

**Struktur und Funktion der vom Plasmid RSF1010
kodierte Primase RepB'**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

Von Diplom-Biochemiker
Sebastian Geibel

Berlin, April 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Disputation am: 10.09.2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2006 bis April 2010 unter Anleitung von Prof. Dr. Saenger am Institut für Chemie und Biochemie durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und auf Grundlage der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Abkürzungsverzeichnis

A ₆₀₀	Absorbtion bei einer Wellenlänge von 600 nm
Å	1 Ångström = 0,1 nm
Ap ^R	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BESSY	Berliner Elektronen-Synchrotron
bp	Basenpaar (doppelsträngige DNA)
CCD	<i>charge coupled device</i>
CD	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
d	desoxy
Da	Dalton
Dali-Server	Service zum Vergleich dreidimensionaler Strukturen
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-triphosphate
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Km ^R	Kanamycinresistenz
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	mol/l
MAD	<i>Multiple Wavelength Anomalous Dispersion</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight</i>
mAu	tausendstel Absorbtionseinheiten
MES	Morpholino Ethan Sulfonsäure
mp18	Max-Planck Stamm 18
M _w	Molekulare Masse, g/mol
N-terminal	Amino-terminal
NTP	Nukleosidtriphosphat
Ni ²⁺ -NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	<i>Brookhaven Protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
Sm ^R	Streptomycin-Resistenz
Su ^R	Sulfonamid-Resistenz
SV	Säulenvolumen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UV	ultraviolett
V _m	Elutionsvolumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
% (v/v)	Volumen des Stoffes bezogen auf das Volumen der fertigen Lösung
% (w/v)	x % (w/v) bedeutet x Gramm des Stoffes pro 100 ml fertige Lösung

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... III

1 EINLEITUNG 1

1.1 Primasen sind essentielle Komponenten der DNA-Replikation 1

1.2 Katalytischer Mechanismus der Nukleotid-Addition von Polymerasen 2

1.3 Mechanismus der Primersynthese 2

1.4 IncQ-Plasmide als Modellsysteme 3

1.5 Genstruktur des Plasmids RSF1010 4

1.6 RSF1010 repliziert im *leading strand* Modus 5

1.7 Mobilisierung von RSF1010 durch bakterielle Konjugation 8

1.8 Primase RepB⁺ - ein hochspezialisiertes essentielles Replikationsenzym 9

1.9 Unterteilung bekannter Primase-Raumstrukturen in zwei Klassen 10

1.10 Raumstrukturen von DnaG-Typ Primasen bestehen aus drei Domänen 10

1.11 Die Zink-Ribbon Domäne ist essentiell für DnaG-Typ Primaseaktivität 11

1.12 Die RNA-Polymerase Domäne- das katalytische Zentrum der DnaG-Typ Primasen 12

1.13 Pri-Typ Primasen bestehen aus zwei Komponenten 12

1.14 Primase-DNA-Strukturen lassen mechanistische Schlüsse zu 14

1.15 Biochemische Eigenschaften von Pri- und DnaG-Typ Primasen: Primersynthese, DNA-Erkennung 15

1.16 Aufgabenstellung 17

2 MATERIALIEN..... 18

2.1 Geräte 18

2.2 Materialien für die Kristallisation und Röntgen-Beugungsexperimente 19

2.3 Chemikalien, Puffer, Nährmedien und -böden 19

2.4 Bakterien- und Phagenstämme 20

2.5 Plasmide und Oligonukleotide 21

2.6 Längen- und Molekulargewichtsstandards 22

2.7 Enzym 22

3 METHODEN 23

3.1 Molekulare Klonierung der RepB⁺-Derivate Gene 23

3.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen 24

3.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 24

3.1.4 DNA-Ligation 24

3.1.5 Transformation 24

3.1.6 Plasmidpräparation 25

3.1.7 *In vitro* DNA-Mutagenese 25

3.1.8 DNA-Sequenzierung 25

3.1.9 Stammkonservierung 25

3.2 Herstellung und Präparation der RepB⁺-Derivate und des Primase-DNA-Komplexes 25

3.2.1 Vorkulturen 25

3.2.2 Protein-Überexpression 26

3.2.3 Zellaufschluss 26

3.2.4 Ultrazentrifugation 26

3.2.5 Chromatographische Proteinreinigung 26

3.2.6 Kationenaustausch-Chromatographie an Heparin 26

3.2.7 Kationenaustausch-Chromatographie an Sulfopropylgruppen 27

3.2.8 Größenausschluss-Chromatographie an Superdex-75 27

3.2.9 Reinigung der N- und C-terminalen Domäne von RepB⁺ 27

3.2.10 Herstellung und Reinigung der Primase-DNA-Komplexe 27

3.3 Herstellung zirkulär geschlossener einzelsträngiger (ss) und doppelsträngiger (ds) DNA des Phagen M13mp18ssiA 28

3.3.1 Transformation von *E. coli* JM103 mit M13mp18ssiA dsDNA 28

Inhaltsverzeichnis

3.3.2 Kultivierung des Indikator-Stammes <i>E. coli</i> JM103	28
3.3.3 Infektion des Indikator-Stammes <i>E. coli</i> JM103 mit dem Phagen M13mp18 <i>ssiA</i>	28
3.3.4 Anzucht infizierter <i>E. coli</i> JM103-Zellen (M13mp18 <i>ssiA</i> ⁺) zur Herstellung der dsDNA des Phagen M13mp18 <i>ssiA</i>	29
3.3.5 Extraktion der ssDNA des Phagen M13mp18 <i>ssiA</i>	29
3.3.6 Ethanol-fällung von DNA	30
3.4 Allgemeine Biochemische Methoden	30
3.4.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNA	30
3.4.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA	30
3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese von Proteinen	31
3.4.4 Konzentrationsbestimmungen von DNA und Protein	31
3.4.5 Bradford-Test	32
3.5 Proteincharakterisierung	32
3.5.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie	32
3.5.2 Komplementärstrangsynthesetest	32
3.5.3 Primersynthesetest	33
3.5.4 Autoradiographie	33
3.5.5 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) mit Wildtyp RepB' und katalytischer Domäne von RepB'	34
3.5.7 Analytische Ultrazentrifugation	35
3.6 Kristallographische Methoden	35
3.6.1 Kristallisation	35
3.6.2 Beugungsexperimente, Datenaufnahme und -prozessierung	35
3.6.3 Lösung des Phasenproblems (RepB'-Raumstruktur)	36
3.6.4 Lösung des Phasenproblems (Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes)	36
3.6.5 Modellverfeinerung, -bau und -validierung	36
3.6.6 Programme für die dreidimensionale Strukturüberlagerung	37
4 ERGEBNISSE	38
4.1 RepB' beginnt die Synthese des DNA-Primers an Thymin 32 der <i>ssiA</i> DNA-Sequenz	38
4.1.1 Die Länge des von RepB' synthetisierten DNA-Primers ist abhängig von der dATP Konzentration und variiert zwischen 2-12 Nukleotiden	41
4.2 Strukturbestimmung des Wildtyps RepB'	43
4.2.1 Optimierung der Kristallisationsbedingung von RepB'	43
4.2.2 Aufnahme eines nativen Datensatzes bis zu einer Auflösung von 2,0 Å und Eingrenzung der tetragonalen Raumgruppen des RepB'-Kristalls auf P4 ₁ 2 ₁ 2 oder P4 ₃ 2 ₁ 2	43
4.2.3 Darstellung der OsO ₃ x 2 Pyridin-Derivate von RepB' und Aufnahme von MAD-Daten bis zu einer Auflösung von 2,7 Å	44
4.2.4 Erstellung des Raumstrukturmodells von RepB'	44
4.3 RepB' besteht aus zwei flexibel miteinander verbundenen Domänen	46
4.4 Die katalytischen Zentren von RepB' und archaebakteriellen Primasen weisen Strukturhomologien auf	47
4.5 Die Raumstrukturen von RepB' und Pri-Typ Primasen weisen konservierte katalytische Aminosäuren im aktiven Zentrum auf	48
4.6 Die RepB'-Aktivität ist Zink-Ionen unabhängig	51
4.7 Die Helix-Bündel Domäne von RepB' ist essentiell für die Primase-Aktivität	52
4.8 Die Verkürzung des Aminosäurelinkers (AS 206-220) von RepB' reduziert die Primase-Aktivität	53
4.9 Die Helix-Bündel Domäne von RepB' weist eine Homeodomänen-ähnliche Faltung auf	55
4.10 Die Helix-Bündel Domäne von RepB' bindet an <i>ssiA</i> DNA	56
Kartierung funktioneller Aminosäuren der Helix-Bündel Domäne von RepB'	57
4.11 Kristallisationsstrategien von Primase-DNA-Komplexe	59
4.12 Das einzelsträngige 5'-Ende der <i>ssiA</i> DNA ist essentiell für die Bindung an RepB'	59
4.13 Herstellung des Primase-DNA-Komplexes	61
4.14 Kristallisation des Primase-DNA-Komplexes	61
4.15 Kristallstruktur der katalytischen Domäne im Komplex mit <i>ssiA</i> (3'Δ13)DNA bei 2,7 Å Auflösung	61
4.16 Die Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes zeigt eine spezifische <i>ssiA</i> DNA-Bindungsstelle von RepB'	63
4.17 Die <i>ssiA</i> DNA-Haarnadelschleife enthält ein G-T <i>wobble</i> Basenpaar	66

Inhaltsverzeichnis

4.18 Die katalytische Domäne von RepB' besteht aus einer spezifischen <i>ssiA</i> DNA-Bindungs- und einer katalytischen Unterdomäne	67
4.19 RepB' ist der Prototyp einer eigenen Primaseklasse, die ausschließlich im <i>leading strand</i> Replikationsmodus arbeitet.....	68
5 DISKUSSION	73
5.1 Einordnung der Primersynthese von RepB'	73
5.2 RepB' besitzt eine spezifische Bindungsstelle für dATP zur Initiation der Primersynthese und eine dNTP-Bindungsstelle zur Primerverlängerung.....	74
5.3 Das von Charles C. Richardson vorgeschlagene Modell zur Initiation der Primersynthese von Primasen lässt sich auf RepB' anwenden	74
5.4 Primer-Initiations- und -Elongationsstelle liegen im katalytischen Zentrum und lassen sich nicht unterscheiden	75
5.5 Mögliche DNA-Bindungsstellen der Helix-Bündel Domäne	75
5.6 Der Aminosäurelinker von RepB' erlaubt den Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation.....	76
5.6 Die Primaseaktivität von RepB' und DnaG-Typ Primasen erfordert zwei Domänen.....	76
5.7 Die Helix-Bündel Domäne ist spezifisch für IncQ-Primasen	77
5.8 Die <i>ssiA</i> spezifische Unterdomäne I von RepB' könnte als Ersatz für ein fehlendes Zink-Bindungsmotiv dienen	77
5.10 Modell für die Translokation der <i>ssiA</i> DNA entlang RepB'	78
5.11 Vergleich der RepB'-DNA-Erkennungssequenz <i>ssiA</i> mit Primase-DNA-Erkennungssequenzen pro- und eukaryontischer Primasen	81
5.12 RepB' könnte einen Komplex mit dem Kopplungsprotein des T4SS bilden.....	82
5.13 Evolutionären Herkunft von RepB'	82
6 ZUSAMMENFASSUNG+SUMMARY.....	84
7 LITERATUR.....	86
8 ANHANG	91
8.1 Planung der RepB'-Derivate	91
8.2 Säulen-Chromatographische Reinigung der RepB'-Derivate	96
Curriculum vitae, Publikationen, Präsentationen	98
DANKSAGUNGEN	99

1 Einleitung

1.1 Primasen sind essentielle Komponenten der DNA-Replikation. Primasen initiieren zusammen mit anderen Replikationsenzymen den Prozess der DNA-Replikation (Verdoppelung der DNA) (1, 2). Vor der Zellteilung muss die DNA repliziert werden, damit die Tochterzelle die vollständige genetische Information erhält. Die Grundlage zum Verständnis der DNA-Replikation schufen James Watson und Francis Crick, als sie 1953 das Raumstrukturmodell der DNA-Doppelhelix vorstellten (3). Die DNA-Doppelhelix besteht aus zwei komplementären DNA-Einzelsträngen mit antiparalleler Orientierung, In der DNA-Doppelhelix liegen sich die komplementären Basen Adenin und Thymin oder Guanin und Cytosin gegenüber und bilden über Wasserstoffbrücken Basenpaare aus, so dass sich aus der Basensequenz eines DNA-Einzelstranges die komplementäre Basensequenz des anderen DNA-Einzelstranges ergibt. Watson and Crick folgerten, dass beide parentalen DNA-Einzelstränge jeweils als Matrize zur Neusynthese eines doppelsträngigen DNA-Tochtermoleküls dienen. Der Mechanismus der semikonservativen DNA-Verdoppelung (4) ist universell gültig für alle Organismen (5), also auch für Viren und Plasmide (6). Das zentrale Enzym der DNA-Replikation ist die DNA-Polymerase (7), da sie am parentalen Matrizen-DNA-Einzelstrang den Tochter DNA-Doppelstrang synthetisiert (Abbildung 1.1). DNA-Polymerasen addieren 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (dNTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) in 5'->3' Richtung komplementär an den parentalen Matrizen-DNA-Einzelstrang, der in 3'->5' Richtung abgelesen wird (8).

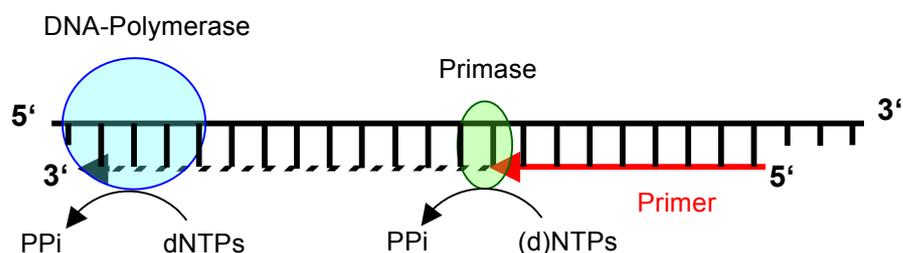


Abbildung 1.1: Initiation der DNA-Replikation durch Primasen. *De novo* Synthese eines RNA- oder DNA-Primers (roter Pfeil) an parentaler einzelsträngiger Matrizen-DNA (schwarze Linie) durch eine Primase (grüne Ellipse). Verlängerung des Primers durch DNA-Polymerase (blauer Kreis). Nucleotid-Addition der Primase und DNA-Polymerase unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) in 5'->3' Richtung. Parentaler und komplementärer DNA-Einzelstrang sind antiparallel orientiert.

DNA-Polymerasen können die DNA-Doppelstrangsynthese nicht *de novo* beginnen, weil sie nur an Matrizen-DNA gepaarte RNA- oder DNA-Fragmente verlängern können (8). Diese RNA- oder DNA-Fragmente, meist Oligonukleotide, werden Primer (deutsch: Starter) genannt, weil durch sie die DNA-Doppelstrangsynthese begonnen wird (1).

Primaseaktivität wurde 1977 erstmals von Eberhard Scherzinger und Erich Lanka nachgewiesen (1). Primasen sind nicht prozessive DNA-Matrizen abhängige DNA- oder RNA-Polymerasen und synthetisieren *de novo* entweder kurze RNA- oder DNA-Primer komplementär zum Matrizen-DNA-Einzelstrang in 5'→3' Richtung (8). Die Addition von Ribonukleosid-5'-triphosphaten (NTP) oder dNTPs erfolgt unter Abspaltung von Pyrophosphat (8).

1.2 Katalytischer Mechanismus der Nukleotid-Addition von Polymerasen. Thomas Steitz postulierte 1998 einen gemeinsamen katalytischen Mechanismus für alle RNA- und DNA-Polymerasen auf Grundlage bekannter dreidimensionaler DNA-Polymerasestrukturen (9). Abbildung 1.2 zeigt die Addition eines dNTPs an einen DNA-Primer.

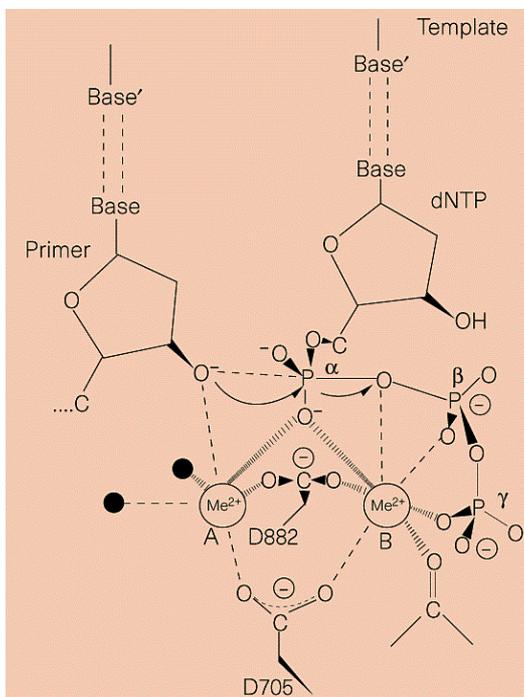


Abbildung 1.2: Katalytischer Mechanismus der Addition von Nukleotiden durch Polymerasen. Der von Thomas Steitz vorgeschlagene Mechanismus am Beispiel des von Doublé et al aufgeklärten DNA-Polymerase DNA-Komplexes (10). Zwei divalente Metallionen (Me) A und B werden unter Beteiligung der Aspartate (D) 705 und 882 der DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 koordiniert. Die schwarzen Kreise sind Wasser-Moleküle, die an Metallion A gebunden sind. Die Abbildung wurde entnommen aus (10).

Drei in allen DNA-Polymerasestrukturen konservierte Aspartate sind an der Koordination von zwei katalytisch aktiven divalenten Metallionen beteiligt. Metallion A

katalysiert den nukleophilen Angriff des 3'-OH Endes des DNA-Primers auf das α -Phosphat des eingehenden dNTPs. Metallion B hilft das dNTP neben dem DNA-Primer zu positionieren und erleichtert möglicherweise den Abgang des Pyrophosphates.

1.3 Mechanismus der Primersynthese. Ein allgemeiner hypothetischer Mechanismus der Primersynthese, der in fünf Schritte unterteilt ist (Abbildung 1.3), wurde von Charles C. Richardson aufgestellt (2).

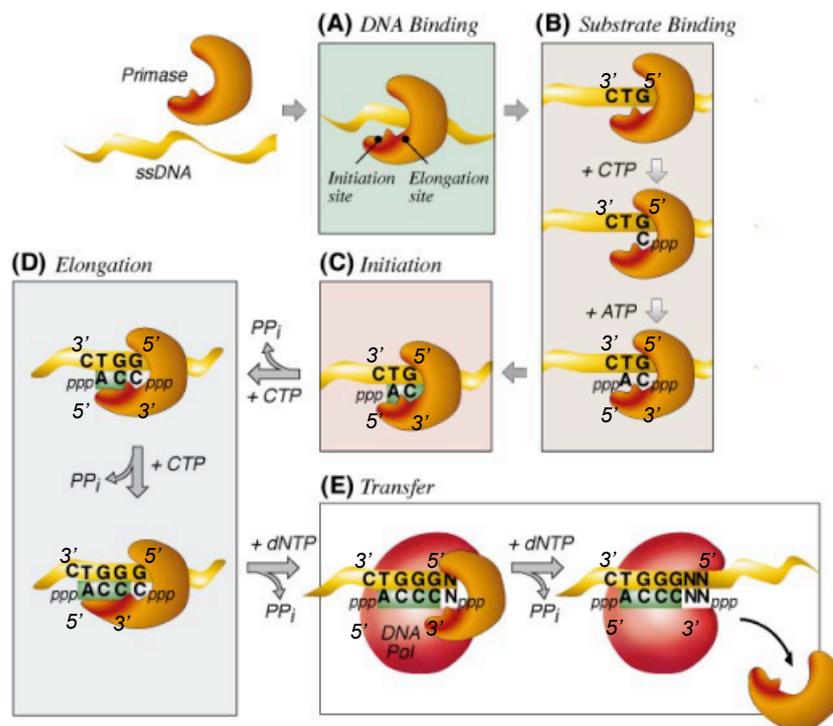


Abbildung 1.3: Mechanismus der Primersynthese. Der von Charles C. Richardson vorgeschlagene Mechanismus der Primersynthese am Beispiel der Primase des Bakteriophagen T7. Orange: T7 Primase. Rot: DNA-Polymerase T7. Gelb: Matrizen-DNA-Einzelstrang mit spezifischer DNA-Erkennungssequenz (5'-GTC-3') der T7 Primase. Der Primersynthese-Mechanismus anderer Primasen unterscheidet sich in der Primase DNA-Erkennungssequenz der jeweiligen Primase, im Gebrauch von (d)NTPs, Primersequenz, Primerlänge und in der DNA-Polymerasespezifität. Die Abbildung wurde entnommen aus (2).

Zuerst bindet die Primase an eine spezifische einzelsträngige DNA-Erkennungssequenz (A). Nachfolgend werden zwei (d)NTPs gebunden (B). Das erste (d)NTP bindet an eine Elongationsstelle und wird später als zweites (d)NTP in den Primer inkorporiert. Das nachfolgende (d)NTP bindet an die Initiationsstelle und wird später das erste Nukleotid am 5'-Ende des Primers. Die Primersynthese beginnt durch die Verknüpfung der beiden

gebundenen (d)NTPs zum Dinukleotid unter Abspaltung von Pyrophosphat (C). Das wachsende Oligonukleotid besetzt die Initiationsstelle. An der Elongationsstelle werden weitere (d)NTPs an das 3'-Ende des Primers addiert (D). Der fertige RNA- oder DNA-Primer wird an eine für die jeweilige Primase spezifische DNA-Polymerase „übergeben“, die dNTPs an das 3'-Ende des Primers anhängt.

1.4 IncQ-Plasmide als Modellsysteme. In der vorliegenden Arbeit wurde die Primase RepB[‘] des Plasmids RSF1010 der Inkompatibilitätsgruppe Q (englisch: Incompatibility, Abkürzung Inc) untersucht, weil Plasmide dieser Gruppe ein einfaches Modell für die Initiation der DNA-Replikation bieten (Punkt 1.6). IncQ-Plasmide kodieren ein konserviertes Replikationsrückgrat (Punkt 1.5) und eine Vielzahl verschiedener Antibiotika. Eine Besonderheit der von IncQ-Plasmiden kodierten Primasen ist, dass sie auch am Prozess der konjugativen DNA-Replikation beteiligt sind (Punkt 1.7). IncQ-Plasmide besitzen ein konserviertes Mobilisierungssystem, das zu ihrer Verbreitung beiträgt (Punkt 1.5). Bis heute werden fortlaufend neue IncQ-Plasmide aus einer großer Vielfalt von Bakterien aus unterschiedlichen Lebensräumen isoliert- darunter Enterobakterien, Pseudomonaden, Proteobakterien, Firmicutes, Actinomyceten und Cyanobakterien (11). RSF1010 wurde in mehr als 30 Gram-negativen und zwei Gram-positiven Bakterien gefunden (10, 11). Die am besten untersuchten Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe Q sind die nahezu identischen Plasmide RSF1010, R1162 und R300B (15).

1.5 Genstruktur des Plasmids RSF1010. RSF1010 (8684bp) weist eine komplexe Genstruktur mit überlappenden Genen auf (Abbildung 1.4), die an Replikation, Mobilisierung und Genregulation von RSF1010 beteiligt sind (16). Die Primase RepB[‘] (35,9 kDa) wird innerhalb des *mobA*-Gens von RSF1010 kodiert. RepB[‘] wird entweder im Leseraster des *mobA*-Gens über einem internen Translationsstart eigenständig oder als C-terminale Domäne des Relaxase-Primase Fusionsproteins MobA (78 kDa) exprimiert (Abbildung 1.4). Relaxase und Primase Domäne des Mobilisierungsproteins MobA werden über etwa 200 Aminosäuren verknüpft, die einen vermutlich unstrukturierten Polypeptid-Linker bilden, da innerhalb der kodierenden DNA-Sequenz des Aminosäurelinkers das Mobilisierungsprotein MobB in unterschiedlichem Leseraster zu MobA kodiert wird (16).

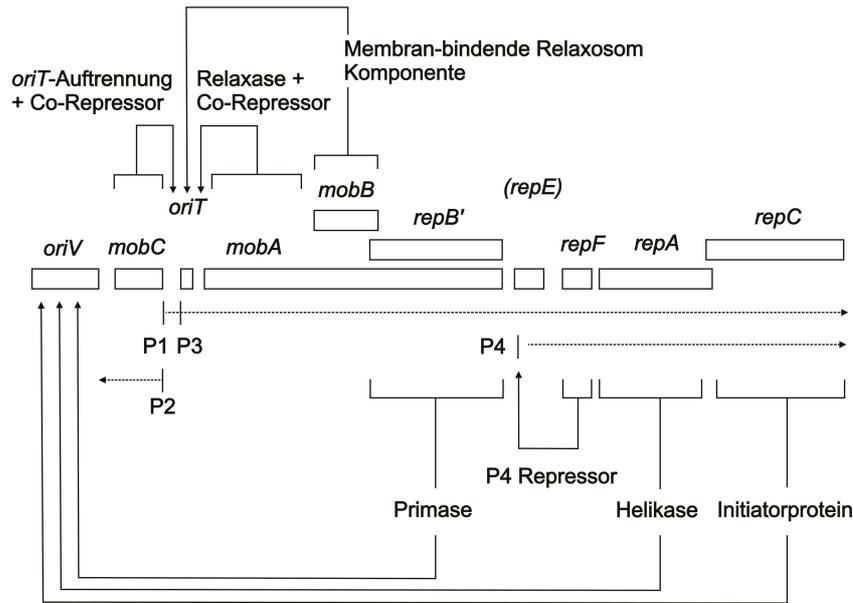


Abbildung 1.4: Komplexe Genstruktur der von RSF1010 kodierten Proteine, die an DNA-Replikation, Mobilisierung und Regulation der Genexpression beteiligt sind. Balken: Replikationsursprung *oriV* (englisch: *origin of vegetative replication*), DNA-Transferabschnitt *oriT* und Gene von RSF1010. Gestrichelte Linien: Transkripte der Promotoren P1-P4. Pfeile zeigen, wo die Genprodukte wirken. Die Abbildung wurde aus (14) entnommen und modifiziert.

Die Transkription der von RSF1010 kodierten Replikationsproteine RepA, RepB' und RepC wird von den Promotoren P1-P3 durch Bindung von MobA und MobC an den DNA-Transferabschnitt *oriT* (englisch: *origin of transfer*) negativ reguliert (16, 17).

1.6 RSF1010 repliziert im *leading strand* Modus. Die Replikationsproteine Helikase RepA, Primase RepB' und Initiatorprotein RepC initiieren die Replikation von RSF1010 (Abbildung 1.5 A). An den weiteren Schritte der RSF1010-Replikation sind Helikase RepA und Replikationsproteine des Wirtes (z.B. *E. coli*) beteiligt wie zum Beispiel DNA-Polymerase III und DNA-Einzelstrang bindende Proteine (18, 19).

Die RSF1010-Replikation beginnt im 396 bp langen Replikationsursprung *oriV* (englisch: *origin of vegetative replication*), der alle strukturellen Bedingungen zur Initiation der Replikation von RSF1010 erfüllt. Drei und eine halbe aufeinanderfolgende Sequenzwiederholungen (*direct repeats*) von 20 bp bzw. 10 bp und ein AT-reicher Abschnitt liegen 60 bp voneinander entfernt im *oriV* von RSF1010.

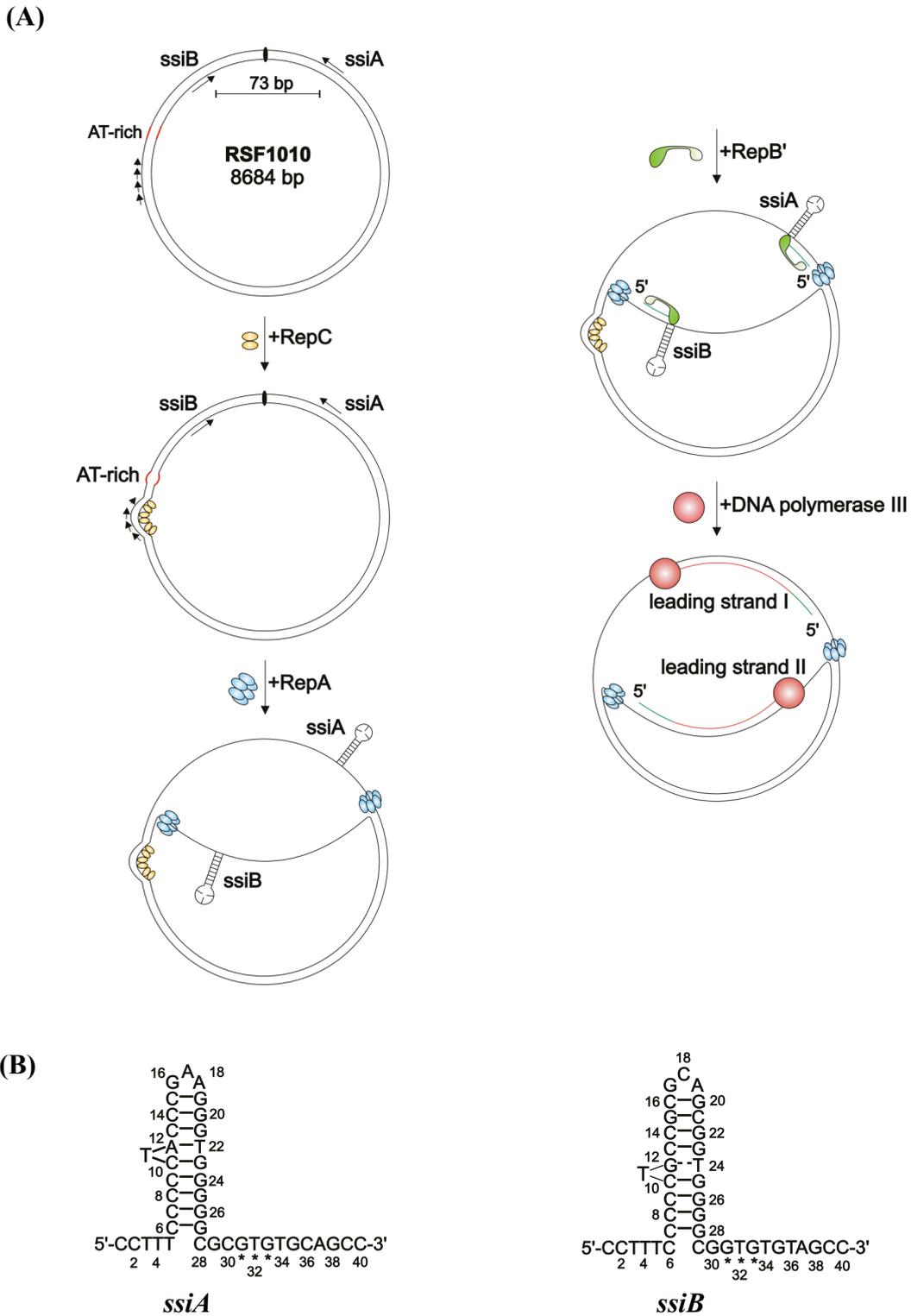


Abbildung 1.5: (A) **Initiation der Replikation des Plasmides RSF1010.** Nicht alle an der RSF1010-Replikation beteiligten Wirts-Replikationsproteine wurden in das Schema eingezeichnet, weil nur das Prinzip der Initiation der DNA-Replikation durch die von RSF1010 kodierte Replikationsproteine RepA (blau), RepB' (grün) und RepC (gelb) verdeutlicht werden soll. DNA-Polymerase III des Wirtes (rot). Die Anzahl der an die drei-einhalb direkten Sequenzwiederholungen (vier in dieselbe Richtung weisende

Pfeile) im *oriV* von RSF1010 bindenden RepC-Dimere ist unbekannt. Der mit *AT-rich* bezeichnete DNA-Abschnitt enthält viele Adenin- und Thyminbasen. **(B) Die im *oriV* von RSF1010 liegenden RepB'-Erkennungssequenzen *ssiA* und *ssiB*.** Faltung der *ssi* (*single strand initiator*)-DNA-Segmente A und B nach Vorschlag von Honda et al (22). Drei Sterne unter den Nukleotiden 31-33 kennzeichnen den von Lin und Meyer vorgeschlagenen Startpunkt der Primersynthese von RepB' (23).

Zwei einzelsträngige, invertierte Sequenzwiederholungen *ssiA* (*ssi*, englisch: *single strand initiator*) und *ssiB* besitzen eine Länge von jeweils 40 bp und werden 73 bp voneinander entfernt auf komplementären DNA-Einzelsträngen im *oriV* gefunden. *SsiA* und *ssiB* formen ein Palindrom (Abbildung 1.5 A, B). Im ersten Schritt der RSF1010-Replikation binden ein oder mehrere Homodimere des Initiatorproteins RepC an die dreieinhalb Sequenzwiederholungen, wodurch die DNA an dieser Stelle bis zu 75° gebogen wird (20, 21). Im *oriV* von RSF1010 befindlicher, noch nicht bestimmter DNA-Abschnitt wird ebenfalls von RepC gebunden, so dass vermutlich eine DNA-Schleife geformt wird, in der die AT-reiche Region liegt (21). Infolge der DNA-Deformierung wird der AT-reiche Abschnitt destabilisiert (24) und dient der hexameren DNA-Helikase RepA als Eintrittspunkt, um die DNA-Doppelhelix von RSF1010 in zwei DNA-Einzelstränge in entgegengesetzte Richtungen unter ATP-Verbrauch zu entwinden (25-27). Die invertierten einzelsträngigen Sequenzwiederholungen von *ssiA* und *ssiB* bilden wahrscheinlich nach Entwindung des DNA-Doppelstranges durch RepA Haarnadelschleifen aus (Abbildung 1.5 B). Die Primase RepB' initiiert jeweils an den exponierten einzelsträngigen DNA-Sequenzen *ssiA* und *ssiB* DNA-Komplementärstrangsynthese, die von der DNA-Polymerase III des Wirtes (z.B. *E. coli*) ausgeführt wird (18, 19).

RSF1010 wird ausschließlich im *leading strand* Modus repliziert, weil seine Replikation von den auf komplementären DNA-Einzelsträngen liegenden *ssiA* und *ssiB* Sequenzen absolut abhängig ist (22, 23, 28-33), die jeweils nur einmal auf RSF1010 kodiert werden (16). Das Replikationssystem von RSF1010 unterscheidet sich darin von den Replikationssystemen seiner Wirtsbakterien (z.B. *E. coli*), die im *leading* und im *lagging strand* (deutsch: nachfolgender/zurückbleibender Strang) Modus repliziert werden (7). Primaseaktivität ist im *lagging strand* Modus periodisch an spezifischen Primase DNA-Erkennungssequenzen zur Initiation von Okazaki-Fragmenten am *lagging* DNA-Einzelstrang erforderlich (Abbildung 1.6) (34). In *E. coli* wird die periodische Primersynthese der DnaG-Primase am *lagging* DNA-Einzelstrang über

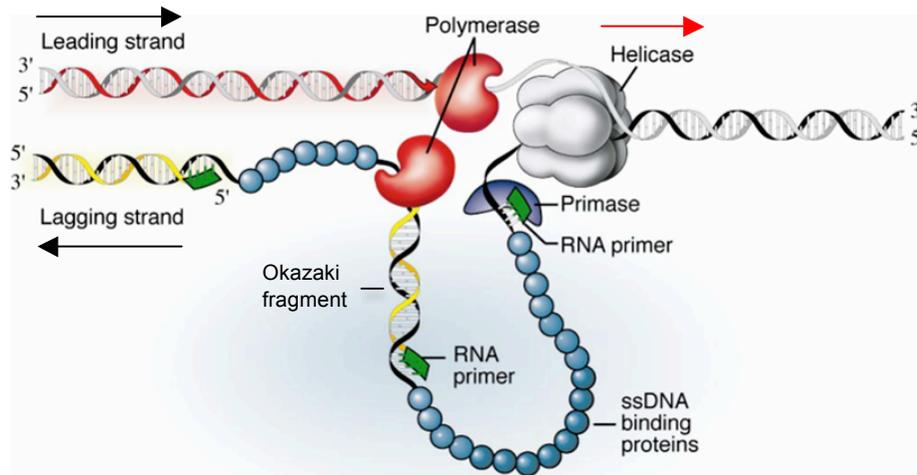


Abbildung 1.6: Chromosomale Replikation des RSF1010 Wirtsbakterium *E. coli* im leading und lagging strand Modus. Aufgrund der antiparallelen Orientierung des DNA-Doppelstranges findet die DNA-Komplementärstrangsynthese ($5' \rightarrow 3'$) der parentalen DNA-Einzelstränge in entgegengesetzte Richtungen statt (schwarze Pfeile). Am *leading* DNA-Einzelstrang ist nur ein Primer zur Initiation der DNA-Replikation notwendig (nicht abgebildet), weil sich die Replikationsgabel (roter Pfeil), an deren Spitze sich die Helikase (grau) befindet, und die DNA-Komplementärstrangsynthese (roter DNA-Einzelstrang) in die gleiche Richtung bewegen. Am *lagging* DNA-Einzelstrang müssen Primer (grün) zur Initiation des DNA-Komplementärstranges (gelber DNA-Einzelstrang) periodisch synthetisiert werden, weil sich die Replikationsgabel entgegengesetzt zur DNA-Komplementärstrangsynthese ($5' \rightarrow 3'$) des *lagging* DNA-Stranges bewegt. Die Abbildung wurde entnommen aus (2).

