

4. Diskussion

Im ersten Teil der Diskussion wird auf die Interaktion vom Initiatorprotein DnaA mit der replikativen Helikase DnaB eingegangen. Beide Proteine interagieren direkt und spezifisch *in vivo* und *in vitro* miteinander. Die Interaktion von DnaA mit DnaB ist unabhängig von der Nukleotid-Form, die das DnaA gebunden hat, und benötigt keinen DNA Kontakt der Proteine. Im zweiten Teil wird die DnaA - DnaA Interaktion diskutiert. Die Selbstinteraktionsdomäne von DnaA überlappt mit der N-terminalen DnaA - DnaB Interaktionsdomäne und ist zusammen mit der minimalen DNA Bindedomäne notwendig und ausreichend für die Initiation der pSC101 Replikation. Der letzte Teil der Diskussion befaßt sich mit dem DnaA-abhängigen Laden der Helikase *in vitro*. Dabei zeigt sich, das ein DnaA Monomer ausreichend ist um die Helikase auf einen benachbarten Einzelstrang zu laden.

4.1 Interaktion von DnaA und DnaB

4.1.1 Interaktion von DnaB mit DnaA führt zur Suppression des kälte-sensitiven Phänotypes von *dnaA219*

Die *dnaA* Mutante *dnaA219*(Cos) zeigt einen kälte-sensitiven Phänotyp (Cos) auf Grund einer leichten aber letalen Überinitiation der Chromosomenreplikation (Kellenberger-Gujer et al., 1978). Bei 42 °C wird die Überinitiation toleriert. Überexpression von DnaA Derivaten, die um die Bindestellen im *oriC* bzw. um die Homointeraktionsdomäne(n) bei DnaA kompetieren, führen zu einer Inhibierung der Initiation und zum Wachstum bei 30 °C (Weigel et al., 1999).

Auch Überexpression von DnaB führt zur Suppression des kalt-sensitiven *dnaA219* Stammes WM2667. Die Überexpression von DnaB und DnaC zusammen kann den *dnaA219* Stamm nicht supprimieren. Eine Überexpression von DnaB allein führt nicht zu einer erhöhten Bildung vom DnaB₆C₆-Komplex und nicht zu einem verstärkten Laden der Helikase. Im Gegensatz zur DnaC Überexpression (Skarstad und Wold, 1995) hat eine Überexpression von DnaB keinen Einfluss auf bereits gestartete Helikasen/Replikationsgabeln. Eine direkte Interaktion von DnaB mit DnaA muß daher der Grund der Suppression von *dnaA219* sein. Sie verringert die Menge an freiem DnaA und resultiert in einer Verminderung der Initiation der Replikation, wodurch der *dnaA219*-Stamm in die Lage versetzt wird bei 30 °C zu wachsen. Mit Hilfe der Fähigkeit von DnaB den kalt-sensitiven Phänotyp von

dnaA219 zu supprimieren, konnte ein Bereich identifiziert werden (DnaB aa 203-213), der im Kontext mit den 52 N-terminalen Aminosäuren (bio-DnaB[154-206]) oder mit den benachbarten C-terminalen Aminosäuren (bio-DnaB[203-471]) ausreicht, den Stamm WM2667 zu supprimieren. Wir schließen daraus, dass dieses Peptid wahrscheinlich eine Interaktionsdomäne von DnaB mit DnaA beinhaltet.

4.1.2 DnaA Domäne 1, 3 und 4 sind für das Laden der Helikase essentiell

Um zu untersuchen, welche Region(en) von DnaA an dem Laden der Helikase beteiligt sind, muss das Laden der Helikase von anderen Schritten abgekoppelt werden, in die DnaA während der Initiation involviert ist. Beim Plasmid pYTC mit einem chimären Origin (*oriV**_{RSF010}) ist das DnaA abhängige Laden der Helikase von dem Aufschmelzen der DNA abgekoppelt.

