

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**

DOTTORATO IN BIOLOGIA APPLICATA - XVIII CICLO

Indirizzo:

*Fisiologia Animale, Vegetale e Microbica*

**Relazioni struttura-funzione  
della DNA elicasi MCM del crenarchaeon  
*Sulfolobus solfataricus***

**Dottorando:**

Biagio Pucci

**Relatore:**

Prof. Ezio Ricca

**Correlatore:**

D.ssa Francesca M. Pisani

**Coordinatore:**

Prof. Maurilio De Felice

**Triennio 2003-2006**

# INDICE

<b>Prefazione.....</b>	<b>pag. 3</b>
<b>Abbreviazioni.....</b>	<b>pag. 4</b>
<b>Sommario.....</b>	<b>pag. 5</b>
<b>1. Introduzione.....</b>	<b>pag. 8</b>
1.1 La replicazione del DNA	
1.2 Le DNA elicasi	
1.3 Il complesso MCM eucariotico	
1.4 Archaea come sistema modello	
1.5 Organizzazione strutturale delle DNA elicasi replicative	
1.6 Modelli ipotetici di funzionamento del complesso MCM	
<b>2. Risultati.....</b>	<b>pag. 20</b>
<b>Parte I</b>	
2.1 Identificazione di quattro residui aminoacidici basici (Lisine 129, 134 e 194 e Istidina 146) di SsoMCM putativamente responsabili del legame al DNA	
2.2 Stato oligomero ed attività ATPasica dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A	
2.3 Proprietà di legame al DNA dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A -H146A e -K194A	
2.4 Attività DNA elicastica dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A	
<b>Parte II</b>	
2.5 Identificazione dei putativi elementi di struttura $\beta$ - <i>hairpin fingers</i> nella sequenza aminoacidica di SsoMCM	
2.6 Stato oligomero ed attività ATPasica dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A	
2.7 Analisi del legame al DNA e dell'attività DNA elicastica dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A	
2.8 Produzione e caratterizzazione dei mutanti SsoMCM-S243C e SsoMCM-S243C/WA	
2.9 Analisi dei cambiamenti conformazionali degli ipotetici $\beta$ - <i>hairpin fingers</i> di SsoMCM mediante spettroscopia di fluorescenza	
<b>3. Discussione e conclusioni.....</b>	<b>pag. 42</b>
<b>4. Materiali e Metodi.....</b>	<b>pag. 48</b>
4.1 Mezzi di coltura ed antibiotici	
4.2 Ceppi batterici e vettori	
4.3 Preparazione di cellule competenti	
4.4 Mini e midi preparazione di DNA plasmidico	

- 4.5 Elettroforesi del DNA su gel di agarosio
- 4.6 Produzione dei costrutti genici pET19b-SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A, -K194A, -K246A, -R247A e -R250A
- 4.7 Produzione del costrutto genico pET28a-SsoMCM-*His tag*
- 4.8 Produzione dei costrutti genici pET28a-SsoMCM-S243C e -S243C/*WA*
- 4.9 Trasformazione dei ceppi di *E. coli* con DNA plasmidico
- 4.10 Espressione e purificazione dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A -K194A, -K246A, -R247A, -R250A e della proteina SsoMCM *wt*
- 4.11 Espressione e purificazione della proteina SsoMCM-*His tag* e dei mutanti SsoMCM-S243C e -S243C/*WA*
- 4.12 Determinazione della concentrazione proteica
- 4.13 Elettroforesi delle proteine su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)
- 4.14 Cromatografia ad esclusione molecolare
- 4.15 Western Blotting
- 4.16 Saggi di attività ATPasica
- 4.17 Saggi di legame al DNA
- 4.18 Saggi di attività DNA elicastica
- 4.19 Marcatura delle proteine SsoMCM-S243C e -S243C/*WA* utilizzando il fluoroforo *acrylodan*
- 4.20 Spettroscopia di fluorescenza
- 4.21 Metodi informatici

**5. Bibliografia.....pag. 65**

## **Prefazione**

Il lavoro scientifico riportato in questa tesi è stato svolto presso il laboratorio della Dott.ssa Francesca M. Pisani dell'Istituto di Biochimica delle Proteine (IBP) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Napoli.