Interaktion mit der DnaB-Helikase reguliert (35), weil DnaG-Primase und DnaB-Helikase einen Replikationskomplex bilden (36) (Abbildung 1.6). Am *leading* DNA-Strang wird dagegen nur ein Primer benötigt (34). Eine mögliche Interaktion zwischen RepA und RepB' (analog zu DnaG-Primase und DnaB-Helikase) wurde durch Quervernetzungsstudien untersucht, konnte aber nicht festgestellt werden (37).

1.7 Mobilisierung von RSF1010 durch bakterielle Konjugation. Während der bakteriellen Konjugation kann RSF1010 vom Wirtsbakterium auf eine Rezipientenzelle übertragen werden (38, 39). Der Transfer von RSF1010 wird durch unterschiedliche Typ-4 Sekretionssysteme (T4SS) (14, 40, 41) und ein von RSF1010 kodiertes Mobilisierungssystem ermöglicht (16, 38, 39). Typ-4 Sekretionssysteme werden z.B. von Helferplasmiden wie Plasmid RP4 kodiert (42). Das Mobilisierungssystem von RSF1010 besteht aus den Mobilisierungsproteinen MobA (78 kDa), MobB (15,1 kDa) und MobC (10,8 kDa) (16), die einen Komplex (Relaxosom) formen (43) und einem

von RSF1010 kodierten, 38 Basenpaare (bp) langen DNA-Transferabschnitt *oriT* (englisch: *origin of transfer*) (44). Die N-terminale Relaxase Domäne von MobA katalysiert einen DNA-Einzelstrangbruch an einer spezifischen Schnittstelle im *oriT* von RSF1010 (43, 45) und bindet kovalent an das 5'-Ende des unterbrochenen DNA-Einzelstranges von RSF1010. Nach Transport über das T4SS in die Rezipientenzelle katalysiert die Relaxase Domäne von MobA den Ringschluss des linearen RSF1010-Einzelstranges (45). Zum Transport des MobA-ssRSF1010 Komplexes sind das Membran-assoziierte Mobilisierungsprotein MobB und vier Transportsignale essentiell, von denen sich zwei auf der Relaxase Domäne und zwei auf der Primase Domäne von MobA befinden (46). Die Transportsignale auf RepB' bestehen aus den Aminosäuren ¹⁹⁴QRQEKAR²⁰¹ und ²⁷⁵KPGHEADYIERTVSKVMGLPSVQLARAELARAPAPRQRGMDRGGPDFSM³²³ (RepB'-Nummerierung) (40, 46). Die Funktion von RepB' als Primase Domäne von MobA besteht wahrscheinlich darin, nach Transfer und Ringschluss des einzelsträngigen, linearen RSF1010, die DNA-Komplementärstrangsynthese von RSF1010 in der Rezipientenzelle einzuleiten (47, 48), da MobA wie RepB' DNA-Komplementärstrangsynthese an RSF1010 zu initiieren vermag (19).

1.8 Primase RepB' - ein hochspezialisiertes essentielles Replikationsenzym.

Primaseaktivität von RepB' wurde *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen. *In vitro* wurde die DNA-Komplementärstrangsynthese an zwei einzelsträngigen zirkulären M13-Derivaten im Zellextrakt von *E. coli* untersucht, die jeweils einen der komplementären DNA-Einzelstränge des *oriV* von RSF1010 enthielten (19, 37). DNA-Komplementärstrangsynthese an einzelsträngigen M13*oriV*-Derivaten wurde nur in Gegenwart von RepB' und eines *oriV*-Einzelstranges von RSF1010 beobachtet. Nachfolgende Studien zeigten, dass RepB' an zwei spezifischen, 40nt langen DNA-Einzelstrangsegmenten *ssiA* und *ssiB* aktiviert wird (30, 32, 33), die im *oriV* von RSF1010 auf komplementären DNA-Einzelsträngen liegen (Abbildung 1.5 A, B).

In vivo wurde untersucht, ob zur Replikation unfähige M13-Derivate, in die entweder *ssiA* oder *ssiB* molekular kloniert worden waren, in *E. coli* repliziert werden können. Die M13*ssi*-Derivate wurden nur erhalten, wenn RepB' unversehrt koexprimiert wurde (31). Aufgrund der komplexen zur Initiation der RSF1010-Replikation erforderlichen *ssi*-Erkennungssequenzen (Abbildung 1.5 B) handelt es sich bei RepB' um ein hochspezialisiertes Enzym.

1.9 Unterteilung bekannter Primase-Raumstrukturen in zwei Klassen. Die bekannten Primase-Raumstrukturen lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Die erste Klasse von Raumstrukturen enthält Primasen des DnaG-Typs aus Bakterien -benannt nach der DnaG-Primase aus *E. coli*- und des Phagen T7. Die zweite Klasse von Raumstrukturen enthält heterodimere Primasen des Pri-Typs aus thermophilen Archaeobakterien. Beide Klassen von Primase-Raumstrukturen unterscheiden sich in Faltung und Aufbau (Punkte 1.10 und 1.11). So bestehen DnaG-Typ Primasen aus einer Polypeptidkette, während Pri-Typ-Primasen aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit bestehen. Primasen beider Klassen besitzen Zink-Bindungsstrukturen und im aktiven Zentrum drei konservierte katalytische Aspartate.

1.10 Raumstrukturen von DnaG-Typ Primasen bestehen aus drei Domänen. Primase-Raumstrukturen des DnaG-Typs weisen untereinander konservierte N-terminale *Zink-Ribbon*- (49-51) und RNA-Polymerase Domänen (50-53) auf, aber unterschiedliche C-Termini (51, 52, 54, 55). DnaG-Typ Primasen ohne zusätzliche Helikasefunktion wie z.B. die DnaG-Primase aus *E. coli* interagieren über eine helikale C-terminale Domäne (51, 52, 55) mit replikativen Helikasen. Die C-terminale Domäne der Primase des Phagen T7 ist dagegen eine Helikase (54).

Die Raumstrukturen der DnaG-Typ Primasen des Bakteriophagen T7 (Abbildung 1.7A) und aus *Aquifex aeolicus* (51) (nicht abgebildet) zeigen, dass die RNA-Polymerase Domänen über unstrukturierte flexible Aminosäurelinker mit der N-terminalen *Zink-Ribbon* Domänen verbunden sind. NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)- und FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Studien demonstrierten, dass DnaG-Typ Primasen aus *E. coli* und des Bakteriophagen T7 sowohl in offener als auch in geschlossener Konformation vorkommen (50, 51). Die Konformationsänderung der DnaG-Typ Primasen wird durch den flexiblen Aminosäurelinker zwischen RNA-Polymerase- und *Zink-Ribbon* Domäne ermöglicht, der z.B. in der T7 Primase aus 26 Aminosäuren besteht (50). In der geschlossenen aktiven Form wechselwirken die zuvor voneinander getrennten RNA-Polymerase und Zink-Bindungs Domäne mit der einzelsträngigen DNA-Matrize- und/oder dem RNA-Primer (50).

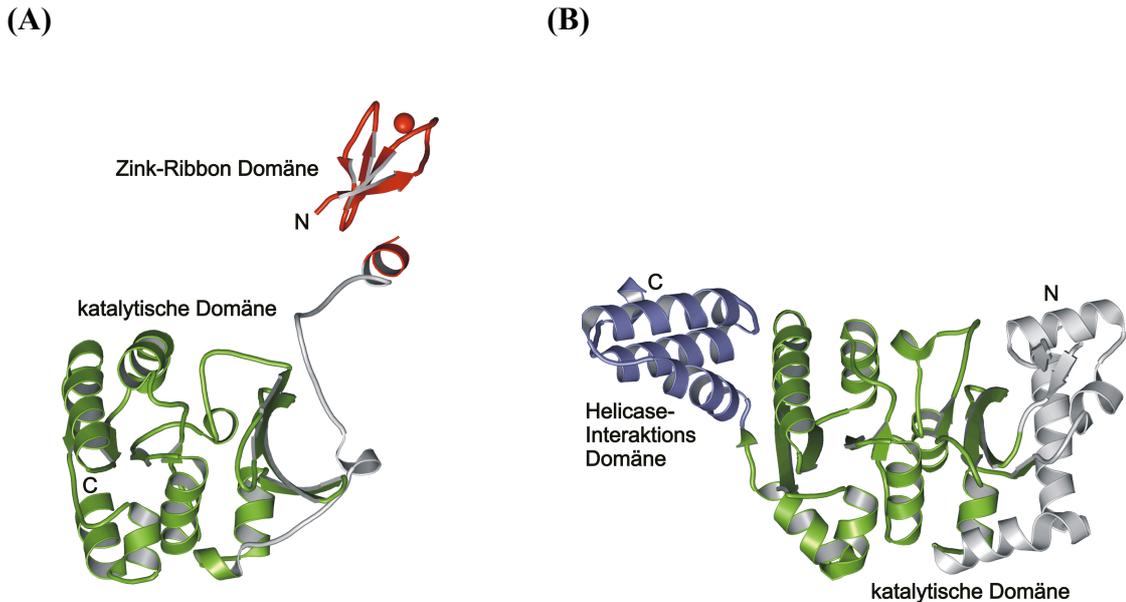


Abbildung 1.7: Raumstrukturen von DnaG-Typ Primasen. Die Faltung der katalytischen Zentren der DnaG-Typ Primasen des Bakteriophagen T7 (A) und aus *E. coli* (B) ist konserviert (grün) und enthält das TOPRIM-Motiv (56). **(A) T7 Primase des Bakteriophage T7.** Grün: katalytische Domäne. Rot: Zink-Ribbon Domäne. Rote Kugel: Zink-Ion. Die Raumstruktur der Helikase am C-Terminus fehlt. **(B) Katalytische und Helikase-Interaktions Domäne der DnaG-Primase aus *E. coli*.** Grün + grau: katalytische Domäne. Die Zink-Ribbon Domäne der DnaG-Primase konnte nicht kristallisiert werden. Blau: Helikase-Interaktions Domäne.

1.11 Die Zink-Ribbon Domäne ist essentiell für DnaG-Typ Primaseaktivität. Das Zink-Ion der unter DnaG-Typ Primasen konservierten Zink-Ribbon Domäne wird von Cysteinen und Histidinen koordiniert (49-51). Das Zink-Ion selbst besitzt wahrscheinlich keine katalytische Funktion, weil die Entfernung des Zink-Ions aus der Zink-Ribbon Domäne durch p-(Hydroxymercuri)-benzolsulfonat die Primersynthese der DnaG-Primase aus *E. coli* nicht beeinflusst (57). Dagegen inaktiviert die Substitution eines der vier Cysteine des Zink-Ribbon Motivs durch ein Serin die Primersynthese der T7 Primase (58). *In vitro* -und *in vivo* Studien belegen, dass die T7 Primase über die Zink-Bindungsdomäne den Matrizen-DNA-Einzelstrang spezifisch erkennt (59).

Primersynthese-Studien an Derivaten der T7 Primase mit verkürzten Aminosäurelinkern zeigten, dass zur Initiation und Extension des RNA-Primers katalytische und Zink-Ribbon Domäne erforderlich sind (60). Die isolierte Zink-Ribbon Domäne stimuliert außerdem die DNA-Komplementärstrangsynthese durch T7 DNA-Polymerase, indem sie den RNA-Primer vermutlich „festhält“ und so vor Abdissoziation von der Matrizen-DNA bewahrt, bevor die T7 DNA-Polymerase den RNA-Primer verlängert hat (50,

61). Primersynthese-Studien an linearen einzelsträngigen DNA-Matrizen zeigten, dass die Zink-*Ribbon* Domäne der DnaG-Primase aus *E. coli* die RNA-Primerlänge reguliert und zur spezifischen Erkennung der Primerinitiationssequenz auf der Matrizen-ssDNA beiträgt (51).

1.12 Die RNA-Polymerase Domäne- das katalytische Zentrum der DnaG-Typ Primasen. Die RNA-Polymerase Domänen der DnaG-Typ Primasen zeichnet sich durch ein TOPRIM-Faltungsmotiv auf (TOPRIM= Topoisomerase Primase), das auch in den aktiven Zentren von TypIA und TypII Topoisomerasen und mehreren Phosphoryltransferasen vorgefunden wird (56). In der RNA-Polymerase Domäne von DnaG-Typ-Primasen sind drei Aspartate konserviert (50-53), die dazu beitragen, zwei divalente katalytische Metallionen zu koordinieren (50, 62). Zwei der drei Aspartate werden durch eine Aminosäure getrennt und bilden ein charakteristisches DXD-Motiv aus, das auch in Pri-Typ Primasen vorgefunden wird.

1.13 Pri-Typ Primasen bestehen aus zwei Komponenten. Die zweite Klasse von Primase-Raumstrukturen besteht aus heterodimeren Pri-Typ Primasen aus thermophilen Archaeobakterien, die sich aus einer kleinen katalytischen (PriS) und einer großen regulatorischen Untereinheit (PriL) zusammensetzen. Die strukturell aufgeklärten Pri-Typ Primasen zeigen Aminosäuresequenzhomologie zur kleinen und großen Primase-Untereinheit der eukaryontischen heterotetrameren Polymerase α (63-65), einem replikativen Primase-Polymerasekomplex (66, 67).

Dreidimensionale Strukturen sind von den PriS-Untereinheiten aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (64), *Pyrococcus horikoshii* (Pho) (63), *Sulfolobus solfataricus* (Sso) (65) bekannt sowie von den N-terminalen Domänen der PriL-Untereinheiten der *Pho*- und *Sso*-Primase (65, 68). PriS-Raumstrukturen zeigen katalytische Domänen mit konservierter „gemischter α - β -Faltung“ (63-65, 69), die ebenfalls in nicht prozessiven Polymerase Domänen von Ligasen gefunden werden (70, 71). Die PriS-Untereinheiten der Pfu- und Pho-Primasen weisen zusätzliche Helix-Bündel Domänen mit unbekannter Funktion auf. Das gemischte α - β -Faltungsmotiv der katalytischen Domänen der PriS-Untereinheiten enthält ein konserviertes DXD-Motiv zur Koordination zweiwertiger katalytischer Metallionen und - im Gegensatz zu den strukturell verwandten Polymerase Domänen aus Ligasen - Zink-Gelenk oder Zink-Schleifen Strukturen im katalytischen

Zentrum (63-65) (Abbildung 1.8A, B). Die Position der Zinkbindungsstrukturen variiert um den konservierten Kern der katalytischen Domäne der PriS-Untereinheiten (Abbildung 1.8A, B).

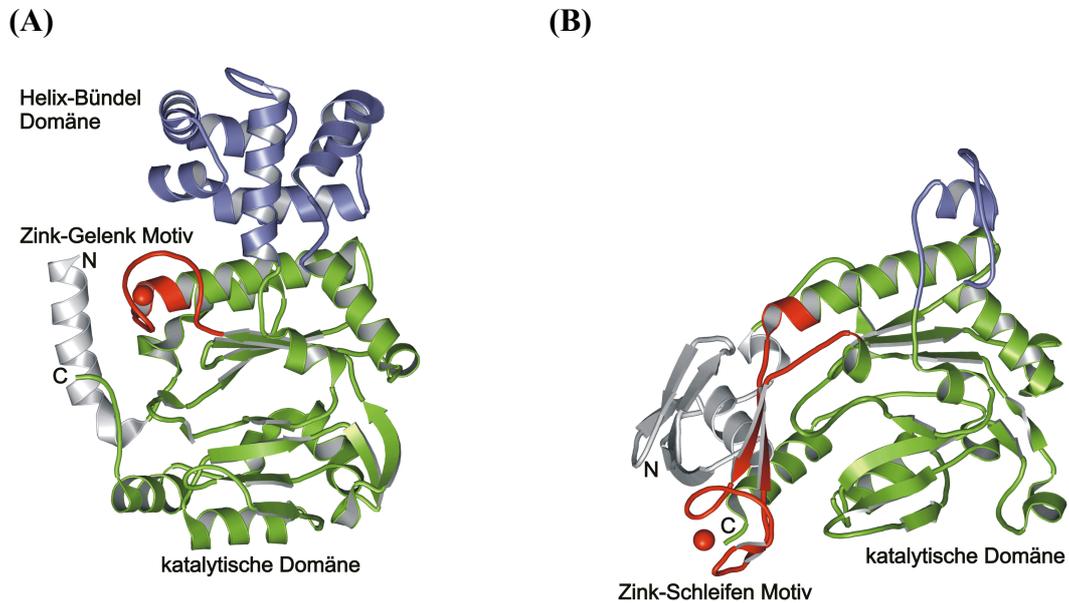


Abbildung 1.8: Raumstrukturen der katalytischen PriS-Untereinheiten von Pri-Typ-Primasen. Die Faltung der katalytischen Domänen ist unter Pri-Typ Primasen konserviert (grün) bis auf die N-Termini (grau) und die Zinkbindungsstrukturen (rot). **(A) Katalytische Untereinheit der PriS-Untereinheit der Pfu-Primase aus *Pyrococcus furiosus*.** Grün, rot, grau: katalytische Domäne. Rot: Zink-Gelenk Motiv und Zink-Ion (Kugel). Blau: Helix-Bündel Domäne. **(B) Katalytische Untereinheit der PriS-Untereinheit der Sso-Primase aus *Sulfolobus solfataricus*.** Grün, rot, grau: katalytische Domäne. Rot: Zink-Schleifen Motiv und Zink-Ion (Kugel). Blau: Vermutlich rudimentärer evolutionärer Rest einer Helix-Bündel Domäne.

Die Funktion der Zinkbindungsstrukturen von Pri-Typ Primasen wurde nur an der Sso-Primase untersucht (65). Die Zink-Schleifenstruktur der Sso-Primase ist nicht essentiell für die Primersynthese im Gegensatz zu den Zink-Ribbon Domänen der DnaG-Primasen (Punkt 1.11). Die Substitution der 18 Aminosäuren langen Zink-Schleifen Struktur der Sso-Primase durch eine verkürzte Ser-Asn-Gly-Schleife, die kein Zink-Ion koordinieren kann, erhöht die Primaseaktivität und bewirkt die Produktion kürzerer RNA-Primer von 30-100 nt Länge (65). Es wurde vorgeschlagen, dass die Zink-Schleifen Struktur der Sso-Primase die Bindung der einzelsträngigen Matrizen-DNA entlang des katalytischen Zentrums unterstützen könnten (65).

Die PriL-Untereinheiten wurden an den Pri-Typ Primasen Sso und Pho untersucht. PriL-Untereinheiten stimulieren die Primersynthese der Primasen Sso und Pho. So hat die isolierte PriS-Untereinheit der Pho-Primase nur geringe Primersyntheseaktivität im Vergleich zum PriS-PriL Primasekomplex (72), und Mutationen auf der PriL-Untereinheit der Sso-Primase reduzieren die Primersyntheserate (65). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Primaseaktivität der PriS-Untereinheiten vom Zink-Bindungsmotiv und der PriL-Untereinheit beeinflusst wird.

1.14 Primase-DNA-Strukturen lassen mechanistische Schlüsse zu. Die Raumstruktur der katalytischen Domäne der DnaG-Primase wurde im unspezifischen Komplex mit einzelsträngiger DNA ohne Primase-Erkennungssequenz bestimmt (73) (Abbildung 1.9).

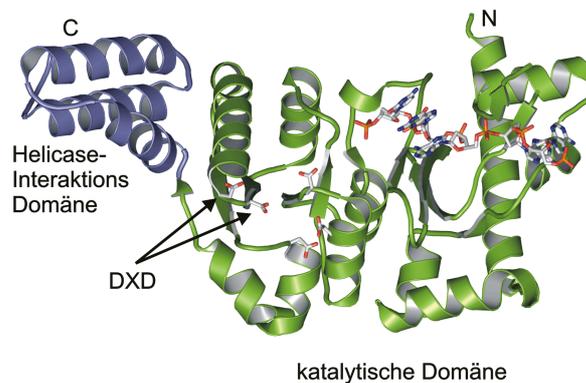


Abbildung 1.9: Katalytische Domäne der DnaG-Primase aus *E. coli* im Komplex mit einzelsträngigem DNA-Heptamer (73). Blau: Helikase-Interaktions Domäne. Grün: Katalytische Domäne. Einzelsträngiges DNA-Heptamer als graues Stabmodell. DXD: Konserviertes Aspartat-Motiv in DnaG-Typ Primasen beteiligt an der Koordination von 2 divalenten katalytischen Metallionen (in dieser Raumstruktur nicht gebunden).

Der Primase-DNA-Komplex wurde durch Quervernetzung mit Glutardialdehyd zwischen einzelsträngiger DNA und einem per DNA-Mutagenese in die katalytische Domäne eingeführten Cystein stabilisiert. Der Primase-DNA-Komplex zeigt, dass die einzelsträngige DNA über ihr Phosphatrückgrat an eine basische Region der N-terminalen Unterdomäne der DnaG-Primase gebunden wird - abseits der katalytischen Aminosäuren auf der C-terminalen Unterdomäne. Es wurde vorgeschlagen, dass die Funktion der identifizierten DNA-Bindungsstelle darin besteht, einzelsträngige DNA unspezifisch „einzufangen“ und in Richtung des katalytischen Zentrums zu führen.

Mutationsstudien demonstrierten, dass basische Aminosäuren, die an der unspezifischen DNA-Bindung beteiligt sind, die katalytische Aktivität der DnaG-Primase herabsetzen (73). Raumstrukturen von Pri-Typ Primase-DNA-Komplexen sind nicht vorhanden.

1.15 Biochemische Eigenschaften von Pri- und DnaG-Typ Primasen: Primersynthese, DNA-Erkennung. Archaeobakterielle Pri-Typ Primasen wurden als Primasen klassifiziert, weil sie *in vitro* an einzelsträngigen DNA-Matrizen *de novo* RNA- oder DNA-Fragmente synthetisieren. Ob Pri-Typ Primasen an der chromosomalen Replikation von Archaeobakterien beteiligt sind, wurde nicht untersucht. Aufgrund der Aminosäuresequenzhomologie zu kleinen und großen Primase-Untereinheiten der eukaryontischen heterotetrameren Polymerase α (66, 67), einem replikativen Primase-Polymerasekomplex, wird angenommen, dass archaeobakterielle Primasen die Replikation des archaeobakteriellen Chromosoms initiieren (74). Allerdings konnten keine orthologen Gene für Polymerase α und die B-Untereinheit des eukaryontischen tetrameren Primase-Polymerasekomplexes in Archaeobakterien identifiziert werden (74). Eine spezifische DNA-Erkennungssequenz für archaeobakterielle Pri-Typ Primasen - wie sie für prokaryontische oder Plasmid-kodierte Primasen existiert - wurde bislang nicht gefunden (Tabelle 1.1). Allerdings sind DNA-Erkennungssequenzen eukaryontischer replikativer Primasen degeneriert (Tabelle 1.1, (2)). Archaeobakterielle Pri-Typ Primasen synthetisieren DNA- oder RNA-Fragmente mit einer Länge von bis zu 7000 nt, was untypisch für bekannte eubakterielle und eukaryontische replikative Primasen ist, deren Primerprodukte zwischen 3 und 14 Nukleotiden Länge schwanken (Tabelle 1.1) (2).

Prokaryontische Primasen aus *E. coli*, des Bakteriophagen T7 und der Plasmid kodierten Primase ColEI erkennen in der Regel spezifische DNA-Sequenzen aus 3-4 Basen und synthetisieren komplementäre RNA-Primer mit einer Länge von 2-10 Nukleotiden (2). Die 3'-terminalen Basen der Primase DNA-Erkennungssequenzen sind oft kryptisch und werden nicht in den RNA-Primer eingebaut, sondern dienen den Primasen zur Erkennung ihrer spezifischen DNA-Sequenz (2).

Fazit: Primasen sind hochspezialisierte Replikationsenzyme. Primasen variieren in der DNA-Erkennungssequenz, im Gebrauch von (d)NTPs, Primersequenz, Primerlänge und Wechselwirkung mit anderen Replikationsproteinen wie Helikasen und DNA-Polymerasen.

Tabelle 1.1 Vergleich biochemischer Eigenschaften verschiedener Primasen. Bei den unterstrichenen Nukleotiden handelt es sich um kryptische Nukleotide, die nicht in die Primersequenz eingebaut werden, aber zur DNA-Sequenzerkennung notwendig sind. Abkürzungen/Zeichen: *P.*, *Pyrococcus*; *S.*, *Sulfolobus*; -, nv, nicht vorhanden.

Organismus	Gen	Mr	Primerlänge [nt]	Primersequenz	Erkennungssequenz
Bakterielle Plasmide					
RSF1010	<i>repB'</i>	35902	2-12 DNA	pppAdC(dN) ₈₋₁₀	ssiA (dN) ₄₀
ColE2	<i>rep</i>	34851	2-3 RNA	pppAGA	5'-TCT <u>G</u> -3'
Prokaryonten					
<i>Escherichia coli</i>	<i>dnaG</i>	65572	10-12 RNA	pppAG(N) ₈₋₁₀	5'-CT <u>G</u> -3'
Bakteriophage T7	<i>gene4</i>	62655	4-5 RNA	pppAC(N) ₂₋₃	5'-GT <u>C</u> -3'
Archaeobakterien					
<i>P. furiosus</i>	<i>priA</i>	40772	12-40 RNA	-	nv
	<i>priB</i>	46209	DNA	-	
<i>P. horikoshii</i>	<i>priA</i>	45949	RNA	-	nv
	<i>priB</i>	40405	DNA	-	
<i>S. solfataricus</i>	<i>priA</i>	37598	2-7000 DNA	-	Präferenz für PolyT
	<i>priB</i>	35734	<1000 RNA	-	
Eukaryonten					
<i>Homo sapiens</i>	<i>PR11</i>	49902	11-14 RNA	ppp(A/G)(N) ₈₋₁₀	nv
	<i>PR12</i>	58778			

1.16 Aufgabenstellung

Die Primase RepB' initiiert die Replikation des IncQ-Plasmides RSF1010 im *oriV* an den zwei nahezu identischen Erkennungsssequenzen *ssiA* und *ssiB*, die auf komplementären DNA-Strängen liegen. RSF1010 ist das am besten studierte IncQ-Plasmid und bietet ein einfach zu untersuchendes und beispielhaftes Replikationssystem, weil RSF1010 nur im *leading strand* Modus repliziert wird und weil die Initiation der RSF1010-Replikation durch RepB' nur an den beiden DNA-Sequenzen *ssiA* und *ssiB* erfolgt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Strukturaufklärung der Primase RepB' und eines RepB'-*ssi* DNA-Komplexes, um Einblick in die strukturellen Anforderungen der Primaseaktivität des Enzyms zu erhalten und damit zum Verständnis der Initiation der RSF1010-Replikation beizutragen. Ein Vergleich vorhandener Daten über die Initiation der Komplementärstrangsynthese sollte die Einordnung der RSF1010 Primasereaktionen in das Schema anderer Primasen ermöglichen.

2 Materialien

2.1 Geräte

Autoradiographie		
Phosphor-Scanner	Cyclone	Perkin Elmer™
Phosphor-Screen	Type MS, PPN7001722	Perkin Elmer™
Bakterienanzucht		
Brutschrank	Innova 4230	New Brunswick Scientific
Schüttler	RS-PL-28-10	Heto Lab Equipment
Schüttler	G25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Elektrophorese		
Elektrophoreseapparatur	Biometra	Biometra
Spannungsquelle	EPS 600, EPS3500	Amersham Pharmacia
Spannungsquelle	E452	Consort
Molekularbiologische Arbeiten		
Elektroporationsgerät	Easyject Prima	EquiBio
Thermocycler	Tpersonal, Trio Thermoblock	Biometra
Gel Imager		INTAS
Protein-Reinigung		
Homogenisator	EmulsiFlex-C5	Avestin
FPLC-Chromatographie-System	ÄKTA Basic	Amersham Pharmacia
Software ÄKTA Purifier	Unicorn Version 4.00	Amersham Pharmacia
Affinitätschromatographie	HiTrap™ Heparin-Säule HP 5 ml	GE Healthcare
Kationenaustausch-Chromatographie	POROS® HS 20 µm Säule	
Gelpermeation-Chromatographie	PEEK™ (10 mm x 100 mm, 7.9ml)	Applied Biosystems
Entsalzungssäule	HiLoad™ Superdex75 (XK26/16)	GE Healthcare
	Illustra™ NAP-5 Säule	GE Healthcare
Spektroskopie		
UV/Visible Spektrophotometer	Ultrospec 3100pro	Amersham Pharmacia
Photometer	Gene Quant	Amersham Pharmacia
Quarzküvetten	105.251-QS (45 µl, 3 mm)	Hellma
Plastikküvetten	K-Küvetten 407 1/1	Eppendorf
Zentrifugation		
Zentrifugen	RC-5B, RC-5C	Sorvall
5804R, 5415R		Eppendorf
Ultrazentrifuge	Cu-L8-50 Me	Beckman-Coulter
Rotoren	60 Ti	Beckman-Coulter
	GS3, GSA, HB4, SS34	Sorvall
Sonstige Geräte		
Dampfsterilisator	Varioklav	H&P LabortechnikH-
Meter	761 Calimatic	Knick
Pipetten	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml	Gilson
Reinstwasseranlage	Milli-Q Gradient Purelab Classic	Millipore
Thermomixer	5436, Thermomixer Compact	Eppendorf
Vortex Mixer	Whirlmix) Genie 2	Bender und Hobein
Waagen	AE 240	Analytic Mettler
PE3600	Acculab, Universal	Sartorius
Wasserbad	Haakel, Haake D8	Laborhandel

2.2 Materialien für die Kristallisation und Röntgen-Beugungsexperimente

Crystal-Screen I		Hampton Research
Crystal-Screen II		Hampton Research
Index-Screen		Hampton Research
PEG/Ion-Screen		Hampton Research
Schalen, 12 Vertiefungen		Nelipak bv
Schalen, 96 Vertiefungen		Greiner Bio-one
Plastikfilm	3 M	Hampton Research
Nylon-Schlaufen		Hampton Research
Deckgläser	22 x 22 mm, Stärke 2	Laborhandel

Sonstige Materialien

Entsalzungssäulen	ZipTip® -C18	Millipore
Konzentratoren	Amicon Ultra-15	Millipore
Pipettenspitzen		Greiner Bio-one
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Greiner Bio-one
Sterilfilter	0,22 µm Porengröße	Millipore

2.3 Chemikalien, Puffer, Nährmedien und -böden

Alle Chemikalien besaßen Analysequalität.

Ammoniumpersulfat (APS)		Merck
Bromphenolblau		Serva
Dithiothreitol (DTT)		AppliChem
Glycerin		Merck
Ethanol, 100%		Roth
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)		Roth
Polyethylenglykole (MW = 200-20.000 Da)		Sigma-Aldrich, Merck
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete		Roche
Roti-Phenol		Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)		Merck
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)		Sigma-Aldrich

Puffer

Herstellung der *ssiA* DNA-Haarnadelschleifen

Hybridisierungspuffer *ssiA* DNA 150 mM NaCl, 20 mM Tris/Cl (pH 7,5)

Phage M13

M13-Puffer 20 mM Tris/HCl (pH 7,6), 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA
 TS-Puffer 1 mM Tris/HCl, (pH 8,0), 1 mM NaCl

Primaseaktivitätstests

NEB-Puffer 2 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Protein-Chromatographie

Zellaufschlusspuffer 50 mM Tris/HCl (pH 7), 150 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT

Kationenaustauschchromatographie an Heparin oder Sulfopropylgruppen

Puffer A 20 mM Tris/HCl (pH 7), 50 mM MgSO₄, 1 mM DTT
 Puffer B 20 mM Tris/HCl (pH 7), 50 mM MgSO₄, 2 M NaCl, 1 mM DTT

Affinitätschromatographie an Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure

Puffer D 20 mM Hepes (pH 8), 200 mM MgCl₂, 1 mM DTT
 Puffer E 20 mM Hepes (pH 8), 200 mM MgCl₂, 1 M Imidazol, 1 mM DTT

Materialien

Größenausschlusschromatographie

Puffer C	10 mM Tris/HCl (pH 7), 150 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Puffer F	10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 0,01 mM EDTA

Elektrophoresepuffer

TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA (pH 8)
TBE-Puffer (1x)	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na ₂ (pH 8)

Nährmedien/-böden

LB (Luria-Bertani)-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	pH 7,5 (RT, 1 M NaOH)	
LBA- oder LBK-Medium	LB-Medium mit Ampicillin	100 µg/ml
LBK-Medium	LB-Medium mit Kanamycin	40 µg/ml
LBM-Medium	LB-Medium mit MgCl ₂	5 mM
TY-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Glucose (nach Autoklavieren)	1 g/l
LBA oder LBK –Agar (1,6 %)	LB-Medium mit Agar-Agar	16 g/l
	Ampicillin oder mit Kanamycin	100 µg/ml 40 µg/ml
Weichagar (0,7 %)	Agar-Agar	7 g/l
	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	MgCl ₂	5 mM
X-Gal/IPTG-Agarplatten(Ap ^R)	LB-Medium mit Agar-Agar	16 g/l
	Ampicillin	100 µg/ml
	IPTG	20 mM
	X-Gal	80 µg/ml

2.4 Bakterien- und Phagenstämme

Stamm (Firma)

E. coli-HB101 (Stratagene/Agilent)

Phenotyp

F' mcrB mrr hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44λ

E. coli-JM103 (NEB)

F' traD36 proA+ proB+ lacIq delta(lacZ)M15 delta(pro-lac) supE hsdR endA1 sbcB15 thi-1 rpsL lambda

E. coli-XL10Gold® (Stratagene/Agilent)

endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac HteΔ(mcrA)183Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]

E. coli ER2566 (NEB)

fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10

Phage M13mp18ssiA

M13mp18 RF I DNA (NEB)

Materialien

2.5 Plasmide und Oligonukleotide

RSF1010	Sm ^R , Su ^R
pJM201	<i>tac</i> -Promotor, <i>lac</i> -Repressor, Ap ^R
pET28a(+)	<i>lac</i> -Promotor, <i>lac</i> -Repressor, Km ^R

RSF1010 und pJM201 wurden von Dr. Erich Lanka (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Ihnestr. 63-73, Berlin) erhalten.

Sequenzierungsprimer		
FW Primer	5'-gcctgccctgtagtgaaacc-3'	22-mer
RV Primer	5'-cgctgcggtactcgtccag-3'	19-mer
Primer für die Amplifizierung der katalytischen (AS 1-212) und Helix-Bündel Domäne (AS 213-323) von RepB' und der katalytischen (AS 1-207) und Helix-Bündel Domäne (AS 213-323 und AS 219-323) von RepB' zur Herstellung von RepB'Δ6 und RepB'Δ12		
FW Primer <i>NdeI</i> /katDom, Δ6, Δ12	5'-tatctgcatatgaagaacgacaggactttgcagg-3'	34-mer
RV Primer 220 <i>HindIII</i> /katDom	5'-tatctgaagcttactcgcgctcgggcagttcg-3'	34-mer
RV Primer 207/Δ6, Δ12	5'-aatctggaattcgaggctggccagcctgcgggc-3'	33-mer
FV Primer 214/ Δ6	5'-aatctggaattcagccgccaccggcgacggcg-3'	33-mer
FW Primer 219/Δ12	5'-aatctggaattcggcgctggacgagtaccg-3'	32-mer
RV Primer <i>HindIII</i> /HBDom, Δ6, Δ12	5'-aatctgaagcttctacatgctgaaatctgcccgc-3'	35-mer
grün - <i>EcoRI</i> -Schnittstellen; blau - <i>HindIII</i> -Schnittstellen; orange markiert - <i>NdeI</i> -Schnittstellen		
Primer für die <i>in vitro</i> Mutagenese des repB'-Gens		
FW Primer RepB'W50A	5'-gtccagaacacgccagcgcctcaagcggatga-3'	32-mer
RV Primer RepB'W50A	5'-tcacccgcttgagcgcctggcgtgttctggagc-3'	32-mer
FW Primer RepB'Y62F	5'-gggcaatgacgtgtttatcaggcccgcg-3'	29-mer
RV Primer RepB'Y62F	5'-cggcgggctgataaacacgtcattgcc-3'	29-mer
FW Primer RepB'Y162A	5'-ccaccgcgcgggtgctcagccgtgggt-3'	28-mer
RV Primer RepB'Y162A	5'-accacggctgagcaccgcgcgggtgg-3'	28-mer
FW Primer RepB'R234A	5'-ccgggctggtcaaggccttcggtgatgacc-3'	30-mer
RV Primer RepB'R234A	5'-ggctacaccgaaaggccttgaccagcccgg-3'	30-mer
FW Primer RepB'D238A	5'-gcgctcgggtgatgccctcagcaagtgcg-3'	29-mer
RV Primer RepB'D238A	5'-cgcactgctgagggcatcaccgaagcgc-3'	29-mer
FW Primer RepB'D281A	5'-ggccacgaagcggcttacatcgagcgc-3'	27-mer
RV Primer RepB'D281A	5'-gcgctcgatgtagccgctcgtggcc-3'	27-mer
FW Primer RepB'R285A	5'-gcggattacatcagggcaccgtcagcaaggt-3'	32-mer
RV Primer RepB'R285A	5'-accttgctgacggtggcctcgtgtaaccgc-3'	32-mer
FW Primer RepB'E302A	5'-gcgcgggcccgcctggcacgg-3'	21-mer
RV Primer RepB'E302A	5'-ccgtgccagcggcggcccgcgc-3'	21-mer
FW Primer RepB'Δ6del624-626	5'-ggctggccagcctcgaagccgccac-3'	26-mer
RV Primer RepB'Δ6del624-626	5'-gtggcggcttcgaggctggccagcc-3'	26-mer
FW Primer RepB'Δ12del623-626	5'-ggctggccagcctcgaagcgtggac-3'	26-mer
RV Primer RepB'Δ12del623-626	5'-gtccagcgttcgaggctggccagcc-3'	26-mer
rot markiert - mutierte Codons		

2.6 Längen- und Molekulargewichtsstandards



2-log-DNA-Längenstandard (NEB)

Der Oligonukleotid-Längenstandard bestand aus radioaktiv 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden mit einer Länge von 6, 8, 10, 12 und 14 Nukleotiden (3.5.3).

