

3. Ergebnisse

Auf Grund der umfangreichen Klonierungen und zur besseren Übersichtlichkeit werden die klonierten DnaA und DnaB Derivate am Anfang beschrieben. Die Expression der Proteine ist IPTG induzierbar. Daraus ergeben sich zwei Vorteile: i) die Expression der Proteine bzw. die Konzentration der Proteine bei gleicher Induktion (IPTG-Konzentration) ist vergleichbar und ii) der $p_{A1-04/03}$ Promotor läßt sich 'schrittweise' regulieren.

Die Experimente lassen sich unter zwei Punkten zusammenfassen. Im ersten Teil geht es um die Interaktion des Initiatorproteins DnaA mit der replikativen Helikase DnaB *in vivo* und *in vitro*. Die Eingrenzung möglicher Interaktionsdomänen von DnaA und DnaB wurde *in vivo* durchgeführt und an einigen ausgewählten Mutanten *in vitro* verifiziert. Dabei gelang es die Interaktionsdomänen von beiden Proteinen zu identifizieren und von anderen Domänen, insbesondere der DnaA-DnaA Selbstinteraktionsdomäne, abzugrenzen. Der zweite Teil der Experimente befaßt sich mit dem eigentlichen Laden der Helikase, was ein entscheidender Schritt für die Etablierung der Replikationsgabeln ist. Für eine bidirektionale Replikation ist es notwendig, zwei Helikasen zu laden. Mit Hilfe eines *in vitro* Ansatzes wurde das Laden der Helikase an einem künstlichen Substrat untersucht.

3.1 Klonierungen

Ein entsprechendes DnaA bzw. DnaB Konstrukt wurde als erfolgreich kloniert bezeichnet (z. B. keine Mutationen, die durch die PCR-Reaktion verursacht werden), wenn über 90% der Klone identische Ergebnisse in folgenden Tests lieferte: i) richtige Banden im Agarosegel nach der Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzym(en), ii) Expression eines Polypeptides mit der entsprechenden Größe, iii) Detektion mit einem entsprechenden Antikörper gegen DnaA, DnaB bzw. den Biotin-tag. Ein richtiger Klon von den konstruierten DnaA und DnaB Derivaten wurde zusätzlich mit einigen der nachfolgenden Kriterien charakterisiert: i) Sequenzierung der klonierten DNA sowohl bei Punktmutationen als auch bei Deletionen zur Vermeidung von Leserahmen-Verschiebungen, ii) Giftigkeit nach der Überexpression in WM1963 (XL-I Blue), iii) DNA Bindung der exprimierten DnaA Derivate *in vitro* mit dem Solid-Phase DNA Binding Assay (Roth und Messer, 1995) oder *in vivo* als Repression der β -Galaktosidaseaktivität mit

einem Stamm, der entweder eine chromosomale *dnaAp::lacZ* (Braun et al., 1985) oder eine *mioCp::lacZ* Fusion (Blaesing et al., 1999) enthält.

DnaA Derivate können durch eine *EcoRI* – *HindIII* Restriktion aus dem Expressionsvektor pdnaA116 (pLEX5BA::*dnaA*) herausgeschnitten, in den Expressionsvektor pbiodnaA116 (pBEX5BA::*dnaA*) überführt und mit einem N-terminalem Biotin-tag exprimiert werden. Auf Grund der Einfachheit der Umklonierung ist jeweils nur eine Klonierung in pLEX5BA oder pBEX5BA beschrieben.

3.1.1 Plasmide, die DnaB oder DnaB Derivate exprimieren.

Für die Amplifikation von *dnaB*-Sequenzen wurde WM1963 oder pPS562 als Template verwendet. WM1963 trägt chromosomal das *wtdnaB* Gen und das Plasmid pPS562 besitzt ebenfalls die kodierende Region von *wtdnaB*. Die Zahlen in den eckigen Klammern geben die exprimierten DnaB Aminosäuren an. Die Bezeichnung „bio“ gibt an, ob sich das Fusionspeptid (Biotin-tag) mit der Erkennungssequenz für das *E. coli* Enzym Biotin-Ligase am N-Terminus oder am C-Terminus der entsprechenden DnaB Mutante befindet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 (2.3) aufgeführt. Als Klonierungsvektoren wurden pLEX5BA und pBEX5BA verwendet.

pbioDnaB[1-471]: Die Amplifikation der gesamten *dnaB*-Sequenz erfolgte mit den Oligonukleotiden #3 + #4. Nach der Restriktion des PCR-Produktes mit *NsiI* und *HindIII* wurde das Fragment in den *PstI* – *HindIII* geschnittenen Vektor pBEX5BA ligiert. **pDnaB[154-471]:** Der DnaB C-Terminus wurde durch Amplifikation mit den Primern #4 + #5 erhalten. Das PCR-Fragment wurde nach der Restriktion mit *BamHI* und *HindIII* in den Vektor pBEX5BA (*BamHI* + *HindIII*) ligiert. **pDnaB[1-156]-bio:** wurde durch eine Zweischrirklonierung erhalten. Der DnaB N-Terminus wurde durch Amplifikation mit den Primern #6 + #7 erhalten. Das überstehende 3'-Ende des PCR-Fragmentes nach der Restriktion mit *NsiI* wurde mit T4-Polymerase entfernt und das Fragment mit *BamHI* nachgeschnitten. Das Fragment wurde in den *XmnI* – *BamHI* geschnittenen pLEX5BA ligiert. Mit Hilfe der Oligonukleotide #8 + #9 und pBEX5BA als Template wurde der Biotin-tag amplifiziert und das PCR-Produkt mit den Enzymen *SalI* – *HindIII* geschnitten und am 3'-Ende des *dnaB*-Fragmentes in den ebenfalls *SalI* – *HindIII* geschnittenen Vektor pDnaB[1-156] ligiert. **pbioDnaB[154-301]:** Das Plasmid pbioDnaB[154-471] wurde mit den

Restriktionsenzymen *NcoI* + *HindIII* geschnitten und mit T4-Polymerase behandelt, um 'blunt ends' zu erhalten, und religiert. Der Leserahmen enthält am DnaB C-Terminus 8 zusätzliche Aminosäuren. **pbioDnaB[301-471]**: Durch Restriktion des Plasmides pbioDnaB[154-471] mit *NcoI* + *BamHI*, Behandlung mit T4-Polymerase und anschließender Religation erhielt man das gewünschte Konstrukt. **pbioDnaB[154-206]**: Das durch Amplifikation mit den Oligonukleotidem #10 und #11 erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* + *HindIII* geschnitten und in den gleichfalls *BamHI* + *HindIII* geschnittenen Vektor pBEX5BA ligiert. **pbioDnaB[203-471]**: erhielt man durch die Restriktion des Plasmides pbioDnaB[154-471] mit *PflMI* und anschließender T4-Polymerase Behandlung. Nach der Hitzeinaktivierung der Enzymes wurde das Plasmid mit *BglII* geschnitten, mit Klenow-Fragment in der Gegenwart von dNTP's inkubiert und religiert. **pbioDnaB[214-471]**: Das LR-PCR Produkt der Oligonukleotide #12 + #13 wurde mit dem Restriktionsenzym *BamHI* geschnitten und religiert. **pbioDnaB[156-174]**: Die Oligonukleotide #14 + #15 wurden hybridisiert, überhängende Enden aufgefüllt und nach der Restriktion mit *BamHI* + *HindIII* in den *BamHI* + *HindIII* geschnittenen Vektor pBEX5BA ligiert. **pbioDnaB[182-206]**: Die Oligonukleotide #16 + #17 wurden hybridisiert, überhängende Enden aufgefüllt und nach der Restriktion mit *BamHI* + *HindIII* in den *BamHI* + *HindIII* geschnittenen Vektor pBEX5BA ligiert.

3.1.2 Plasmide, die DnaA oder DnaA Derivate exprimieren.

Für die Amplifikation von *dnaA*-Sequenzen wurde WM1963 oder pdnaA116 als PCR-Template verwendet. WM1963 trägt chromosomal das *wtdnaA* Gen und das Plasmid pdnaA116 besitzt ebenfalls die kodierende Region des *wtdnaA* Gens. Die Zahlen in den eckigen Klammern geben die exprimierten Aminosäuren von DnaA bzw. den Aminosäureaustausch bei Punktmutationen an. Die Bezeichnung „bio“ gibt an, ob sich das Fusionspeptid mit der Erkennungssequenz für das *E.coli* Enzym Biotin-Ligase (Biotin-tag) am N-Terminus oder am C-Terminus der entsprechenden DnaA Mutante befindet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 (2.3) aufgeführt. Als Klonierungsvektoren wurden pLEX5BA und pBEX5BA verwendet.

Wildtyp *E. coli* DnaA wurde vom Plasmid pdnaA116 (2.2.1.2 Plasmide und Vektoren) exprimiert. **pDnaA[1-130,149-467]**: Das PCR-Produkt, welches mit den Oligonukleotiden #18 + #19 erhalten wurde, wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *PmeI* geschnitten. Das PCR-Produkt der

Oligonukleotide #20 + #21 wurde mit *XbaI* und *NsiI* geschnitten. Das Plasmid pdnaA116 wurde mit den Restriktionsenzymen *PmeI* und *NsiI* geschnitten und die beiden PCR-Produkte mit dem Vektor ligiert. **pDnaA[1-467,K178A]**: Das LR-PCR Produkt der Oligonukleotide #22 + #23 wurde mit T4-Polymerase behandelt und ligiert. Eine Mutation (G→T Transversion Pos. 582 gemäß pdnaA116 Sequenz), die nicht zu einem Aminosäureaustausch führt, wurde eingeführt, um den gewünschten Klon vom Ausgangsvektor leichter unterscheiden zu können. **pDnaA[1-363]**: Das LR-PCR Produkt der Oligonukleotide #24 + #25 wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten und ligiert. **pDnaA[1-87,374-467]**: Das LR-PCR Produkt der Oligonukleotide #26 + #27 wurde mit dem Restriktionsenzym *XmaI* geschnitten und ligiert. **pDnaA[1-87,bio,374-467]**: Als Template für die PCR wurde pdnaA116::Biotin-tag (Schaper und Messer, 1997) verwendet. Das LR-PCR Produkt der Oligonukleotide #27 + #28 wurde mit *XmaI* geschnitten und zur Entfernung überstehender 5'-Enden mit Mung Bean Nuclease inkubiert und anschließend ligiert. Das exprimierte Protein hat den Biotin-tag zwischen Domäne 1 und 4 von DnaA. **pDnaA[1-69,87-467]**: Das PCR-Produkt der Oligonukleotide #29 + #30 wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *PstI* geschnitten und in den *SaII* und *PstI* geschnittenen Vektor pDnaA[87-467] ligiert. **pDnaA[87-467]**: Ein PCR-Produkt amplifiziert mit den Primern #41 + #42, wurde *NsiI* geschnitten, mit T4 DNA Polymerase behandelt, mit *HindIII* geschnitten und in den *XmnI* und *HindIII* geschnittenen Vektor pLEX5BA ligiert. Das exprimierte Protein beginnt mit Met1 und fünf zusätzlichen Aminosäuren vor dem Prolin 87 von DnaA. **pDnaA[1-333]**: erhielt man durch Deletion der *dnaA* Sequenz downstream der einzigen *BsaAI*-site (Pos. 1979; GenBank accession JO1602) von pdnaA116. **pDnaA[1-136,374-467]**: Das PCR-Produkt, amplifiziert mit den Oligonukleotiden #31 + #32, wurde *AflIII* – *HindIII* geschnitten und in pdnaA116 ligiert. Der Vektor wurde vorher mit *HindIII* linearisiert und ein partieller *AflIII* Verdau durchgeführt. **pDnaA[1-136,332-364]**: Das PCR-Produkt der Oligonukleotide #25 + #37 wurde mit den Restriktionsenzymen *AflIII* – *HindIII* geschnitten und in einen wie oben beschrieben partiell *AflIII* – *HindIII* geschnittenen pdnaA116 ligiert. **pDnaA[1-467,K178A,T179L]**: Die zwei PCR-Produkte, amplifiziert mit den Primern #33 + #35 und #34 + #36 und pUdnaAEco (Blaesing et al., 1999) als Template, wurden hybridisiert und mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt. Das Produkt wurde *EcoRI* und *HindIII* geschnitten und in den ebenfalls *EcoRI* – *HindIII* geschnittenen pdnaA116 ligiert.