Bei der minimalen DNA-Bindedomäne von *E. coli* DnaA handelt sich um eine funktionelle Einheit (Roth und Messer, 1995). Die DNA-Bindedomäne ist für die Initiation der Replikation am *oriV**_{RSF010} essentiell, kann aber durch die DNA-Bindedomäne von *B. subtilis* DnaA funktionell ersetzt werden. Bei der Klonierung des chimären Origins (*oriV**_{RSF010}) wurde nur eine Orientierung der DnaA-Box erhalten (Taguchi et al., 1996). Die Orientierung der DnaA-Box – und damit die Orientierung des DnaA-Proteins – in Bezug auf die aufgeschmolzene Region ist für das Laden der Helikase kritisch. Die Helikase kann nur geladen werden, wenn sich die aufgeschmolzene Region am 5'-Ende der DnaA-Box (5'-TT^A/_TTNCACA) befindet (*oriC* Situation bei *E. coli* und *B. subtilis*, *oriV**_{RSF010}). Ein DnaA-Protein bestehend aus *B. subtilis* DnaA Domäne I-III und *E. coli* DnaA Domäne 4 ist nicht in der Lage pYTC Replikation zu initiieren. Das bedeutet, dass die Spezifität der Interaktion zwischen *E. coli* DnaA und der Helikase in Domäne 1-3 von *E. coli* DnaA liegt und DnaA Domäne 4 nicht an einer direkten Interaktion mit der Helikase beteiligt ist.

Der DnaA N-Terminus (aa 1-77) ist essentiell für die Homooligomerisierung vom DnaA (Weigel et al., 1999). Eine Deletion der ersten 23 Aminosäuren von DnaA resultiert in einem Protein (DnaA[24-467]) das die Helikase noch laden kann (pYTC-Test). Für die Interaktion von DnaA mit dem Helikasekomplex (DnaB₆C₆) ist folglich keine Oligomerisierung über Domäne 1 vom DnaA-Protein nötig. Der *E. coli* DnaA N-Terminus (aa 24-86) ist also wichtig für die Helikaseladeaktivität vom

DnaA. Bereits kleine Deletionen oder Punktmutationen in diesem Bereich verhindern, dass die Helikase geladen werden kann.

Die zentrale Domäne 3 von DnaA besteht aus einer "open twisted α/β Struktur" und beinhaltet ein ATP-Bindemotiv vom "Rossmann fold" Typ (Rossmann et al., 1974; Schaper und Messer, 1997). Diese Region zeigt Homologie zu der ATP-Bindedomäne vom DnaC (Koonin, 1997) und viele Mutationen in temperatursensitiven Stämmen (ts und Cos) sind in Domäne 3 lokalisiert. Die Initiation der chromosomalen DNA Replikation, im Besonderen das Aufschmelzen der AT-reichen Region, benötigt ATP-DnaA (Sekimizu et al., 1987; Hsu et al., 1994). Beide Nukleotidformen vom DnaA (ATP-DnaA und ADP-DnaA) und das nukleotidfreie DnaA (DnaA[1-467,K178A]) sind jedoch in der Lage die Helikase *in vivo* zu laden. DnaA Derivate mit Mutationen innerhalb von Domäne 3, die vermutlich die Struktur der Domäne 3 verändern, können die Helikase nicht laden. Daraus lässt sich schließen, dass für das Laden der Helikase eine intakte, nukleotidbindefähige Domäne 3 von DnaA benötigt wird.

4.1.3 DnaA und DnaB besitzen zwei Interaktionsdomänen

Die Ergebnisse vom pYTC-Test lassen keine Aussage zu, ob die inaktiven DnaA-Proteine nicht mit der Helikase interagieren können oder ob sie mit der Helikase interagieren, diese aber nicht laden können. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden ausgewählte DnaA und DnaB Derivate in dem Solid-Phase Protein Binding Assays getestet.

Unabhängig davon, welches Protein immobilisiert wurde, können beide Proteine (DnaA und DnaB) miteinander interagieren. Die Interaktion benötigt keinen DNA-Kontakt. DnaB[154-471] und DnaB[154-203] verhalten sich genauso wie wtDnaB

Der DnaA N-Terminus (aa 24-86) ist notwendig um mit der Helikase zu interagieren. DnaA-Derivate mit Deletionen oder Punktmutation innerhalb dieser Region führen zu einem Verlust der Interaktion mit DnaB und können deswegen die Helikase im pYTC-Test nicht laden.