- ³²P-ACGCGC
- ³²P-ACGCGCCC
- ³²P-ACGCGCCCC
- ³²P-ACGCGCCCCAC
- ³²P-ACGCGCCCCACCC

Proteinmolekulargewichtsstandard p7702L (NEB)

2.7 Enzyme

EcoRI (NEB), *HindIII* (NEB), *NdeI* (NEB), Phosphokinase (NEB), T4-DNA-Ligase (NEB), Thrombin (Sigma-Aldrich), Vent_R[®]-DNA-Polymerase (NEB)

2.8 Kits

Kit

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Centrifugation Protocol)
 QUIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit
 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (DNA Purification by Centrifugation)
 QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit
 Quick Start Bradford Protein Assay Kit

Hersteller

Promega
 Qiagen
 Promega
 Stratagene
 BioRad

3 Methoden

3.1 Molekulare Klonierung der RepB'-Derivate Gene. Zur Isolierung der Gensegmente der katalytischen und der Helix-Bündel Domäne von RepB' wurden durch PCR nt 1-636 und nt 637-969 des *repB'*-Gens amplifiziert (3.1.1). Die PCR-Produkte wurden im 1 % Agarosegel analysiert (3.4.1), aus dem Agarosegel extrahiert (3.1.2), mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* verdaut (3.1.3), gereinigt (3.4.1 und 3.1.2) und mit *NdeI* und *HindIII* geschnittenen Überexpressionsplasmid pET28a ligiert (3.1.4). Der Überexpressionsstamm *E.coli* ER2566 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert (3.1.5) und auf LBK-Agarplatten (2.3) ausplattiert. Von *E.coli* ER2566 Kolonien wurden Reinkulturen (3.2.1) angelegt, die Plasmide pET28a-nt 1-636 und pET28a- nt 637-969 aus den Reinkulturen isoliert (3.1.6) und die DNA-Sequenzen der *repB'*-Genabschnitte überprüft (3.1.8).

Zur molekularen Klonierung der Gene der RepB'-Derivate RepB' Δ 6 und RepB' Δ 12 wurden nt 1-618, nt 642-969 und nt 657- 969 des *repB'*-Gens amplifiziert (3.1.1). Das DNA-Fragment nt 1-618 wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* verdaut (3.1.3) und jeweils mit einem der beiden DNA-Fragmente nt 642-969 oder nt 657- 969, die mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut worden waren, in das mit *NdeI* und *HindIII* geschnittene Plasmid pET28a ligiert (3.1.4). Das durch die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle in die RepB'-Sequenz eingeführte DNA-Triplett für Phenylalanin wurde durch *in vitro* Mutagenese entfernt (3.1.7). Danach wurde nach den Punkten 3.2.1, 3.1.6 und 3.1.8 weiterverfahren.

Die Gene der RepB' Proteinmutanten W50A, Y62F, Y162A, R234A, D238A, D281A, R285A und E302A wurden durch *in vitro* Mutagenese des *repB'*-Gens erzeugt (3.1.7, Anhang Abbildung A2-3).

3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR von Abschnitten des *repB'*-Gens, die für die katalytische Domäne^a (nt 1-618, nt 1-636) und unterschiedlich lange Varianten der Helix-Bündel Domäne^b (nt 637-972, nt 642-969, nt 657- 969) kodieren, wurde im Thermocycler des Typs Tpersonal von Biometra durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter Punkt 2.5 aufgelistet. Die Elongationszeiten der PCR wurden der Nukleotidlänge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts angepasst (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Reaktionsansatz für eine PCR und PCR-Programm

<u>Reaktionsansatz (50 µl):</u>	<u>PCR-Programm:</u>
30 ng RSF1010	1-DNA-Denaturierung:
50 pmol Vorwärts-Primer	- 4 min, 94 °C
50 pmol Rückwärts-Primer	2-DNA-Amplifizierung (x 35):
1 x NEB-Puffer 2	- 30 s, 94 °C
1 x ThermoPol Puffer	- 45 s, 65 °C
0,2 mM dNTPs	- 45 s ^a , 30 s ^b 72 °C
2 Units Vent-DNA-Polymerase	3-Ende:
	- 30 s, 72 °C
	- Pause 4 °C

3.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen. DNA-Banden wurden aus Agarosegelen unter UV-Licht (312 nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems“ von PROMEGA nach Herstellerangaben extrahiert.

3.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen. Ein Restriktionsansatz (100 µl) enthielt 50 Units der eingesetzten Restriktionsendonukleasen (NEB) sowie 2-10 µg geschlossene Plasmid-DNA oder lineare DNA-Fragmente. Der Restriktionsverdau wurde über Nacht unter den vom Hersteller (NEB) empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

3.1.4 DNA-Ligation. Die Ligation von dsDNA mit kohäsiven Enden wurde mit der T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerprotokoll (NEB) durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 30 ng linearisierter kohäsiver Plasmid-DNA und die fünffache molare Menge des kohäsiven DNA-Fragments im Verhältnis zum Plasmid eingesetzt.

3.1.5 Transformation. Elektrokompente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl *E. coli* Zellen mit 2 ng gereinigtem Plasmid (3.1.6) oder 1 µl eines Ligationsansatzes (3.1.4) in einer Küvette (Durchmesser 2 mm, EquiBio) vorsichtig vermischt, einem elektrischen Puls von 2500 V im Elektrotransformator (Easyject Prima, EquiBio) ausgesetzt, in 400 µl auf 37 °C vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und eine Stunde im Schüttler (RS-PL-28-10 Heto Lab Equipment) bei 300 rpm und 37 °C regeneriert.

3.1.6 Plasmidpräparation. Plasmide (2.5) wurden mit dem QIAquick Plasmid Miniprep Kit der Firma Qiagen (2.8) nach Herstellerprotokoll präpariert.

3.1.7 *In vitro* DNA-Mutagenese. DNA-Punktmutationen auf dem *repB'*-Gen wurden mit dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (2.8) nach Herstellerprotokoll (Stratagene/Agilent) erzeugt. Die Primer für die PCR wurden nach Herstellervorgaben entworfen (2.5). Pro PCR-Ansatz wurden 25 ng pJM201-*repB'*-Plasmid als Matrizen-DNA verwendet. Die PCR wurde in einem Thermocycler des Typs Tpersonal (Biometra) durchgeführt.

3.1.8 DNA-Sequenzierung. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) oder AGOWA *Genomics* (Berlin) nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (<http://www.agowa.de>). Für eine Sequenzierungsreaktion wurden 2 µg Plasmid-DNA präpariert (3.1.2). Die Sequenzierungsprimer wurden von MWG Biotech synthetisiert (2.5). Der Vergleich der sequenzierten DNA mit der Wildtyp-DNA erfolgte mit Hilfe des Programms „ClustalW“ (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) (75).

3.1.9 Stammkonservierung. Zur Langzeitlagerung der *E. coli* Überexpressionsstämme wurden 10 ml LBA oder LBK-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 250 rpm inkubiert bis die A_{600} einen Wert von 0,8 erreichte. Die Bakteriensuspension wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit sterilem Glycerin (100%) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Herstellung und Präparation der RepB'-Derivate und des Primase-DNA-Komplexes.

3.2.1 Vorkulturen. Es wurden 100 ml LBA- oder LBK-Medium mit einer sterilen Impföse von einer Glycerin-Stammkultur eines *E. coli* Überexpressionsstammes angeimpft und über Nacht unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 250 rpm und 37 °C kultiviert.

3.2.2 Protein-Überexpression. Acht Liter LBA- oder LBK-Medium wurden mit der Vorkultur eines *E. coli* Überexpressionsstammes im Verhältnis 1:100 inokuliert und unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 250 rpm und 37 °C kultiviert. Nach Anstieg der A_{600} auf 0,6 wurde die Protein-Überexpression durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mM induziert. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde die Bakteriensuspension bei 4 °C 10 min mit 5.000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in Zellaufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl (pH7), 150 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT) resuspendiert und nach Zugabe des Protease-Inhibitor-Cocktails „COMPLETE“ (Roche) bei -20 °C eingefroren.

3.2.3 Zellaufschluss. Bakteriensuspensionen wurden im Homogenisator EmulsiFlex-C5 von Avestin bei 4 °C mit einem Druck von etwa 100 bar durch dreimalige Passage aufgeschlossen.

3.2.4 Ultrazentrifugation. Die Zelltrümmer der aufgeschlossenen Bakteriensuspensionen wurden durch Zentrifugation (30.000 x g, 4 °C, 30 min) vom Cytosol abgetrennt.

3.2.5 Chromatographische Proteinreinigung. wurde mit Hilfe eines ÄKTA-FPLC-Systems (Amersham Pharmacia) bei 4 °C durchgeführt. Im Chromatogramm wurden die Wellenlängen 215nm, 260nm und 280nm aufgezeichnet. Die RepB'-Derivate W50A, Y62F, Y162A, R234A, D238A, D281A, R285A, E302A, RepB'Δ6, RepB'Δ12 konnten nach dem Reinigungsprotokoll für den Wildtyp RepB' gereinigt werden (76).

3.2.6 Kationenaustausch-Chromatographie an Heparin. Eine HiTrap™ Heparin-Säule (SV=5ml, GE Healthcare) wurde mit Puffer A (20mM Tris/HCl (pH 7), 50mM MgSO₄, 1 mM DTT) äquilibriert, und die mit Puffer A im Verhältnis 1:2 verdünnte Proteinprobe mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 14 % Puffer B (20 mM Tris/HCl (pH 7), 50 mM MgSO₄, 2 M NaCl, 1mM DTT) wurden die RepB'-Derivate durch einen linearen Gradienten von 14 -21% Puffer B über ein Volumen von 5 SV bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert. Die RepB'-Derivate enthaltenden Fraktionen wurden vereint und bis zur anschließenden Kationenaustausch-

Chromatographie an Sulfopropylgruppen bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.7 Kationenaustausch-Chromatographie an Sulfopropylgruppen. Die Proteinprobe wurde mit Puffer A im Verhältnis 1:4 verdünnt und mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die mit Puffer A äquilibrierte[®] 20HS-Säule (SV=7ml, Perseptive Biosystems) aufgetragen. Die RepB'-Derivate wurden mit einem linearen Gradienten von 0-20 % Puffer B über ein Volumen von 5 SV bei einer Flussrate von 5 ml/min eluiert, die RepB'-Derivate enthaltenden Fraktionen durch Ultrafiltration in Zentrifugal-Konzentrationszellen (Millipore) auf 2 ml für die anschließende Gelfiltration (3.2.8) konzentriert.

3.2.8 Größenausschluss-Chromatographie an Superdex-75. Nach Äquilibration der HiLoadTM-16/60-Superdex75 Chromatographie-Säule (SV=110 ml) mit Puffer C (10 mM Tris/HCl (pH 7), 150 mM MgCl₂, 1 mM DTT) wurden 2 ml einer steril filtrierten (Porengröße: 0,22 µM) Probe aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte mit einer Flussrate von 0,8 ml/min.

3.2.9 Reinigung der N- und C-terminalen Domäne von RepB'. Die N- und C-terminalen Domänen von RepB' wurden an einer mit Puffer D (200 mM MgCl₂, 20 mM Hepes (pH 8), 1 mM DTT) äquilibrierten HisTrap-Säule (GE Healthcare, SV=5ml) über einen linearen Imidazol-Gradienten von 0-50 % Puffer E (200 mM MgCl₂, 20 mM Hepes (pH 8), 1 M Imidazol, 1 mM DTT) eluiert. Das Histidin-Hexapeptid wurde durch Thrombinverdau und Dialyse (5 kDa Ausschlussgrenze) gegen denselben Puffer entfernt. Die N-terminale Domäne von RepB' wurde anschließend nach dem Reinigungsprotokoll für den Wildtyp RepB' weitergereinigt (3.2.6-3.2.8).

3.2.10 Herstellung und Reinigung der Primase-DNA-Komplexe. Einzelsträngige getrocknete *ssiA* DNA (TIB MOLBIOL) wurde in 400 µl Hybridisierungspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris/Cl (pH7.5)) gelöst, im Thermoblock 5 min bei 95 °C erhitzt und über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Equimolare Menge an gereinigter Primase und *ssiA* DNA wurden für 30min bei 37 °C inkubiert. Maximal 2ml des Primase-DNA-Komplexes wurden auf die mit Puffer F (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 0,01 mM EDTA) equilibrierte HiLoadTM-16/60-Superdex75

Chromatographie-Säule (SV=110 ml) aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,8 ml/min eluiert. Die Reinheit der Primase-DNA-Komplexe wurde mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (3.4.3) und *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) (3.5.5-3.5.6) überprüft.

3.3 Herstellung zirkulär geschlossener einzelsträngiger (ss) und doppelsträngiger (ds) DNA des Phagen M13mp18ssiA. Bei M13mp18ssiA (mp18, Max-Planck Stamm 18) handelt es sich um einen rekombinanten M13 Phagen mit einer in das Genom integrierten *Mutli Cloning Site*, in die *ssiA* DNA inseriert wurde (77). Nach Infektion eines Indikatorbakteriums wird nur der (+)ssDNA-Strang des Phagen M13mp18ssiA in die Phagenpartikel verpackt. Zur Herstellung der M13mp18ssiA dsDNA wurden F'-Plasmid tragende elektrokompente *E. coli* JM103 Zellen mit M13mp18ssiA dsDNA transformiert (3.1.5) und eine Reinkultur der mit dem Phagen M13mp18ssiA infizierten *E. coli* JM103 angelegt (3.3.2-3.3.4). Nach Zentrifugation der Reinkultur von *E. coli* JM103(M13mp18ssiA⁺) wurde die M13mp18ssiA dsDNA aus dem Bakterienpellet (3.3.4 und 3.3.6) und die ssDNA des Phagen M13mp18ssiA aus den im Überstand befindlichen Phagenpartikel extrahiert (3.3.5).

3.3.1 Transformation von *E. coli* JM103 mit M13mp18ssiA dsDNA. Elektrokompente *E. coli* JM103 Zellen wurden mit M13RFssiA-dsDNA im Elektroporationsgerät (Easyject Prima, EquiBio) nach Hersteller-Protokoll (EquiBio) transformiert.

3.3.2 Kultivierung des Indikator-Stammes *E. coli* JM103. Eine Glycerinkultur von *E. coli* JM103 wurde auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurden 5 ml LB-Medium in einem Falcon Tube (15 ml) angeimpft. Nach 8 Stunden Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) wurde die Kultur für 20 min auf Eis gestellt und bis zu ihrer Verwendung bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.3 Infektion des Indikator-Stammes *E. coli* JM103 mit dem Phagen M13mp18ssiA. In einem 10 ml-Reagenzglas wurden 3 ml Weichagar (2.3) auf 47 °C erwärmt, mit 100 µl *E. coli* JM103 und 400 µl der M13mp18ssiA dsDNA

transformierten *E. coli* JM103 (3.3.1) vermischt, bei Raumtemperatur auf X-Gal/IPTG-Agarplatten (2.3) fest werden lassen und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert, bis blaue Pseudoplaques auf dem Bakterienrasen zu sehen waren.

3.3.4 Anzucht infizierter *E. coli* JM103-Zellen (M13mp18ssiA⁺) zur Herstellung der dsDNA des M13mp18ssiA. Es wurden 3 ml LBM-Medium (2.3) mit 100 µl der Indikatorbakterien *E. coli* JM103 in einem 10 ml-Reagenzglas angeimpft. Die *E. coli* JM103 Kultur wurde 3 Stunden unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 250 rpm bei 37 °C inkubiert, mit LBM-Medium im Erlmeyer-Kolben 1:10 verdünnt und mit 3 ml M13mp18ssiA-Phagensuspension angeimpft. Zur Herstellung der M13mp18ssiA-Phagensuspension wurden 3 ml LBM-Medium durch eine sterile Impföse von einem gut separierten Pseudoplaque angeimpft und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Stunden Inkubation bei 37°C unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 500 rpm wurden die *E. coli* JM103-Zellen 5 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das M13mp18ssiA RF-DNA enthaltende Bakterienpellet bei -20 °C bis zur DNA-Präparation aufbewahrt.

3.3.5 Extraktion der ssDNA des Phagen M13mp18ssiA. Eine Vorkultur von *E. coli* JM103 (M13mp18ssiA⁺) wurde in TY-Lösung (2.3) 1:50 verdünnt, 6 ml in einen 250 ml-Erlmeyerkolben abgefüllt, mit 1,5 ml Phagensuspension (3.3.4) beimpft und fünf Stunden bei 37 °C unter Schütteln (G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific) bei 450 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden 5 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand mit dem Phagen M13mp18ssiA, ohne Bakteriensediment aufzusaugen, in neue 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und erneut zentrifugiert. Jeweils 1 ml der M13mp18ssiA Phagen-Überstände wurde auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß verteilt, mit 200 µl eiskalter PEG-NaCl-Lösung (20 % PEG 6000 2,5 M NaCl) gründlich durchmischt und eine Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurden die M13mp18ssiA Phagen 15 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die präzipitierten M13mp18ssiA Phagen wurden in 10 µl M13-Puffer (20 mM Tris/HCl (pH 7,6), 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Erhitzen auf 60 °C wurden die M13mp18ssiA Phagen-Suspensionen mit 50 µl auf 60 °C erhitztem Phenol („Roti-Phenol“, Roth) gründlich gemischt. Die phenolhaltigen

Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, wieder durchgemischt und 3 min bei 16.000 x g und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (mit der M13mp18*ssiA* ssDNA) wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 100 µl Chloroform versetzt, 10 sec bei 16.000 x g und bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit Ethanol gefällt (3.3.6).

3.3.6 Ethanolfällung von DNA. Ein Volumen DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (100%) durchgemischt und die DNA zwei Stunden bei -20°C gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet mit dem gleichen Volumen an 4 °C kaltem 70% Ethanol gewaschen, 1 min zentrifugiert und der Vorgang mit 100 % Ethanol wiederholt. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet, in 100 µl TS-Puffer (1 mM Tris/HCl, (pH 8,0), 1 mM NaCl) aufgenommen und 10 min bei 65 °C erhitzt. Die DNA-Lösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.4 Allgemeine biochemische Methoden

3.4.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNA. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA (pH 8)) durch Aufkochen gelöst, 50 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und in einer Kammer (10cm x 7cm x 1cm) polymerisieren lassen. Vor dem Auftrag wurde die DNA mit DNA-Probenpuffer (5 x) vermischt. Die Elektrophorese der DNA-Probe wurde bei einer Spannung von 12V/cm für 1 h in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die DNA wurde auf dem UV-Schirm (312nm) sichtbar gemacht.

DNA-Probenpuffer (5x)
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
0,25 % Xylen Cyanol (w/v)
40 % D(+)-Saccharose (w/v)

Elektrophoresepuffer (1x)
40 mM Tris
1,142 % Eisessig (v/v)
1 mM EDTA, pH 8,0

3.4.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA bestanden aus 20 % Polyacrylamid, 8 M Harnstoff und 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na₂ (pH 8)). Die Polymerisation von 33 ml 30 % Acrylamidlösung wurde mit 25 µl TEMED und 250 µl 10 % APS gestartet. Die PAGE-

Harnstoffgele hatten ein Format von 28 cm x 16 cm x 0.2 cm. Vor der Elektrophorese wurden die DNA-Proben mit Formaldehyd-Ladepuffer (2 x) vermischt, 2 min bei 95 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese von DNA-Oligonukleotiden wurde vertikal bei 11 V/cm über 6 h in 1 x TBE-Puffer durchgeführt.

Formaldehyd-Ladepuffer (2 x)

95 % Formamid
18 mM EDTA
0.025 % SDS
Xylen Cyanol
Bromphenol Blau

3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese von Proteinen. Ein SDS-Polyacrylamidgel (11 cm x 8,5 cm x 0,2 cm) bestand aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 20 %-igen Trenngel. Pro Proben tasche wurden 2-30 µg Protein aufgetragen. Die Proben (20 µl) wurden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 2:1 gemischt und 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese der Protein-Proben wurde bei einer Spannung von 20 V/cm durchgeführt. Die SDS-Gele wurden in Coomassie-Färbelösung 20 min gefärbt und in erhitztem Wasser entfärbt.

Trenngel (20 %):

375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1 % Laurylsulfat (w/v)
62,5 % Rotiphorese Gel30 (v/v)

Sammelgel (4 %):

125 mM Tris/HCl, pH 6,8
0,1 % Laurylsulfat (w/v)
13,4 % Rotiphorese Gel30 (v/v)

Die Polymerisation wurde mit 0,05 % (v/v) N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und 0,05 % (v/v) Ammoniumpersulfat (APS) gestartet.

Probenpuffer (5 x):

50 mM Tris/HCl, pH 7,0
10 % Laurylsulfat (w/v)
0,1 % Bromphenolblau (w/v)
1 % 2-Mercaptoethanol (v/v)
14 % 1,4-Dithiothreitol (w/v)
10 % Glycerin (v/v)

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris/HCl, pH 8,3
1,44 % Glycin (w/v)
0,1 % Laurylsulfat (w/v)

Coomassie-Färbelösung:

0,5 % Coomassie Brilliant-Blue G250 (w/v)
6,25 % Ethanol (v/v)
4,25 % Perchlorsäure (v/v)

3.4.4 Konzentrationsbestimmungen von DNA und Protein. Die Konzentrationsbestimmung von *ssiA* DNA- und Proteinlösungen erfolgte über die

Bestimmung ihrer Extinktion bei den Wellenlängen von 260nm (DNA) bzw. 280nm (Protein) mit Hilfe des Photometers „GeneQuant RNA/DNA Calculators“ (Pharmacia). Die Konzentrationen wurde nach folgender Formel ausgerechnet:

$$E = c \times d \times \epsilon$$

E = Extinktion bei 260 nm oder bei 280 nm

d = Küvettendurchmesser

ϵ = Extinktionskoeffizient bei 260 nm oder bei 280 nm

Die Extinktionskoeffizient der RepB'-Derivate und der zur Kristallisation eingesetzten DNA wurden mit dem Programm ProtParam berechnet (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) (78). Die DNA-Konzentration von Plasmiden wurde über die Extinktion anhand des folgenden Verhältnisses bestimmt: A_{260} von 1,0 entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA (bezogen auf einen Küvettendurchmesser von 1 cm).

3.4.5 Bradford-Test. Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford wurde photometrisch (Ultrospec 3100pro, Amersham Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 595 nm nach Angaben des Herstellers (BioRad) durchgeführt (79).

3.5 Proteincharakterisierung

3.5.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie. Protein-Proben wurden entweder mithilfe von C_{18} -Kieselgelsäulen (Zip-Tips, Millipore) nach Herstellerprotokoll entsalzt oder nach Extraktion aus dem SDS-Polyacrylamidgel mit Trypsin verdaut. Danach wurden die Proben mit einer organischen Matrix nach einem Protokoll von Dr. Chris Weise vermischt und auf einen Probenträger aufgebracht. Die MALDI-TOF Spektren wurden von Dr. Chris Weise (Institut für Biochemie, FU Berlin) aufgenommen.

3.5.2 Komplementärstrangsynthesetest. Ein Reaktionsansatz (Tabelle 3.2) wurde 10 min bei 37 °C, dann 8 min bei 72 °C inkubiert und durch Zugabe von 0.5 % SDS gestoppt. Die Elektrophorese der Proben im nativen 1 %-igen Agarosegel wurde bei einer Spannung von 12 V/cm für 1 Stunde in 1 x TAE-Puffer durchgeführt (3.4.1). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und auf dem UV-Transilluminator (312nm)

sichtbar gemacht (3.4.1).

Tabelle 3.2: Reaktionsansatz für den Komplementärstrangsynthesetest

Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
NEB-Puffer 2	1 x
dNTPs	0,375 mM
M13mp18 <i>ssiA</i>	30 ng
Primase	50 nM
Vent-DNA-Polymerase	0,5 Units

3.5.3 Primersynthesetest. Der Reaktionsansatz (Tabelle 3.3) wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, mit Formaldehyd-Ladepuffer (2 x) versetzt, 2 min bei 95 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese der Proben unter denaturierenden Bedingungen (3.4.2) wurde vertikal bei 11 V/cm über 6 h in 1 x TBE-Puffer durchgeführt und das PAGE-Harnstoffgel anschließend autoradiographiert (3.5.4).

Tabelle 3.3: Reaktionsansatz für den Primersynthesetest

Reaktionsansatz (10 µl)	Endkonzentration
NEB-Puffer 2	1 x
dATP	1 mM
dCTPs	10 µM
dGTP	100 µM
dTTP	100 µM
[³² αP] dCTP (3000Ci/mmol)	90 mM
M13mp18 <i>ssiA/B</i>	240 ng
Primase	3 µM

Als Längenstandard für die radioaktiven Primaseaktivitätstests dienten radioaktiv phosphorylierte Oligonukleotide mit einer Länge von 6, 8, 10, 12, 14 Nukleotiden (2.5), die von TIBMOL BIOL (Berlin) bezogen und mit Phosphokinase (NEB) nach Angaben des Herstellers (NEB) am 5'-Ende radioaktiv mit [³²γP]ATP phosphoryliert wurden.

3.5.4 Autoradiographie. Nach Elektrophorese (3.5.3) wurde das Polyacrylamid-Harnstoffgel in Saranfolie eingeschlagen und ein Phosphor-Screen (Type MS, Perkin ElmerTM) daraufgelegt. Nach Exposition über Nacht bei -80°C wurde der Phosphor-Screen am Phosphor-Scanner (Cyclone, Perkin ElmerTM) eingelesen und mit der mitgelieferten Software ausgewertet.

3.5.5 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) mit Wildtyp RepB' und katalytischer Domäne von RepB'. Die Bindung von drei *ssiA* DNA-Molekülen (Basen in der Haarnadelschleife fett gedruckt) an den Wildtyp von RepB' oder die katalytische Domäne von RepB' wurde durch EMSA getestet. Die Basenpaarungen in der *ssiA* DNA-Haarnadelschleife, wie sie vor dieser Studie vermutet worden waren, sind unterstrichen (Abbildung 3.1).

ssiA DNA, intakt
(5'-CCTTTCCCCCTACCCGAAGGGTGGGGGCGCGTGTGCAGCC-3'),

ssiA(3'Δ13)DNA, verkürztes 3'-Ende
(5'-CCTTTCCCCCTACCCGAAGGGTGGGGG-3'),

ssiA(5'Δ5)DNA, verkürztes 5'-Ende
(5'-CCCCCTACCCGAAGGGTGGGGGCGCGTGTGCAGCC-3')

Abbildung 3.1: Im EMSA eingesetzte *ssiA* DNA Sequenzen

Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Die Reaktionsansätze enthielten 10 μM *ssiA* DNA, 5-12.5 μM des Wildtyps von RepB' oder die katalytische Domäne von RepB', 50 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 20mMTris/HCl, pH 7,5. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C 1 Stunde inkubiert und auf ein 6 %-iges natives Polyacrylamidgel (11 cm x 8.5 cm x 0.2 cm) aufgetragen, das 0.5 x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer enthält. Die Elektrophorese der Primase-DNA-Komplexe erfolgte mit 5 V/cm bei 4 °C über 170 min in 0.5 x TAE-Puffer nach einem Vorlauf von 30 min unter denselben Elektrophorese-Bedingungen. Die DNA und die Primase-DNA Komplexe wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter dem UV-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht.

3.5.6 EMSA mit der Helix-Bündel Domäne von RepB'. Die Reaktionsansätze enthielten 10 μM *ssiA* DNA, 5-12,5 μM der Helix-Bündel Domäne (AS 212-323) und 200 mM MgCl₂, weil die Helix-Bündel Domäne nur unter diesen Bedingungen löslich war. Die Primase-DNA-Komplexe wurden im 8 %-igen Polyacrylamidgel (11 cm x 8,5 cm x 0,2 cm) elektrophoretisch aufgetrennt, das 6 % Glycerol, 20 mM HEPES (pH 8,0) und 0,1 mM EDTA enthält. Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 20 mM HEPES (pH 8,0), 0,1 mM EDTA. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 5 V/cm bei 4 °C über 170 min durchgeführt.

3.5.7 Analytische Ultrazentrifugation. Die analytische Ultrazentrifugation wurde von Prof. Dr. Joachim Behlke (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) nach veröffentlichtem Protokoll durchgeführt (80). Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden Proteine und DNA in 100 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 20 mM Hepes, pH 8,0 aufgenommen. Die Extinktionskoeffizienten (l/mol x cm) zur Berechnung der Bindungskonstanten wurden mit Hilfe des Programms ProtParam (78) des ExPasy-Servers berechnet. $\epsilon_{280}=29,450$ für die katalytische Domäne, $\epsilon_{280}=2,980$ für die Helix-Bündel Domäne, $\epsilon_{280}=32,555$ für den Wildtyp RepB', $\epsilon_{280}=266,190$ für die 27-mer *ssiA* (3'Δ13)DNA und $\epsilon_{280}=393,490$ für die 40-mer *ssiA* DNA.

3.6 Kristallographische Methoden

3.6.1 Kristallisation. Zur Kristallisation von Primase-DNA-Komplexen wurde die Dampfdiffusionsmethode angewendet (81). Die Kristallisationsexperimente wurden entweder in Zellkulturschalen mit 12 Vertiefungen oder in Platten mit 96 Vertiefungen angesetzt. In den Zellkulturschalen wurden 700 µl des Fällungsmittels in die Vertiefung vorgelegt und 1-3 µl des Proteins mit 1-3 µl des Fällungsmittels auf einem silikonisierten Deckglas vermischt, das auf den eingefetteten Rand der Vertiefung gelegt wurde. In den Kristallisationsplatten wurden 100 µl Fällungsmittellösung vorgelegt, in vorgeformte kleinere Vertiefungen 1 µl der Probe und 1 µl des Fällungsmittels gemischt und die Platte mit einem Plastikfilm (3M, Hampton Research) versiegelt. Die Kristallisationsansätze wurden entweder bei 4 °C oder 18 °C inkubiert.

3.6.2 Beugungsexperimente, Datenaufnahme und -prozessierung. Vor einem Beugungsexperiment wurden die Kristalle in eine Reservoirlösung mit 20 % (v/v) Glycerin (RepB') oder 30 % PEG400 (Primase-DNA-Komplex) überführt, in Nylon-Schlaufen (Hampton Research) durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren und bis zur Messung dort aufbewahrt. Während des Beugungsexperimentes wurden die Proteinkristalle im Stickstoffstrom bei 100 °K gekühlt und im Röntgenstrahl rotiert. Vor der Datensammlung wurden 2-4 Oszillationsbilder jeweils im Winkel von 90° zueinander aufgenommen, mit dem Programm MOSFLM (82) indiziert und das Kristallsystem bestimmt. Mit dem Unter-Programm STRATEGY von MOSFLM wurden das Winkelinkrement, der Startwinkel und der gesamte Rotationswinkel für das

Beugungsexperiment berechnet mit dem Ziel, einen vollständigen Datensatz aufzunehmen. Die Expositionszeit des Kristalls mit Röntgenstrahlung wurde so eingestellt, dass einerseits durch längere Exposition schwächere Reflexe bei höherer Auflösung mit der notwendigen Signalintensität aufgenommen werden konnten. Andererseits wurde versucht, die Expositionszeit ausreichend zu verkürzen, um Strahlenschäden am Kristall zu reduzieren und um „überladene“, nicht auswertbare Reflexe (*overloads*) auf den Oszillationsbildern aufgrund von zu intensiver Bestrahlung des Detektors zu vermeiden. Die Diffraktionsdaten für den nativen RepB'-Datensatz wurden am Strahlrohr ID14-2 am ESRF in Grenoble mit einem ADSC Q4 CCD Detektor, und die vier MAD-Datensätze an einem OsO₃-Derivat von RepB' wurden am FU-eigenen Strahlrohr BL-14.1 des Synchrotrons BESSY II in Berlin mit einem MAR CCD 165 mm Detektor aufgenommen. Die Röntgenaufnahmen wurden mit den Programmen SCALEPACK (83) oder XSCALE (84) mit (native Datensätze) und ohne (RepB'-OsO₃-Datensätze) Mittelung der Friedelpaare aufeinander skaliert.

3.6.3 Lösung des Phasenproblems (RepB'-Raumstruktur). Zur Bestimmung der Schweratomsstruktur des OsO₃ Py-Derivates von RepB' nach der Differenz-Patterson-Methode wurde das Programm-Paket SHELX verwendet (85). Das anomale Signal wurde mit dem Unter-Programm SHLEXC und die Lage und Besetzung von OsO₃ Py in der asymmetrischen Einheit des RepB'-Kristalls wurden mit dem Unter-Programm SHELXD bestimmt. Die Phasenbestimmung und Verfeinerung (durch Lösungsmittelglättung) aus der Schweratomsstruktur des OsO₃ Py-Derivates von RepB' erfolgte mit dem Unter-Programm SHELXE.

3.6.4 Lösung des Phasenproblems (Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes). Das Phasenproblem wurde durch die Methode des molekularen Ersatzes mit dem Programm Phaser (86) gelöst. Als Suchmodelle diente die katalytische Domäne von RepB' (AS 4-206). Zur Translations- und Rotationssuche wurden die voreingestellten Parameter des Programms Phaser in einem Auflösungsbereich von 20 Å bis 3.5 Å verwendet.

3.6.5 Modellverfeinerung, -bau und -validierung. Das Anfangsmodell wurde zum Teil durch das automatische Modellierungsprogramm RESOLVE (87) gebaut und

manuell fertiggestellt mit dem Programm COOT (88). Die Modellverfeinerung erfolgte iterativ, indem die Differenz der experimentell bestimmten (F_o) und der aus dem neuen Atom-Modell errechneten Strukturamplituden (F_c) durch *Restraint*-Verfeinerung der Geometrieparameter des Modells nach der Methode der Maximalen-Wahrscheinlichkeit mit dem Programm REFMAC5 (89) minimiert und das Modell anhand von $2F_o-F_c$ und F_o-F_c Elektrondichtekarten korrigiert wurde (88). Zur Validierung des Modells wurden etwa 5 % der gemessenen Reflexe verwendet, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden (Tabelle 4.1). Der Verfeinerungsprozess wurde bis zur Konvergenz des R_{free} -Faktors wiederholt. Die stereochemische Qualität der Modelle wurde mit WHATCHECK (90) and PROCHECK (91) überprüft. Bänderdarstellungen und Darstellungen des elektrostatischen Potentials der Modelle wurden mit dem Programm Pymol (92) erstellt.

3.6.6 Programme für die dreidimensionale Strukturüberlagerung.

Strukturüberlagerungen wurden mit den Programmen COOT (88) und DALI (93) durchgeführt. DALI vergleicht die $C\alpha$ -Atompositionen der Aminosäuren des Suchmodells und der Strukturmodelle aus der PDB-Datenbank miteinander, berechnet die mittlere Standardabweichung der $C\alpha$ -Atome und gibt den Z-Wert als Maß für die Homologie zwischen zwei Raumstrukturen an. In der Regel weisen Z-Werte größer als 6 auf zwei homologe Raumstrukturen hin. Bei Z-Werten zwischen 3-6 geht man davon aus, dass zwei Raumstrukturen entfernt verwandt sind. Bei Z-Werten unter 2 besteht keine Ähnlichkeit zwischen zwei Raumstrukturen.

4 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit sollten die Fragen beantwortet werden, wo RepB' die Primersynthese auf der *ssiA* DNA beginnt und wie lang die von RepB' synthetisierten Primer sind. Aus *in vivo* Studien, in denen verkürzte *oriV* DNA eingesetzt worden war, wurde der Startpunkt der RepB' Primersynthese von Lin und Meyer (23) auf die Nukleotide 31-33 eingegrenzt (Abbildung 1.5 B).

4.1 RepB' beginnt die Synthese des DNA-Primers an Thymin 32 der *ssiA* DNA-Sequenz. Der Startpunkt der DNA-Primersynthese von RepB' wurde durch eine *run off* DNA-Sequenzierung (3.1.8) an zirkulärer doppelsträngiger M13mp18 *ssiA* RFII DNA bestimmt, die im (+)DNA-Strang die *ssiA* Sequenz und im komplementären (-)DNA-Strang eine DNA-Bindungslücke am Startpunkt des DNA-Primers von RepB' enthält (Abbildung 4.1 A, B).

