla, J.D. (1980), Cycling of ribonucleic polymerase to produce oligonucleotides during initiation *in vitro* at the *lac* UV5 promoter. *Biochemistry*, 19, 3245-3253.

- Chamberlin, M.J., (1974), The selectivity of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 43, 721-775.
- Childs, J., Villanueva, K., Barrick, D., Schneider, T.D., Stormo, G., Gold, L., Leitner, M. and Caruthers, M. (1985), Ribosome binding site sequences and function. pp. 341-350. In Calendar, R. and Gold, L. (ed.) *Sequence specificity in transcription and translation*. Alan R. Liss, New York.
- Christie, G.E., Farnham, P.J. Platt, T. (1981), Synthetic sites for transcription termination and functional comparison with tryptophan operon termination sites *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4180-4184.
- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C. and Chambon, P. (1980) Promoter sequences of eukaryotic protein coding genes. *Science* 209, 1406-1414.
- Crkvenjakov, R., Drmanac, R., Bucan, M., Konstantinovic, M., Fogel, M., Maksimovic, V., Petrovic, N., Savic, A., and Glisin, V., (1984), Cloning of eukaryotic gene sequences: studies on human fibroblast interferon and rat globin genes. *Periodicum Biologorum*, 86, 115-124.
- Degrave, W., Derynck, R., Tavernier, J., Haegeman, G., and Fiers, W. (1981), Nucleotide sequence of the chromosomal gene for human fibroblast (beta-1) interferon and of the flanking region. *Gene*, 14, 137-134.
- Edge, M. D., Greene, A.R., Heathcliffe, G.R., Meacock, P.A., Schuch, W., Scanlon, D.B., Atkinson, T.C., Newton, C.R. and Markham, A.F. (1981) Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature*, 292, 756-762.
- Gamper, H.B. and Hearst, J.E. (1982), A topological model for transcription based on unwinding angle analysis of *E. coli* RNA polymerase binary, initiation and ternary complexes. *Cell*, 29, 81-90.
- Gilbert, W. (1976), Starting and stoping sequences for the RNA polymerase, in Losick, R., and Chamberlin, M. (Eds.) *RNA Polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1976, pp. 193-205.
- Goeddel, D.V., Heynecker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R., and Seeburg, P.H. (1979) Direct expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, 281, 544-548.
- Goeddel, D.V., Shepard, H.M., Yelverton, E., Leung, D. and Crea, R. (1980), Synthesis of human fibroblast interferon by *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 8, 4057-4074.

Gold, L. and Stormo, L. (1987), Translational initiation. pp. 1303-1307. In Neidhart, F., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*-cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D. C.

Gourse, R. L., De Boer, H. A., and Nomura, M. (1986), DNA determinants of rRNA Synthesis in *E. coli*: Growth Rate Dependent Regulation, Feedback Inhibition, Upstream Activation, Antitermination. *Cell*, 44, 197-205.

Gouy, M. and Gautier, C. (1982), Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity, *Nucleic Acids Res.* 10, 7055-7074.

Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. and Mercier, R. (1981), Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* 9, 443-r75.

Gray, H. B., Ostrander, D. A., Hodnett, J. L., Legarski, R. J. and Robberson, D. L. (1975), Extracellular nuclease of *Pseudomonas* BAL 31. I. Characterization of single strand-specific deoxyriboendonuclease and double-strand deoxyriboexonuclease activities. *Nucleic Acids Res.*, 2 1459-1492.

Greenblatt, J. (1981). Regulation of transcription termination by the N gene protein of bacteriophage lambda. *Cell*, 24, 8-9.

Grosjean, H. and Fiers, W. (1982) Preferential codon usage in prokaryotic genes. The optimal codon- anticodon interaction energy and selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene*, 18, 199-209.

Gross, G., Mayr, U., Bruns, W., Grosveld, F., Dahl, H. -H. M. and Collins, J. (1981), The structure of a thirty-six kilobase region of the human chromosome including the fibroblast interferon-IFN-beta. *Nucleic Acids Res.*, 9, 2495-2507.

Grossman, A. D., Erickson, J. W. and Gross, C. A. (1984), The *htrP* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat shock promoters. *Cell*, 38, 383-390.

Guo, L. -H. and Wu, R. (1983), Exonuclease III: Use for DNA sequence analysis and in specific deletions of nucleotides. *Methods in Enzymology*, 100, 60-96.

Hallewell, R. A. and Emtage, S. (1980), Plasmid Vectors containing the tryptophan operon promoter suitable for efficient regulated expression of foreign genes. *Gene*, 9, 24-47.

Hanna, M. M. and Meares, C. F. (1983), Topography of transcription: path of the leading end of nascent RNA through the *Escherichia coli* transcription complex. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4238-4242.

Hanahan, D., (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hawley, D. K. and McClure, W. R. (1983), Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acids Res., 11, 2237-2250.

Hawley, D. K., Johnson, A. D. and McClure, W. R. (1985), Functional and physical characterization of transcription initiation complexes in the bacteriophage λ OR region. J. Biol. Chem., 260, 8618-8626.

Hershfield, M. V., Boyer, H. W., Yanofsky, C., Lovett, M. and Helinski, D. R., (1974), Plasmid Col E1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3455-3459.

Hopkins, A. S., Murray, E. and Brammar, W. J. (1976). Characterisation of lambda trp-transducing bacteriophage made *in vitro*. J. Mol. Biol. 107, 549- 569.

Hoopes, B. C. and McClure, W. R. (1987), Strategies in regulation of transcription initiation. 1231-1240. In Neidhart, F., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaecheter, M. and Umberger, H. E. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*-cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Horn, G. T. and Wells, R. D., (1981a), The leftward promoter of bacteriophage λ . Structure, Biological activity, and influence by adjacent regions. J. Biol. Chem. 256, 2003-2009.

Horn, G. T. and Wells, R. D., (1981b), The leftward promoter of bacteriophage λ . Isolation of a small restriction fragment and deletion of adjacent regions. J. Biol. Chem. 256, 1998-2002.

Ikemura, T. (1981), Correlation between the abundance of *E. coli* transfer RNAs and the occurrence of respective codons in its protein genes. J. Mol Biol. 146, 1-21.

Iserentant, D. and Fiers, W. (1980), Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. Gene, 9, 1-12.

Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. and Boyer, H. W. (1977), Expression in *E. coli* of a chemically synthesised gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198, 1056-1063.

Jay, G. and Kaempfer, R. (1975), Initiation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 250, 5742-5748.

Jay, G., Khoury, G., Seth, A. K. and Jay, E. (1981). Construction of a general vector for efficient expression of mammalian proteins in bacteria: Uses of a synthetic ribosome binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 5543-5548.

Jehle, H. (1965), Replication of double-strand nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 53, 1451-1455.

Kirkegaard, K., Buc, H., Spassky, A. and Wang, J. C. (1983), Mapping of single-stranded regions in duplex DNA at the sequence level: Single-strand-specific cytosine methylation in RNA polymerase-promoter complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 2544-2548.

Kozak, M. (1981), Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9, 5233- 5252.

Lamond, A. I. and Travers, A. A., (1983), Requirement for an upstream element for optimal transcription of a bacterial tRNA gene. *Nature*, 305, 248-250.

