

Deinococcus radiodurans

- bakterija otporna na zračenje



Ksenija Zahradka, dr. sc.

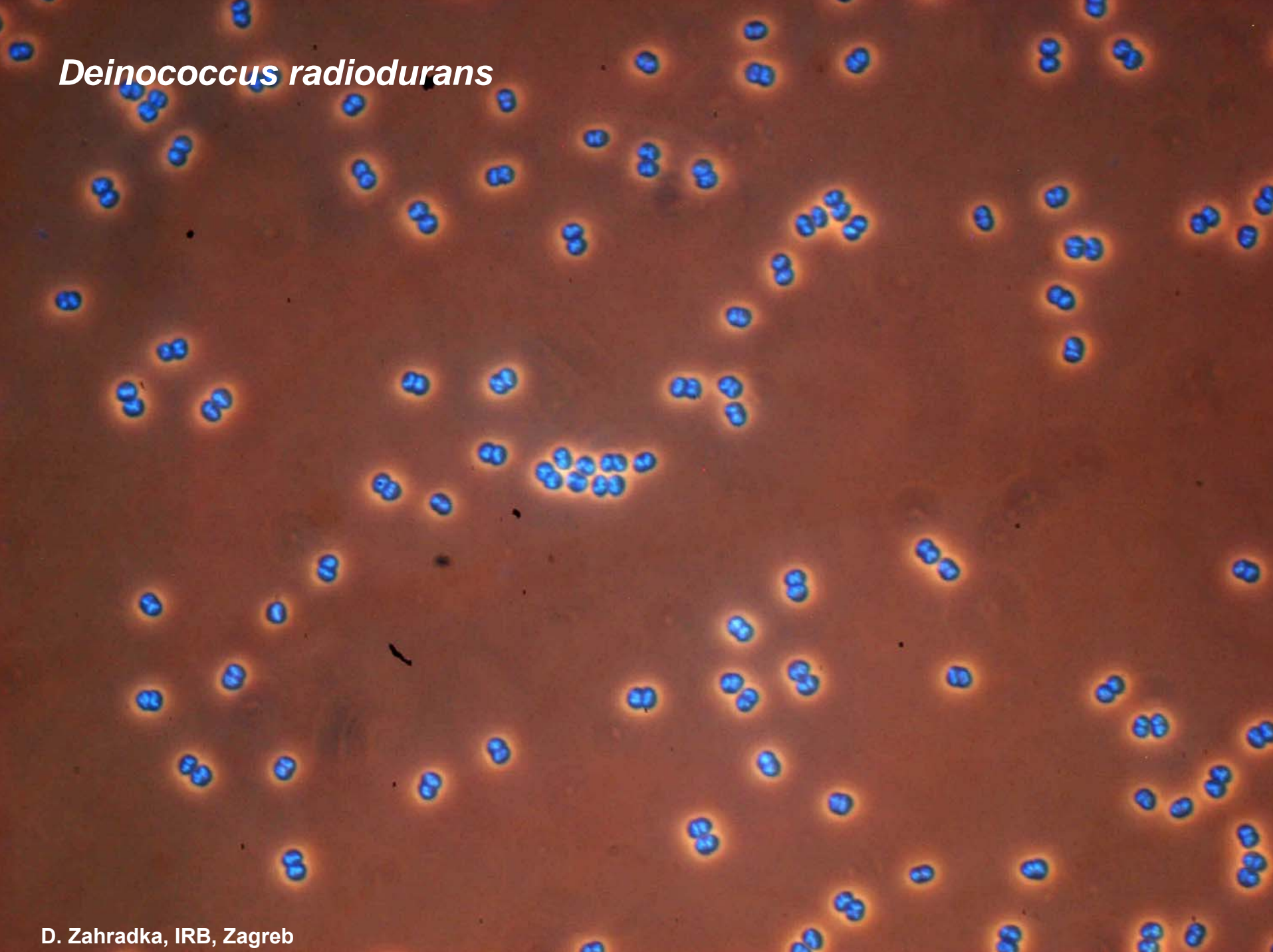
Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju
Zavod za molekularnu biologiju
Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Deinococcus radiodurans

“Super-bakterija”

“Bakterija Konan”

Deinococcus radiodurans



Deinococcus radiodurans

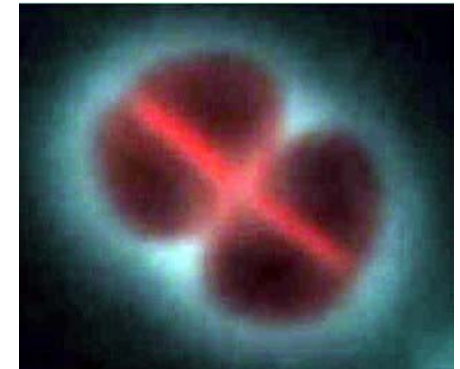
- pripada porodici *Deinococcaceae*;
grupa *Thermus/Deinococcus*, bakterijska grana ekstremofila
- izoliran 1956. u Oregonu, iz konzervi mesa “steriliziranog” x-zračenjem
- različita prirodna staništa:
 - organski-bogati uvjeti (zemlja, životinjski izmet, suho voće)
 - organski-siromašni uvjeti (pustinje, gole stijene, kućna prašina)
- Gram (+), crveno-pigmentirana, aerobna, nesporulirajuća, nepatogena bakterija; 1 – 2 μm veličine
- kompleksno građena stanična ovojnica (6 slojeva)



Kolonije bakterije *D. radiodurans* na krutoj hranjivoj podlozi.

D. radiodurans

- raste u parovima i tetradama u tekućoj hranjivoj podlozi
- optimalni laboratorijski uvjeti rast: 30°C, TGY podloga, aeracija - generacijsko vrijeme 90 min.
- nema nađenih bakteriofaga niti konjugacije
- može se prirodno transformirati
- poliploid:
 - stacionarne stanice: 2 - 4 kopije genoma
 - eksponencijalne stanice: do 10 kopija genoma

