

DRVO ŽIVOTA

Što Prva dama molekularne biologije i Conan imaju zajedničko? Bakterijski mehanizmi popravka oštećene molekule DNA

M. Buljubašić¹, J. Repar¹, A. Šimatović², I. Vlašić²

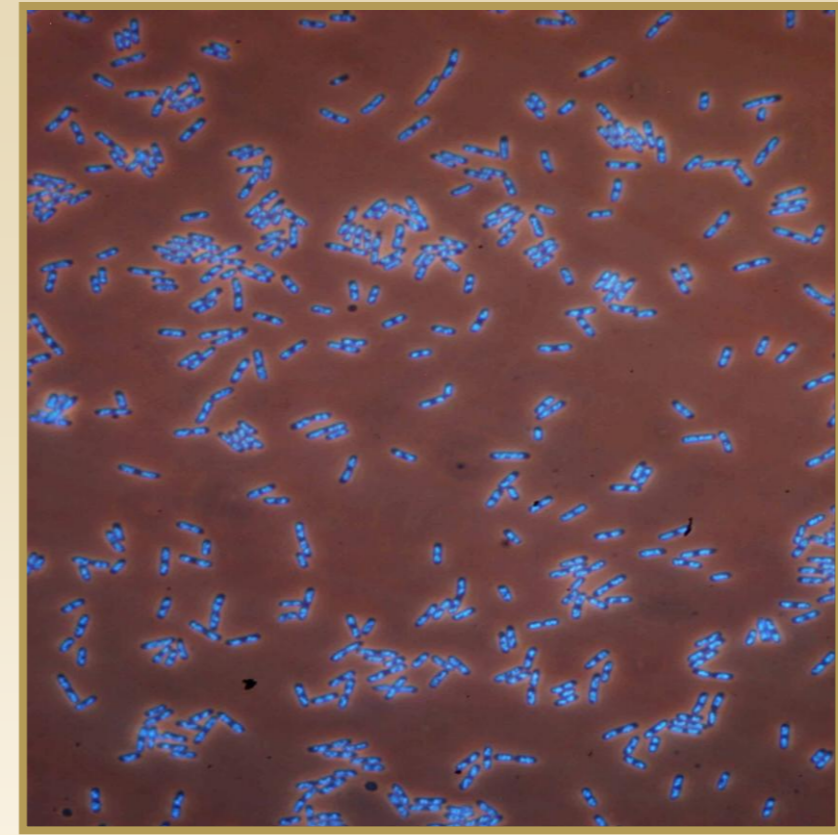
¹ Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković
² Laboratorij za evolucijsku genetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković



Bakterije su organizmi prisutni na Zemlji 3,8 milijuna godina, no zbog svoje veličine (prosjeak 1-5 μm) čovjek ih je prvi puta vidio u 17. stoljeću - Antony van Leeuwenhoek. Iako ih mnogi smatraju primitivnim one su vrlo dobro prilagođene i uspješan oblik života. Najbrojnija su skupina organizama koja je prisutna u gotovo svim staništima i imaju vrlo važnu ulogu u održavanju svakog ekosustava. Procjenjeno je da na našoj planeti obitava čak 5,000,000,000,000,000,000,000,000,000 (5x10³⁰) različitih vrsta od kojih je do danas okarakterizirano samo 1%. Bakterije su prokarioti što znači da nemaju jezgru niti ostale organele koje možemo naći kod eukariota.

Escherichia coli

- Štapičasta, gram negativna bakterija
- Primarno se nalazi u probavnom sustavu svih sisavaca, no zbog svoje otpornosti može mjesecima preživjeti u vanjskim uvjetima
- Kolonizira nas već 40 sati nakon rođenja i od tada pomaže u probavi (sinteza vitamina K)
- Sprječava naseljavanje patogenih bakterija
- 'Najsretnije' su na temperaturi oko 37°C i neutralnom pH
- Ona je prvi modelni organizam u molekularnoj biologiji pa je zasluženo dobila naziv 'Prve dame'
- Mali broj sojeva može izazvati i bolesti (npr. EHEC serotip O157:H7)



E. coli (divlji tip) vidljiva pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Kromosomi su obojani fluorescentnom bojom DAPI.