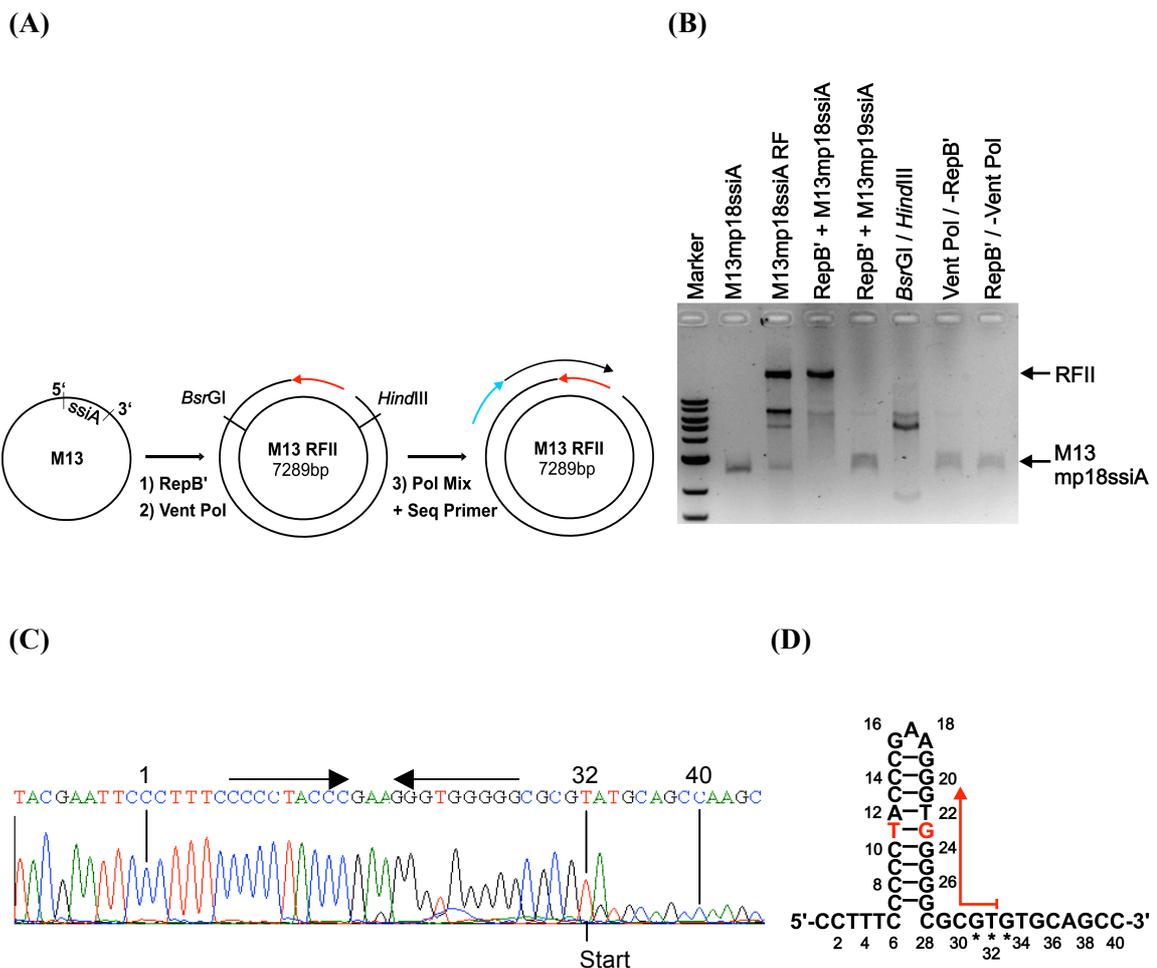


Abbildung 4.1 (A) Prinzip des Primaseaktivitätstests und Bestimmung des Startpunktes des DNA-Primers von RepB' an *ssiA* durch eine *run off* DNA-Sequenzierung. Ein Reaktionsansatz enthielt zirkuläre einzelsträngige M13mp18 *ssiA* DNA, die die *ssiA* DNA-Sequenz enthält (3.5.2), RepB', Vent-DNA-Polymerase und 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (dNTP). RepB' synthetisiert einen DNA-Primer (roter Pfeil) komplementär zur *ssiA* DNA-Sequenz, der von der Vent-DNA-Polymerase verlängert wird, bis die Vent-DNA-Polymerase auf das 5'-DNA Ende des von RepB' synthetisierten DNA-Primers trifft. An dieser Stelle bleibt eine Bindungslücke zurück, da der Reaktionsansatz keine DNA-Ligase enthält. Primaseaktivität wird durch die Umwandlung der einzelsträngigen in doppelsträngige M13mp18*ssiA* DNA angezeigt. Im Kontrollversuch ohne RepB' wird kein DNA-Komplementärstrang synthetisiert. Da der neu synthetisierte DNA-Einzelstrang der M13mp18*ssiA* dsDNA eine Bindungslücke enthält, wird die M13mp18*ssiA* dsDNA als replikative Form II (RFII) bezeichnet, um sie von der replikativen Form I, der zirkulär geschlossenen doppelsträngigen DNA von M13 abzugrenzen.

Die Bindungslücke der RFII Form der M13mp18*ssiA* dsDNA diente zur Bestimmung des Startpunktes des Primers. Die *run off* DNA-Sequenzierung nach Sanger wurde von der Sequenzierungsfirma AGOWA *genomics* durchgeführt. Der Sequenzierungsprimer (2.5) wurde so entworfen (blauer Pfeil), dass die DNA-Sequenzierung am DNA-Einzelstrangbruch des (-)DNA-Stranges der M13mp18*ssiA* RFII DNA ausläuft (*run off*), d.h. abgebrochen wird, da die Taq-Polymerase nur über kontinuierliche DNA-Stränge den Gegenstrang synthetisieren kann.

(B) Komplementärstrangsynthese an M13mp18*ssiA* ssDNA (Herstellung der RFII Form von M13mp18*ssiA*). Marker: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1,5 [kB]. Kontrollen: M13mp18*ssiA* ssDNA und aus *E. coli* isolierte M13mp18*ssiA* dsDNA (3.3). M13mp19*ssiA* ssDNA enthält den inaktiven DNA-Komplementärstrang von *ssiA*. Vent Pol/-RepB', Ansatz mit Vent-DNA-Polymerase und ohne RepB'. RepB'/-Vent Pol, Ansatz mit RepB' und ohne Vent-DNA-Polymerase. DNA-Doppelstrang-Kontrolle *BsrGI/HindIII*, der Verdau eines kompletten Reaktionsansatzes mit den dsDNA spezifischen Restriktionsenzymen *BsrGI/HindIII* lieferte zwei DNA-Fragmente der erwarteten Länge von 2 kB und 5,5 kB.

(C) Ergebnisse der *run off* DNA-Sequenzierung am (-)DNA-Strang der M13mp18*ssiA* RFII DNA. Y-Achse, relative Fluoreszenzintensitäten von Adenin (grün), Thymin (rot), Cytosin (blau), Guanin (schwarz). X-Achse, DNA-Sequenz. Die ermittelte DNA-Sequenz ist oberhalb des Fluoreszenzprofils angegeben. Ein Fluoreszenz-Peak entspricht jeweils einer sequenzierten Base. Die erste (Nummer 1) und letzte Base (Nummer 40) sowie die Basen der Haarnadelschleife (gegenüberliegende Pfeile) der *ssiA* DNA-Sequenz wurden über der ermittelten DNA-Sequenz gekennzeichnet. Die Base mit der Nummer 32 ist der Startpunkt der DNA-Primersynthese von RepB'.

(D) *SsiA* DNA-Sequenz und -Haarnadelstruktur aus dem *oriV* von RSF1010 mit eingezeichneter Startstelle des von RepB' synthetisierten Primers. Der zuvor von Lin und Meyer (23) vermutete Startpunkt der Primersynthese von RepB' an den Nukleotiden G³¹T³²G³³ ist mit drei Sternen gekennzeichnet. Ein Pfeil über T³² zeigt die in dieser Arbeit exakt bestimmte Startposition der Primersynthese. Die Basenpaare der Haarnadelschleife der *ssiA* DNA wurden in der Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes beobachtet (Abbildung. 4.18); der G²³T¹¹ DNA-*wobble* ist rot gefärbt.

Die *run off* DNA-Sequenzierung erfolgte am (-)DNA-Strang der M13mp18 *ssiA* RFII DNA in Richtung der DNA-Bindungslücke. Das Fluoreszenzsignal der DNA-Sequenzierungsreaktion wurde signifikant reduziert nach Thymin in Position 32 in der *ssiA* DNA-Sequenz (Abbildung 4.1 C). Das zusätzliche Adenin-Signal in Position 33 der *ssiA* Matrizen-DNA wurde von der zur DNA-Sequenzierung verwendeten Taq-DNA-Polymerase erzeugt, die unabhängig von der DNA-Matrize ein Adenosinmonophosphat an freie 3'-OH DNA-Enden anhängt (persönliche Mitteilung von AGOWA *genomics*). Weil Adenosintriphosphat das erste dNTP im DNA-Primer ist, wird Thymin 32 in der *ssiA* DNA-Sequenz als erstes Nukleotid von RepB' abgelesen (Abbildung 4.1 D).

Der *run off* Ansatz wurde ergänzt durch Primersynthesetests (3.5.3) an M13mp18*ssiA* ssDNA unter Verwendung unterschiedlicher Kombinationen von 2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphaten (dNTP), um das Start-Nukleotid des DNA-Primers von RepB' zu bestätigen (Abbildung 4.2 A, B). Volle Primersyntheseaktivität von RepB' wurde nur in Reaktionsansätzen mit dATP erreicht. RepB' produziert DNA-Primer mit einer Länge von bis zu 12 Nukleotiden (Abbildung 4.2 B). In Reaktionsansätzen ohne dGTP synthetisierte RepB' überwiegend Dinukleotide, in geringem Maße Trinukleotide und DNA-Primer mit einer Länge von bis zu 12 Nukleotiden.

Der Abbruch der DNA-Primersynthese nach einem Dinukleotid im Reaktionsansatz ohne dGTP entsprach den Erwartungen, weil RepB' an Position C30 (3. Position im DNA-Primer) kein komplementäres GMP einbauen kann. Die schwache Synthese von Trinukleotiden und längerer DNA-Primer im Reaktionsansatz ohne dGTP zeigt, dass RepB' unter diesen Bedingungen zur *ssiA* Matrizen-DNA nicht komplementäre dNTPs in den DNA-Primer inkorporiert, dies aber ineffizient ist. Wahrscheinlich ist, dass in den Positionen C28 und C30 der *ssiA* DNA-Sequenz dAMP unter Bildung eines C-A *wobble* Basenpaares in den DNA-Primer von RepB' inkorporiert worden ist. Das Weglassen von dTTP im Reaktionsansatz hatte keinen Einfluss auf die Primer-Länge, weil Adenin nicht im Abschnitt der *ssiA* DNA-Sequenz vorkommt, der als Matrize für die DNA-Primersynthese dient.

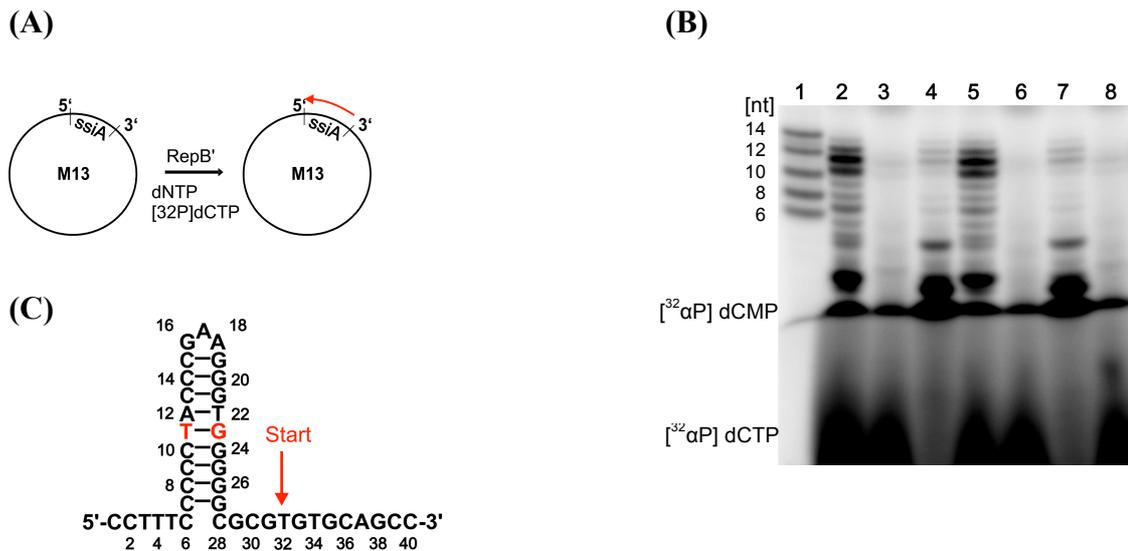


Abbildung 4.2 A, B, C: DNA-Primersynthese von RepB' an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA DNA in Abhängigkeit von dATP, [³²αP] dCTP, dGTP und dTTP. (A) Prinzip des Primersynthesetests. Ein Reaktionsansatz enthält RepB', dNTPs und [³²αP] dCTP. Die von RepB' synthetisierten DNA-Primer wurden durch die Verwendung von [³²αP] dCTP als Substrat im Primersynthesetest radioaktiv markiert, elektrophoretisch im denaturierenden 20%-igen Harnstoffgel aufgetrennt (3.4.2) und durch Autoradiographie mit Hilfe eines Phosphor-Scanners nachgewiesen (3.5.4). [³²αP] dCMP ist eine Verunreinigung des [³²αP] dCTPs. **(B) Primersynthesetest an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA DNA unter Verwendung verschiedener dNTP-Kombinationen.** Alle Reaktionsansätze (3.5.3) enthielten RepB' und M13mp18ssiA DNA und [³²αP] dCTP, aber unterschiedliche Zusammensetzungen an dNTPs. Daher werden für die Spuren 2-8 nur vom Experiment abweichende Reaktionsbedingungen angegeben. **(C) SsiA DNA-Sequenz aus dem oriV von RSF1010 mit eingezeichnetem DNA-Primer von RepB' (roter Pfeil).**

Spur 1 Oligonukleotid-Marker 6-8-10-12-14 Nukleotide

Spur 2 dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Spur 3 dCTP, dGTP, dTTP

Spur 4 dATP, dCTP, dTTP

Spur 5 dATP, dCTP, dGTP

Spur 6 dCTP, dGTP

Spur 7 dATP, dCTP

Spur 8 ohne RepB'

4.1.1 Die Länge des von RepB' synthetisierten DNA-Primers ist abhängig von der dATP Konzentration und variiert zwischen 2-12 Nukleotiden. Um die Auswirkungen der Konzentration von dATP als Start-Nucleotid auf die DNA-Primersynthese von RepB' an M13mp18ssiA DNA zu studieren, wurden die dATP Konzentrationen von 10 μM, 1 mM und 10 mM im Reaktionsansatz variiert bei gleichbleibender Konzentration von 10 μM der 2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate dCTP, dGTP, dTTP (Abbildung 4.3).

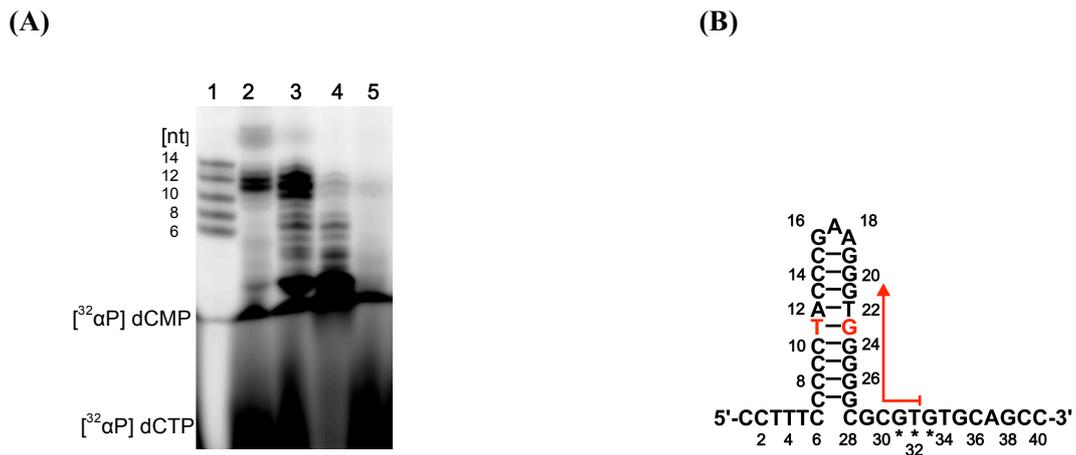


Abbildung 4.3 (A) DNA-Primersynthese von RepB' an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18*ssiA* DNA in Abhängigkeit der dATP-Konzentration. Alle Reaktionsansätze (3.5.3) enthielten M13mp18*ssiA* DNA, RepB' und jeweils 10 μ M von dCTP (davon 1 μ M [$^{32}\alpha$ P] dCTP), dGTP und dTTP. dATP wurde in den Konzentrationen 10 mM (Spur 2), 1 mM (Spur 3) und 10 μ M (Spur 4) eingesetzt oder das Reaktionsgemisch enthielt keine RepB' (Spur 5). Oligonukleotid-Marker 6, 8, 10, 12 und 14 Nukleotide (Spur 1). Die Länge der DNA-Primer konnte anhand der Oligonukleotid-Abbruchprodukte abgezählt oder über den Vergleich mit dem Oligonukleotid-Längenstandards bestimmt werden. **(B) *SsiA* DNA-Sequenz aus dem *oriV* von RSF1010 mit eingezeichnetem DNA-Primer von RepB' (roter Pfeil).**

Je höher die Konzentration von dATP im Verhältnis zu dCTP, dGTP und dTTP war, desto kürzere DNA-Primer synthetisierte RepB'. Bei 10 μ M dATP im Reaktionsansatz, d.h. bei equimolaren Mengen von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, produzierte RepB' DNA-Primer von überwiegend 11 und 12 Nukleotiden. Wurde die dATP-Konzentration auf 1 mM erhöht, synthetisierte RepB' DNA-Primer von 2, 10, 11 und 12 Nukleotiden. Bei einer Konzentration von 10 mM dATP im Reaktionsansatz erzeugte RepB' unter Verbrauch des gesamten freien dATP Di-, Tri- und Hexanukleotide. Die erhöhte dATP-Konzentration von 10 mM stimuliert die DNA-Primer-Neusynthese von RepB' erheblich. Die permanente Neusynthese kurzer DNA-Primer erfordert, dass von RepB' synthetisierte DNA-Primer von der M13mp18*ssiA* DNA-Matrize dissoziieren, damit die Matrizen-DNA für die Synthese weiterer DNA-Primer wieder zur Verfügung steht. Die dATP-Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Primersynthese legt nahe, dass RepB' eine dATP-Bindungsstelle zur Initiation der Primersynthese besitzt, die, sobald sie besetzt ist, die DNA-Primersynthese initiiert. Länge und Startpunkt der DNA-Primersynthese weisen außerdem daraufhin, dass RepB' die *ssiA* DNA-Haarnadelstruktur aufschmelzen

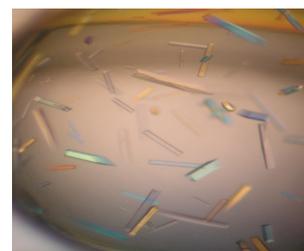
muss, um Primer in voller Länge von 12 Nukleotiden zu synthetisieren, weil der Abstand vom Startpunkt der Primersynthese (T32) bis zur basengepaarten Haarnadelschleife nur 5 Nukleotide beträgt (Abbildung 4.3 B).

4.2 Strukturbestimmung des Wildtyps RepB'. Zu Beginn dieser Doktorarbeit war ein nativer Datensatz eines RepB'-Kristalls bis zu einer Auflösung von 2,5 Å aus meiner Diplomarbeit vorhanden (76). Die Raumgruppe des RepB'-Kristalls war primitiv tetragonal, $P4_12_12$ oder $P4_32_12$. Die Zellkonstanten der Einheitszelle betragen $a = b = 91,1 \text{ \AA}$, $c = 83,6 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

4.2.1 Optimierung der Kristallisationsbedingung von RepB'. Durch Zugabe von 1 mM des Primase-Substrates dTTP zur Kristallisationslösung (Abbildung 4.4) konnte die Diffraktion der RepB' Kristalle um 0,5 Å erhöht werden (3.6.1).

Abbildung 4.4: Optimierte Kristallisationsbedingung für RepB' und RepB' Kristalle

0,3 M Ammoniumsulfat
22 % w/v Polyethylenglycol (PEG)
Monomethylether 2000, 5 % (v/v) γ -Butyrolacton
100 mM Natrium Acetat pH 5,5
1 mM dTTP



4.2.2 Aufnahme eines nativen Datensatzes bis zu einer Auflösung von 2,0 Å und Eingrenzung der tetragonalen Raumgruppen des RepB'-Kristalls auf $P4_12_12$ oder $P4_32_12$. Am Strahlrohr ID 14-2 des *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble konnte mit einem ADSC Q4 CCD Detektor von einem RepB'-Kristall ein nativer Datensatz bis zu einer Auflösung von 1,98 Å aufgenommen werden, der unter der neuen Kristallisationsbedingung mit dTTP gewachsen war. Nach Datenprozessierung (3.6.2) mit den Programmen Denzo und Scalepack (83) wurde ein primitiv tetragonales Kristallsystem festgelegt und die Schraubenachsen nach Bestimmung serieller Auslöschungen entlang der Kristallachsen $h00$ und $00l$ zugeordnet. Die Raumgruppe des Kristalls konnte auf $P4_12_12$ oder $P4_32_12$ eingegrenzt werden. Eine Entscheidung zwischen den enantiomorphen Raumgruppen $P4_12_12$ oder $P4_32_12$ konnte erst nach Lösung des Phasenproblems getroffen werden (s.u.). Die Zellkonstanten der Einheitszelle waren $a = b = 91,74 \text{ \AA}$, $c = 83,48 \text{ \AA}$ und $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

4.2.3 Darstellung der OsO₃ x 2 Pyridin-Derivate von RepB' und Aufnahme von MAD-Daten bis zu einer Auflösung von 2,7 Å. Aufgrund fehlender Raumstrukturen von Primasen mit homologer Aminosäuresequenz konnte das Phasenproblem nicht mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst werden. Daher erforderte die Phasenermittlung die Suche nach geeigneten Schweratomderivaten von RepB'. Letztlich gelang die Phasenbestimmung durch *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit einem OsO₃ x 2 Pyridin RepB'-Derivat (3.6.2). RepB'-Kristalle wurden in Kristallisationslösungen mit 10 mM OsO₃ x 2 Pyridin, aber ohne Zusatz von dTTP 24 Stunden inkubiert. Ungebundenes OsO₃ x 2 Pyridin wurde durch 5-maligen Austausch der Mutterlauge durch Reservoirlösung entfernt. Zur Phasenbestimmung durch MAD wurden von einem Kristall eines RepB'-Osmiumderivates vier Datensätze bis zu Auflösung von 2,7 Å bei jeweils verschiedenen Wellenlänge unter Ausnutzung anomaler Dispersion an der LIII-Absorptionskante von Osmium (Literaturwert 1,1405 Å) aufgenommen (Tabelle 4.1). Das Maximum der LIII-Absorptionskante von Osmium wurde zuvor experimentell durch einen Fluoreszenzscan auf 1,1402 Å ermittelt.

4.2.4 Erstellung des Raumstrukturmodells von RepB'. Nachdem die Röntgenaufnahmen ohne Mittelung der Friedelpaare aufeinander skaliert worden waren (3.6.2), konnte mit dem Programm SHELXC ein anomales Signal bis zu einer Auflösung von 2,7 Å detektiert werden. Mit dem Programm SHELXD konnten nach der Differenz-Patterson-Methode fünf OsO₃-Lagen in der asymmetrischen Einheit lokalisiert werden, die in der initialen, experimentellen Elektronendichtekarte gut definiert waren. Die Bestimmung und Verfeinerung der Phasenwinkel erfolgte mit dem Programm SHELXE bis zu einer Auflösung von 2,7 Å unter Verwendung der drei OsO₃-Lagen mit der höchsten Besetzung und gelang nur in der Raumgruppe P4₃2₁2.

Nach Abschluss des iterativen Strukturverfeinerungsprozesses (3.6.5) unter der Verwendung von 2 Fo-Fc und Fo-Fc Elektronendichtekarten (3.6.5) konnte ein Modell der Raumstruktur von RepB' erstellt werden, dass 89 % der Aminosäuresequenz von RepB' widerspiegelt (3.6.5).

Tabelle 4.1: Datensammlung und Verfeinerungsstatistiken, RepB' Raumstruktur. * Die höchste Auflösungsschale ist in Klammern angegeben. $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, wobei I die beobachtete und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität der Reflexe ist.

	Nativer Kristall	OsO₃-Derivat Kristall			
Datensammlung		<i>peak</i>	<i>inflection</i>	<i>high remote</i>	<i>low remote</i>
Wellenlänge (Å)	0,931	1,1402	1,1406	1,0442	1,2557
Raumgruppe	P43212			P43212	
Einheitszelle (Å)					
a=b	91,74			90,4	
C	83,48			83,2	
$\alpha=\beta=\gamma$ (°)	90			90	
Auflösung (Å)	50-1,98			50-2,7	
$I/\sigma(I)^*$	19,5 (3,4)	30,94 (2,3)	33 (3,7)	37,17 (4,0)	30,24 (2,1)
Vollständigkeit (%)*	99,8 (98,4)	96,5 (72,5)	99,2 (99,9)	99,9 (100)	96 (64,4)
R_{sym} (%)*, #	7,6 (53,3)	3,9 (27,4)	3,9 (34,9)	3,7 (33,9)	4 (36,1)
Gemessene Reflexe	209883	62854	70362	70980	61428
Unabhängige Reflexe	24819	17528	18120	18159	17497
Multiplizität	8,5	3,6	3,9	3,9	3,5
Verfeinerung					
Auflösung (Å)	19,2-1,98				
Reflexe benutzt für Verf.	24774				
Arbeitsatzgröße (%)	23748 (95,8)				
Testsatzgröße (%)	1026 (4,1)				
R-Faktor/freier R-Faktor	19,5/23,3				
Anzahl der Atome					
Protein	2244				
Sauerstoff, Wassers	253				
Sulfat (2)	10				
Pyrophosphat (1)	9				
Durchschnittlicher Temperaturfaktor B (Å ²)	36,1				
Standardabweichung					
Bindungslänge (Å)	0,010				
Bindungswinkel(°)	1,065				
Ramachandran Diagramm					
Bevorzugte Regionen(%)	95,2				
Erlaubte Regionen (%)	4,4				
Großzügig erlaubte Regionen (%)	0,4				

Aufgrund von nicht interpretierbarer Elektronendichte in ungeordneten Bereichen der RepB'-Raumstruktur konnten 11 % der Aminosäurekette von RepB' nicht modelliert werden: Aminosäuren 1-4, 154, 159-161, 208-216, 276-278 und 308-323. Die Stereochemie wurde mit den Programmen WHATCHECK (90) und PROCHECK (91) geprüft. Alle Torsionswinkel ψ und Φ lagen in erlaubten Bereichen (Tabelle 4.1).

4.3 RepB' besteht aus zwei flexibel miteinander verbundenen Domänen. RepB' weist eine hantelförmige Raumstruktur mit zwei voneinander abgegrenzten Domänen auf (Abbildung 4.5 A, B). Die N-terminale Domäne (AS 1-205) von RepB' setzt sich aus zwei zentralen, antiparallelen β -Faltblättern zusammen, die von sechs α -Helices umgeben sind.

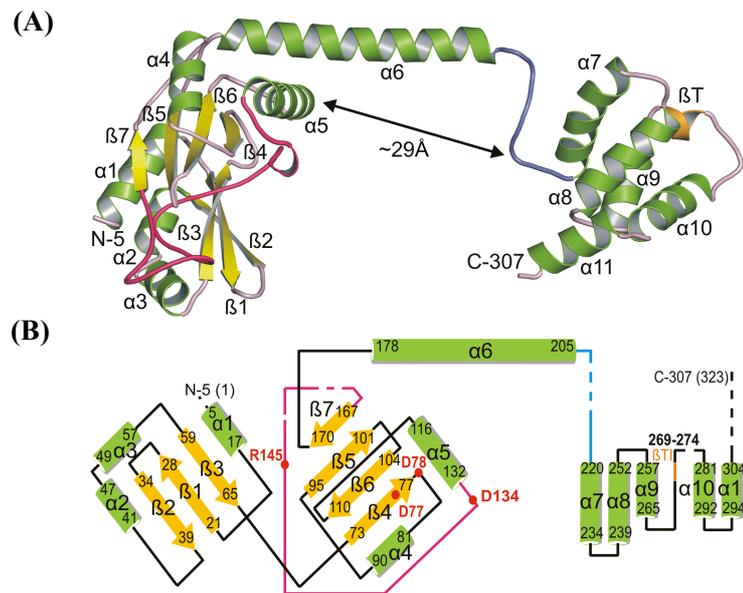


Abbildung 4.5 A, B: Sekundär- und Tertiärstruktur von RepB'. (A) Kristallstruktur von RepB' in der Bänderdarstellung. α -Helices grün, β -Stränge gelb, β -turn Typ I (β T) zwischen α -Helices α 9 und α 10 orange, Schleifen in pink bis auf die lange Schleife (rot), die α -Helix α 5 und β -Strang β 7 verbindet, und die Verbindungsschleife zwischen α -Helix α 6 und α 7 (blau). N -und C Terminus, α -Helices, and β -Stränge sind gekennzeichnet. Die rote Verbindungsschleife verläuft am Boden des katalytischen Zentrums und trägt das katalytisch aktive R145. (B) Topographiedarstellung der RepB'-Raumstruktur. Farben und Kennzeichnung wie in (A). Teile der RepB'-Raumstruktur, die aufgrund von Unordnung nicht modelliert werden konnten, sind als gestrichelte Linien dargestellt (Aminosäuren 1-4, 154, 159-161, 208-216, 276-278, and 308-323). Strukturell konservierte katalytische Aminosäuren sind als rote Punkte eingezeichnet und im Ein-Buchstaben-Code gekennzeichnet.

Die C-terminale Domäne (AS 220-323) von RepB' besteht aus einem Bündel von sechs α -Helices. N- und C-terminale Domäne von RepB' sind durch 14 unstrukturierte Aminosäuren (AS 206-219) miteinander verbunden und liegen in der asymmetrischen Einheit des Kristalls ~ 29 Å voneinander entfernt. Da N- und C-terminale Domäne von RepB' flexibel verknüpft sind, sind Lage und Orientierung der beiden Domänen zueinander sehr wahrscheinlich durch die Kristallpackung beeinflusst.

Um Strukturhomologien zu anderen Proteinen aufzuzeigen, wurden mit Hilfe des DALI-Servers (93) die Raumstrukturen von RepB' und Proteinen aus der PDB-Datenbank überlagert (3.6.6).

4.4 Die katalytischen Zentren von RepB' und archaebakteriellen Primasen weisen Strukturhomologien auf. Die Raumstrukturvergleiche des DALI-Servers (93) ergaben, dass die N-terminale Domäne von RepB' Strukturhomologie zu katalytischen Domänen von Primasen aus Archaebakterien und zu einer RNA-Polymerase Domäne der LigaseD aus *Pseudomonas aeruginosa* (70) aufweist (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Ergebnisse der DALI-Server Suche mit RepB'.

PDB-Code, Protein Daten Bank ID Code. AS, Aminosäure. PDB-Code RepB' 3H20.

Primase	PDB-Code	Organismus	Z-Wert	Mittlere Standard-abweichung der C α -Atome [Å]	Anzahl überlagerte AS (C α -Position)
Pfo-Primase (64)	1G71	<i>Pyrococcus furiosus</i> (Pfu)	9,9	2,8 Å	148
Pho-Primase (63)	1v33	<i>Pyrococcus horikoshii</i> (Pho)	9,8	2,8 Å	148
Polymerase Domäne der Ligase D (70)	2FAO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,0	3,2 Å	156
Sso-Primase (65)	1zt2	<i>Sulfolobus solfataricus</i> (Sso)	7,8	3,0 Å	140
DNA-Primase/ Polymerase Domäne des Replikationsproteins ORF904 (69)	1rni	<i>Sulfolobus islandicus</i>	6,7	3,9 Å	146

Die strukturell größte Verwandtschaft (Z-Wert 9,9) besteht zwischen den katalytischen Domänen von RepB' und der Pfu-Primase aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (64), von denen sich die C α -Atomposition von 148 Aminosäuren mit einer mittleren Standardabweichung von 2,8 Å überlagern ließen. Die Ergebnisse der DALI-Suche für die Helix-Bündel Domäne werden weiter unten beschrieben.

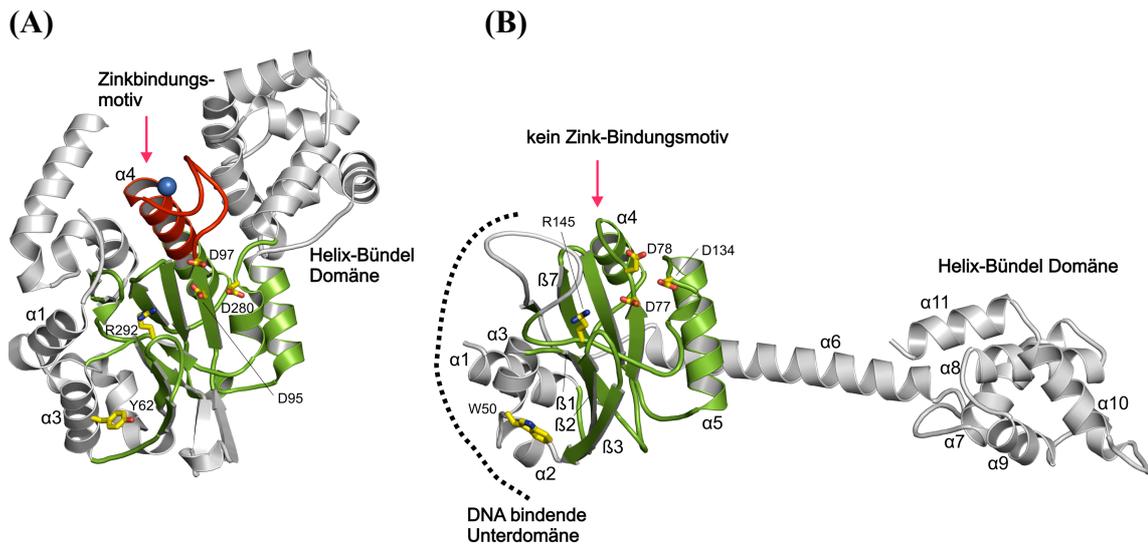


Abbildung 4.6: Raumstrukturvergleich der aktiven Zentren von Pfu Primase (A) und RepB' (B). Die Überlagerung der Raumstrukturen von RepB' (Protein Daten Bank ID Code 3H20) und Pfu-Primase (Protein Daten Bank ID Code 1G71) liefert einen Z-Wert von 9,9 und eine mittlere Standardabweichung von 2,8 Å für 148 C-Atome beider Strukturen. Maßstab und Orientierung der Raumstrukturen von RepB' und Pfu Primase sind gleich. Strukturelemente, die sich überlagern, sind grün, abweichende Strukturelemente sind rot oder grau gefärbt. Die katalytischen Aminosäuren beider Primasen und die potentiell DNA-bindenden Aminosäuren Y62 (Pfu) and W50 (RepB') sind als Stabmodelle eingezeichnet (Kohlenstoffatome gelb, Sauerstoff rot, Stickstoff blau). (A) Das Zink-Bindungsmotiv der Pfu Primase ist am N-Terminus von α -Helix α 4 (rot) lokalisiert; das gebundene Zn^{2+} -Ion ist als blaue Kugel dargestellt. (B) Die korrespondierende α -Helix α 4 ist verkürzt in der RepB'-Raumstruktur (roter Pfeil). Die *ssiA* DNA spezifisch bindende Unterdomäne von RepB' (Helices α 1- α 3 und α 7 und β -Stränge β 1- β 3, siehe Abbildung 4.18), ist mit einer gestrichelten schwarzen Linie angedeutet.

4.5 Die Raumstrukturen von RepB' und Pri-Typ Primasen weisen konservierte katalytische Aminosäuren im aktiven Zentrum auf. Durch Überlagerungen der homologen Raumstrukturen der Primasen RepB, Pho, Sso und der LigD Polymerase Domäne konnten strukturell konservierte Aminosäuren identifiziert werden (Abbildung 4.7, Tabelle 4.3). Die Aminosäuren D77, D78, D134, und R145 waren in den überlagerten Raumstrukturen identisch, die Aminosäuren Y62, L75, T100, Q106, H142 und N151 typkonserviert (RepB'-Nummerierung). Die geometrische Anordnung der drei Aspartate D77, D78 und D134 ist auch in Raumstrukturen von DNA- und RNA-Polymerasen konserviert, wo drei Aspartate nach Bindung von zwei dNTPs bzw. NTPs 2 Metallionen koordinieren und so die Nukleotidyltransferaseaktivität der DNA- und RNA-Polymerasen katalysieren (Abbildung 1.2).

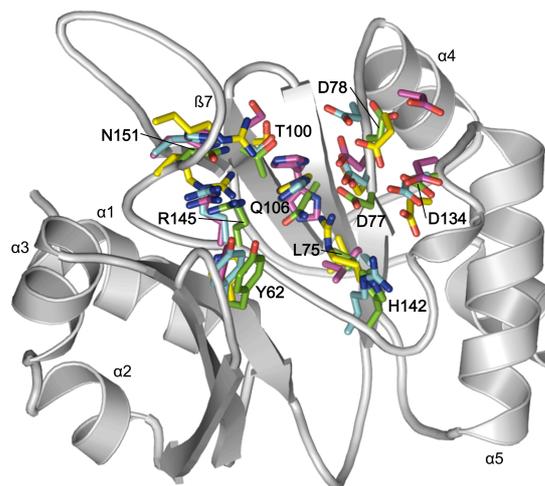


Abbildung 4.7: Raumstruktur des aktiven Zentrums von RepB' mit konservierten Aminosäuren.