Nach der Deletion vom DnaA N-Terminus (aa 1-86) kann das Protein nicht mehr mit wtDnaB und dem DnaB $\beta\gamma$ -Terminus (aa 154-471) interagieren, aber mit dem DnaB α -Fragment (aa 1-156). Das zeigt, dass beide Proteine zwei Interaktionsdomänen besitzen, wobei die Interaktionsdomäne vom DnaB α -

Fragment für DnaA nur zugänglich ist, wenn das DnaB α -Fragment von $\beta\gamma$ -Fragment getrennt ist. Die primäre Interaktion findet vom DnaA N-Terminus (aa 24-86) mit dem DnaB $\beta\gamma$ -Fragment, bzw. DnaB aa 203-213, statt und führt zur Suppression der *dnaA219(Cos)*. Die DnaA Domäne 3 (aa 135-149) wechselwirkt mit dem DnaB α -Fragment (aa 1-154).

Der Ladepartner von DnaB, das DnaC Protein, interagiert unter anderem mit dem flexiblen Bereich um Aminosäure 140 von DnaB (Dixon, 1999). Dreidimensionale Imagerekonstruktion von 'cryoelectron microscopy images' und elektronenmikroskopische Aufnahmen von $DnaB_6C_6$ legen eine Interaktion von DnaC mit dem DnaB α -Fragment nahe (San Martin et al., 1998; San Martin et al., 1995). Die sekundäre Interaktionsdomäne von DnaB mit DnaA ist vermutlich normalerweise von DnaC verdeckt (Abb. 26). Während des Ladens der Helikase rekrutiert die primäre Interaktionsdomäne von DnaA (aa 24-86) die Helikase und verdrängt wahrscheinlich mit der sekundären Interaktionsdomäne (aa 129-149) den Ladepartner DnaC. Unklar ist ob es sich um ein 'aktives' Verdrängen von DnaC handelt oder ob DnaA die ATPase-Aktivität von DnaC stimuliert. Erst nachdem DnaC den DnaBC-Komplex unter ATP-Hydrolyse verlassen hat, kann DnaB doppelsträngige DNA entwinden. Ein Modell der Interaktionen von DnaB sowohl mit DnaA als auch mit DnaC zeigt Abb. 26.

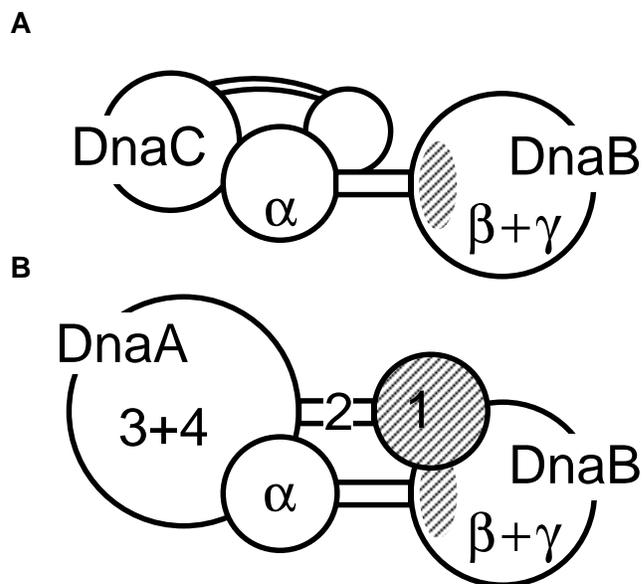


Abb. 26: Modell der Interaktion von DnaB mit DnaC (A) und mit DnaA (B)

Die Region von DnaB, die mit DnaA interagiert (DnaB aa 154-203), überlappt bzw. grenzt an die Interaktionsdomänen von DnaB mit dem Initiatorprotein π vom Plasmid R6K (DnaB aa 183-219) (Ratnakar et al., 1996) bzw. mit dem Initiatorprotein RepA vom pSC101 (DnaB aa 208-261) (Datta et al., 1999). Für die Interaktion von DnaA mit DnaB wurde ein Bereich hinter Position 261 von DnaB vorhergesagt (Datta et al., 1999). Das würde bedeuten, dass die Interaktionsdomänen von DnaB mit den einzelnen Initiatorproteinen aufeinanderfolgend angeordnet sind. Auf Grund der hier gezeigten Ergebnisse, ist eine Interaktion von DnaA mit dieser Region von DnaB eher unwahrscheinlich. Das zentrale Lysin K236 von DnaB ist für die Bindung von ATP notwendig (Fang et al., 1999) und ist das Kernmotiv des Walker A –Motivs (aa 223-244 von DnaB). Das DnaB β -Fragment (aa 151-300) beinhaltet die vollständige ATPase von DnaB (Biswas und Biswas, 1999a). Die vorhergesagte Interaktionsdomäne von DnaB mit DnaA befindet sich also mitten in der ATPase-Domäne von DnaB.

