

SVEMIR OD BIG BANGA DO IRB-a

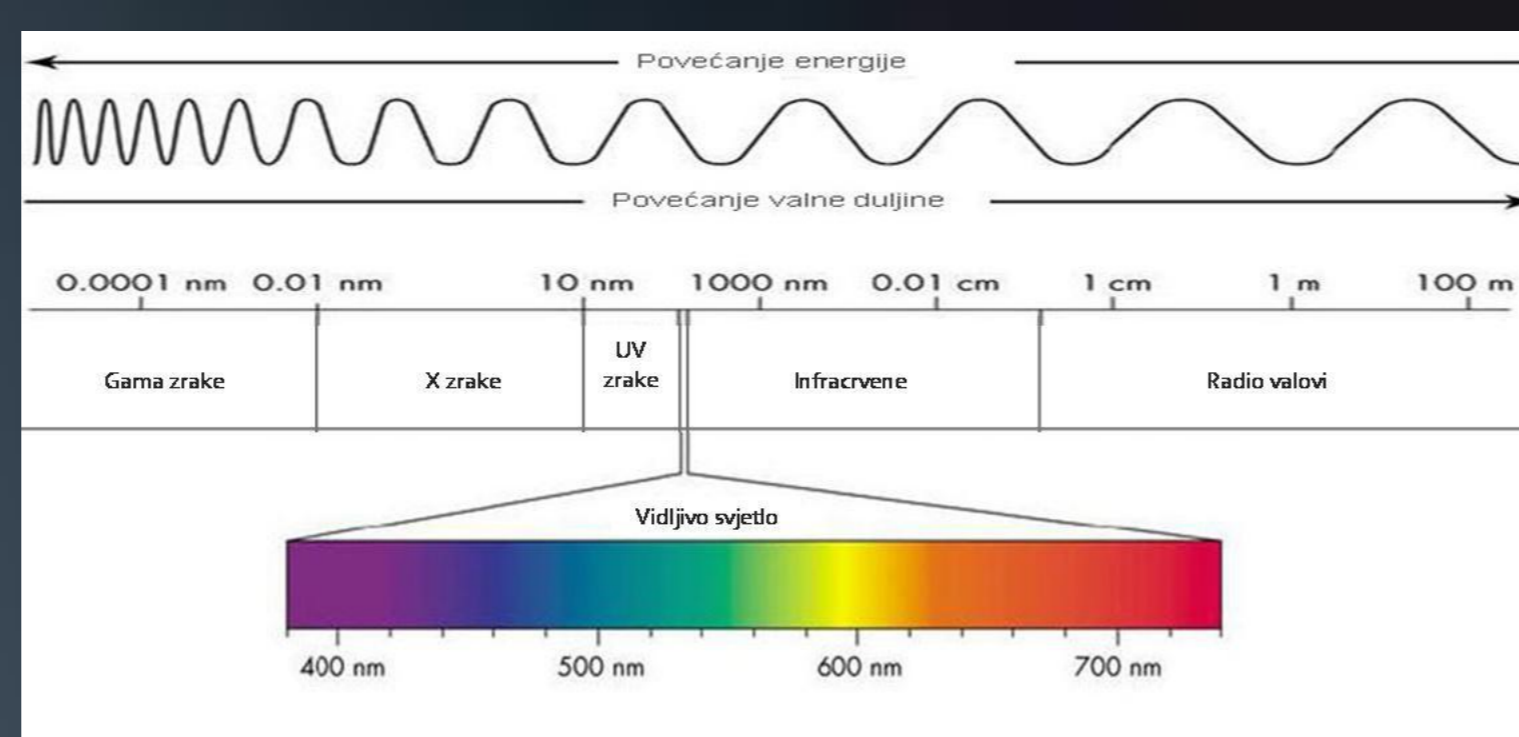
Preživljavanje bakterija u ekstremnim uvjetima