La tesi consiste in un sommario e quattro capitoli.

Nel capitolo 1 sono riportati i modelli ipotetici sul funzionamento delle DNA elicasi proposti sulla base dei dati biochimici e strutturali raccolti su questi complessi proteici e descritti in una vasta letteratura scientifica da diversi gruppi di ricerca nel mondo.

Nel capitolo 2 sono descritti i Risultati sperimentali ottenuti.

Il capitolo 3 contiene la Discussione dei risultati sperimentali ottenuti, e si conclude con la proposta di un modello di funzionamento della DNA elicasi oggetto dello studio (MCM di *Sulfolobus solfataricus*).

Il capitolo 4 riporta i Materiali ed i Metodi utilizzati per lo svolgimento di questo lavoro sperimentale.

## Abbreviazioni

Acrylodan	6-acyl-2-dimethylaminonaphthalene
ADP-AIF <sup>4+</sup>	ADP-alluminio fluoruro
BSA	albumina da siero bovino
EDTA	acido etilendiamminotetra acetico
EM	<i>electron microscopy</i>
EMSA	<i>electrophoresis mobility shift assays</i>
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalatto-piranoside
LB	Luria-Bertani
OD	densità ottica
PAGE	elettroforesi su gel di poliacrilammide
PCR	reazione a catena della polimerasi
rpm	rotazioni per minuto
<i>wt</i>	<i>wild type</i>

## Sommario

Il progetto scientifico sviluppato durante il triennio del Dottorato di ricerca ha riguardato lo studio delle relazioni struttura-funzione della DNA elicasi dall'archaeon iper-termofilo *Sulfolobus solfataricus* (SsoMCM).

La replicazione del DNA negli eucarioti è caratterizzata dall'interazione di molti fattori proteici che coordinano in maniera altamente precisa una serie di eventi culminanti con la duplicazione del materiale genetico prima del completamento della divisione cellulare. Il completo sequenziamento del genoma di molte specie archeobatteriche ed i primi studi effettuati sul sistema replicativo di tali organismi indicano l'esistenza di una forte similitudine con il sistema eucariotico. Infatti, i complessi molecolari degli Archaea coinvolti nella replicazione del DNA sono costituiti da fattori proteici più simili a quelli eucariotici che non batterici e questo fa degli Archaea un ottimo modello di studio per comprendere i meccanismi biologici che regolano il complicato macchinario replicativo eucariotico.

Lo studio dell'ipotetica DNA elicasi replicativa SsoMCM è un perfetto esempio in tal senso. Infatti, nel genoma di *Sulfolobus solfataricus* è presente un unico omologo delle proteine che compongono il complesso proteico MCM 2-7 eucariotico (*Mini-Chromosome Maintenance*). Studi preliminari hanno evidenziato che SsoMCM è un omo-esamero ed appartiene alla super-famiglia delle ATPasi con varie Attività cellulari Associate (*AAA<sup>+</sup> super-family*), è in grado di legare differenti tipi di molecole di DNA e mostra un'attività DNA elicastica, ATPasi-dipendente, con polarità 3' → 5'.

Studi strutturali mediante microscopia elettronica ad elevata risoluzione e cristallografia ai raggi-X della proteina MCM dell'archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicum* (MthMCM) hanno dimostrato che essa è costituita da due esameri giustapposti, ciascuno dei quali delimita un canale centrale carico positivamente che si ritiene legghi il DNA. Grazie all'allineamento tra le sequenze altamente simili di MthMCM e di SsoMCM, perfezionato sulla base della struttura cristallografica recentemente risolta di un frammento di circa 300 residui di MthMCM, è stato possibile identificare aminoacidi con carica positiva di SsoMCM putativamente localizzati nel canale centrale e coinvolti nel legame al DNA. Tali aminoacidi (Lisine 129, 134, 194 ed Istidina 146) sono stati sostituiti con residui di Alanina mediante mutagenesi sito-diretta. Si è dimostrato che le proteine mutanti formano correttamente omo-esameri in soluzione e conservano una attività ATPasica paragonabile a quella della proteina *wild type*. Mediante analisi per EMSA e saggi enzimatici è stato possibile dimostrare che sono critici per il legame al DNA e/o l'attività DNA elicastica, mentre la sostituzione del residuo aminoacidico K134 con Alanina ha effetto solo sul legame al DNA a doppio filamento e non sul legame al DNA a singolo filamento né sull'attività DNA elicastica dell'enzima. Grazie alla analisi suddetta, sono stati individuati altri residui basici (Lisina 246 ed Arginine 247, 250) situati in  *$\beta$ -hairpin fingers* ipoteticamente orientati verso il canale centrale in SsoMCM. La loro sostituzione con Alanina determina una sostanziale riduzione sia del legame al DNA che dell'attività enzimatica. Inoltre, mediante tecniche di spettroscopia di fluorescenza sono stati monitorati cambi conformazionali di tali  *$\beta$ -hairpin fingers* promossi dal legame di SsoMCM a vari nucleotidi (ATP, ADP, ADP-AlF<sup>4-</sup>). L'effetto più importante si è osservato quando gli spettri sono stati registrati in presenza di ADP o ADP-AlF<sup>4-</sup>, un analogo dello stato di transizione della reazione