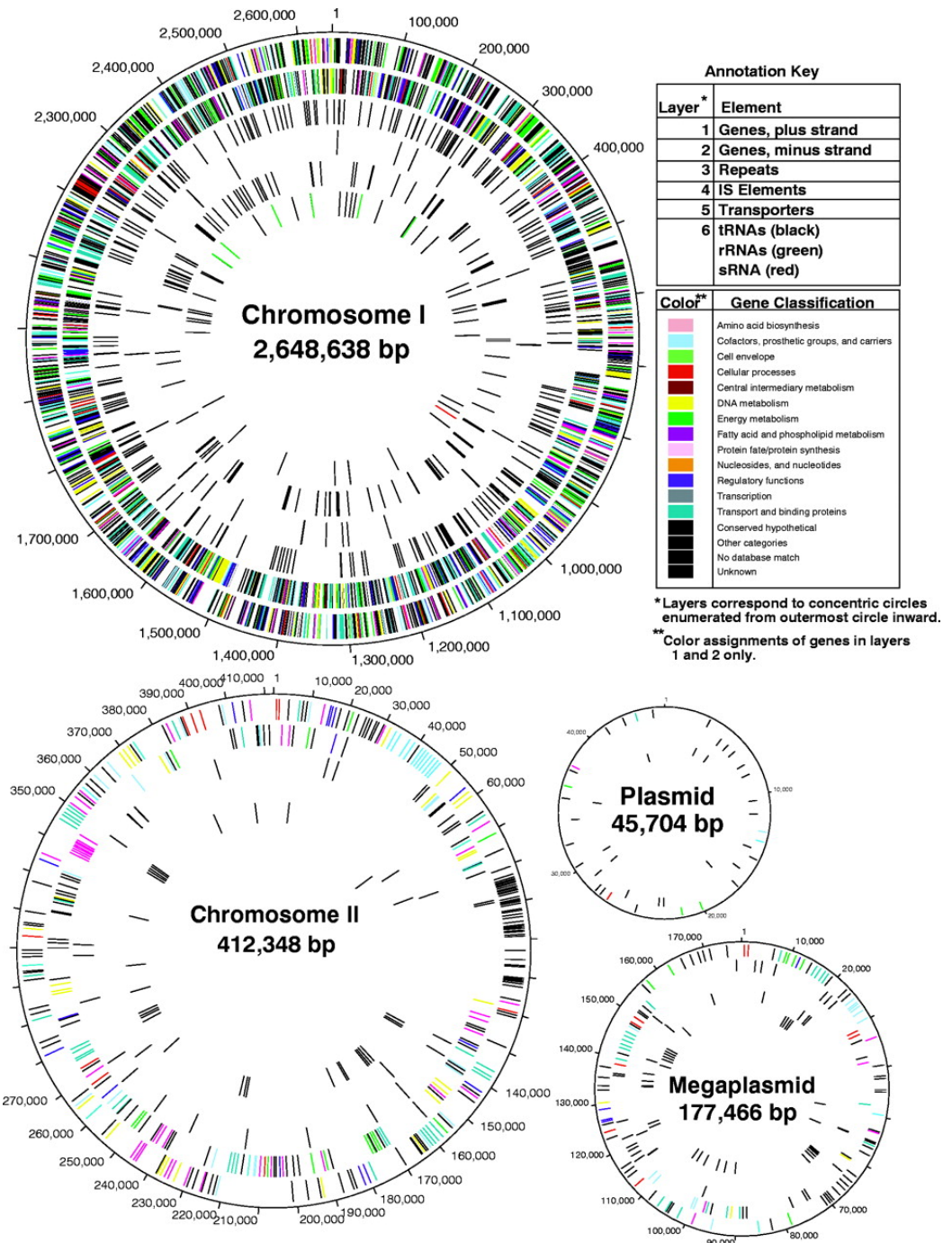


Genom bakterije *D. radiodurans*

- **kompletno sekvenciran**
<http://www.tigr.org/tdb/mdb>
- **3.28 Mbp; 3187 ORF-a**
- **analiza proteinskih sekvenci:**
najveća sličnost sa
***Thermus thermophilus* (143/175)**
(zajednički termofilni predak)

- **mozaicizam genoma:** velik broj gena stečen horizontalnim prijenosom iz različitih izvora