S. Cvjetan ¹, J. Repar ¹, I. Vlašić ²



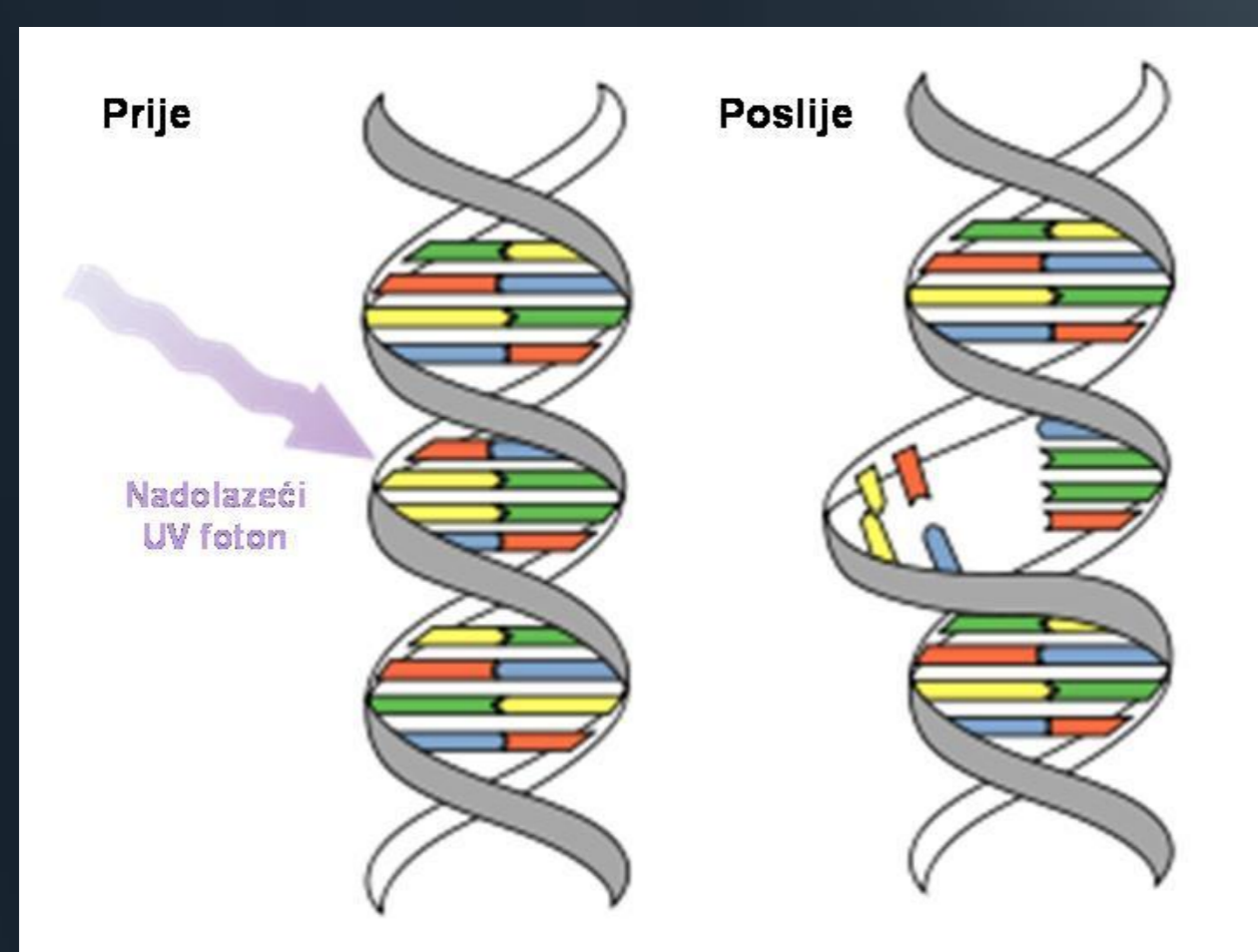
¹ Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković
² Laboratorij za evolucijsku genetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković

U svemiru djeluje kozmičko zračenje kojeg čine energetske električki-nabijene subatomske čestice. Zahvaljujući Zemljinom prirodnom štitu, magnetosferi i atmosferi, vrlo malo kozmičkog zračenja dopire do površine Zemlje. Većina kozmičkog zračenja međudjeluje sa Zemljinom atmosferom i nastaje sekundarno kozmičko zračenje koje je sastavljeno od elektrona, neutrona i elektromagnetskog zračenja različitih valnih duljina. Neka od njih su UV ($\lambda=10-400$ nm) i γ ($\lambda<0,01$ nm) zračenje.