Die *E. coli* Primase DnaG interagiert während der Replikation ebenfalls mit der Helikase. Die Region von DnaB, die mit der Primase interagiert, umfaßt Aminosäure 210-246 (Ratnakar et al., 1996). Diese Interaktion ist für eine koordinierte Synthese der Primer notwendig.

Aus den *in vivo* Daten (Cos-Suppression) und den *in vitro* Daten (SPP-Assay) läßt sich schließen, dass ein Bereich von aa 203-213 von DnaB im Zusammenhang mit den benachbarten N-terminalen (DnaB[154-206]) oder C-terminalen Aminosäuren (DnaB203-471) für eine Interaktion von DnaB mit DnaA ausreicht. Die Region (aa 203-213 von DnaB) befindet sich am Ende des flexiblen Linkers und dem Anfang vom DnaB C-Terminus. Es scheint sich dabei um eine universelle Interaktionsdomäne von DnaB mit Proteinen, die an der Replikation beteiligt sind, zu handeln. Für die Spezifität von DnaB mit den einzelnen Proteinen ist wahrscheinlich eine zweite Interaktionsdomäne verantwortlich. Im Falle der DnaB-DnaA Interaktion wird die Spezifität durch die Interaktion vom DnaB α -Fragment mit DnaA Domäne 3 hergestellt.

4.2 Selbstinteraktion von DnaA

4.2.1 DnaA oligomerisiert über den N-Terminus

Aus den *in vivo* (pYTC-Test) und den *in vitro* (SPP-Test) Daten ergibt sich, dass DnaA über den N-Terminus mit DnaB interagiert. Ferner war bekannt, dass der DnaA N-Terminus für eine DnaA-DnaA Interaktion wichtig ist. Unter Zuhilfenahme des Solid Phase Protein Binding Assay wurde versucht, die Interaktionsdomänen voneinander abzugrenzen. Dazu wurden im Solid-Phase Protein Binding Assay biotinyliertes DnaA bzw. DnaA Derivate mit wtDnaA bzw. DnaA[87-467] inkubiert.

Eine DnaA-DnaA Interaktion findet statt, wenn beide Proteine (immobilisiertes bio-DnaA Derivat und überexprimiertes DnaA Derivat) eine intakte Domäne 1 besitzen. Die Interaktion ist unabhängig von dem nativen Kontext des N-Terminus, der Nukleotidbindung von Domäne 3 und der DNA-Bindung von Domäne 4. Der isolierte N-Terminus in bio-DnaA[1-86] bzw. bio-DnaA[1-77] zeigt keinen Unterschied im Test im Vergleich zum bio-wtDnaA. Das bedeutet, dass der DnaA N-Terminus (aa 1-77) notwendig und ausreichend für die Selbstinteraktion von DnaA ist. Die Domäne für die Selbstinteraktion von DnaA überlappt fast vollständig mit der Interaktionsdomäne für DnaB, wobei die ersten 23 Aminosäuren essentiell für eine spezifische DnaA-DnaA Interaktion sind. Für eine DnaA-DnaA Interaktion werden Aminosäuren 1-77 und für eine DnaA-DnaB Interaktion Aminosäuren 24-86 benötigt.

Die Initiatorproteine der Plasmide PS10, R6K und vom Phagen Φ 29 binden als Dimer an Ihre Erkennungssequenz. Die Dimerisierung findet über ein Helix-Loop-Helix Motiv im C-Terminus (DNA-Bindedomäne) statt (Giraldo et al., 1998) (Bravo und Salas, 1998) (Wu et al., 1997). Die Proteine können zusätzlich über den N-Terminus oligomerisieren. Im Gegensatz zu den plasmidkodierten Initiatorproteinen bindet DnaA als Monomer an seine Erkennungssequenz (Fuller et al., 1984; Schaper und Messer, 1995).

