

1. Einleitung

1.1 Die Replikation

Die Verdopplung der genetischen Information und ihre Weitergabe an die nächste Generation ist ein Schlüssel für die Fähigkeit der Zellen sich zu vermehren. Die Reproduktion der DNA als Träger der genetischen Information und damit aller funktionellen und strukturellen Komponenten der Bakterienzelle erfordert einen komplexen und streng regulierten Prozess. Die Regulation dieses Prozesses, der Replikation, erlaubt es der Zelle auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen, Umwelteinflüsse und Nahrungsangebote flexibel zu reagieren. Die Verdopplung der DNA während der Replikation und das Zellwachstum sind miteinander gekoppelt. Die Replikation ist wie alle makromolekularen Synthesen der Zelle auf der Stufe der Initiation reguliert (Maaloe und Kjeldgaard, 1966). Nur einmal während des Zellzyklus und nur zu einer bestimmten Zeit findet die Initiation statt (Cooper und Helmstetter, 1968; Skarstad et al., 1986). Die Replikation der DNA ist semikonservativ (Meselson und Stahl, 1958), bidirektional (Masters und Broda, 1971) und semidiskontinuierlich (Okazaki et al., 1968a).

Escherichia coli (*E. coli*) ist der molekularbiologisch am besten charakterisierte Organismus. Die Replikation des Genoms wird am Ursprung der chromosomalen Replikation, *oriC*, gestartet (Louarn et al., 1974) und endet gegenüber dem *oriC* am Terminus, *terC* (Louarn und Patte, 1977). Das bakterielle Genom hat eine Länge von 4700 Kilobasenpaaren (kbp) (GenBank Accession Nummer L10328), ist zirkulär (Cairns, 1963) und liegt in einer kompakten Form, assoziiert mit mehreren Proteinen z.B. HU-Protein (Griffith, 1976) ohne umgebende Membran vor.

1.2 Der Replikationsorigin *oriC* von *Escherichia coli*

Der Chromosomenabschnitt, auf dem der Replikationsorigin *oriC* lokalisiert ist, liegt bei 84,3 Minuten auf der Genkarte (Bachmann, 1990). Der minimale Replikationsorigin, ein DNA-Fragment, welches zur autonomen Replikation *in vivo* fähig ist, umfaßt 258 Bp (Oka et al., 1980; Asai et al., 1990), wird als Minichromosom bezeichnet (Messer et al., 1978) und umfaßt die *oriC* Koordinaten 11-268 (Buhk und

Messer, 1983). Der entsprechende Chromosomenabschnitt wurde isoliert (Messer et al., 1978; von Meyenburg et al., 1979; Yasuda und Hirota, 1977) und die Nukleotidsequenz bestimmt (Meijer et al., 1979; Sugimoto et al., 1979).

Für die *Enterobacteriaceae* – somit auch *E. coli* – konnte durch Sequenzvergleiche gezeigt werden, dass die Origins starke Homologie untereinander aufweisen und dass in der Originregion einzelne DNA-Segmente stark konserviert sind. Diese konservierten Segmente werden durch Bereiche variabler Sequenz aber konstanter Länge voneinander getrennt (Zyskind et al., 1981; Asada et al., 1982). Die konservierten Bereiche stellen Proteinbindungsstellen dar, die untereinander durch Spacerregionen im richtigen Abstand positioniert werden (Zyskind et al., 1983; Oka et al., 1984). Abbildung 1 zeigt die strukturelle Organisation der *oriC* Region von *E. coli*.

