

## ANALISIS FILOGENETIK SUBUNIT ALFA DNA POLIMERASE III DAN ERROR-PRONE DNA POLIMERASE DARI GENUS *RHODOBACTER*

Edwin Thomas Apituley<sup>1\*)</sup>, Amos Killay<sup>2)</sup>

<sup>1\*,2)</sup> Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas pattimura, Ambon.

<sup>1\*)</sup> Corresponding Author e-mail: [edwin.apituley.mail@gmail.com](mailto:edwin.apituley.mail@gmail.com)

Informasi	Abstrak.
<b>Kata kunci:</b> DNA polimerase , Error –prone DNA polymerase, filogeni, <i>Rhodobacter</i>	Sekuens nukleotida dari gen <i>dnaE</i> yang mengkodekan subunit alfa dari DNA polimerase III maupun sekuen asam amino produknya dari genus <i>Rhodobacter</i> dan beberapa genus yang berhubungan dianalisis untuk menentukan hubungan evolusioner mereka. Metode Maximum Likelihood dan model Kimura 2 parameter masing-masing untuk mengkonstruksi pohon filogenetik dan mengukur jarak genetik. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida dari gen yang mengkodekan subunit alfa dari DNA polimerase III dibandingkan terhadap pohon filogenetik berdasarkan sekuen gen <i>16S</i> rRNA, Genus <i>Rhodobacter</i> maupun genus lain yang diuji memiliki 2 jenis <i>dnaE</i> , diberi nama <i>dnaE1</i> dan <i>dnaE2</i> . Perbandingan pasangan sekuen menunjukkan bahwa persentase keidentikan sekuen antara kedua jenis gen dibawah 50 persen untuk sekuen nukleotida dan 25 persen untuk sekuen asam amino. Satu anggota genus <i>Rhodobacter</i> , <i>R.sedimicola</i> JA983 memiliki tiga salinan gen <i>dnaE</i> dengan rentang keidentikan 40 persen hingga 54 persen untuk sekuen nukleotida dan 22.6 hingga 50.6 persen untuk sekuen asam amino. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida <i>dnaE</i> memiliki dua percabangan utama, masing-masing mewakili <i>dnaE1</i> dan <i>dnaE2</i> . Topologi dari pohon filogenetik berdasarkan gen <i>dnaE</i> memiliki kemiripan terhadap pohon filogenetik berdasarkan sekuen gen <i>16S</i> rRNA, terutama untuk percabangan <i>dnaE1</i> . <i>R.sedimicola</i> memiliki satu salinan gen pada percabangan <i>dnaE1</i> dan dua salinan gen pada percabangan <i>dnaE2</i> , pada pohon filogenetik berdasarkan sekeun gen <i>dnaE</i> , dan dianotasi sebagai <i>dnaE2.1</i> dan <i>dnaE2.2</i> .
Information	Abstract.
<b>Key words:</b> DNA polymerase , Error –prone DNA polymerase, phylogeny, <i>Rhodobacter</i>	Nucleotide sequences of <i>dnaE</i> gene encoding subunit alpha of DNA polymerase III as well as amino acid sequence of their products from genus <i>Rhodobacter</i> and some related genus were analyzed to determine their evolutionary relationship. Maximum Likelihood method and Kimura 2 Parameter model were each used to construct phylogenetic tree and measure genetics distance. The phylogenetic tree based on nucleotide sequences of gene encoding subunit alpha of DNA polymerase III was compared to phylogenetic tree based on <i>16S</i> rRNA gene sequence. Genus <i>Rhodobacter</i> as well as other genus examined had two types of <i>dnaE</i> gene, namely <i>dnaE1</i> and <i>dnaE2</i> . Pairwise sequence comparison showed that percentage of sequence identity between these two types of genes were below 50 percent for nucleotide sequence and 25 percent for amino acid sequence. One member Genus <i>Rhodobacter</i> , <i>R.sedimicola</i> JA983 had three copies of <i>dnaE</i> gene with percentage of identity among them were 40 to 54 percent for nucleotide sequence and 22.6 to 50.6 percent for amino acid sequence. The phylogenetic tree based on nucleotide sequence of <i>dnaE</i> gene have two main branch, each represent <i>dnaE1</i> cluster and <i>dnaE2</i> cluster. The topology of phylogenetic tree based on <i>dnaE</i> showed similarity to phylogenetic tree based on <i>16S</i> rRNA gene, especially for branch of <i>dnaE1</i> . <i>R.sedimicola</i> had one copy of <i>dnaE</i> on <i>dnaE1</i> branch and two copy of <i>dnaE</i> on the <i>dnaE2</i> branch in phylogenetic tree based on nucleotide sequence of <i>dnaE</i> gene, which annotated here as <i>dnaE2.1</i> and <i>dnaE2.2</i> .