di idrolisi dell'ATP. Questi risultati suggeriscono che l'idrolisi, piuttosto che il legame, dell'ATP determina il movimento di tali elementi di struttura necessario per la funzione di *remodeling* del DNA da parte di SsoMCM.



# 1. Introduzione

## 1.1 La replicazione del DNA

La replicazione del DNA è un processo essenziale sia per gli organismi procariotici che eucariotici in quanto determina la duplicazione del materiale genetico durante la divisione cellulare.

In tutti gli organismi la replicazione inizia da punti precisi dei cromosomi: le sequenze di origine. Queste ultime presentano caratteristiche comuni come la presenza di elementi ripetuti ed invertiti (IR), ricchi in A e T. Sebbene tutte le origini abbiano caratteristiche simili fra loro, esse possono variare notevolmente in lunghezza potendosi estendere da 100 a 1000 paia di basi (bp) (Boulikas, 1996).

In *Escherichia coli* l'unico cromosoma presenta una singola origine di replicazione (*oriC*) dalla quale, la replicazione procede bi-direzionalmente sui due filamenti antiparalleli grazie all'attività della DNA polimerasi (Kornberg and Baker, 1992).

Negli eucarioti la situazione è più complessa, infatti si stima che circa 10000-100000 origini siano necessarie affinché possa essere duplicato il genoma organizzato in cromosomi multipli, così come tutto il macchinario replicativo degli organismi pluricellulari risulta essere più complesso.

## 1.2 Le DNA elicasi

Le DNA elicasi hanno un ruolo chiave in meccanismi cellulari di replicazione, riparazione e ricombinazione del materiale genetico. Esse, infatti, separano i due filamenti complementari che formano il DNA in reazioni enzimatiche

che richiedono l'idrolisi di nucleotidi-trifosfati (generalmente ATP; Matson and Kaiser-Rogers, 1990).

Sulla base del loro meccanismo di azione, le DNA elicasi possono essere suddivise in due classi: quelle con polarità 5'→3' e quelle con polarità 3'→5' a seconda della direzione in cui traslocano lungo il DNA a filamento singolo (Patel and Picha, 2000). Molte delle DNA elicasi più studiate ricoprono un ruolo centrale nella replicazione del genoma. Favorendo infatti l'apertura dell'elica dell'acido nucleico, esse consentono alla DNA polimerasi di copiare i due filamenti antiparalleli di DNA: un filamento in maniera continua (*leading strand*) e l'altro (*lagging strand*) con attività discontinua (frammenti di Okazaki). Tra le DNA elicasi replicative più ampiamente caratterizzate ci sono quelle dei batteriofagi T7 (gp4), T4 (gp41) e SPP1, il fattore DnaB di *E. coli*, la DNA elicasi del simian virus SV40 (LTag) e del virus del papilloma bovino (E1), il complesso MCM 2-7 eucariotico ed i suoi omologhi archeobatterici (*MCM-like*). Inoltre, sono state caratterizzate DNA elicasi di *E. coli* coinvolte in altri processi metabolici degli acidi nucleici, quali la ricombinazione e la terminazione della trascrizione come le proteine RuvA, RuvB e rho (Patel and Picha, 2000).

Visto il coinvolgimento delle DNA elicasi in diversi processi che riguardano gli acidi nucleici, non sorprende che difetti nel corretto funzionamento di queste molecole siano causa di molte malattie umane quali lo *xeroderma pigmentosum*, le sindromi di Bloom (Ellis *et al.*, 1995; Karow *et al.*, 1997), Werner e Cockayne (Yu *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998).

### 1.3 Il complesso MCM eucariotico

I geni MCM sono stati identificati per la prima volta nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* mediante analisi genetica di mutanti in cui si riduce notevolmente l'efficienza di inizio della replicazione del DNA e si verifica la perdita dei minicromosomi (Tye, 1999). Il complesso MCM eucariotico è un etero-esamero, formato da sei proteine paraloghe MCM 2, MCM 3, MCM 4, MCM 5, MCM 6 ed MCM 7 che da osservazioni al microscopio elettronico sembrano formare una struttura ad anello (Adachi *et al.*, 1997).

Studi genetici e biochimici hanno evidenziato che negli eucarioti il complesso MCM 2-7 (*Mini-Chromosome Maintenance*) svolge il ruolo di DNA elicasi replicativa (Labib and Diffley 2001). E' stato recentemente osservato che in estratti di uova di *Xenopus laevis* l'inattivazione del complesso MCM 2-7 in qualsiasi momento dopo l'inizio della replicazione del DNA determina l'inibizione dello "svolgimento" del cromosoma all'origine di replicazione e la conseguente terminazione di tale processo (Pacek and Walter, 2004; Shechter *et al.*, 2004). Questa è stata sicuramente una prova importante del fatto che il complesso MCM 2-7 è presente all'origine di replicazione ed è determinante per la progressione della forca replicativa nella fase S del ciclo cellulare.

Come è stato osservato per altre DNA elicasi replicative, il complesso MCM 2-7 possiede attività ATPasica. In ciascuna delle sei subunità, infatti, è presente il dominio strutturale caratteristico della super-famiglia delle proteine AAA+ (*ATPases with other associated cellular activities*). Questo è caratterizzato dai motivi di sequenza Walker A e Walker B, che contengono i residui aminoacidici critici per il legame e la idrolisi dei nucleotidi-trifosfato, e da un residuo di Arginina (*Arginine*

*finger*), che ha la funzione di neutralizzare la carica negativa sviluppata durante l'idrolisi dell'ATP (Chong, 2005).

Il complesso MCM 2-7, purificato da estratti cellulari di molte specie eucariotiche, non presenta attività DNA elicastica *in vitro*, mentre, il doppio trimero MCM 4/6/7 mostra tale attività con una polarità sul DNA 3'→5' in presenza di ATP o di dATP anche se con bassa processività (in grado cioè di aprire circa 30 bp del doppio filamento; Tye, 1999). Tale processività, comunque, risulta essere aumentata in presenza del fattore RPA (*Replication Protein A*; Lee *et al.*, 2001). Studi biochimici hanno evidenziato un ruolo inibitorio/regolatorio da parte del dimero MCM 3/5 e della subunità MCM 2 (Tye, 1999; Lee and Hurwitz, 2000).

#### **1.4 Archaea come sistema modello**

Gli Archaea sono stati identificati come “il terzo dominio dei viventi” (Woese *et al.*, 1990). Suddivisi in tre phyla principali (crenarchaeota, euryarchaeota e korarchaeota), essi presentano una morfologia cellulare procariotica con assenza di strutture nucleari, citoscheletro ed organelli (Edgell and Doolittle, 1997; Olsen and Woese, 1997). Come per i processi metabolici, anche l'organizzazione genomica sembra essere di tipo procariotico: infatti la replicazione del DNA per alcune specie studiate sembra prendere inizio da una singola origine e procedere bi-direzionalmente (Myllykallio *et al.*, 2000), mentre nel singolo cromosoma della specie *Sulfolobus solfataricus* (SsoMCM) sono state individuate tre attive origini di replicazione del DNA (Robinson *et al.*, 2004; Lundgren *et al.*, 2004).

La sequenza completa del genoma di molte specie archeobatteriche indica che i complessi molecolari coinvolti in processi quali replicazione, riparazione e

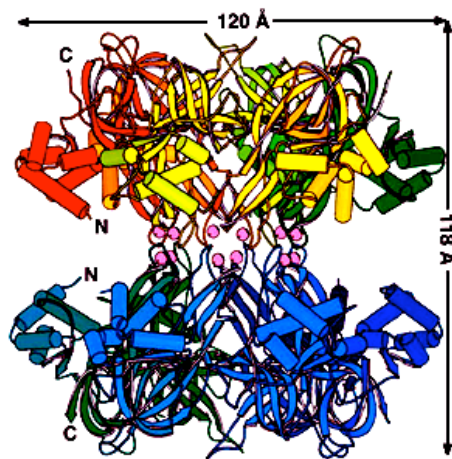
ricombinazione del DNA sono costituiti da fattori proteici più simili a quelli eucariotici che non batterici. Inoltre, alcune specie di euryarchaeota contengono omologhi di proteine istoniche eucariotiche che non si trovano nei batteri (Reeve *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1997). Queste evidenze fanno degli Archaea un modello semplificato da cui attingere informazioni utili alla comprensione dei meccanismi di replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA. In tutti gli Archaea dei quali è nota la sequenza genomica completa è presente un unico omologo delle proteine MCM eucariotiche, ad eccezione della specie *Methanococcus jannaschii* nel cui genoma ne sono stati identificati quattro (Bult *et al.*, 1996). Le proteine MCM archeobatteriche più studiate derivano dalle specie: *Methanobacterium thermautotrophicum* (MthMCM), (Kelman *et al.*, 1999) *Sulfolobus solfataricus* (SsoMCM), (Carpentieri *et al.*, 2002) e *Archaeoglobus fulgidus* (AfuMCM) (Grainge *et al.*, 2003). Esse sono più simili nella struttura primaria alla proteina MCM 4 che non alle altre proteine MCM eucariotiche.

Studi biochimici sulla proteina MthMCM indicano un'organizzazione molecolare di tipo doppio-esamerico e caratteristiche simili a quelle del complesso eucariotico MCM 4/6/7. Come quest'ultimo, MthMCM ha un'attività DNA elicastica ATPasi-dipendente con polarità 3'→5', capacità di legare il DNA a filamento singolo ed un'attività ATPasica stimolata dal DNA (Chong *et al.*, 2000; Shechter *et al.*, 2000). Invece SsoMCM forma omo-esameri in soluzione (440 kDa) e mostra un'attività ATPasica non stimolata dal DNA. L'attività DNA elicastica di SsoMCM è stimolata dalla proteina SSB (*Single-Stranded DNA-Binding Protein*) e che le due proteine interagiscono fisicamente (Carpentieri *et al.*, 2002). Inoltre, si è dimostrato che SsoMCM lega differenti tipi di molecole di DNA. Studi di EMSA hanno infatti evidenziato che SsoMCM presenta una maggiore affinità per molecole di DNA che

presentano giunzioni singolo-doppio filamento o che sono strutturalmente simili alla bolla replicativa (De Felice *et al.*, 2004).

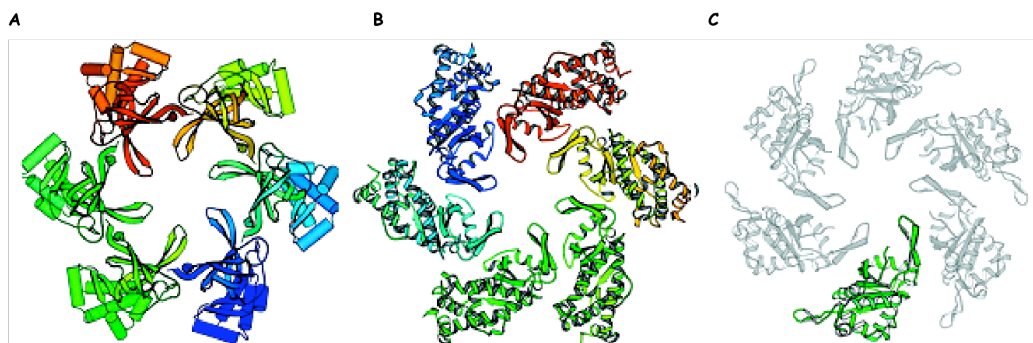
## **1.5 Organizzazione strutturale delle DNA elicasi replicative**

Una caratteristica che accomuna le DNA elicasi replicative è la loro struttura oligomerica. La combinazione di tecniche biochimiche, quali gel filtrazione analitica ed ultracentrifugazione analitica, ed osservazioni al microscopio elettronico, ha evidenziato un'organizzazione molecolare di tipo esamerico (o doppio-esamerica) ad anello, formante un canale centrale. Questa architettura, tipica anche di altre proteine che legano il DNA (come per esempio i PCNA *proliferating cell nuclear antigen*), permette all'acido nucleico di alloggiarsi all'interno di tale canale centrale e consente di ridurre sensibilmente una "facile" dissociazione DNA-proteina, favorendo così un'elevata processività enzimatica che è fondamentale per i processi di replicazione o di ricombinazione (Patel and Picha, 2000). La determinazione della struttura cristallografica ai raggi-X del frammento N-terminale (1-286 aminoacidi) di MthMCM ha evidenziato per la prima volta i dettagli molecolari attraverso i quali è organizzato il doppio-esamero: i motivi leganti lo zinco (*Zinc-binding motifs*) all'N-terminale mediano l'interazione dei due opposti esameri posizionati in una configurazione testa-testa (Fletcher *et al.*, 2003; Fig. 1).



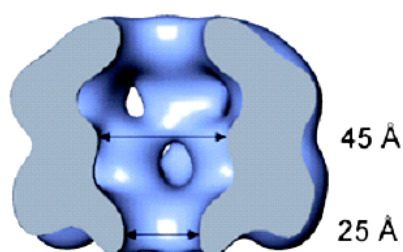
**Fig. 1. Sezione della struttura cristallografica ai raggi-X di MthMCM.** I singoli monomeri sono evidenziati da colori diversi; gli elementi secondari di struttura  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -strand sono rappresentati da cilindri e frecce rispettivamente; i 12 atomi di zinco (rosa) sono posizionati nella parte centrale del doppio-esamero mediando l'interazione tra i due esameri (Fletcher, 2003).

Un'importante caratteristica che emerge dall'analisi della struttura cristallografica di MthMCM è la presenza nel canale centrale di una forte carica positiva dovuta ad aminoacidi basici le cui catene laterali sono rivolte proprio verso l'interno del canale e alla presenza di sei elementi di struttura fortemente basici ( $\beta$ -hairpin fingers) anch'essi orientati verso l'interno del canale (Fig. 2A). Studi di mutagenesi sito-specifica dei residui aminoacidici localizzati ai vertici dei suddetti elementi di struttura ne hanno evidenziato l'importanza nel legame al DNA sia a singolo che a doppio filamento (Vedi Fig. 6 dei Risultati).



**Fig. 2. Struttura dei  $\beta$ -hairpin fingers nel canale centrale di tre complessi proteici. A, MthMCM; B, LTag di SV40; C, E1 del virus del Papilloma umano (Shen, 2005, modificata).**

Successivi studi di ricostruzione della struttura tridimensionale dell'intera proteina mediante analisi di EM indicano che le dimensioni del canale centrale (25-45Å) sono tali da poter accomodare DNA sia a singolo che a doppio filamento (Pape *et al.*, 2003; Fig. 3).



**Fig.3. Modello tri-dimensionale della struttura di MthMCM. I sei monomeri formano una struttura ad anello con una cavità centrale che ha dimensioni tali da accogliere una molecola di DNA a doppio filamento (Pape *et al.*, 2004).**