Deinococcus radiodurans

- Rozo pigmentirana, okruglog oblika, gram pozitivna bakterija
- Najpoznatija po svojoj otpornosti na γ-zračenje i shodno tome dobila nadimak 'Conan the bacterium'
- Prvi put izolirana iz pokvarene konzerve mesa "sterilizirane" x-zračenjem
- Najčešće raste u obliku parova i tetrada, idealno na 30°C
- Nepatogena

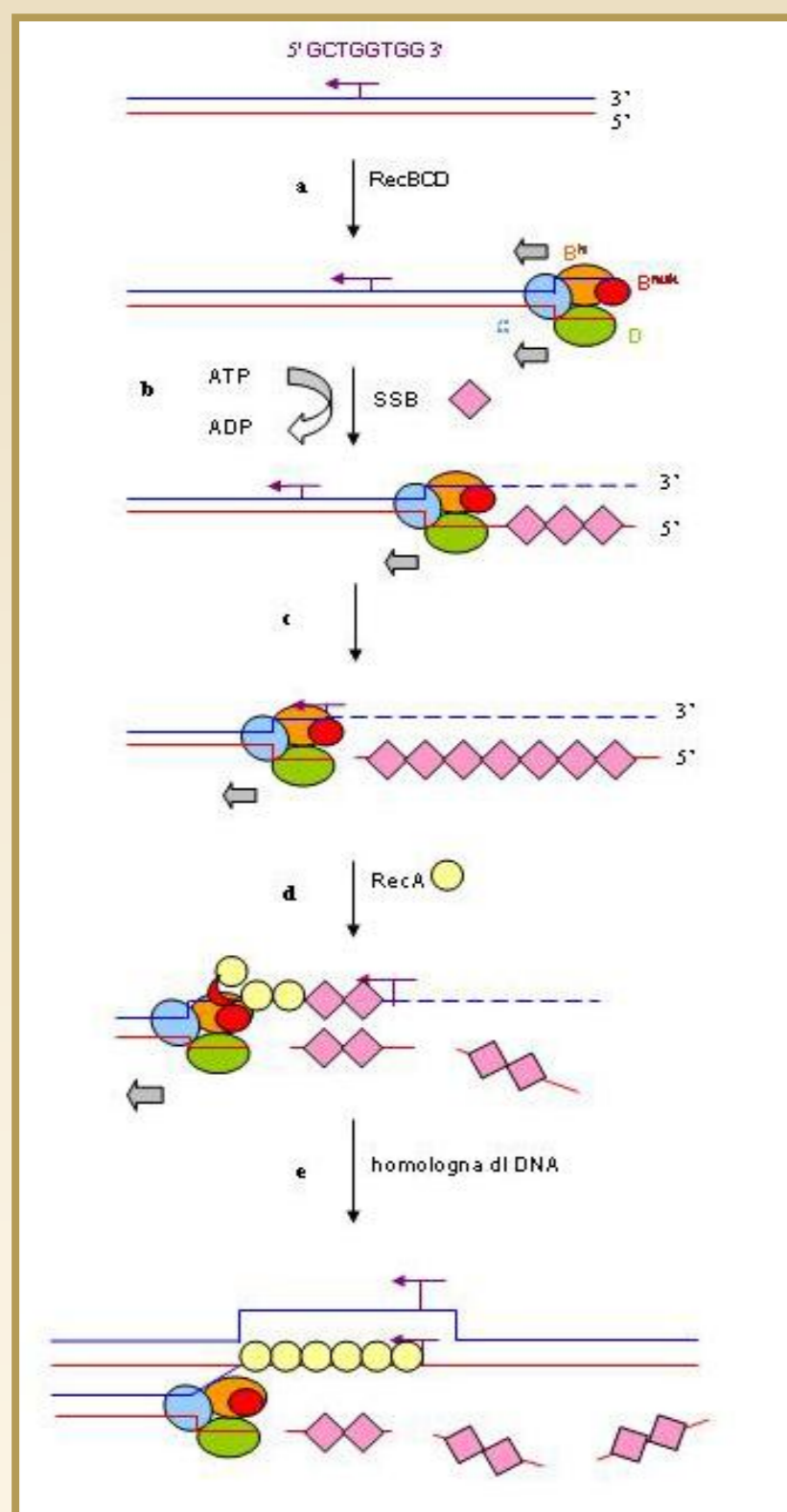


D. radiodurans (divlji tip) vidljiv pod fazno-kontrastnim mikroskopom. Kromosomi su obojani fluorescentnom bojom DAPI.

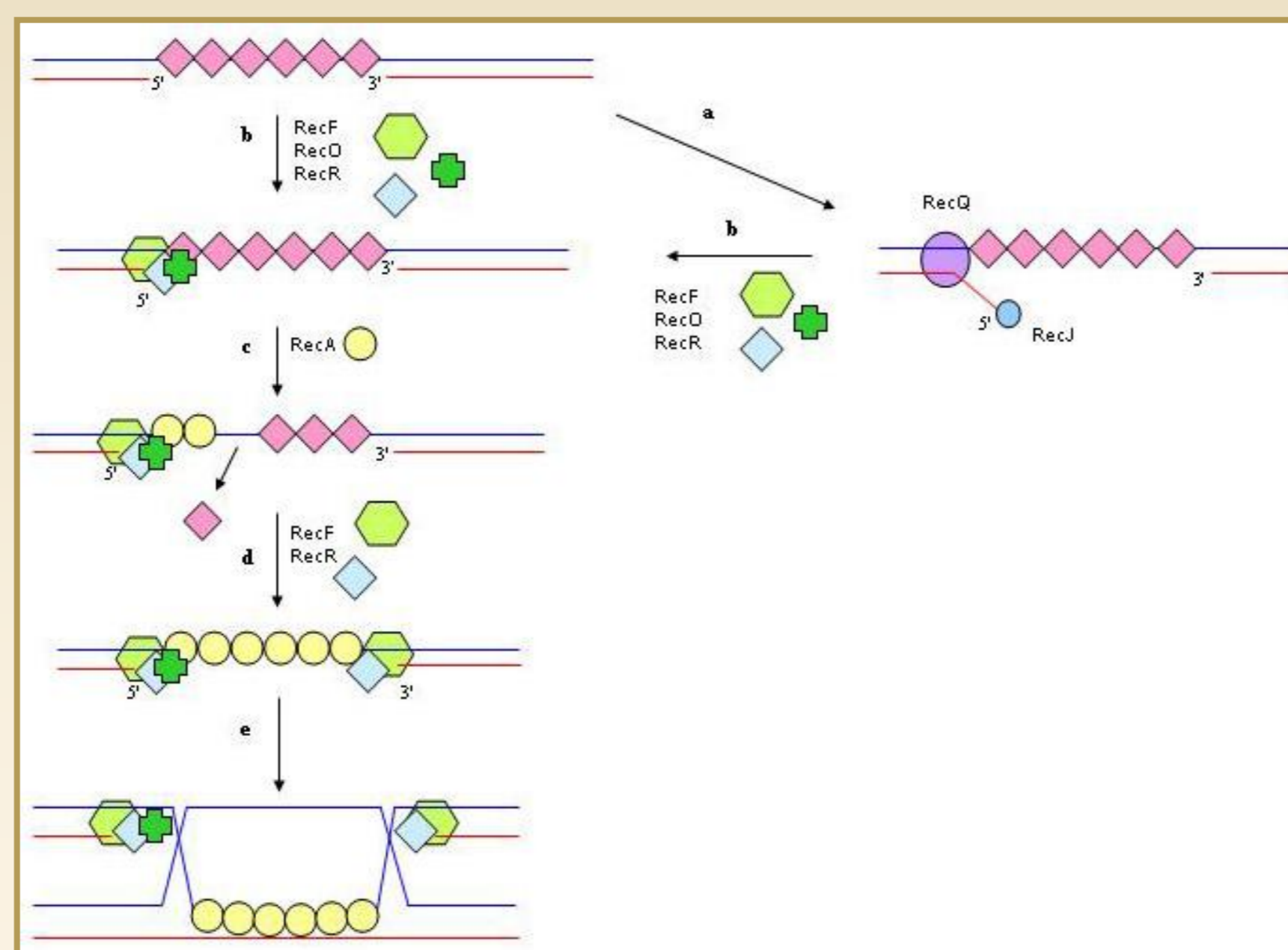
Iako različite po izgledu i sposobnostima preživljavanja, bakterije *Escherichia coli* i *Deinococcus radiodurans* imaju zajedničkih točaka na molekularnoj razini. Obje imaju dvolančane molekule DNA i protein RecA. Ukoliko se molekula DNA ošteti nastaju dvolančani lomovi koji su smrtonosni za svaku stanicu. Mehanizam popravka takvih lomova naziva se rekombinacijski popravak i u obje bakterije on ovisi o proteinu RecA i homolognoj dvolančanoj molekuli DNA. Dvlančani lomovi mogu nastati uslijed nekog vanjskog utjecaja kao što je γ zračenje koje direktno uvodi dvolančane lomove ili nakon UV zračenja pri čemu indirektno nastaju jednolančane praznine i dvolančani lomovi. Osim toga, dvolančani lomovi mogu nastati i spontano npr. prilikom replikacije molekule DNA.

U bakteriji *Escherichia coli* dvolančani lomovi popravljaju se RecBCD rekombinacijskim mehanizmom popravka, dok se jednolančane praznine u molekuli DNA popravljaju RecF rekombinacijskim mehanizmom popravka. Rekombinacijski proteini RecBCD i RecFOR nanose protein RecA na jednolančanu DNA i tako nastaje RecA filament.

