Translezijska sinteza DNA polimerazom IV i uloga u replikaciji bakterije Escherichia coli

Grbavac, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:625850

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

TRANSLEZIJSKA SINTEZA DNA POLIMERAZOM IV I ULOGA U REPLIKACIJI BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI*

TRANSLESION SYNTHESIS BY DNA POLYMERASE IV AND ITS ROLE IN THE REPLICATION OF BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

SEMINARSKI RAD

Dora Grbavac

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study of Molecular Biology

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2018.

1. UVOD 1

2. SOS ODGOVOR I TRANSLEZIJSKA SINTEZA 2

2.1 Povijesni pregled

2.2 Indukcija SOS odgovora

2.3. Translezijska sinteza

3. DNA POLIMERAZA IV 4

3.1 Opća svojstva

3.2. Broj molekula DNA polimeraze IV

4. LOKALIZACIJA DNA POLIMERAZE IV TIJEKOM SOS ODGOVORA.....6

5. INTERAKCIJE DNA POL IV I DNA POL III 10

5.1. Mehanizam izmjene DNA Pol IV i DNA Pol III

6. LITERATURA.....14

7. SAŽETAK 16

8. SUMMARY 16

1. UVOD

Stabilnost DNA i točnost replikacije neophodne su za održavanje vrste kroz generacije, stoga su živa bića tijekom evolucije razvila replikacijsku mašineriju koja umanjuje pogreške. Međutim, pogreške tijekom replikacije nisu jedina prijetnja integritetu DNA. Žive stanice konstantno su izložene brojnim agensima koji oštećuju DNA. Mnogi okolišni čimbenici mogu ubrzati kemijske reakcije, tako npr. povišena temperatura dovodi do deaminacije baza, a UV - zračenje do stvaranja pirimidinskih dimera. Brojne kemikalije mogu reagirati s DNA dodajući grupe na baze i šećere, cijepajući veze ili fuzionirajući dijelove molekula. Tako nastalo kemijsko oštećenje DNA naziva se lezijom. Oštećenja DNA mogu biti vrlo opasna jer mogu onemogućiti replikaciju preko oštećenog područja ili izazvati mutacije.

U stanici postoje brojni reparatorni mehanizmi koji brzo pronađu i poprave oštećenu DNA. Međutim, neke lezije ostaju u genomu i blokiraju njegovu duplikaciju. Većina mehanizama popravka ne radi greške tijekom popravka, a u njih spadaju: ekscizijski popravak baza –BER (eng. *base excision repair*), ekscizijski popravak nukleotida – NER (eng. *nucleotide excision repair*) ili rekombinacijski popravak DNA (Friedberg i sur., 2006).

Ako je razina oštećenja toliko velika da mehanizmi koji ne rade pogreške nisu dovoljni da bi izvršili popravak i ponovno pokrenuli zaustavljene replikacijske rašlje, inducira se SOS odgovor (Walker i sur., 1984). Ova faza popravka uključuje sintezu DNA preko lezije, tzv. translezijsku sintezu – TLS (eng. *translesion synthesis*). Proces je posredovan translezijskim polimerazama - TLS Pol. Translezijska sinteza DNA evolucijski je konzervirani mehanizam koji podrazumijeva veliki broj grešaka i često je povezan s povećanim rizikom mutageneze i karcinogeneze (Yeiser i sur., 2002), a TLS polimeraze repliciraju znatno sporije u odnosu na replikativne polimeraze (Tan i sur., 2015).

U bakteriji *Escherichia coli (E. coli)* prisutno je pet različitih DNA polimeraza, nazvane Pol I - V. Pol II, IV i V sudjeluju u TLS (Freidberg i sur., 2006), dok Pol I sudjeluje u popravku DNA i maturaciji Okazakijevih fragmenata (Okazaki i sur., 1971). Iako su regulirane brojnim transkripcijskim i posttranslacijskim kontrolama, TLS polimeraze također imaju pristup neoštećenoj DNA, te njihova netočna sinteza može doprinjeti genetičkoj raznolikosti (Goodman i sur., 2013). Jedna od DNA polimeraza koja je sposobna replicirati oštećenu DNA mehanizmom translezijske sinteze je i DNA Pol IV, čiji popravak može, ovisno o oštećenju, biti točan ili netočan. Na zaustavljenim replikacijskim rašljama, DNA

polimeraza IV kompetira s podjedinicama DNA pol III, da bi olakšala translezijsku replikaciju.

2. SOS ODGOVOR I TRANSLEZIJSKA SINTEZA

2.1 Povijesni pregled

SOS odgovor bakterije *Escherichia coli* jednostavan je i dobro opisan reparatorni mehanizam, što je rezultat brojnih i isrcpnih istraživanja koja su započela još 40-ih godina prošloga stoljeća. Nakon otkrića da su geni izgrađeni od DNA, izvođeni su brojni eksperimenti, koji su najčešće uključivali tretiranje bakterija mnogim agensima i kemikalijama.

Pokusi poput sljedećih doprinijeli su stvaranju hipoteze SOS odgovora; Jean Weigle zaključio je da se reaktivacija faga λ uvelike povećala nakon što su fagi nasađeni na ploče ozračenih livada *E. coli* (Weigle i sur., 1953), te dokaz da nakon ozračivanja lizogene *E. coli* dolazi do indukcije profaga λ i lize bakterija.