Received: 20 April 2022

Accepted: 14 Mei 2022

©2022 Jurusan Biologi FMIPA Unpatti, IAIFI Cab. Ambon

## A. PENDAHULUAN

DNA polimerase adalah suatu kompleks enzim yang berperan pada sejumlah proses yang berlangsung didalam sel, termasuk didalamnya replikasi DNA, perbaikan, pencegahan dan perbaikan kesalahan dengan ketepatan proses-proses ini adalah sumber utama variasi sekuen DNA (McHenry, C.S, 2011; Zhao *et. al.*, 2006). Polimerase, sebuah sliding clamp dan camp loader adalah tiga komponen yang dibutuhkan untuk sel untuk mereplikasikan kromosomnya (Kornberg dan Baker, 1992). Enzim polimerase yang bertanggung jawab replikasi DNA bakteri adalah DNA polimerase III (O'Donnell *et. al.*, 2013) yang terdiri dari tiga subunit, salah satunya adalah subunit alfa yang bertanggung jawab untuk aktifitas katalitik dari enzim (Beattie and Reyes-Lamothe, 2015). Pada *Escherichia coli*, subunit alfa adalah produk dari gen *dnaE* (Fijalkowska *et.al.*, 2012), sedangkan beberapa bakteri memiliki dua jenis gen *dnaE*, yaitu *dnaE1* dan *dnaE2*, yang mengkodekan produk DnaE1 dan DnaE2. *Pseudomonas aeruginosa* memiliki DnaE1 yang berfungsi untuk pemanjangan primer RNA dan pemrosesan replikasi kromosom secara cepat, Dna2 merupakan error-prone DNA polymerase yang memiliki fungsi dalam replikasi rawan kesalahan dan induksi mutagenesis (McHenry, C.S, 2011). Error-prone DNA polymerase atau DNA polimerase rawan kesalahan adalah produk dari gen *dnaE2* dan bertindak sebagai penyeimbang yang memastikan laju mutasi rendah pada genom *Myxococcus xanthus* pada sel yang beradaptasi pada lingkungan baru (Peng *et.al.*, 2017) dan sebagai mediator utama untuk *Mycobacterium tuberculosis* bertahan melalui mutagenesis yang terinduksi (Boshoff *et.al.*, 2003). *Rhodobacter* adalah suatu genus bakteri yang secara taxonomi berada pada kelas *Alphaproteobacteria* dan memiliki kemampuan untuk melakukan fotosintesis secara anoksigenik dan hidup pada lingkungan yang bervariasi (Hördt *et.al.*, 2020; Imhoff *et.al.*, 1984., Imhoff, 2017). Anggota genus *Rhodobacter* juga memiliki kemampuan metabolisme yang lain seperti respirasi aerob, anaerob, dan fermentasi untuk menghasilkan ATP, kemampuan untuk beradaptasi terhadap lingkungannya (Licht *et al.*, 2020). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis filogeni subunit alfa DNA polimerase III dan error-prone DNA polymerase dari genus *Rhodobacter* berdasarkan sekuen gen dan asam amino.

## B. METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari hingga Mei 2022 pada laboratorium jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pattimura, Ambon.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan berupa perangkat komputer untuk mengumpulkan dan mengolah data. Bahan yang digunakan berupa sekuen nukleotida dan asam amino yang diperoleh dari National Center for Biotechnology Information (NCBI) Data Bank, United State of America (Sayers *et.al.*, 2021). Sumber sekuen ini adalah were *Rhodobacter aestuarii* DSM19945, *Rhodobacter maris* JA276, *Rhodobacter capsulatus* SB1002, *Rhodobacter viridis* JA737, *Rhodobacter xinxiangensis* TJ48, *Rhodobacter sp.*LPB0142, *Rhodobacter sedimicola* JA983, *Rhodobacter flagellatus* SYSU, *Rhodobacter thermarum* YIM73036, *Luteovulum sphaeroides*