p_{bio}DnaA[1-77]: Das LR-PCR Produkt der Primer #24 + #38 und Plasmid p_{bio}DnaA[1-467] als Template wurde mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten und religiert. **pDnaA[1-467,L233P]**: Eine C zu T Mutation an Position 697 (Positionsangabe bezieht sich auf GenBank Accession JO1602) wurde durch eine gerichtete Mutagenese mit dem Primer #46 in M13mp8::*dnaA* eingeführt und resultiert in einem Prolin an Aminosäureposition 233 anstelle eines Leucins. Anschließend wurde das *Eco*RI – *Hind*III Fragment zurück in den p_{dna}A116 kloniert. **p[DnaA/DnaC]**: wurde in einer Zwei-Schritt Klonierung erhalten, wobei die DnaA Aminosäuren 134-297 gegen die DnaC Aminosäuren 66-234 ausgetauscht wurden. Das PCR-Produkt der Primer pLEX5BA forw. + #43 und p_{dna}A116 als Template wurde *Eco*RI und *Sac*I geschnitten und in das *Eco*RI und *Sac*I geschnittene pLEX5BA::*dnaA*212 (DnaA-Derivat mit einer zusätzlichen *Sac*I-Restriktionsschnittstelle (Weigel et al., 1999)) ligiert. Mit den Primern #44 + #45 und XI-1 Blue als Template wurden die DnaC Aminosäuren 66-234 amplifiziert. Das Plasmid pLEX5BA::*dnaA*[1-133,298-467] (Produkt des ersten Schrittes) wurde *Sa*II und *Sac*I geschnitten und das *Xho*I und *Sac*I geschnittene PCR-Produkt 2 in das Plasmid ligiert.

pDnaA[24-467], **pDnaA[1-24,33-467]**, **pDnaA508[1-467,P28L,T80I]**, **pDnaA216[1-86,105-467]**, **pDnaA [λ cl/Eco]**, **p_{bio}DnaA[1-136,329-467]** sind in Weigel, Schmidt et al. 1999 beschrieben, **pDnaA[Eco/Bsu]** und **pDnaA[Bsu/Eco]** sind in Krause und Messer 1999 und **pDnaA[1-86,6xHis,135-467]** ist in Schaper und Messer 1997 beschrieben.

3.2 Untersuchungen zur Interaktion von DnaA und DnaB

Im folgenden sollte versucht werden, die Interaktion von DnaA und DnaB näher zu charakterisieren. Während des Ladens der Helikase am *oriC* ist eine Interaktion von DnaA mit DnaB notwendig. Ein DnaA spezifischer Antikörper (Erkennungsepitop aa 111-148 von DnaA) verhindert diese Interaktion *in vitro* (Marszalek und Kaguni, 1994). Mit Hilfe von „Surface Plasmon Resonanz Messungen“ war es möglich, diese Region auf den Bereich von Aminosäuren 130-148 von DnaA einzugrenzen (Sutton et al., 1998).

DnaB ist nicht nur die replikative Helikase für die chromosomale Replikation, auch viele Phagen, z.B. λ (Klein et al., 1980) und Plasmide wie pSC101, R6K (Ratnakar et al., 1996) benötigen DnaB für die Replikation. Für einige an der

Initiation beteiligte Phagen- bzw. Plasmidproteine, z.B. P von λ (Mallory et al., 1990) und π von R6K (Ratnakar et al., 1996) konnte eine direkte Interaktion mit DnaB gezeigt werden. Die bereits identifizierten Domänen auf DnaB liegen direkt benachbart. Die Aminosäuren 173-208 von DnaB interagieren mit π von R6K (Ratnakar et al., 1996), aa 208-261 von DnaB interagieren mit RepA von pSC101 (Datta et al., 1999). Es gibt zwei Hypothesen für die Interaktion von Initiatorproteinen mit DnaB: i) die Interaktionsdomänen sind aufeinanderfolgend angeordnet, ohne oder mit nur geringer Überlappung und ii) es existiert eine 'Kerninteraktionsdomäne' von DnaB mit den Initiatorproteinen, und die Spezifität wird über die angrenzenden Regionen oder eine zweite Domäne hergestellt. Neben der Identifizierung der Interaktionsdomänen von DnaB und DnaA sollten diese Hypothesen überprüft werden.

Die Interaktion von DnaA mit dem DnaBC-Komplex ist reversibel. Eine Interaktion zwischen beiden Proteinen ist weniger stabil als andere Protein-Protein Interaktionen wie z.B. beim Polymerase III Enzymkomplex oder zwischen den ribosomalen Proteinen. Eine Interaktion ist daher *in vitro* möglicherweise schwieriger nachzuweisen.

3.2.1 Suppression von *dnaA219(Cos)* durch DnaB

Um mögliche Interaktionsdomänen von der replikativen *E. coli* Helikase DnaB mit dem Initiatorprotein DnaA zu identifizieren, wurde zunächst ein genetischer Test verwendet. Verschiedene *dnaA* Mutanten zeigen einen kalt-sensitiven (Cos) Phänotyp auf Grund einer leichten aber letalen Überinitiation der Chromosomreplikation (Kellenberger-Gujer et al., 1978). Bei 42 °C kann die Überinitiation auf Grund des schnelleren Zellwachstums toleriert und ausgeglichen werden, wohingegen die Zellen bei 30 °C sterben. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von DnaA Derivaten, die entweder die intakte DNA-Bindedomäne (Domäne 4, aa 373-467) oder die N-terminale Homo-Oligomerisierungsdomäne (Domäne 1, aa 1-77) besitzen, die Überinitiation inhibiert wird und die Zellen bei der nicht-permissiven Temperatur wachsen können (Weigel et al., 1999). Überexpression von DnaA Domäne 4 Derivaten führt zu einer Konkurrenz um die Bindestellen in *oriC* und verhindert damit die Bildung des Initiationskomplexes. Überexpression von DnaA Domäne 1 führt zu einer Konkurrenz um die Homointeraktionsstelle(n) des DnaA-Proteins und verhindert

dadurch ebenfalls die Bildung des Initiationskomplexes. In beiden Fällen reduziert nur teilweise funktionales DnaA die Überinitiation durch Beeinträchtigung des DnaA-*oriC*-Komplexes.

Eine Interaktion von DnaB mit DnaA, die nicht zum Laden der Helikase führt, sollte in analoger Weise zu einer Suppression des Cos-Phänotypes führen. Mit Hilfe von DnaB Deletionsderivaten sollten sich mögliche Interaktionsdomänen von DnaB mit DnaA leicht identifizieren lassen.

DnaB Derivative	Cos-Suppression				
	DnaB	α -Fragment	β -Fragment		γ -Fragment
DnaB Aminosäuren	1-467	1-156	157-300	301-471	
DnaB[1-467]	[Bar chart: full length DnaB]				+
DnaB[1-156]-bio	[Bar chart: DnaB[1-156]-bio]				-
bio-DnaB[154-471]	[Bar chart: bio-DnaB[154-471]]				+
bio-DnaB[154-301]	[Bar chart: bio-DnaB[154-301]]				+
bio-DnaB[154-206]	[Bar chart: bio-DnaB[154-206]]				+
bio-DnaB[156-174]	[Bar chart: bio-DnaB[156-174]]				-
bio-DnaB[182-206]	[Bar chart: bio-DnaB[182-206]]				-
bio-DnaB[214-471]	[Bar chart: bio-DnaB[214-471]]				-
bio-DnaB[203-471]	[Bar chart: bio-DnaB[203-471]]				+

Abb. 12: Suppression des Cos-Phänotypes vom *dnaA219*(Cos)-Stamm WM2667. Namen der DnaB-Derivate (linke Spalte) geben die exprimierten Aminosäuren in eckigen Klammern an. Die Unterteilung in '+' (Suppression) und '-' (keine Suppression) wurde wie im Methodenteil beschrieben vorgenommen. Die Unterteilung von Wildtyp *E. coli* DnaB ist angegeben (Biswas und Biswas, 1999a). Grau unterlegte Bereiche zeigen cotranslatierte nicht-DnaB-Sequenzen an, bio: Biotin-tag vom pBEX5BA

Überexpression des gesamten DnaB Proteins im *dnaA219*(Cos) Stamm WM2667 führte zu einer effizienten Cos-Suppression (Abb. 12). Überexpression von DnaB und DnaC zusammen oder Überexpression von DnaC allein hatte keinen Effekt. Das Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein, dass Überexpression des *ban*-Proteins vom Coliphagen P1 (ein DnaB Ortholog) den kalt-sensitiven Phänotyp vom *dnaA46*(Cos) Stamm supprimiert. Die Suppression erfolgt wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion von DnaA und *ban* bzw. DnaB (Kellenberger-Gujer et al., 1978). Unterteilung von DnaB in eine kleinere N-

terminale Domäne (aa 1-156) und eine größere C-terminale Domäne (aa 154-471) zeigte, dass nur der C-Terminus zur Cos-Suppression führte (s Abb. 12). Bei weiterer Verkleinerung vom DnaB C-Terminus zeigten alle DnaB Konstrukte, die die Aminosäuren 203-206 besitzen, entweder zusammen mit 50 Aminosäuren upstream (DnaB[154-206]) oder mit den direkt benachbarten C-terminalen Aminosäuren (DnaB[203-471]), die Fähigkeit den *dnaA219*(Cos) Stamm zu supprimieren. Ob dieses Motiv tatsächlich eine Interaktionsdomäne von DnaB mit DnaA ist, wurde *in vitro* durch einen Solid-Phase Protein Binding Assay untersucht (3.2.3).

3.2.2 DnaA-abhängiges Laden der Helikase *in vivo*

Zur Identifizierung von Domänen von DnaA, die am Laden der Helikase beteiligt sind, wurde ein genetischer Test verwendet. RSF1010 ist ein multicopy Plasmid (8.684 Bp) (Scholz et al., 1989), das in den meisten Gram-negativen Bakterien und in den Gram-positiven Actinomyceten replizieren kann (Gormley und Davis, 1991). Neben der minimalen Origin Sequenz (*oriV_{RSF1010}*) ist die Initiation der Replikation von RSF1010 in *E. coli* nur von den drei plasmidkodierten Genprodukten RepA (Helikase), RepB' (Primase) und RepC (Initiatorprotein) abhängig (Scherzinger et al., 1991);(Abb. 13 A). Der *oriV_{RSF1010}* besteht aus 396 Bp und kann in zwei funktionelle Domänen unterteilt werden. Die erste Domäne besteht aus drei 'direct repeats' (Iterons) von jeweils 20 Bp und benachbarten GC- und AT-reichen DNA Sequenzen. RepC bindet an die Iterons (Scholz et al., 1989) und bewirkt ein Aufschmelzen der benachbarten AT-reichen Sequenz (Haring et al., 1985). Die zweite Domäne besteht aus den Startstellen für die DNA-Synthese (*ssiA* und *ssiB*). Bei den *ssiA* und *ssiB* Stellen handelt es sich um hochkonservierte Sequenzen von jeweils 40 Bp, an denen RepB' mit der Primersynthese für den jeweiligen Plasmidstrang beginnt (Honda et al., 1988; Honda et al., 1989). Werden die *ssiA* und *ssiB* Stellen durch 'Primosome assembly sites' vom Phagen Φ X174 oder durch 'G-sites' vom Phagen G4 ersetzt, ist der chimäre Origin *in vivo* funktionsfähig. Die Initiation der Replikation ist aber nicht mehr RepB' abhängig (Honda et al., 1991; Honda et al., 1992). Die Primersynthese am *oriV_{RSF1010}* durch RepB' ist getrennt vom prepriming Schritt der Initiation (Origin Erkennung und Aufschmelzen der DNA), für die RepC und RepA verantwortlich sind (Taguchi et al., 1996).