Na temelju ovih podataka Miroslav Radman zaključio je da u *E. coli* postoji sistem popravka DNA ovisan o proteinima LexA i RecA koji su inducirani nakon značajnih oštećenja DNA. Radman je ovaj popravak nazvao SOS odgovorom. Evelyn Witkin otkrila je još prije da nastanak filamenata RecA i indukcija profaga mogu biti povezani mehanizami. Sistemi slični onima u SOS odgovoru kasnije su pronađeni i u eukariotskim stanicama, iako su bakterijski i eukariotski odgovor u srži vrlo različiti (Janion i sur., 2000).

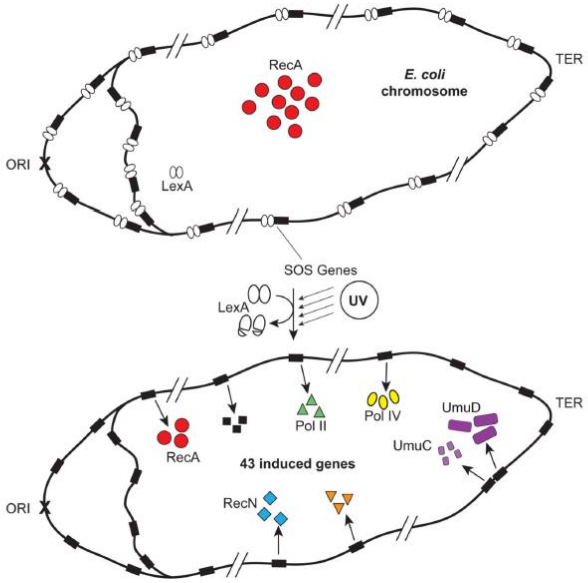
2.2 Indukcija SOS odgovora

SOS odgovor potaknut je nakupljanjem jednolančane DNA na mjestu zaustavljenih replikacijskih rašlji uslijed oštećenja DNA nakon izlaganja UV-zračenju ili kemikalijama. Najvažniji zadatak SOS odgovora je ponovno pokrenuti replikaciju i omogućiti diobu stanica. Postoji više od 40 gena uključenih u ovaj popravak (Janion i sur., 2000). Među njima je i grupa gena *din* (eng. *damage inducible*), koji su između ostalog, inducirani SOS odgovorom. Ovaj sustav reguliran je transkripcijskim represorom LexA i rekombinazom RecA (Slika 1).

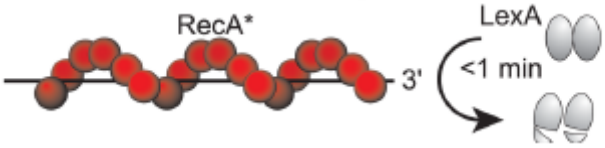
Bakterijski protein RecA je DNA ovisna ATPaza koja se veže na jednolančanu DNA kao nukleoproteinski filament. Nakon spore nukleacije, slijedi brza ekstenzija filamenta u 5’

→ 3’ smjeru (Slika 2). Nastanak filamenata zahtijeva vezanje, ali ne i hidrolizu ATP-a. Razgradnja filamenata se također odvija u 5’ → 3’ smjeru te zahtijeva hidrolizu ATP-a (Patel i sur., 2010).

SOS odgovor normalno je suprimiran represorom LexA tako što se LexA veže na operatorske regije gena uključenih u SOS odgovor te onemogućava vezanje RNA polimeraze i njihovu ekspresiju. Te regije, uzvodno od SOS gena, nazivaju se SOS - kutijama i imaju palindromske sljedove što znači da se LexA represor veže kao dimer (Thliveris i sur., 1991). Filamenti RecA* formirani oko jednolančane DNA služe u pokretanju SOS odgovora olakšavajući autokatalitičko cijepanje represora LexA. LexA veže se umjereno jako na operator gena *recA* te zbog toga dolazi do trenutačne indukcije RecA (<1min) (Little i sur., 1991).



Slika 1. SOS odgovor u bakteriji *Escherichia coli*, preuzeto iz Patel i sur., 2011.



Slika 2. Autokatalitičko cijepanje represora LexA, preuzeto iz Patel i sur., 2011.

2.3. Translezijska sinteza

Kako bi nadišle problem replikacije oštećene DNA, stanice su razvile mehanizam koji omogućava toleriranje oštećenja. Kada su replikacijske rašlje zaustavljene oštećenjem, replikativna DNA polimeraza privremeno je zamijenjena translezijskom polimerazom koja produžuje lanac i sintetizira preko mjesta oštećenja.