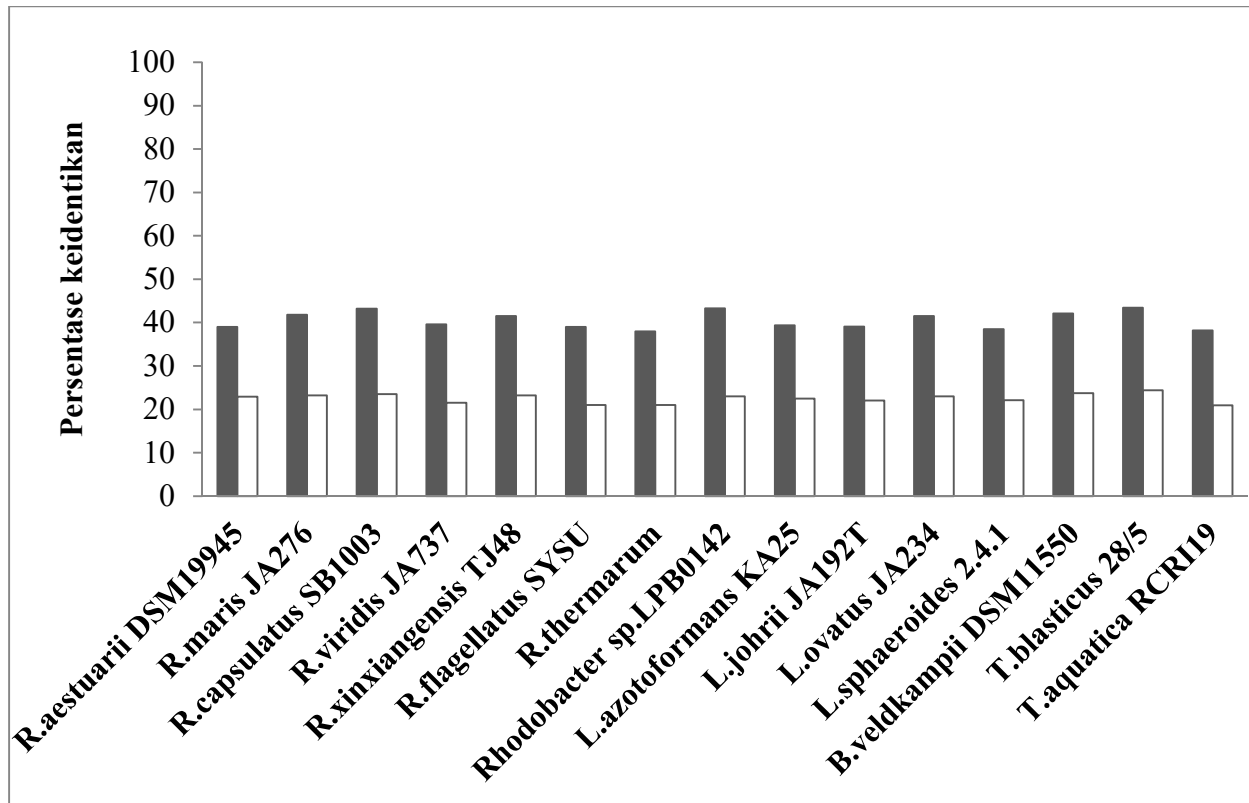
2.4.1, *Luteovulum azotoformans* Ka25, *Luteovulum ovatus*, JA234 *Bieblia veldkampii* DSM11550, *Tabrizicola aquatica* RCRI19 and *Tabrizicola blasticus* 28/5.