Aminosäuresequenzen, die als α -Helix angeordnet, eine hydrophobe Seite ausbilden können nennt man Leucin-zipper. Leucin-zipper stellen potentielle Dimerisierungsdomänen dar. Für die Initiatorproteine RepA, P1 und π konnte eine Oligomerisierung über den Leucin-zipper gezeigt werden. Im DnaA N-Terminus befindet sich ein konservierter Leucin-zipper, der für die Oligomerisierung eine Rolle spielen könnte (siehe Tabelle 6).

| Organismus/ Plasmid | Protein | Sequenz |
|--|---------|---|
| <i>E. coli</i> | DnaA | MSLSLWQQCLARLQDELPA ^L TEFSMWIRPLQAE ^L SDNTLALY |
| <i>P. spec</i> / PS10 ^a | RepA | MVENKVTQSNKLI ^E SSHTLT ^L LN ^E KRLV ^L CAASLIDSRKPLPKDGYLTIRA |
| <i>B. subtilis</i> / Φ29 ^b | P1 | MIDLELEK ^K MTKLEHENKLMKNALYELSRMENNDYATWVIK |
| R6K ^c | π | NELNHTLAQLPLPAKRVMYMALAPIDSKEPL |

Tabelle 6: N-terminale Sequenzen von DnaA, RepA, P1 und π. Aminosäuren die in die Ausbildung eines Leucin-Zippers involviert sein könnten, sind hervorgehoben. Die Aminosäuresequenz beginnt jeweils mit dem ersten Methionin, mit Ausnahme von π, das mit einem Asparagin (N) beginnt. a) (Giraldo et al., 1998) b) (Bravo und Salas, 1998) c) (Wu et al., 1997)

4.2.2 pSC101 Replikation benötigt DnaA Domäne 1 und 4

Die Initiation vom pSC101 ist DnaA abhängig. Im Origin vom pSC101 befinden sich zwei DnaA-Boxen im Abstand von ca. 150 Bp. Nur wenn beide DnaA-Proteine miteinander interagieren, kann die AT-reiche Sequenz vom Origin zusammen mit RepA aufgeschmolzen werden. Somit sind nur DnaA-Derivate die miteinander interagieren können, in der Lage die Replikation von pSC101 zu initiieren.

Für die pSC101 Replikation werden nur Domäne 1 und 4 von DnaA benötigt. Bereits kleine Deletionen vom N-Terminus oder im N-Terminus resultieren in einem Protein das nicht mit sich selbst interagieren kann und deswegen nicht mehr pSC101 replizieren kann. Der DnaA N-Terminus kann funktionell nicht durch die Oligomerisierungsdomäne vom λ cl Repressor ersetzt werden. Ein Austausch der ersten 20 Aminosäuren vom *E. coli* DnaA gegen die ersten 23 Aminosäuren vom *B. subtilis* DnaA führt zu einem inaktiven Protein. Das bedeutet, dass DnaA *in vivo* über den N-Terminus oligomerisiert und die ersten 23 Aminosäuren essentiell für eine spezifische *E. coli* DnaA-DnaA Interaktion sind.

Außer Domäne 1 wird nur die minimale DNA-Bindedomäne benötigt. Die Domänen 2 und 3 von DnaA (aa 87-372) sind für pSC101 Replikation entbehrlich und können durch den Biotin-tag vom pBEX5BA ersetzt werden. Ein Austausch der DNA-Bindedomäne von *E. coli* DnaA gegen die entsprechende Domäne von *B. subtilis* führt zu einem funktionellen chimären Protein und zeigt, dass die Domäne 4 nicht an einer Interaktion beteiligt ist, sondern nur der Verankerung dient. DnaA[1-363], DnaA[1-136,332-364] und DnaA[1-333] können pSC101 nicht

replizieren. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Ergebnissen, die zeigen, dass eine DnaA amber Mutation (DnaAam361) in der Lage ist den pSC101 zu replizieren (Sutton und Kaguni, 1997a). Die Unterschiede können in einem translationalen 'read-through' der amber Mutation oder einer stabileren Interaktion von DnaA mit der für die Selektion vom DnaAam361 verwendeten 'copy-number-up' *repA* Mutante (Tucker et al., 1984) liegen. In Übereinstimmung damit kann die Abhängigkeit der pSC101-Replikation von IHF durch Mutationen im *repA*-Gen oder im *topA*-Gen von *E. coli* überbrückt werden. Diese Mutationen können zu alternativen Konformationen am Origin führen, wodurch eine DnaA-RepA Interaktion in Abwesenheit von IHF möglich wird (Biek und Cohen, 1989a; Biek und Cohen, 1989b).