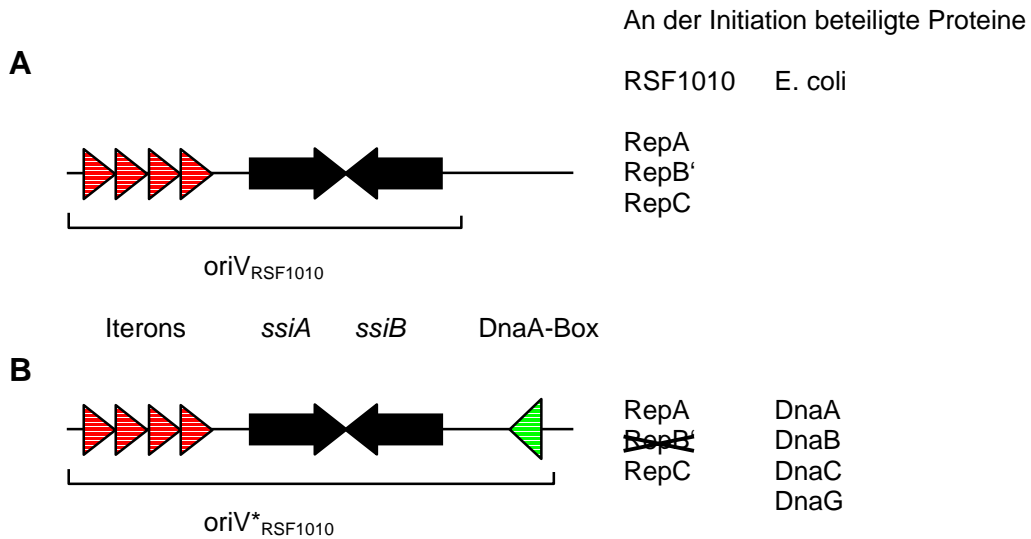


Abb. 13: Schematische Darstellung vom Wildtyp $oriV_{RSF1010}$ (A) und chimären $oriV^*_{RSF1010}$ vom pYTC (B)

Um mit Hilfe eines genetischen Tests untersuchen zu können, welche Regionen von DnaA in das Laden der Helikase involviert sind, muß dieser Vorgang von anderen Funktionen, an denen DnaA beteiligt ist, insbesondere dem Aufschmelzen der DNA, abgetrennt werden. Die Verwendung eines Plasmides mit dem chimären $oriV^*_{RSF1010}$ (pYTA1 bzw pYTC) erfüllt diese Voraussetzung (Taguchi et al., 1996). An der Initiation am $oriV_{RSF1010}$ vom Plasmid RSF1010 sind, wie oben beschrieben, die drei plasmidkodierte Proteine RepA, RepB', und RepC beteiligt (Abb. 13 A). Durch Insertion einer einzelnen DnaA-Box benachbart zu den *ssi*-Stellen vom $oriV_{RSF1010}$ wird die Initiation der Replikation am chimären $oriV^*_{RSF1010}$ in Abwesenheit der RepB'-Primase DnaA abhängig (Abb 13 B). DnaA lädt die chromosomale Helikase (DnaB₆C₆), welche anschließend die *E. coli* Primase DnaG rekrutiert, wodurch die Synthese eines Primers ermöglicht wird, der von Polymerasen verwendet werden kann.

Als Teststamm wurde der *dnaA*(Null) Stamm WM1490 benutzt, der bereits das Helferplasmid pMMB2Δ67 (exprimiert RepA und RepC) und ein Plasmid, das DnaA Derivate exprimiert, besitzt. Plasmidkodierte DnaA Derivate wurden auf Ihre Fähigkeit hin getestet, pYTC zu replizieren. Das Plasmid pYTC besteht aus dem $oriV^*_{RSF1010}$ und dem Gen für Chloramphenicolresistenz. Nach der Transformation mit dem Testplasmid wurde auf Chloramphenicolresistenz selektioniert und die Transformationseffizienz ausgewertet (2.2.2.14 pYTC-Test). Während pYTC in

WM1490(pMMB2 Δ 67) nicht etabliert werden konnte, reichte eine geringe Expression von wtDnaA aus, um pYTC zu replizieren (Abb. 14). Die Replikation von pYTC wurde durch einen N-terminalen Biotin-tag am DnaA-Protein nicht eingeschränkt.

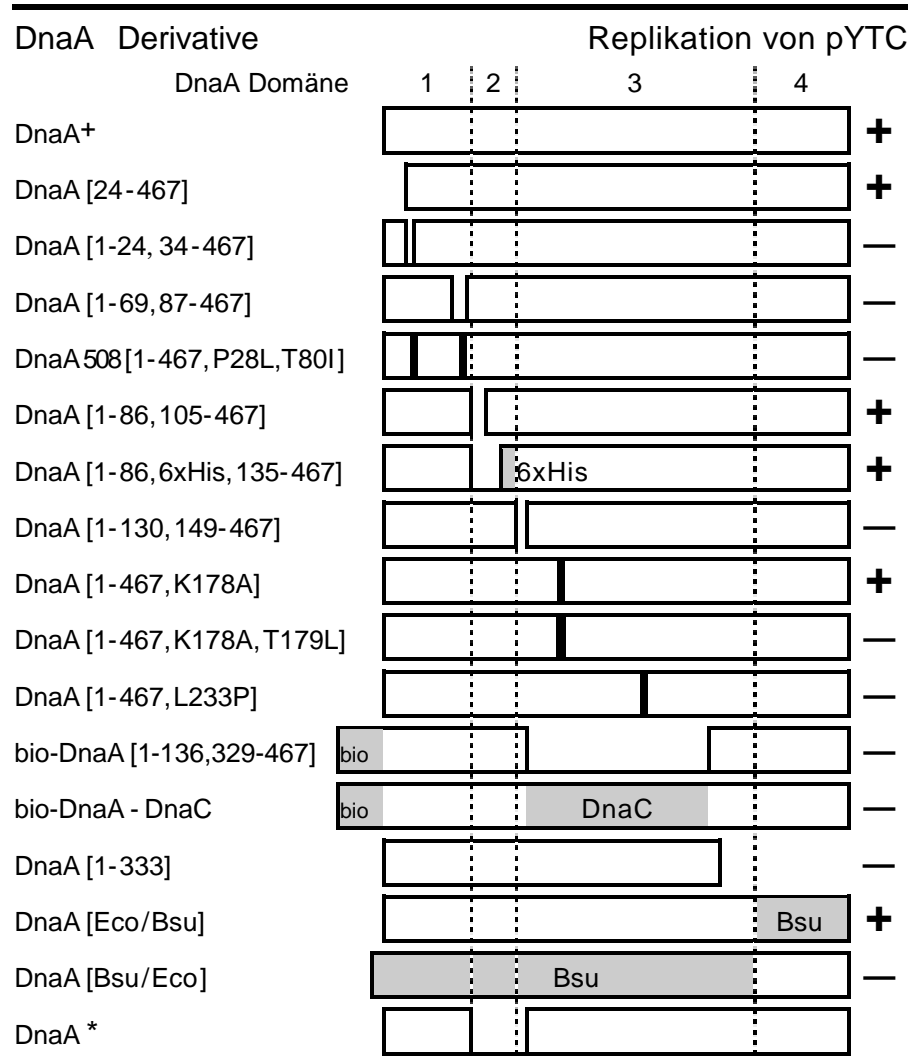


Abb. 14: DnaA abhängige Replikation von pYTC. Namen der DnaA-Derivate (linke Spalte) geben die exprimierten Aminosäuren in eckigen Klammern an. Die Unterteilung in '+' (Chloramphenicolresistenz) und '-' (Chloramphenicolsensitiv) wurde wie im Methodenteil beschrieben vorgenommen. Die Domänen Struktur von Wildtyp *E. coli* DnaA ist angegeben (Domänengrenzen sind durch gestrichelte Linien angezeigt). DnaA* (letzte Zeile) gibt die Domänen von DnaA an, die für die Replikation von pYTC essentiell sind. Die ungefähren Positionen von Mutationen und Deletionen sind angegeben. Grau unterlegte Bereiche zeigen cotranslatierte nicht-DnaA-Sequenzen an, bio: Biotin-tag vom pBEX5BA, Bsu: *B. subtilis* DnaA Sequenzen, DnaC: *E. coli* DnaC Sequenz.

DnaA Derivate mit Deletionen und Insertionen innerhalb von Domäne 2, wie DnaA216 (DnaA[1-86,105-467]) oder DnaA[1-86,6xHis,135-467] (Schaper und Messer, 1997) konnten pYTC genauso effizient replizieren wie wtDnaA. DnaA[1-

130,149-467] mit einer kurzen Deletion am Anfang von Domäne 3, ein Motiv, das wahrscheinlich am Laden der Helikase beteiligt ist (Sutton et al., 1998), war inaktiv.

Eine Deletion der ersten 23 Aminosäuren (DnaA[24-467]) hatte keinen Einfluß auf die Replikation von pYTC. Jede weitere Deletion innerhalb des DnaA N-Terminus wie in DnaA[1-24,34-467] oder DnaA[1-69,87-467] führte zu einem Verlust der Helikaseladeaktivität von DnaA. DnaA508(P27L, T80I) mit zwei Punktmutationen innerhalb des N-Terminus konnte die Helikase nicht laden.

Aminosäureaustausch K178A in DnaA[1-467,K178A] führt zu einem Verlust der Nukleotidbindefähigkeit der ATP-Bindedomäne (Lu et al., 1998). Das nukleotidfreie DnaA[1-467,K178A] war in der Lage pYTC zu replizieren, im Gegensatz zu DnaA[1-467,K178A,T179L] und DnaA[1-467,L233P], die beide die Fähigkeit verloren hatten, die Helikase zu laden. Eine Deletion der gesamten Domäne 3 (bio-DnaA[1-136,329-467]) bzw. der Austausch gegen die ATP-Bindedomäne von *E. coli* DnaC (DnaA-DnaC) resultierte in inaktiven Proteinen (Abb. 14).

DnaA[1-333] mit einer vollständigen Deletion der DNA-Bindedomäne (Domäne 4) bzw. Domäne 4 allein waren nicht in der Lage pYTC zu replizieren. Ein chimäres Protein mit der DNA-Bindedomäne von *B. subtilis* anstelle der entsprechenden *E. coli* Domäne (DnaA[Eco/Bsu]) war in der Lage die Helikase zu laden. Im Gegensatz dazu war nach dem Austausch von Domäne 1-3 von *E. coli* DnaA gegen die entsprechenden Domänen von *B. subtilis* das chimäre Protein (DnaA[Bsu/Eco]) inaktiv.