### Analisis Data

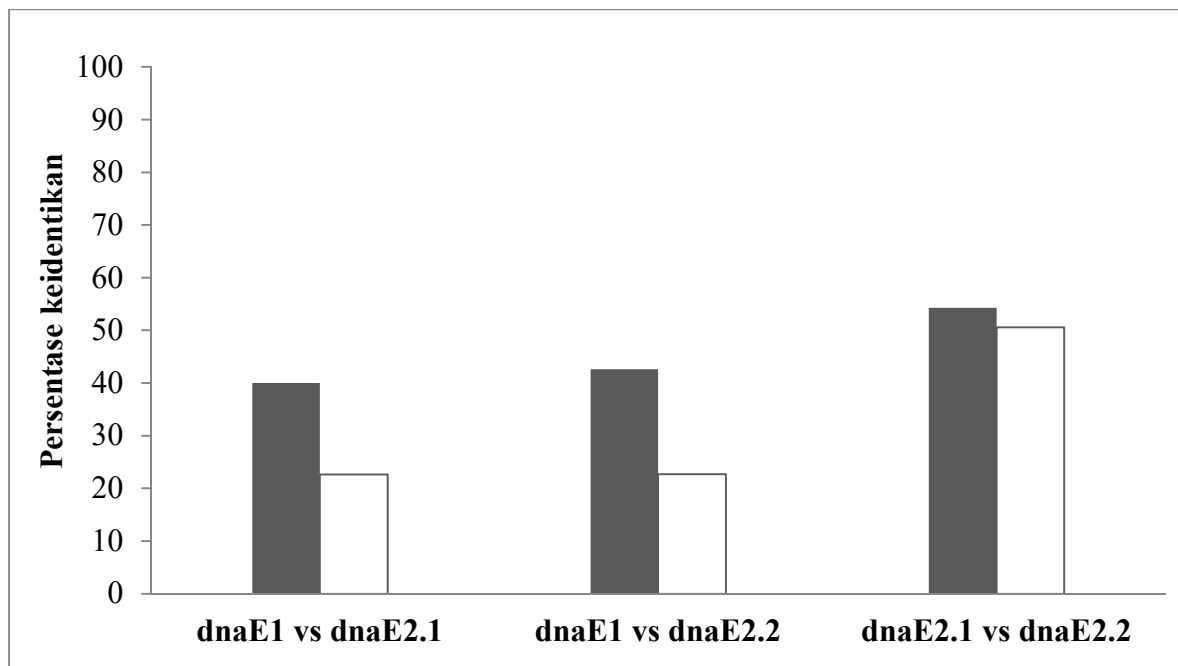
Data hasil penelitian ini dianalisis dengan metode analisis filogenetik, yang dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA X (Kumar *et.al.*, 2018), dengan metode Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981) dan model Kimura 2 Parameter (Kimura, 1980). Penjajaran multi sekuen diperoleh menggunakan Clustal-W (Thompson *et.al.*, 1994). Analisis bootstrap dilakukan dengan melakukan 1000 uji bootstrapped untuk mengevaluasi topologi dari pohon filogenetik. Persentase keidentikan antar sekuen dihitung sebagai persentase jumlah nukleotida atau asam amino yang identik pada suatu sekuen relatif terhadap jumlah total nukleotida atau asam amino. Conserved Protein Domain Family pada NCBI digunakan untuk memvalidasi setiap salinan gen *dnaE* dari *R.sediminicola* (Lu *et.al.*, 2020).