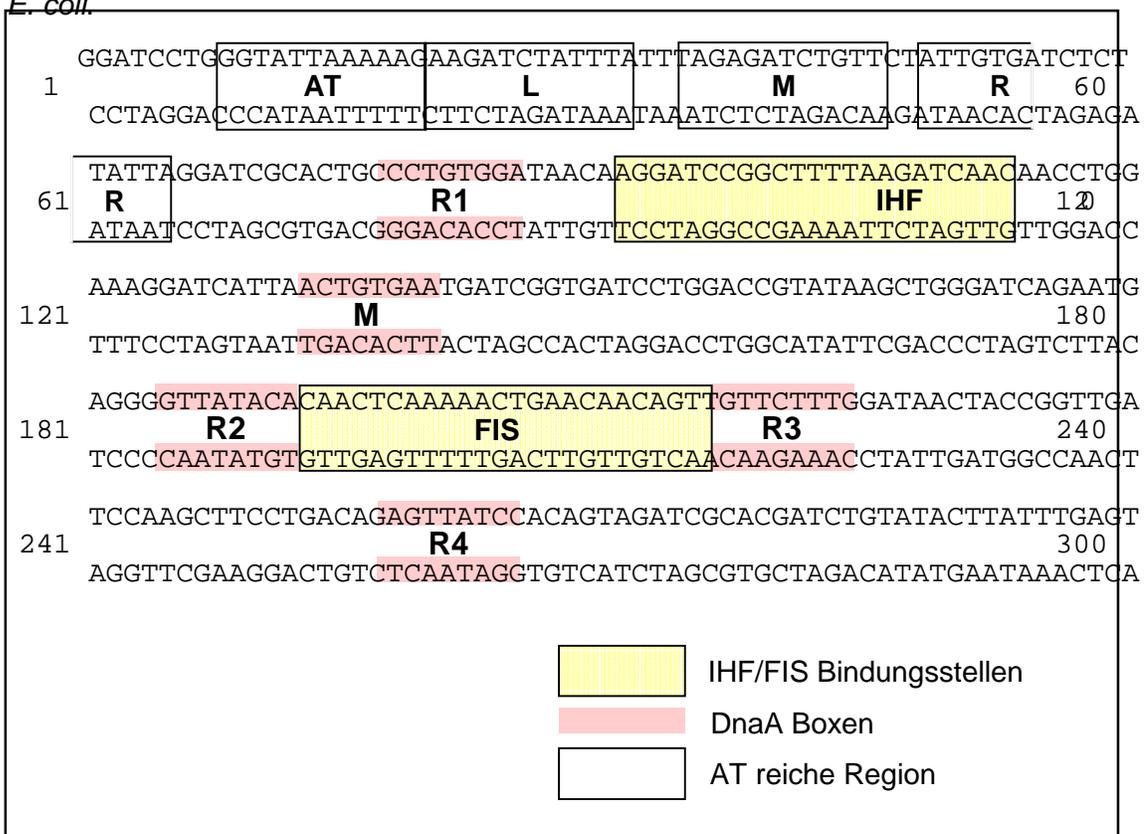


Abb. 1: Minimale *oriC* Region von *E. coli*. Die DNA Sequenz enthält die Nummerierung nach Buhk und Messer (1983). Wichtige Sequenzmerkmale sind hervorgehoben.

Im linken Bereich befinden sich ein AT-Cluster und drei AT-reiche 13mere (R, M, L) in 'Tandem-Repeat' Anordnung (Bramhill und Kornberg, 1988). Von besonderer Bedeutung sind im mittleren und rechten Teil vom *oriC* fünf Bindungsstellen für das DnaA-Protein, sogenannte DnaA-Boxen (R1, M, R2, R3, R4). Die DnaA-Box besteht aus einer 9 Bp langen nicht palindromischen Konsensussequenz $TT^A_{\text{T}}TNCACA$ (Fuller et al., 1984; Schaper und Messer, 1995). Die DnaA-Box M im mittleren Teil vom *oriC*, die eine Fehlposition hat, wurde aufgrund von *in vitro* Footprinting Experimenten identifiziert (Matsui et al., 1985).

Ferner existieren im *oriC* Bindungsstellen für DNA-strukturverändernde Proteine (histonähnliche Proteine). Das Protein IHF (integration host factor) bindet zwischen den DnaA-Boxen R1 und M (Polaczek, 1990), während das Protein FIS (factor of inversion stimulation) zwischen den Boxen R2 und R3 bindet (Messer et al., 1991). Die Bindung von beiden Proteinen bewirkt eine starke Krümmung ('bend') der DNA (Roth et al., 1994). Die Krümmung der DNA begünstigt die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes und damit das Aufschmelzen der DNA. Das HU-Protein besitzt keine definierte Bindungssequenz im *oriC*, unterstützt aber ebenfalls die Bildung des Nukleoproteinkomplexes (Dixon und Kornberg, 1984; van der Ende et al., 1985).

1.3 Der Replikationsprozeß von *Escherichia coli*

Der Replikationsprozeß in *E. coli* konnte aufgrund von *in vitro* Versuchen am *oriC* mit Rohextrakt (Fuller et al., 1981) bzw. gereinigten Komponenten (Kaguni und Kornberg, 1984) in einzelne Schritte unterteilt werden (Kornberg und Baker, 1992). Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung des Replikationsprozesses.

Der Initiationskomplex

Die Bildung des Initiationskomplexes erfolgt durch Bindung von DnaA an seine Bindungsstellen im *oriC*. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen den Initiationskomplex als kompakte ellipsoide Struktur von etwa 20 DnaA Monomeren (Fuller et al., 1984). 220 Bp der *oriC* Region sind wahrscheinlich um den ellipsoiden Komplex herumgewickelt (Funnell et al., 1987; Crooke et al., 1993). Für die Bildung des Initiationskomplexes ist eine geringe ATP-Konzentration (30 nM) ausreichend (Sekimizu et al., 1987). In Anwesenheit der Hilfsfaktoren HU oder IHF und von supercoiled DNA (van der Ende et al., 1985) wird der Initiationskomplex in den offenen Komplex überführt. Dabei wird ein Teil der AT-reichen 13mer Region

entwunden (Bramhill und Kornberg, 1988; Gille und Messer, 1991; Krause und Messer, 1999). Während des Zellwachstums hat FIS an seine Erkennungssequenz im *oriC* gebunden und wird erst während der Initiation der Replikation durch IHF ersetzt. Gleichzeitig ist eine Bindung von DnaA an die DnaA-Box R3 zu beobachten (Cassler et al., 1995).