Die Ergebnisse zeigen, daß drei Regionen (Abb. 14 DnaA*) des DnaA-Proteins in das Laden der Helikase am chimären *oriV**_{RSF1010} involviert sind: i) DnaA N-Terminus (aa 24-86), ii) eine intakte Domäne 3 und iii) die DNA-Bindedomäne. Welche der Domäne(n) an der Interaktion mit DnaB beteiligt ist(sind), wurde *in vitro* mit Hilfe des Solid-Phase Protein Binding Assay (3.2.3) näher untersucht.

3.2.3 Solid-Phase Protein Binding Assays

Aufgrund von *in vivo* Versuchen (unter anderem Cos-Suppression) war bereits bekannt, daß der DnaA N-Terminus für die Homo-Oligomerisierung des Proteins während der Initiation der Replikation wichtig ist. Um die DnaA – DnaA Interaktion *in vitro* näher zu charakterisieren, wurde ein Solid-Phase Protein Binding Assay etabliert. Biotinyliertes DnaA bzw. biotinylierte DnaA Derivate wurden mittels des

Biotin-tags an Magnetkugeln (Beads) mit einer Streptavidinoberfläche gebunden. Rohextrakt von Zellen, die entweder DnaA oder DnaA[87-467] überexprimieren, wurde mit dem immobilisierten Protein inkubiert (Abb. 15) und DnaA Derivate, die mit dem gekoppelten Protein interagieren, durch Immunoblots analysiert.

Der gleiche Test wurde für die DnaA – DnaB Interaktion verwendet. Hierbei wurden sowohl biotinyliertes DnaB bzw. DnaB Deletionsderivate an die Beads gekoppelt und mit DnaA bzw. DnaA Derivaten inkubiert, als auch die umgekehrte Versuchsanordnung benutzt. Durch Immunoblots wurden die Proteine (DnaA bzw. DnaB) identifiziert.

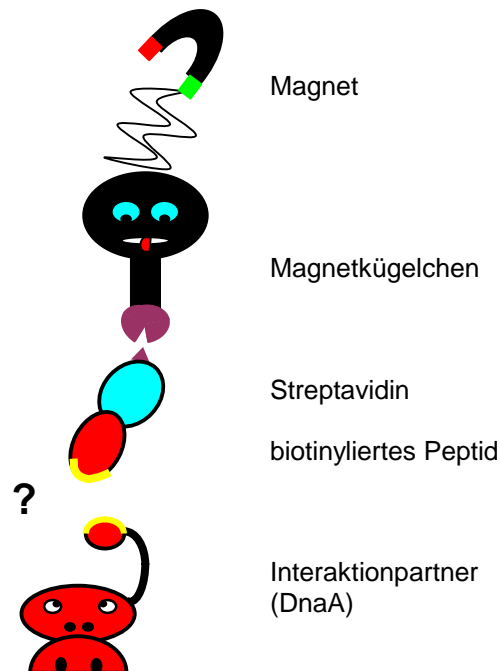


Abb. 15: Solid-Phase Protein Binding Assay: Fusionsproteine mit einem N-terminalem Biotin-tag wurden an die Beads gekoppelt und mit möglichen Interaktionspartnern in Zellextrakten inkubiert. Nach 2 Waschschrritten wurden die Proteine mittels Western Blot analysiert.

3.2.3.1 DnaA – DnaA Interaktion *in vitro*

Der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer DnaA - DnaA Interaktion wurde experimentell bestimmt (vergl. Abb. 16 A und B). Überexprimiertes wtDnaA band nur sehr schwach an Beads, die nur mit dem 12,5 kD Protein des Biotin-tags bedeckt sind. Die Menge an 'gefischtem' DnaA lag an der Nachweisgrenze der verwendeten Antikörper. Im Gegensatz dazu interagierte DnaA in Lösung

(Rohextrakt) mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467] sehr effizient (Abb. 16 A). Die Interaktion war reversibel und ließ sich bereits mit dem ersten differenzierenden Waschschrift aufheben.

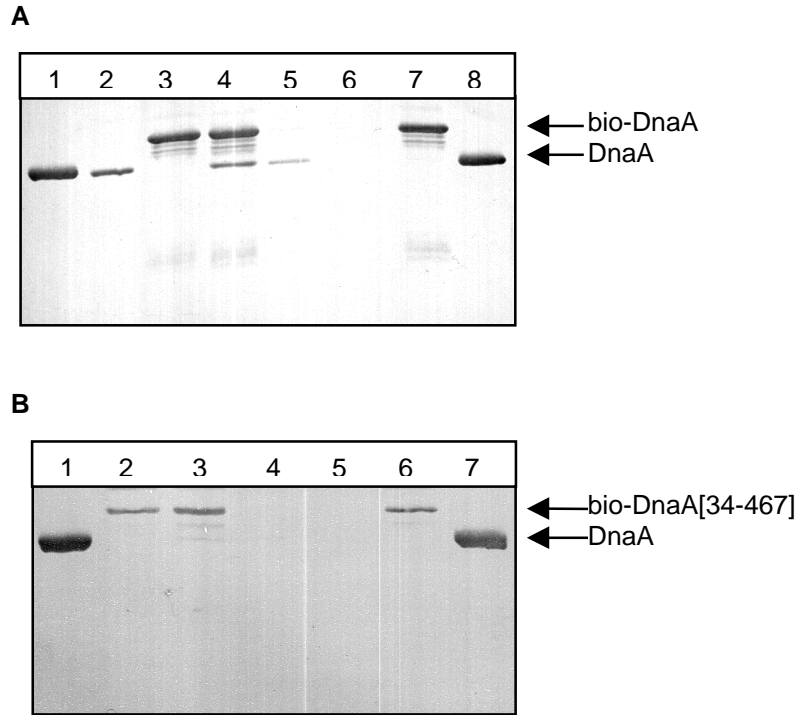


Abb. 16: Interaktion von DnaA mit bio-DnaA[1-467] (A) und bio-DnaA[34-467] (B). Teil A zeigt die Interaktion von DnaA mit immobilisiertem DnaA[1-467] Spuren zeigen **A:** 1) wtDnaA; 2) Rohextrakt von überexprimiertem wtDnaA, der für das Experiment eingesetzt wurde; 3) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467]; 4) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467] und DnaA; 5) Waschschrift 1; 6) Waschschrift 2; 7) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467] nach dem 2. Waschschrift; 8) wtDnaA; **B:** 1) wtDnaA; 2) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[34-467]; 3) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[34-467] und DnaA; 4) Waschschrift 1; 5) Waschschrift 2; 6) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[34-467] nach dem 2. Waschschrift; 7) wtDnaA

Immobilisiertes bio-DnaA[34-467] war nicht in der Lage mit wtDnaA in Lösung zu interagieren (Abb. 16 B). Die Menge an DnaA, die mit bio-DnaA[34-467] interagiert, entspricht der Menge, die unspezifisch an die Beads bindet. Wurde als Interaktionspartner DnaA[87-467] in ungefähr gleicher Konzentration wie wtDnaA in Lösung angeboten, war keine Interaktion mit bio-DnaA[1-467] und bio-DnaA[34-467] zu beobachten. Immobilisierter DnaA N-Terminus (bio-DnaA[1-77] und DnaA[1-86]-bio) waren dagegen in der Lage mit DnaA zu interagieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der DnaA N-Terminus hinreichend und notwendig für die Selbstinteraktion *in vitro* ist und stimmen mit *in vivo* Daten überein (Weigel et al., 1999).

3.2.3.2 DnaA – DnaB Interaktion *in vitro*

Mit Hilfe des pYTC-Tests konnten drei Domänen (Domäne 1, 3 und 4) von DnaA identifiziert werden, die für das Laden der Helikase essentiell sind. Auf Grund der *in vivo* Daten läßt sich keine Aussage darüber machen, ob die Domänen an einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen beteiligt sind oder aber die Helikase aus anderen Gründen, z.B. auf Grund einer falschen Struktur des DnaA Derivates, nicht geladen werden kann.

DnaB[1-471] interagierte mit den Beads, die nur mit dem 12,5 kD Biotin-tag bedeckt waren, schwächer als mit bio-DnaA[1-467] (Abb. 17). Die Interaktion DnaB–Beads läßt sich durch differenzierendes Waschen von der DnaB - DnaA Interaktion unterscheiden. Die Interaktion von DnaB mit DnaA war stabiler als die DnaA - DnaA Interaktion.

Immobilisiertes bio-DnaB interagierte mit überexprimiertem DnaA aus Rohextrakt und mit gereinigtem DnaA. Unter den getesteten Bedingungen interagierten DnaA und DnaB spezifisch und direkt miteinander. Die Interaktion von DnaA mit DnaB ist unabhängig davon, welches Protein an den Beads immobilisiert ist. Für die Interaktion war weder eine spezifische DNA Bindung (DnaA-Box) noch eine unspezifische nötig.

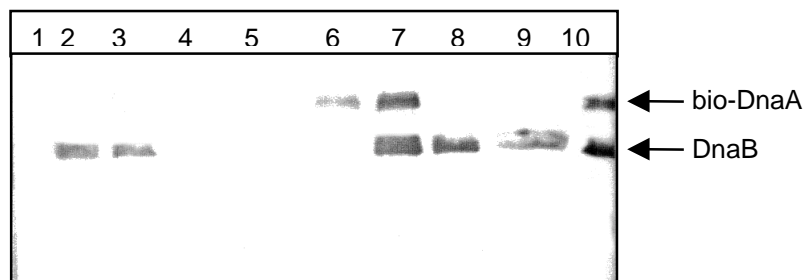


Abb. 17: Interaktion von DnaB mit den Beads und mit immobilisiertem DnaA. Die Spuren zeigen 1) Rohextrakt aus einem *dnaA*(Null)-Stamm; 2) Beads mit DnaB; 3) Waschschrift 1; 4) Waschschrift 2; 5) Beads nach dem 2. Waschschrift; 6) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467]; 7) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467] und DnaB, 8) Waschschrift 1; 9) Waschschrift 2; 10) Beads mit immobilisiertem bio-DnaA[1-467] und DnaB nach dem 2. Waschschrift

DnaA[24-467] und bio-DnaA[24-467], dem die ersten 23 Aminosäuren fehlen, konnten *in vivo* die Helikase laden. Der Biotin-tag am N-Terminus hatte keinen Einfluß auf die Aktivität *in vivo*. Außerdem konnte bio-DnaA[24-467] *in vitro* mit der

Helikase interagieren. Im Gegensatz dazu konnte bio-DnaA[57-467], dem fast die vollständige Domäne 1 fehlt, weder *in vivo* die pYTC Replikation unterstützen noch *in vitro* mit der Helikase interagieren.