White i sur. 1999, Science 286:1571

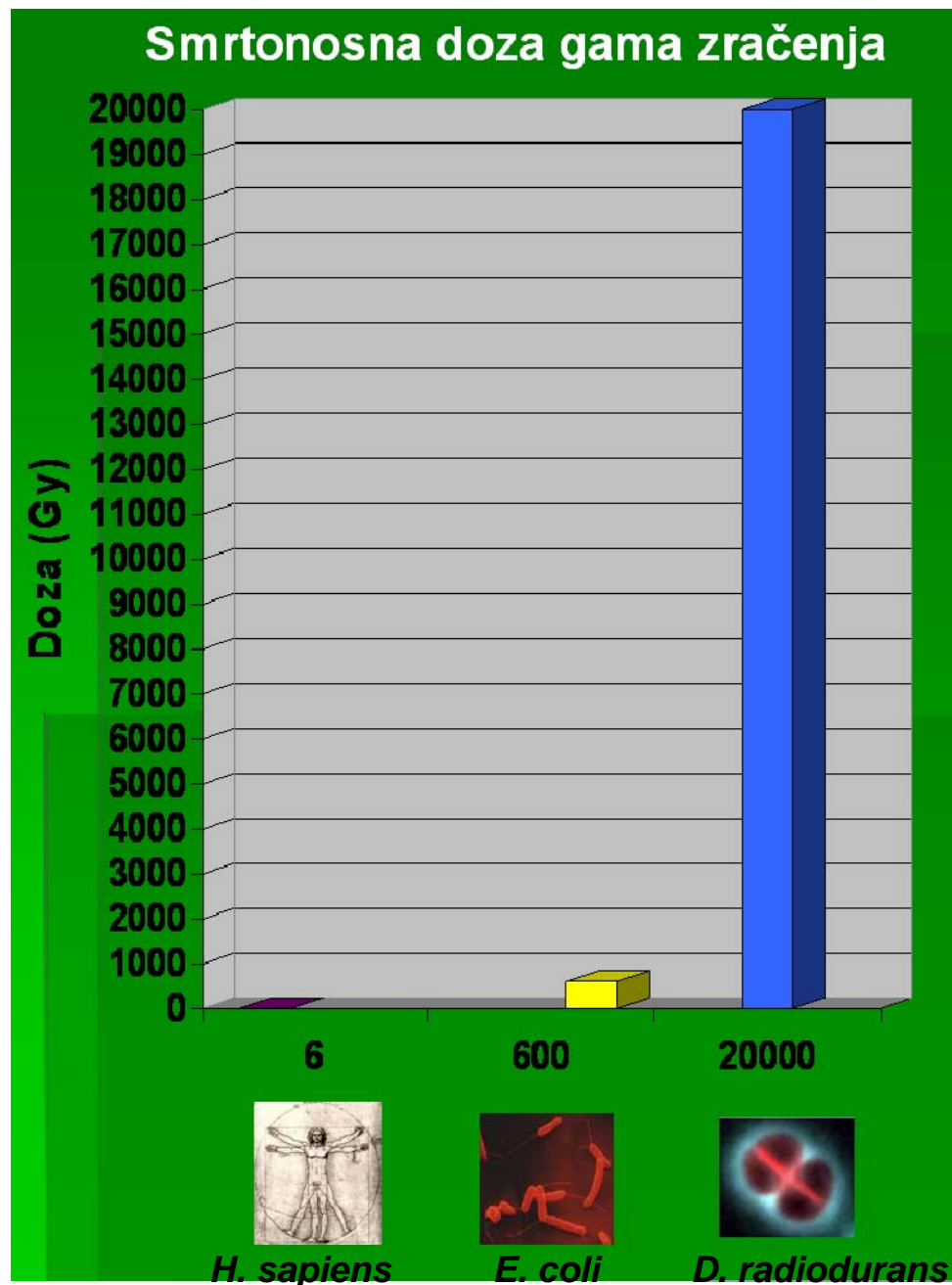


D. radiodurans

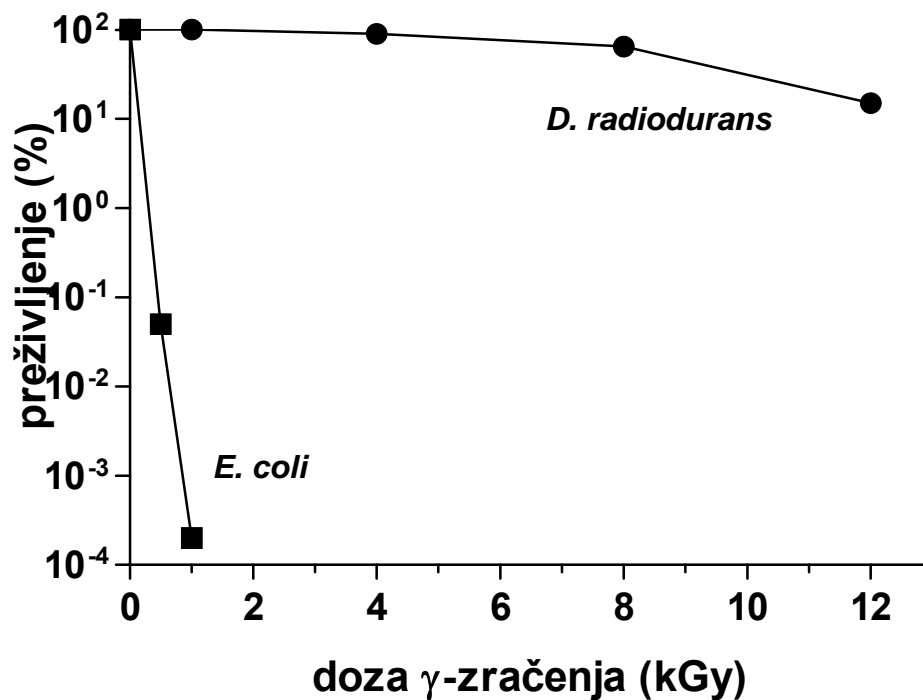
- izuzetno otporan na agense koji oštećuju DNA:

- UV zračenje
- ionizirajuće zračenje (x, gama)
- isušivanje (desikacija)
- kemijski (mutageni) spojevi

- najotporniji poznati organizam na ionizirajuće zračenje !



Bakterija *D. radiodurans* je izuzetno otporna na γ -zračenje



	<u>D_{37} (Gy)</u>
<i>E. coli</i>	30
<i>D. radiodurans</i>	7000 - 8000

Otpornost na UV zračenje

- eksponencijalne stanice preživljavaju 1000 J/m²
(500 J/m² → 5000 pirimidinskih dimera)

	<u>D₃₇ (J/m²)</u>
<i>E. coli</i>	30
<i>D. radiodurans</i>	600

Otpornost na isušivanje (desikaciju)

- *DR* kulture osušene na predmetnom staklu i čuvane 2 godine u desikatoru kod 5 % vlažnosti pokazuju preživljenje od **80 %** !

- rezistencija na zračenje korelira s rezistencijom na isušivanje
→ **radiorezistencija**: “nus-produkt” prilagodbe na isušivanje
- i zračenje i isušivanje izazivaju najteži tip oštećenja genoma:
dvolančane lomove u molekuli **DNA**

***D. radiodurans* preživljava i efikasno popravlja cijepanje kromosma izazvano zračenjem**

**ionizacijsko zračenje
(7000 Gy)**

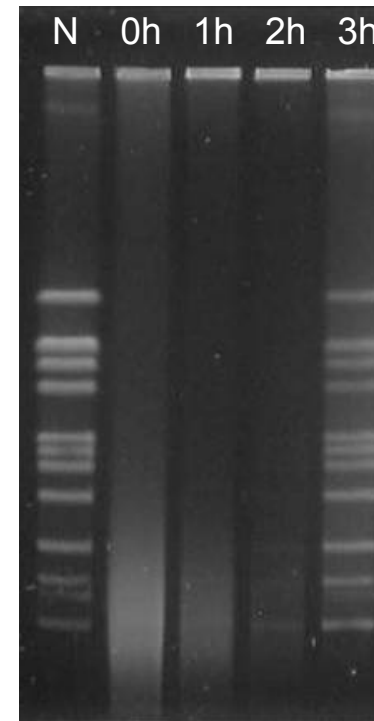


**kromosomi pocijepani u stotine
fragmenata**

(~200 dl lomova po genomu)