Spektar elektromagnetskog zračenja

Sunce je prirodan izvor UV zračenja i to najviše UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) i UV-C (100-280 nm) zračenja, ali samo UV zračenje valne duljine od 300 do 400 nm dolazi na Zemlju. Poznato je štetno djelovanje UV zračenja jer indirektno (UV-A) ili direktno (UV-B i UV-C) oštećuje molekulu DNA. Od sva tri tipa UV zračenja, UV-C zračenje najštetniji je tip UV zračenja i koristi se za sterilizaciju jer uništava mikroorganizme. UV-C zračenje direktno djeluje na molekulu DNA tako što uzrokuje povezivanje susjednih pirimidinskih baza i stvaranje pirimidinskih dimera. Isti mutageni efekt ima i UV-B zračenje. UV-A zračenje dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji oštećuju molekulu DNA i proteine u stani.



Pirimidinski dimeri popravljaju se mehanizmom nukleotidnog ekscizijskog popravka (NER). Ukoliko se ne poprave NER-om dimeri su mutageni. Nepopravljeni dimeri aktiviraju će translezijsku DNA sintezu (TLS). TLS popravak ovisi o DNA polimerazama koje su sklone uvođenju pogrešaka. Prisustvo citozina u dimeru dovest će do tranzicije citozina u timin odn. mutageneze.

γ -zračenje je visokoenergetsko elektromagnetsko zračenje koje ne nalazimo često u prirodi. Zato se pretpostavlja da je kod bakterije *D. radiodurans* otpornost na γ -zračenje zapravo posljedica adaptacije na ekstremno isušivanje. Spektar valnih duljina γ -zračenja preklapa se djelomično sa spektrom široko upotrebljivanih x-zraka koje slično djeluju na stanice. γ -zračenje i slobodni radikali nastali zbog γ -zračenja oštećuju stanične molekule (DNA, proteine, lipide, ugljikohidrate) te uzrokuju nastanak potencijalno letalnih dvolančanih lomova u molekuli DNA.



Genomska DNA bakterije *D. radiodurans* potrgana je na komade nakon 3kGy γ -zračenja

Genomska DNA bakterije *D. radiodurans* razrezana je na desetak dijelova pomoću restrikcijskog enzima NotI i razdvojena pomoću elektroforeze u promjenjivom električnom polju.

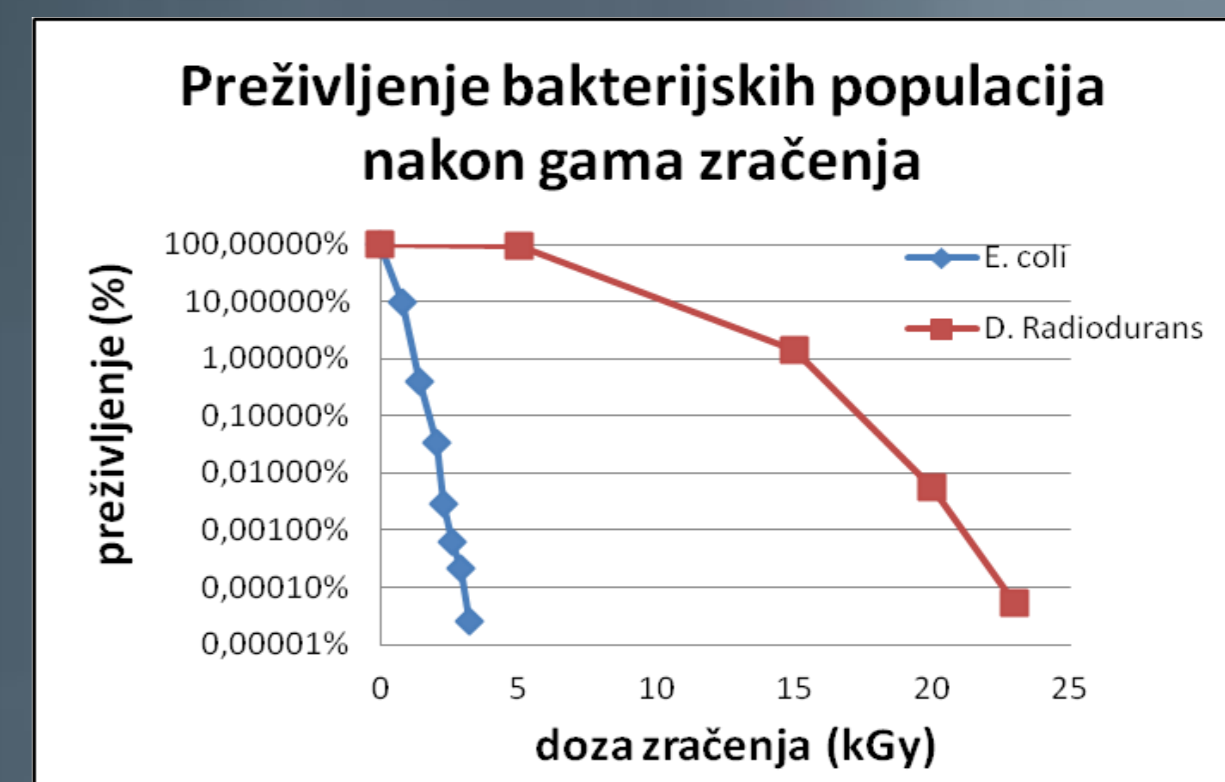
UV i γ zračenje mogu biti smrtonosni za živi organizam jer oštećuju stanični materijal (molekulu DNA, proteine, lipide i dr.). Usprkos tome, planetu Zemlju nastanjuju bakterije koje mogu preživjeti tako ekstreme uvjete. Neke od tih bakterija su *Bacillus subtilis* i *Deinococcus radiodurans* koje su razvile karakteristične mehanizme preživljavanja.