Die katalytische Domäne ist in ähnlicher Orientierung wie in Abbildung. 4.6 abgebildet. Die Aminosäuren sind als Stabmodelle dargestellt. Die C-Atome unterscheiden sich abhängig von der zugehörigen Primase: RepB' (grüne C-Atome), Pfu Primase (blaue C-Atome), Sso Primase (violette C-Atome) und LigD Polymerase Domäne (gelbe C-Atome). Sauerstoffatome sind rot und Stickstoffatome blau gefärbt. Die Aminosäuren von RepB' sind im Ein-Buchstaben-Code gekennzeichnet. Äquivalente Aminosäuren der überlagerten Primasen sind nicht beschriftet, können aber mit Hilfe des Farbcodes und Tabelle 4.3 abgeleitet werden. Zum Beispiel sind Aminosäuren D280 (blaue C-Atome, Pfu), D759 (gelbe C-Atome, ligD), and D235 (violette C-Atome, Sso) äquivalent zu Aminosäure D134 (grüne C-Atome, RepB'). Die Aminosäuren der Pho Primase sind zur besseren Übersicht nicht gezeigt, besetzen aber die gleichen Positionen in der Raumstruktur wie die Aminosäuren der Pfu Primase und haben die gleiche Nummerierung. Die Aminosäuresequenzen der Primasen Pfu and Pho sind zu 90% homolog.

RepB'	LigD Pol	Pfu-Primase	Pho-Primase	Sso-Primase
Asp77	Asp669	Asp95	Asp95	Asp101
Asp78	Asp671	Asp97	Asp97	Asp103
Asp134	Asp759	Asp280	Asp280	Asp235
Arg145	Arg776	Arg292	Arg292	Arg247
<i>Tyr62</i>	His651	Tyr72	Tyr72	Phe74
<i>Leu75</i>	Val668	Val93	Val93	Leu99
<i>Thr100</i>	Ser704	Ser146	Ser146	Ser173
<i>Gln-106</i>	His710	His151	His151	His179
<i>His142</i>	Arg762	Arg289	Arg289	Arg247
<i>Asn151</i>	Arg778	His298	His298	His253

Tabelle 4.3: Strukturell konservierte Aminosäuren innerhalb des katalytischen Zentrum von RepB' und der homologen Primasen Pfu, Pho und Sso und der LigD Polymerase-Domäne. Identische und typkonservierte (schräggestellt) Aminosäuren innerhalb der verglichenen Raumstrukturen in der Zählweise der jeweiligen Proteine.

Die Oberflächendarstellung von RepB' zeigt, dass die strukturell konservierten Aminosäuren sich in einer Vertiefung der katalytischen Domäne(n) befinden, die der Helix-Bündel Domäne zugewandt ist (Abbildung. 4.8).

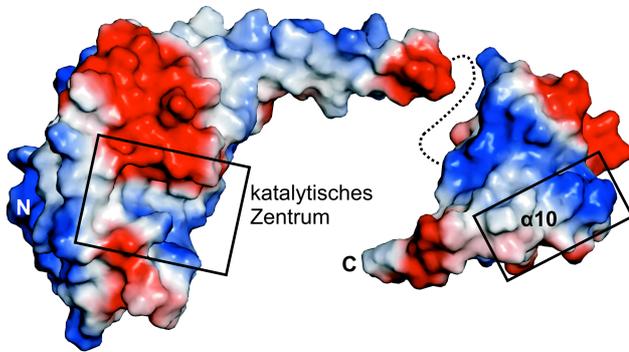
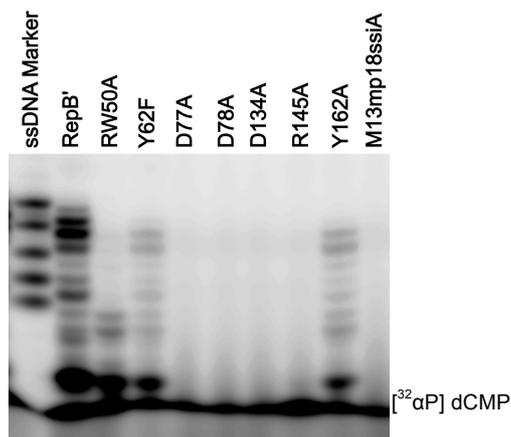


Abbildung 4.8: Oberflächendarstellung von RepB' in gleicher Orientierung wie in Abbildung 4.5) Positive geladene (blau), negative geladene (rot) und neutrale Oberfläche (grau).

(A)



(B)

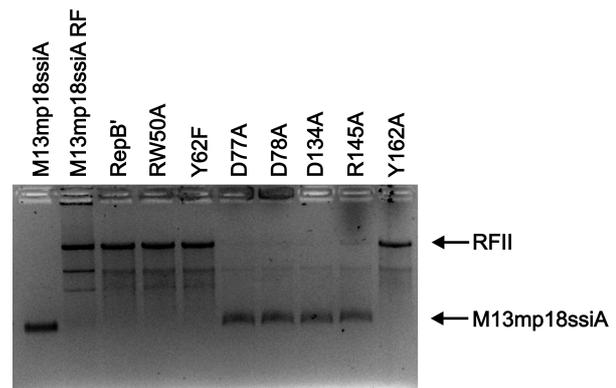


Abbildung 4.9 A, B: Primersynthese- und Komplementärstrangsynthesetests der RepB'-Mutantenproteine W50A, Y62F, D77A, D78A, D134A, R145A und Y162A an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA DNA (A) Primersynthesetest (3.5.3). Alle Ansätze enthielten M13mp18ssiA DNA, dNTPs, [³²αP] dCTP und jeweils eines der folgenden RepB'- Mutantenproteine: W50A, Y62F, D77A, D78A, D134A, R145A und Y162A. Kontrolle: M13mp18ssiA, Reaktionsansatz ohne RepB'. Oligonukleotid-Längenstandard: 6, 8, 10, 12, 14 Nukleotide (2.6). **(B) Im Komplementärstrangsynthesetest (3.5.2) wurde die Fähigkeit der Primase getestet, in Gegenwart der Vent-DNA-Polymerase dsDNA-Synthese an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA DNA zu initiieren (Abbildung 4.1 A).** Die Reaktionsansätze wurden im 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht (3.4.1). Alle Reaktionsansätze (3.5.2) enthielten M13mp18ssiA DNA, dNTPs, Vent-DNA-Polymerase und eines der folgenden RepB'- Mutantenproteine: W50A, Y62F, D77A, D78A, D134A, R145A und Y162A. Kontrollen: M13mp18ssiA ssDNA und aus *E. coli* isolierte M13mp18ssiA dsDNA (3.3).

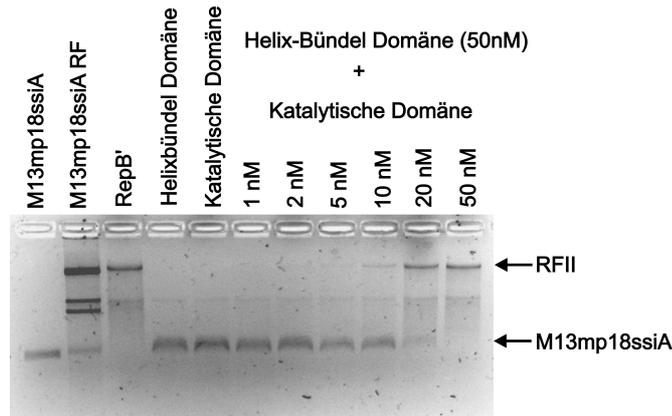
Um den katalytischen Einfluss der konservierten Aminosäuren zu testen, wurden RepB'-Derivate mit jeweils einer Punktmutationen in der Aminosäuresequenz generiert (3.1.7, Anhang Abbildung A2-3) und ihre Primaseaktivität an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18*ssiA* DNA gemessen (3.5.2, 3.5.3, Abbildung 4.9). In Primersynthese- und Komplementärstrangsynthesetests zeigten die RepB'-Mutantenproteine D77A oder D78A oder D134A im Vergleich zum Wildtyp RepB' keine Aktivität mehr (Abbildung 4.9 A, B). Damit kann angenommen werden, dass die Aminosäuren RepB' D77, D78 und D134 die Nukleotidyltransferase-Aktivität von RepB' katalysieren. Die Primaseaktivität der RepB'-Proteinmutante R145A war im Komplementärstrangsynthesetest im Vergleich zum Wildtyp RepB' stark reduziert; im Primase-Aktivitätstest konnte keine DNA-Primersynthese des RepB'-Mutantenproteins R145A nachgewiesen werden, was zeigt, dass der Komplementärstrangsynthesetest sensitiver ist als der radioaktive Primase-Aktivitätstest. Die Aminosäure R145 liegt im katalytischen Zentrum eher unzugänglich für Matrizen-DNA. Es erscheint deshalb wahrscheinlich, dass R145 an der dNTP- und nicht an der DNA-Bindung beteiligt ist. Die stark reduzierte Primaseaktivität des RepB' Mutantenproteins R145A könnte auf eine Beeinträchtigung der Bindung oder der Positionierung des eingehenden dNTPs in das aktive Zentrum zurückzuführen sein. Die RepB'-Proteinmutante Y62F zeigte volle Aktivität im Vergleich zum Wildtyp RepB'. Die Untersuchung der RepB'-Mutantenproteine W50A und Y162A wird unter Punkt 4.16 beschrieben.

4.6 Die RepB'-Aktivität ist Zink-Ionen unabhängig. Im Gegensatz zu den dreidimensionalen Strukturen von Primasen des DnaG- oder des Pri-Typs weist die Raumstruktur von RepB' weder auf der katalytischen noch auf der Helix-Bündel Domäne eine gebundenes Zink-Ion oder ein Zinkbindungsmotiv auf. Die Überlagerung der Raumstrukturen von RepB' und Pfu-Primase zeigt, dass die zu α -Helix α 4 von RepB' korrespondierende Zink-bindende α -Helix der Pfu-Primase in der Struktur von RepB'- verkürzt und damit offenbar zur Zn^{2+} -Bindung ungeeignet ist (Abbildung 4.6). Um zu verifizieren, dass die Primase-Aktivität von RepB' Zink-unabhängig ist, wurde die Primaseaktivität in Gegenwart von 0,001-10 mM $ZnCl_2$ oder des Zink-Chelators N,N,N,N-tetra-bis-(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin (TPEN) gemessen. Weder $ZnCl_2$ noch der Zink-Chelator TPEN stimulierten oder inhibierten die Primaseaktivität (nicht gezeigt).

4.7 Die Helix-Bündel Domäne von RepB' ist essentiell für die Primase-Aktivität.

Um festzustellen, ob die Helix-Bündel Domäne von RepB' die Primersynthese beeinflusst, wurden die Helix-Bündel Domäne (AS 213-323) und die katalytischen Domäne RepB' (AS 1-212) rekombinant hergestellt (3.1) und im Primase-Aktivitätstest (3.5.2, 3.5.3) untersucht (Abbildung 4.10 A, B).

(A)



(B)

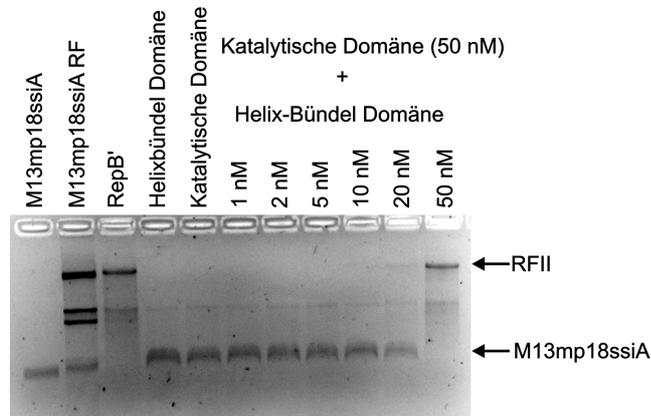


Abbildung 4.10 A, B: Abhängigkeit der Initiation der Komplementärstrangsynthese vom Konzentrationsverhältnis katalytischer zu Helix-Bündel Domäne von RepB'. Nur equimolare Verhältnisse von katalytischer und Helix-Bündel Domäne von RepB' können die Primaseaktivität wiederherstellen. **(A)** Die Konzentration der Helix-Bündel Domäne von RepB' wurde herabgesetzt von 50, 20, 10, 5, 2 auf 1 nM bei konstanter Konzentration (50 nM) der katalytischen Domäne von RepB'. Kontrollen: RepB', ssM13mp18ssiA ssDNA und aus *E. coli* isolierte M13mp18ssiA dsDNA. **(B)** Die Konzentration der katalytischen Domäne von RepB' wurde herabgesetzt von 50, 20, 10, 5, 2 auf 1 nM bei konstanter Konzentration (50 nM) der Helix-Bündel Domäne von RepB'. Kontrollen: RepB', aus *E. coli* isolierte M13mp18ssiA dsDNA und ssM13mp18ssiA ssDNA.

Sowohl die isolierte katalytische Domäne als auch die isolierte Helix-Bündel Domäne von RepB' konnten DNA-Doppelstrangsynthese nicht eigenständig an einzelsträngiger, zirkulärer *ssiA* M13mp18 DNA initiieren. Die Primaseaktivität konnte wiederhergestellt werden, wenn die isolierte katalytische und Helix-Bündel Domäne von RepB' zusammen eingesetzt wurden (Abbildung 4.10 A, B). Im Vergleich zum Wildtyp RepB' konnte die volle Primaseaktivität nur bei equimolarem Verhältnis von isolierter katalytischer und isolierter Helix-Bündel Domäne von RepB' erreicht werden. Wurde die Konzentration einer Domäne von 50 nM auf 1 nM herabgesetzt bei konstanter Konzentration von 50 nM der anderen Domäne, wurde die Primaseaktivität reduziert (Abbildung 4.10 A, B).

Dieses Ergebnis wurde durch den Primersynthesetest bestätigt: Bei Komplementation von isolierter katalytischer Domäne und isolierter Helix-Bündel Domäne von RepB' wurden in sehr geringem Maße Di-, Tri- und Tetranukleotide an M13mp18*ssiA* ssDNA synthetisiert. Wenn nur isolierte katalytische Domäne oder nur die isolierte Helix-Bündel Domäne von RepB' im Reaktionsansatz waren, konnten keine DNA-Primer nachgewiesen werden (Abbildung 4.11 A).

Die *in vitro* Komplementation zeigt, dass katalytische und Helix-Bündel Domäne von RepB' auch ohne kovalente Verknüpfung ohne nennenswerten Verlust aktiv sind. Daraus lässt sich schließen, dass katalytische und Helix-Bündel Domäne von RepB' einen spezifischen Komplex an *ssiA* DNA bilden. Weil DNA-Komplementärstrangsynthese nur bei equimolarem Verhältnis von katalytischer und Helix-Bündel Domäne von RepB' initiiert wird, ist wahrscheinlich, dass beide Domänen einen spezifischen Komplex im Verhältnis 1:1 an *ssiA* DNA formen.

4.8 Die Verkürzung des Aminosäurelinkers (AS 206-220) von RepB' reduziert die Primase-Aktivität. Die Funktion des Aminosäurelinkers von RepB', der katalytische und Helix-Bündel Domäne verbindet, wurde an den RepB'-Derivaten RepB' Δ 6 und RepB' Δ 12 untersucht (Abbildung 4.11 A, B), in denen der Aminosäurelinker (AS 206-220) um sechs (AS 207-213) bzw. um 12 Aminosäuren (AS 207-219) verkürzt ist (Anhang Abbildung A1-3). RepB' Δ 6 und RepB' Δ 12 initiierten dsDNA-Synthese an M13mp18*ssiA* ssDNA. Obwohl die Primersynthese-Aktivität von RepB' Δ 6 und RepB' Δ 12 im Vergleich zum Wildtyp RepB' reduziert war, entsprach die Länge der von RepB' Δ 6 und RepB' Δ 12 synthetisierten DNA-Primer der Primer-Länge des

Wildtyps RepB'. Die Primersynthese Aktivität von RepB' Δ 6 war höher als von RepB' Δ 12. Offenbar beeinflusst die durch den Aminosäurelinker vermittelte Flexibilität zwischen katalytischer und Helix-Bündel Domäne die Primersynthese Aktivität von RepB'.

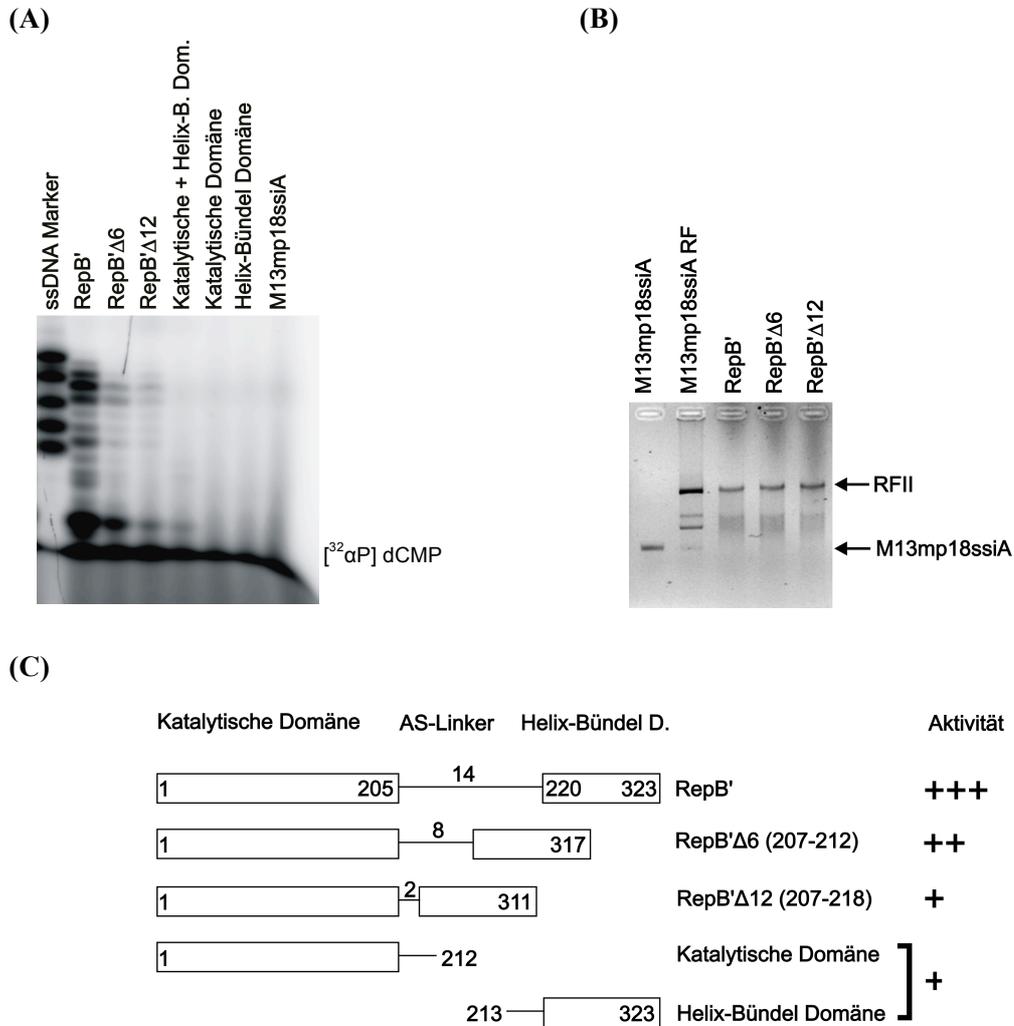


Abbildung 4.11 A, B, C: DNA-Primersynthese der RepB'-Derivate RepB' Δ 6, RepB' Δ 12, katalytische und Helix-Bündel Domäne von RepB' an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA DNA. Alle Ansätze (3.5.2) enthielten M13mp18ssiA DNA, dNTPs und jeweils eines der folgenden RepB'-Derivate: RepB' Δ 6, RepB' Δ 12, katalytische + Helix-Bündel Domäne von RepB', katalytische Domäne von RepB', Helix-Bündel Domäne von RepB'. Oligonukleotid-Längenstandard. Kontrolle: M13mp18ssiA, Reaktionsansatz ohne RepB'. (C) Übersicht über die eingesetzten RepB'-Derivate. Balken deuten die Domänen der Derivate an. Die ersten und letzten Aminosäuren der RepB'-Derivate und ihrer Domänen sind in der Nummerierung des jeweiligen Derivates angegeben. Die Zahlen auf den Aminosäurelinkern geben die Länge des Linkers an. Die abgeschätzte Aktivität der RepB'-Derivate im Primersynthesetest wird mit + angezeigt: + niedrigste und +++ höchste Primersyntheseaktivität.

Katalytische und Helix-Bündel Domäne produzierten zusammen aber nur auf geringem Niveau Di-, Tri- und Tetranukleotide, konnten aber Komplementärstrangsynthese initiieren (Abbildung 4.10 A, B). Die geringere Primersyntheseaktivität im Vergleich zum Wildtyp könnte in diesem Fall darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund des fehlenden Aminosäurelinkers katalytische und Helix-Bündel Domäne von RepB' seltener zueinander finden. Dagegen sorgt der Aminosäurelinker im Wildtyp RepB' für eine "lokale Konzentrierung" beider Domänen.

4.9 Die Helix-Bündel Domäne von RepB' weist eine Homeodomänen-ähnliche Faltung auf. Raumstrukturvergleiche mit dem DALI-Server lieferten entfernt homologe Strukturen zur Helix-Bündel Domäne von RepB' (AS 212-323, Z-Werte < 5,5). Am ähnlichsten zur Raumstruktur der Helix-Bündel Domäne von RepB' waren dsDNA-bindende Homeodomänen aus Eukaryonten bzw. dsDNA-bindende Proteine mit Homeodomänen-ähnlicher Faltung aus Phagen, die sich mit den antiparallel zueinander verlaufenden α -Helices $\alpha 8$ und $\alpha 9$ und der über den α -Helices $\alpha 8$ und $\alpha 9$ quer liegenden α -Helix $\alpha 10$ der Helix-Bündel Domäne von RepB' überlagern ließen (Abbildung 4.12 A, B). Mit der dsDNA-Bindungsdomäne der Transposase des Phagen Mu konnten bis auf α -Helix $\alpha 7$ die vier α -Helices $\alpha 8-11$ überlagert werden (Abbildung 4.12 B). Von 111 Aminosäuren der Helix-Bündel Domäne von RepB' wurden 58 Aminosäuren mit einer mittleren Standardabweichung von 2,9 Å mit der Mu DNA-Bindungsdomäne überlagert; der Z-Wert war 3,3.

In allen Überlagerungen wurde α -Helix $\alpha 10$ automatisch auf hypothetische oder experimentell ermittelte dsDNA-Erkennungshelices positioniert, die in der großen Furche der DNA-Doppelhelix binden (Abbildung 4.12 A). Ein flexibler N-Terminus, der mit der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix interagiert, wie es typisch für Homeodomänen ist, fehlt der Helix-Bündel Domäne von RepB'. Die α -Helices $\alpha 1-\alpha 3$ der Mu Transposase and α -Helices $\alpha 8-\alpha 10$ von RepB' weisen die Homeodomänen-ähnliche Faltung auf. Zusätzlich lässt sich α -Helix $\alpha 4$ der Mu Transposase mit Helix $\alpha 11$ von RepB' überlagern.

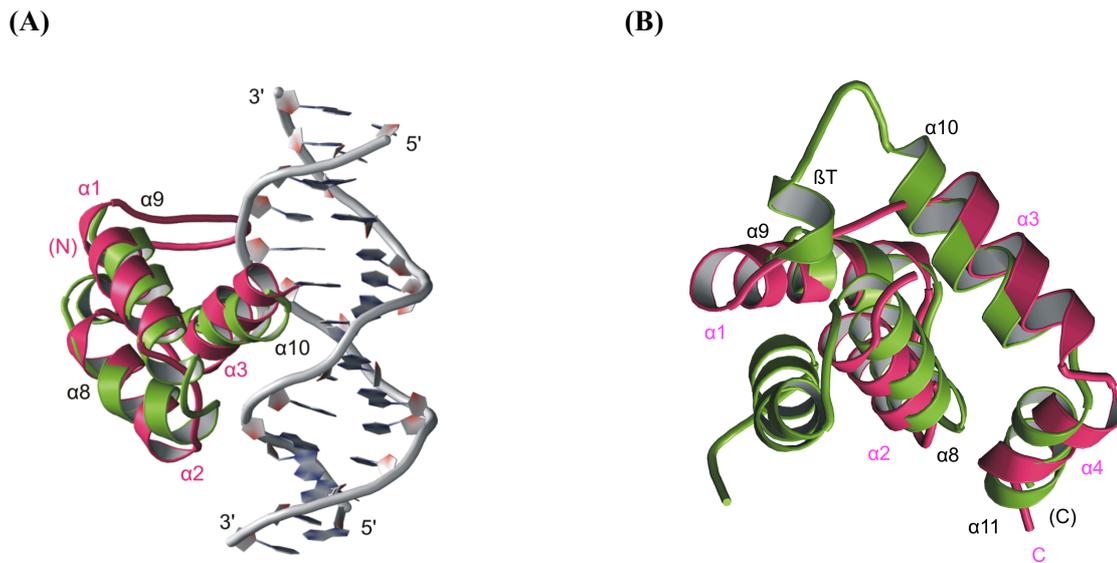


Abbildung 4.12 A, B: (A) Die Homeodomänen-ähnliche Faltung der Helix-Bündel Domäne von RepB' modelliert an dsDNA. Helices $\alpha 8$ – $\alpha 10$ von RepB' (grün) sind mit der Antennapedia Homeodomäne von *Drosophila melanogaster* überlagert (rot; $\alpha 1$ – $\alpha 3$), die im Komplex mit dsDNA (grau; Protein Data Bank ID code 1AHD) vorliegt. Die potentielle dsDNA-Erkennungshelix $\alpha 10$ von RepB' würden sterisch in die große Furche der DNA-Doppelhelix passen. α -Helices $\alpha 7$ and $\alpha 11$ von RepB' sind zur besseren Übersicht nicht gezeigt, würden aber eine Bindung an die DNA-Doppelhelix nicht behindern. **(B) Die potentielle DNA-Bindungsstelle der Helix-Bündel Domäne von RepB' (grün) überlagert mit der Homeodomänen-ähnliche Faltung der Transposase I des Phagen Mu (rot, Protein Data Bank ID Code 2ezh).** Die Überlagerung liefert einen Z-Wert von 3.3 und eine mittlere Standardabweichung von 2,9 Å für 58 α -Atompositionen beider Domänen.

4.10 Die Helix-Bündel Domäne von RepB' bindet an ssiA DNA. In der Tat wurden Komplexe aus Helix-Bündel Domäne (AS 213-323) von RepB' und *ssiA* DNA im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA, 3.5.6) beobachtet und die Dissoziationskonstante der Komplexe durch analytischer Ultrazentrifugation (3.5.7) auf 27 μ M bestimmt. Die Dissoziationskonstante der Komplexe aus Helix-Bündel Domäne von RepB' und *ssiA*(3' Δ 13)DNA, die am 3'-DNA-Ende, um 13 Nukleotide verkürzt ist, wurde durch analytische Ultrazentrifugation gemessen und betrug 25,8 μ M. Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten der Komplexe bestehend aus Helix-Bündel Domäne/*ssiA* DNA und Helix-Bündel Domäne/*ssiA*(3' Δ 13)DNA zeigt, dass das 3'-DNA-Ende (Nukleotide 28-40) der *ssiA* DNA die Bindung an die Helix-Bündel Domäne von RepB' kaum beeinflusst. Bindungsstudien an der Haarnadelschleife

(Nukleotide 7-27) der *ssiA* DNA konnten nicht durchgeführt werden, weil die Haarnadelschleife unter den verwendeten Bedingungen unlöslich war.

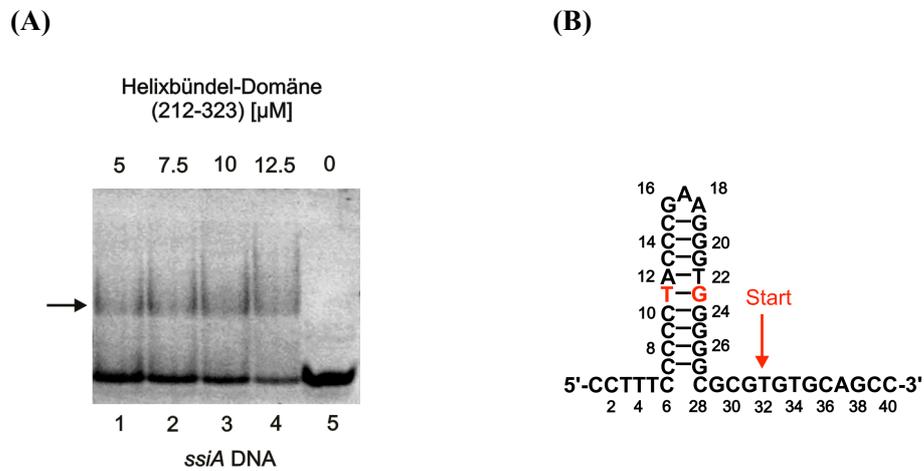
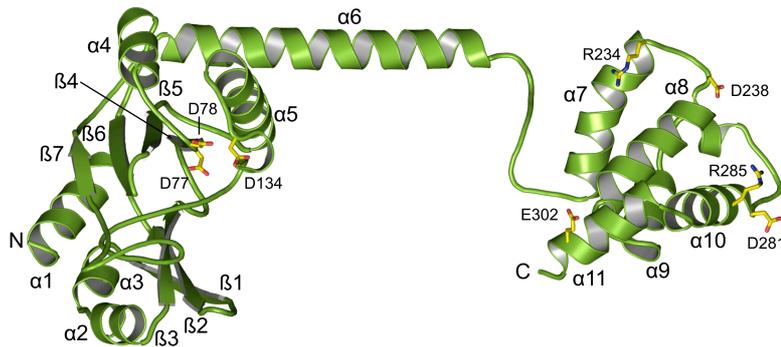


Abbildung 4.13 A, B EMSA der *ssiA* DNA mit der Helix-Bündel Domäne von RepB'. Helix-Bündel Domäne/*ssiA* DNA Komplexe wandern langsamer im nativen Polyacrylamidgel im Vergleich zur ungebundenen *ssiA* DNA und sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Bei der unteren Bande handelt es sich um ungebundene *ssiA* DNA. Spuren 1-4: 10 μM *ssiA* DNA + 5-12,5 μM Helix-Bündel Domäne von RepB'; Spur 5: nur *ssiA* DNA. (B) *SsiA* DNA-Sequenz aus dem *oriV* von RSF1010. Der Startpunkt der DNA-Primersynthese ist eingezeichnet.

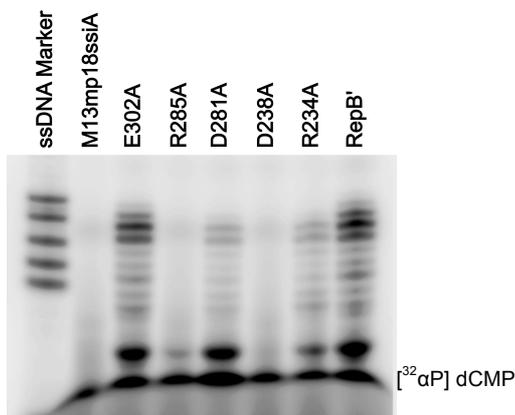
Kartierung funktioneller Aminosäuren der Helix-Bündel Domäne von RepB'.

Aminosäuren auf der Oberfläche der Helix-Bündel Domäne von RepB' wurden einem Alanin-Scan unterzogen, um eine Kartierung funktioneller Aminosäuren vorzunehmen. Durch Überlagerung der Helix-Bündel Domäne von RepB' mit dsDNA Bindungsdomänen konnten strukturell konservierte Aminosäuren nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Sequenzvergleiche von RepB' mit Primasen, die von den RSF1010 verwandten IncQ und IncQ ähnlichen Plasmiden kodiert werden, wiesen dagegen auf konservierte Aminosäuren hin, unter denen Aminosäuren D281 und R285 auf der theoretischen Erkennungshelix $\alpha 10$ der Helix-Bündel Domäne liegen (Abbildung 4.14 A). Die RepB'-Proteinmutanten R234A, D281A und E302A synthetisierten DNA-Primer in voller Länge, aber in geringerem Maße als der Wildtyp RepB' (Abbildung 4.14 B).

(A)



(B)



(C)

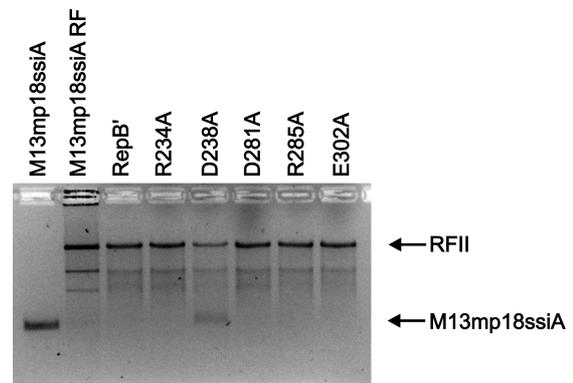


Abbildung 4.14 A, B: DNA-Primersynthese der RepB'-Mutantenproteine R234A, D238A, D281A, R285A und E302A an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA DNA. (A) Struktur von RepB' mit konservierten Aminosäuren. Alle eingezeichneten Aminosäuren sind unter IncQ-Primasen strikt konserviert in der Aminosäuresequenz. **(B) Primersynthesetest (3.5.3).** Alle Ansätze enthielten M13mp18ssiA DNA, dNTPs und jeweils eines der folgenden RepB'-Mutantenproteine: R234A, D238A, D281A, R285A und E302A. Kontrollen: M13mp18ssiA ssDNA, Reaktionsansatz ohne RepB'. RepB', kompletter Reaktionsansatz. Oligonukleotid-Längenstandard: 6, 8, 10, 12, 14 Nukleotide (2.6).

(C) Im Komplementärstrangsynthesetest (3.5.2) wurde die Fähigkeit der Primase getestet, in Gegenwart der Vent-DNA-Polymerase dsDNA-Synthese an zirkulärer einzelsträngiger M13mp18ssiA zu initiieren (Abbildung 4.1 A). Die Reaktionsansätze wurden im 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht (3.4.1). Alle Reaktionsansätze (3.5.2) enthielten M13mp18ssiA DNA, dNTPs, Vent-DNA-Polymerase und eines der folgenden RepB'-Mutantenproteine: R234A, D238A, D281A, R285A und E302A. Kontrollen: M13mp18ssiA ssDNA, M13mp18ssiA dsDNA isoliert aus *E. coli* (3.3).

Die RepB'-Proteinmutante R285A produzierte kaum nachweisbare Mengen eines Dinukleotids. Die DNA-Primersynthese der RepB'-Proteinmutante D238A lag zwar

unter der Nachweisgrenze des Primer-Synthesetests. Die Initiation der Komplementärstrangsynthese durch RepB' D238A und R285A bewies aber, dass RepB' D238A und R285A Primaseaktivität ebenso wie RepB' R234A, D281A und E302A besitzen (Abbildung 4.14 B). Der Versuch zeigt, dass die Funktion der Helix-Bündel Domäne von mehreren Aminosäuren ausgeübt wird, von denen jede einzelne Aminosäuren nicht essentiell für die Primaseaktivität von RepB' ist.

4.11 Strategien zur Kristallisation von Primase-DNA-Komplexen. Kristallisationsversuche mit Wildtyp RepB' und intakter *ssiA* DNA blieben erfolglos. Als Ursache wurden flexible Regionen der *ssiA* DNA oder von RepB' vermutet wie z.B. das 3'- oder 5' Ende der *ssiA* DNA oder die über den flexiblen Aminosäurelinker verknüpfte Helix-Bündel Domäne und der unstrukturierte C-Terminus (AS 306-323) von RepB'. Aus diesem Grund wurden die katalytische Domäne von RepB' sowie ein um 16 Aminosäuren verkürztes RepB'-Derivat (RepB' Δ 16, Ergebnisse nicht gezeigt) hergestellt und versucht mit verschiedenen verkürzten *ssiA* DNA-Derivaten zu kristallisieren. Zur Identifizierung verkürzter *ssiA* DNA-Derivate, die stabil gereinigt werden konnten, wurden Bindungsstudien unternommen, die nachfolgend beschrieben werden.

4.12 Das einzelsträngige 5'-Ende der *ssiA* DNA ist essentiell für die Bindung an RepB'. Im EMSA konnten Komplexe aus *ssiA* DNA und RepB' oder der katalytischen Domäne von RepB' beobachtet werden (Abbildung. 4.15 B, C); die Dissoziationskonstanten dieser Primase-*ssiA* DNA Komplexe wurden durch analytische Ultrazentrifugation auf 3,59 μ M (RepB'+*ssiA* DNA) und 2,01 μ M (katalytische Domäne von RepB'+ *ssiA* DNA) bestimmt (Tabelle 4.4).