### C. HASIL DAN PEMBAHASAN

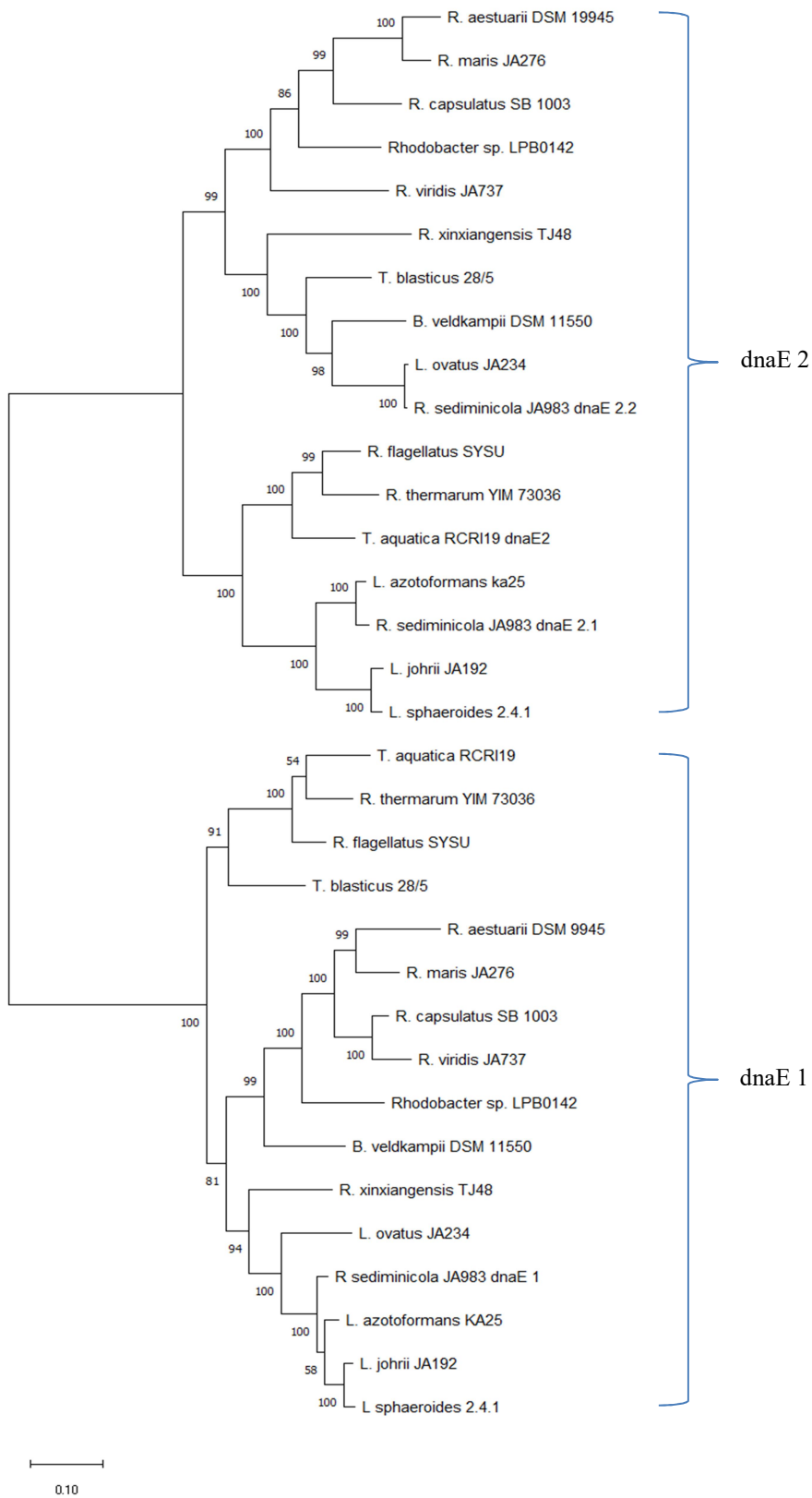
Sembilan strain dari genus *Rhodobacter* dan tujuh strain dari genus yang berhubungan, dan sebelumnya dimasukkan dalam genus *Rhodobacter* (Hördt *et.al.*, 2020), dianalisis pada penelitian ini. Semua strain yang diuji dalam penelitian ini memiliki dua jenis gen *dnaE*, jenis pertama menyandikan subunit alfa dari DNA polimerase III dan dianotasi sebagai *dnaE1*, jenis yang kedua menyandikan polimerase rawan kesalahan dan dianotasi sebagai *dnaE2*. *Rhodobacter sediminicola* merupakan satu-satunya strain yang memiliki satu salinan *dnaE1* dan dua salinan *dnaE2*, yaitu *dnaE2.1* dan *dnaE2.2*. Conserved Protein Domain Family pada NCBI digunakan untuk memvalidasi satu salinan *dnaE* dari *R.sediminicola* JA983 sebagai subunit alfa dari DNA polimerase III (*dnaE1*) dan dua salinan yang lain sebagai DNA polimerase rawan kesalahan (*dnaE2.1* dan *dnaE2.2*). Persentase keidentikan sekuen nukleotida antara *dnaE1* dan *dnaE2* untuk semua strain yang diuji berada dibawah 50 persen, sedangkan persentase keidentikan sekuen asam amino antara produk *dnaE1* dan *dnaE2* berada dibawah 25 persen (Gambar 1). Persentase keidentikan sekuen nukleotida pada ketiga gen *dnaE* pada *R.sediminicola* JA983 juga berada dibawah 50 persen, kecuali antara *dnaE2.1* dan *dnaE2.2* yaitu 54.3 persen (Gambar 2). Ketiga gen *dnaE* pada *R.sediminicola* JA983 menyandikan sekuen asam amino dengan persentase keidentikan diantara mereka berada dibawah 25 persen kecuali 50.6 persen antara *dnaE2.1* dengan *dnaE2.2*. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen *dnaE* menunjukkan terdapat dua percabangan utama pada pohon (Gambar 3).