Eine Deletion der gesamten Domäne 3 von DnaA wie in bio-DnaA[1-136,329-467] oder Punktmutationen in der ATP-Bindedomäne wie in bio-DnaA[1-467,K178A,T179L] verhinderten nicht die Interaktion mit der Helikase *in vitro*, obwohl die Proteine komplett inaktiv im pYTC-Test waren. Für eine Interaktion von DnaA mit DnaB wird also nur der N-Terminus von DnaA benötigt. Tabelle 3 faßt die Ergebnisse des ‘Solid-Phase Protein Binding Tests’ zusammen.

	bio	bio-DnaA [1-467]	bio-DnaA [24-467]	bio-DnaA [57-467]	bio-DnaA [1-136,329-467]
DnaB[1-471]	—	+	+	—	+

Tabelle 3: Interaktion zwischen DnaB und DnaA. Bio-DnaA Derivate wurden an Beads gekoppelt und mit gereinigtem DnaB inkubiert. Nach dem Waschen des Sandwichs, bestehend aus Beads-bio-DnaA-DnaB, wurde dieser mittels Western Blot analysiert. Namen der DnaA-Derivate geben die exprimierten Aminosäuren in eckigen Klammern an. Die Unterteilung in ‘+’ (Interaktion genauso stabil wie bio-DnaA-DnaB) und ‘-’ (Interaktion deutlich schwächer als die Interaktion von bio-DnaA-DnaB) (s. Abb 17) wurde wie im Methodenteil beschrieben vorgenommen. bio: Biotin-tag vom pBEX5BA

Um die Ergebnisse zu überprüfen und die Interaktionsdomäne(n) von DnaB zu identifizieren, wurde das reziproke Experiment durchgeführt. Der Cos-Suppressions Test lieferte Beweise dafür, dass der DnaB C-Terminus ($\beta\gamma$ -Fragment) bzw. bio-DnaB[154-206] mit DnaA *in vivo* interagieren.

Die getesteten DnaA Derivate interagierten mit den Beads, die mit dem 12,5 kD Biotin-tag bedeckt waren, gar nicht bzw. nur sehr schwach (Abb. 16). Gesamt bio-DnaB, sowie bio-DnaB[154-471] und bio-DnaB[154-206] verhielten sich identisch. Das DnaB α -Fragment (DnaB[1-156]-bio) interagierte ebenfalls mit wtDnaA, aber im Gegensatz zu allen anderen DnaB-Derivaten auch mit DnaA Derivaten mit Deletionen im N-Terminus wie DnaA[1-24,33-467] und DnaA[87-467]. Dagegen erfolgte keine Reaktion mit DnaA[1-139,149-467]. Das DnaB α -Fragment kann nur mit DnaA interagieren, nachdem das DnaB $\beta\gamma$ -Fragment deletiert ist. Das DnaB α -Fragment und das DnaB $\beta\gamma$ -Fragment besitzen jeweils eine Interaktionsdomäne mit DnaA. Die Interaktionsdomäne auf dem $\beta\gamma$ -Fragment ist auch im wtDnaB für DnaA zugänglich. Wahrscheinlich handelt es sich um die primäre Interaktionsdomäne von DnaB mit DnaA. Deletionen im DnaA N-Terminus

führten zu einem Verlust der Interaktion mit dem $\beta\gamma$ -Fragment von DnaB bzw. bio-DnaB[154-206]. Der DnaA N-Terminus (aa 24-86) interagiert damit mit einer Region auf bio-DnaB[154-206] spezifisch. Das DnaB α -Fragment (DnaB[1-156]-bio) besitzt eine zweite, schwächere, Interaktionsregion mit DnaA und interagiert mit DnaA Aminosäure 130-149. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse vom Solid-Phase Protein Binding Assay zusammen.

	bio	bio-DnaB [1-471]	DnaB [1-156]-bio	bio-DnaB [154-471]	bio-DnaB [154-206]
DnaA[1-467]	—	+	+	+	+
DnaA[1-24,33-467]	—	—	+	—	—
DnaA[87-467]	—	—	+	—	—
DnaA[1-86,135-467]	—	+	+	+	+
DnaA[1-130,149-467]	—	+	—	+	+

Tabelle 4: Interaktion zwischen DnaB und DnaA. Bio-DnaB Derivate wurden an Beads gekoppelt und mit dem Zellrohextrakt von Stämmen, die das entsprechende DnaA Derivat überexprimieren, inkubiert. Nach dem Waschen des Sandwichs bestehend aus Beads-bio-DnaB-DnaA wurde dieser mittels Western Blot analysiert. Namen der DnaB- und DnaA-Derivate geben die exprimierten Aminosäuren in eckigen Klammern an. Die Unterteilung in '+' (Interaktion genauso stabil wie bio-DnaB-DnaA) und '-' (Interaktion deutlich schwächer als die Interaktion von bio-DnaB-DnaA) (s Abb. 17) wurde wie im Methodenteil beschrieben vorgenommen. bio: Biotin-tag von pBEX5BA

3.2.4 Replikation von pSC101

Das Plasmid pSC101 wurde 1973 entdeckt (Cohen und Chang, 1973). Es besteht aus 9263 Bp (Bernardi und Bernardi, 1984), besitzt das Tetracyclinresistenz-Gen, ein eigenes Initiatorprotein (RepA) und den *ori*. RepA bindet innerhalb des Replikationsorigins an drei Iterons und zwei 'inverted repeats' (Vocke und Bastia, 1983). Für die Initiation der Replikation wird neben RepA das *E. coli* Protein DnaA benötigt (Hasunuma und Sekiguchi, 1977). Nach dem Binden von RepA an die Iterons und von DnaA an die DnaA_s-Box kann die DNA zwischen den Bindestellen gekrümmt werden (Abb. 18). Die Bindung vom integration host factor (IHF) verstärkt die Krümmung der DNA (Stenzel et al., 1987). Auf Grund der starken Krümmung nimmt die DNA eine Struktur an, die es dem DnaA an der DnaA_s-Box erlaubt, mit RepA und/oder DnaA an den DnaA_w-Boxen, die mit den Iterons überlappen, zu interagieren (Abb. 18);(Stenzel et al., 1991). RepA interagiert *in vitro* sowohl mit

DnaB als auch mit DnaA (Datta et al., 1999). Diese Interaktion ist unabhängig von IHF und von der Gegenwart von DNA. Die Helikase muß *in vitro* sowohl mit RepA als auch mit DnaA interagieren, um am Plasmidorigin geladen zu werden (Datta et al., 1999).

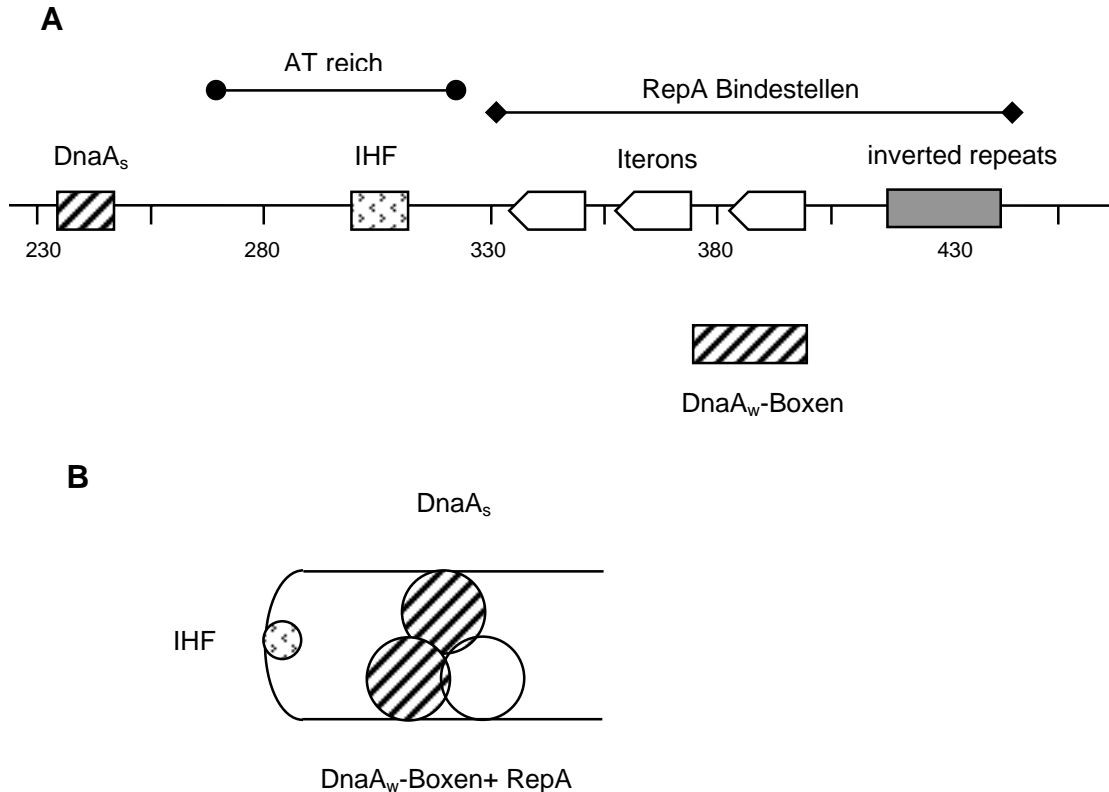


Abb. 18: Schematische Darstellung der origin Region vom pSC101

Die bisherigen Ergebnisse (pYTC-Test, Solid Phase Protein Binding Assay) zeigen, dass der DnaA N-Terminus sowohl mit der DnaB Helikase interagiert als auch essentiell für die Selbstinteraktion von DnaA ist.

Die Initiation der Replikation von pSC101 bietet die Voraussetzungen für einen genetischen Test, der es ermöglichen sollte zu unterscheiden, welche Regionen von DnaA bzw. vom DnaA N-Terminus für die Selbstinteraktion benötigt werden und diese von den Regionen, die für die DnaA – DnaB Interaktion verantwortlich sind, abzugrenzen. Bei der Interaktion von DnaA am pSC101 Origin handelt sich um eine 'long-range' Interaktion. Die Distanz zwischen den DnaA-Boxen im pSC101 Origin beträgt ca. 150 Bp. Eine ähnliche 'long-range' Interaktion könnte während der Bildung des Initiationskomplexes am *E. coli oriC* bei der Interaktion zwischen nicht benachbarten DnaA-Boxen eine Rolle spielen.

Als Teststamm wurde der *dnaA*(Null) Stamm WM2747 benutzt, der mit Plasmiden transformiert wurde, die DnaA Derivate exprimieren. Plasmidkodierte DnaA Derivate wurden auf Ihre Fähigkeit hin getestet pSC101 zu replizieren. Nach der Transformation mit dem Testplasmid wurde auf Tetracyclinresistenz selektioniert und die Transformationseffizienz ausgewertet (2.2.2.13).

Im *dnaA*(Null) Stamm WM2747 konnte pSC101 nicht replizieren, aber bereits geringe Expression (10 µM IPTG) von wtDnaA (Expression von pdnaA116 aus) führte zu einer effektiven Replikation von pSC101 (Abb. 19). DnaA Derivate mit kleinen Deletionen innerhalb von Domäne 1 wie DnaA[24-467], DnaA[1-24,33-467] oder DnaA[1-69,87-467] konnten die pSC101 Replikation nicht unterstützen. DnaA508[1-467, P27L,T80I] mit zwei Punktmutationen innerhalb des N-Terminus konnte pSC101 replizieren, aber nicht die Helikase laden (vergl. Abb. 18 + 19). DnaA216[1-86,105-467], DnaA[1-86,6xHis,135-467] und DnaA[1-130,149-467] waren fähig pSC101 Replikation zu unterstützen, genauso wie DnaA[1-136,374-467] mit einer Deletion der kompletten Domäne 3. Ein DnaA Derivat, das nur aus der Selbstinteraktionsdomäne (Domäne 1) und der minimalen DNA-Bindedomäne (Domäne 4) besteht, DnaA[1-86,374-467], war inaktiv. Eine Insertion des 12,5 kD Biotin-tags zwischen Domäne 1 und 4 in DnaA[1-86,bio,374-467] führte zu einer effektiven pSC101 Replikation. Für die Initiation der pSC101 Replikation werden also nur Domäne 1 und 4 von DnaA benötigt und ein Spacer (flexibler Linker) zwischen den beiden Domänen. Dieses Ergebnis legt außerdem nahe, daß eine Interaktion von DnaA mit RepA, an der die DnaA Domäne 3 (aa 245-360) beteiligt ist (Sutton und Kaguni, 1997b), nicht notwendig ist. DnaA Derivate ohne DNA-Bindedomäne, aber mit der kompletten oder Teilen der vorhergesagten Interaktionsregion mit RepA (DnaA[1-363], DnaA[1-136,332-362], DnaA[1-333]), waren im pSC101-Test vollständig inaktiv (Abb. 19).