Im Promotor vom *dnaA* Gen befinden sich zwei dicht benachbarte DnaA-Boxen. Bindung an die DnaA-Boxen sowie an zusätzliche ATP-DnaA-Boxen im Promotor erfordert keine Oligomerisierung von DnaA über den DnaA N-Terminus (Speck et al., 1999). Die Interaktion von DnaA im Promotor des *dnaA* Genes unterscheidet somit sich von der 'long range' Interaktion die für die Initiation der pSC101 Replikation notwendig ist. Die 'long range' Interaktion im pSC101 erfolgt über den DnaA N-Terminus und ist unabhängig von der Domäne 3.

Viele Plasmide benötigen zusätzlich zu ihrem eigenem Initiatorprotein Wirts-DnaA. Die Funktion vom DnaA ist dabei je nach Plasmidsystem unterschiedlich. DnaA kann in die Stabilisierung eines spezifischen DNA-Initiatorproteinkomplexes involviert sein (pSC101-Replikation). Im Plasmid F ist DnaA verantwortlich für das Laden der Helikase (Kawasaki et al., 1996). Alternativ kann DnaA zur Bildung des offenen Komplexes zusammen mit dem Plasmidinitiatorprotein führen, wie bei den Plasmiden R6K und RK2, wobei im Falle vom RK2 die Helikase durch das plasmidkodierte Initiatorprotein geladen wird (Datta et al., 1999; Konieczny et al., 1997).

4.3 DnaA abhängiges Laden der DnaB Helikase *in vitro*

Ein wichtiger Schritt bei der Initiation der Replikation ist das Laden der Helikase. Nur wenn zwei Helikasen koordiniert am *oriC* geladen werden, ist eine bidirektionale Replikation gewährleistet. Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, dass das Laden der Helikase auf einen Einzelstrangbereich unabhängig von der Sequenz des Einzelstranges ist. Während des Ladens der Helikase orientiert das DnaA-

Protein an der R1-Box die Helikase so, das sie nur auf den unteren Strang geladen werden kann. Die Helikase für den oberen Strang kann nicht von einem DnaA-Protein, das an die R1-Box gebunden hat, geladen werden.

4.3.1 DnaA abhängiges Laden der DnaB Helikase ist nicht sequenzspezifisch

Das Plasmid pOCBS besitzt einen chimären Origin, bei dem die AT-reiche Region vom *E. coli oriC* gegen die AT-reiche Region vom *B. subtilis oriC* ausgetauscht wurde. Das Plasmid kann *in vivo* nicht vom chimären Origin aus die Replikation initiieren. *E. coli* DnaA kann den chimären Origin aufschmelzen. Weiterhin zeigt der FI*-Test, dass die Helikase in dem so entwundenen Origin geladen werden kann. Der FI*-Test mißt das Laden und die Aktivität der Helikase als Bildung einer veränderten negativen Superspiralisierung des Plasmides durch die Helikase und die Gyrase. Im Agarosegel können die beiden Formen FI und FI* getrennt werden.

Die Anordnung und Orientierung der 5 DnaA-Boxen im *E. coli oriC* ist ausreichend um eine benachbarte AT-reiche Region aufzuschmelzen. Beim Aufschmelzen spielen sogenannte ATP-DnaA-Boxen in der AT-reichen Region eine Rolle. Diese ATP-DnaA-Boxen sind zwischen den AT-reichen Regionen von *B. subtilis* und *E. coli oriC*, sowohl was den Abstand als auch was die Anzahl betrifft, konserviert (persönliche Mitteilung C.Speck). Die Anordnung der DnaA-Boxen im *E. coli oriC* ist ausreichend um mindestens eine Helikase zu laden. Über die Anzahl der geladenen Helikasen am chimären Origin im pOCBS im Vergleich zum *E. coli oriC* (pOC180) läßt sich keine Aussage machen. Die Initiation der Replikation ist auf der Stufe des Aufschmelzens bzw. der Bildung des Nukleoproteinkomplexes reguliert. *E. coli* kann sowohl die Menge an DnaA-Protein als auch die Nukleotidform von DnaA (ATP oder ADP-DnaA) regulieren (Speck et al., 1999). Zum Laden der Helikase durch DnaA ist eine einzelne DnaA-Box neben einer Einzelstrangregion *in vivo* (pYTC-Test) und *in vitro* (4.2.2) ausreichend. Die Sequenz der Einzelstrangregion hat keinen Einfluß auf das Laden.

Das Aufschmelzen der DNA des chimären Origins scheint *in vitro* einfacher zu funktionieren als das des *oriC*. Der Einfluß vom Histon-ähnlichem Protein HU ist deutlich geringer. Warum die Replikation *in vivo* nicht vom chimären Origin initiiert werden kann, ist unklar.