**brza i efikasna rekonstitucija
kromosoma
(za 3 sata)**



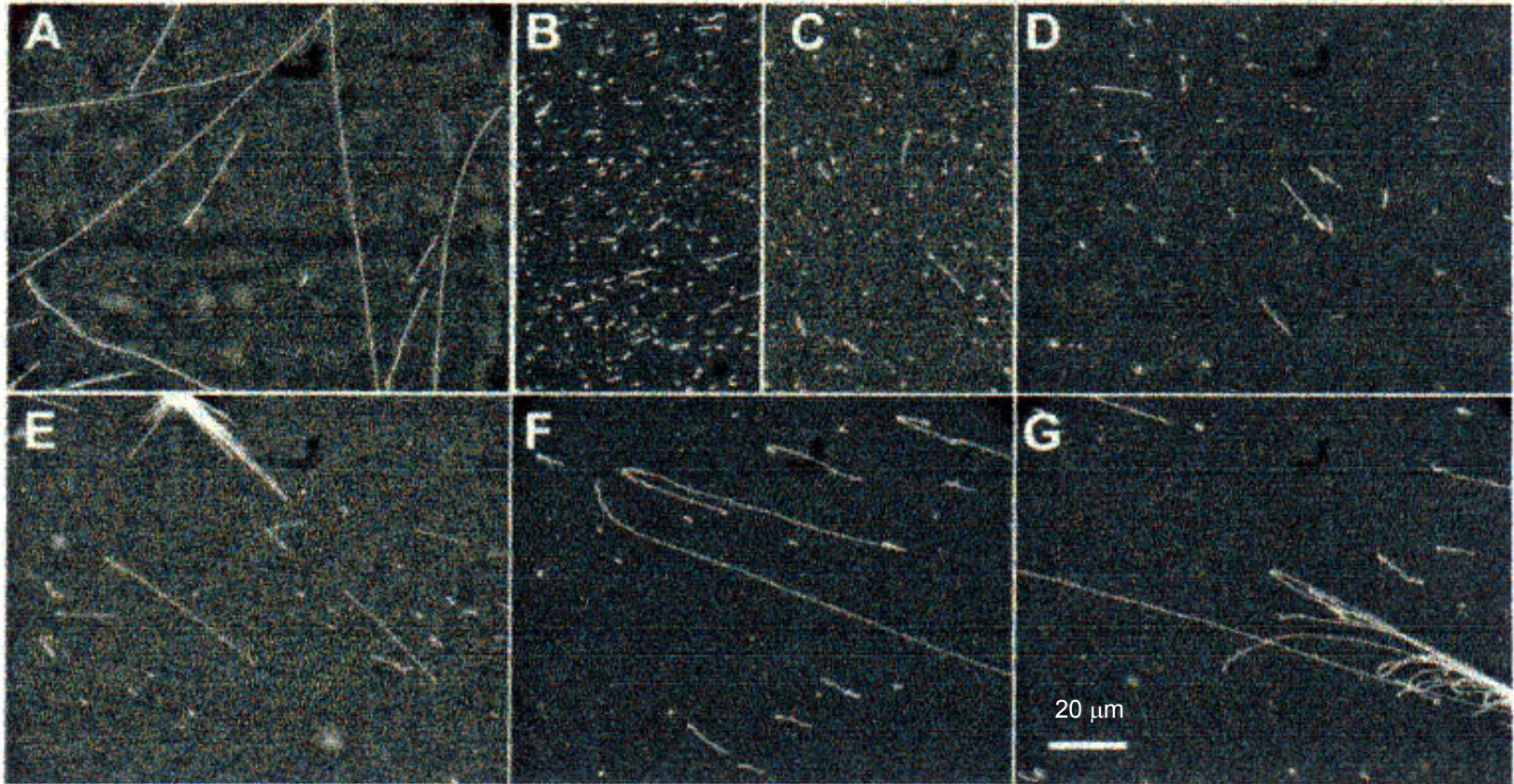
Popravak DNA bakterije *D. radiodurans* nakon 7 kGy gama-zračenja praćen metodom PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). DNA bakterije *D. radiodurans* razgrađena enzimom NotI prije zračenja (N) i u vremenskim intervalima nakon ozračivanja (0 – 3 sata).

Popravak DNA bakterije *D. radiodurans* vizualiziran fluorescencijskom mikroskopijom