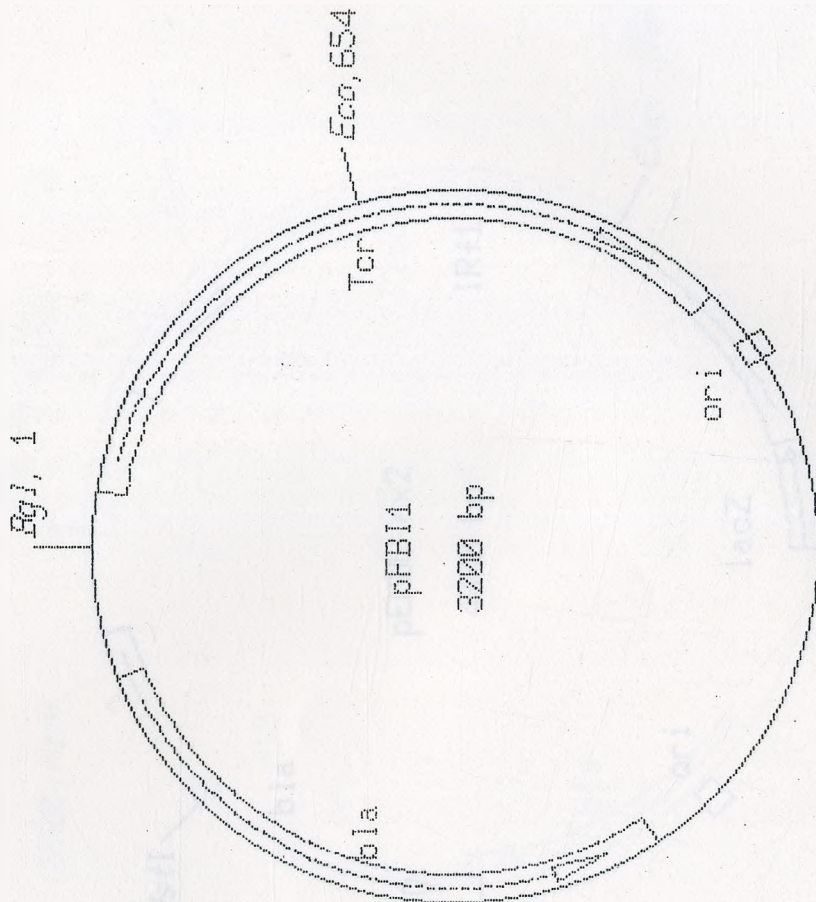
Landick, R. and Yanofsky, C. (1987), Transcription attenuation. 1276-1302. In Neidhart, F., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*-cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D. C.

Lawn, R. M., Adelman, J., Franke, A. E., Houck, C. M., Gross, M., Najarian, R. and Goeddel, D. V. (1981), Human fibroblast interferon gene lacks introns. *Nucleic Acids Res.* 9, 1045-1052.

de Lorenzo, V., Herrero, M., and Neilands, J. B., (1988), pCON4 and pCONS: improved plasmid vectors to study bacterial promoters. *FEMS Microbiology Letters*, 50, 17-23.

Mandecki, W. and Reznikoff, W. S., (1982) A *lac* promoter with a changed distance between -10 and -35 regions. *Nucl. Acids Res.*, 10, 903-912.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.



2423, Pst
 Size is 3200 bps.

Restriction Enzyme Table:

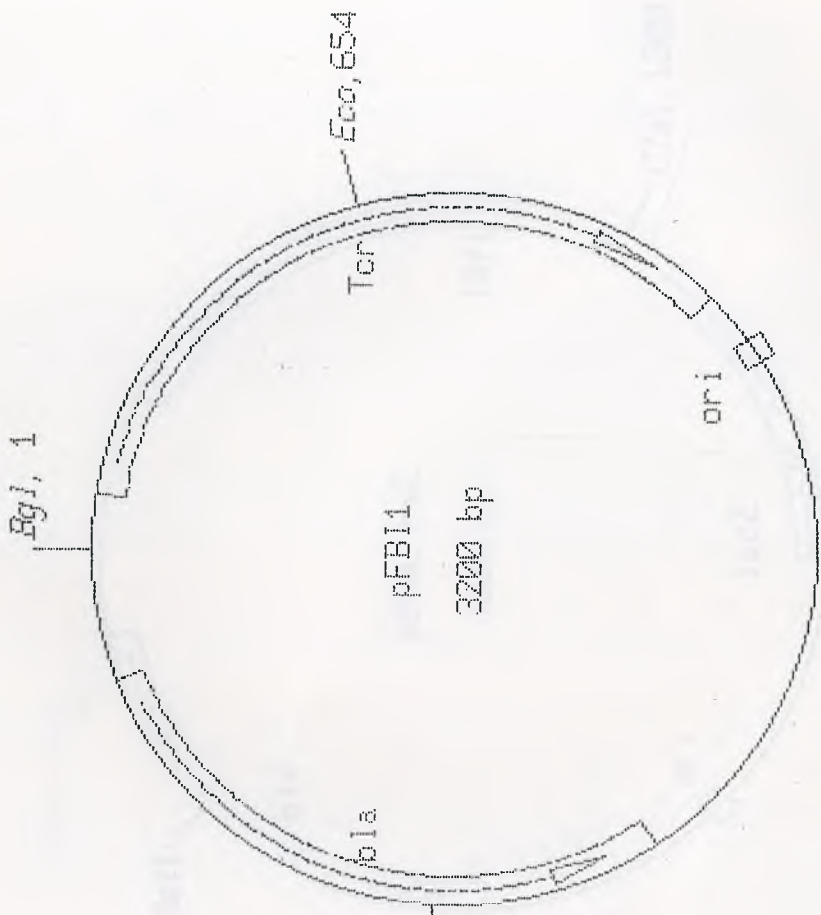
No.	Name	Location	Displayed
1	Bgl	1	YES
2	Eco	654	YES
3	Pst	2423	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	Tcr	80 to 1200
2	bla	3000 to 2100

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	1300	



Plasmid: pFB11
 Size is 3200 bps.

Restriction Enzyme Table:

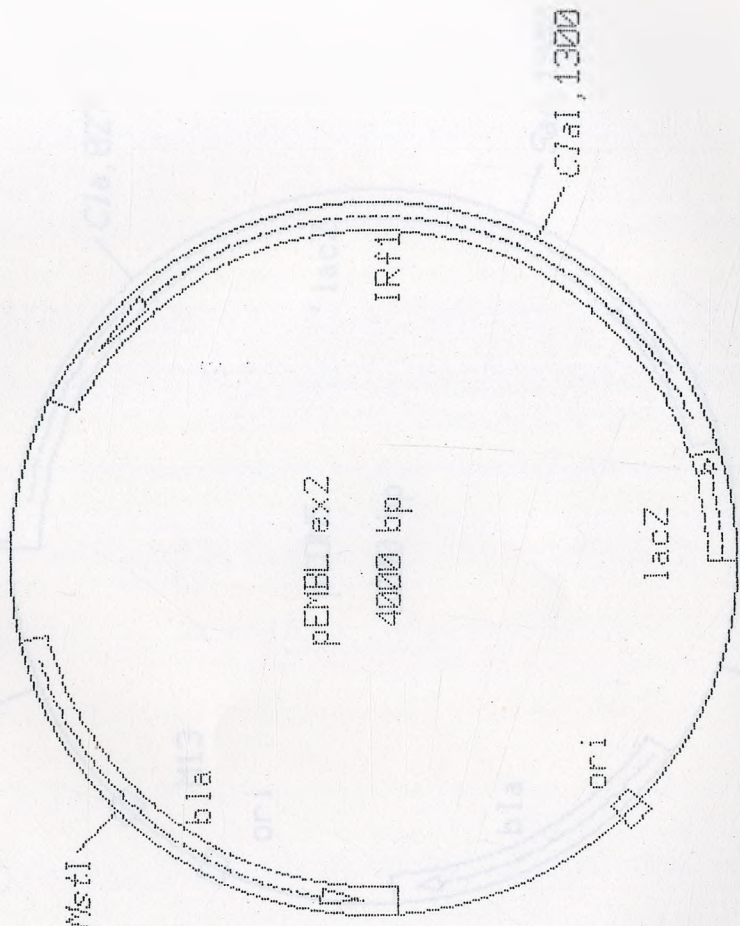
No.	Name	Location	Displayed
1	Bgl	1	YES
2	Eco	654	YES
3	Pst	2423	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	Ter	80 to 1200
2	bla	3000 to 2100

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	1300	



Plasmid: pEMBL ex2
 Size is 4000 bps.