4.3.2 Die DnaA-Box R1 im *oriC* lädt die Helikase auf den unteren Strang

Mit den artifiziellen Substraten kann das Laden der Helikase durch DnaA *in vitro* untersucht werden. Die Substrate ahmen den aufgeschmolzenen Bereich am *E. coli oriC* nach (2.2.2.16). DnaA bindet an die DnaA-Box und lädt die Helikase. Gel-shift Experimente zeigen, dass mehr als ein DnaA pro Substrat (pro DnaA-Box) binden kann, wobei das zweite DnaA wahrscheinlich mit dem oberen Einzelstrang interagiert. Ob das zweite DnaA direkt an dem Laden der Helikase beteiligt ist oder nur eine Struktur stabilisiert, die es dem DnaA an der R1-Box ermöglicht die Helikase zu laden, kann mit diesem Substrat nicht eindeutig geklärt werden. Die Bindung von DnaA an die AT-reiche Region im *oriC* unterstützt möglicherweise das Aufschmelzen der DNA und stabilisiert den aufgeschmolzenen Bereich (persönliche Mitteilung C.Speck).

Die Helikase wird von DnaA bei beiden Substraten auf den unteren Strang geladen. Das Laden der Helikase ist unabhängig von der Sequenz des unteren Stranges. Im Falle vom Substrat 158_{UoriC} wird die Helikase auf den 10 Nukleotide langen Einzelstrangbereich geladen (Abb. 27).

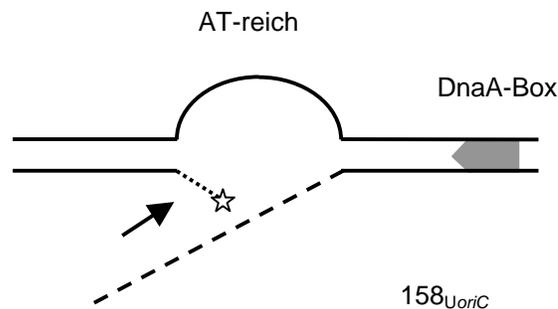


Abb. 27: Substrat 158_{UoriC} . Der Pfeil markiert den Einzelstrang auf den die Helikase geladen wird.

Der zentrale Tunnel von DnaB reicht aus um einen Einzelstrangbereich von ~20 Nukleotiden zu bedecken (Bujalowski et al., 1994). Die Helikase wird im Falle vom Substrat 158_{UoriC} auf einen 10 Nukleotide langen Einzelstrang geladen. Das bedeutet, dass nur ein Teil der Helikase (das $\beta\gamma$ -Fragment) den Einzelstrang beim Laden gebunden hat. Das $\beta\gamma$ -Fragment der Helikase besitzt eine ATPase-Aktivität, die durch Einzelstrang DNA stimuliert werden kann {Biswas & Biswas 1999 1743 /id}. Da nur ein intaktes DnaB im Helikasetest aktiv ist, folgt daraus, dass die Helikaseaktivität von DnaB sich wahrscheinlich im $\beta\gamma$ -Fragment von DnaB befindet.

Am aufgeschmolzenen *oriC* ist es möglich zwei Helikasen zu laden. Die Helikase für den unteren Strang wird zwischen Position 40 und 68 von *oriC* geladen (Fang et al., 1999). Dieser Bereich ist in den artifziellen Substraten einzelsträngig und beinhaltet den 10 Nukleotide langen Einzelstrang vom Substrat 158_{*UoriC*}. Daraus lässt sich schließen, dass die Helikase für den unteren Strang im *oriC* ebenfalls von dem DnaA auf der R1-Box geladen wird.

Die Helikase wird bei beiden Substraten (158_{*UoriC*} und 158_{*LoriC*}) auf den unteren Strang geladen. Die Helikase für den oberen Strang (2. Replikationsgabel) wird folglich von einem anderen DnaA geladen. Bei der Bildung des Initiationskomplexes bilden ca. 20 DnaA Monomere mit einem *oriC*-Bereich von ca. 220 Bp einen ellipsoiden Komplex (Crooke et al., 1993; Fuller et al., 1984; Funnell et al., 1987). Die DnaA-Box R2 könnte in einem solchen Komplex in eine räumliche Nähe zum aufgeschmolzenen Bereich kommen und die Helikase auf den oberen Strang laden. Die DnaA-Boxen M, R2, R3 und R4 sind *in vivo* zusammen mit der DnaA-Box R1 nicht nur für das Aufschmelzen der DNA verantwortlich, sondern möglicherweise auch für das Laden von der Helikase für den oberen Strang.