neozračeno:
0 h

ozračeno (17 kGy):
0 h 2 h

4 h



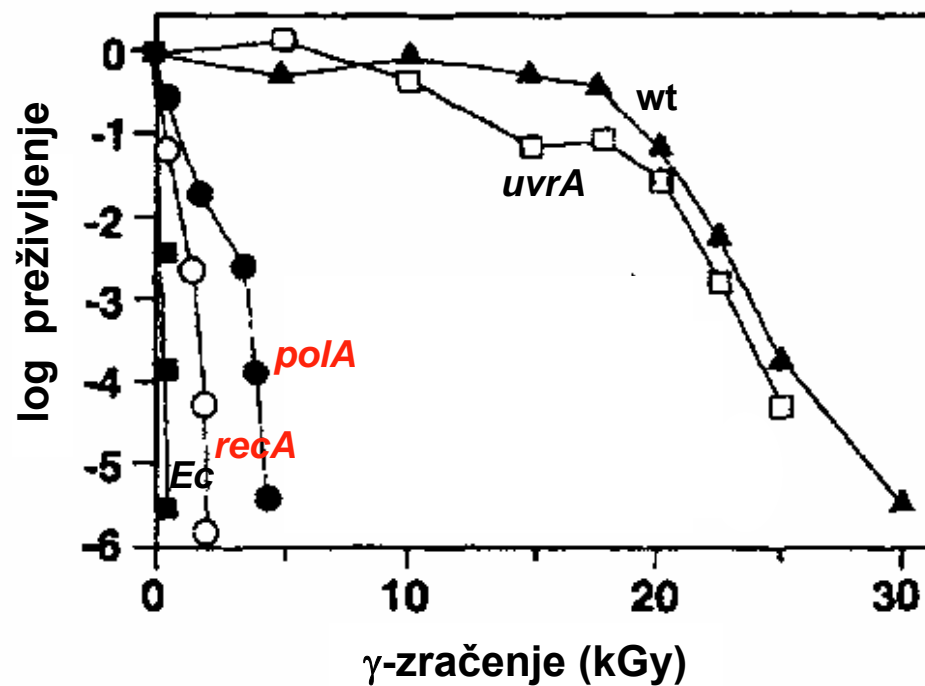
ozračeno: 6 h

16 h

24 h

D. radiodurans: popravak DNA

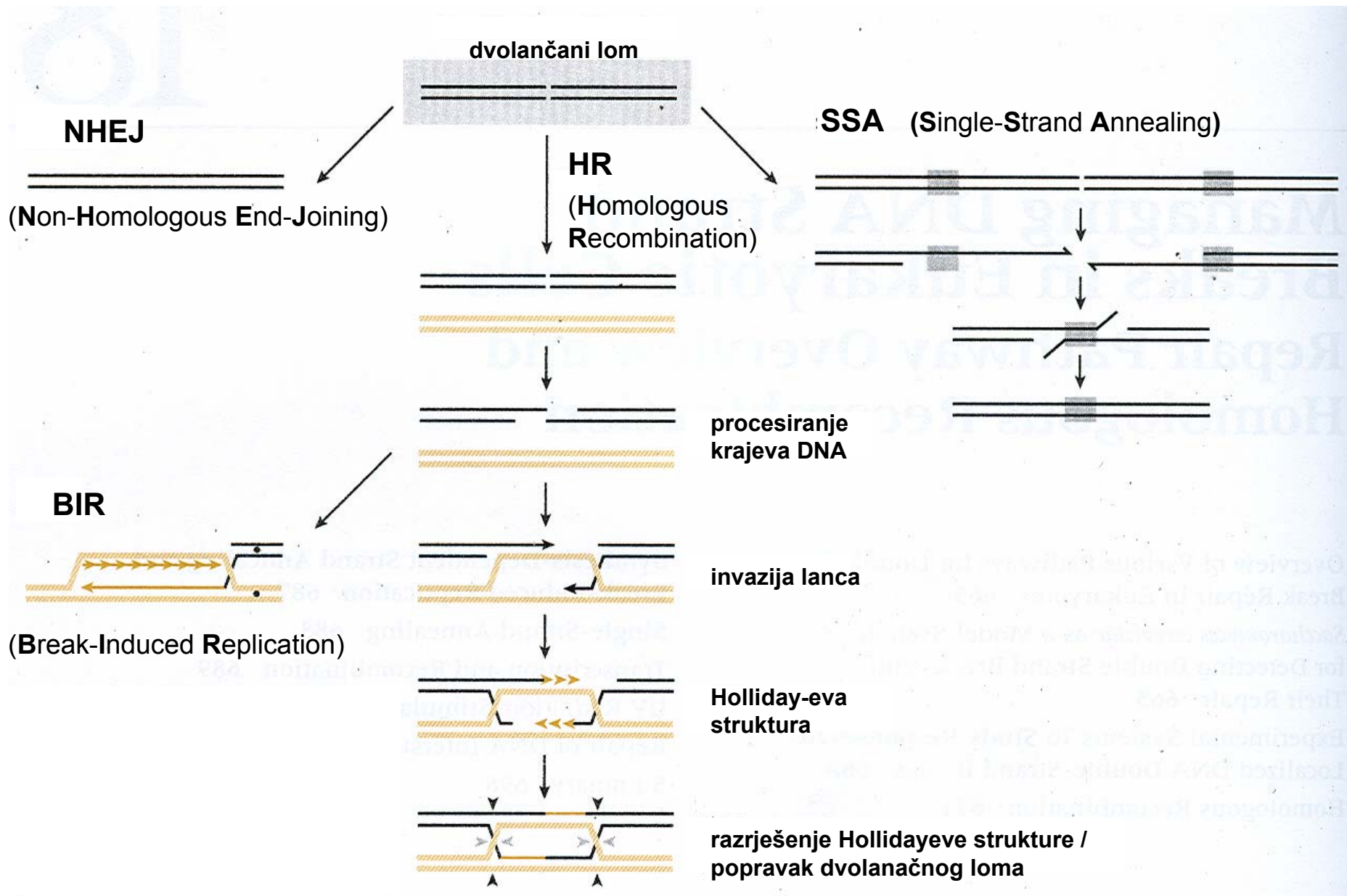
- mutanti u genima *recA* i *polA* osjetljivi na γ -zračenje !



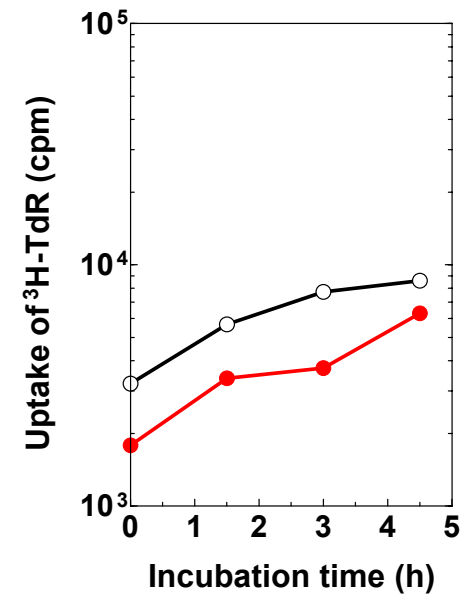
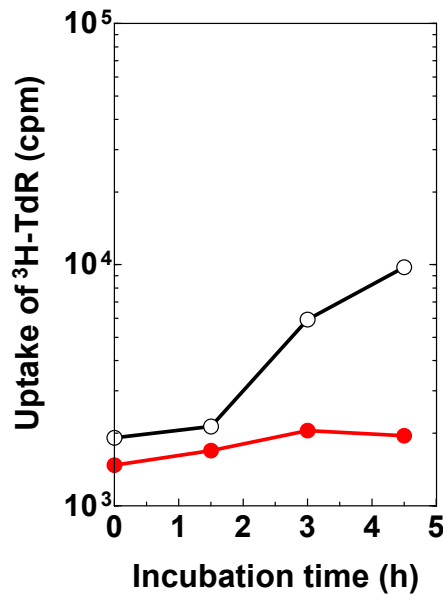
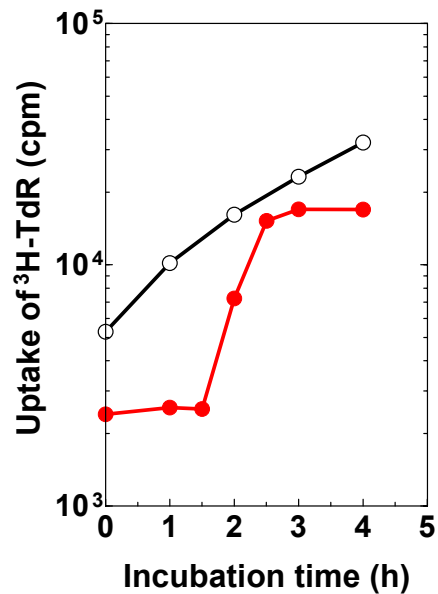
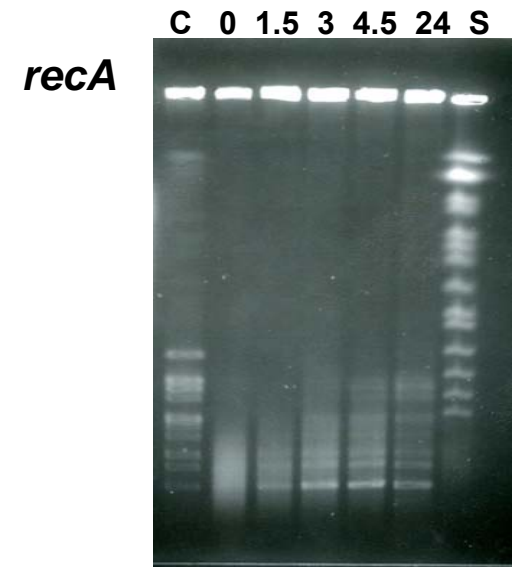
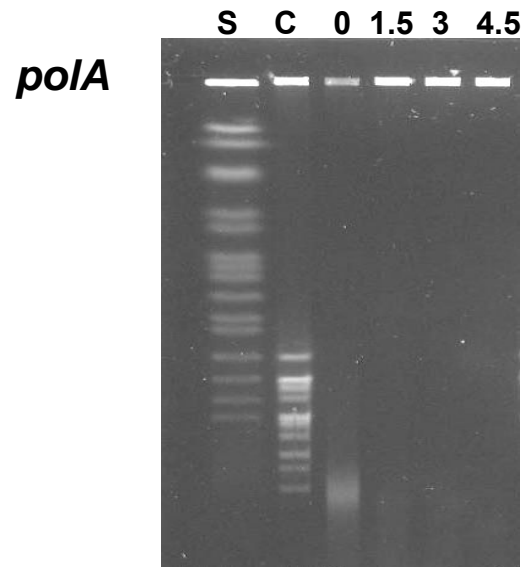
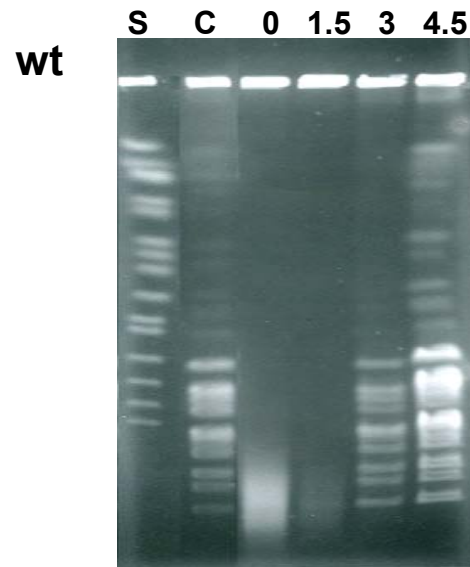
→ produkti gena *recA* i *polA* (tj. **RecA protein** i **DNA polimeraza I**) sudjeluju u popravku dvolančanih lomova DNA nakon γ -zračenja

