

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Replikation	1
1.2	Der Replikationsorigin <i>oriC</i> von <i>Escherichia coli</i>	1
1.3	Der Replikationsprozeß von <i>Escherichia coli</i>	3
1.4	Das Initiatorprotein DnaA von <i>Escherichia coli</i>	6
1.5	Die replikative Helikase DnaB von <i>Escherichia coli</i>	10
1.6	Aufgabenstellung	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Enzyme und Proteine	16
2.1.3	Sonstiges Material, Geräte	17
2.1.4	Puffer und Medien	18
2.1.5	Verwendete Stämme	20
2.1.6	Plasmide und Vektoren	21
2.2	Methoden	27
2.2.1	Allgemeine Molekularbiochemische Techniken	27
2.2.1.1	Wachstum von Bakterienkulturen, Herstellung von Glycerinkulturen	27
2.2.1.2	Herstellung von kompetenten Zellen (TSS-Methode)	27
2.2.1.3	Herstellung von kompetenten Zellen (RuCl-Methode)	27
2.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	28
2.2.1.5	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.2.1.6	Präparative DNA-Isolierung	29
2.2.1.7	Ethanolpräzipitation von DNA	30
2.2.1.8	Agarosegelelektrophorese	30
2.2.1.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	31
2.2.1.10	Restriktion von DNA	31
2.2.1.11	Behandlung mit T4-Polymerase und Klenow-Enzym	31
2.2.1.12	Behandlung mit Mung-Bean Nuklease	32

2.2.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.2.1.14	Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
2.2.1.15	Long-range PCR	33
2.2.1.16	DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing	34
2.2.2.	Proteinbiochemische Techniken	36
2.2.2.1	Reinigung des DnaA-Proteins von <i>E. coli</i>	36
2.2.2.2	Reinigung von DnaB und DnaC von <i>E. coli</i>	37
2.2.2.3	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	39
2.2.2.4	Proteinschnellaufschluß	39
2.2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.2.2.6	Western Blot (semi-dry Methode)	41
2.2.2.7	Immunodetektion von Proteinen	41
2.2.2.8	Nachweis von biotinylierten Proteinen	42
2.2.2.9	Gelretardierung von Protein-DNA Komplexen	42
2.2.2.10	Herstellung von Zellrohextrakt	42
2.2.2.11	'Solid-Phase Protein Binding Assay' (SPP-Test)	43
2.2.2.12	Suppression des kälte-sensitiven Phänotypes von <i>dnaA219</i> (Cos-Suppressions Test)	44
2.2.2.13	Replikation von pSC101 in einem <i>dnaA</i> (Null) Stamm (pSC101-Test)	44
2.2.2.14	DnaA abhängiges Laden der DnaB-Helikase <i>in vivo</i> (pYTC-Test)	45
2.2.2.15	Fl*-Test	46
2.2.2.16	DnaA-abhängiges Laden der DnaB-Helikase <i>in vitro</i>	49
2.3	Oligonukleotide	51
3.	Ergebnisse	54
3.1	Klonierungen	54
3.1.1	Plasmide, die DnaB oder DnaB Derivate exprimieren	55
3.1.2	Plasmide, die DnaA oder DnaA Derivate exprimieren	56
3.2	Untersuchungen zur Interaktion von DnaA und DnaB	58
3.2.1	Suppression von <i>dnaA219</i> (Cos) durch DnaB	59
3.2.2	DnaA-abhängiges Laden der Helikase <i>in vivo</i>	61

3.2.3	Solid-Phase Protein Binding Assay's	64
3.2.3.1	DnaA – DnaA Selbstinteraktion <i>in vitro</i>	65
3.2.3.2	DnaA – DnaB Interaktion <i>in vitro</i>	67
3.2.4	Replikation von pSC101	69
3.3	Untersuchungen zum Laden der Helikase	73
3.3.1	Laden der Helikase auf eine AT-reiche Region	73
3.3.2	Laden der Helikase auf ein artifizielles Substrat	76
4.	Diskussion	82
4.1	Interaktion von DnaA und DnaB	82
4.1.1	Interaktion von DnaB mit DnaA führt zur Suppression des kälte-sensitiven Phänotypes von <i>dnaA219</i>	82
4.1.2	DnaA Domäne 1, 3 und 4 sind für das Laden der Helikase essentiell	83
4.1.3	DnaA und DnaB besitzen zwei Interaktionsdomänen	84
4.2	Selbstinteraktion von DnaA	87
4.2.1	DnaA oligomerisiert über den N-Terminus	87
4.2.2	pSC101 Replikation benötigt DnaA Domäne 1 und 4	88
4.3.1	DnaA abhängiges Laden der DnaB Helikase ist nicht sequenzspezifisch	90
4.3.2	Die DnaA-Box R1 im <i>oriC</i> lädt die Helikase auf den unteren Strang	91
5.	Zusammenfassung	94
6.	Summary	96
7.	Literatur	98
8.	Abkürzungen	110