Restriction Enzyme Table:

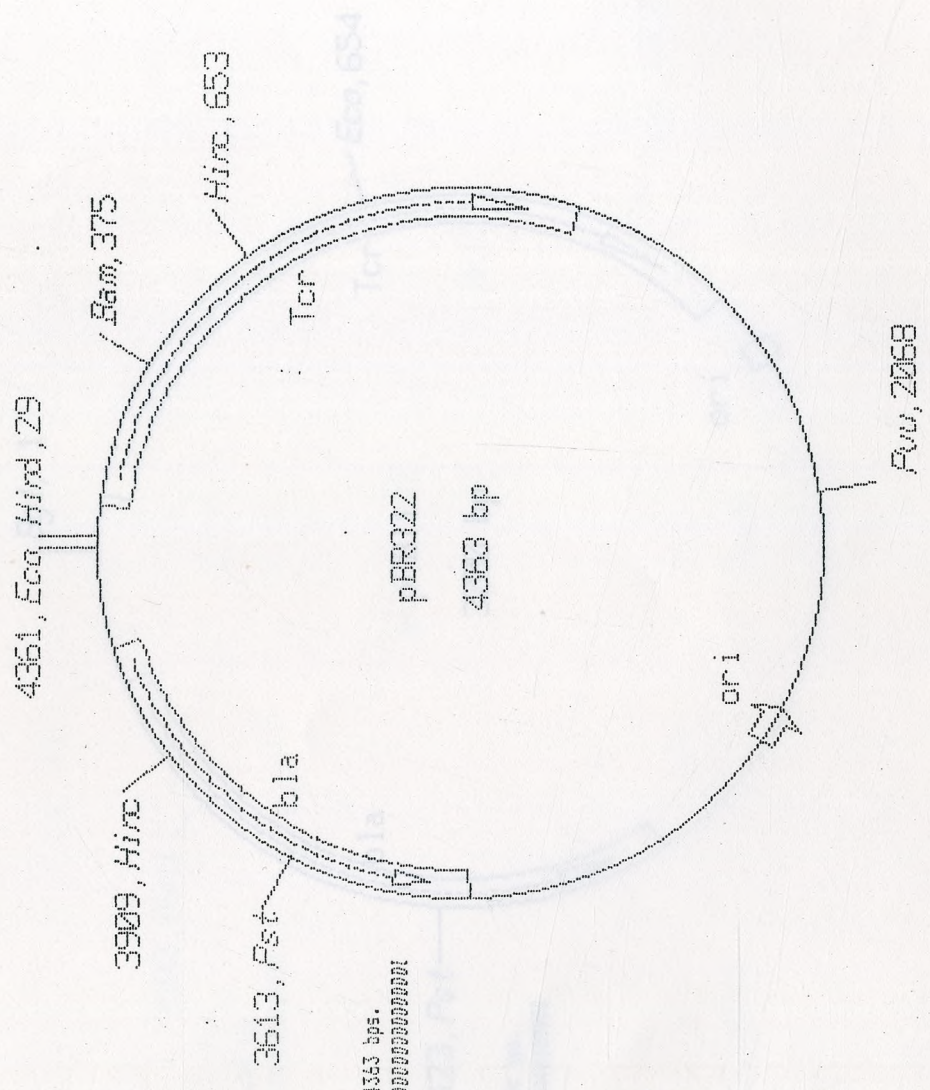
No.	Name	Location	Displayed
1	Clal	1300	YES
2	MstI	3500	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	IRf1	1800 to 300
2	lacZ	2000 to 1800
3	bla	3850 to 2950

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	2500	"



Plasmid: pBR322
 Size is 4363 bps.

Restriction Enzyme Table:

No.	Enzyme Name	Location	Displayed
1	Hind	29	YES
2	Bam	375	YES
3	Hinc	653	YES
4	Pvu	2068	YES
5	Pst	3613	YES
6	Hinc	3909	YES
7	Eco	4361	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Gene Name	Location
1	Tcr	80 to 1320
2	bla	4160 to 3260

Plasmid Markers Table:

No.	Marker Name	Location	Direction
1	ori	2540	(=

Maxam, A.M. and Gilbert, W., (1980), Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499-560.

McClure, W.R., (1980), Rate-limiting steps in RNA chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5634-5638.

McClure, W.R., Hawley, D.K., Youderian, P. and Susskind, M.M. (1983), DNA determinants of promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 477-481.

McClure, W.R. (1985), Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 171-204.

Miller, J.H. *Experiments in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

Miller, J.H. and Reznikoff, W.S. (1978). *The Operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Mizushima-Sugano, J. and Kaziro, Y., (1985), Regulation of the expression of the *tufB* operon: DNA sequences directly involved in the stringent control., *The EMBO Journal*, 4, 1053-1058.

Moir, A. and Brammar, W.J., (1976), The use of specialized transducing phage in the amplification of enzyme production. *Molec. Gen. Genet.* 149, 87-99.

Mulligan, M.E., Hawley, D.K., Entriken, R. and McClure, W.R. (1984), *Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res.* 12, 789-800.

Munson, L.M., Stormo, G.D., Niece, R.L. and Reznikoff, W.S. (1984), *lacZ* translational initiation mutation. *J. Mol. Biol.* 177, 663-683.

Nakamura, K and Inouye, M., (1979), DNA sequence of the gene for the outer membrane lipoprotein of *E. coli*: an extremely AT-rich promoter. *Cell*, 18, 1109-1117.

Nakamura, K. and Inouye, M. (1982) Construction of versatile expression cloning vehicles using lipoprotein gene of *E. coli*. *EMBO Journal* 1, 771-775.

Nakamura, K., Masui, Y. and Inouye, M. (1982), Use of a *lac* promoter-operator fragment as a transcriptional control switch for expression of the constitutive *lpp* gene in *E. coli*. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 289-299.

Nishi, T. and Itoh, S. (1986), Enhancement of transcriptional activity of the *Escherichia coli* *trp* promoter by upstream A+T-rich regions. *Gene*, 44, 29-36.

Ohno, S. and Taniguchi, T. (1981), Structure of chromosomal gene for human interferon beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5305-5309.

Olins, P. O., Devine, C. S., Rangwala, S. H. and Kavka, K. S. (1988), The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 73, 227-235.

Panayotatos, N. and Truong, K. (1981) Specific deletion of DNA sequences between preselected basis. *Nucleic Acids Res.*, 9, 5679-5688

Phillips, T. A., van Bogelen, R. A. and Neidhardt, F. C. (1984), *lon* gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J. Bacteriology*, 159, 283-287.

Plaskon, R. R. and Wartell, R. M., (1987), Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters. *Nucl. Acids Res.*, 15, 785-796.

Pribnow, D., (1975), Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *J. Mol. Biol.*, 99, 419-443.

Ptashne, M. (1986), A Genetic Switch - Gene Control and Phage λ , Harvard University, Protein-DNA interactions and gene control pp. 33-47., Blackwell Scientific Publications & Cell Press.

Raibaud, O. and Schwartz, M. (1984) Positive control in transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 18, 173-206.

Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1981), Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the *PL* promoter of coliphage lambda. *Gene*, 15, 81-93.

Remaut, E., Stanssens, P. and Fiers, W. (1983), Inducible High level synthesis of mature human fibroblast interferon in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 11, 4677-4687.

Reznikoff, W. S., Maquat, L. E., Munson, L. M., Johnson, R. C. and Mandecki, W. (1982), The *lac* promoter: analysis of structural signals for transcription, initiation, and identification of a new sequence-specific event, pp.80-95. In Rodriguez, R. L. and Chamberlin, M. J. (ed), *Promoters: structure and function*. Praeger, New York.

Roberts, D., Hoopes, B. C., McClure, W. R. and N. Kleckaer (1985), IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell*, 43, 117-130.