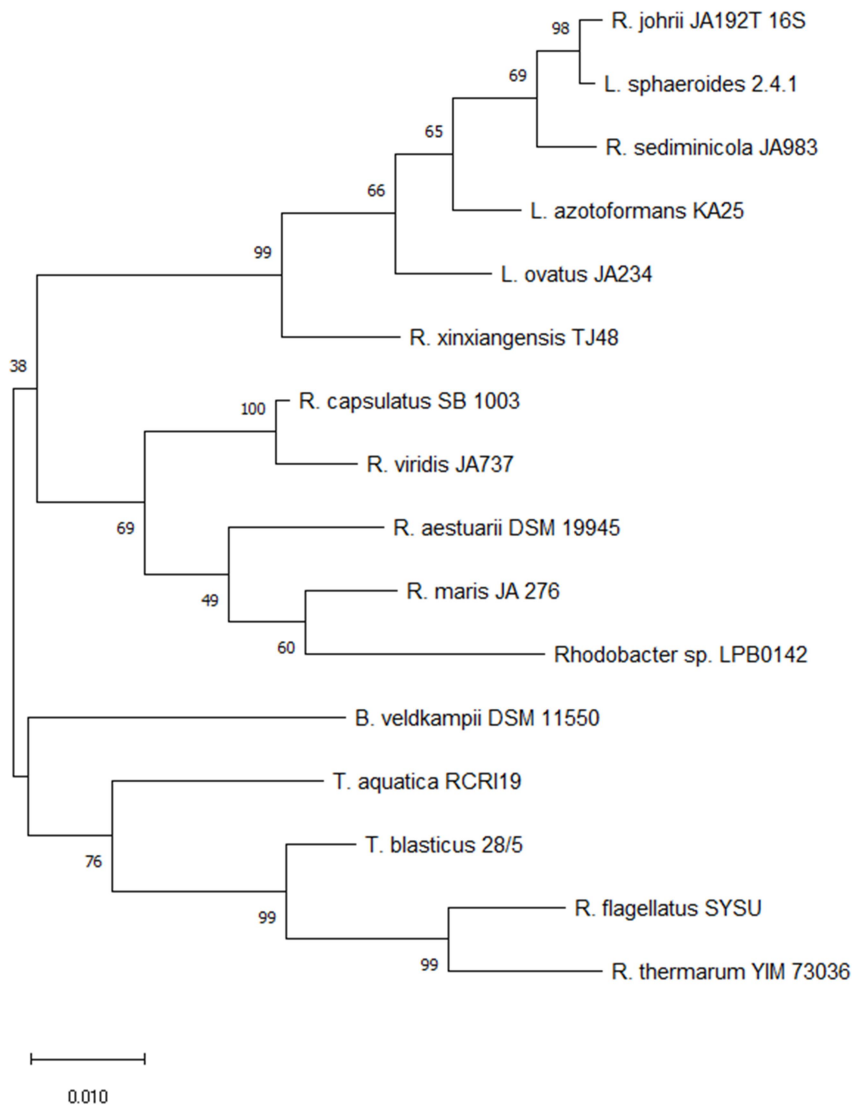
Gambar 1. Persentase keidentikan sekuen nukleotida (kotak terisi) dan asam amino (kotak terbuka) antara gen *dnaE1* dan *dnaE2*, dan produk proteinnya.



Gambar 2. Persentase keidentikan sekuen nukleotida (kotak terisi) dan asam amino (kotak terbuka) antara gen *dnaE1*, *dnaE2.1* dan *dnaE2.2* dari *R.sediminicola* JA983 dan asam amino proteinnya.



Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan analisis sekuen gen *dnaE*. Jarak genetik diindikasikan oleh skala.



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasarkan pada analisis sekuen gen *16S* rRNA. Jarak genetik diindikasikan oleh skala.

Percabangan pertama mewakili kelompok gen *dnaE1* dan jika dibandingkan terhadap pohon filogenetik berdasarkan sekuen gen *16S* rRNA (Gambar 4), keduanya memiliki kemiripan topologi. Percabangan kedua mewakili kelompok gen *dnaE2* dan memiliki perbedaan topologi jika dibandingkan terhadap topologi percabangan yang pertama. Terdapat sub kelompok pada percabangan *dnaE2* yang terdiri dari strain yang berasal dari genus yang berbeda seperti *Rhodobacter sediminicola* JA983, *Luteovulum ovatus* JA234, *Bieblia veldkampii* DSM11550, *Tabrizicola blasticus* 28/5 dan *Rhodobacter xinxiangensis* TJ48.