Das chimäre Protein DnaA[Eco/Bsu] mit der DNA-Bindedomäne von *B. subtilis* war vollständig aktiv. Die chimäre DnaA[Bsu/Eco] mit Domäne 1-3 von *B. subtilis* konnte pSC101 nicht replizieren. Die Oligomerisationsdomäne vom *cl* Repressor des Coliphagen λ in *cl*[133-235]DnaA[87-467] (Weigel et al., 1999) konnte die DnaA Domäne 1 im pSC101-Test funktionell nicht ersetzen. Die Replikation von pSC101 benötigt außer der DNA-Bindung eine DnaA spezifische Interaktion.

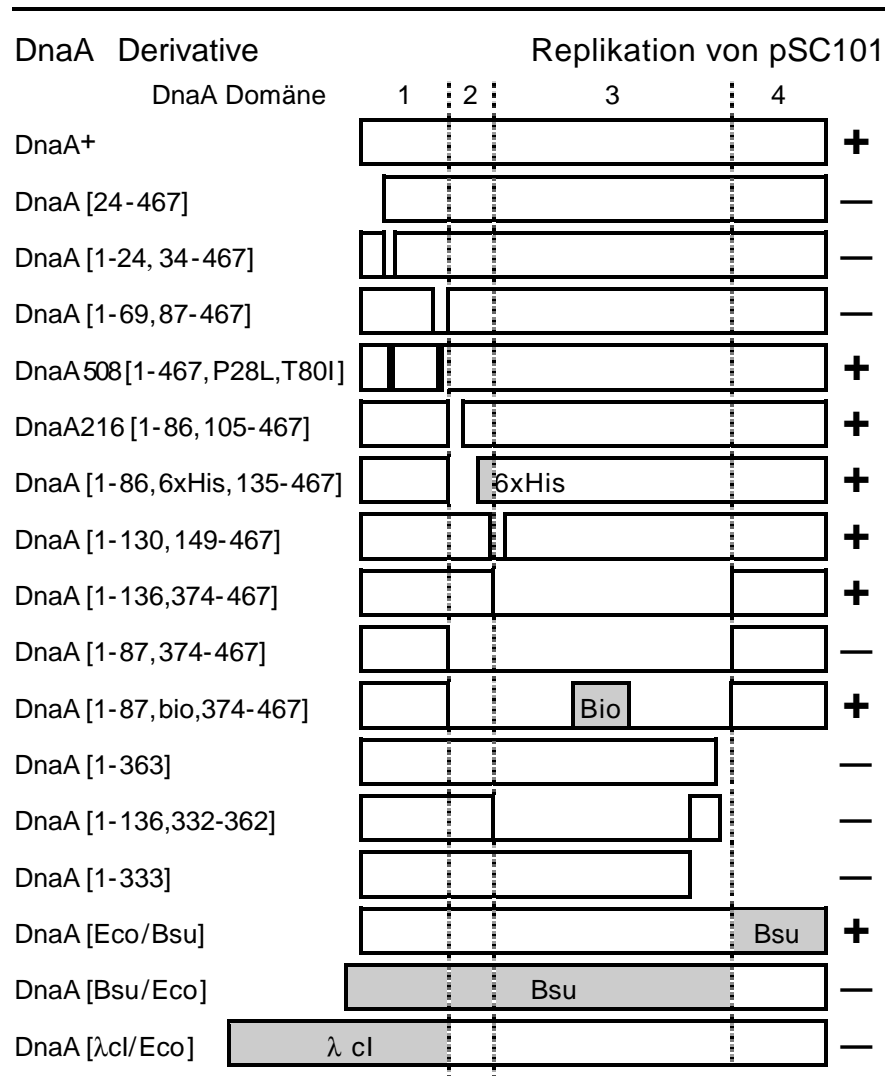


Abb. 19: DnaA abhängige Replikation von pSC101. Namen der DnaA-Derivate (linke Spalte) geben die exprimierten Aminosäuren in eckigen Klammern an. Die Unterteilung in '+' (Tetracyclinresistenz) und '-' (Tetracyclinsensitiv) wurde wie im Methodenteil beschrieben vorgenommen. Die Domänenstruktur von Wildtyp *E. coli* DnaA ist angegeben (Domänengrenzen sind durch gestrichelte Linien angezeigt). Die ungefähre Position von Mutationen und Deletionen ist angegeben. Grau unterlegte Bereiche zeigen cotranslatierte nicht-DnaA-Sequenzen an, bio: Biotin-tag vom pBEX5BA, Bsu: *B. subtilis* DnaA Sequenzen, λ cl: Oligomerisierungsdomäne vom cl Repressor des λ -Phagen.

Die Voraussetzungen für pSC101 und pYTC Replikation unterscheiden sich also deutlich in Bezug auf die Domänen 1 und 3: i) pSC101 Replikation benötigt den kompletten DnaA N-Terminus (aa 1-86), während für pYTC Replikation die Aminosäuren 24-86 ausreichen, und ii) pSC101 Replikation ist nicht von Domäne 3 abhängig, im Gegensatz zur pYTC Replikation. Mit Hilfe der pSC101 und pYTC Replikation ist es möglich unterschiedliche Funktionen des DnaA-Proteins getrennt voneinander zu untersuchen.

DnaA wird bei der pSC101 Replikation nicht zum Laden der Helikase benötigt, sondern stabilisiert einen DNA-Initiatorproteinkomplex.

3.3 Untersuchungen zum Laden der Helikase

3.3.1 Laden der Helikase auf eine AT-reiche Region

Das Laden der DnaB Helikase am *oriC* von *E. coli* wurde mit dem FI*-Test (2.2.2.15) untersucht. Als Plasmide wurden pOC180 und pOCBS verwendet. Das Plasmid pOC180 hat die gesamte *oriC* Region von *E. coli* (Pos. -176 - 1497) und als zusätzliches Replikon den ColEI Origin. Das Plasmid pOCBS entstand durch den Austausch der AT-reichen Region von *E. coli oriC* gegen die AT-reiche Region von *B. subtilis oriC*. Der chimäre Origin wurde hergestellt, um die Erfordernisse der AT-reichen Region für das Aufschmelzen näher zu charakterisieren und dadurch besser zu verstehen. Der Abstand zwischen der DnaA-Box und dem ersten aufgeschmolzenen Basenpaar ist im *E. coli oriC* und im *B. subtilis oriC* identisch (Abb. 20). DnaA ist in der Lage, jeweils 28 Bp aufzuschmelzen und zu stabilisieren. Dieser Bereich wird durch SSB um 16-18 Bp vergrößert (Abb. 20);(Krause und Messer, 1999).

Die Replikation von pOCBS kann im Gegensatz zu pOC180 *in vivo* nicht von *oriC* aus initiiert werden (M. Welzeck, persönliche Mitteilung). Durch Kaliumpermanganat-Footprint Experimente war bekannt, daß *E. coli* DnaA den chimären Origin aufschmelzen kann. Der Bereich, der von *E. coli* DnaA aufgeschmolzen wird, entspricht dem Bereich der im *B. subtilis oriC* vom *B. subtilis* DnaA Protein aufgeschmolzen wird (M. Welzeck, persönliche Mitteilung).

Um zu untersuchen, ob die Helikase auf den chimären Origin geladen werden kann, wurde das Plasmid pOCBS im FI*-Test untersucht. Die FI-Form von Plasmiden spiegelt die negative Superhelizität des Plasmides wieder. Durch die kombinierte Aktivität von DnaB und der Gyrase wird die Windungszahl des Plasmides und damit die Superhelizität des Plasmides verändert. Plasmide mit einer unterschiedlichen Windungszahl können elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt werden. Die FI*-Form kann nur gebildet werden, wenn DnaA den *oriC* aufschmilzt und mindestens eine Helikase geladen wird.

	1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12
	pOC180						M	pOCBS					
DnaA	—	—	+	+	+	+		—	—	+	+	+	+
DnaBC	—	+	—	+	+	+		—	+	—	+	+	+
SSB	—	+	+	+	+	+		—	+	+	+	+	+
HU	—	+	+	+	+	—		—	+	+	+	+	—
Gyrase	—	+	+	—	+	+		—	+	+	—	+	+

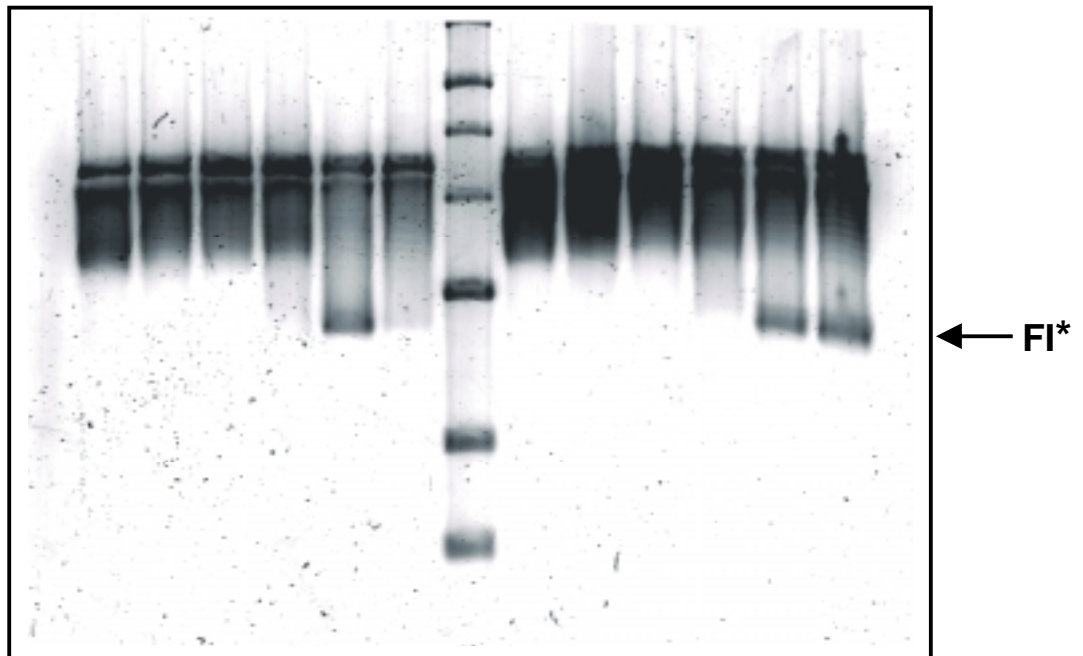


Abb. 21: FI*-Test der Plasmide pOC180 und pOCBS. Die Tabelle gibt die Proteine an, die im Reaktionsansatz vorhanden waren. M: 1 kb Marker von NEB-Biolabs

Die Ergebnisse zeigen, dass das Aufschmelzen einer AT-reichen Region und das Laden der Helikase unabhängig von der DNA-Sequenz der AT-reichen Region sind.