Rosenberg, M. and Court, D. (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genetics* 13, 319-353.

Rubinstein, S., Familletti, P. C. and Pestka, S., (1981), Convenient assay for interferons. *Journal of Virology* 37, 755-758.

Russell, D. R. and Bennett, G. N., (1982), Construction and analysis of *in vitro* activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 and -10 spacing. *Gene* 20, 231-234.

Sanzey, B. (1979), Modulation of gene expression by drugs affecting deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriology*, 138, 40-47.

Sauer, R. T., Krovatin, W., DeAnda, J., Youderian, P. and Susskind, M. M. (1983), Primary structure of the *immI* immunity region of bacteriophage P22. *J. Mol. Biol.* 168, 699-713.

Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1342-1346.

Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, 254, 34-38.

Shortle, D., Dimairo, D. and Nathans, D. (1981) Directed mutagenesis. *Ann. Rev. Genetics*, 15, 265-294

Siebenlist, U., Simpson, R. B. and Gilbert, W. (1980). *E. coli* polymerase interacts homologously with two different promoters. *Cell*, 20, 269-281.

Silverstone, A. E., Arditti, R. R., and Magasnik, B. (1970), Catabolite insensitive revertants of *lac* promoter mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 773-778.

Shinsky, J. J., Uhlin, B. E., Gustafsson, P. and Cohen, S. N. (1981), Construction and characterization of a novel two-plasmid system for accomplishing temperature-regulated amplified expression of cloned adventitious genes in *E. coli*. *Gene*, 16, 275-286.

Soberón, X., Covarrubias, L. and Bolívar, L. (1980), Construction and characterization of new cloning vehicles, IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene*, 9, 287-350.

Sollazzo, M., Frank, R. and Cesareni, G., (1985), High level expression of RNAs and proteins: the use of oligonucleotides for the precise fusion of coding-to-regulatory sequences. *Gene*, 37, 199-206.

Steege, D. A. (1977), The 5' terminal sequence of the *E. coli* lactose repressor messenger RNA: features of translational initiation and reinitiation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4163-4167.

Stefano, J. E. and Gralla, J. D., (1982), Spacer mutations in the *lac p*^s promoter. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1069-1082.

Steitz, J. A. (1979). Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In "Biological Regulation and development 1. Gene Expression" (Goldberger, R. F., ed) pp. 349-399. Plenum Press, New York.

Stephens, J. C., Artz, S. W. and Ames, B. N. (1975), Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4389-4393.

Sternberg, N., (1985), Evidence that adenine methylation influences DNA-protein interactions in *Escherichia coli*., *J. Bacteriology*, 164, 490-493.

Stormo, G. D., Schneider, T. D. and Gold, L. (1982), Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, 10, 2971-2996.

Stüber, D. and Bujard, H. (1981), Organization of transcriptional signals in plasmid pBR322 and pACYC184. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 167-171.

Sutcliffe, J. G., (1978), pBR322 restriction map marked from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acids Res.* 5, 2721-

Sutcliffe, J. G., (1979), Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 77-

Takagi, H., Morinaga, Y., Tsuchiya, M., Ikemura, H. and Inouye, M. (1988), Control of folding of proteins secreted by a high expression secretion vector, pIN-III-ompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*, *Bio/technology*, 6, 948-950.

Talmadge, K., Kaufman, J. and Gilbert, W. (1980a) Bacteria mature preproinsulin to proinsulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3988-3992.

Talmadge, K., Stahl, S. and Gilbert, W. (1980b) Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3369-3373

Tavernier, J., Gheysen, D., Duerinck, F., van der Heyden, J. and Fiers, W. Deletion mapping of the inducible promoter of human IFN-beta gene. (1983) *Nature*, 301, 634-636.

Travers, A.A., (1980), A tRNA^{tyr} promoter with an altered *in vitro* response to ppGpp., *J. Mol. Biol.* 141, 91-97.

Twigg, A.J. and Sherratt, D. (1980), Trans-complementable copy number mutants of plasmid ColE1. *Nature*, 283, 216-218.

Vollenweider, H.J., Fianndt, M. and Szybalski, W., (1979), A relationship between DNA helix stability and recognition sites for RNA polymerase. *Science*, 205, 508-511.

Wu, H.M. and Crothers, D.M. (1984), The locus of sequence directed and protein induced DNA bending. *Nature (London)*, 308, 509-513.

Wu, H.-Y., Shyy, S., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988), Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, 53, 433-440.

Yager, T.D. and von Hippel, P.H. (1987), Transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. 1241-1275. In Neidhart, F., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaecheter, M. and Umberger, H.E. (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*-cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Yamamori, T. and Yura, T. (1982), Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 860-864.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J., (1985), Improved M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yanofsky, C., Kelley, R.L. and Horn, V. (1984). Repression is relieved before attenuation in the *trp* operon of *Escherichia coli* as tryptophan starvation becomes increasingly severe. *J. Bacteriology*, 158, 1018-1024.



8.1. WZIKI WOP PLANNIA

8. DODATAK

8.1. FIZIČKE MAPE PLAZMIDA



Pod 11. 190 mm

Pod 11. 190 mm	Pod 11. 190 mm	Pod 11. 190 mm	Pod 11. 190 mm
120° 520	120° 600	120° 650	120° 700
120° 750	120° 800	120° 850	120° 900
120° 950	120° 1000	120° 1050	120° 1100
120° 1150	120° 1200	120° 1250	120° 1300

Plasmid: pIF4
 Size is 4907 bps.

Restriction Enzyme Table:

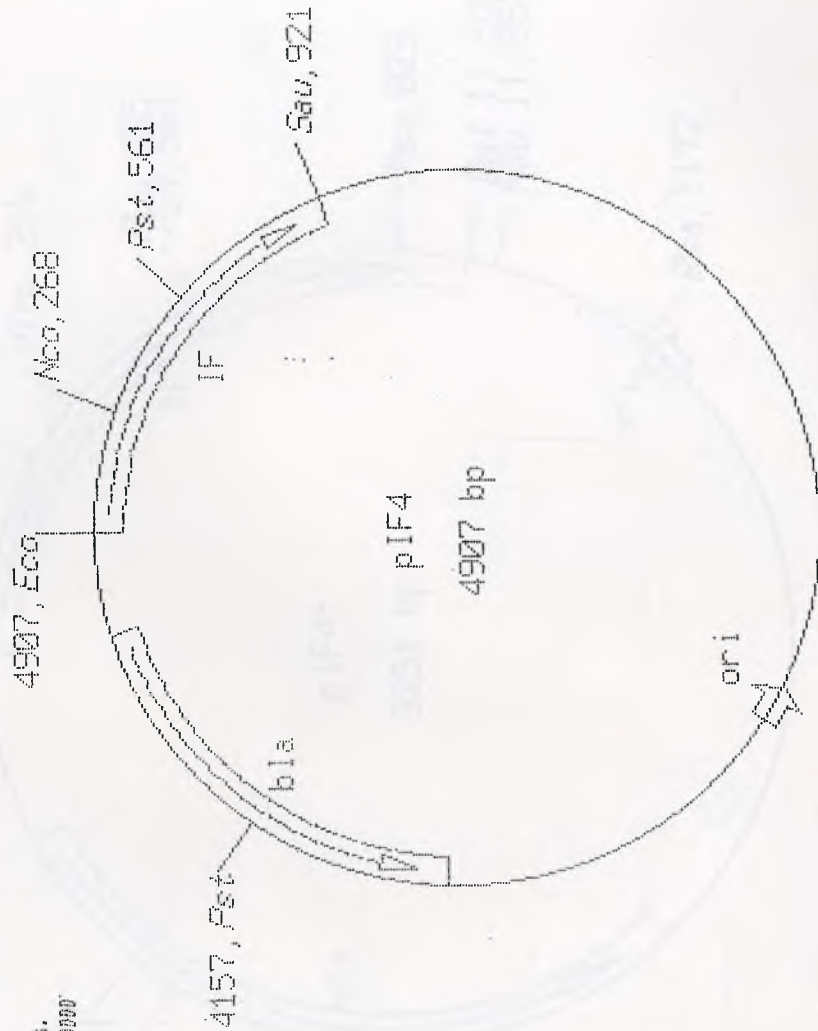
No.	Name	Location	Displayed
1	Nco	268	YES
2	Hinc	351	NO
3	Pvu	555	NO
4	Pst	561	YES
5	Sau	921	YES
6	Hinc	1197	NO
7	Pvu	2613	NO
8	Pst	4157	YES
9	Hinc	4453	NO
10	Eco	4907	YES