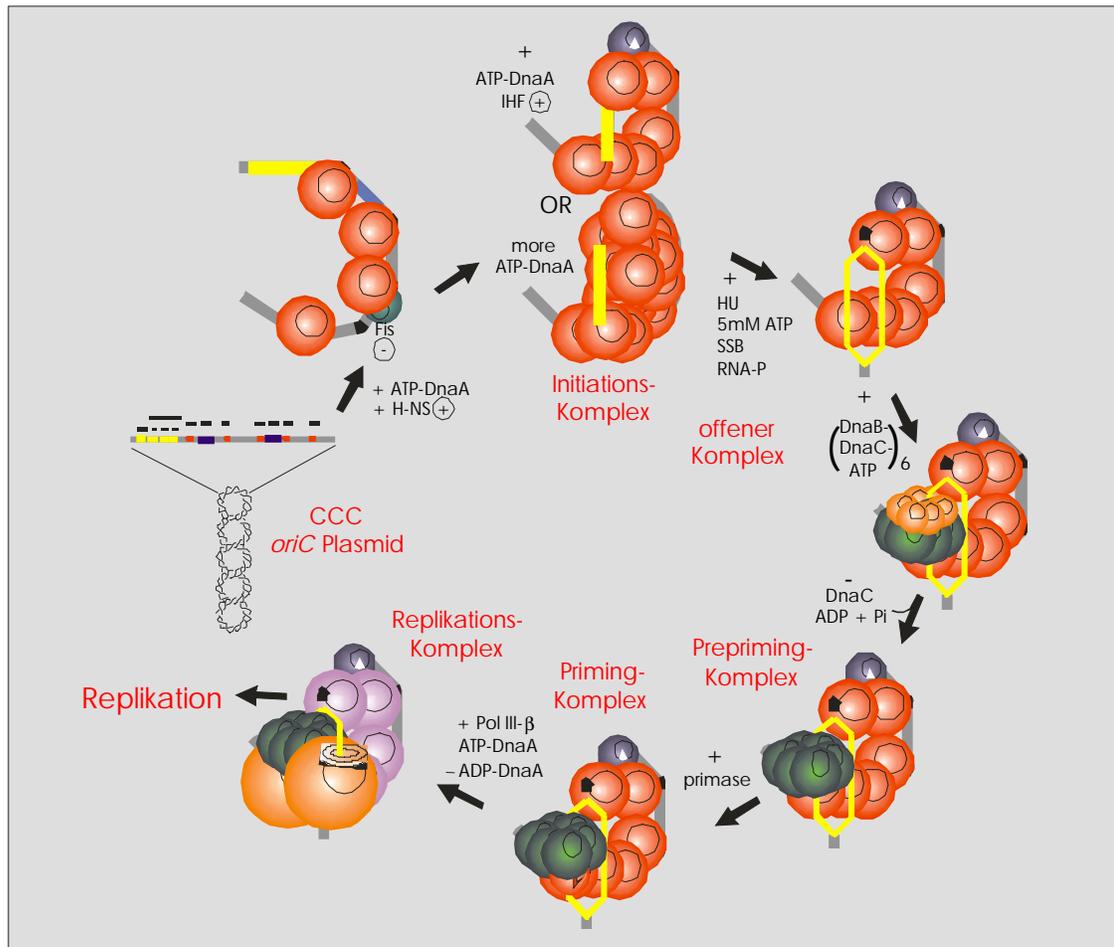


Abb. 2: Schematische Darstellung des Replikationsprozesses.

Der offene Komplex

Für die Umwandlung des Initiationskomplexes in den offenen Komplex ist eine höhere ATP-Konzentration (5 mM) nötig. DnaA allein kann nur bei höheren Temperaturen ($\geq 37\text{ °C}$) die 13mer Region entwenden. Die DnaA-Boxen müssen sich dabei im richtigen Abstand zur 13mer Region befinden (Hsu et al., 1994). Bei niedrigeren Temperaturen werden Hilfsfaktoren benötigt, z.B. optimale

Konzentrationen von HU-Protein oder IHF-Protein (Dixon und Kornberg, 1984; Skarstad et al., 1990).

Der Prepriming-Komplex I

In Anwesenheit von ATP bilden DnaB (die replikative Helikase) und DnaC den DnaB₆C₆-Komplex (Lanka und Schuster, 1983). Dieser wird durch DnaA an die aufgeschmolzene Region im *oriC* dirigiert (Baker et al., 1986; Seufert und Messer, 1987). Auf die entwundene 13mer Region werden zwei Helikasen geladen (Fang et al., 1999). DnaA und DnaB interagieren während des Ladens direkt miteinander (Marszalek und Kaguni, 1994). Die einzelsträngige DNA wird durch SSB (single-strand binding protein) stabilisiert. DnaC verläßt unter ATP-Hydrolyse den Komplex (Kornberg et al., 1987) bevor die Helikasen beginnen die DNA zu entwinden.

Der Prepriming-Komplex II

Die Helikase wird durch das Freisetzen von DnaC aktiviert (Wahle et al., 1989). Unter ATP-Hydrolyse legen beide Helikasen eine Strecke von ca. 65 Nukleotiden zurück bevor die Primase mit der Helikase interagiert (Fang et al., 1999).

Der Priming-Komplex

Der Prepriming Komplex II ist Substrat für die DnaG Primase. Eine optimale Konzentration an Primase ist für eine bidirektionale Replikation ebenso essentiell (Hiasa und Marians, 1994), wie die Interaktion der Primase sowohl mit der Helikase als auch mit der τ -Untereinheit des DNA-Polymerase III Holoenzym (Hiasa und Marians, 1999). Unter Mitwirkung von Gyrase und unter ATP-Hydrolyse entwindet die Helikase die DNA in 5'→3' Richtung (Baker et al., 1986; Bramhill und Kornberg, 1988; Kornberg et al., 1987).

Die Elongation

Das DNA-Polymerase III Holoenzym führt die DNA-Elongation durch (McHenry, 1986). Ein dimerer Komplex der DNA-Polymerase assembliert an jeder Replikationsgabel ATP-abhängig und durch Anheften der Polymerase an die Primer Termini über die β -Untereinheit ('sliding-clamp') (Maki et al., 1988; McHenry, 1988; Kornberg und Baker, 1992). Die 'sliding-clamp' stimuliert die ATPase Aktivität vom DnaA, wodurch das DnaA-Protein in die ADP-Form überführt und damit inaktiviert wird (Katayama et al., 1998). Die Synthese der DNA erfolgt dabei in 5'→3' Richtung. In einer koordinierten Aktion wird ein Strang kontinuierlich ('leading strand') und ein Strang diskontinuierlich ('lagging strand') synthetisiert (Okazaki et al., 1968b).

Die Termination

Die Replikation wird in der *terC*-Region terminiert. Die Region enthält zwei Bereiche T1 und T2 mit drei Erkennungsstellen für das *ter*-Bindungsprotein (TBP) (Hill et al., 1987; Hill et al., 1988; Hill und Mariani, 1990; Hidaka et al., 1991). Der TBP-*ter*-Komplex bewirkt die Blockierung der Helikasen in 5'→3'-Richtung, wodurch die Replikation gestoppt wird.

1.4 Das Initiatorprotein DnaA von *Escherichia coli*

Mit Hilfe temperatursensitiver Mutanten konnte das *dnaA* Gen identifiziert, lokalisiert, kloniert und dessen Funktion bestätigt werden. Das Gen befindet sich bei 83,5 Minuten auf der Genkarte (Miki et al., 1979; Hansen et al., 1982a).

dnaA ist das erste Gen eines Operons, zu dem die nachfolgenden Gene *dnaN*, β -Untereinheit der DNA-Polymerase III (Sakakibara und Mizukami, 1980), und *recF*, steht im Zusammenhang mit der Rekombination (Armengod und Lambies, 1986), gehören. Das nachfolgende Gen *gyrB* kodiert für die β -Untereinheit der DNA-Gyrase (Hansen und von Meyenburg, 1979), gehört aber wahrscheinlich nicht mehr zur Transkriptionseinheit, da ein gemeinsames Transkript von *dnaA*, *dnaN*, *recF* und *gyrB* bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Das *dnaA* Gen ist autoreguliert (Atlung et al., 1985; Braun et al., 1985; Kücherer et al., 1986; Wang und Kaguni, 1987) und zusätzlich an der Regulation verschiedener Proteine beteiligt. DnaA kann sowohl die Transkription aktivieren (*nrd*, Operon für zwei Ribonukleosid Diphosphat Reduktasen (Augustin et al., 1994), *glpD*, aerobe Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (Messer und Weigel, 1996)); als auch reprimieren (*mioC*, modulation of initiation at qriC (Skarstad und Boye, 1994), *rpoH*, Hitzeschockfaktor σ^{32} (Wang und Kaguni, 1989)).

Das *dnaA* Operon wird von zwei Promotoren aus transkribiert, welche 239 Bp bzw. 157 Bp vor der kodierenden Sequenz lokalisiert sind (Hansen et al., 1982b). Zwischen den Promotoren befinden sich zwei DnaA-Boxen. Durch Bindung von DnaA an die DnaA-Boxen kommt es zu einer Reprimierung der Expression, aber erst die Bindung von DnaA an zusätzliche ATP-DnaA-Boxen im Promotor führt zu einer vollständigen Repression der Transkription (Speck et al., 1999).

Der Leserahmen vom *dnaA* Gen umfaßt 1401 Nukleotide, die für ein basisches Protein von 467 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 52,5 kDa

kodieren (Hansen et al., 1982a). In löslicher Form liegt das Protein als Monomer vor (Schaper und Messer, 1995). DnaA bindet sowohl ATP als auch ADP mit hoher Affinität. Die Dissoziationskonstanten liegen bei 30 nM für ATP und bei 100 nM für ADP (Sekimizu et al., 1987). Beide Nukleotidformen können spezifisch DNA binden. Während der Replikation ist nur die ATP-Form aktiv. Die Inaktivierung des Proteins erfolgt durch Hydrolyse des ATPs zu ADP.

Das DnaA-Protein interagiert mit der *oriC*-Region durch Bindung an die DnaA-Boxen (Chakraborty et al., 1982; Fuller et al., 1984). DnaA bindet als Monomer und induziert dabei eine Krümmung der DNA um 40° (Schaper und Messer, 1995). Der Kontakt findet mit beiden DNA Strängen statt (Speck et al., 1997). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für die Bindung an die DnaA-Boxen liegen im Bereich von 1 – 50 nM für die DnaA-Boxen R1, R2 und R4. (Schaper und Messer, 1995). Die Bindung an die DnaA-Boxen wird durch die flankierenden Bereiche moduliert. Bindung an die DnaA-Boxen R3 und M erfolgt *in vitro* nur bei hohen DnaA Konzentrationen (Matsui et al., 1985; Samitt et al., 1989). Als isolierte Oligomere stellen die DnaA-Boxen R3 und M keine Bindungsstellen dar (Schaper und Messer, 1995). Ihre Bedeutung konnte *in vivo* belegt und eine Interaktion von DnaA mit der DnaA-Box R3 zum Zeitpunkt der Initiation der Replikation nachgewiesen werden (Cassler et al., 1995).

Unter den Eubakterien ist sowohl die genetische Organisation als auch die Primärstruktur der DnaA-Proteine konserviert (Yoshikawa und Ogasawara, 1991; Yoshikawa und Wake, 1993). Auf der Basis von Sequenzhomologien konnte das Protein in 4 Domänen unterteilt werden (Fujita et al., 1990). Eine kurze N-terminale Domäne (Domäne I) mit gemäßigter Homologie ist gefolgt von einer Domäne, die in Sequenz und Aminosäurezusammensetzung sehr variabel ist (Domäne II). Die hochkonservierte Domäne III ist von der ebenfalls hochkonservierten Domäne IV durch einen Bereich mit geringerer Homologie getrennt. Die Unterteilung wurde durch Sekundärstrukturvorhersagen (Schaper und Messer, 1997; Sutton und Kaguni, 1997a) und vielfältige biochemische und genetische Studien verfeinert (Sutton und Kaguni, 1997b; Weigel et al., 1999; Guo et al., 1999). Aufgrund dessen erfolgte für *E. coli* DnaA eine Unterteilung in einzelne funktionelle Domänen (Abb. 3), die mit arabischen Nummern bezeichnet werden (Messer et al., 1999).

Die N-terminalen 86 Aminosäuren sind die Domäne 1 (Abb. 3). Diese Domäne bildet die Oligomerisierungsdomäne von DnaA (Weigel et al., 1999). Die Region

enthält ein potentielles Leucin-Zipper Motiv aus hydrophoben Aminosäuren, welches möglicherweise an der Oligomerisierung beteiligt ist. Die Domäne 1 wird nicht für das Entwinden der DNA *in vitro* benötigt, sondern ist eine davon unabhängige Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Sutton et al., 1998; Mima et al., 1999; Weigel et al., 1999).

Domäne 1 (aa 1-86)

```

      10           20           30           40
MSLSLWQQCLARLQDELPA TEFSMWIRPLQAELSDNTLAL
41           50           60           70           80
YAPNRFVLDWVRDKYLNNINGLLTSFCGADAPQLRFEVGT
81
KPVTQT

```

Domäne 2 (aa 87-134)

```

      90           100          110          120
      PQA AVTSNVAAPAQVAQTQPQRAAPSTRSGWDNV
121          130
PAPAEPTYRSNVNVK

```

Domäne 3 (aa 135-373)

```

      140          150          160
      HTFDNFVEGKSNQLARAAARQVADN
161          170          180          190          200
PGGAYNPLFLYGGTGLGKTHLLHAVGNGIMARKPNAKVVY
201          210          220          230          240
MHSERFVQDMVKALQNNAIIEFKRYRSVDALLIDDIQFF
241          250          260          270          280
ANKERSQEEFFHTFNALLEGNQIILTSDRYPKEINGVED
281          290          300          310          320
RLKSRFGWGLTVAIEPPELETRVAILMKKADENDIRLPGE
321          330          340          350          360
VAFFIAKRLRSNVRELEGALNRVIANANFTGRAITIDFVR
361          370
EALRDLLALQEKL

```

Domäne 4 (aa 374-467)

```

      380          390          400
      VTIDNIQKTVAEYKIKVADLLSKRRS
401          410          420          430          440
RSVARPRQMAMALAKELTNHSLPEIGDAFGGRDHTTVLHA
441          450          460          467
CRKIEQLREESHDIKEDFSNLIRT LSS

```

Abb. 3: Aminosäuresequenz und Domänenstruktur von *E. coli* DnaA. Die Einteilung der Domänen erfolgte aufgrund von Funktionalität. Die Sekundärstrukturanalyse nach Schaper & Messer (1995) ist wie folgt angegeben: gelb: α -Helix, blau: β -Faltblatt, grün: keine Vorhersage.

Das *E. coli* DnaA-Protein toleriert Insertionen und Deletionen in der Domäne 2 (aa 87-134, s. Abb. 3) ohne einen Verlust an Funktionalität. *dnaA216* (DnaA[1-85,105-467]) mit einer Deletion in Domäne 2 ist funktionell nicht von wtDnaA zu unterscheiden. Der größte Teil von Domäne 2 ist vermutlich eine flexible Linker-Region.

Die Domäne 3 (aa 135-373) besitzt eine 'open twisted $\alpha\beta$ -Struktur', die in Nukleotid-bindenden Proteinen häufig vorkommt (Schaper und Messer, 1997). Das Nukleotid-bindende Motiv gehört zum 'Rossmann fold' bzw. P-Loop Typ (Rossmann et al., 1974; Saraste et al., 1990). Mutationen in diesem Motiv reduzieren die ATP-Bindeaktivität (Kaguni und Hwang, 1988; Carr und Kaguni, 1996; Lu et al., 1998; Mizushima et al., 1998; Skovgaard et al., 1998). Ein Antikörper, der gegen die Aminosäuren 111-148 gerichtet ist, verhindert die Interaktion von DnaA mit DnaB (Marszalek und Kaguni, 1994). Eine direkte Interaktion von DnaA (aa 130-219) mit DnaB wurde mit 'Surface Plasmon Resonanz' Messungen nachgewiesen (Sutton et al., 1998). Daraus ergibt sich, dass die Aminosäuren 130-148 an einer DnaA-DnaB Interaktion beteiligt sind. Eine kurze Subdomäne mit unbekannter Funktion, die bei Transkriptionsfaktoren der NtrC-Familie konserviert ist, findet sich auch bei DnaA (Roth und Messer, 1995). DnaA vollzieht strukturelle Umlagerungen nach der Bindung von ATP (Kubota et al., 1997). Die Hydrolyse von ATP ist wichtig für die Regulierung des Initiationsprozesses (Kaguni, 1997; Mizushima et al., 1997). Am Ende der Initiation wird DnaA durch die Stimulierung der ATPase-Aktivität durch die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III inaktiviert (Katayama et al., 1998). ATP-DnaA kann durch einen Nukleotidaustausch regeneriert werden. Am Ende von Domäne 3 befindet sich eine Region (aa 357-374) die mit Membrankomponenten wie sauren Phospholipiden wie z.B. Cardiolipiden interagiert und dabei den Nukleotidaustausch stimuliert (Garner und Crooke, 1996; Yamaguchi et al., 1999).

Die Domäne 4 (aa 374-467) besteht aus den 94 C-terminalen Aminosäuren und bildet die minimale DNA Bindungsdomäne von DnaA (Roth und Messer, 1995). Das DNA-Bindemotiv besteht aus zwei amphipatischen Helices mit einem basischen Loop dazwischen und einer dritten langen α -Helix (Schaper und Messer, 1997). Mutationen, die zu einer reduzierten DNA Bindung führen, finden sich in der gesamten Domäne 4 (Sutton und Kaguni, 1997c; Blaesing et al., 1999). Die Affinität von DnaA zu den DnaA-Boxen R1 und R4 ist höher als zu der DnaA-Box R2 von *E. coli oriC*. Mutationen zwischen Aminosäure 432-436 kehren die Präferenz um

(Blaesing et al., 1999) und ein Austausch von Aminosäure Threonin 435 gegen Methionin führt zu einer unspezifischen DNA Bindung (Sutton und Kaguni, 1997c). Die Region (aa 432-436 von DnaA) ist wahrscheinlich an der spezifischen DNA Bindung beteiligt.

1.5 Die replikative Helikase DnaB von *Escherichia coli*

Zum ersten Mal beschrieben wurden Helikasen vor über 20 Jahren (Abdel-Monhem et al., 1976; Scott et al., 1977). Helikasen sind Enzyme, die unter NTP-Hydrolyse doppelsträngige DNA, RNA oder DNA-RNA Hybride aufschmelzen. Helikasen sind an vielen zellulären Stoffwechselfvorgängen wie DNA Replikation, Reparatur und Rekombination sowie Transkription und Translation beteiligt (Matson und Kaiser-Rogers, 1990; Lohman und Bjornson, 1996). In jedem dieser Prozesse destabilisiert die Helikase die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen. Während der Aufschmelzreaktion wird das NTP hydrolysiert. Eng verknüpft mit der Aufschmelzreaktion ist eine Translokation der Helikase auf dem Template mit bis zu $500-1000 \text{ Bp s}^{-1}$ (Moore und Lohman, 1995). Helikasen wurden sowohl in Eukaryonten und Prokaryonten als auch in Bakteriophagen und Viren identifiziert (Matson, 1991). Viele Organismen besitzen mehrere Helikasen. Für *E. coli* wurden mindestens 12 Helikasen (Matson et al., 1994) und für *S. cerevisiae* mindestens 6 Helikasen identifiziert (Li et al., 1992). Helikasen spielen auch bei einigen menschlichen Erbkrankheiten eine Rolle. So führen Mutationen im *ERCC2* Gen zu *Xeroderma Pigmentosum* (Johnson und Squires, 1992), ein homologes Protein der *E. coli* RecQ-Helikase ist wahrscheinlich am Bloom's Syndrom (erhöhte Rate der Krebsbildung) beteiligt (Ellis et al., 1995) und das Werner Syndrom (vorzeitiges Altern) ist ebenfalls auf eine defekte Helikase zurückzuführen (Yu et al., 1996).

DnaB ist die replikative Helikase von *E. coli* (Wickner et al., 1974; McMacken et al., 1977; Reha-Krantz und Hurwitz, 1978; Kornberg und Baker, 1992) und entwindet die doppelsträngige DNA an der Replikationsgabel in 5'→3' Richtung, bezogen auf den DNA-Strang auf den die Helikase geladen wurde (LeBowitz und McMacken, 1986; Baker et al., 1987). DnaB gehört der gleichen Helikasefamilie an wie T4 DNA Helikase, T7 DNA Helikase und SV40 T-Antigen (Dean et al., 1992; Dong et al., 1995; Dong und von Hippel, 1996). DnaB dient als Modell, um die Mechanismen der verschiedenen enzymatischen Reaktionen und Protein-Interaktionen zu charakterisieren.

Das *E. coli dnaB*-Gen kodiert für ein Protein von 471 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 52,5 kDa (Ueda et al., 1978; Arai et al., 1981; Nakayama et al., 1984). DnaB bildet DnaB₆ Homohexamere (Reha-Krantz und Hurwitz, 1978) durch Trimerisierung von Dimeren (San Martin et al., 1995). Das Hexamer besitzt eine ringförmige Struktur (Bujalowski et al., 1994; San Martin et al., 1995) mit einem zentralen Kanal. Analog zur *E. coli* RuvB Helikase (Stasiak et al., 1994) und zur gp4 Helikase vom Bakteriophagen T7 (Egelman et al., 1995) wird die ssDNA durch den zentralen Kanal transloziert (Bujalowski und Jezewska, 1995). Im Cytoplasma liegt DnaB komplexiert mit DnaC als Heterohexamer DnaB₆C₆ vor (Lanka und Schuster, 1983). Sowohl DnaB als auch DnaB₆C₆ binden sehr ineffizient Einzelstrang-DNA, die mit dem SSB-Protein bedeckt ist (Arai und Kornberg, 1979). In Gegenwart von DnaA zeigt DnaC eine kryptische ssDNA Bindeaktivität im DnaBC-Komplex (Learn et al., 1997). Die Helikaseaktivität von DnaB wird nach dem Laden auf Einzelstrang-DNA und Dissoziation von DnaC aktiviert (Marians, 1996).

Selektive Proteolyse von DnaB ergibt zwei Fragmente, die durch einen flexiblen Loop verbunden sind (Nakayama et al., 1984). Das kleinere N-terminale Fragment (aa 14-130) ist wichtig für die Hexamerisierung von DnaB (Nakayama et al., 1984) interagiert aber wahrscheinlich nicht mit DnaC (Weigelt et al., 1999). An der Interaktion mit DnaC sind die Aminosäuren um Position 140 beteiligt (Dixon, 1999). Das Nukleotid-Bindemotiv, die Dimerisierungsdomäne und das ssDNA-Bindemotiv befinden sich auf dem C-Terminus von DnaB (aa 172-471) (Kim et al., 1996; Lu et al., 1996). Subklonierung von DnaB in drei Fragmente (Fragment α : aa 1-156; β : aa 157-302; γ : aa 303-471, siehe Abb.: 4) zeigte, dass das β -Fragment eine vollständige ATPase Aktivität besitzt und im $\beta\gamma$ -Fragment die ATPase Aktivität durch ssDNA stimulierbar ist (Biswas und Biswas, 1999a; Biswas und Biswas, 1999b).

Das β -Fragment beinhaltet zusätzlich eine Mg²⁺ abhängige Dimerisierungsdomäne (Biswas und Biswas, 1999a), die Interaktionsdomäne mit der DnaG Primase (Lu et al., 1996) und mit den Initiatorproteinen π vom Plasmid R6K (aa 183-219 von DnaB) (Ratnakar et al., 1996) und RepA von pSC101 (aa 208-261 von DnaB) (Datta et al., 1999). Eine zweite Protein-Protein Interaktionsdomäne befindet sich auf dem γ -Fragment (Biswas und Biswas, 1999a). Mutationen im flexiblen Linker zwischen dem N-Terminus und dem C-Terminus resultieren in einem Protein mit einer reduzierten ATPase-Aktivität und reduzierter Primase Stimulierung (Stordal und Maurer, 1996).

α -Fragment (aa 1-156)

```

          10          20          30          40
MAGNKP FNKQQA EPRER DPQVAGL KVP PH S I EAEQS VLGG
41          50          60          70          80
LMLDNER WDDV AERVVADDF YTRPHRH I FTE MARLQE SGS
81          90          100         110         120
P I D L I T L A E S L E R Q G Q L D S V G G F A Y L A E L S K N T P S A A N I S
121         130         140         150
A Y A D I V R E R A V V R E M I S V A N E I A E A G F D P Q G R T S E D

```

 β -Fragment (aa157-302)

```

          160          170          180          190
      L L D L A E S R V F K I A E S R A N K D E G P K N I A D V L D A T V
191         200         210         220         230
A R I E Q L F Q Q P H D G V T G V N T G Y D D L N K K T A G L Q P S D L I I V A
231         240         250         260         270
A R P S M G K T T F A M N L V E N A A M L Q D K P V L I F S L E M P S E Q I M M
271         280         290         300
R S L A S L S R V D Q T K I R T G Q L D D E D W A R I S G T M G