3.3.2 Laden der Helikase auf ein artifizielles Substrat

Um das DnaA vermittelte Laden der Helikase auf einen Einzelstrang zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Test etabliert. Das Substrat enthält eine einzelne DnaA-Box und einen Einzelstrangbereich. Das Substrat simuliert den während der Initiation der Replikation gebildeten offenen Komplex.

DnaA-Retardierungen der Substrate

Um den Einfluß des Einzelstranges auf das Bindeverhalten von DnaA zu untersuchen, wurden Substrate, die aus einem 21 Bp Doppelstrang mit der DnaA-Box R1 und einem Einzelstrang bestehen, in Retardierungsexperimenten eingesetzt (Tabelle 5). Als Kontrolle diente ein 21 Bp Oligonukleotid mit der gut charakterisierten DnaA-Box R1 ($R1_{21}$).


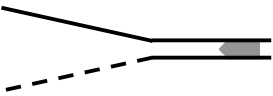

Substrat	Name	Oligonukleotide	Abb. 22
	$R1_{21}$	R1 upper 21mer R1 lower 21mer	A
	132_{UoriC}	oriC upper 66mer R1 lower 66mer	B
	132_{LoriC}	R1 upper 66mer oriC lower 66mer	C

Tabelle 5: Schematische Darstellung der in Retardierungsexperimenten getesteten Substrate. Durchgezogene Linien repräsentieren *oriC*-Sequenz und gestrichelte Linien nicht-*oriC*-Sequenz (während der Synthese wurden alle 4 Nukleotide pro Syntheseschritt eingesetzt)

Mit steigenden DnaA Konzentrationen wurde das Substrat $R1_{21}$ retardiert. Bei einem Verhältnis von 2 DnaA Molekülen pro Substrat Molekül war die DnaA-Box fast vollständig mit einem DnaA-Protein besetzt (Abb. 22A). $R1_{21}$ wurde nur von einem DnaA-Protein gebunden. Erst bei hohen Protein-Konzentrationen (mind. 5 DnaA-Molekülen pro Substrat Molekül) band das DnaA-Protein auch unspezifisch an die DNA. Dieser Effekt war bei allen getesteten Substraten zu erkennen (Abb. 22A, B, C).

Im Gegensatz zu den Substraten $R1_{21}$ und 132_{LoriC} banden an das Substrat 132_{UoriC} zwei DnaA-Moleküle (Abb. 22B). Der erste Komplex wurde bei ähnlichen DnaA Konzentrationen gebildet wie beim Substrat $R1_{21}$. Die Bildung des zweiten Komplexes erfolgte bevor die gesamte freie DNA gebunden war (Abb. 22B). Die Bindung des zweiten DnaA-Proteins erfolgt möglicherweise kooperativ. Das zweite DnaA-Protein band bevorzugt an den oberen Einzelstrang, wenn der Einzelstrangbereich *oriC* Sequenz enthielt.

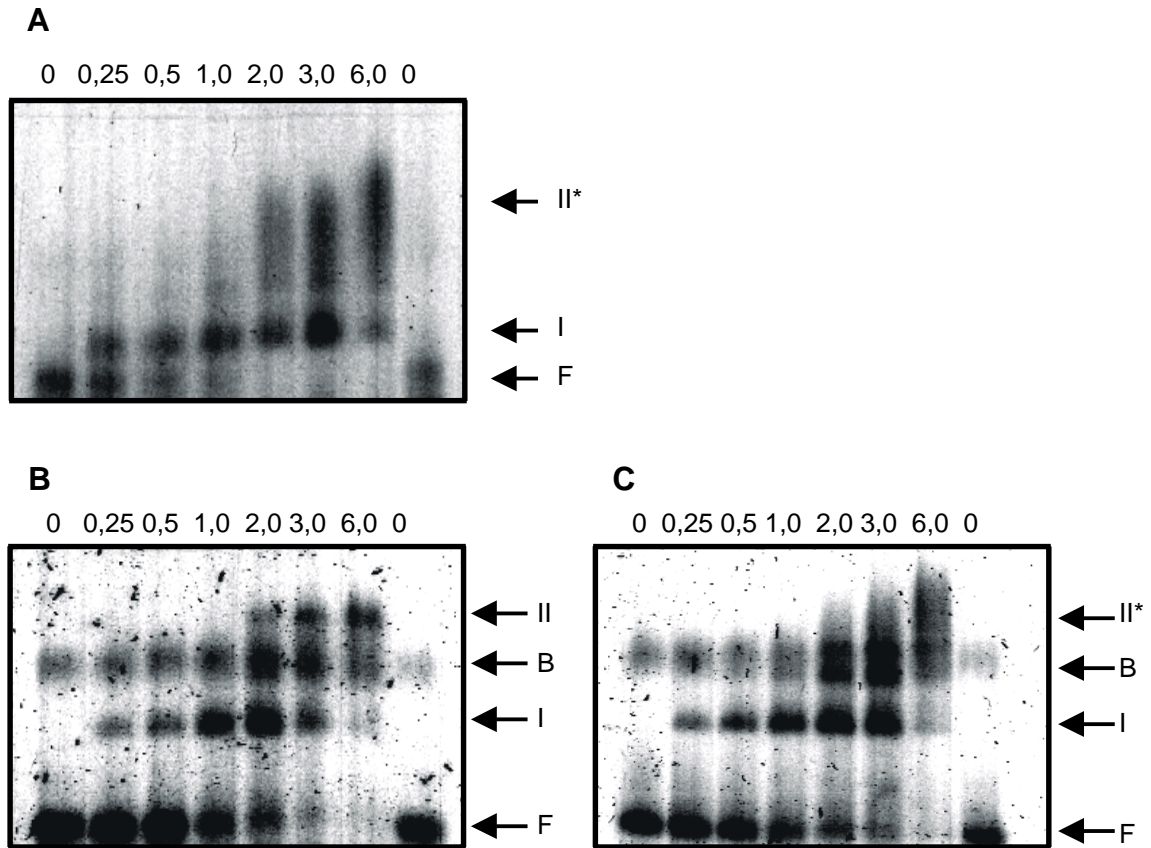


Abb. 22: Retardierungsgele mit den Substraten R1₂₁ (A), 132_{UoriC} (B) und 132_{LoriC} (C). Bezeichnung der Substrate wie in Tabelle 5. Die eingesetzte Anzahl von DnaA-Proteinen pro Substrat Molekül ist oberhalb der Gele angegeben. F: freie DNA; B: BSA; I: Komplex I; II: Komplex II; II*: unspezifische Bindung

Die Ergebnisse zeigen, dass DnaA die R1-Box auf dem Substrat erkennt und spezifisch bindet. Für die weiteren Experimente wurden die Bedingungen so gewählt, das jeweils zwei DnaA-Moleküle pro Substrat Molekül zugegeben wurden. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Bindung von DnaA fast ausschließlich an seine Erkennungssequenz. Die Bindung des zweiten DnaA-Proteins an den Einzelstrang spiegelt ein neues Bindungsverhalten von DnaA wieder. Möglicherweise unterstützt das zweite DnaA *in vivo* das Aufschmelzen der DNA bzw. stabilisiert den aufgeschmolzenen *oriC* (C. Speck, persönliche Mitteilung).

Die im Helikasetest eingesetzten Substrate 158_{UoriC} und 158_{LoriC} zeigten in Gelshiftexperimenten das gleiche Retardierungsverhalten wie die Substrate 132_{oriC}.

Laden der Helikase *in vitro*

Um *in vitro* das DnaA abhängige Laden der Helikase untersuchen zu können, muß dieser Vorgang von anderen Funktionen, an denen DnaA beteiligt ist,

insbesondere dem Entwinden, abgetrennt werden. Das Substrat spiegelt den aufgeschmolzenen *oriC* wieder und erfüllt somit die Voraussetzungen.

Im Test wurde das Laden der Helikase auf die Spiegelbildsubstrate 158_{UoriC} und 158_{LoriC} untersucht. Es wurden jeweils ein zweifacher Überschuss an DnaA-Protein (nahezu vollständige Bindung von DnaA an das Substrat) und Helikasekomplex ($DnaB_6C_6$) eingesetzt. Im Testansatz ist genügend ATP vorhanden, wodurch ein Recycling des DnaBC-Komplexes möglich ist.

Abbildung 23 zeigt die Substrate und die möglichen im Helikasetest entstehenden Fluorescein markierten Produkte. DnaB ist eine 5'→3' Helikase. Wird die Helikase durch DnaA z.B. im Substrat 158_{LoriC} auf den oberen Strang geladen, entsteht Produkt 1 (Abb. 23A). Dieses müßte eine erhöhte elektrophoretische Mobilität gegenüber dem Substrat aufweisen. Lädt DnaA die Helikase auf den unteren Strang, wird das kurze Fluorescein markierte DNA-Fragment verdrängt (Produkt 2), welches die höchste Mobilität im Gel besitzt (Abb. 23A).

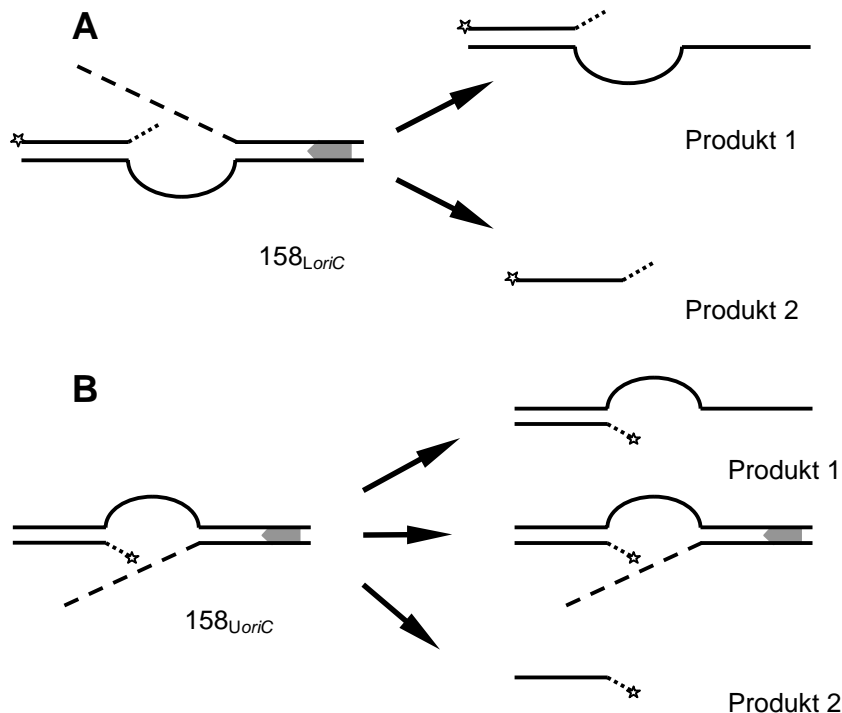


Abb. 23: Substrate 158_{UoriC} und 158_{LoriC} und mögliche durch die Helikaseaktivität von DnaB gebildete Produkte. Durchgezogene Linien symbolisieren *oriC*-Sequenz und gestrichelte Linien unterschiedliche nicht *oriC*-Sequenz. Das Sternchen (☆) markiert das Fluorescein. Gezeigt sind nur Produkte, die mit Fluorescein markiert sind.