RecBCD rekombinacijski put popravka



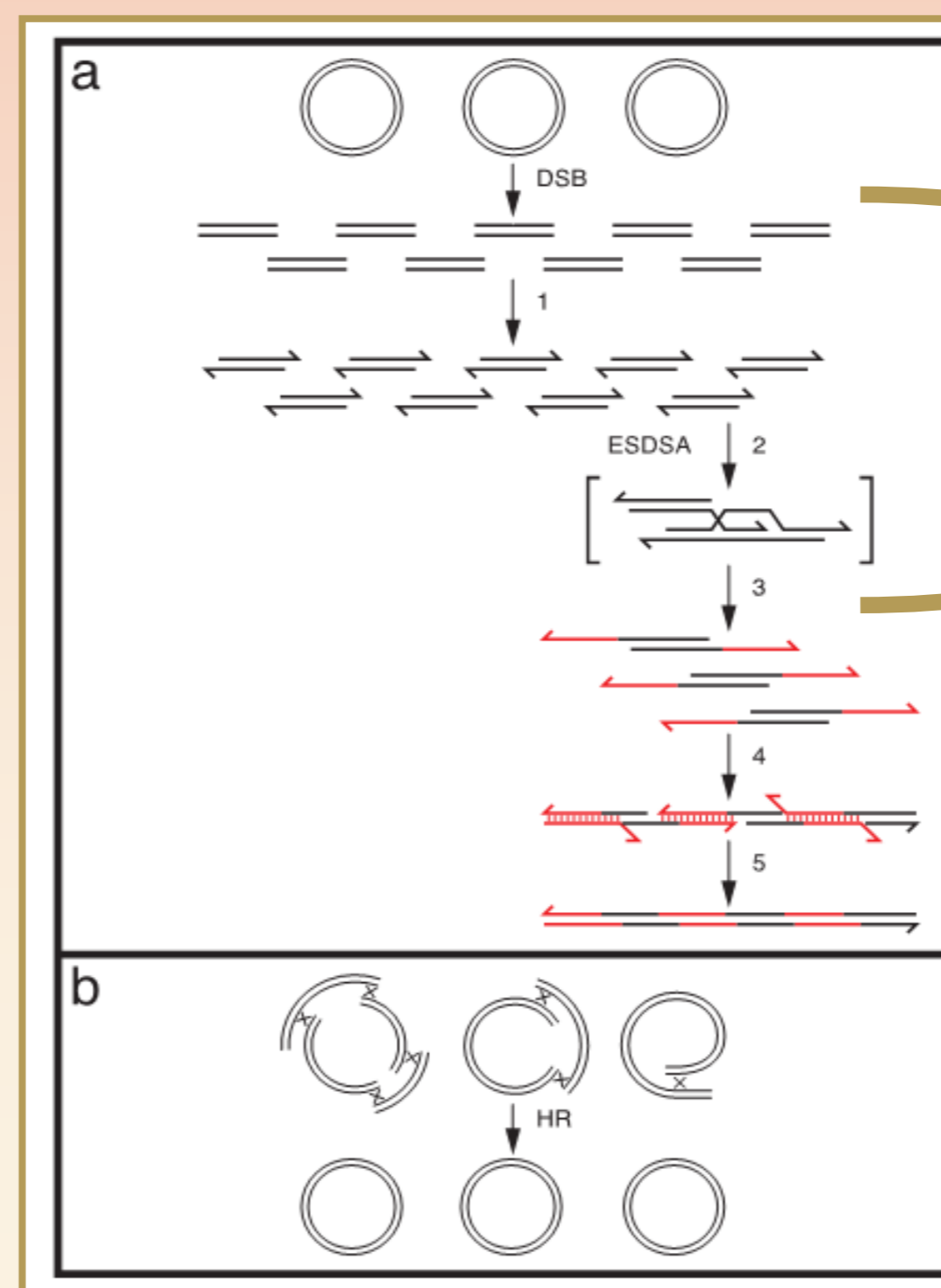
RecF rekombinacijski put popravka



(modeli RecBCD i RecF rekombinacijskih puteva popravka preuzeti su iz Spies i Kowalczykowski (2005))