Bakteri dari genus *Rhodobacter* memiliki 2 produk dari gen *dnaE*, dinamai pada NCBI sebagai subunit alfa DNA polimerase III, produk dari gen *dnaE1* dan DNA polimerase rawan kesalahan, produk dari gen *dnaE2*, Persentase keidentikan antara gen *dnaE1* dan *dnaE2* atau produk protein dari kedua gen tersebut diantara strain dari genus *Rhodobacter* bersifat rendah, yaitu dibawah 50 persen pada tingkatan sekuen nukleotida dan dibawah 25 persen untuk sekuen asam amino. Persentase keidentikan antara gen *dnaE1* dan *dnaE2* dan produknya, terutama untuk sekuen asam amino bersifat rendah dibandingkan mikroba lain misalnya 30 persen untuk *Myxococcus xanthus* (Peng *et.al.*, 2017) dan 28 persen untuk *Mycobacterium tuberculosis* (Le Chatelier *et.al.*, 2004).

Produk dari gen *dnaE2* merupakan suatu homologi dari subunit alfa enzim DNA polimerase III dari bakteri gram negatif (Boshoff *et.al.*, 2003). Mengikuti model klasik dari pembentukan gen baru oleh Ohno (Ohno, 1970), *dnaE2* mungkin berasal dari duplikasi nenek moyang bersama dari gen *dnaE* diikuti oleh proses divergensi. Gen terduplikasi mungkin kemudian mengalami modifikasi yang menuju pada diperolehnya suatu peranan baru. Mekanisme dari divergensi fungsional pada enzim memberikan kontribusi terhadap diversitas fungsi dari mikroba (Serres *et.al.*, 2009).

Pohon filogenetik dikonstruksi dengan menggunakan metode maximum likelihood untuk sembilan strain dari genus *Rhodobacter* dan tujuh strain uji lain dari genus yang berbeda. Pohon filogenetik ini menunjukkan bahwa gen *dnaE1* yang mengkodekan subunit alfa dari DNA polimerase III membentuk suatu kelompok utama yang terpisah dari kelompok utama yang lain, yang dibentuk oleh gen-gen *dnaE2* yang mengkodekan error-prone DNA polimerase atau DNA polimerase rawan kesalahan. Topologi pohon menunjukkan kemiripan terhadap topologi pohon filogenetik berdasarkan sekuen gen 16S rRNA, terutama kelompok utama yang dibentuk oleh gen-gen *dnaE1*. Sekuen dari gen 16S rRNA sangat terkonservasi diantara bakteri dan kingdom yang lain, terdistribusi secara universal dan konstan secara fungsional, sehingga dapat digunakan untuk menduga hubungan evolusioner di antara organisme (Woese, 1987; Woese *et.al.*, 1990). Genus *Rhodobacter* nampak bersifat non monofiletik pada pohon yang berdasarkan gen 16S rRNA (Hördt *et.al.*, 2020), hal ini juga ditemukan pada penelitian ini untuk pohon filogenetik yang didasarkan gen *dnaE*, karena kelompok taxonomi yang dibentuk oleh gen *dnaE* pada strain dari *Rhodobacter* berbagi nenek moyang bersama dengan grup taxonomi yang lain.

*Rhodobacter sediminicola* JA983 memiliki dua salinan *dnaE2* yang dianotasikan sebagai *dnaE2.1* dan *dnaE2.2*, masing-masing ditempatkan pada dua sub kelompok terpisah dari kelompok yang dibentuk oleh gen *dnaE2*, yang mengkodekan DNA polimerase rawan kesalahan. Salah satu dari gen ini, yaitu *dnaE2.2* berada pada kelompok yang terdiri dari strain yang berasal dari genus yang berbeda dimana salah satu dari strain ini adalah *Tabrizicola blasticus* 28/5 yang membawa *dnaE2* pada plasmidnya, membuatnya mungkin untuk dipertukarkan dengan bakteri yang lain melalui mekanisme transfer gen secara horisontal. Transfer secara horizontal dapat berlangsung pada bakteri, melalui penyebaran elemen genetik yang mobil, plasmid dan elemen konjugasi integratif (Iranzo *et.al.*, 2016; Koonin, 2016).

## D. KESIMPULAN

Genus *Rhodobacter* memiliki dua jenis gen *dnaE*, yaitu satu salinan *dnaE1* dan *dnaE2*, kecuali pada *Rhodobacter sediminicola* JA983 yang memiliki satu salinan *dnaE1* dan dua salinan *dnaE2*, dengan persentase keidentikan diantara gen-gen *dnaE1* dan *dnaE2* serendah 50 persen pada sekuen nukleotida dan 25 persen pada sekuen asam amino. Berdasarkan analisis filogenetik, hubungan evolusioner untuk gen *dnaE* dari genus *Rhodobacter* memiliki kemiripan dengan hubungan evolusioner pada gen *16S* rRNA yang bersifat non monofiletik.