Die Dissoziationskonstanten der auch im EMSA beobachteten Komplexe aus *ssiA*(3' Δ 13)DNA und RepB' oder der katalytischer Domäne von RepB' (Abbildung 4.15 D, E) waren um den Faktor \sim 2 reduziert auf 7,95 μ M (RepB'+ *ssiA*(3' Δ 13)DNA) und 5,22 μ M (katalytische Domäne+ *ssiA*(3' Δ 13)DNA). Dies zeigt, dass das einzelsträngige 3'-Ende (Nukleotide 28-40) der *ssiA* DNA zwar zur Bindung an die katalytische Domäne von RepB' beiträgt, aber nicht essentiell ist. Wurde die *ssiA* DNA dagegen am 5'-Ende um die Nukleotide 1-6 verkürzt (*ssiA*(5' Δ 6)DNA), konnten weder RepB' noch die katalytische Domäne an *ssiA*(5' Δ 6)DNA binden.

Tabelle 4.4: Dissoziationskonstanten von Primase-DNA Komplexen: RepB', katalytische (AS 1-212) oder Helix-Bündel Domäne (AS 212-323) von RepB' gebunden an *ssiA* DNA oder *ssiA*(3'Δ13)DNA. Die Dissoziationskonstanten der Primase-DNA-Komplexe wurden durch analytische Ultrazentrifugation bestimmt (3.5.7). Die Standardabweichungen sind in Klammern angegeben. Die analytische Ultrazentrifugation wurde von Prof. Behlke (MDC Berlin-Buch) durchgeführt.

K_d	RepB'	Katalytische Domäne	Helix-Bündel Domäne
<i>ssiA</i>	3,59 (+/-2,0) μM	2,01 (+/- 0,4) μM	27,0 (+/- 1,2) μM
<i>ssiA</i> (3'Δ13)	7,95 (+/- 0,98) μM	5,22 (+/-0,98) μM	25,8 (+/- 2,7) μM

4.13 Herstellung von Primase-DNA-Komplexen. Primase und DNA wurden im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und über eine Größenausschluss-Chromatographie gereinigt (Anhang Abbildung A4). Die Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie wurden im SDS-Gel und im nativen Gel analysiert (Anhang Abbildung A4) und die saubersten Fraktionen zur Kristallisation eingesetzt.

4.14 Kristallisation des Primase-DNA-Komplexes. Der Komplex aus katalytischer Domäne und *ssiA*(3'Δ13)DNA konnte im Dampfdiffusionsverfahren (3.6.1) unter folgender Bedingung kristallisiert werden: 0,2 M (NH₄)-Citrat, pH 5 and 20 % (w/v) PEG 3350. Bei 18°C wuchsen nach einem Tag Kristalle in den Dimensionen 0,3 x 0,05 x 0,05 mm³.

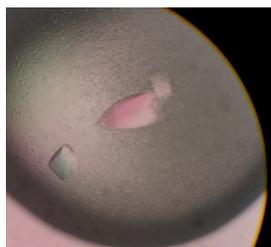


Abbildung 4.16: Kristalle des Komplexes aus katalytischer Domäne und *ssiA*(3'Δ13)DNA.

4.15 Kristallstruktur der katalytischen Domäne im Komplex mit *ssiA*(3'Δ13)DNA bei 2,7 Å Auflösung. Für das Röntgenbeugungsexperiment wurden die Kristalle in Reservoirlösung mit 30 % (v/v) PEG-400 überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 100°K am Strahlrohr 14.2 der Freien Universität Berlin am Berliner Elektronenspeicherring BESSY vermessen. Die Datensammlung erfolgte mit einem MAR CCD 165-mm Detektor (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Datensammlung katalytische Domäne/ *ssiA*(3'Δ13)DNA-Raumstruktur.

* Die höchste Auflösungsschale ist in Klammern angegeben. $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, wobei I die beobachtete und $\langle I \rangle$ die durchschnittliche Intensität der Reflexe ist.

Datensammlung	
Wellenlänge (Å)	0,9184
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2
Einheitszelle (Å)	
a=b	85,3
c	68,8
$\alpha=\beta=\gamma$ (°)	90
Auflösung (Å)	19,0-2,7
$I/\sigma(I)^*$	16,5 (5,6)
Vollständigkeit (%)*	97,5(95)
R_{sym} (%)*:#	11,1 (39,4)
Gemessene Reflexe	52296
Unabhängige Reflexe	7215
Multiplizität	7,2

Die Diffraktion der Kristalle konnte durch wiederholtes Unterbrechen des Stickstoffstromes für einige Sekunden bis zur Konvergenz der Auflösung bei 2,7 Å um 0,7 Å Auflösung verbessert werden.

Nach Datenprozessierung mit dem Programmpaket XDS (84) wurde ein primitiv tetragonales Kristallsystem ermittelt, serielle Auslöschungen entlang der Kristallachsen $h00$ und $00l$ ausgewertet und den Schraubenachsen zugeordnet. Die Raumgruppe konnte auf P4₁2₁2 oder P4₃2₁2 eingegrenzt werden. Die Festlegung auf eine der beiden enantiomorphen Raumgruppen P4₁2₁2 oder P4₃2₁2 gelang nach der Lösung des Phasenproblems (s.u.). Zur Bestimmung der Phasenwinkel wurde die Methode des Molekularen Ersatzes angewendet (3.6.4). Mit dem Programm PHASER (86) wurde eine Rotations- und Translationssuche im Auflösungsbereich von 20-3,5 Å mit der katalytischen Domäne von RepB“ als Suchmodell (AS 4-205) durchgeführt. Das Phasenproblem wurde in der Raumgruppe P4₃2₁2 gelöst. Nach Modellierung der *ssiA*(3'Δ13)DNA unter Verwendung idealer B-DNA für den basengepaarten Teil der *ssiA*(3'Δ13)DNA Haarnadelschleife wurde das Raumstrukturmodell der katalytischen Domäne im Komplex mit *ssiA*(3'Δ13)DNA bis zur Konvergenz des freien R-Faktors verfeinert (Tabelle 4.6). Die Stereochemie der katalytischen Domäne wurde mit den

Programmen WHATCHECK (15) and PROCHECK (16) geprüft. Alle Torsionswinkel ψ und Φ lagen in erlaubten Bereichen (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Verfeinerungstatistiken katalytische Domäne/ *ssiA*(3'Δ13)DNA-Raumstruktur.

Verfeinerung	
Auflösung (Å)	19,0-2,7
Reflexe benutzt für Verf.	6997
Arbeitssatzgröße (%)	95,0
Testsatzgröße (%)	5,0
R-Faktor/freier R-Faktor	21,4/27,0
Anzahl der Atome	
Protein+DNA	1986
Sauerstoff des Wassers	24
Durchschnittlicher Temperaturfaktor B (Å ²)	31,7
Standardabweichung	
Bindungslänge (Å)	0,005
Bindungswinkel (°)	1,0
Ramachandran Diagramm	
Bevorzugte Regionen (%)	95,1
Erlaubte Regionen (%)	4,3
Großzügig erlaubten Regionen (%)	0,6

Die Aminosäuren 1-3, 156-162 und 199-212 der katalytischen Domäne von RepB' konnten aufgrund von Unordnung nicht modelliert werden, aber die Aminosäuren, die mit der *ssiA*(3'Δ13)DNA interagieren, sind in der Elektronendichte gut definiert (Abbildung 4.17 A, B).

4.16 Die Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes zeigt eine spezifische *ssiA* DNA-Bindungsstelle von RepB'. Die katalytische Domäne von RepB' erkennt das einzelsträngige 5'-Ende der *ssiA*(3'Δ13)DNA (Nukleotide 1-6) und das erste Basenpaar der Haarnadelschleife (Nukleotide 7 und 27), Abbildung 4.18 A. Die Raumstruktur der katalytischen Domäne von RepB' im Komplex mit *ssiA*(3'Δ13)DNA bestätigt EMSA-Daten, die zeigen, dass das 5'Ende (Nukleotide 1-6) der *ssiA* DNA essentiell für die Bindung an die katalytische Domäne oder an RepB' ist (Abbildung 4.15 B-G).

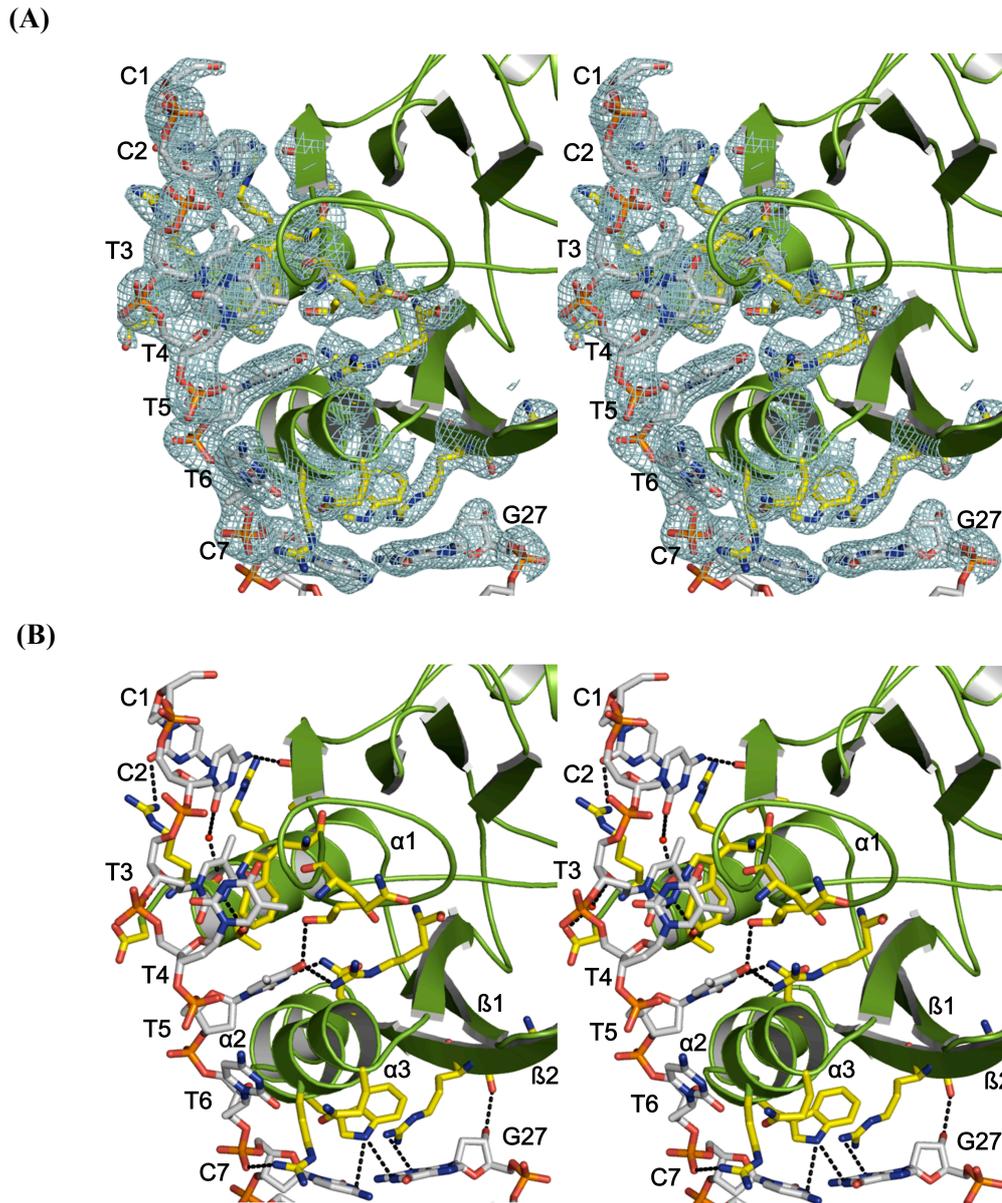


Abbildung 4.17 A, B: (A) Stereodarstellung der spezifischen DNA-Bindungsstelle des Primase-DNA Komplexes. Die Elektronendichte (blaues Gitternetz bei σ 1,0 konturiert) ist nur für die Aminosäuren der katalytischen Domäne von RepB' dargestellt, die mit der *ssiA*(3' Δ 13)DNA interagieren. Die an *ssiA*(3' Δ 13)DNA (grau) gebundenen Aminosäuren (gelb) der katalytischen Domäne von RepB' sind als Stabmodell präsentiert. (B) Stereodarstellung der spezifischen DNA-Bindungsstelle des Primase-DNA-Komplexes in gleicher Orientierung wie in (A), aber ohne Elektronendichte. Wasserstoffbrücken sind als schwarze gestrichelte Linien dargestellt.

Die Bindung der katalytischen Domäne (AS 1-212) von RepB' an *ssiA*(3' Δ 13)DNA ist spezifisch, weil die Aminosäuren der katalytischen Domäne 11 von insgesamt 17 Wasserstoffbrücken mit den DNA-Basen der *ssiA*(3' Δ 13)DNA eingehen. Weiterhin

werden drei Wasserstoffbrücken von der katalytischen Domäne von RepB' zum Zucker-Phosphatrückgrat der *ssiA*(3'Δ13)DNA und zwei Wasserstoffbrücken über jeweils ein Wassermolekül zwischen katalytischer Domäne und *ssiA*(3'Δ13)DNA ausgebildet (Abbildung 4.18 B).

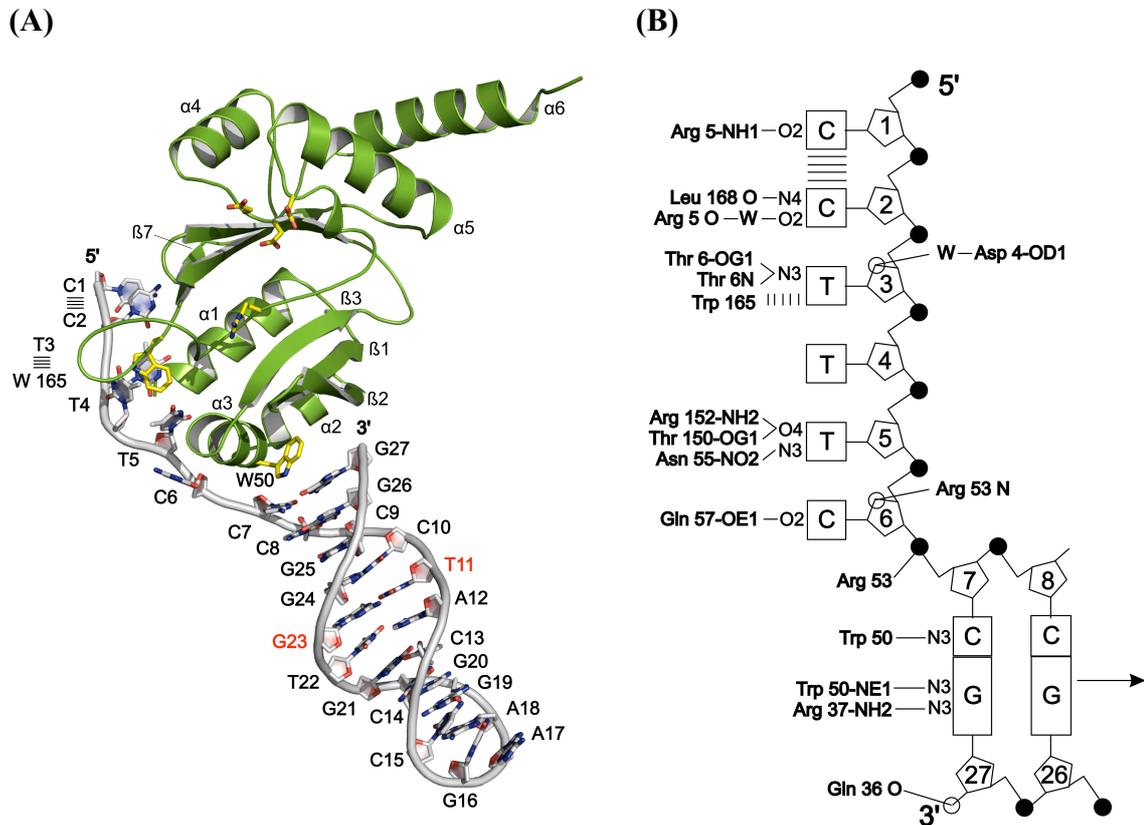


Abbildung 4.18 A, B: Architektur des Primase-DNA-Komplexes. (A) Kristallraumstruktur der katalytischen Domäne von RepB' im Komplex mit *ssiA*(3'Δ13) DNA. Die katalytische Domäne von RepB' ist als grünes Bändermodell und die *ssiA*(3'Δ13)DNA als graues Stabmodell mit Desoxyribose-Phosphat Rückgrat als glatte Linie dargestellt. Die Nukleotide von *ssiA*(3'Δ13)DNA sind von 1-27 nummeriert und im Ein-Buchstaben Code gekennzeichnet. Die DNA-Doppelhelix weist einen G23-T11 *wobble* Basenpaar auf (rote Buchstaben; siehe auch Abbildung 4.19). **(B) Topographiedarstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und Basenstapelungen zwischen katalytischer Domäne von RepB' und *ssiA*(3'Δ13)DNA.** Darstellung der Basen als viereckige Boxen, Desoxyribose als Pentamer (fortlaufend nummeriert), Phosphate als schwarze gefüllte Kreise und O4' (an T3 und C6) als offener Kreis. Direkte und Wasser (W)-vermittelte Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren und *ssiA*(3'Δ13)DNA sind mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet; Aminosäuren im Drei-Buchstaben Code. Bei Wasserstoffbrücken zu Peptidbindungen sind nur die Aminosäurenummer und das Peptidatom angegeben. Parallele Linien weisen auf Stapelungen hin zwischen den Basen C1 und C2 sowie der Base T3 und W165.

DNA-Basenstapelung wird am einzelsträngigen 5'-Ende der *ssiA*(3'Δ13)DNA für die Basen C1 und C2 beobachtet, weil Trp-165 zwischen den Basen T3 und T4 eingeschoben ist und dadurch sowohl eine Stapelung der Basen C2 und T3 als auch der Basen T3 und T4 verhindert. Die α -Helix α_3 ist zwischen der Base T5 und dem Basenpaar C7-G27 so positioniert, dass Base C6 nicht auf Base T5 gestapelt werden kann.

Um den Einfluss der DNA-bindenden Aminosäuren W50 und Y162 auf die Primaseaktivität zu untersuchen, wurden die RepB'-Mutantenproteine W50A und Y162A überprüft (Abbildung 4.9). Die RepB'-Mutantenproteine W50A und Y162A waren im Komplementstrangsynthesetest voll aktiv im Vergleich zum Wildtyp RepB'. Im Primersynthesetest produzierte das Mutantenprotein Y162A DNA-Primer mit einer Länge von 2 und 10-12 Nukleotiden, die auch mit RepB' Wildtypprotein beobachtet wurden. Die RepB' Proteinmutante W50A synthetisierte im Vergleich zum Wildtyp RepB' verkürzte DNA-Primer mit Längen von 5-6 Nukleotiden, während die Synthese längerer DNA-Primer deutlich vermindert war. Für Tryptophan 50 wäre eine Rolle bei der Aufschmelzung der *ssiA* DNA-Haarnadelschleife denkbar, die erforderlich wird, wenn der DNA-Primer von RepB' die Länge von 5 Nukleotiden überschreitet, weil der Abstand zwischen Startpunkt der Primersynthese (T32) und erstem Basenpaar der Haarnadelschleife (nt 7-27) an *ssiA* 5 Nukleotide beträgt (Punkt 4.1). Diese Länge entspricht in etwa der Länge der von Proteinmutante W50A synthetisierten Primer. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Mutation von W50 zu Alanin die DNA-Bindung von RepB' an *ssiA* DNA herabsetzt und die Proteinmutante W50A frühzeitig von *ssiA* DNA abdissoziiert und deshalb verkürzte Primer synthetisiert.

4.17 Die *ssiA* DNA-Haarnadelschleife enthält ein G-T wobble Basenpaar. Die DNA-Doppelhelix in der Haarnadelschleife der *ssiA*(3'Δ13)DNA nimmt die B-Form ein und weist ein G-T Basenpaar auf (T11-G23; Abbildung 4.19). Das G-T Basenpaar widerlegt die bisherige Annahme (31), dass Thymin 11 aus der Haarnadelschleife von *ssiA*(3'Δ13)DNA herausgedrückt wird und keine Basenpaarung eingeht. Die Elektronendichte zeigt, dass die DNA-Doppelhelix der *ssiA*(3'Δ13)DNA Haarnadelschleife um ein Nukleotid versetzt ist und eine reguläre Watson-Crick B-DNA-Doppelhelix ausgebildet wird. Folglich ist das 5'-Ende der *ssiA*(3'Δ13)DNA fünf

anstatt sechs Nukleotide lang. Die Nukleotide 16-18 formen die einzelsträngige DNA-Schleife der *ssiA*(3' Δ 13)DNA Haarnadelstruktur.

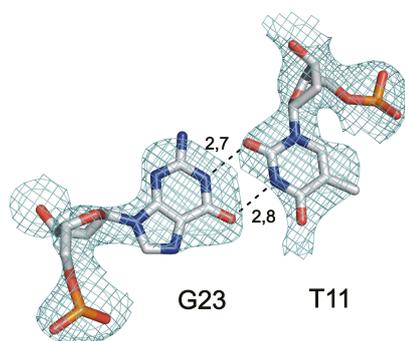


Abbildung 4.19: Der G-T Basenpaar *wobble* in der der *ssiA*(3' Δ 13)DNA-Haarnadelschleife. Die Basen G23 und T11 (Stabmodell; Kohlenstoff grau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau) bilden ein Basenpaar *wobble* mit 2 Wasserstoffbrücken aus (schwarze gestrichelte Linien, N--O Abstände in Å). Die Elektronendichte ist als blaues Gitternetz bei σ 1,0 konturiert.

4.18 Die katalytische Domäne von RepB' besteht aus einer spezifischen *ssiA* DNA-Bindungs- und einer katalytischen Unterdomäne. Die katalytische Domäne von RepB' lässt zwei Unterdomänen erkennen: Unterdomäne I besteht aus α -Helices α 1- α 3 und den β -Strängen β 1- β 3 und β 7 und erkennt spezifisch die *ssiA*(3' Δ 13)DNA. Die Unterdomäne II setzt sich aus Helices α 4- α 6 und den β -Strängen β 4- β 6 und einer Schleife bestehend aus Aminosäuren 133-166 zusammen und beherbergt die katalytisch aktiven Aminosäuren D77, D78, D134 und R145.

Überlagerungen der katalytischen Domänen von RepB' und den Primasen Pfu, Pho, Sso und der Polymerase-Domäne der Ligase D zeigen, dass die Unterdomäne I von RepB' von der konservierten Faltung der katalytischen Domäne der PriS Primasen abweicht (Abbildung 4.6). Bei einer Strukturüberlagerung wird ein sterischer Zusammenstoß des einzelsträngigen 5'-Endes der *ssiA*(3' Δ 13)DNA mit α -Helix α 1 der Pfu-Primase verursacht (nicht gezeigt), die in den Strukturen der Primase Pfu (Abbildung 4.6 A), Pfu, Pho, Sso, and der NHEJ Polymerase-Domäne strukturell konserviert ist.

Unter den oben verglichenen Raumstrukturen sind α -Helix α 3 und die β -Stränge β 1- β 3 and β 7 der Unterdomäne I von RepB' konserviert. Die α -Helix α 3 von RepB' weist das strukturell konservierte Trp 50 auf, welches das Basenpaar C7-G27 der *ssiA*(3' Δ 13)DNA erkennt. Anstelle von Trp50 findet sich in den Raumstrukturen der Pfu- und Pho- und Sso-Primasen jeweils ein Tyrosin (Nr. 63) (Abbildung 4.6 A, 4.7, Tabelle 4.3), das frei zugänglich, d.h. in der Kristallstruktur zum Lösungsmittel exponiert ist.

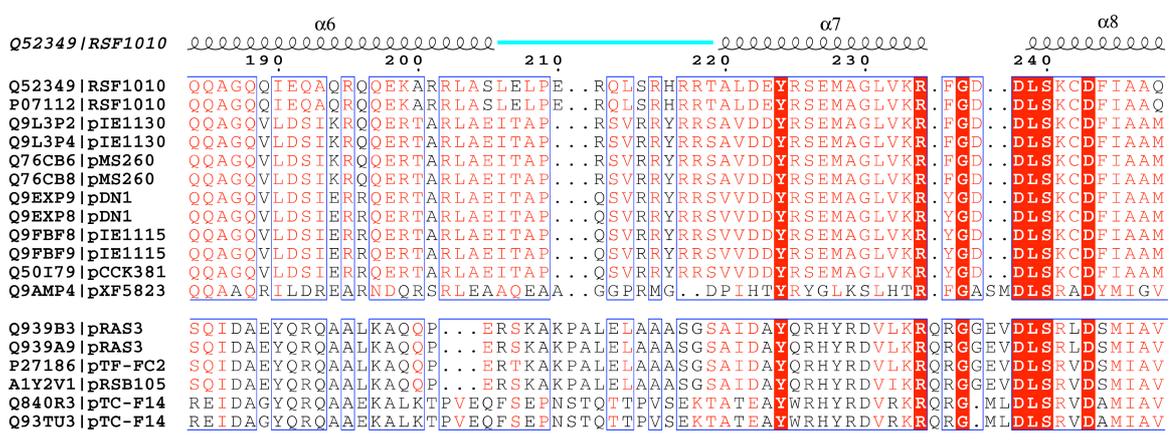
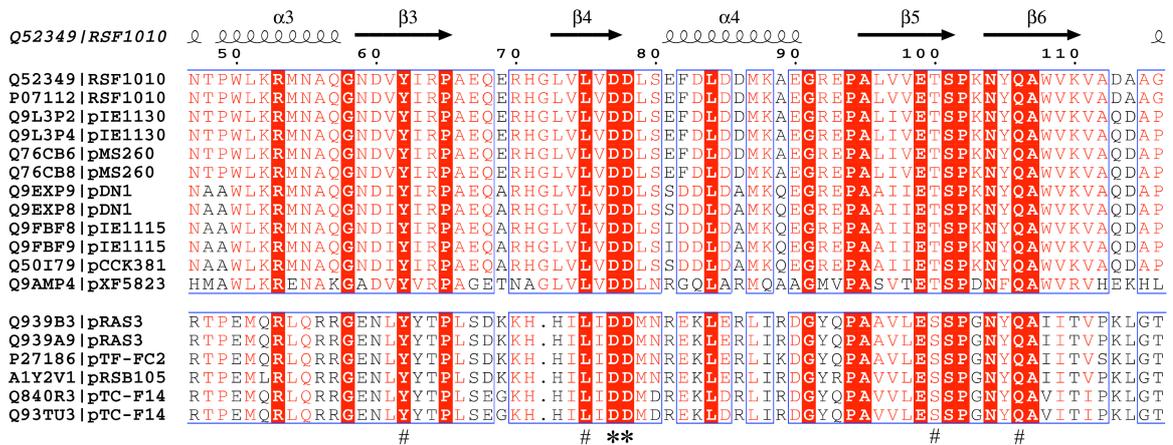
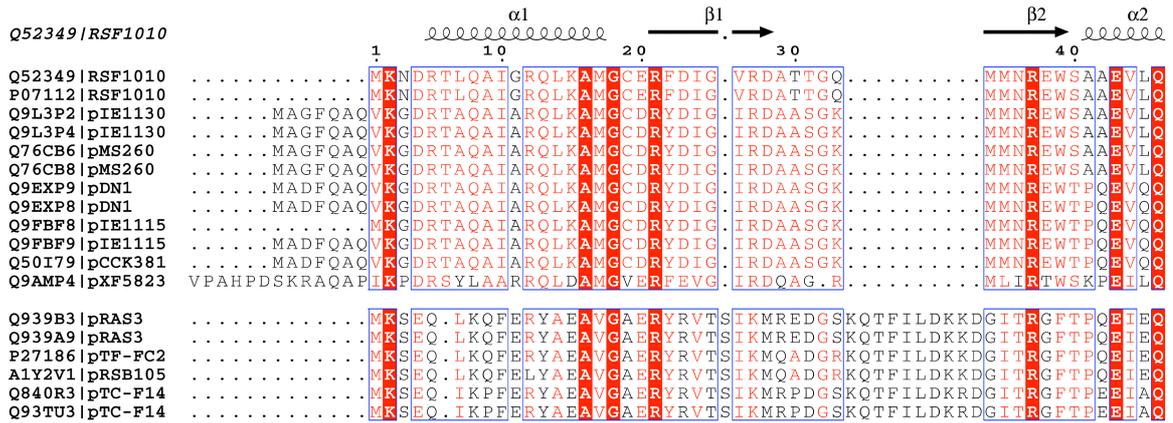
4.19 RepB' ist der Prototyp einer eigenen Primaseklasse, die ausschließlich im *leading strand* Replikationsmodus arbeitet. Obwohl die katalytischen Domänen der archaebakteriellen Primasen Sso, Pfu, und Pho und RepB' (Abbildung 4.6 A, B) ähnlich gefaltet sind und die strukturell konservierten katalytischen Aminosäuren D77, D78, D134, and D145 (RepB'-Nummerierung, Abbildung 4.7) aufweisen, besitzen sie keine Aminosäure-Sequenzhomologie untereinander (nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den archaebakteriellen Pri-Typ Primasen Sso, Pfu, und Pho weist RepB' kein Zink-Bindungsmotiv auf (Punkt 1.13) und das konservierte DXD-Motiv im katalytischen Zentrum der oben genannten Pri-Typ-Primasen ist durch ein ⁷⁷DD⁷⁸-Motiv ersetzt. DNA-bindende Aminosäuren im Primase-DNA-Komplex von RepB' sind in Pri-Typ Primase-Raumstrukturen nicht konserviert (Punkt 4.18). Das EGYATA Sequenz-Motiv (94), das in mehreren Plasmid-kodierten Primasen im aktiven Zentrum konserviert ist, kommt nicht in der RepB'-Sequenz vor (Abbildung 4.20 A).

Die Aminosäuresequenz von RepB' ist zu 38 % bzw. 63 % homolog zu Primasen, die von IncQ-Plasmiden bzw. IncQ-ähnlichen Plasmiden kodiert werden (Abbildung 4.20 A) und deren dreidimensionale Strukturen unbekannt sind. Die in der RepB'-Raumstruktur identifizierten katalytischen und *ssiA*(3' Δ 13)DNA bindenden Aminosäuren sind in den Aminosäuresequenzen der IncQ und IncQ-ähnlichen spezifischen Primasegruppen konserviert.

Weil IncQ und IncQ-ähnliche Plasmide zu *ssiA* und *ssiB* fast identische Sequenzen aufweisen (Abbildung 4.20 B), die auch eine Haarnadelschleife formen können und auf komplementären DNA-Strängen liegen, wird ihre DNA-Replikation sehr wahrscheinlich an den *ssiA* und *ssiB* ähnlichen DNA-Segmenten im *leading strand* Modus durch zu RepB' homologe Primasen initiiert. RepB' ist daher offensichtlich der Prototyp einer eigenen Primaseklasse mit hoher Sequenzhomologie, die ausschließlich im *leading strand* Modus repliziert.

Ergebnisse



Ergebnisse

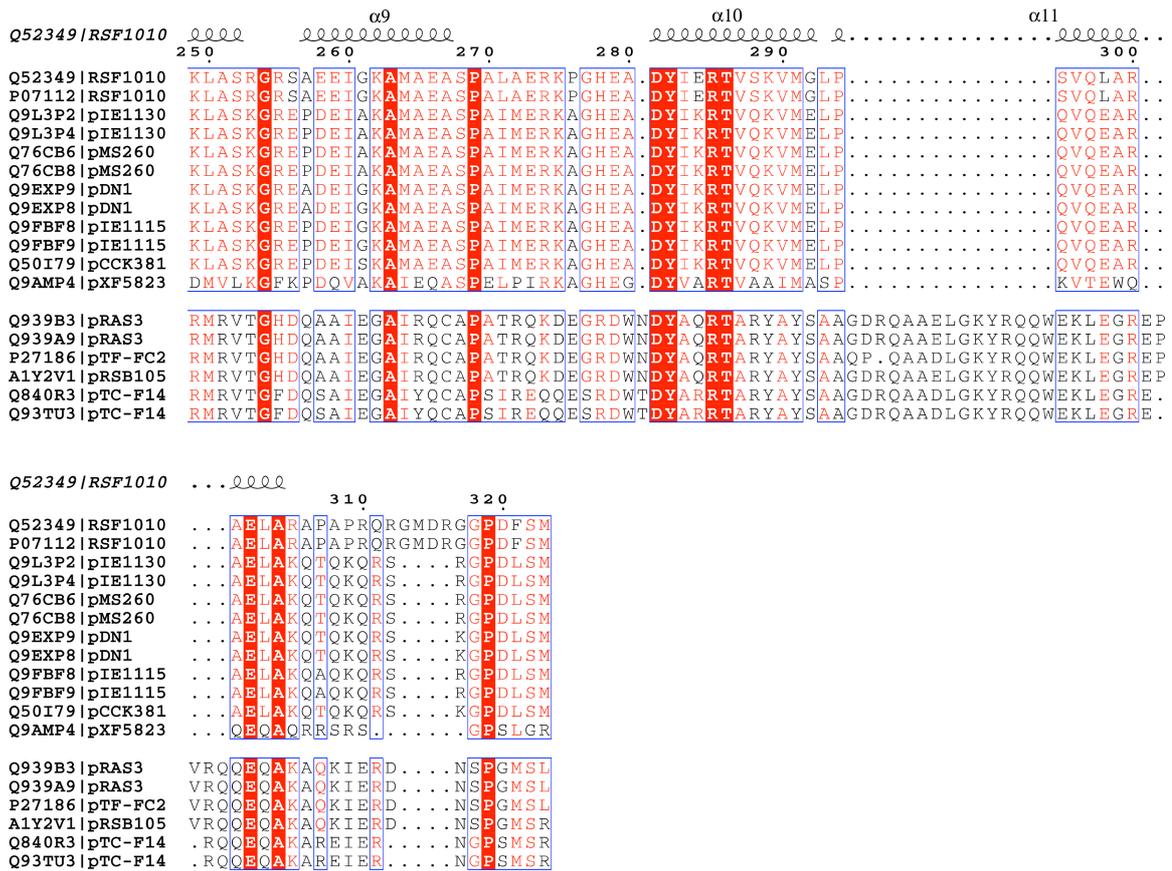


Abbildung 4.20 (A) Aminosäuresequenzvergleich von RepB' mit Proteinen aus der Swiss-Prot/TrEMBL Datenbank. Angabe der Proteine mit Datenbank-Eintragscode und nachfolgend der Plasmidname. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm CLUSTALW erstellt (75) und mit dem Programm ESPript graphisch dargestellt (95). Die Sekundärstrukturelemente von RepB' sind oberhalb des Sequenzvergleiches abgebildet. Die rote horizontale Linie präsentiert die Schleife im katalytischen Zentrum (AS 133-166) und die blaue Linie die Schleife (AS 206-219) zwischen α -Helix α_6 und der C-terminalen Domäne. Identische Aminosäuren innerhalb der verglichenen Proteine sind in weißen Buchstaben auf rotem Grund und homologe Aminosäure in roten Buchstaben auf weißem Grund angegeben. Die aus der Überlagerung von RepB', LigD-Polymerase, Sso-, Pfu- und Pho-Primase ermittelten strukturell konservierten Aminosäuren sind mit * (identisch) oder # (homolog) gekennzeichnet (siehe Abbildung 4.7, Tabelle 4.3). Die Primasen können in 2 Gruppen unterteilt werden. Die größere Gruppe (oberhalb der Leerzeile) wird von den Plasmiden RSF1010, R1162, pIE1115, pIE1130 und homologen Plasmiden und die kleinere Gruppe (unterhalb der Leerzeile) von den Plasmiden pTC-F14, pTF-FC2 und weiteren Plasmiden kodiert. Die beiden Primasegruppen besitzen nur zu 15 % identische Aminosäuren, aber innerhalb der Primase-Gruppen ist die Aminosäuresequenzidentität höher. Die größere (oberhalb der Leerzeile) Primase-Gruppe besitzt 38 % Aminosäure-Sequenzidentität und 63 % Aminosäure-Sequenzhomologie. Typisch für die verglichenen Primasen ist, dass sie als C-terminale Domäne fusioniert an eine N-terminale Relaxase Domäne auch in Mobilisierungsproteinen auftreten. Diese Primase-Domänen wurden in den Aminosäuresequenzvergleich einbezogen und sind in den Auflistungen der beiden Plasmidgruppen mit + markiert. Die N-terminal Relaxase-Aminosäuresequenz

Ergebnisse

wurde der Übersichtlichkeit halber ausgelassen. Für die Fusionsproteine Q9AMP4, Q50I79, und A1Y2V1 wurden keine unabhängig exprimierte, eigenständige Primasen in der Swiss-Prot/TrEMBL Datenbank gefunden.