→ mehanizam popravka: ?

Mogući mehanizmi popravka DNA nakon γ -zračenja



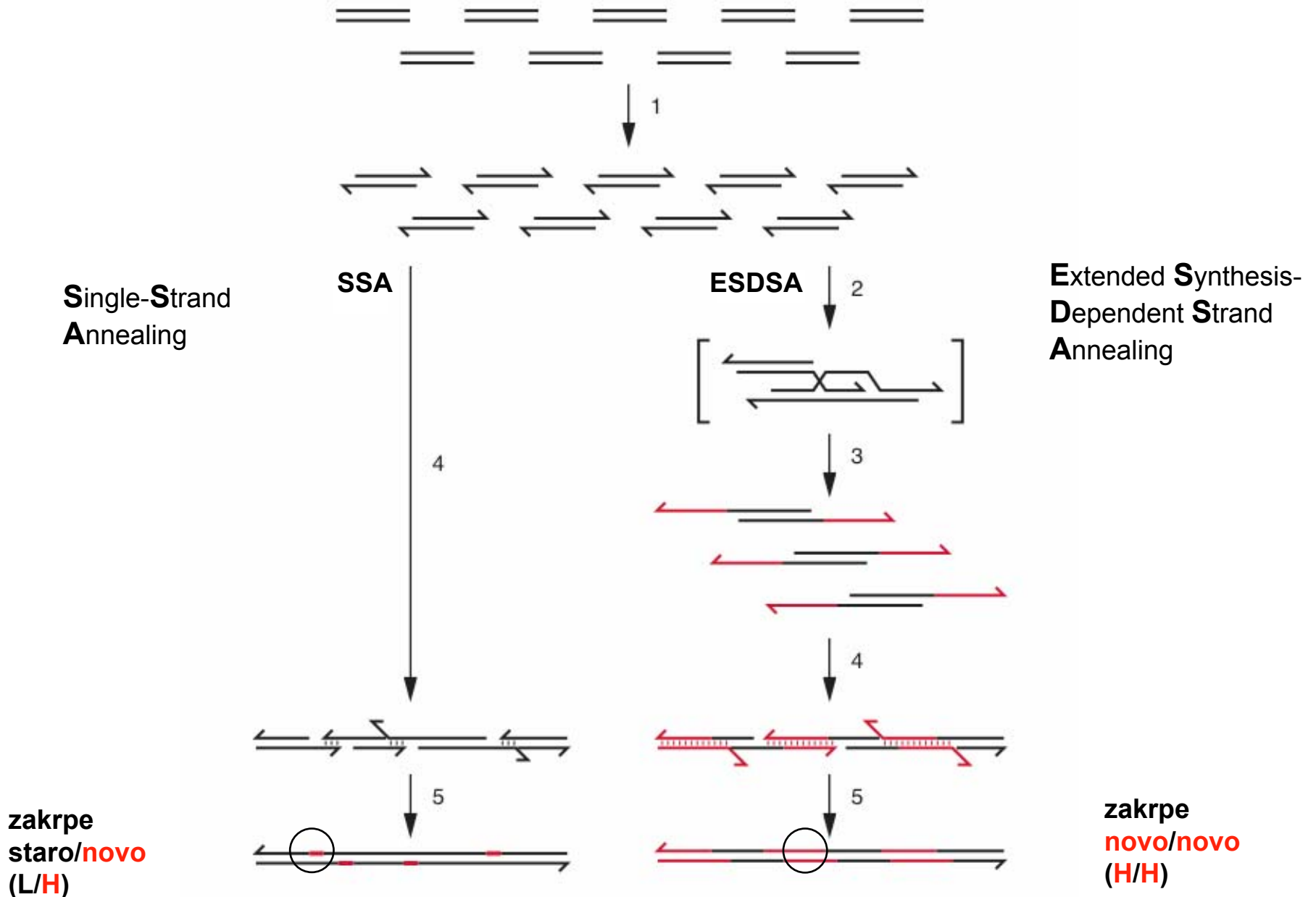
Kinetika popravka DNA i sinteze DNA nakon γ -zračenja



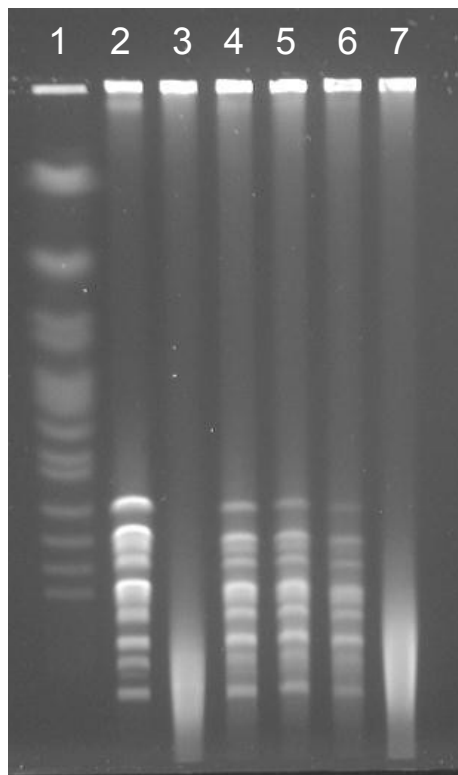
Kinetika popravka DNA i sinteze DNA nakon γ -zračenja

- Nakon izlaganja γ -zračenju (7 kGy), *D. radiodurans* u potpunosti rekonstituirala svoj genom u roku od 3 sata.
- Popravak DNA nakon zračenja praćen je **opsežnom sintezom DNA** koja je ovisna o **DNA polimerazi I**.
- Za rekonstrukciju cjelovitog kromosoma potreban je funkcionalni **RecA protein**.