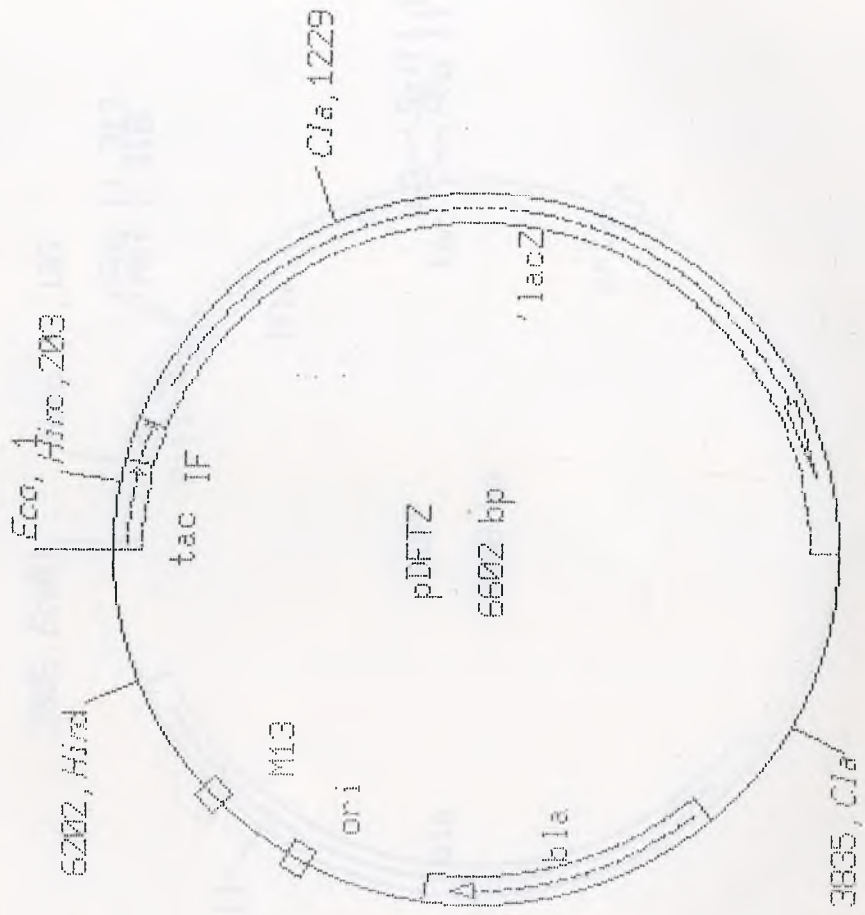
Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	IF	1 to 921
2	bla	4675 to 3707

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	2854	<=





Plasmid: pDFTZ
 Size is 6602 bps.

Restriction Enzyme Table:

No.	Name	Location	Displayed
1	Eco	1	YES
2	Hinc	203	YES
3	Cla	1229	YES
4	Cla	3835	YES
5	Hind	6202	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	tac	1 to 271
2	IF	272 to 409
3	'lacZ	410 to 3301
4	bla	4205 to 5105

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	5490	~
2	M13	5790	~

Plasmid: pDFF

Size is 3008 bps.

Restriction Enzyme Table:

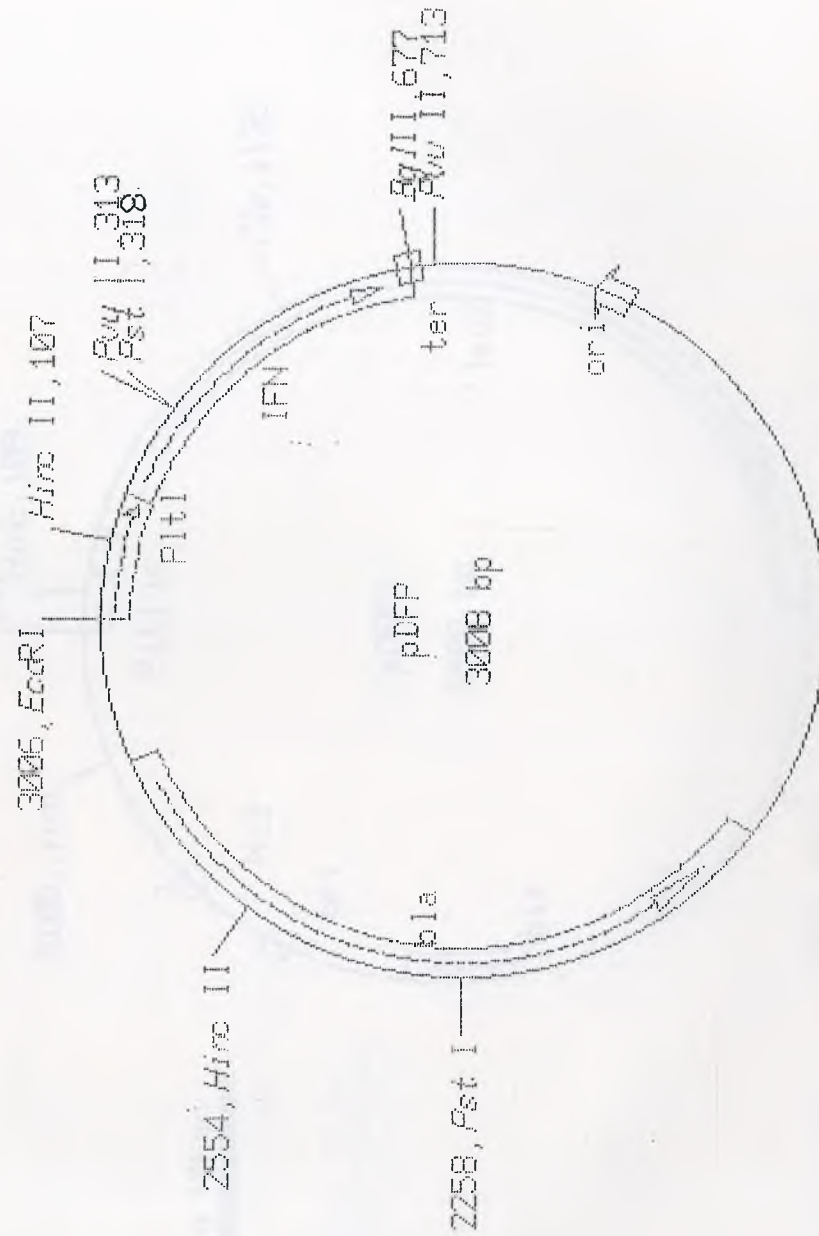
No.	Name	Location	Displayed
1	Hinc II	107	YES
2	Pvu II	313	YES
3	Pst I	318	YES
4	BglII	677	YES
5	Pvu II	713	YES
6	Pst I	2558	YES
7	Hinc II	2554	YES
8	EcoRI	3006	YES