## E. DAFTAR PUSTAKA

- Beattie T.R, and R.A Reyes-Lamothe. 2015. Replisome's journey through the bacterial chromosome. *Front. Microbiol.* 6(562):55-66.
- Boshoff HIM, Reed MB, Barry CE, and V Mizrahi. 2003. DnaE2 Polymerase Contributes to In Vivo Survival and the Emergence of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 133: 183 – 193.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A Maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol* 1981; 17:368-376.
- Fijalkowska IJ, Schaaper RM, and P Jonezyk. 2012. DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi – DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:1105-1121.
- Hördt A, Lopez MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold LM, Tindall BJ, Gronow S, Kyripides NC, Woyke T, and M Göker. 2020. Analysis Of 1,000 + Type – Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alpha – proteobacteria. *Front. Microbiol.* 468(11):1-112.
- Imhoff JF, Trüper HG, and N Pfennig. 1984. Rearrangement of the species and genera of the phototrophic “purple non sulfur bacteria”. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 34:340-343.
- Imhoff JF. 2017. Diversity of anaerobic anoxygenic phototrophic purple bacteria. In P. C. Hallenbeck (Ed). *Modern topics in the phototrophic prokaryotes*. Springer International Publishing. Switzerland.
- Iranzo J, Puigbó P, Lobkovsky AE, Wolf YI, and EV Koonin. 2016. Inevitability of genetic parasites. *Genome Biol.Evol.* 8:2856 – 2869.
- Koonin, EV. 2016. Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Res.* 5: 1805.
- Kornberg A, and TA Baker. 1992. *DNA Replication*. New York, USA: W.H. Freeman Company.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and K Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 2018; 35:1547-1549.
- Kimura M. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Le Chatelier E, Becherel OJ, d’Alencon E, Canceill D, Ehrlich SD, Fuchs RPP, and L Janniere. 2004. Involvement of DnaE, the Second Replication DNA Polymerase from *Bacillus subtilis*, in DNA Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 279(3):1757-1767.
- Licht MK, Nuss AM, Volk M, Konzer A, Backstette M, Berghoff BA, and G Klug. 2020. Adaptation to photooxidative stress: Common and Special Strategies of the Alphaproteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microorganisms.* 2020; 8(2):283.
- Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales N, Gwadz M, Hurwitz DI, Machler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yang M, Zhang D, Zhang C, Lanczycki CJ, and A Marchler- Bauer. 2020. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acid Res.* 48;265-268.
- McHenry, C.S. 2011. Breaking the rules: bacteria that use several DNA polymerase IIIs. *EMBO reports.* 12(5):408-414.
- O’Donnell M, Langston L, and B Stillman. 2013. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea and Eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a010108.
- Ohno, S. 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Peng R, Chen JH, Feng WW, Zhang Z, Yin J, Li Z.S, and YZ Li. 2017. Error-prone DNA E2 Balances the Genome Mutation Rates in *Myxococcus xanthus* DK1622. *Front. Microbiol.* 12(8):1-10.
- Sayers EW, Beck J, Bolton EE, Bourexis D, Bristes JR, Canese K, Comeau DC, Funk K, Kim S, Klimke W, Marcher-Bauer A, Landrum M, Lathrop S, Lu Z, Madden TL, O’Leary N, Phan L, Rangwala SH, Schneider VA, Skripchenko Y, Wang JY, Ye J, Trawick BW, Pruitt KD and ST Sherry. 2021. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acid research.* 49:10-13.



- Serres MH, Ker ARW, McCormack TJ, and M. Riley. 2009. Evolution by leaps: gene duplication in bacteria. *Biology Direct.* 4:46.
- Thompson JD, Higgins DG, and TJ Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research.* 22:4673-4680.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbial.Rev.*15:221-271.
- Woese CR, Kandler O, and ML Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms proposal for the domain *Archaea, Bacteria* and *Eukarya*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 87:4576-4579.
- Zhao XQ, Hu, JF, and J Yu. 2006. Comparative Analysis of Eubacterial DNA Polymerase III Alpha subunits. *Geno, Prot, Bioinfo.* 4(1):203-211.