Mehanizam popravka *DR* DNA nakon γ -zračenja: SSA vs ESDSA



Otkrivanje strukture repariranih *D. radiodurans* kromosoma pomoću UV fotolize BrdU-DNA

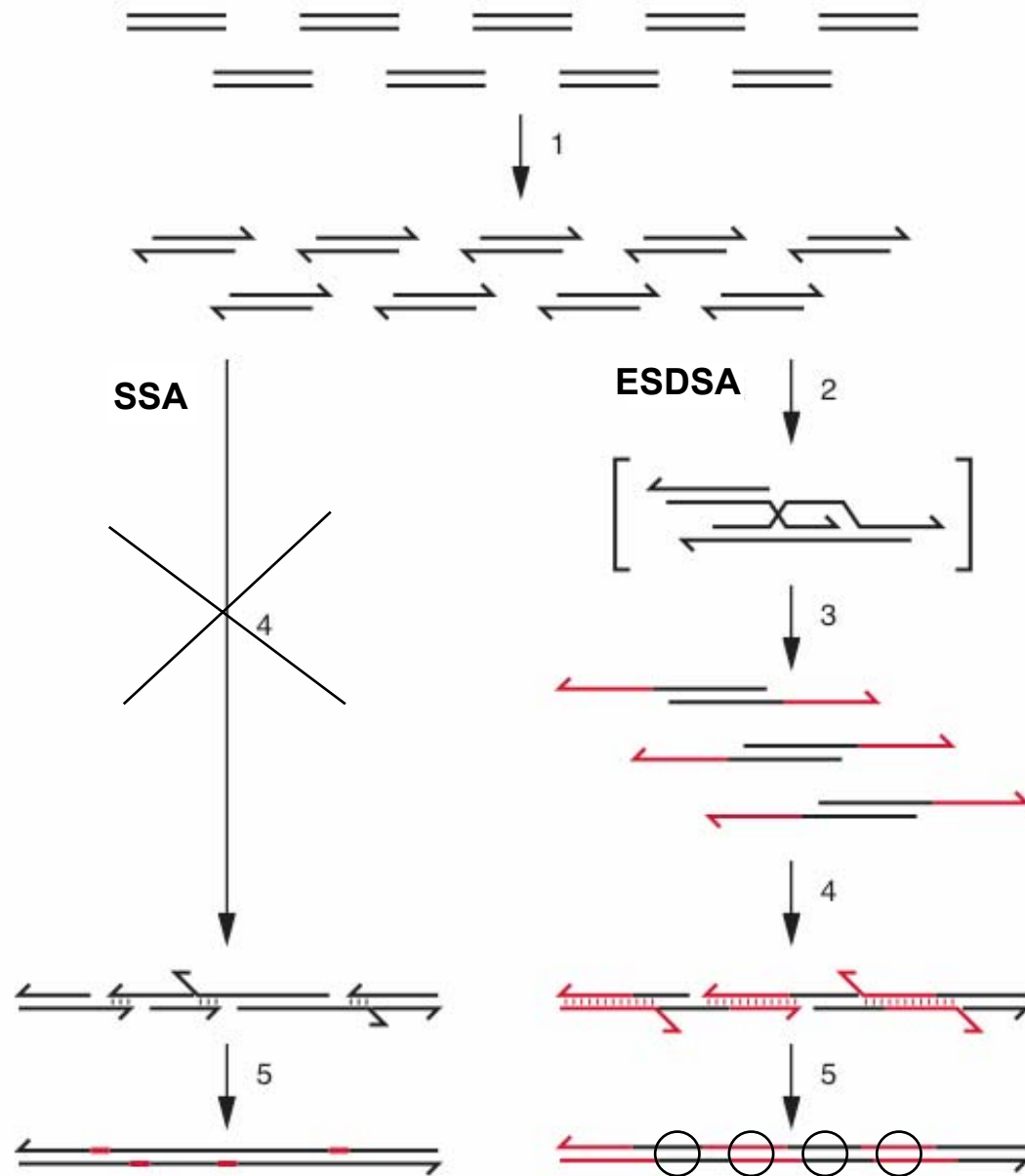


- 1: *S. cerevisiae* standard (225 – 2200 kbp)
- 2 - 7: *D. radiodurans* *thy* DNA
- 2: neozračeno
- 3: ozračeno (7 kGy)
- 4: 3 h nakon zračenja
- 5: 3 h nakon zračenja + UV (1000 J/m²)
- 6: 3 h nakon zračenja + BrdU
- 7: 3 h nakon zračenja + BrdU + UV (1000 J/m²)