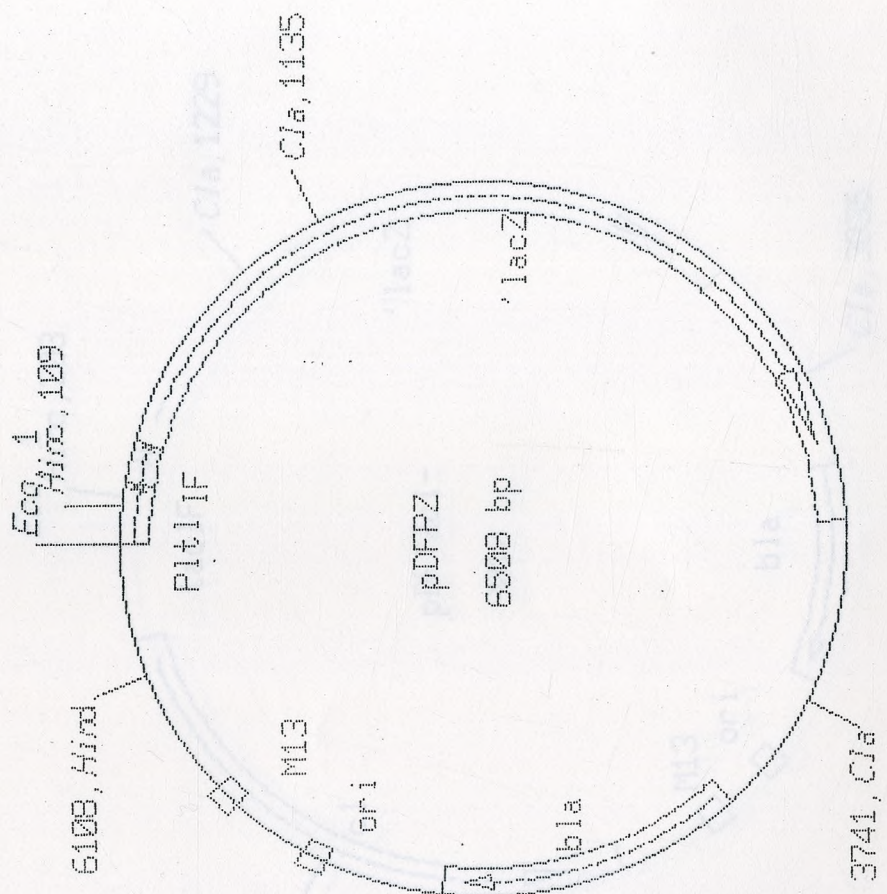
Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	IFN	176 to 677
2	bla	2804 to 1809
3	P1t1	3006 to 175

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ter	680	↙
2	ori	946	↻





Plasmid: pDFPZ Size is 6508 bps.

Restriction Enzyme Table:

No.	Name	Location	Displayed
1	EcoI	1	YES
2	Hinc	109	YES
3	Cla	1135	YES
4	Cla	3741	YES
5	Hind	6108	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	PstI	1 to 177
2	IF	178 to 315
3	'lacZ	316 to 3207
4	bla	4111 to 5011

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	5396	~
2	ML3	5696	~

Plasmid: pDFPZcI+ Size is 8916 bps.

Restriction Enzyme Table:

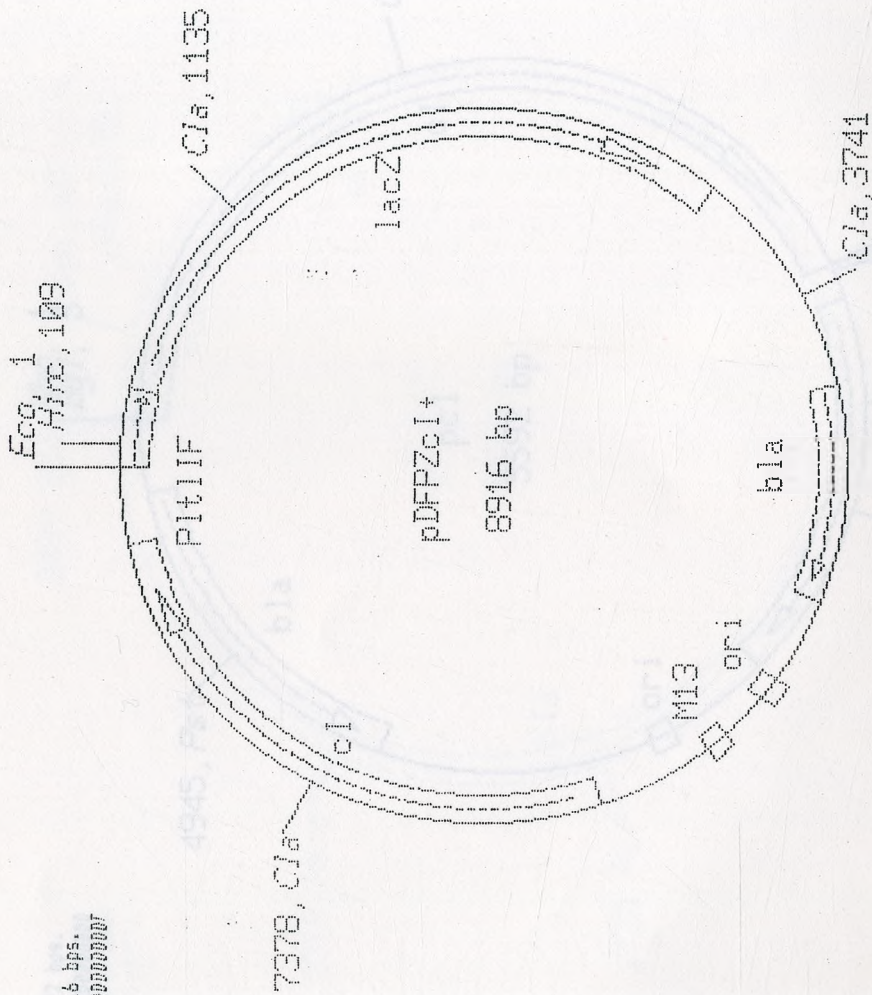
No.	Name	Location	Displayed
1	Eco	1	YES
2	Hinc	109	YES
3	Cla	1135	YES
4	Cla	3741	YES
5	Cla	7378	YES

Plasmid Genes Table:

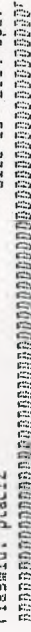
No.	Name	Location
1	PtIIF	1 to 315
2	lacZ	316 to 3207
3	bla	4111 to 5011
4	ci	6216 to 8602

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	5396	*
2	M13	5696	*



Plasmid: ptac12 Size is 2564 bps.



Restriction Enzyme Table:

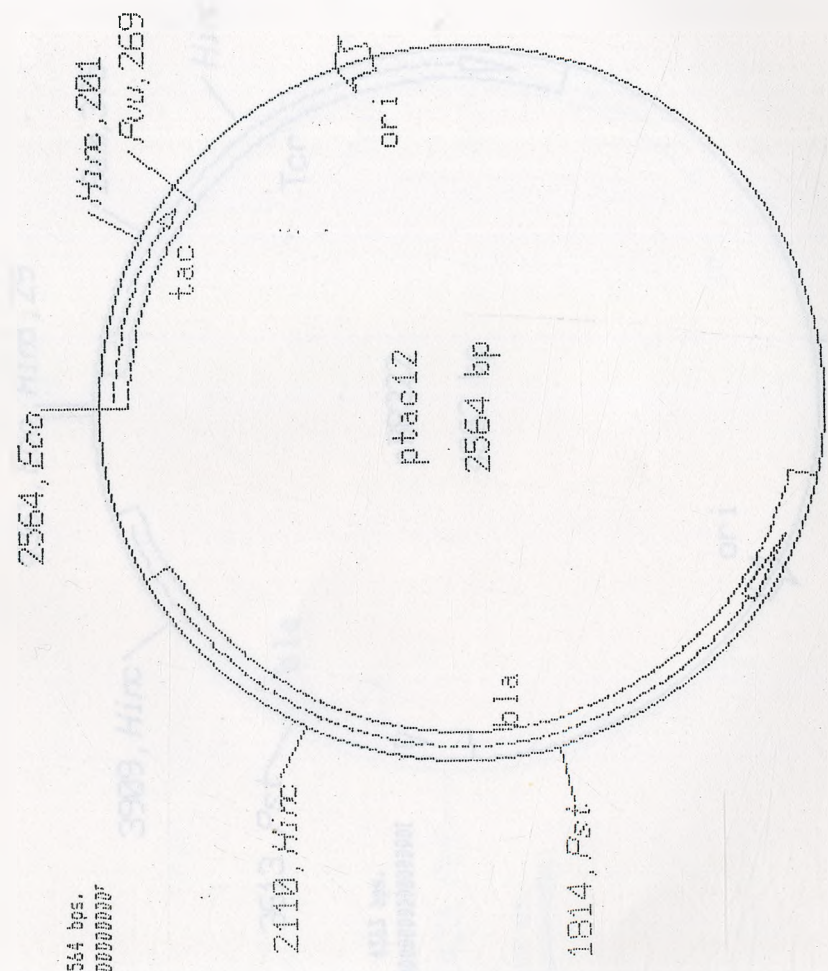
No.	Name	Location	Displayed
1	Hinc	201	YES
2	Pvu	269	YES
3	Pst	1814	YES
4	Hinc	2110	YES
5	Eco	2564	YES