Bacillus subtilis je gram pozitivna bakterija koja se najčešće nalazi u zemlji. Tijekom nutritivnog stresa stvara endospore koje mu omogućavaju da preživi ekstremne uvjete npr. visoke temperature, UV i γ zračenje, isušivanje i otrovne kemikalije (H_2O_2 , formaldehid i nitratnu kiselinu). Glavnu ulogu u mehanizmu preživljavanja imaju α i β proteini koji zasićuju molekulu DNA i pri tome je štite. Navedeni proteini prisutni su samo u endospori, no ne i u vegetativnim stanicama.



Razmaz bakterije *Bacillus subtilis* na bogatom, hranjivom mediju

Bakterija *Deinococcus radiodurans* je jedan od najotpornijih organizama na ionizirajuće zračenje. Izolirana je 1956. iz x-zrakama ozračenih mesne konzerve (koja se pokvarila). Bakterije iz roda *Deinococcus* izolirane su iz različitih staništa – od životinjskog fecesa do antarktičkog i pustinjskog tla. Preživljavanje ekstremnih uvjeta pripisuje se snažnoj zaštiti proteina od oksidativnih oštećenja (Daly i sur. 2007) te preciznom i efikasnom mehanizmu rekonstrukcije genoma iz stotine kromosomskih fragmenata (Zahradka i sur. 2006).



Cilj istraživanja:

Dolazi li do mutageneze u sporama *Bacillus subtilis* nakon što se ozrače UV zračenjem? Da bi se to utvrdilo spore se zrače simuliranim okolišnim UV zračenjem (UV-A i UV-B) ili germicidalnim zračenjem (UV-C).

Rezultati:

Do mutageneze dolazi ukoliko se spore *Bacillus subtilis* tretiraju UV-A i UV-B ili UV-C zračenjem, no spektar mutacija se razlikuje.