Wird die Helikase im Substrat 158_{UoriC} auf den oberen Strang geladen, entsteht ebenfalls Produkt 1 (Abb. 23 B). Das Substrat 158_{UoriC} besitzt zwei „untere“ DNA-Stränge, wodurch beim Laden der Helikase zwei mögliche Produkte entstehen

können. Wird die Helikase auf den DNA-Strang geladen, der sich direkt benachbart zur DnaA-Box befindet, kann keine Helikaseaktivität bestimmt werden. Substrat und Produkt sind in diesem Fall identisch (Abb. 23 B). Ein Laden der Helikase auf den kurzen Fluorescein markierten DNA-Strang führt zur Bildung von Produkt 2 (Abb. 23 B). Auf Grund der gebildeten Produkte, sollte eine Aussage möglich sein, auf welchen Strang die Helikase durch DnaA geladen wird. Ist das Laden der Helikase unabhängig von der Einzelstrangsequenz, müßte bei beiden Produkten die Helikase auf denselben Strang geladen werden.

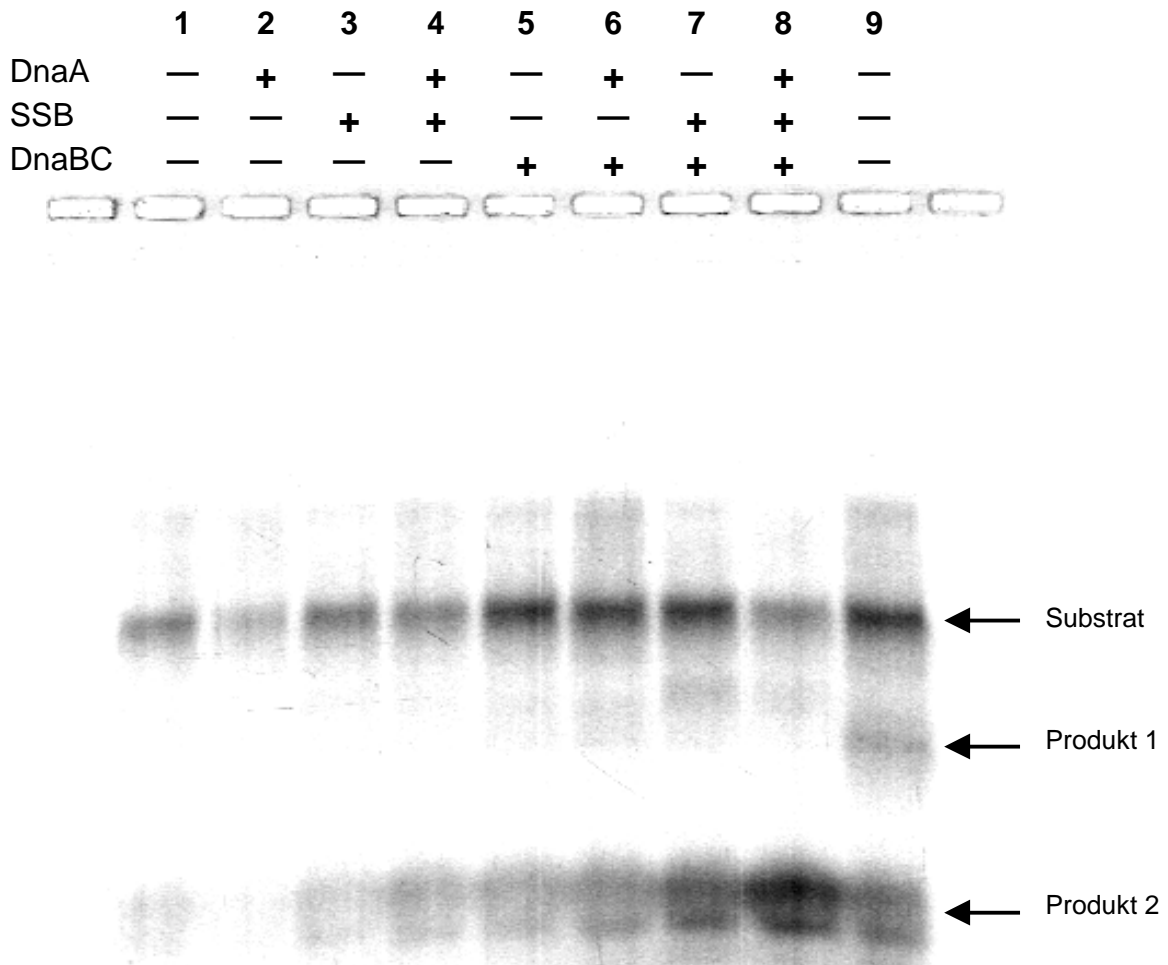


Abb. 24: Agarosegel vom Substrat 158_{LoriC}. Spur 1 enthält das Substrat ohne Proteinzugabe und Spur 9 eine Kombination des Substrates mit den möglichen Produkten. Die Tabelle gibt die in den einzelnen Spuren zugegebenen Proteine an.

Bindung von DnaA an die DnaA-Box im Substrat 158_{LoriC} oder von SSB an die Einzelstrangregionen hatte keinen Einfluß auf das Substrat 158_{LoriC} (Abb. 24, Spur 2,3 +4). Nur in Gegenwart von DnaA, SSB und dem Helikasekomplex war eine

deutliche Bildung von Produkt 2 zu sehen (Abb. 24, Spur 8). Die Helikase wurde von DnaA auf den unteren DNA-Strang (*oriC*-Sequenz) geladen und verdrängt den Fluorescein markierten DNA-Strang. In Abwesenheit von DnaA wurde der Helikasekomplex nicht auf den Einzelstrang geladen (Abb. 24, Spur 5). Die Abhängigkeit der Reaktion nicht nur von DnaA, sondern auch von SSB, kann an der Struktur des Substrates liegen.

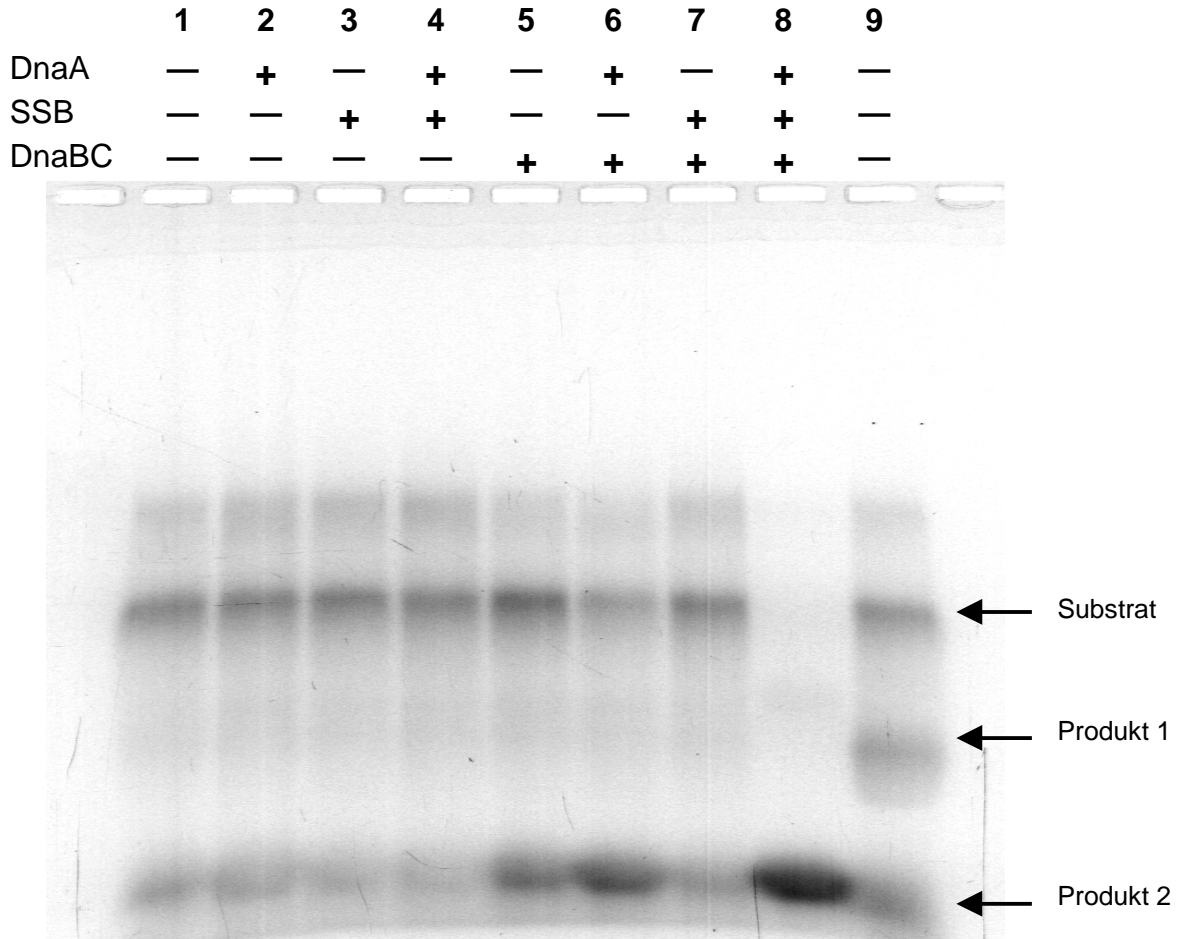


Abb. 25: Agarosegel vom Substrat 158_{UoriC}. Spur 1 enthält das Substrat ohne Proteinzugabe und Spur 9 eine Kombination des Substrates mit den möglichen Produkten. Die Tabelle gibt die in den einzelnen Spuren zugegebenen Proteine an.

Das Substrat 158_{UoriC} wurde verwendet, um den Einfluß der Sequenz des Einzelstranges auf das Laden zu untersuchen. Im Substrat 158_{LoriC} wurde die Helikase auf den unteren DNA-Strang mit *oriC* Sequenz geladen. Sollte DnaA die Helikase spezifisch auf einen Einzelstrang mit *oriC* Sequenz laden, müßte die Helikase im Substrat 158_{UoriC} auf den oberen DNA Strang geladen werden. Ist das

Laden der Helikase unabhängig von der Sequenz des Einzelstranges, sollte die Helikase im Substrat 158_{U_{oriC}} ebenfalls auf den unteren DNA Strang geladen werden.

In Gegenwart von DnaA, SSB oder dem DnaBC-Komplex allein konnte kein Produkt beobachtet werden (Abb. 25, Spur 2, 3, 4 +5). Erst durch Zugabe von DnaA und dem DnaBC-Komplex zusammen (Abb. 25, Spur 6) war eine Abnahme des Substrates und eine Zunahme vom Produkt 2 zu beobachten. SSB scheint das Laden der Helikase durch DnaA zu erleichtern (Abb. 25, Spur 8). Die Helikase wird wie beim Substrat 158_{L_{oriC}} auf den unteren Strang geladen. Das Laden erfolgt nicht auf den der DnaA-Box direkt benachbarten Einzelstrang, sondern in einiger Entfernung auf den sehr kurzen Fluorescein markierten Einzelstrang (10 Nukleotide nicht-*oriC*-Sequenz).

Beide Substrate eignen sich, um das DnaA abhängige Laden der Helikase *in vitro* näher zu charakterisieren und liefern die gleichen Ergebnisse. Die Helikase wird jeweils auf den unteren DNA-Strang geladen. Eine Sequenzabhängigkeit ist beim Laden nicht zuerkennen. Das Laden ist nicht nur von DnaA, sondern auch von SSB abhängig. Wahrscheinlich nimmt das Substrat nach Zugabe von SSB eine Konformation an, die es dem DnaA erleichtert, die Helikase zu laden. Durch den Einzelstrang ist die Struktur des Substrates sehr flexibel.