Primasen in der oberen Gruppe:

Q52349	Primase RepB', IncQ Plasmid RSF1010, weiter Wirtsbereich
P07112	Mobilisierungsprotein A (+), IncQ Plasmid RSF1010
Q9L3P2	Primase (nicht experimentell bestätigt), IncQ-ähnliches Plasmid pIE1130, weiter Wirtsbereich
Q9L3P4	Mobilisierungsprotein (+) (nicht experimentell bestätigt), IncQ ähnliches Plasmid pIE1130, weiter Wirtsbereich
Q76CB6	Primase (nicht experimentell bestätigt), Plasmid pMS260
Q76CB8	Mobilisierungsprotein A (+), Plasmid pMS260
Q9EXP9	Mobilisierungsprotein A (+), Plasmid pDN1, weiter Wirtsbereich
Q9EXP8	Replikationsprotein B, Plasmid pDN1, weiter Wirtsbereich
Q9FBF8	Primase (nicht experimentell bestätigt), Plasmid IncQ-ähnliches Plasmid pIE1115, weiter Wirtsbereich
Q9FBF9	Mobilisierungsprotein (+)(nicht experimentell bestätigt), IncQ-ähnliches Plasmid pIE1115, weiter Wirtsbereich
Q50I79	Mobilisierungsprotein A (+), Plasmid pCCK381
Q9AMP4	RepB/MobA-ähnliches Protein (+), Plasmid pXF5823

Primasen in der unteren Gruppe:

Q939B3	Polyprotein, Plasmid pRAS3.1 (+)
Q939A9	Polyprotein, Plasmid pRAS3.1
P27186	Replicative DNA primase REPB_THIFE, IncQ ähnliches Plasmid
pTF-FC2	weiter Wirtsbereich
A1Y2V1	Mobilisierungsprotein (+), Plasmid pRSB105
Q840R3	Relaxase/Primase-ähnliches Fusionsprotein (+), IncQ-ähnliches Plasmid pTC-F14, weiter Wirtsbereich
Q93TU3	Primase ähnliches Protein, IncQ-ähnliches Plasmid pTC-F14, weiter Wirtsbereich

Ergebnisse

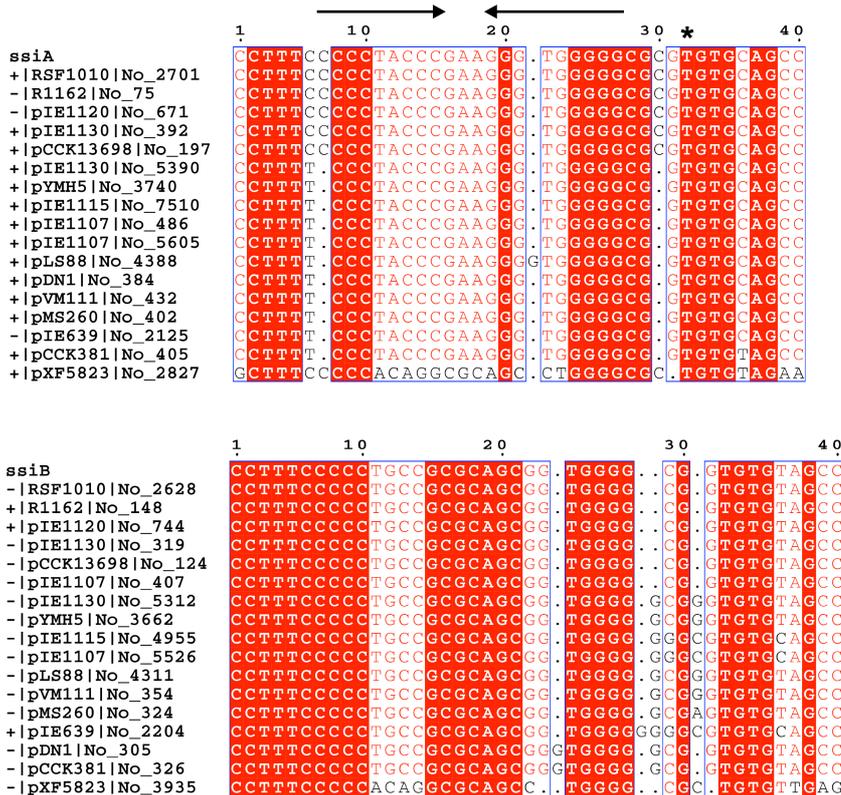


Abbildung 4.20 (B) Nukleotidsequenzvergleich der *ssiA* (oben) und *ssiB* (unten) DNA-Segmente von RSF1010 mit *ssiA* and *ssiB*-ähnlichen DNA-Segmenten von anderen Plasmiden. Der Nukleotidsequenzvergleich wurde mit dem Programmen blastN (96) und CLUSTALW (75) durchgeführt und die Abbildung mit dem Programm ESPript (95) erstellt. Innerhalb der verglichenen Nukleotidsequenzen sind identische Nukleotide, die in allen Nukleotidsequenzen vorkommen, in weißen Buchstaben auf rotem Grund und Nukleotide, die in mehr als 80 % der Nukleotidsequenzen vorkommen, in roten Buchstaben auf weißem Grund gedruckt. Ein Minuszeichen (-) kennzeichnet, ob die *ssiA* DNA-Sequenzen auf dem kodierenden DNA-Strang liegen und ein Pluszeichen (+), ob sie auf einem nichtkodierenden DNA-Strang liegen. Die Startstelle (T32) der Primersynthese ist in der *ssiA* DNA-Sequenz mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet und wurde nur für die *ssiA*-Sequenz von RSF1010 experimentell bestimmt. Die Nummern hinter den Plasmidnamen geben die Position auf den kodierenden bzw. nicht kodierenden DNA-Strängen an. Die Sequenzidentität der *ssiA* und *ssiA*-ähnlichen DNA-Segmente untereinander beträgt 50 % und wäre sogar 90 %, falls pXF5823 aus dem Nukleotidsequenzvergleich ausgelassen würde. Die DNA-Sequenzidentität für *ssiB* ist 60 % bzw. 90 %, falls pXF5823 nicht berücksichtigt würde. Für die Plasmide pRAS3, pTF-FC2, pRSB105 und pTC-F14 (untere Gruppe in Abbildung 4.20 A), die zu RepB' homologe Proteine kodieren, wurden keine *ssiA* oder *ssiB* ähnlichen DNA-Segmente gefunden.

5 Diskussion

Das Plasmid RSF1010 bietet ein einfaches und beispielhaftes System, um die Initiation der dsDNA-Synthese durch die Primase RepB' zu untersuchen. (i) RSF1010 repliziert nur im *leading strand* Modus (Abbildung 1.5 A), der nur einen Primer pro DNA-Strang benötigt, und unterscheidet sich dadurch von DNA-Replikationssystemen, die im *leading* und *lagging strand* Modus repliziert werden (Abbildung 1.6). (ii) RSF1010 weist nur zwei nahezu identische Primase-Erkennungssequenzen *ssiA* und *ssiB* auf, die 40 Nukleotide lang sind, eine Haarnadelschleife (Nukleotide 7-27) ausbilden (Abbildung 1.5 B) und auf je einem der beiden DNA-Stränge liegen. (iii) RepB' enthält kein gebundenes Zink-Ion wie andere Primasen, deren Raumstrukturen bekannt sind (Abbildung 1.7 A, B und 1.8 A, B). (iv) RepB' ist mit einer molekularen Masse von nur 35.9 kDa die kleinste bekannte Primase. (v) Während der bakteriellen Konjugation initiiert RepB' als C-terminale Primase Domäne des Mobilisierungsproteins MobA die DNA-Komplementärstrangsynthese des einzelsträngigen RSF1010 nach Transfer in die Rezipientenzelle (Punkt 1.7).

5.1 Einordnung der Primersynthese von RepB'. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten bekannt, dass RepB' die Replikation von RSF1010 an den 40 nt langen DNA-Sequenzen *ssiA* und *ssiB* initiiert. Der genaue Startpunkt der Primersynthese war dagegen unbekannt sowie die Länge und Art (RNA oder DNA) des von RepB' erzeugten Primers. Lin und Meyer schätzten den Startpunkt der Primersynthese auf eines der Nukleotide 31-33 (23). In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine *run off* DNA-Sequenzierung und Primersynthesetests gezeigt, dass RepB' die DNA-Primersynthese an Thymin 32 der *ssiA* DNA-Sequenz mit dATP beginnt. Die Ergebnisse bestätigten, dass RepB' die DNA-Primersynthese innerhalb der von Lin und Meyer vermuteten Startsequenz initiiert. Ein Vergleich zeigt, dass pro- und eukaryontische Primasen RNA-Primer synthetisieren, die entweder mit ATP oder GTP beginnen (Tabelle 5.1). Die meisten Primasen verwenden Purinribonukleotide als Startnukleotid. Die Synthese eines DNA-Primers von RepB' ist daher ungewöhnlich in der prokaryontischen Primase-Gruppe.

Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen (3.5.3) synthetisierte RepB' ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Primern von 2-12 Nukleotiden (Abbildung 4.3).

Primerabbruchprodukte werden auch bei anderen Primasen wie z.B. bei der DnaG-Primase aus *E. coli* beobachtet, weil diese Primasen nicht prozessiv arbeiten, d.h. während der Primersynthese von der DNA-Matrize abdissoziieren.

5.2 RepB' besitzt eine spezifische Bindungsstelle für dATP zur Initiation der Primersynthese und eine dNTP-Bindungsstelle zur Primerverlängerung. Die Primer-Neusynthese von RepB' wurde durch Erhöhung der dATP-Konzentration beträchtlich stimuliert (Abbildung 4.3), aber nicht durch Erhöhung der Konzentration von dCTP oder dGTP oder dTTP (nicht gezeigt). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass RepB' eine spezifische Bindungsstelle für dATP besitzt, an der die Primersynthese initiiert wird und eine zweite Bindungsstelle, an der der DNA-Primer verlängert wird. Sobald die Initiationsstelle im katalytischen Zentrum von RepB' mit dATP besetzt ist, wird die Primersynthese an der Verlängerungsstelle begonnen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein wachsender DNA-Primer vorzeitig unterbrochen wird, um ein neues DNA-Molekül zu synthetisieren. Für diese Vermutung spricht die Beobachtung, dass bei Erhöhung der dATP-Konzentration die von RepB' synthetisierten DNA-Primer immer kürzer werden. Wahrscheinlich wird bei hoher dATP-Konzentration die Initiationsstelle durch dATP schneller wieder besetzt und so der vorzeitige Abbruch des noch wachsenden Primers und nachfolgend die Synthese eines neuen Primers ausgelöst.

5.3 Das von Charles C. Richardson vorgeschlagene Modell zur Initiation der Primersynthese von Primasen lässt sich auf RepB' anwenden. Die über RepB' gewonnenen biochemischen Daten bekräftigen das von Charles C. Richardson vorgeschlagene Modell der Initiation der Primersynthese (Abbildung 1.3), wonach eine Primase abhängig von der Matrizen-DNA-Sequenz jeweils ein Nukleosidtriphosphat an einer Initiations- und einer Elongationsstelle bindet. Das an die Initiationsstelle gebundene Nukleotid, im Falle von RepB' dATP, wird nach Richardsons Vorschlag später zum ersten Nukleotid am 5'-Ende des Primers. Die an Initiations- und Elongationsstelle gebundenen Nukleosidtriphosphate werden unter Pyrophosphat-Abspaltung verknüpft und das Primer-Dimer dann zur Elongationsstelle weitergerückt, wo weitere Nukleotide komplementär zur Matrizen-DNA-Sequenz an das 3'-Ende addiert werden.

5.4 Primer-Initiations- und -Elongationsstelle liegen im katalytischen Zentrum und lassen sich nicht unterscheiden. Die Struktur-Funktionsuntersuchung an RepB' zeigt, dass die Nukleotidyltransferase-Aktivität von RepB' von den Aminosäuren D77, D78 und D134 katalysiert wird, die in einer Vertiefung auf der N-terminalen Domäne liegen und das aktive Zentrum bilden. Die Helix-Bündel Domäne weist keine Vertiefung auf, die als Nukleotidbindungsstasche dienen könnte. Initiations- und Elongationsstelle liegen also wahrscheinlich zusammen im katalytischen Zentrum von RepB' und lassen sich nicht offensichtlich unterscheiden. Vorstellbar wäre, dass bei der Initiation der Dinukleotid-Synthese das initiale dATP und das nachfolgende Nukleotid im katalytischen Zentrum aufeinander gestapelt werden, bevor die Nukleotidaddition erfolgt, während beide Nukleotide komplementäre Basenpaarungen mit der *ssi* Matrizen-DNA eingehen.

5.5 Mögliche DNA-Bindungsstellen der Helix-Bündel Domäne. Komplementationsstudien demonstrierten, dass katalytische und Helix-Bündel Domäne einen spezifischen Komplex im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 an *ssiA* DNA bilden (Abbildung 4.10). EMSA- und analytische Ultrazentrifugationsstudien bestätigten, dass die Helix-Bündel Domäne von RepB' an *ssiA* und *ssiA*(3'Δ13)DNA bindet (Abbildung 4.13, Tabelle 4.4). Die exakte Bindungsstelle an *ssiA* DNA und die DNA-Bindungsspezifität der Helix-Bündel Domäne bleiben jedoch aufzuklären. Aufgrund der Strukturhomologie zu dsDNA bindenden Homeodomänen (Abbildung 4.12 A) lassen die EMSA-Studien vermuten, dass die Helix-Bündel Domäne von RepB' an die doppelsträngige *ssiA* DNA-Haarnadelschleife binden könnte. Die ermittelten Dissoziationskonstanten für die Bindung der Helix-Bündel Domäne von RepB' an *ssiA* und *ssiA*(3'Δ13)DNA sind jedoch mit 25-27 μM (wegen besserer Löslichkeit von RepB' in 150 mM MgCl₂ gemessen durch analytische Ultrazentrifugation) um etwa den Faktor 10000 geringer als für die Antennapedia Homeodomäne (in 150mM NaCl gemessen mittels Oberflächenplasmonresonanz-spektroskopie) (97) und zeigen, dass die Helix-Bündel Domäne nur schwach an dsDNA bindet, d.h. leicht wieder von der dsDNA abdissoziieren kann. Auch eine Bindung der Helix-Bündel Domäne von RepB' an den wachsenden DNA-Primer wäre denkbar, der eine DNA-Doppelhelix mit der *ssiA* Matrizen-DNA bildet. Kristallisationsversuche mit der Helix-Bündel Domäne von RepB' und intakter *ssiA* DNA oder mit RepB' und intaktem *ssiA* DNA-Primer Hybrid, die

Aufschluss über DNA-Bindung und DNA-Sequenzspezifität der Helix-Bündel Domäne geben könnten, blieben bislang erfolglos.

5.6 Der Aminosäurelinker von RepB' erlaubt den Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation. Beide Vorschläge zur DNA-Bindung der Helix-Bündel Domäne von RepB' verlangen, dass sich die Helix-Bündel Domäne von ihrer Position in der Kristallstruktur wegbewegt. Der flexible Aminosäurelinker (14 AS) von RepB' würde eine Interaktion der katalytischen und Helix-Bündel an *ssiA* DNA erlauben. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die Primersyntheseaktivität von RepB' mit kürzer werdendem Aminosäurelinker abnimmt (Abbildung 4.11 A). Offenbar ist die Flexibilität der katalytischen und Helix-Bündel Domäne von RepB' zueinander notwendig, um volle Primersyntheseaktivität zu gewährleisten. Diese experimentellen Daten deuten darauf hin, dass RepB' nach Bindung an *ssiA* DNA von einer offenen in eine aktive geschlossenen Konformation übergeht.

Solche Konformationsänderungen sind auch von DnaG-Typ Primasen bekannt, die zur RNA-Primersynthese an Matrizen-DNA von einer offenen inaktiven in eine geschlossene aktive Form übergehen (Punkt 1.10). In der geschlossenen Form kommen die zuvor räumlich getrennten katalytische und Zink-Ribbon Domäne der DnaG-Typ Primasen zusammen und wechselwirken mit dem Hybrid aus RNA-Primer und DNA-Matrize. Die Konformationsänderung der DnaG-Typ Primasen ermöglicht ähnlich wie bei RepB' einen flexiblen Aminosäurelinker von bis zu 26 Aminosäuren Länge, über den katalytische und *Zink-Ribbon* Domäne verbunden sind.

5.6 Die Primaseaktivität von RepB' und DnaG-Typ Primasen erfordert zwei Domänen. Obwohl RepB' und DnaG-Typ Primasen unterschiedlich gefaltet sind, besteht ein gemeinsames Prinzip im Primersynthese-Mechanismus: Die Primaseaktivität von RepB' und DnaG-Typ Primasen erfordert zwei Domänen. Die katalytischen Domänen von RepB' und DnaG-Typ Primasen besitzen jeweils drei Aspartate zur Koordination von zwei divalenten Metallionen, welche die Nukleotidyltransferaseaktivität katalysieren. Die isolierten katalytischen Domänen von RepB' und DnaG-Typ Primasen sind aber selbst inaktiv. Erst eine weitere Domäne in Form eines Helix-Bündels von RepB' oder *Zink-Ribbon* von DnaG-Typ Primasen verleiht

Primersyntheseaktivität. RepB' und DnaG-Typ Primasen sind in der geschlossenen Form aktiv, wenn katalytische und Helix-Bündel bzw. *Zink-Ribbon* Domäne an spezifischen DNA-Sequenzen wechselwirken.

Der Vergleich lässt erwarten, dass es sich bei der Helix-Bündel Domäne von RepB' um ein funktionelles Äquivalent zur *Zink-Ribbon* Domäne der DnaG-Typ Primasen handelt. Die *Zink-Ribbon* Domäne der DnaG-Typ Primasen ist involviert in die spezifische DNA-Sequenzerkennung, RNA-Primerverlängerung und in die Primer-Übergabe an die zur jeweiligen Primase kompatible DNA-Polymerase.

Die strukturellen Anforderungen an die Primaseaktivität der Pri- Typ Primasen sind komplexer als bei RepB' oder DnaG-Typ Primasen, weil die Primaseaktivität der PriS-Untereinheit durch die PriL-Untereinheit reguliert wird (Punkt 1.13). Die katalytischen Domänen der PriS-Untereinheiten und von RepB' weisen eine konservierte gemischte α -, β -Faltung mit drei strikt konservierten katalytischen Aspartaten und einem Arginin sowie weitere typkonservierte Aminosäuren auf (Abbildung 4.6). Die PriS-Untereinheiten der Pfu -und Pho Primasen besitzen außerdem funktionell unbekannte Helix-Bündel Domänen. Anders als bei RepB' sind die Helix-Bündel Domänen der Primasen Pfu und Pho starr in der PriS-Untereinheiten angeordnet und weisen keine strukturelle Verwandtschaft zur Helix-Bündel Domäne von RepB' auf. Rückschlüsse auf die Funktion der Helix-Bündel Domänen in den PriS-Untereinheiten sind nicht möglich.

5.7 Die Helix-Bündel Domäne ist spezifisch für IncQ-Primasen. Homologe Aminosäuresequenzen zur Helix-Bündel Domäne von RepB' treten ausschließlich in Primasen auf, die von den RSF1010 homologen IncQ oder IncQ-ähnlichen Plasmiden kodiert werden (Abbildung 4.20 A). Die Helix-Bündel Domäne von RepB' ist daher ein neues Strukturelement, das Primaseaktivität verleiht und spezifisch für IncQ-Primasen ist.

5.8 Die *ssiA* spezifische Unterdomäne I von RepB' könnte als Ersatz für ein fehlendes Zink-Bindungsmotiv dienen. Die Raumstruktur von RepB' zeigt erstmals eine Zn^{2+} -unabhängige Primase. Im Gegensatz zu Pri- und DnaG-Typ Primasen weist

RepB' kein Zink-Bindungsmotiv auf (Abbildung 4.6 A, B). Die Zink-Bindungselemente archaebakterieller Pri-Typ Primasen sind nicht weitreichend untersucht. Nach heutigem Wissensstand wird vermutet, dass Zink-Bindungselemente archaebakterieller Pri-Typ Primasen die Bindung der Matrizen-DNA unterstützen (Punkt 1.13). Da keine spezifischen DNA-Erkennungssequenzen archaebakterieller Pri-Typ Primasen bekannt sind, könnte es sich bei den Zink-Bindungsstrukturen um unspezifische DNA-Bindungselemente handeln. Gegenüber den DNA-Sequenz spezifischen *Zink-Ribbon* Domänen der DnaG-Typ Primasen sind die Zink-Bindungselemente der untersuchten archaebakteriellen Primasen *in vitro* nicht essentiell für die Primaseaktivität. Diese Tatsache mag erklären, warum die zu Pri-Typ Primasen ähnliche katalytische Domäne von RepB' kein Zinkbindungs-Motiv besitzt. Außerdem zeigt die Raumstruktur der katalytischen Domäne von RepB' im Komplex mit *ssiA*(3' Δ 13)DNA, dass RepB' mit der Unterdomäne I das 5'-Ende und das erste Basenpaar der *ssiA* DNA spezifisch erkennt. Die Unterdomäne I ist strukturell nicht unter den Zink-abhängigen Pri- und DnaG-Typ Primasen Raumstrukturen konserviert. Bis auf das unter archaebakteriellen Pri-Typ Primasen Typ-konservierte Trp50 (Abbildung 4.6, Tabelle 4.3) ist keine an der *ssiA* DNA-Bindung beteiligte Aminosäure in Pri- und DnaG-Typ Raumstrukturen konserviert. Die Unterdomäne I der katalytischen Domäne von RepB' könnte also Ersatz für „fehlende“ DNA-Zink-Bindungselemente sein.

Die gemischte α -, β -Faltung der katalytischen Domäne von RepB' wird auch in nicht prozessiven Polymerase Domänen der Ligase D aus *Pseudomonas aeruginosa* vorgefunden (70). Das bedeutet, dass die katalytische Domäne Polymeraseaktivität besitzen könnte. Jedoch konnte die isolierte katalytische Domäne von RepB' nach Zugabe der Oligonukleotid-Primer AC, ACG, ACGC Komplementärstrangsynthese an M13mp18*ssiA* ssDNA in Gegenwart der Vent-DNA-Polymerase nicht initiieren (nicht gezeigt). Die Oligonukleotid-Primer AC, ACG, ACGC wurden als Kontrollen im Experiment eingesetzt und konnten selbst die Komplementärstrangsynthese an M13mp18*ssiA* ssDNA nicht einleiten, weil die Oligonukleotide aufgrund ihrer unzureichenden Länge von der Vent-DNA-Polymerase nicht verwendet werden können.

5.10 Modell für die Translokation der *ssiA* DNA entlang RepB'. Wie könnte die *ssiA* Matrizen-ssDNA während der Primersynthese entlang der katalytischen Domäne von

RepB' weitergerückt werden? Auf Grundlage der Kristallstruktur des Primase-DNA-Komplexes und der experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell zur *ssiA* DNA-Translokation erstellt (Abbildung 5.1).

Die Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes zeigt, dass die katalytischen Domäne von RepB' das einzelsträngige 5'-Ende (nt 1-6) und das erste Basenpaar (G7-C27) der *ssiA*(3' Δ 13)DNA (nt 1-27) spezifisch bindet (Abbildung 4.18 A, B), aber den größten Teil der Haarnadelschleife (nt 8-26) nicht erkennt. Das in der Raumstruktur fehlende 3'-Ende (nt 28-40) der intakten *ssiA* DNA sollte entlang des aktiven Zentrums binden (Abbildung 5.1) und RepB' als Matrizen-DNA dienen, weil an Thymin 32 die DNA-Primersynthese beginnt.

Die zur *ssiA* DNA komplementäre DNA-Primersynthese bedingt, dass die Translokation der *ssiA* DNA relativ zu RepB' und entgegen der Primersyntheserichtung erfolgt (Abbildung 5.1).

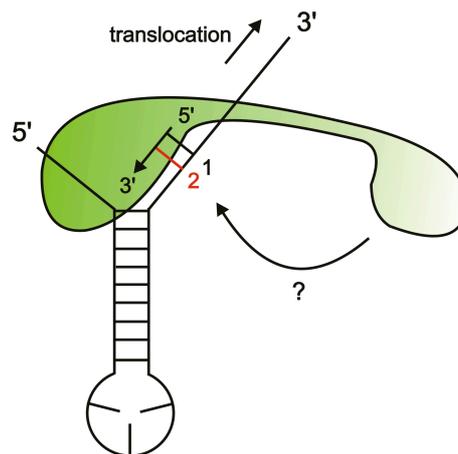


Abbildung 5.1: Modell für Primersynthese und Translokation entlang *ssiA* DNA. RepB' (grün) ist an intakte *ssiA* DNA gebunden. Das 5'-Ende und das erste Basenpaar (nt 7-27) der *ssiA* DNA-Haarnadelschleife werden durch die katalytische Domäne spezifisch erkannt. Das 3'-Ende der *ssiA* DNA (nt 28-40) wird entlang des katalytischen Zentrums gebunden und dient RepB' als Matrizen-DNA. Der DNA-Primer wird von RepB' komplementär zur *ssiA* DNA-Matrize in 5'->3' Richtung synthetisiert. Das 3'-Ende (nt 28-40) der *ssiA* DNA wird in die entgegengesetzte Richtung weitergerückt (schwarzer Pfeil, am 3'-Ende). Das erste Basenpaar des *ssiA* DNA Primer Hybrids ist schwarz dargestellt und mit der Ziffer 1 versehen. Das zweite nachfolgende Basenpaar ist rot gefärbt. Mögliche Interaktionen zwischen der Helix-Bündel Domäne und Primer sind mit einem gebogenen Pfeil und einem Fragezeichen angedeutet.

Weil das 5'-Ende der *ssiA* DNA essentiell für die Bindung an RepB' ist, erscheint eine Translokation des 5'-Endes während der DNA-Primersynthese unwahrscheinlich. Stattdessen könnte das 3'-Ende (nt 28-40) der *ssiA* DNA weitergerückt werden. Eine Translokation des 3'-Endes der *ssiA* DNA ist denkbar, weil es nicht essentiell für die Bindung von RepB' ist (Abbildung 4.15 B-G).

Die Entwindung der *ssiA*-Haarnadelschleife (nt 7-27) wird spätestens notwendig, sobald der von RepB' synthetisierte 12 nt lange DNA-Primer die Länge von 5 Nukleotiden überschreitet. Denn der Abstand vom Startpunkt der DNA-Primersynthese (Thymin 32) bis zum ersten Basenpaar der Haarnadelschleife beträgt fünf Nukleotide. In der Raumstruktur des Primase-DNA-Komplexes kontaktiert Trp50 das erste Basenpaar der *ssiA*-Haarnadelschleife G7-C27 und könnte deshalb eine Rolle bei der Auftrennung der Haarnadelschleife spielen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass das RepB' Mutantenprotein W50A überwiegend DNA-Primer mit einer Länge von 5-6 Nukleotiden synthetisiert, und die Synthese längerer DNA-Primer deutlich vermindert ist.

Das auf strukturellen und biochemischen Daten beruhende hier vorgestellte Modell der Translokation der *ssiA* DNA von RepB' unterscheidet sich von der gängigen Vorstellung, dass Primasen entlang der DNA diffundieren und aufgrund fehlender Prozessivitätselemente wie „Finger und Daumen“ Domänen der DNA-Polymerasen während der Primersynthese von der DNA abdissoziieren. Vielmehr bleibt RepB' während des Primersyntheseprozesses aufgrund einer spezifischen DNA-Bindungsstelle an *ssiA* DNA gebunden, solange kein neuer DNA-Primer durch Besetzung der dATP-Bindungsstelle initiiert wird. Im Gegensatz zu anderen Primasen gleitet RepB' selbst nicht entlang der DNA, sondern die *ssiA* DNA-Matrize wird durch Auftrennung der *ssiA* DNA-Haarnadelschleife am katalytischen Zentrum von RepB' entlang gerückt. Das in dieser Arbeit vorgestellte Translokationsmodell ist daher nicht auf Primasen übertragbar, denen Haarnadelstrukturen wie *ssiA* oder *ssiB* in ihrer Erkennungs-DNA fehlen. Dagegen könnte das Translokationsmodell anwendbar sein auf alle Primasen, die von IncQ- und IncQ-ähnlichen Plasmiden kodiert werden. IncQ-Primasen und RepB' besitzen untereinander konservierte katalytische und DNA-bindende Aminosäuren (Abbildung 4.20 A), und ihre Plasmide weisen homologe *ssi*-Sequenzen auf (Abbildung 4.20 B).

Tabelle 5.1: Vergleich biochemischer und struktureller Eigenschaften der RSF1010 kodierten Primase RepB', der DnaG-Primase aus *E.coli*, archaebakteriellen Pri-Typ Primasen Pfu aus *P. furiosus* und Sso aus *S. sulfolobus*.

	DnaG (<i>E.coli</i>)	Pfu (<i>P. furiosus</i>)	Sso (<i>S. sulfolobus</i>)	RepB' (RSF1010)
Aufbau	3 Domänen: - Zn ²⁺ -bindende - RNA-Polymerase Domäne - Helikase bindende Domäne	2 Untereinheiten: - große UE - kleine UE: katalytische Domäne Helix-Bündel-Domäne	2 Untereinheiten: - große UE - kleine UE: katalytische Domäne Helix-Bündel-Domäne	2 Domänen: - katalytische Domäne - Helix-Bündel Domäne
Katalytische Domäne	TOPRIM Faltung	Gemischte α - β -Faltung	Gemischte α - β -Faltung	Gemischte α - β -Faltung
Funktion(en)	Matrizen-ssDNA abhängige Nukleotidyl-transferase Spezifische DNA-Erkennungsstelle (5'-CTG-3') + unspezifische DNA Bindungsstelle	Matrizen-ssDNA abhängige Nukleotidyl-transferase Unbekannt	Matrizen-ssDNA abhängige Nukleotidyl-transferase Unbekannt	Matrizen-ssDNA abhängige Nukleotidyl-transferase Spezifische <i>ssiA</i> DNA-Erkennungsstelle
Zink-bindende Domäne/Motive	Zink <i>Ribbon</i> Domäne	Zink-Gelenk (<i>knuckle</i>) Motiv	Zink-Schleife (<i>stem loop</i>)	Nicht vorhanden
Funktion(en)	Matrizen-ssDNA Spezifität Primerverlängerung Primer Übergabe an DNA-Polymerase	Unbekannt	beeinflusst Primaseaktivität	
Helix-Bündel Domäne	Nicht vorhanden	α -Helices	Nicht vorhanden	α -Helices
Funktion(en)		Unbekannt		Primer Initiation
Unstrukt. AS-linker	Beeinflusst Primerverlängerung	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	reduziert Primaseaktivität bei Verkürzung
Matrizen-ssDNA	5'-CTG-3'	Unbekannt	Unbekannt	<i>ssiA</i>
Primer	pppAG(N) ₈₋₁₀	RNA (kl UE)/ DNA (gr+ kl UE)	DNA+RNA (gr + kl UE), NTP-Präferenz	pppdAdC(N) ₈₋₁₀

5.11 Vergleich der RepB'-DNA-Erkennungssequenz *ssiA* mit Primase-DNA-Erkennungssequenzen pro- und eukaryontischer Primasen. EMSA-Studien und *run off* DNA-Sequenzierung zeigten, dass das 5'-Ende der *ssiA* DNA essentiell zur Bindung an RepB' ist, während am 3'-Ende die Primersynthese begonnen wird. Die Aufteilung der *ssiA* DNA in eine spezifische Bindungs- und eine spezifische Primerinitiationssequenz ist neu für prokaryontische Primasen. Eubakterielle Primasen besitzen meist deutlich kürzere Erkennungssequenzen als RepB' und synthetisieren RNA-Primer direkt gegenüber ihrer DNA-Erkennungssequenz (Tabelle 5.1). Bei

eukaryontischen Primasen wird dagegen eine ähnliche funktionelle Unterteilung der Matrizen-DNA vorgefunden wie bei RepB', aber die erkannten DNA-Sequenzen sind degeneriert (2). So wird die Maus-Primase-Aktivität erhöht, wenn die Matrizen-DNA die Pyrimidin-reichen Trinukleotid-Sequenzen CCA und CCC enthält. Die RNA-Primersynthese der Maus-Primase erfolgt bis zu 10 Nukleotide vom 3'-Ende des Pyrimidin-reichen DNA-Abschnitts entfernt, wobei der erzeugte RNA-Primer mit einem Purin (ATP oder GTP) anfängt.

5.12 RepB' könnte einen Komplex mit dem Kopplungsprotein des T4SS bilden.

RepB' initiiert als C-terminale Primase-Domäne des Mobilisierungsproteins MobA die konjugative RSF1010-Replikation in der Rezipientenzelle. Nach kovalenter Bindung der N-terminalen Relaxase Domäne von MobA an einzelsträngige RSF1010 wird ssRSF1010-MobA über ein Typ-4 Sekretionssystem (T4SS) in die Rezipientenzelle transportiert (Punkt 1.7). Der ssRSF1010-MobA Komplex wird wahrscheinlich über das cytoplasmatische Kopplungsprotein des T4SS zuerst erkannt. MobA hält 4 Transportsignale bereit, von denen zwei auf der C-terminalen RepB' Domäne liegen (AS 194-201 und AS 275-323).

Vergunst et al schlugen vor, dass das T4SS den MobA-ssRSF1010 Komplex aufgrund positiv geladener Aminosäuren innerhalb der C-terminalen 48 AS der RepB' Domäne erkennt (40). Weil nach Einfügen von zusätzlichen Aminosäuren (im Leseraster) vor den beiden Transportsignalen auf RepB' MobA-ssRSF1010 nicht mehr in die Rezipientenzelle transportiert werden konnte, vermuteten Parker und Meyer (46), dass nicht nur Ladung, sondern auch strukturelle Integrität der auf RepB' kodierten Transportsignale notwendig für die Erkennung von MobA-ssRF1010 ist (46). In der Tat zeigt die Raumstruktur von RepB', dass Transportsignal 1 (AS 194-201) auf der langen α -Helix α_6 liegt, während Transportsignal 2 sich aus α -Helix α_{11} und dem unstrukturierten C-Terminus zusammensetzt (Abbildung 4.5). Dies deutet darauf hin, dass ein Komplex zwischen Kopplungsprotein des T4SS und der RepB' Domäne von MobA vor dem Transport des MobA-ssRSF1010 in die Rezipientenzelle gebildet werden könnte.

5.13 Evolutionäre Herkunft von RepB'. Die ungewöhnlich komplexen *ssi* DNA-Erkennungssequenzen werden nur auf IncQ und IncQ-ähnlichen Plasmiden gefunden,

aber nicht auf bakteriellen oder archaeobakteriellen Genomen. Obwohl RSF1010 bisher nur in Eubakterien gefunden wurde und keine beweiskräftige Aminosäuresequenz-homologie zwischen RepB' und den archaeobakteriellen Primasen Pfu, Pho, Sso besteht (nicht gezeigt), besitzen die katalytischen Domänen von RepB' und archaeobakteriellen Primasen Strukturhomologie und konservierte katalytische Aminosäuren. RepB' ist mit der Vent-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermococcus litoralis* kompatibel, die im Komplementärstrang-synthesetest eingesetzt wurde. Interessanterweise ist RepB' selbst nach Erhitzen auf 80°C über eine Zeitdauer von 30 min noch aktiv (37). Die bemerkenswerte Hitzestabilität kann nun mit der Strukturhomologie zu Primase Pfu, Pho und Sso aus thermophilen Archaeobakterien erklärt werden und weckt die Frage nach der evolutionären Herkunft nicht nur von RepB', sondern auch von RSF1010.

6 Zusammenfassung

Die Primase RepB' des Plasmides RSF1010 initiiert jeweils an den Sequenzen *ssiA* und *ssiB* im *oriV* die RSF1010-Replikation, die ausschließlich im *leading strand* Modus erfolgt. Die beiden einzelsträngigen *ssi* Sequenzen bestehen aus 40 Nukleotiden und bilden Haarnadelstrukturen (nt 7-27) aus. In der vorliegenden Arbeit wurde bestimmt, dass RepB' die Synthese eines DNA-Primers dATP-abhängig an Thymin 32 der *ssiA*-Sequenz beginnt. Die Raumstruktur von RepB' wurde in Volllänge bei einer Auflösung von 2,0 Å und die Struktur der katalytischen Domäne von RepB' (AS 1-212) im Komplex mit *ssiA*(3'Δ13)DNA (nt 1-27) bei einer Auflösung von 2,7 Å aufgeklärt. RepB' zeigt eine hantelförmige Struktur, die aus einer N-terminalen katalytischen und einer C-terminalen Helix-Bündel Domäne besteht. Beide Domänen von RepB' sind durch einen flexiblen Aminosäurelinker aus 14 Aminosäuren verknüpft und liegen in der Kristallstruktur ~29 Å voneinander entfernt. Die Struktur der katalytischen Domäne von RepB' (AS 1-212) im Komplex mit *ssiA*(3'Δ13)DNA zeigt, dass die sechs 5'-terminalen Nukleotide und das erste Basenpaar der *ssiA*(3'Δ13)DNA spezifisch von der Unterdomäne I der katalytischen Domäne gebunden werden. EMSA-Studien belegten, dass das spezifisch gebundene 5'-Ende der *ssiA* DNA essentiell zur Bindung von *ssiA* DNA an RepB' ist. Die RepB'-*ssiA*(3'Δ13)DNA-Struktur zeigt erstmals eine Primase im spezifischen Komplex mit DNA. Struktur-Funktionsanalysen demonstrierten, dass die katalytischen Domänen von RepB' und der eukaryontischen/archaeobakteriellen Pri-Typ Primase Familie eine ähnliche Faltung aufweisen und untereinander konservierte katalytische Aminosäuren besitzen. Allerdings fehlt der katalytischen Domäne von RepB' ein für die Pri-Typ Primase-Familie typisches Zink-Bindungselement, das vermutlich die Bindung an Matrizen-ssDNA unterstützt. Die spezifisch DNA-bindenden Aminosäuren von RepB' sind in Pri-Typ Primasen nicht konserviert. Die Raumstruktur von RepB' ist das erste Beispiel einer Zink-unabhängigen Primase-Struktur. Komplementationsstudien bewiesen, dass die Helix-Bündel Domäne der katalytischen Domäne von RepB' Primaseaktivität verleiht. Die Helix-Bündel Domäne wird in keiner anderen Primase-Raumstruktur vorgefunden und tritt nur innerhalb von IncQ-Primasen auf. Aminosäuresequenzvergleiche zeigten, dass RepB' der Vertreter einer eigenen Primaseklasse ist, die von IncQ und IncQ-ähnlichen Plasmiden kodiert wird, die *ssiA*- und *ssiB* Sequenzen tragen und hohe Sequenzidentität zu RSF1010 besitzen.