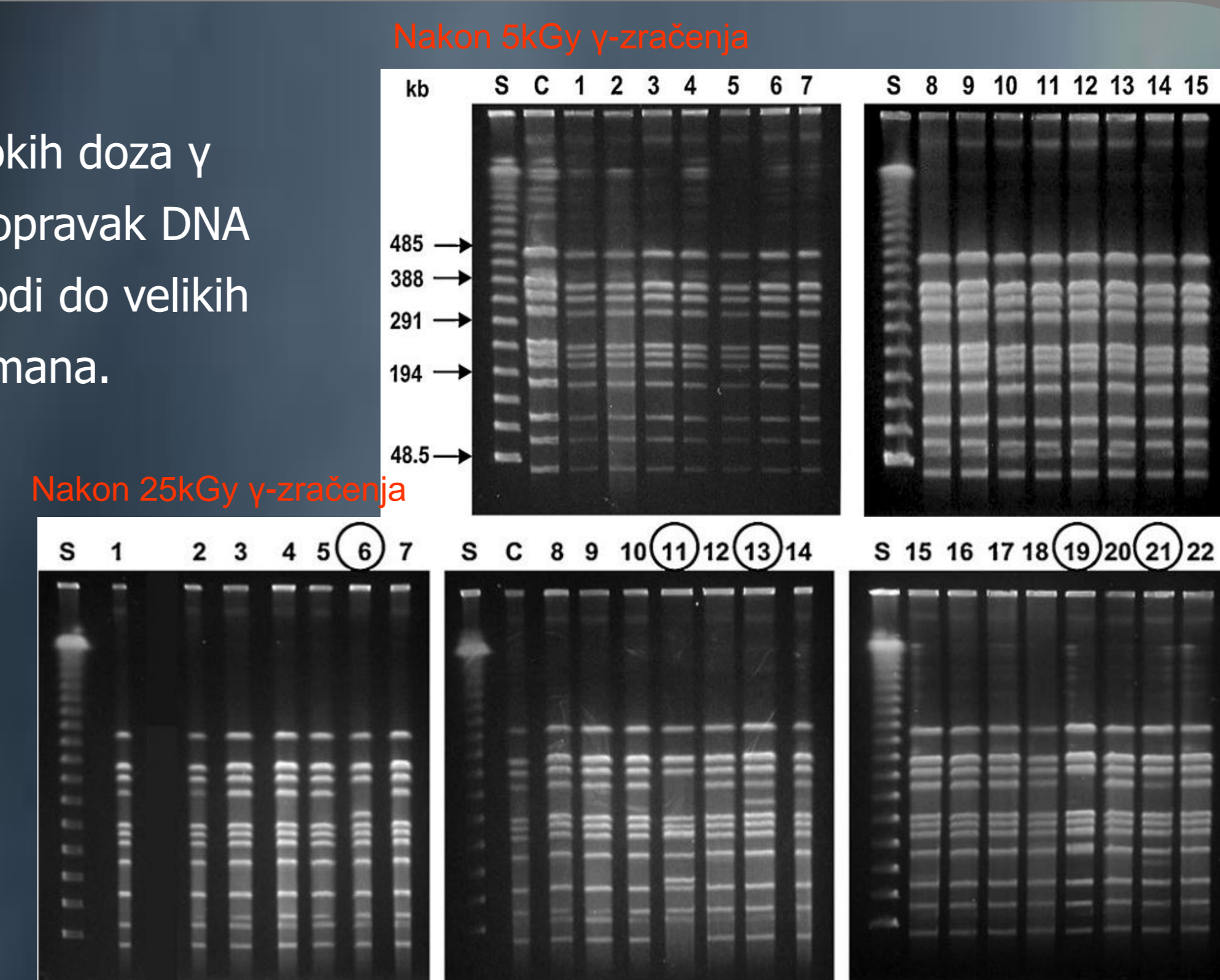
Slika 1. Slika 2. Svrnjavanje sekvenci divljeg tipa gena *gyrA* i uzoraka izolirane DNA nakon zračenja spora *Bacillus subtilis* UV-A i UV-B (Slika 1.) i UV-C (Slika 2.) zračenjem. Za svrnjavanje sekvenci korišten je bioinformatički program ClustalW. Crveno je označeno 'vruč' mjesto, odn. položaj nukleotidnog slijeda gdje dolazi do mutageneze, dok je plavo označen nukleotidni slijed divljeg tipa gena *gyrA* bakterije *Bacillus subtilis*.

Cilj istraživanja:

Koliko je efikasna i točna rekonstitucija molekule DNA u bakteriji *D. radiodurans* nakon dvolančanih lomova uzrokovanih γ -zračenjem?

Rezultati:

Nakon izuzetno visokih doza γ zračenja (25kGy) popravak DNA je neprecizan i dovodi do velikih genomskih rearanžmana. (Repar i sur. 2010)



Kolonije bakterije *D. radiodurans* koje su preživjele γ -zračenje uzgojene su do staničnih kultura iz kojih je izolirana DNA. Genomska DNA razrezana je na desetak dijelova pomoću restrikcijskog enzima NotI i razdvojena pomoću elektroforeze u promjenjivom električnom polju.

Zahvale mentorima i voditeljima projekata:

Dr. sc. Krunoslav Brčić-Kostić, mentor i voditelj projekta: 'Uloga rekombinacije u popravku DNA i evoluciji genoma', Laboratorij za evolucijsku genetiku
Dr. sc. Ksenija Zahradka, mentor i dr. sc. Davor Zahradka, mentor i voditelj projekta: 'Molekularni mehanizmi rekombinacije i popravka DNA', Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju

Reference:

Repar, J., Cvjetan, S., Slade, D., Radman, M., Zahradka, D., Zahradka, K. (2010) DNA Repair. 9:1151-1161.
Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, Petranovic M, Lindner A B, Radman M (2006) Nature 443:569-573.
Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M. i sur. (2007) PLOS Biology. 5(4), e92.