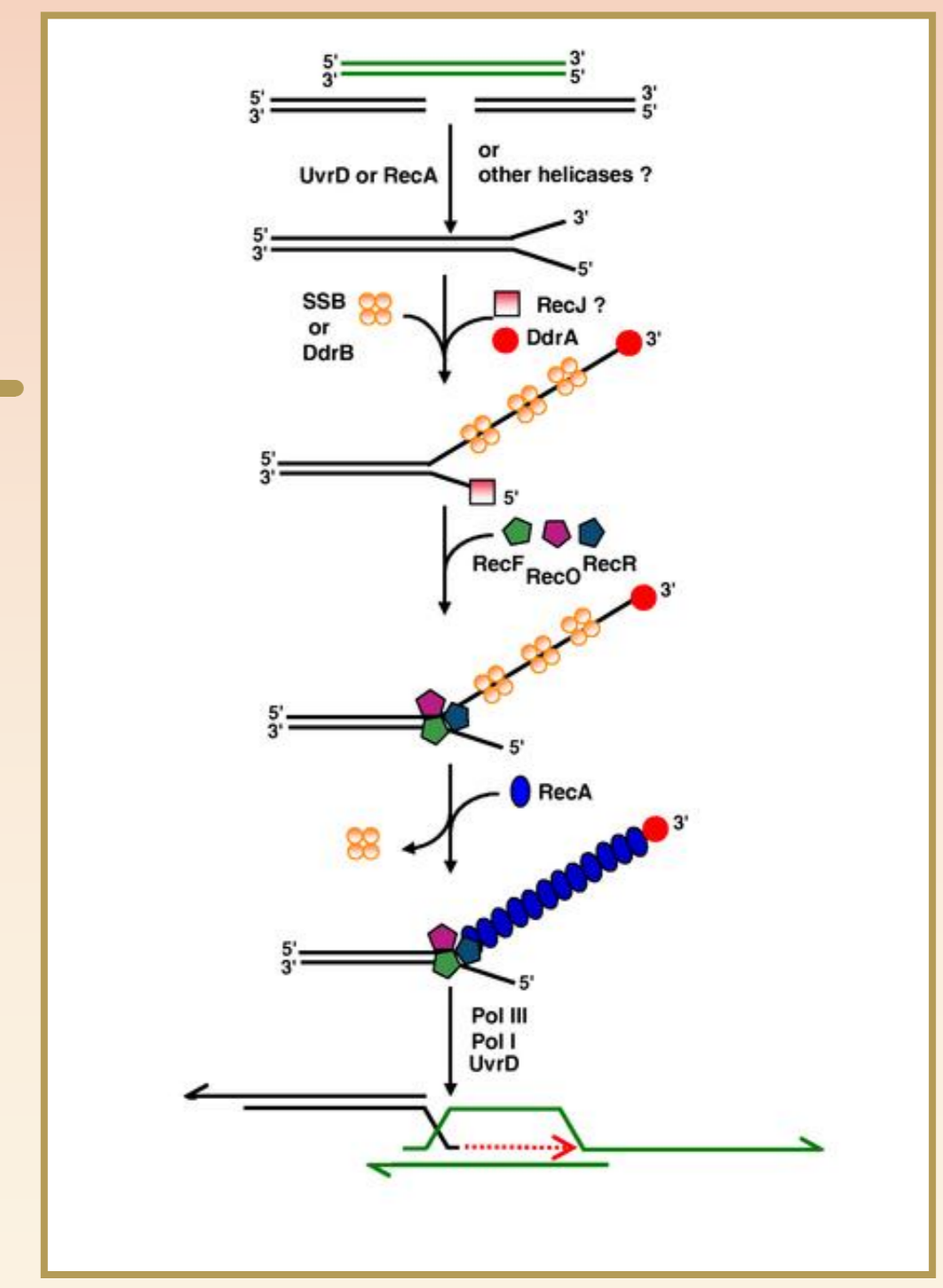
Popravak dvolančanih lomova DNA u bakteriji *D. radiodurans* osim rekombinacije uključuje i opsežnu sintezu DNA. Zato je osim o RecA proteinu popravak ovisan i o polimerazama Pol I i PolIII. *D. radiodurans* koristi proteine RecF puta za nanošenje proteina RecA na jednolančanu DNA.

Mehanizam popravka dvolančanih lomova DNA u bakteriji D. radiodurans:



(model preuzet iz Zahradka i sur. (2006))

Proteini RecF puta popravka ključni su za rekombinaciju u D. radiodurans



(model preuzet iz Benthikou i sur. (2010))

Protein RecA i RecA filament ključni su:

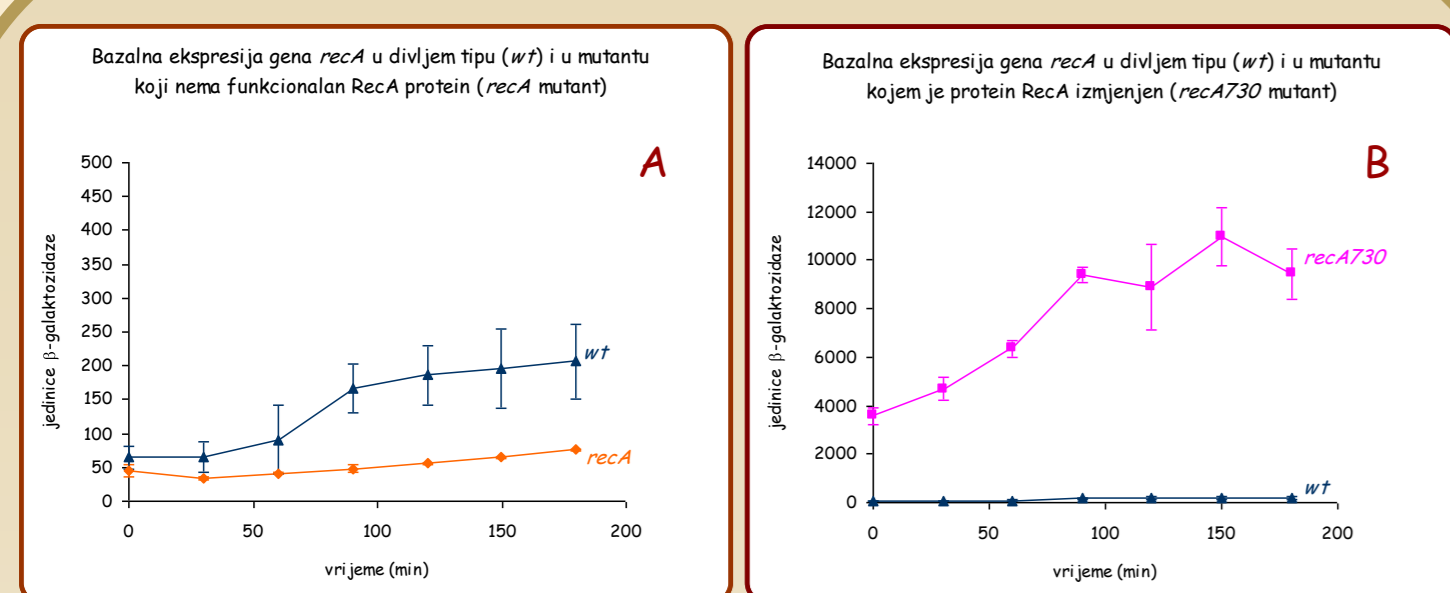
- jer čuvaju molekulu DNA od degradacije različitim nukleazama
- jer induciraju SOS odgovor, mehanizam koji se aktivira ako je oštećena molekula DNA
- jer o njima ovisi rekombinacijski popravak