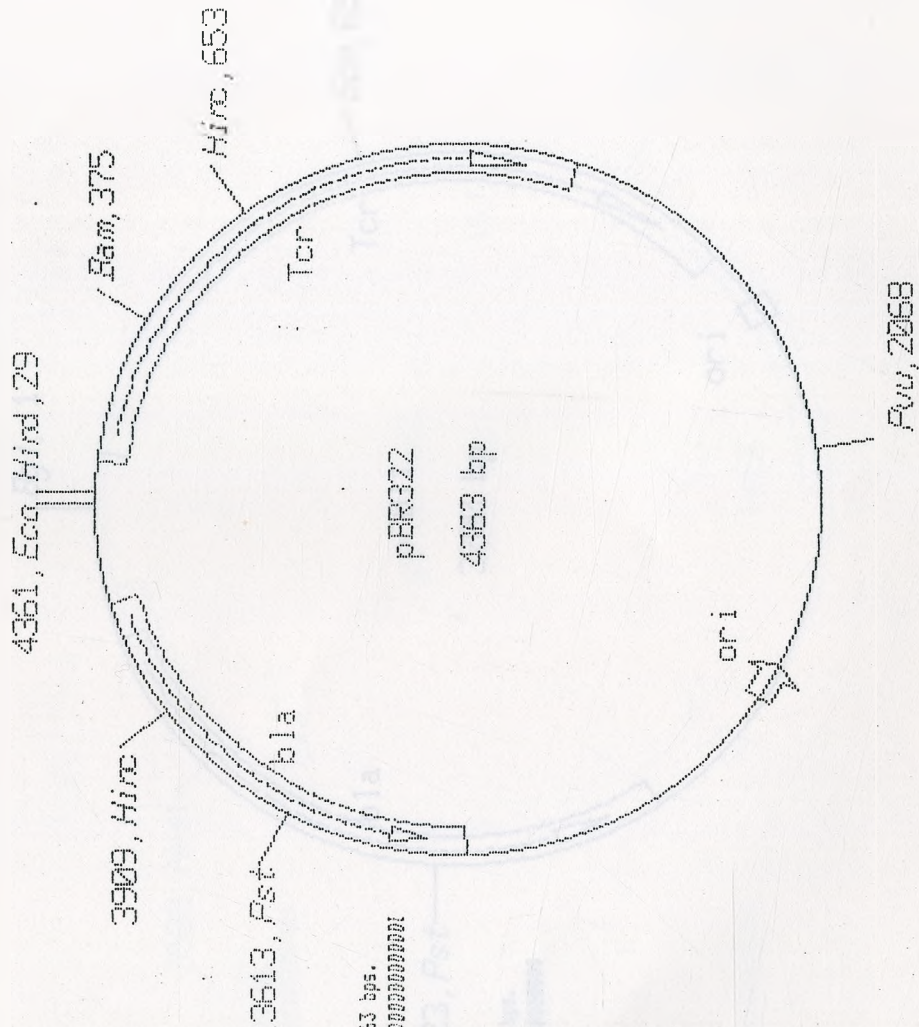
Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	bla	2359 to 1304
2	tac	2564 to 269

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	511	(=





Plasmid: pBR322 Size is 4363 bps.

Restriction Enzyme Table:

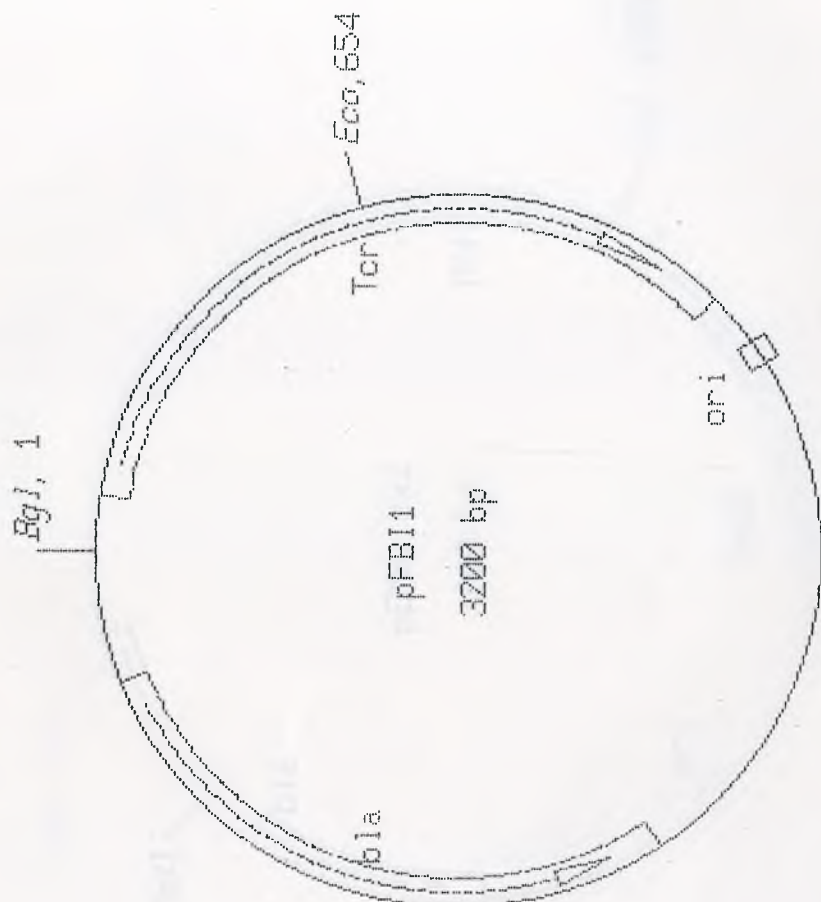
No.	Name	Location	Displayed
1	Hind	29	YES
2	Bam	375	YES
3	Hinc	653	YES
4	Pvu	2068	YES
5	Pst	3613	YES
6	Hinc	3909	YES
7	Eco	4361	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	Tcr	80 to 1320
2	bla	4160 to 3260

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	2540	(=



Plasmid: pFBI1
 Size is 3200 bps.

Restriction Enzyme Table:

No.	Name	Location	Displayed
1	Bgl	1	YES
2	Eco	654	YES
3	Pst	2423	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	Tcr	80 to 1200
2	bla	3000 to 2100

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	1300	

Plasmid: pEMBL ex2

Size is 4000 bps.