Summary

Primase RepB' of plasmid RSF1010 initiates the replication of plasmid RSF1010 within the *origin of vegetative replication (oriV)* on sequences *ssiA* (*ssi*, single strand initiator) and *ssiB*. Replication of RSF1010 is carried out exclusively in leading strand mode. Sequences *ssiA* and *ssiB* consist of 40 nucleotides whilst nucleotides 7-27 form a double-stranded hairpin. This work shows that RepB' synthesises DNA primers with a length of up to 14 nucleotides in a dATP dependent manner beginning on thymine 32 of *ssiA* DNA. The crystal structure of RepB' was determined in full length at 2.0 Å resolution and the structure of the catalytic domain of RepB' (amino acids 1-212) in a specific complex with *ssiA*(3'Δ13)DNA at 2.7 Å resolution. RepB' has got a dumbbell like shape consisting of an N-terminal catalytic and a C-terminal helix-bundle domain. Both domains of RepB' are separated by a long α-helix and a flexible linker composed of 14 amino acids and are found ~29 Å away from each other in the crystal structure of RepB'. The structure of the catalytic domain of RepB' in complex with *ssiA*(3'Δ13)DNA shows that nucleotides one to six and base pair C7-G27 of the hairpin are specifically bound by subdomain I of the catalytic domain. EMSA-studies confirmed that the six 5' terminal nucleotides of *ssiA* DNA are crucial for binding to RepB'. The structure of the catalytic domain-*ssiA*(3'Δ13)DNA complex shows for the first time a primase in a specific complex with DNA. Structure function analyses revealed that the catalytic domains of RepB' and of the eucaryotic/ archaebacterial Pri-type primase family share a similar fold and conserved catalytic amino acids. However, the catalytic domain of RepB' lacks the zinc binding element typical of Pri-Typ primases which is supposed to support DNA binding. The *ssiA* DNA binding amino acids of RepB' are not conserved among Pri-Typ primases. The structure of RepB' is the first structure of a zinc independent primase. Complementation studies demonstrated that the catalytic domain of RepB' exhibits primase activity only in presence of the helix-bundle domain of RepB', which occurs exclusively among primases encoded by IncQ and IncQ-like plasmids. Amino acid sequence comparisons showed that RepB' is apparently the prototype of a distinct class of primases encoded by IncQ and IncQ-like plasmids with *ssiA*- and *ssiB*-like sequences, and exclusive leading-strand replication mode.

7 Literaturverzeichnis

1. Scherzinger E, *et al.* (1977) Bacteriophage-T7-induced DNA-priming protein. A novel enzyme involved in DNA replication. *Eur J Biochem* 72:543-558.
2. Frick DN, Richardson CC (2001) DNA primases. *Annu Rev Biochem* 70:39-80.
3. Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.
4. Meselson M, Stahl FW (1958) The Replication of DNA in Escherichia Coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44:671-682.
5. Kornberg A, Baker TA (2005) *DNA Replication* (University Science Books).
6. Datta N (1985) in *PLASMIDS IN BACTERIA*, ed. Hollaender A (Plenum Press, New York, USA), pp. 3-16.
7. Kornberg A, Baker TA (2005) in *DNA Replication* (University Science Books), pp. 113-226.
8. Kornberg A, Baker TA (2005) in *DNA Replication* (University Science Books), pp. 103-109.
9. Steitz TA (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature* 391:231-232.
10. Doublet S, *et al.* (1998) Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* 391:251-258.
11. Frey J, Bagdasarian M (1989) in *Promiscuous Plasmids of Gram-Negative Bacteria*, ed. Thomas CM (Academic Press, Ltd., London, UK), pp. 79-93.
12. Bonemann G, Stiens M, Puhler A, Schluter A (2006) Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, qnrS2, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3075-3080.
13. Kehrenberg C, Wallmann J, Schwarz S (2008) Molecular analysis of florfenicol-resistant *Pasteurella multocida* isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother* 62:951-955.
14. Meyer R (2009) Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* 62:57-70.
15. Barth PT, Grinter NJ (1974) Comparison of the deoxyribonucleic acid molecular weights and homologies of plasmids conferring linked resistance to streptomycin and sulfonamides. *J Bacteriol* 120:618-630.
16. Scholz P, *et al.* (1989) Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75:271-288.
17. Frey J, Bagdasarian MM, Bagdasarian M (1992) Replication and copy number control of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 113:101-106.
18. Scherzinger E, *et al.* (1984) Replication of the broad host range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid-encoded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:654-658.
19. Scherzinger E, Haring V, Lurz R, Otto S (1991) Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res* 19:1203-1211.
20. Miao DM, *et al.* (1995) The interaction of RepC initiator with iterons in the replication of the broad host-range plasmid RSF1010. *Nucleic Acids Res* 23:3295-3300.
21. Haring V, *et al.* (1985) Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6090-6094.
22. Honda Y, *et al.* (1993) Mutational analysis of the specific priming signal essential for DNA replication of the broad host-range plasmid RSF1010. *FEBS Lett* 324:67-70.
23. Lin LS, Meyer RJ (1987) DNA synthesis is initiated at two positions within the origin of replication of plasmid R1162. *Nucleic Acids Res* 15:8319-8331.
24. Kim YJ, Meyer RJ (1991) An essential iteron-binding protein required for plasmid R1162 replication induces localized melting within the origin at a specific site in AT-rich DNA. *J Bacteriol* 173:5539-5545.

25. Scherzinger E, *et al.* (1997) The RepA protein of plasmid RSF1010 is a replicative DNA helicase. *J Biol Chem* 272:30228-30236.
26. Niedenzu T, *et al.* (2001) Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *J Mol Biol* 306:479-487.
27. Xu H, *et al.* (2003) Structure of DNA helicase RepA in complex with sulfate at 1.95 Å resolution implicates structural changes to an "open" form. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:815-822.
28. Haring V, Scherzinger E (1989) in *Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria*, ed. Thomas CM (Academic Press, Ltd., London, UK), pp. 95-124.
29. Tanaka K, *et al.* (1994) Functional difference between the two oppositely oriented priming signals essential for the initiation of the broad host-range plasmid RSF1010 DNA replication. *Nucleic Acids Res* 22:767-772.
30. Honda Y, *et al.* (1991) Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: molecular dissection of the oriV of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:179-183.
31. Honda Y, Sakai H, Komano T, Bagdasarian M (1989) RepB' is required in trans for the two single-strand DNA initiation signals in oriV of plasmid RSF1010. *Gene* 80:155-159.
32. Miao DM, *et al.* (1993) A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF1010. *Nucleic Acids Res* 21:4900-4903.
33. Honda Y, *et al.* (1992) DnaG-dependent priming signals can substitute for the two essential DNA initiation signals in oriV of the broad host-range plasmid RSF1010. *Nucleic Acids Res* 20:1733-1737.
34. Ogawa T, Okazaki T (1980) Discontinuous DNA replication. *Annu Rev Biochem* 49:421-457.
35. Corn JE, Berger JM (2006) Regulation of bacterial priming and daughter strand synthesis through helicase-primase interactions. *Nucleic Acids Res* 34:4082-4088.
36. Bird LE, Pan H, Soultanas P, Wigley DB (2000) Mapping protein-protein interactions within a stable complex of DNA primase and DnaB helicase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* 39:171-182.
37. Haring V (1986) *The Replication proteins of the plasmid RSF1010: Overproduction, purification and characterization of the plasmid encoded enzymes* (Technische Universität, Berlin).
38. Derbyshire KM, Hatfull G, Willetts N (1987) Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic and DNA sequence analysis of the mobilization region. *Mol Gen Genet* 206:161-168.
39. Brasch MA, Meyer RJ (1986) Genetic organization of plasmid R1162 DNA involved in conjugative mobilization. *J Bacteriol* 167:703-710.
40. Vergunst AC, *et al.* (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:832-837.
41. Luo ZQ, Isberg RR (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:841-846.
42. Fronzes R, *et al.* (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323:266-268.
43. Scherzinger E, Lurz R, Otto S, Dobrinski B (1992) In vitro cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. *Nucleic Acids Res* 20:41-48.
44. Brasch MA, Meyer RJ (1987) A 38 base-pair segment of DNA is required in cis for conjugative mobilization of broad host-range plasmid R1162. *J Mol Biol* 198:361-369.

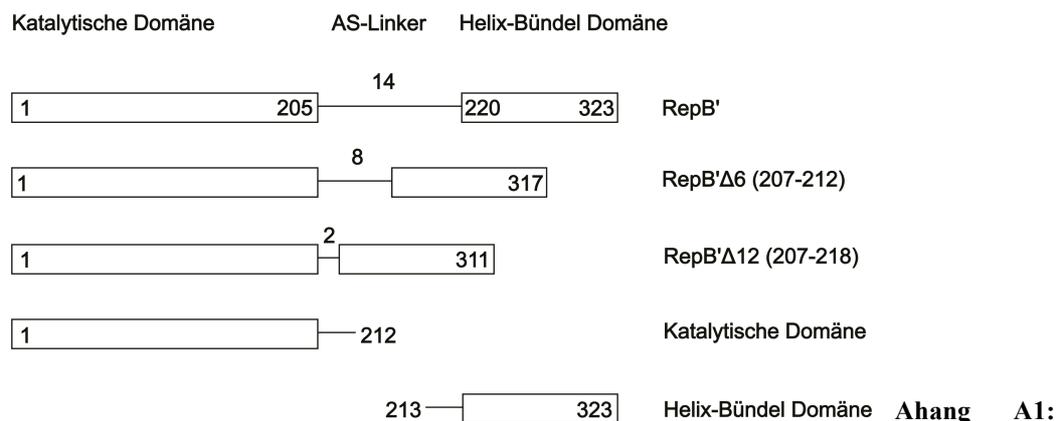
45. Scherzinger E, Kruff V, Otto S (1993) Purification of the large mobilization protein of plasmid RSF1010 and characterization of its site-specific DNA-cleaving/DNA-joining activity. *Eur J Biochem* 217:929-938.
46. Parker C, Meyer RJ (2007) The R1162 relaxase/primase contains two, type IV transport signals that require the small plasmid protein MobB. *Mol Microbiol* 66:252-261.
47. Henderson D, Meyer R (1999) The MobA-linked primase is the only replication protein of R1162 required for conjugal mobilization. *J Bacteriol* 181:2973-2978.
48. Henderson D, Meyer RJ (1996) The primase of broad-host-range plasmid R1162 is active in conjugal transfer. *J Bacteriol* 178:6888-6894.
49. Pan H, Wigley DB (2000) Structure of the zinc-binding domain of *Bacillus stearothermophilus* DNA primase. *Structure* 8:231-239.
50. Kato M, *et al.* (2003) Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis. *Mol Cell* 11:1349-1360.
51. Corn JE, Pease PJ, Hura GL, Berger JM (2005) Crosstalk between primase subunits can act to regulate primer synthesis in trans. *Mol Cell* 20:391-401.
52. Keck JL, Roche DD, Lynch AS, Berger JM (2000) Structure of the RNA polymerase domain of *E. coli* primase. *Science* 287:2482-2486.
53. Podobnik M, McInerney P, O'Donnell M, Kuriyan J (2000) A TOPRIM domain in the crystal structure of the catalytic core of *Escherichia coli* primase confirms a structural link to DNA topoisomerases. *J Mol Biol* 300:353-362.
54. Toth EA, *et al.* (2003) The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7. *Mol Cell* 12:1113-1123.
55. Oakley AJ, *et al.* (2005) Crystal and solution structures of the helicase-binding domain of *Escherichia coli* primase. *J Biol Chem* 280:11495-11504.
56. Aravind L, Leipe DD, Koonin EV (1998) Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res* 26:4205-4213.
57. Griep MA, Lokey ER (1996) The role of zinc and the reactivity of cysteines in *Escherichia coli* primase. *Biochemistry* 35:8260-8267.
58. Mendelman LV, Beauchamp BB, Richardson CC (1994) Requirement for a zinc motif for template recognition by the bacteriophage T7 primase. *Embo J* 13:3909-3916.
59. Kusakabe T, Richardson CC (1996) The role of the zinc motif in sequence recognition by DNA primases. *J Biol Chem* 271:19563-19570.
60. Qimron U, Lee SJ, Hamdan SM, Richardson CC (2006) Primer initiation and extension by T7 DNA primase. *EMBO J* 25:2199-2208.
61. Kato M, Ito T, Wagner G, Ellenberger T (2004) A molecular handoff between bacteriophage T7 DNA primase and T7 DNA polymerase initiates DNA synthesis. *J Biol Chem* 279:30554-30562.
62. Godson GN, Schoenich J, Sun W, Mustaev AA (2000) Identification of the magnesium ion binding site in the catalytic center of *Escherichia coli* primase by iron cleavage. *Biochemistry* 39:332-339.
63. Ito N, *et al.* (2003) Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* DNA primase-UTP complex: implications for the mechanism of primer synthesis. *Genes Cells* 8:913-923.
64. Augustin MA, Huber R, Kaiser JT (2001) Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nat Struct Biol* 8:57-61.
65. Lao-Sirieix SH, *et al.* (2005) Structure of the heterodimeric core primase. *Nat Struct Mol Biol* 12:1137-1144.
66. Foiani M, Lucchini G, Plevani P (1997) The DNA polymerase alpha-primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA-damage response. *Trends Biochem Sci* 22:424-427.
67. Arezi B, Kuchta RD (2000) Eukaryotic DNA primase. *Trends Biochem Sci* 25:572-576.
68. Ito N, Matsui I, Matsui E (2007) Molecular basis for the subunit assembly of the primase from an archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS J* 274:1340-1351.

69. Lipps G, *et al.* (2004) Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nat Struct Mol Biol* 11:157-162.
70. Zhu H, *et al.* (2006) Atomic structure and nonhomologous end-joining function of the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1711-1716.
71. Brissett NC, *et al.* (2007) Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science* 318:456-459.
72. Matsui E, *et al.* (2003) Distinct domain functions regulating de novo DNA synthesis of thermostable DNA primase from hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* 42:14968-14976.
73. Corn JE, Pelton JG, Berger JM (2008) Identification of a DNA primase template tracking site redefines the geometry of primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 15:163-169.
74. Duggin IG, Bell SD (2006) The chromosome replication machinery of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* 281:15029-15032.
75. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
76. Geibel S (2006) *Kristallographische Studien an der von dem Plasmid RSF1010 kodierten Primase RepB'* (Freie Universität Berlin).
77. Banchenko S (2008) *Funktionelle Studien an der von Plasmid RSF1010 kodierten Primase RepB'* (Freie Universität Berlin).
78. Gasteiger E, Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005) in *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. Walker JM (Humana Press), pp. 571-607.
79. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
80. Behlke J, Ristau O, Schönfeld HJ (1997) Nucleotide-dependent complex formation between the *Escherichia coli* chaperonins GroEL and GroES studied under equilibrium conditions. *Biochemistry* 36:5149-5156.
81. Ducruix AaG, R. (1999) *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*. (Oxford University Press, Oxford, New York).
82. Leslie AGW (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* 26.
83. Otwinowski Z, Minor W eds. (1997) *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode* (Academic Press).
84. Kabsch (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26:795-800.
85. Sheldrick GM (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* 64:112-122.
86. McCoy AJ, *et al.* (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40:658-674.
87. Terwilliger TC (2003) Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:38-44.
88. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126-2132.
89. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255.
90. Hoof RW, Vriend G, Sander C, Abola EE (1996) Errors in protein structures. *Nature* 381:272.
91. Laskowski RA, Moss DS, Thornton JM (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol* 231:1049-1067.
92. DeLano WL (2002) (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA).

93. Holm L, Sander C (1998) Touring protein fold space with Dali/FSSP. *Nucleic Acids Res* 26:316-319.
94. Strack B, Lessl M, Calendar R, Lanka E (1992) A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the alpha protein of the Escherichia coli satellite phage P4. *J Biol Chem* 267:13062-13072.
95. Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metoz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15:305-308.
96. Tatusova TA, Madden TL (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174:247-250.
97. Seimiya M, Kurosawa Y (1996) Kinetics of binding of Antp homeodomain to DNA analyzed by measurements of surface plasmon resonance. *FEBS Lett* 398:279-284.

8 Anhang

8.1 Planung der RepB'-Derivate. Die Strukturbestimmung zeigte, dass RepB' aus einer katalytische Domäne (AS 1-205) und einer unbekanntem Helix-Bündel Domäne (AS 220-323) besteht, die über einen flexiblen 14 Aminosäure langen *Linker* (AS 206-219) verbunden sind (Abbildung 4.5 A). Zur Untersuchung der Funktion und Wechselwirkung beider Domänen wurden katalytische (AS 1-212) und Helix-Bündel Domäne (AS 213-323) von RepB' separat hergestellt (3.1). Die Funktion des Aminosäurelinkers von RepB' wurde mit den Derivaten RepB' Δ 6, RepB' Δ 12 erforscht (Abbildung 4.11 A). Bei RepB' Δ 6 wurden aus dem *Linker* sechs Aminosäuren (AS 207-212) und bei RepB' Δ 12 12 Aminosäuren (AS 207-218) entfernt. RepB' Δ 16 besitzt einen um 16 Aminosäuren verkürzten C-Terminus und wurde in Kristallisationsexperimenten verwendet.



Für die Struktur-Funktionsuntersuchung an RepB' verwendete RepB'-Derivate

Domänen als Boxen. RepB': Aminosäuren 1-323. RepB' Δ 6: Aminosäuren 1-317, Aminosäuren 207-12 deletiert. Der Aminosäurelinker besteht aus acht flexiblen Aminosäuren. RepB' Δ 12: AS 1-311, Aminosäuren 207-218 deletiert. Der Aminosäurelinker besteht aus zwei flexiblen Aminosäuren. Katalytische Domäne von RepB': AS 1-212. Helix-Bündel Domäne von RepB': AS 213-323. RepB' Δ 16 nicht dargestellt.

Im Verlauf der Struktur-Funktionsuntersuchungen an RepB' wurde die Herstellung verschiedener RepB'-Derivate erforderlich (3.1, 3.1.7, 3.2.5), deren Verwendung hier kurz beschrieben werden soll. Zur Identifizierung potentieller katalytischer Aminosäuren im aktiven Zentrum wurden die RepB'-Mutantenproteine Y62F, D77A,

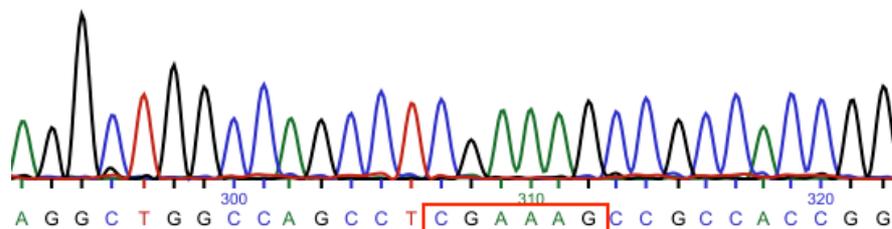
D78A, D134A und R145A generiert (Abbildung 4.9 A, B). Die Mutantenproteine RepB' D77A, D78A, D134A und R145A wurden von Sofia Banchenko während ihrer Diplomarbeit hergestellt (77).

Funktionelle Aminosäuren auf der Oberfläche der Helix-Bündel Domäne von RepB' wurden durch einen Alanin-Scan der sequenzkonservierten Aminosäuren R234, D238, D281, R285 und D302 ermittelt. Nach Aufklärung der Struktur des Primase-DNA-Komplexes wurden die Mutantenproteine RepB' W50A und Y162A erzeugt, um den Einfluss der DNA-bindenden Aminosäuren W50A und Y162A auf die Primer-Synthese zu untersuchen. Die DNA- und Protein-Sequenzen aller RepB'-Derivate wurden durch DNA-Sequenzierung (3.1.8) und zum Teil durch MALDI-TOF Messungen (3.5.1) bestätigt (nicht gezeigt) Die gewünschten genetischen Veränderungen der RepB'-Derivate konnten zweifelsfrei im Fluoreszenzdiagramm der DNA-Sequenzen ermittelt werden (Abbildung A1).

Abbildung A2: Sequenzierungsergebnisse der DNA-Sequenzen von RepB'Δ6, RepB'Δ12, W50A, Y62F, Y162A, R234A, D238A, D281A, R285A und E302A. Es werden Ausschnitte aus den Fluoreszenzprofilen gezeigt. In der oberen Zeile ist die Wildtypsequenz des repB' Gens zu sehen, darunter die durch DNA-Sequenzierung ermittelte DNA-Sequenz des jeweiligen RepB'-Derivates. In der Sequenz sind Deletionen oder Mutationen rot eingerahmt. Mutierte Codons sind gelb unterlegt. Das Fluoreszenzprofil der DNA-Sequenzierung zeigt auf der Y-Achse die relative Fluoreszenzintensität und auf der X-Achse die ermittelte DNA-Sequenz. Farbcode der DNA-Basen: Adenin (grün), Thymin (rot), Cytosin (blau), Guanin (schwarz).

RepB'Δ6

RepB' 5'-GAAGGCCCGCAGGCTGGCCAGCCTCGAACTGCCCGAGCGGCAGCTTAGCCGCCACC-3'
 RepB' Δ6 5'-CAGGCTGGCCAGCCTCGAA-----AGCCGCCACCGGCGCACGG-3'
 *****

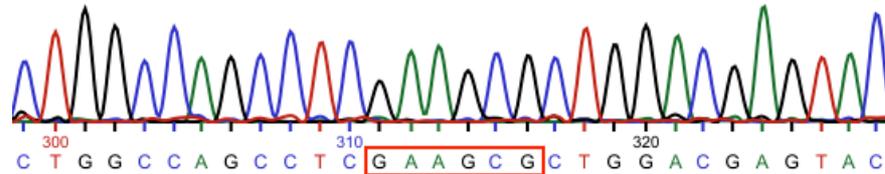


RepB'Δ12

RepB' 5'-CAGCCTCGAACTGCCCGAGCGGCAGCTTAGCCGCCACCGGCGCACGGCGCTGGACG-3'

RepB'Δ12 5'-CAGCCTCGAA-----GCGCTGGACG-3'

*****.....*****

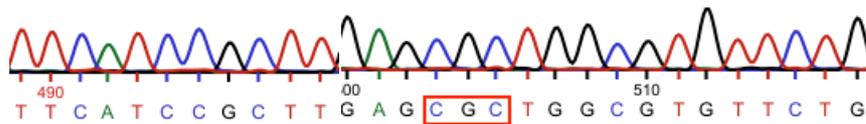


RepB' W50A

RepB'_rk 5'-TTGCCCTGGGCATTTCATCCGCTTGAGC**CA**TGGCGTGTCTGGAGCACTTCGGCGGC-3'

W50A_rk 5'-TTGCCCTGGGCATTTCATCCGCTTGAGC**CGC**TGGCGTGTCTGGAGCACTTCGGCGGC-3'

*****.....*****

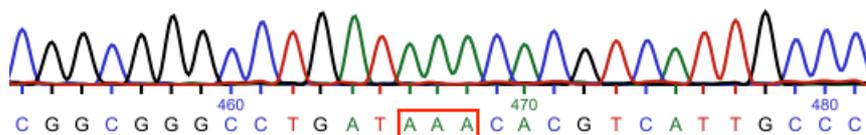


RepB' Y62F

RepB'_rk 5'-ATGCCGCTCCTGCTCGGCGGGCCTGATAT**T**ACACGTCATTGCCCTGGGCATTTCATCC-3'

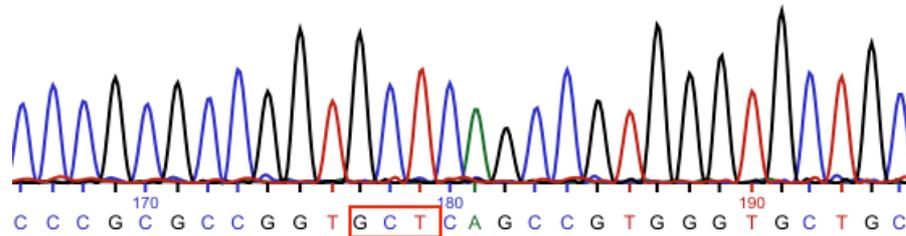
Y62F_rk 5'-ATGCCGCTCCTGCTCGGCGGGCCTGATA**AAA**CACGTCATTGCCCTGGGCATTTCATCC-3'

*****.....*****



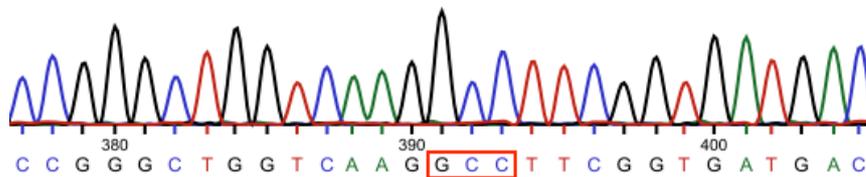
RepB' Y162A

RepB' 5'-AAGGACAAGCACACCACCCGCGCCGGT**TA**TCAGCCGTGGGTGCTGCTGCGTGAATC-3'
 Y162A 5'-AAGGACAAGCACACCACCCGCGCCGGT**GCT**TCAGCCGTGGGTGCTGCTGCGTGAATC-3'
 *** ***** . *****



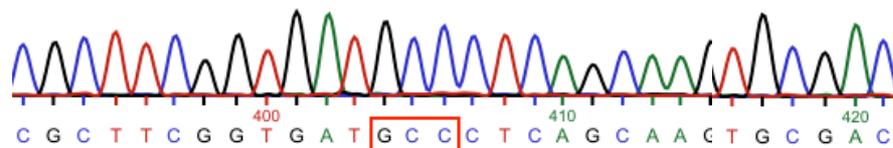
RepB' E234A

RepB' 5'-GCAGCGAGATGGCCGGGCTGGTCAAG**CG**CTTCGGTGATGACCTCAGCAAGTGCGAC-3'
 R234A 5'-GCAGCGAGATGGCCGGGCTGGTCAAG**GCC**CTTCGGTGATGACCTCAGCAAGTGCGAC-3'
 ***** . *****



RepB' D238A

RepB' 5'-GCCGGGCTGGTCAAGCGCTTCGGTGATG**A**CCTCAGCAAGTGCGACTTTATCGCCGC-3'
 D238A 5'-GCCGGGCTGGTCAAGCGCTTCGGTGATG**CC**CCTCAGCAAGTGCGACTTTATCGCCGC-3'
 ***** . *****

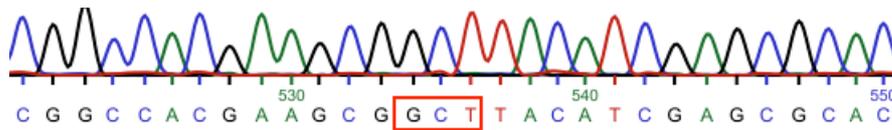


RepB' D281A

RepB' 5' -AGAGCGCAAGCCCCGGCCACGAAGCGGA^TTTACATCGAGCGCACCGTCAGCAAGGTCA-3'

D281A 5' -AGAGCGCAAGCCCCGGCCACGAAGCG^{GCT}TTACATCGAGCGCACCGTCAGCAAGGTCA-3'

***** . *****

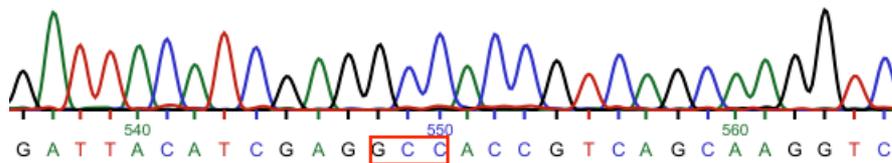


RepB' R285A

RepB' 5' -CCCGGCCACGAAGCGGATTACATCGAG^{CG}CACCGTCAGCAAGGTCATGGGTCTGCC-3'

R285A 5' -CCCGGCCACGAAGCGGATTACATCGAG^{GCC}CACCGTCAGCAAGGTCATGGGTCTGCC-3'

***** . *****

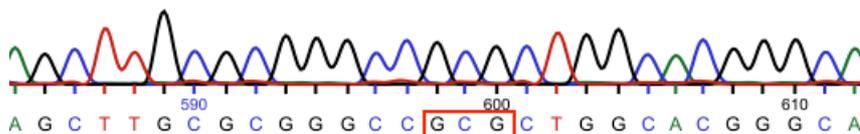


RepB' E302A

RepB' 5' -CCCAGCGTCCAGCTTGC^GCGGGCCGAGCTGGCACGGGCACCGGCACCCCGCCAGCG-3'

E302A 5' -CCCAGCGTCCAGCTTGC^{GCG}CGGGCCGAGCTGGCACGGGCACCGGCACCCCGCCAGCG-3'

***** . *****



8.2 Säulen-chromatographische Reinigung der RepB'-Derivate. Die RepB'-Derivate RepB' Δ 6, RepB' Δ 12 und alle RepB'-Mutantenproteine konnten nach vorhandenem Protokoll >95 % chromatographisch gereinigt werden (3.2.5). Die N- und C-terminale Domäne von RepB' wurden über eine Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure(NTA)-Säule chromatographiert, das Histidin-Hexapeptid wurde durch Thrombinverdau abgeschnitten und durch Dialyse entfernt (3.2.9). Die N-terminale Domäne von RepB' wurde weiter nach RepB'-Reinigungsprotokoll chromatographisch gereinigt.

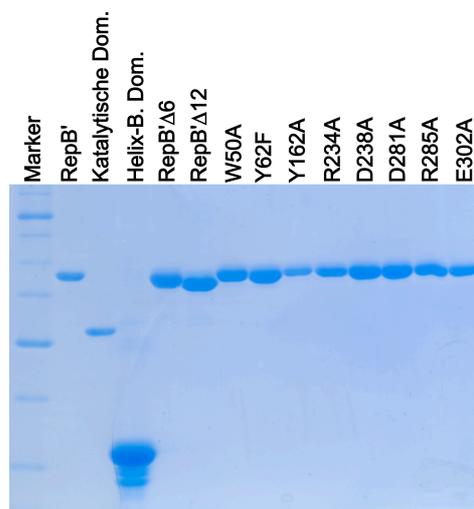


Abbildung A3: SDS-PAGE Ergebnisse der chromatographisch gereinigten RepB'-Derivate.

Spur 1: 2-log Proteinmarker (NEB) (2.6): 66,4 (dicke Bande, oben) 55,6/42,7/34,6/27,0 (dicke Bande, mittig)/20,0/14,3/6,5 [kDa]. Spur 2-14: RepB', katalytische Domäne, Helix-Bündel Domäne, RepB' Δ 6, RepB' Δ 12, W50A, Y62F, Y162A, R234A, D238A, D281A, R285A und E302A.

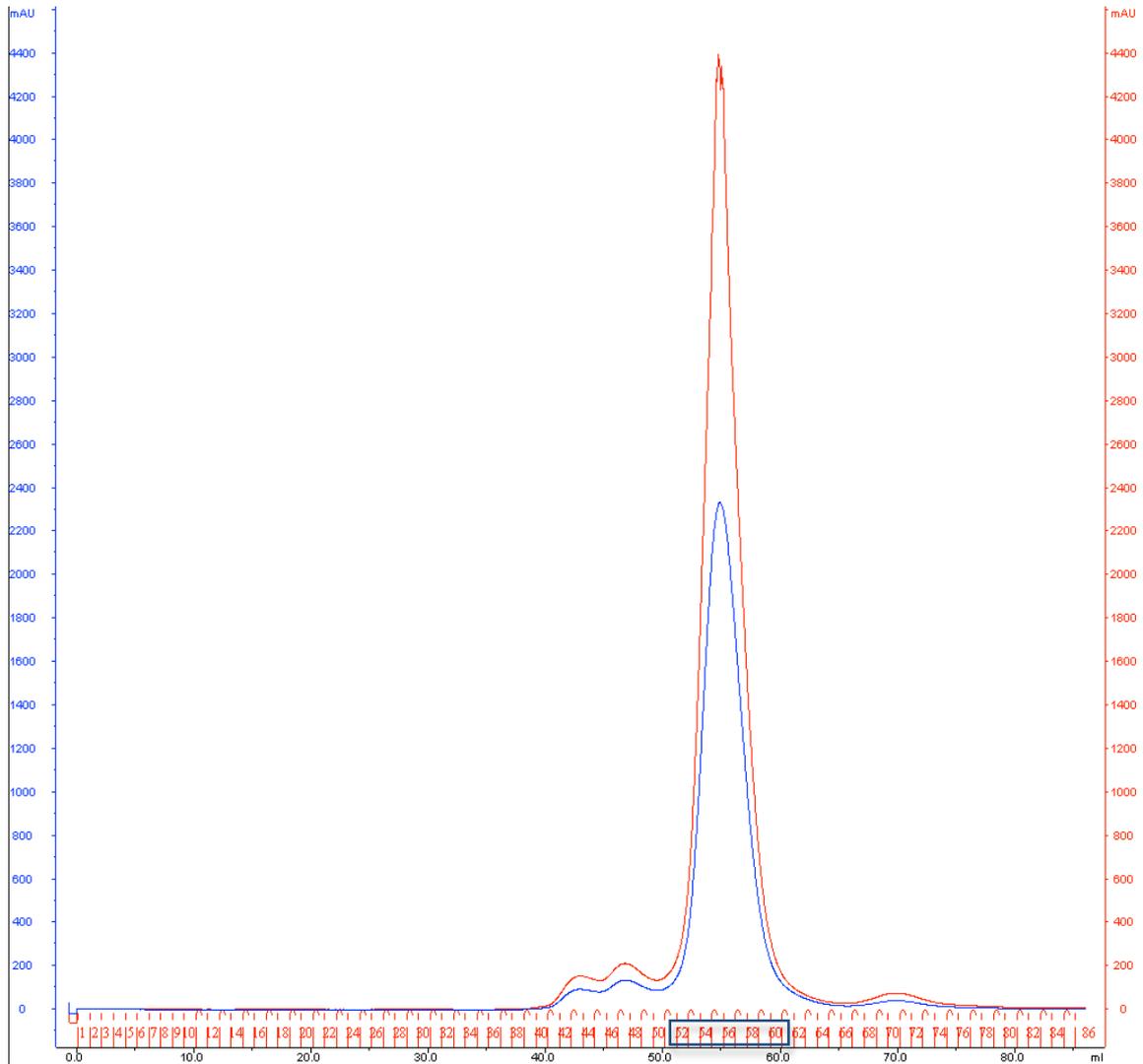


Abbildung A4: Chromatogramm der Gelfiltration an Sephadex-75 des Primase-DNA Komplexes. Die Detektion von Protein bei 280 nm (linke Y-Achse) und von DNA bei 260 nm (rechte Y-Achse) ist in tausendstel Absorptionseinheiten (mAu) angegeben. Das Ausschlussvolumen ist auf der X-Achse in Millilitern (ml) angegeben. Die im SDS-PAGE Gel analysierten proteinhaltigen Fraktionen (rote Zahlen, unterhalb der X-Achse) sind durch einen blauen Kasten gekennzeichnet. Die Hauptmenge des Primase-DNA-Komplexes eluiert bei einem Ausschlussvolumen von 56 ml.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationen

Structure and function of primase RepB' encoded by broad-host-range plasmid RSF1010 that replicates exclusively in leading-strand mode.

Geibel, S, Banchenko S, Engel M, Lanka E, Saenger W

Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 12;106 (19):7810-5. Epub 2009 Apr 24.

PMID: 19416864

A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes.

Bárány-Wallje E, Keller S, Serowy S, Geibel S, Pohl P, Bienert M, Dathe M.

Biophys J. 2005 Oct;89 (4):2513-21. Epub 2005 Jul 22.

PMID: 16040762

Präsentationen

2008 Poster Präsentation beim Keystone Symposium „DNA-Replication and Recombination“ in Santa Fe, USA

2008 Poster Präsentation beim 28. *BESSY Users' Meeting* in Berlin

2007 Mündliche Präsentation beim 10. *Heart of Europe bio-Crystallography (HEC) Meeting* in Bedlewo, Polen

2007 Poster Präsentation beim 27. *BESSY Users' Meeting* in Berlin

Danksagungen

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Saenger für seine vielen Anregungen, sein Engagement für optimale Arbeitsbedingungen und für das interessante und vielfältige Thema bedanken. Die Freiheiten, die mir im Labor zum selbständigen Arbeiten gewährt wurden, habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Dr. Erich Lanka bin ich für die gute Zusammenarbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft, viele Anregungen und für die Besorgung von „Materialien“ aller Art zu großem Dank verpflichtet.

Bei Sofia Banchenko, deren Diplom-Arbeit ich betreut habe, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung bedanken. Phuong Duang danke ich für seine Hilfe bei der Proteinreinigung.

Dr. Michael Engel, Dr. Thomas Spreter und Dr. Willhelm Weihofen möchte ich für die Unterstützung im Umgang mit der komplexen Kristallographie-Software, für Anregungen und Diskussionen danken.

Zu Dank verpflichtet bin ich Claudia Alings für Hilfe bei der Kristallisation von diversen Proteinen und DNA-Reinigung, Clemens Langner für die Hilfe bei technischen Problemen aller Art, Chris Weise für unzählige MALDI-TOF-Messungen und Carsten Jakob für Hilfe bei Computerproblemen. Allen anderen Kollegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Anne Meyer-Gatermann und meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken.