

5. Zusammenfassung

Beim DnaA Protein handelt sich um das zentrale Initiatorprotein der bakteriellen Replikation. DnaA bindet spezifisch an seine Erkennungssequenz im *oriC*. Dies führt zur Ausbildung des Initiationskomplexes und zur lokalen Entwindung der DNA im linken Bereich von *oriC*. Auf die aufgeschmolzene Region werden zwei Helikasen geladen, was zur Etablierung einer bidirektionalen Replikation führt.

Ziel der Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der Interaktionsdomänen vom Initiatorprotein DnaA mit der replikativen Helikase DnaB und die Aufklärung des DnaA vermittelten Ladens der Helikase am *oriC*.

Mit Hilfe des Cos-Suppressions Tests konnte zunächst eine Region von DnaB (aa 203-213) identifiziert werden, die im Kontext mit den benachbarten Aminosäuren (DnaB[154-206] bzw. DnaB[203-471]) die Initiation der Replikation, gemessen als Wachstum bei 30 °C, inhibiert. Die Suppression der Initiation ist wahrscheinlich auf direkte Interaktion von DnaB mit DnaA zurückzuführen.

Ein *in vivo* Test, bei dem das Aufschmelzen der DNA vom Laden der Helikase abgekoppelt ist, wurde benutzt um Regionen von DnaA zu identifizieren, die am Laden der Helikase beteiligt sind. Die DnaA Domänen 1 (aa 24-86), 3 (aa 135-373) und Domäne 4 (aa 374-467) sind für das Laden der Helikase essentiell. Mutationen innerhalb von Domäne 3, die zu einem Verlust der Nukleotidbindfähigkeit von DnaA führen, aber nicht die Struktur der Domäne verändern, sind in der Lage die Helikase zu laden.

Solid-Phase Protein Binding Assays zeigen, dass DnaA und DnaB direkt miteinander interagieren. Die Interaktion ist unabhängig von einer DNA Bindung von DnaA oder DnaB. Beide Proteine besitzen zwei Interaktionsdomänen füreinander. Der DnaA N-Terminus (aa 24-86) interagiert mit DnaB (aa 203-213) und die DnaA Domäne 3 (aa 130-149) mit dem DnaB α -Fragment (aa 1-156). Bei der Interaktion vom DnaA N-Terminus (aa 24-86) mit DnaB (aa 203-213) handelt es sich um die primären Interaktionsdomänen der Proteine. Die DnaA Domäne 4 ist nicht direkt an einer Interaktion mit DnaB beteiligt.

Zur Ausbildung des Initiationskomplexes am *oriC* von *E. coli* und am Origin vom pSC101 ist eine DnaA-DnaA Interaktion notwendig. Die Selbstinteraktion von DnaA findet über den DnaA N-Terminus (aa 1-77) statt und überlappt mit der primären Interaktionsdomäne von DnaA mit DnaB. Die Selbstinteraktionsdomäne und die minimale DNA-Bindedomäne von DnaA sind notwendig und hinreichend um

einen DnaA-RepA spezifischen Komplex am Replikationsorigin vom pSC101 auszubilden. Bei der DnaA-DnaA Interaktion über den N-Terminus handelt sich um eine 'long-range Interaktion'.

Das Laden der Helikase wurde *in vitro* an einem artifiziellen Substrat, das den aufgeschmolzenen *oriC* simuliert, und mit dem FI*-Test untersucht. Ein DnaA Monomer ist ausreichend um die Helikase auf einen benachbarten Einzelstrang zu laden. DnaA, das an die DnaA-Box R1 im *oriC* gebunden hat, lädt *in vitro* die Helikase auf den unteren DNA Strang. Das Laden der Helikase ist unabhängig von der Sequenz der einzelsträngigen DNA. Die Helikase für den anderen DNA Strang wird von einer anderen DnaA-Box im *oriC*, vermutlich der DnaA-Box R2, geladen.