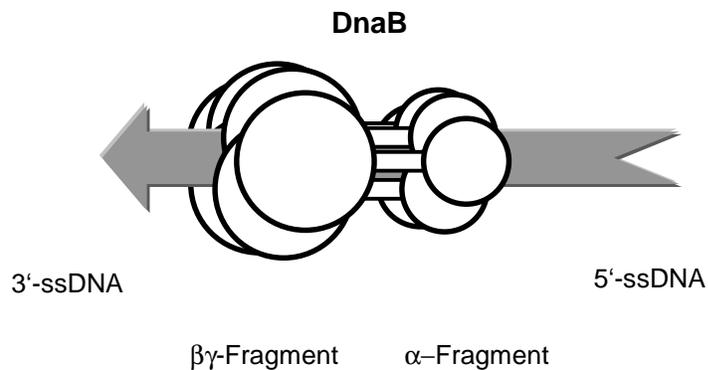


Abb. 28: Modell von DnaB mit ssDNA

Die Ergebnisse lassen sich in einem Modell zusammenfassen, das im folgenden diskutiert wird. Im DnaB-ssDNA Komplex befindet sich das 5'-Ende der ssDNA am DnaB N-Terminus (Abb. 28) (Bujalowski, 1999). Die Interaktion von DnaB mit DnaC und DnaA findet über das α -Fragment von DnaB bzw. der flexiblen Region zwischen den Domänen statt. Beim Laden der Helikase verdrängt DnaA das DnaC. Dadurch wird das DnaB so orientiert, dass das $\beta\gamma$ -Fragment von DnaB mit der Helikaseaktivität zum aufgeschmolzenen Bereich im *oriC* bzw. im Substrat zeigt. Das bedeutet, wenn das DnaA an der R1-Box die Helikase auf den unteren Strang

lädt, kann die Helikase sofort die dsDNA in 5'→3' Richtung entwenden (Abb. 29). Wird die Helikase auf den oberen Strang durch das DnaA-Protein an der DnaA-Box R1 geladen, ist die Orientierung der Helikase auf der DNA entgegen Ihrer Prozessivität. Um die DNA aktiv zu entwenden, wären größere Umlagerungen der Helikase nötig.

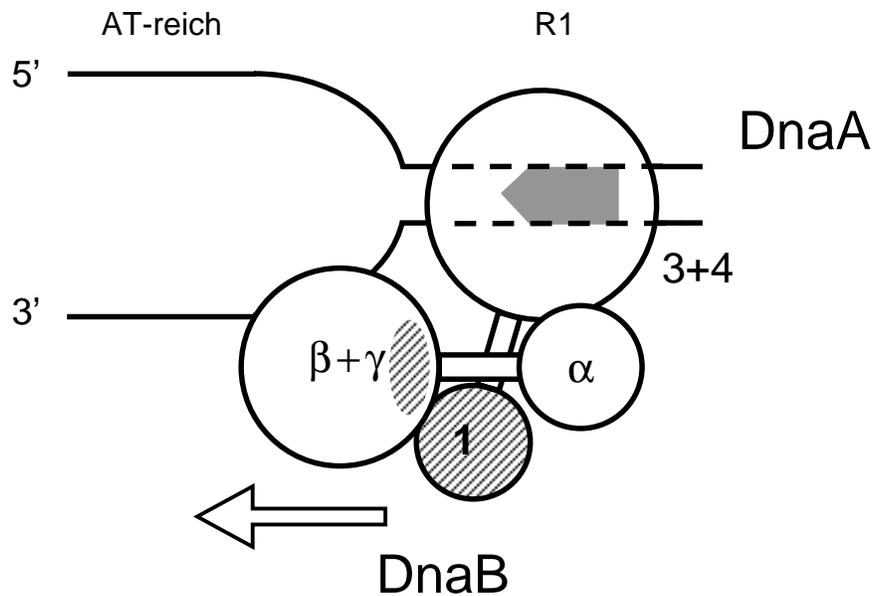


Abb. 29: Modell vom DnaA abhängigen Laden der Helikase am *oriC*.