Restriction Enzymes Table:

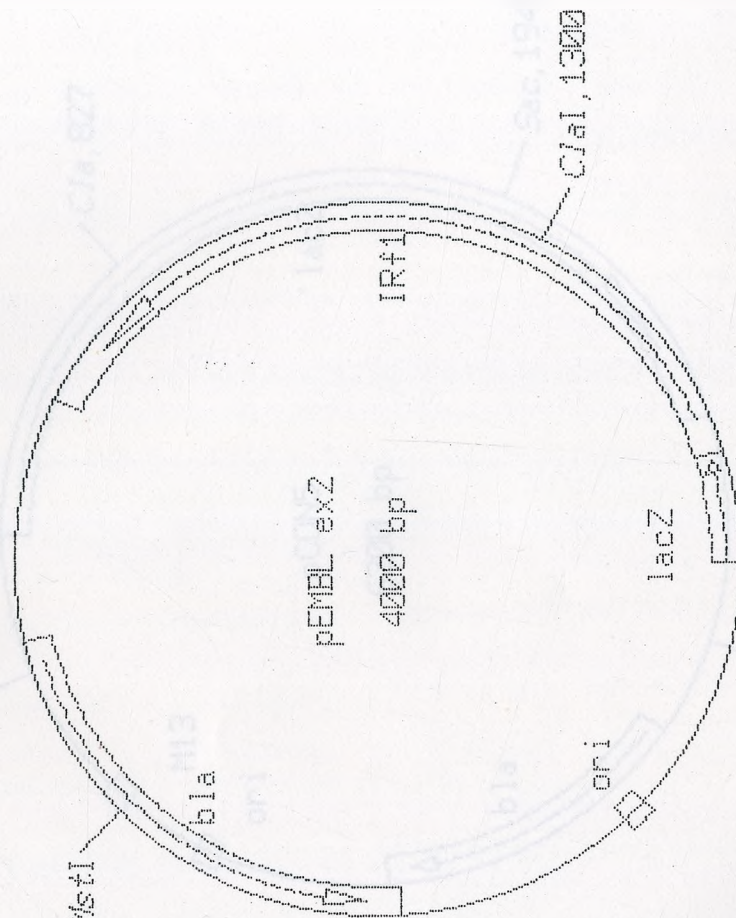
No.	Name	Location	Displayed
1	ClaI	1300	YES
2	MstI	3500	YES

Plasmid Genes Table:

No.	Name	Location
1	IRf1	1800 to 300
2	lacZ	2000 to 1800
3	bla	3850 to 2950

Plasmid Markers Table:

No.	Name	Location	Direction
1	ori	2500	



HUMAN β -INTERFERON:

LOCUS IF 921 BP UPDATED 5/17/89
LIT. Lawn et al.(1981), Gross et al.(1981), Degraeve et al.
(1981), Tavernier et al. (1983).

1 AATTCTCAGG TCGTTTGCTT TCCTTTGCTT TCTCCCAAGT CTTGTTTTAC
51 AATTTGCTTT AGTCATTAC TGAAACTTTA AAAAACATTA GAAAACCTCA
101 CAGTTTGTA AATCTTTTCC CTATTATATA TATCATAAGA TAGGAGCTTA
151 AATAAAGAGT TTTAGAAACT ACTAAAATGT AAATGACATA GGAAAACCTGA
201 AAGGGAGAAG TGAAAGTGGG AAATTCCTCT GAATAGAGAG AGGACCATCT
251 CATATAAATA GCCATACC ATGGAGAAAG GACATTCTAA CTGCAACCTT
HaeIII NcoI
301 TCGAAGCCTT TGCTCTGGCA CAACAGGTAG TAGGGGACAC TGTTCTGTGT
TaqI
351 GTC AACATGA CCAACAAGTG TCTCCTCCAA ATTGCTCTCC TGTTGTGCTT
HincII
401 CTCCACTACA GCTCTTTCCA TGAGCTACAA CTTGCTTGG TTCTACAAA
HinfI
451 GAAGCAGCAA TTTTCAGTGT CAGAAGCTCC TGTGGCAATT GAATGGGAGG
501 CTTGAATACT GCCTCAAGGA CAGGATGAAC TTTGACATCC CTGAGGAGAT
551 TAAGCAGCTG CAGCAGTTCC AGAAGGAGGA CGCCGCATTG ACCATCTATG
PvuII PstI
601 AGATGCTCCA GAACATCTTT GCTATTTTCA GACAAGATTC ATCTAGCACT
HinfI
651 GGCTGGAATG AGACTATTGT TGAGAACCTC CTGGCTAATG TCTATCATCA
701 GATAAACCAT CTGAAGACAG TCCTGGAAGA AAAACTGGAG AAAGAAGATT
751 TCACCAGGGG AAAACTCATG AGCAGTCTGC ACCTGAAAAG ATATTATGGG
801 AGGATTCTGC ATTACCTGAA GGCCAAGGAG TACAGTCACT GTGCCTGGAC
HinfI HaeIII
851 CATAGTCAGA GTGGAAATCC TAAGGAACTT TTA CTTCATT AACAGACTTA
901 CAGGTTACCT CCGAAACTGA A

pDFT

LOCUS DF81t 809 BP UPDATED 5/17/89
ORIGIN EcoRI

```
1 AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAC TGCACGGTGC ACCAATGCTT
      Taa I
51 CTGGCGTCAG GCAGCCATCG GAAGCTGTGG TATGGCTGTG CAGGTCGTAA
101 ATCACTGCAT AATTCGTGTC GCTCAAGGCG CACTCCCSTT CTGGATAATG
151 TTTTTTGGCG CGACATCATA ACGGTTCTGG CAAATATTCT GAAATGAGCT
      -35 -10 >>>> mRNK
201 GTTGACAATT AATCATCGGC TCGTATAATG TGTGGAATTG TGAGCGGATA
      Hinc II lac operator
      RBS
251 ACAATTTTAC ACAGGAAACA GATGAGCTAC AACTTGCTTG GATTCCTACA
      MetSerTyr. . .
301 AAGAAGCAGC AATTTTCAGT GTCAGAAGCT CCTGTGGCAA TTGAATGGGA
351 GGCTTGAATA CTGCCTCAAG GACAGGATGA ACTTTGACAT CCCTGAGGAG
401 ATTAAGCAGC TGCAGCAGTT CCAGAAGGAG GACGCCGCAT TGACCATCTA
451 TGAGATGCTC CAGAACATCT TTGCTATTTT CAGACAAGAT TCATCTAGCA
501 CTGGCTGGAA TGAGACTATT GTTGAGAACC TCCTGGCTAA TGTCTATCAT
551 CAGATAAACC ATCTGAAGAC AGTCCTGGAA GAAAAACTGG AGAAAGAAGA
601 TTTCACCAGG GGAAAACTCA TGAGCAGTCT GCACCTGAAA AGATATTATG
651 GGAGGATTCT GCATTACCTG AAGGCCAAGG AGTACAGTCA CTGTGCCTGG
701 ACCATAGTCA GAGTGGAAAT CCTAAGGAAC TTTTACTTCA TTAACAGACT
751 TACAGGTTAC CTCCGAAACT GAAGATCTAG CCCGCCTAAT GAGCGGGCTT
801 TTTTTTCAG
```

lac promoter:

LOCUS *lacpro* 271 BP

UPDATED 5/17/89

ORIGIN *EcoRI*

LIT. De Boer (1982)

```
1  AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAC TGCACGGTGC ACCAATGCTT
      Taa I
51  CTGGCGTCAG GCAGCCATCG GAAGCTGTGG TATGGCTGTG CAGGTCGTAA
101 ATCACTGCAT AATTCGTGTC GCTCAAGGCG CACTCCCATT CTGGATAATG
151 TTTTTTGGCG CGACATCATA ACGGTTCTGG CAAATATTCT GAAATGAGCT
      -35 -10 >>>> mRNK
201 GTTGACAATT AATCATCGGC TCGTATAATG TGTGGAATTG TGAGCGGATA
      Hinc II lac operator
251 ACAATTTTAC ACAGGAAACA G
      RBS
```