3. DNA POLIMERAZA IV

3.1. Opća svojstva DNA polimeraze IV

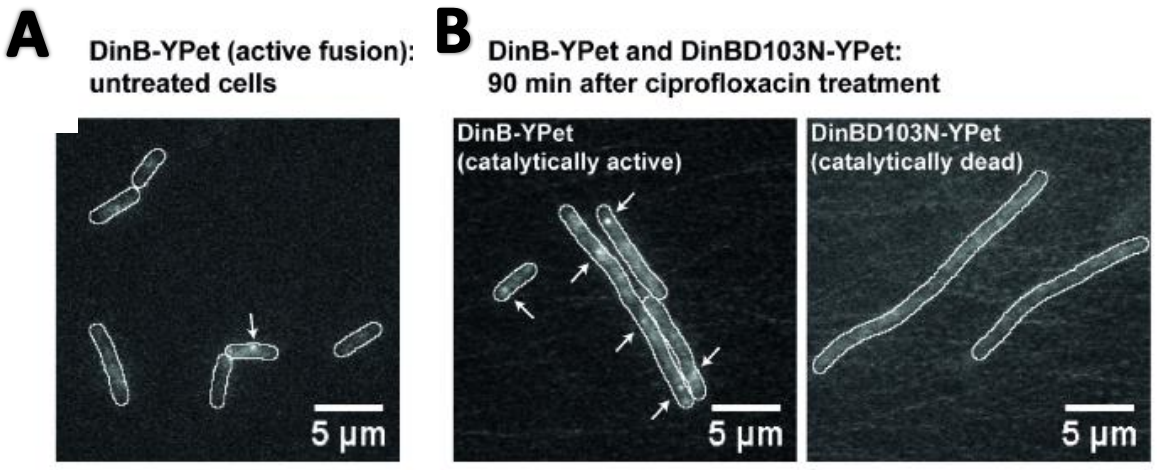
DNA polimeraza IV, kodirana genom *dinB*, pripada Y-obitelji DNA polimeraza. Polimeraze Y-obitelji imaju otvorena i velika aktivna mjesta i nemaju 3'-5' lektorirajuću egzonukleaznu aktivnost, što pridonosi češćoj ugradnji pogrešnih baza. Pol IV ima dvije domene povezane fleksibilnom poveznicom; N-terminalnu katalitičku domenu i C-terminalnu domenu. Za razliku od TLS polimeraze V, polimeraza IV može premostiti samo određena oštećenja, specijalizirana je za adukte na N^2-poziciji gvanina (uzrokovanih nitrofurazonom - NFZ) i također premošćuje alkilne adukte kao što su N^3-metiladeninska oštećenja dobivena tretmanom metilmetan sulfonatom - MMS (Thrall i sur., 2017).

Osim u translezijskoj sintezi, Pol IV doprinosi preživljenju stanica u stacionarnoj fazi (Corzett i sur., 2013). Kada je nadeksprimirana, Pol IV uzrokuje mutantni fenotip, stvarajući mutacije prvenstveno na tromom lancu (Kuban i sur., 2005).

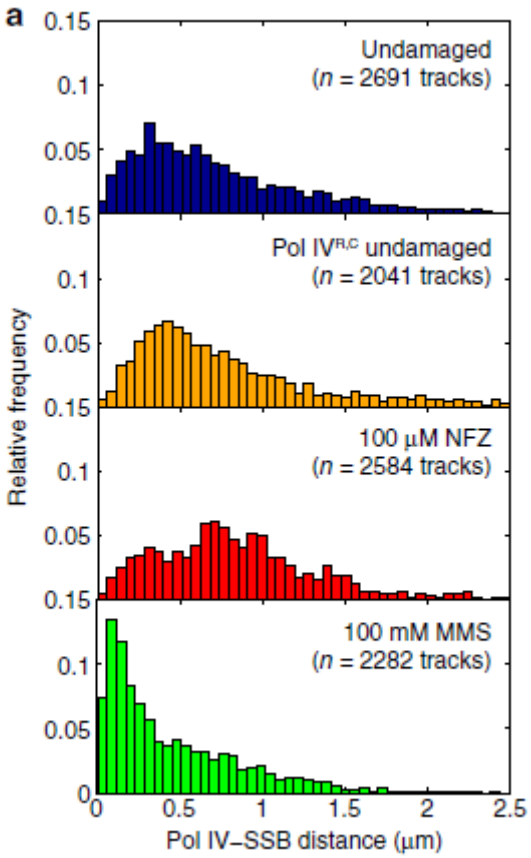
3.2. Broj molekula DNA polimeraze IV

DNA polimeraza IV u *E. coli* ima veći broj molekula od svih ostalih polimeraza. Istraživanja pomoću metode Western blot pokazala su porast broja molekula Pol IV s 250 na 2,500 nakon indukcije SOS odgovora (Kim i sur., 2001). Međutim, noviji rezultati dobiveni fluorescencijskom mikroskopijom ukazuju na postojanje manjeg broja molekula po stanici. Zamjenom nativnog gena *dinB* u *E. coli* K12 s fuzioniranim genom *dinB-YPet* koristeći metodu λ_{RED} recombineering, dobiven je fluorescentno označen protein. Tako dobivene stanice eksprimiraju pol IV sa svog nativnog promotora. U odsutnosti oštećenja izmjereni su mali signali DinB-YPet. Kalibriranjem intenziteta fluorescencije utvrđeno je da je broj molekula po stanici u tom trenutku otprilike 30. Izračunata koncentracija Pol IV u neoštećenim stanicama iznosi 6 nM. Nakon tretmana stanica ciprofloksacinom (30 ng/mL),

antibiotikom koji inhibira DNA girazu i formira kovalentne adukte na DNA, nastali su točkasti fokusi. Fokusi su se počeli pojavljivati 20 minuta nakon dodatka ciprofloksacina i izračunato je oko 279 molekula po stanici. Međutim, uslijed oštećenja, stanice su povećale volumen 2,5 puta, te koncentracija Pol IV iznosi 34 nM, što je otprilike 5,5 puta više nego u neoštećenim stanicama (Slika 3), (Henrikus i sur., 2017). Broj molekula Pol IV ovisi i o dozi mutagenog agensa. Broj signala utvrđenih fluorescencijskom mikroskopijom povećao se s 7,4 u netretiranim stanicama, na 9,8 u stanicama tretiranim 40 μM NFZ (nitrofurazon), te 13,0 nakon tretmana 100 μM NFZ (Slika 4) (Thrall i sur., 2017).