→ UV fotoliza izaziva dvolančane lomove u BrdU-DNA

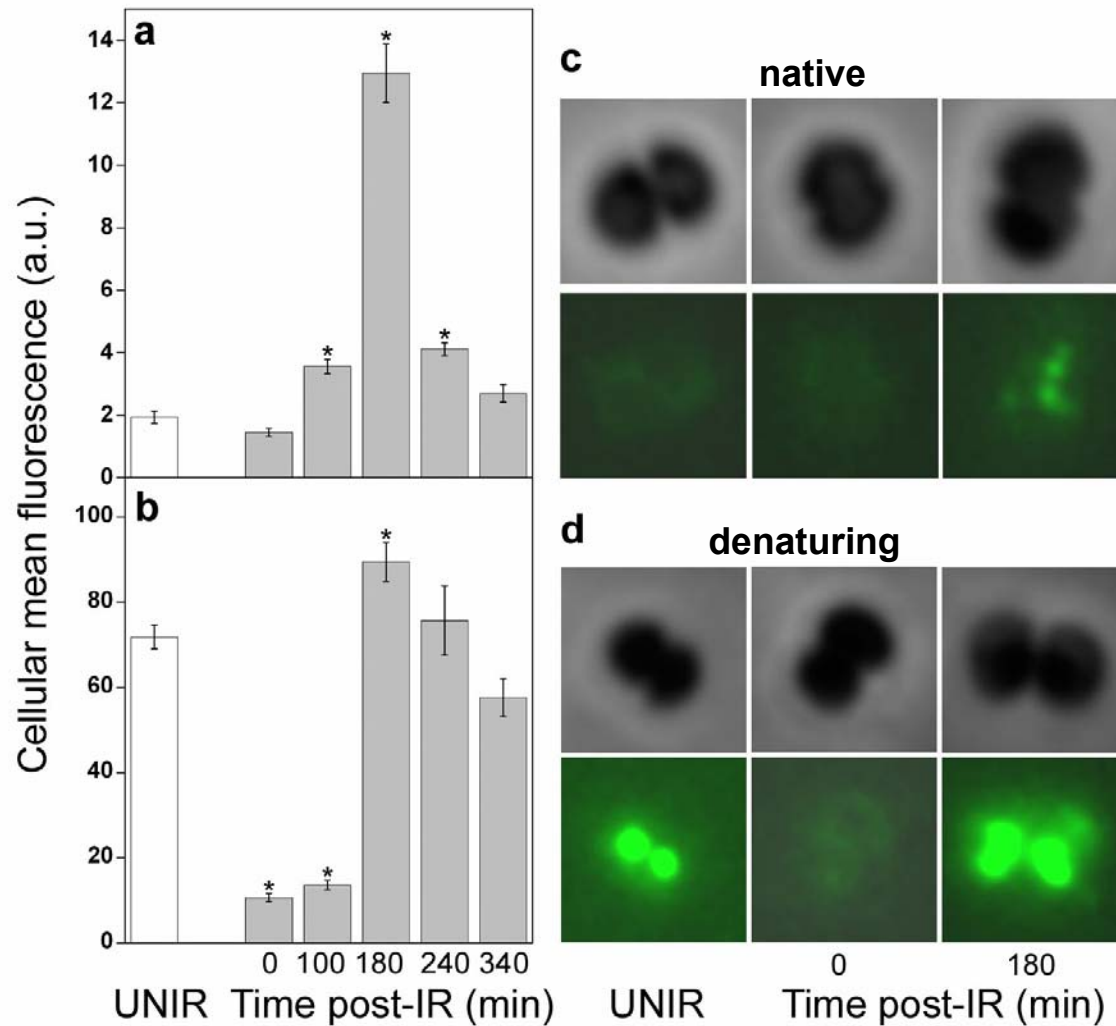
→ reparirana DNA sadrži **dvolančane blokove novosintetizirane DNA !**

Mehanizam popravka *DR* DNA nakon γ -zračenja: ESDSA



Popravljeni kromosomi su
mozaik starih (sintetiziranih
prije zračenja) i **novih**
(sintetiziranih nakon zračenja)
dvolančanih DNA blokova !

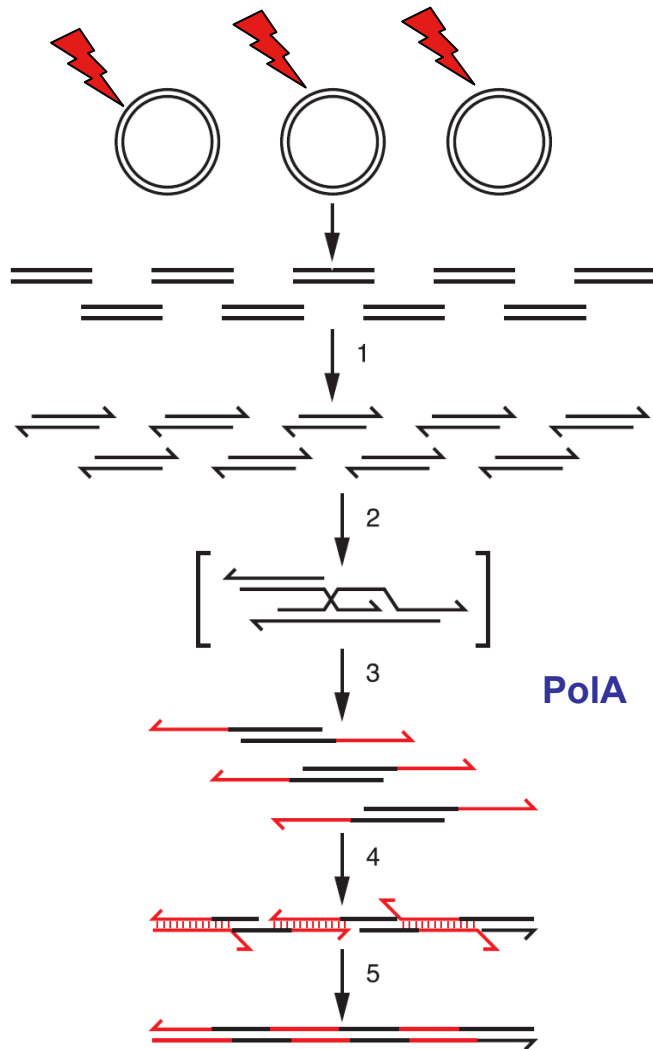
Masivna **sin**teza jednolančane DNA tijekom popravka *DR* kromosoma
detektirana imunofluorescencijskom mikroskopijom



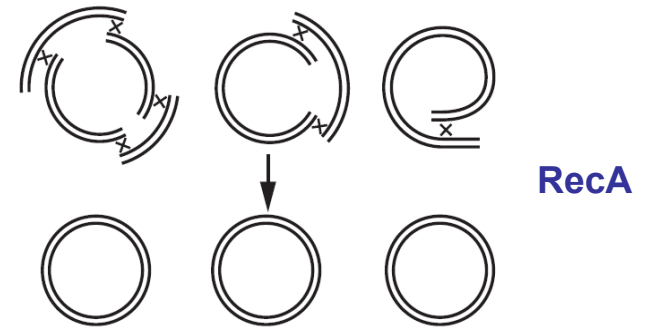
***D. radiodurans*: dvostupanjski mehanizam popravka DNA**

1. ESDSA

(extended synthesis-dependent strand annealing)



2. HR (homologous recombination)



"Ključ" radiorezistencije

Pasivni mehanizmi

- **multipli genom** (veća meta, veća rezerva genetičkog materijala)
- **organizacija nukleoida** (prstenasti, kondenzirani nukleoidi tzv. DNA toroidi)
- **karotenoidi, Mn (II)** – "čistači" slobodnih radikala, štite makromolekule od zračenja
- **regulacija staničnog ciklusa** "DNA-damage checkpoints" ?

Aktivni (enzimatski) mehanizmi

- **ekscizijski popravak nukleotida (NER) i ekscizijski popravak baza (BER)** – više enzimskih aktivnosti
- **rekombinacijski popravak DNA: ESDSA (PolA) + homologna rekombinacija (RecA)**

D. radiodurans : Život u ekstremnim uvjetima

**Institut Ruđer Bošković,
Zagreb, HR**

Davor Zahradka
Jelena Repar

Ksenija Zahradka
Svjetlana Cvjetan

**Faculté de Médecine Necker,
Paris, FR**

Dea Slade
Ariel Lindner

Miroslav Radman
Anita Kriško

**Mediterranean Institute for Life
Sciences (MedILS), Split, HR**

Bojan Žagrović
Ivo Sbalzarini