```

 γ -Fragment (aa 303-471)

```

          310          320          330          340
      G I L L E K R N I Y I D D S S G L T P T E V R S R A R R I A R E H G G I G L I
341         350         360         370         380
M I D Y L Q L M R V P A L S D N R T L E I A E I S R S L K A L A K E L N V P V V
381         390         400         410         420
A L S Q L N R S L E Q R A D K R P V N S D L R E S G S I E Q D A D L I M F I Y R
421         430         440         450         460
D E V Y H E N S D L K G I A E I I I G K Q R N G P I G T V R L T F N G Q W S R F
461         471
D N Y A G P Q Y D D E

```

Abb. 4: Aminosäuresequenz und Domänenstruktur von *E. coli* DnaB. Die Einteilung erfolgte nach Biswas und Biswas 1999. Die Sekundärstrukturanalyse nach Fass et al. 1999 und Weigelt et al. 1999 für das DnaB α -Fragment ist wie folgt angegeben: gelb: α -Helix, rot: keine definierte Struktur. Für das β und das γ -Fragment liegen noch keine Strukturdaten vor.

Dreidimensionale Imagerekonstruktion von 'cryoelectron microscopy images' von DnaB₆C₆ und elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Zwei-Domänen Struktur von DnaB und zeigen einen direkten Kontakt zwischen DnaB und DnaC (San Martin et al., 1995; San Martin et al., 1998). Die NMR-Struktur und die Kristallstruktur vom DnaB N-Terminus zeigen eine globuläre Struktur mit einem hohen Helixanteil, der dimerisieren kann (Fass et al., 1999; Weigelt et al., 1999). Strukturdaten für das gesamte Protein liegen nicht vor.

Das Laden der Helikase auf die ssDNA ist ein komplexer Vorgang und bisher wenig untersucht. Bei der T7 DNA Helikase kann das Laden in 4 Schritte unterteilt werden (Patel, 1999). Zuerst findet ein Kontakt zwischen der DNA und der Außenseite der Helikase statt. In den folgenden Schritten öffnet sich das Hexamer und die DNA wird in den zentralen Kanal transportiert bevor sich der Ring wieder schließt (Patel, 1999). Ein ähnlicher Prozeß wird für das Laden der DnaB Helikase vermutet (Bujalowski und Jezewska, 2000). Die Struktur der Helikase (ein kleiner N-Terminus und ein großer C-Terminus) spiegelt die Polarität der Prozessivität wieder. Die Helikase bewegt sich auf der DNA in 5'→3' Richtung. Nach dem Laden zeigt der DnaB N-Terminus zum 5'-Ende der DNA (Bujalowski, 1999) und bildet die Austrittsstelle der DNA. Für die Helikaseaktivität ist ein intaktes DnaB notwendig. Welche Aminosäuren an der Helikaseaktivität beteiligt sind und wie die ATP-Hydrolyse in eine Translokation auf der DNA übertragen wird ist bis jetzt unklar.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Interaktion vom Initiatorprotein DnaA mit der replikativen Helikase DnaB während der Initiation der Replikation. Die Selbstinteraktion von DnaA ist zur Ausbildung des Initiationskomplexes und zum Aufschmelzen der DNA an der AT-reichen Region essentiell. Beim Laden der Helikase auf die aufgeschmolzene AT-reiche Region findet ein direkter Kontakt zwischen DnaA und DnaB statt. DnaA muß die Helikase zu der aufgeschmolzenen Region dirigieren und den aufgeschmolzenen Bereich stabilisieren. Nur durch das koordinierte Laden von 2 Helikasen ist eine bidirektionale Replikation möglich.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der Interaktion von DnaA mit DnaB. Die Domäne(n) beider Proteine für die Interaktion miteinander sollen identifiziert werden. Entsprechende *in vivo* Testsysteme sind zu etablieren und auf ihre Funktionalität hin zu testen. Zur näheren Charakterisierung der Interaktion von DnaA mit DnaA und mit DnaB sind ausgewählte DnaA und DnaB Derivate *in vitro* zu untersuchen.

Um die Interaktionsdomäne von DnaB mit DnaA zu identifizieren, sollte die Fähigkeit von DnaB zur Suppression des kälte-sensitiven Wachstums des *dnaA219*-Allels ausgenutzt werden. Für die Inhibierung der Initiation ist eine direkte Interaktion von DnaB mit DnaA Voraussetzung. Zur Untersuchung der DnaA Domänen, die am Laden der Helikase beteiligt sind, sollen *in vivo* Tests etabliert werden. Dabei soll die Helikaseladeaktivität von DnaA von anderen Funktionen, in die DnaA während der Initiation involviert ist, getrennt untersucht werden. Die identifizierten DnaA-DnaB Interaktionsdomänen sollen dann von anderen Interaktionsdomänen von DnaA, insbesondere die für die DnaA-DnaA Interaktion, abgegrenzt werden.

Die zweite Zielsetzung der Arbeit befaßt sich mit dem Laden der Helikase durch DnaA am *oriC*. Ein besonderes Interesse gilt dabei der durch DnaA vermittelten Strangspezifität der Helikase.