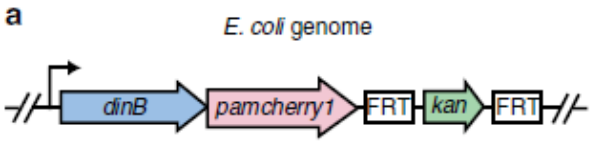
Slika 3. Flourescentna snimka neoštećene stanice koja pokazuje nisku razinu DinB-YPet signala (a), fluorescentna snimka nakon tretmana antibiotikom ciprofloksacinom, preuzeto i modificirano iz Henrikus i sur., 2017.



Slika 4. Ovisnost broja molekula Pol IV o koncentraciji mutagenog agensa, preuzeto iz Thrall i sur., 2017.

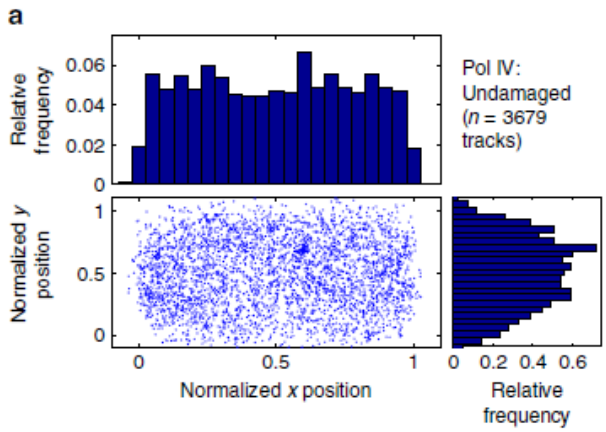
4. LOKALIZACIJA DNA POLIMERAZE IV

U nekoliko nedavnih istraživanja, upotreba genske fuzije u svrhu vizualizacije genskih produkta pomoću fluorescencije pokazala se vrlo učinkovitom metodom praćenja aktivnosti neke molekule. Jedna od takvih fuzija je i fuzija gena za fluorescentni protein PAmCherry i gena *dinB*. (Slika 5)



Slika 5. Shematski prikaz genske fuzije PAmCherry1 na C-kraj gena *dinB*, preuzeto iz Thrall i sur., 2017.

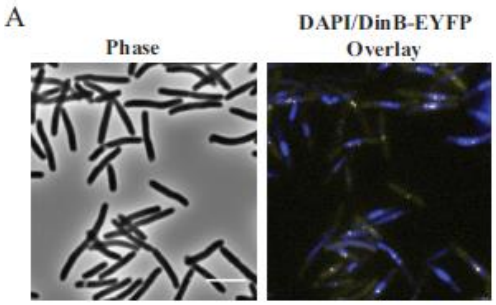
Molekule Pol IV s obzirom na mobilnost u stanici dijele se na mobilne i statične. Konstrukcijom fluorescentne fuzije Pol IV- PamCherry i PALM mikroskopije, izračunati su dvodimenzionalni difuzijski koeficijenti-D*. Jedna populacija stanica imala je D* = 0,8 $\mu m^2/s$, dok je drugoj populaciji izračunat D* iznosio 0,1, što predstavlja vezane molekule, vjerojatno za DNA (Thrall i sur., 2017). Budući da Pol IV treba otprilike 100 ms za ugradnju jednog nukleotida, molekule koje sintetiziraju DNA će se učiniti statičnim na snimkama i stvarati svijetle fokuse (Henrikus i sur., 2017). Kako bi se karakterizirala lokalizacija statičnih molekula Pol IV, uzeti su podaci s mikrografa i normalizirani na sve pozicije uzduž duge (x) i kratke (y) osi. Pod normalnim uvjetima, Pol IV je lokalizirana po cijeloj stanici, bez ijedne nakupine na bilo kojem staničnom položaju (Slika 6).



Slika 6. Raspodjela molekula DNA pol IV u stanici, preuzeto iz Thrall i sur, 2017.

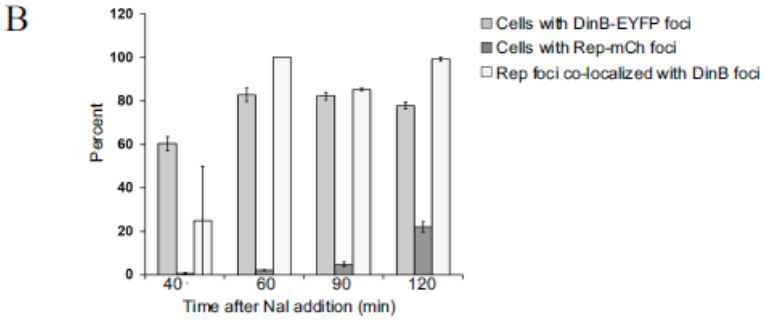
Kao odgovor na oštećenja DNA, Pol IV se lokalizira u fokuse. Dok niti jedan fokus fuzijskog proteina DinB-EYFP nije lociran u netretiranim stanicama, nakon tretmana

inhibitorom DNA giraze NaI, u svim stanicama zamijećen je barem jedan fokus, a svi su bili povezani s nukleoidom (Slika 7).



Slika 7. Fazno-kontrastna i fluorescentna slika lokalizacije fuzijskog proteina, preuzeto iz Mallik i sur., 2015.

Pol IV pokazuje i kolokalizaciju s replikativnom helikazom, Rep. Konstruirane fuzije mCherry na C-kraju proteina Rep i DinB-EYFP pokazale su da je stvaranje Pol IV fokusa u stanicama tretiranim NaI prethodila stvaranju fokusa Rep (Mallik i sur., 2015). Jedan sat nakon tretmana, otprilike 80% stanica imalo je DinB-EYFP fokuse, dok je Rep fokuse pokazivalo 2% stanica. Nakon dva sata, broj stanica s Rep fokusima povećao se na 22% (Slika 8).

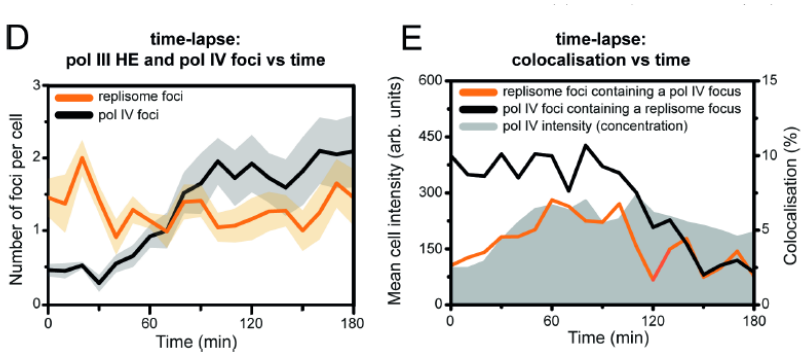


Slika 8. Kolokalizacija proteina Rep s DNA Pol IV nakon tretmana NaI, preuzeto iz Mallik i sur., 2015.

Pol IV također kolokalizira s proteinom RecA. 30-60 minuta nakon dodatka NaI, zamijećene su niti RecA-GFP, dok je nakon 120 minuta došlo do pojave i kolokalizacije DinB fokusa (Mallik i sur., 2015).

Dva su modela koja opisuju aktivnost Pol IV u blizini replisoma. U prvom, najviše zastupljenom modelu, Pol IV primarno djeluje unutar replisoma, zamjenjujući Pol III na zaustavljenim replikacijskim rašljama te nakon sinteze izlazi iz replikacijskih rašlji kako bi se Pol III ponovno mogla vezati i nastaviti sintezu. Prema drugom modelu, Pol IV obavlja postreplikativnu translezijsku sintezu, na lezijama koje je Pol III preskočila. Oba modela su jednako vjerojatna (Henrikus i sur., 2017).

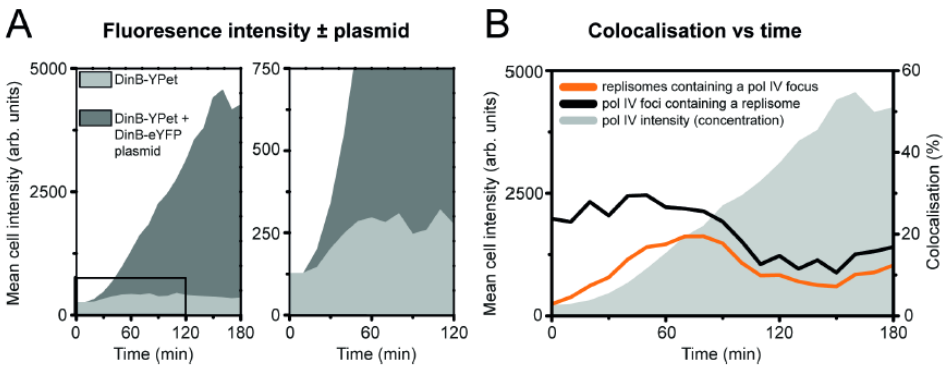
Međutim, noviji rezultati pokazuju da najveći broj Pol IV djeluje izvan replikacijskih rašlji. Snimke fluorescirajućih fuzija DinB-YPet i replisomskog markera koji omogućava vizualizaciju pol III HE kompleksa omogućile su i mjerenje udaljenosti fokusa. Uočena je široka distribucija udaljenosti Pol IV i replisomskih fokusa. Histogram udaljenosti pokazao je širi maksimum, što odgovara "labavoj" kolokalizaciji. DinB-YPet fokusi formiraju se blizu, ali ne na replisomima, što ide u prilog hipotezi da Pol IV obavlja postreplikativnu TLS, u prazninama iza replikacijskih rašlji. Analize vremenski ovisnih promjena u kolokalizaciji pokazale su da je broj cjelovitih replisomskih fokusa ostao približno konstantan nakon tretmana ciprofloksacinom. To znači da nije uklonjen velik broj Pol III HE- holoenzima. 0-100 minuta nakon dodatka ciprofloksacina, 10% Pol IV kolokalizira s replisomima, što je znatno manje od očekivanog ako Pol IV prvenstveno djeluje u blizini replisoma. U kasnoj fazi SOS odgovora samo 2,5% fokusa Pol IV kolokalizira s replisomima (Slika 9), (Henrikus i sur., 2017). Ovi rezultati ukazuju da većina molekula Pol IV u stanici ima nereplisomsku ulogu. Nereplisomske uloge Pol IV podrazumijevaju aktivaciju zaustavljenih replikacijskih rašlji, popravak dvolančanih lomova, adaptivne mutacije i povećanje preživljenja stacionarne faze.



Slika 9. Ovisnost stvaranja replisomskih i Pol IV fokusa o vremenu (lijevo), te ovisnost srednjeg intenziteta i kolokalizacije Pol IV i replisoma o vremenu, preuzeto iz Henrikus i sur., 2017.

Također je primjećeno da se tijekom prvih 100 minuta povećava koncentracija molekula Pol IV, ali odnos kolokalizacije s replisomima ostaje približno konstantan, što znači da je broj molekula Pol IV koje se vežu blizu replisoma neovisan o njihovoj koncentraciji (Henrikus i sur., 2017). Molekule Pol IV uključene u sintezu DNA ostaju duže vezane za DNA. Povećanjem vremena izlaganja s 50 ms na 300 ms lokalizacija je ostala ista, što znači da Pol IV sudjeluje u sintezi DNA u blizini i dalje od replisoma.

Nastanak fokusa i kolokalizacija s replisomima provjerena je povećanjem ekspresije Pol IV. Stanice su transformirane plazmidom, s 5-10 kopija po stanici. Zabilježena je viša razina fluorescencije, ali uz isti gubitak kolokalizacije (Slika 10). Udio replisoma koji sadrže Pol IV fokus se povećao s 3 na 20%, izračunato je da fokusi u ranijim fazama imaju 3-10 molekula Pol IV, dok u kasnijim fazama imaju više od 30 molekula (Henrikus i sur., 2017).



Slika 10. Kolokalizacija Pol IV s replisomima u prisutnosti dodatnih fluorescentno označenih molekula Pol IV eksprimiranih s plazmida, preuzeto iz Henrikus i sur., 2017.

5. INTERAKCIJE DNA POL IV I REPLIKATIVNE DNA POL III

Zbog već spomenute sporosti, otvorenog aktivnog mjesta i nepostojanja lektorirajuće aktivnosti, djelovanje TLS polimeraza mora biti strogo regulirano. Trenutno su predložena dva moguća mehanizma postavljanja TLS polimeraza na oštećenje: 1) β-hvataljka postreplikativno postavlja TLS polimeraze na oštećenja u prazninama jednolančane DNA koje je replikativna Pol III preskočila; 2) TLS polimeraze dobivaju pristup replikacijskim

rašljama i oštećenjima nakon zamjene s Pol III. Ipak, više dokaza podupire pretpostavljeni mehanizam izmjene polimeraza, iako mnoga pitanja vezana uz same procese i dalje nisu odgovorena i ostavljaju prostora za daljnja istraživanja.

Izmjena replikativne Pol III i TLS Pol IV ključan je dio mehanizma regulacije TLS *in vivo* jer kontrolira pristup Pol IV molekuli DNA. Povećani pristup Pol IV uzrokovan nadekspresijom ima za posljedicu povećanje učestalosti mutacija ili čak inhibiciju progresije replikacijskih rašlji. Djelovanje TLS polimeraza dijelom je uvjetovano prstenastim proteinima - tzv. hvataljkama. Prokariotska β-hvataljka ključan je protein za koordiniranje aktivnosti DNA polimeraza. β-hvataljka, služi kao klizni držač koji obuhvaća molekulu DNA i na nju postavlja DNA polimeraze. β-hvataljka strukturni je homolog eukariotske PCNA (eng. *proliferating cell nuclear antigen*), koja ima sličnu ulogu (Le i sur., 2017).

Na temelju istraživanja mutantnog soja u genu *dnaN*, koji kodira za β-hvataljku, dokazano je da β-hvataljka ima ključnu ulogu u odabiru polimeraze. Svih pet DNA polimeraza veže se za β-hvataljku, i više od jedne može biti vezano u isto vrijeme. Iz ovog je razvijen koncept tzv. trake s alatima, što znači da je više od jedne polimeraze vezano, ali samo jedna je aktivna. Budući da je β-hvataljka dimer, dva su džepa za vezanje polimeraza. DNA polimeraze se također vežu za domene utora i ivice β-hvataljke, te se smatra da je ta interakcija ključna za odabir polimeraze (Hastings i sur., 2010).

DNA polimeraza III glavna je replikaza u stanicama bakterije *E. coli*. Holoenzim (HE) sastoji se od 20 podjedinica; 2 homodimerna β-klizna držača i 3 sržna kompleksa (Pol III αεθ) koji su povezani interakcijom Pol IIIα i heptamerne DNAX ATPaze (τ3δδ'ψχ)- postavljača β-hvataljke. Sržni kompleks obavlja sintezu DNA. Pol IIIα katalizira polimerizaciju, Pol IIIε provjeru točnosti, a Pol IIIθ stimulira aktivnost Pol IIIε (Scotland i sur., 2015).

Svaka polimeraza sadrži pentamerni ili heksamerni vezujući motiv za β-hvataljku - CBM (eng. *clamp binding motif*). CBM intereagira s hidrofobnim utorom koji se nalazi blizu C-kraja svakog protomera β-hvataljke. Osim ove, mnoge druge interakcije na površini β-hvataljke doprinose izmjeni polimeraza. Pokusom produljenja početnica pokazano je da je interakcija utora i ivice nužna za Pol III - Pol IV izmjenu i procesivnu replikaciju (Scotland i sur., 2015).

5.1. Mehanizam izmjene DNA Pol IV i DNA Pol III

Budući da nadeksprimirana pol IV onemogućuje rast stanica *E. coli* zamjenjujući Pol III na replikacijskim rašljama, izmjena ovih dviju polimeraza vrlo je važan trenutak za kontrolu mutagene aktivnosti Pol IV. Provedena su brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja daju bolji uvid u ovaj proces.

Sojevi koji eksprimiraju Pol IV^C (mutirani gen za utor) i Pol IV^R (mutirani gen za ivicu) potvrdili su ključnu ulogu β-hvataljke u translezijskoj sintezi DNA polimerazom IV. Za funkciju Pol IV ključne su dvije stvari: kontakt s utorom i ivicom β-hvataljke te inhibicija procesivnosti Pol III direktnom interakcijom Pol IV s jednom ili više podjedinica Pol III. Pol III veže se na β-hvataljku pomoću motiva CBM u katalitičkoj i lektorirajućoj podjedinici. Iako Pol III HE može zauzeti oba utora β-hvataljke, jedan utor dovoljan je za procesivnu replikaciju Pol III te Pol III - Pol IV zamjenu. Za aktivnost Pol III nužna je interakcija između Pol IIIα i utora β-hvataljke, dok interakcija između Pol IIIε i β-hvataljke nije nužna. Na temelju toga pretpostavljen je mehanizam prema kojem izmjena započinje prvotnim vezanjem Pol IV na ivicu β-hvataljke u blizini utora za koji je vezana Pol IIIα. Pol IV, pri relativno malim koncentracijama tijekom normalnog rasta, može se povezati s ivicom β-hvataljke i kompetirati sa slabo povezanom ε-podjedinicom Pol III za utor hvataljke. Zauzimajući ivicu i utor na β-hvataljci, u inaktivnom obliku tijekom normalnih uvjeta, Pol IV je dostupna za brzu izmjenu i TLS kad Pol III zastane, što je predloženo u modelu trake s alatima (Kath i sur., 2014).

Još uvijek nije jasno je li uvjet za postavljanje Pol IV na replikacijske rašlje zaustavljanje Pol III. Jedna je pretpostavka da kad dođe do blokiranja Pol III, dolazi do konformacijske promjene kojom se izlaže površina Pol III koja dolazi u kontakt s Pol IV. Iz tog razloga Pol IV može zamijeniti blokiranu Pol III. Nadalje, ako zaustavljeni replisom postavlja Pol IV, onda jedna interakcija Pol III - Pol IV može biti dovoljna za postavljanje i zamjenu Pol III. Međutim, ako aktivno replicirajuća Pol III regrutira Pol IV neovisno o njenom zaustavljanju, onda bi različiti Pol III - Pol IV kontakti trebali biti uvjet za postavljanje Pol IV i izmjenu. Iako Pol IV uklanja Pol III s β-hvataljke, pretpostavlja se da Pol IIIα-DnaXτ-DnaB interakcije zadržavaju Pol III unutar replisomskog kompleksa sve dok Pol IV kontrolira kalup DNA. To omogućuje Pol III da ponovno dobije kontrolu nad replikacijskim rašljama nakon što se ukloni Pol IV. Međutim, kad je Pol IV nadeksprimirana ili kad replisomi sadrže mutantni dnaN159 za β-hvataljku, Pol IV kontinuirano zamjenjuje Pol

III na rubu β-hvataljke. Ova ponavljana izmjena može zamijeniti Pol III s replisoma, objašnjavajući letalni fenotip uočen kod sojeva s nadeksprimiranom Pol IV (Scotland i sur., 2015). Dijeljeni kontakti, kao što je jedan utor β-hvataljke tijekom kompeticije između Pol III i Pol IV vjerojatno su važni za olakšavanje disocijacije i promjenu podjedinica. Sekundarni kontakti, kao što je područje ivice na Pol IV, igraju važnu ulogu u orijentiranju proteina da iskoriste kratke promjene u okupiranju ovih zajedničkih mjesta, što rezultira promjenom vezanih parova (Kath i sur., 2014).

Biokemijska istraživanja dala su rezultate koji govore o inicijaciji i uzroku izmjene Pol III-Pol IV. Proučavana je inicijacija izmjene Pol III - Pol IV kad Pol III HE produljuje kraj početnice. Kratka ukosnica ili dupleks na lancu kalupa efikasno inducira zamjenu Pol III za Pol IV, neovisno o oštećenju. Pol III HE postaje dostupna za izmjenu posredovanu Pol IV kada se sudari s peteljkom dupleksa ukosnice ili 5’ krajem dupleksa početnica/kalup (Thi Le i sur., 2017).

Navedene interakcije pojedinih domena DNA Pol III i DNA Pol IV nepobitno su ključne za inicijaciju, održavanje i razrješenje izmjene polimeraza. Međutim, nekolicina modela koji opisuju izmjenu i dalje su kontradiktorna po nekim pitanjima, što ostavlja prostor za daljnja istraživanja.

6. LITERATURA:

Corzett CH, Goodman MF, Finkel SE (2013). Competitive fitness during feast and famine: how SOS DNA polymerases influence physiology and evolution in *Escherichia coli*. *Genetics*; **194**: 409-420.

Fernandez de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D et al. (2010). Identification of additional genes belonging to the LexA-regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*; **35**: 1560–1572.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA et al. (2006). DNA repair and mutagenesis. *American Society for Microbiology Press*, 2nd edition

Goodman MF, Woodgate R (2013). Translesion DNA polymerases. *CSH Perspectives*; 5: a010363.

Hastings P, Hersh M, Thornton PC, Fonville N et al. (2010). Competition of *Escherichia coli* DNA Polymerases I, II and III with DNA Pol IV in Stressed Cells. *Plos ONE;* **5**: e10862

Henrikus S, Wood E, McDonald J, Cox M, Woodgate R et al. (2017). DNA polymerase IV primarily operates outside of DNA replication forks in *Escherichia coli*. *PLOS Genetics;* **14**: e1007161.

Katha J, Jergicb S, Heltzelc J, Jacobe D, Dixonb N et al. (2014). Polymerase exchange on single DNA molecules reveals processivity clamp control of translesion synthesis. *PNAS*; **111**: 7647-7652

Kim SR, Matsui K, Yamada M, Gruz P, Nohmi T (2001). Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*; **266**: 207–215.

Kuban W, Banach-Orlowska M, Bialoskorska M, Lipowska A, Schaaper RM, et al. (2005) Mutator phenotype resulting from DNA polymerase IV overproduction in *Escherichia coli*: preferential mutagenesis on the lagging strand. *Bacteriol*; **187**: 6862–6866.

Le T, Furukohri, Tatsumi-Akiyama M, Maki H (2017). Collision with duplex DNA renders *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme susceptible to DNA polymerase IV-mediated polymerase switching on the sliding clamp. *Scientific reports*; **7**: 12755.

Little JW (1991). Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie*; **73**: 411–421.

Mallik S, Popodi EM, Hanson AJ, Foster PL (2015). Interactions and localization of

Escherichia coli error-prone DNA polymerase IV after DNA damage. *Journal of Bacteriology*; **197**: 2792-2809.

Okazaki R, Arisawa M, Sugino A (1971). Slow joining of newly replicated DNA chains in DNA polymerase I-deficient *Escherichia coli* mutants. *PNAS*; **68**: 2954–2957.

Patel M, Jiang Q, Woodgate R, Cox M, Goodman MF (2010). A New Model for SOS-induced Mutagenesis: How RecA Protein Activates DNA Polymerase V. *Critical reviews in biochemisty and molecular biology*; **45**: 171-184.

Scotland M, Heltzel J, Kath, Choi JS, Berdis AJ et al. (2015). A Genetic Selection for *dinB* Mutants Reveals an Interaction between DNA Polymerase IV and the Replicative Polymerase That Is Required for Translesion Synthesis. *PloS Genetics*; **11**: e1005507.

Tan KW, Pham TM, Furukohri A, Maki H, Akiyama MT (2015); Recombinase and translesion DNA polymerase decrease the speed of replication fork progression during the DNA damage response in *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research;* **43**: 1714–1725.

Thliveris, AT, Little, JW, Mount, DW (1991). Repression of the *E. coli recA* gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie*; **73**: 449-456.

Thrall ES, Kath JE, Chang S, Loparo JJ (2017). Single-molecule imaging reveals multiple pathways for the recruitment of translesion polymerases after DNA damage. *Nature communications*; **7**: 2170.

Walker GC (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*; **48**: 60–93.

Weigle JJ (1953). Induction of mutation in a bacterial virus. *PNAS*; **39**: 628-636.

Yeiser B, Pepper E, Goodman MF, Finkel SE (2002). SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *PNAS*; **99**: 8737-41.

7. SAŽETAK

Genetički materijal organizama podložan je stalnim oštećenjima uzrokovanim endogenim i egzogenim čimbenicima. Postoje brojni mehanizmi koji brzo i točno popravljaju ovakva oštećenja. Međutim, ako je razina oštećenja toliko velika da mehanizmi koji ne rade greške nisu dovoljni da bi izvršili popravak, dolazi do indukcije SOS odgovora. Ova faza popravka uključuje sintezu preko lezije, tzv. translezijsku sintezu (TLS), a posredovana je translezijskim polimerazama. Jedna od pet polimeraza u bakteriji *Escherichia coli* je i DNA Pol IV. Na zaustavljenim replikacijskim rašljama, DNA polimeraza IV kompetira s polimeraznim podjedinicama DNA Pol III, da bi olakšala translezijsku replikaciju.

U ovom seminaru opisana je indukcija SOS odgovora, svojstva Pol IV, lokalizacija i broj molekula u stanici te interakcije s replikativnom DNA Pol III. Mnogi radovi jasno predlažu modele za određene probleme vezane uz Pol IV. Međutim, postoje radovi koji iznose drugačija opažanja, ostavljajući time mnogo prostora za daljnja istraživanja.

8. SUMMARY

The genetic material of living organisms is suspectible to continuous damage caused by endogenous and exogenous factors. Various mechanisms exist that preform fast and accurate repair of such damage. However, if the level of damage is so vast that these high-fidelity mechanisms are not sufficient for repair, SOS response is induced. This phase of repair mechanism includes translesion synthesis (TLS), which is mediated by translesion polymerases. One of the five TLS polymerases in bacteria *Escherichia coli* is DNA Pol IV. At blocked replication fork, DNA Pol IV competes with subunits of replicative DNA Pol III in order to preform translesion synthesis.

In this review, the induction of SOS response, properties, localization, number of Pol IV, as well as interactions with Pol III are discussed. Alhough a large number of research unequivocally suggest many models for the mentioned topics, there is a significant number of those which contradict these results thus leaving a space for the further research.