Ekspekcija gena SOS odgovora

Preživljenje nakon UV zračenja

Degradacija molekule DNA

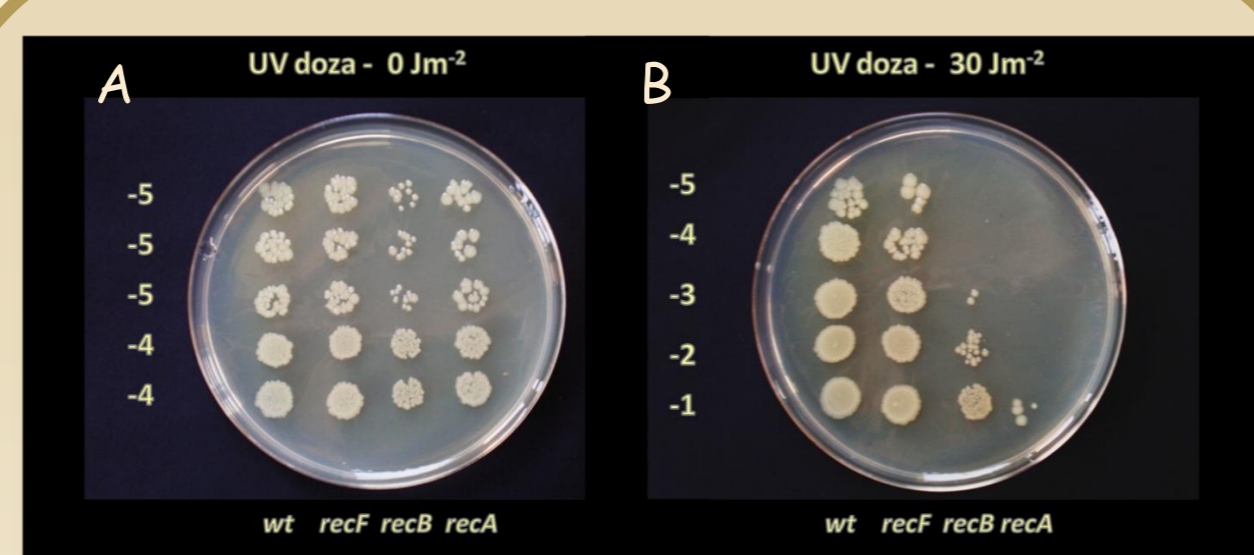
Popravak oštećene molekule DNA nakon γ zračenja



Bazalna ekspresija gena SOS odgovora:

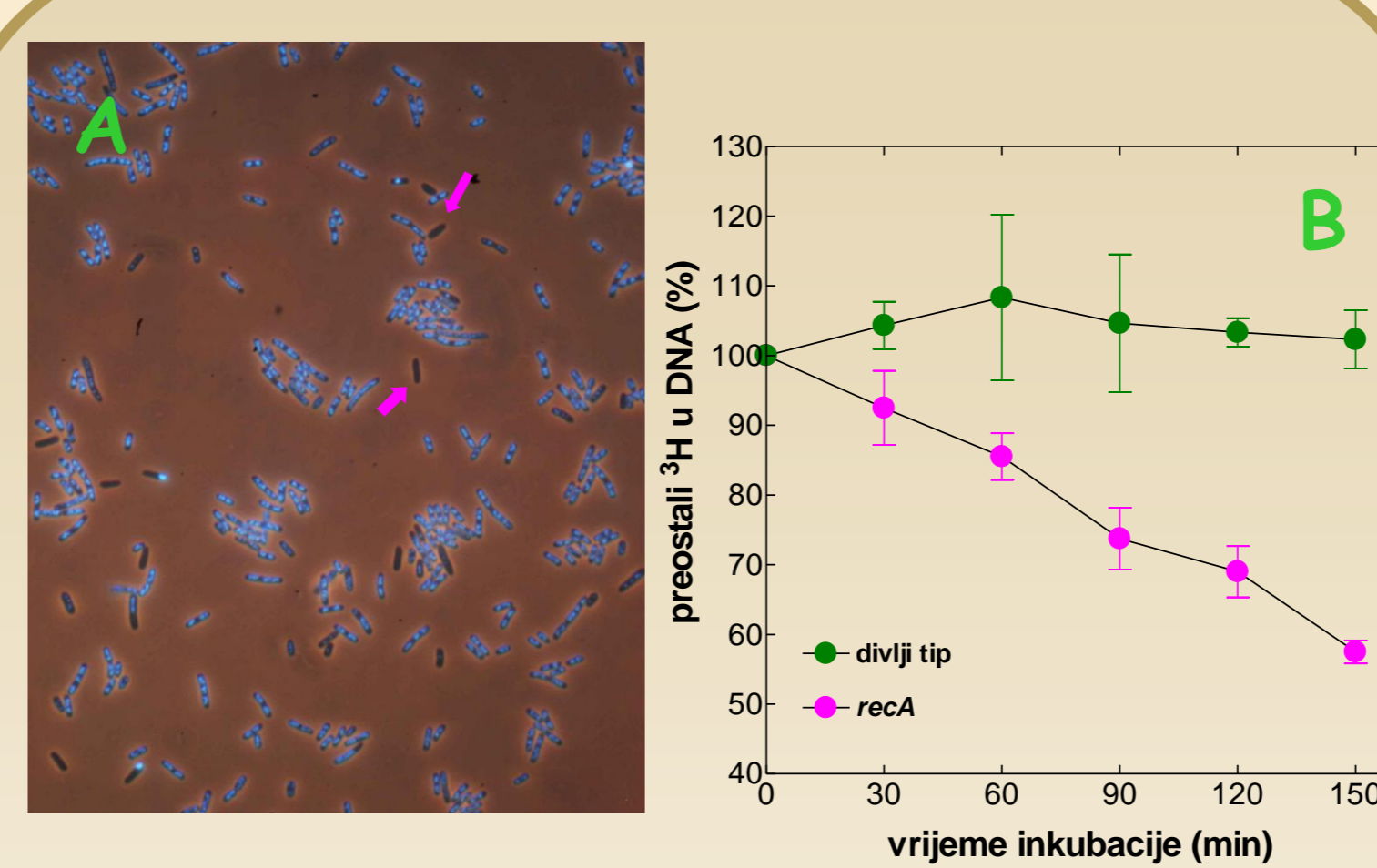
U slučaju da stanice ne mogu popraviti oštećenja regularnim putem, RecA filament postaje signal za ekspresiju oko 50 različitih gena čiji su produkti uključeni u SOS odgovor. Pod promotor gena za jedan takav protein stavljen je gen za enzim β-galaktozidazu. Kao supstrat za detekciju aktivnosti β-galaktozidaze koristi se ONPG, bezbojna kemikalija čijom hidrolizom nastaje žuto obojenje. Intenzitet obojenja mjera je aktivnosti enzima i ujedno pokazatelj jačine SOS odgovora.

S obzirom da do DNA oštećenja dolazi i spontano, možemo pratiti i bazalnu ekspresiju gena SOS odgovora. Ona će u divljem tipu (wt), a posebice u mutantu koji nema RecA protein (mutant recA) biti neznatna (A) dok će mutant s vrlo visokim afinitetom za jednolančanu DNA (mutant recA730) uzrokovati visoku razinu SOS odgovora (B).



Preživljenje nakon UV zračenja:

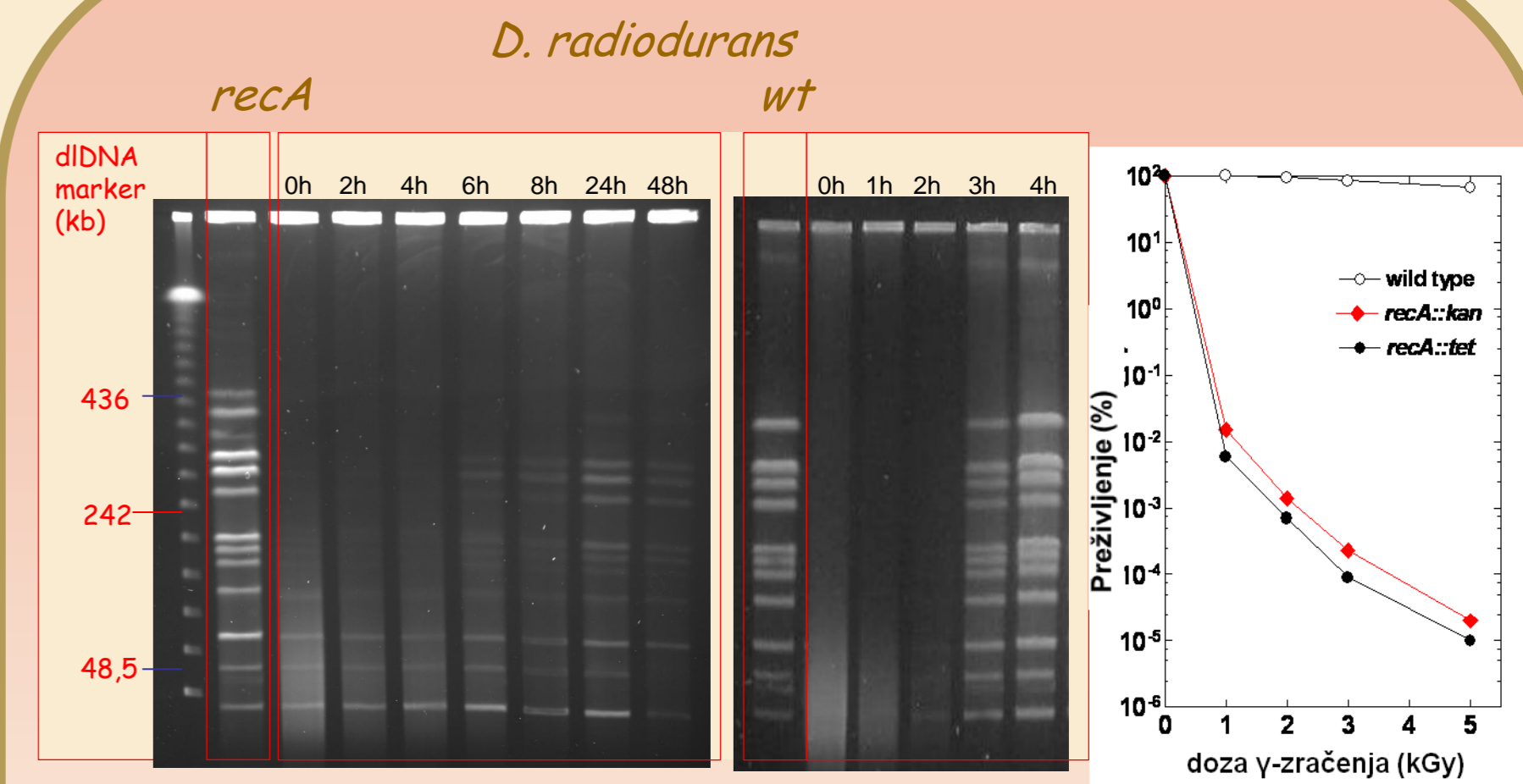
Stanice su uzgojene do logaritamske faze, a zatim su različita razrjeđenja nasadena na LB ploče. Jedna ploča nam služi kao kontrola rasta stanica (A), a druga (B) pokazuje sposobnost stanica da poprave DNA i prežive nakon UV zračenja. Prikazan je utjecaj delecije tri gena čiji produkti imaju važnu ulogu u jednom (mutanti recF ili recB) ili oba (mutant recA) puta homolognog popravka oštećene DNA. Delecija gena recA čiji produkt sudjeluje u oba rekombinacijska puta ima i najveći efekt.



Spontana degradacija DNA u recA mutantu E. coli:

(A) U populaciji stanica bez RecA proteina pojavljuju se i stanice bez DNA, tj. sa potpuno degradiranim kromosomom (na slici označene strelicama). Za taj fenomen spontane i "neobuzdane" degradacije DNA odgovoran je enzim RecBCD. (B) Mjerenje degradacije DNA praćenjem gubitka radioaktiviteta iz stanica čija je DNA obilježena [³H] timidinom. Oko 40% DNA je degradirano u recA stanicama nakon 150 min.

(Zahradka i sur. (2009))



Vrijeme nakon ozračivanja s 3kGy (recA) i 7kGy (wt)

Jednaki volumeni bakterija uzimani su u različita vremena nakon zračenja i iz njih je izolirana DNA. Genomska DNA razrezana je na desetak dijelova pomoću restriktijskog enzima NotI i razdvojena pomoću elektroforeze u promjenjivom električnom polju.

(Repar i sur. (2010))

Preživljenje γ-zračenja kod različitih sojeva bakterije D. radiodurans

Reference
Benthikou E, Servant P, Coste G, Sommer S (2010) PLoS Genet 6(1): e1000774.
Repar J, Cvjetan S, Slade D, Radman M, Zahradka D, Zahradka K (2010) DNA Repair. 9:1151-1161.
Spies M, Kowalczykowski S.C. (2005) In: Patrick Higgins N. (ed.), The Bacterial Chromosome, ASM Press, Washington, D.C., 389-403.
Zahradka K, Buljubašić M, Petranović M, Zahradka D (2009) J. Bacteriol. 191:1677-1687.
Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbek D, Petranovic M, Lindner A B, Radman M (2006) Nature 443:569-573.

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