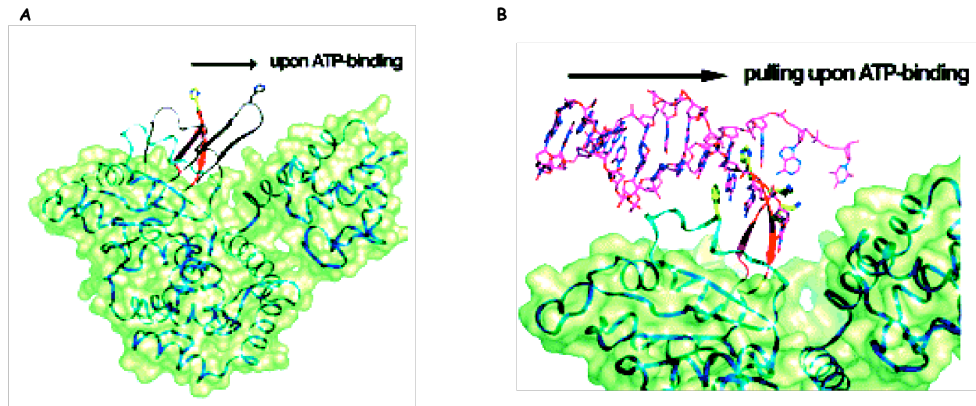


L'organizzazione molecolare doppio-esamerica è condivisa anche dalla DNA elicasi replicativa di SV40 LTag come indicato da studi biochimici, genetici ed osservazioni di EM. L'attività DNA elicastica del LTag in forma doppio-esamerica risulta essere 15 volte superiore a quella determinata per il singolo esamero (Smelkova and Borowiec, 1997). La formazione del doppio-esamero si attua grazie all'interazione dei domini N-terminali di due esameri in una configurazione testa-testa con gli N-terminali posizionati al centro della struttura e i domini elicastici (C-terminale) posizionati alle estremità opposte del complesso (Gomez-Lorenzo *et al.*, 2003)

Inoltre, la visualizzazione della struttura cristallografica ai raggi-X del LTag ha rivelato ulteriori analogie con il complesso MthMCM. Anche nel LTag è presente un canale centrale fortemente positivo determinato da aminoacidi basici, ma ciò che caratterizza il canale è la presenza di sei fori fortemente positivi che si formano all'interfaccia tra i monomeri. E' stato ipotizzato che il DNA a filamento singolo che si forma a seguito dell'apertura dell'elica nel canale centrale sia estruso attraverso tali pori laterali (Li *et al.*, 2003).

Anche nella struttura del LTag di SV40 sono presenti  $\beta$ -hairpin fingers basici equivalenti a quelli di MthMCM che sporgono nel canale centrale (Fig 2B). Tali elementi strutturali subiscono cambi conformazionali durante il ciclo di idrolisi dell'ATP, come dimostrato dal confronto delle strutture cristallografiche ad elevata risoluzione del complesso del LTag nella forma apo-enzimatica, legata all'ATP o all'ADP. Infatti i sei elementi di struttura passano da uno stato rilassato in assenza di ATP ad un significativo spostamento in senso longitudinale lungo il canale quando è fornito il nucleotide-trifosfato (Gai *et al.*, 2004). E' stato quindi ipotizzato che essi siano direttamente responsabili del legame e della traslocazione del DNA nel canale centrale della proteina. Tale ipotesi è stata rafforzata grazie a studi di mutagenesi

sito-diretta effettuati su residui aminoacidici localizzati sui  $\beta$ -hairpin fingers. Si è così dimostrato che tali elementi di struttura contattano direttamente il DNA e si è ipotizzato che essi favoriscano la traslocazione del DNA durante le fasi di apertura della doppia elica (Shen *et al.*, 2005; Fig. 4AB).



**Fig. 4. Funzione degli elementi di struttura  $\beta$ -hairpin fingers nel LTag di SV40.** A, la freccia indica il movimento di un  $\beta$ -hairpin finger in risposta al legame dell'ATP. B, modello di interazione dell'elemento  $\beta$ -hairpin finger con il DNA (Shen *et al.*, 2005).

## 1.6 Modelli di funzionamento del complesso MCM

Il meccanismo molecolare di azione delle DNA elicasi replicative ed in particolare del complesso MCM non è stato ancora chiarito. Attualmente quattro modelli di funzionamento sono stati proposti per il complesso MCM 2-7 eucariotico. L'elaborazione di tali modelli è stata effettuata sulla base di evidenze sperimentali raccolte nell'ultima decade da più gruppi di ricerca sulle DNA elicasi dei diversi domini dei viventi.

Il primo modello è basato su osservazioni fatte per DnaB di *E. coli* ed è definito dell'esclusione sterica (Kaplan *et al.*, 2003). Esso propone che MCM 2-7 durante la replicazione cromosomale legghi solo uno dei due filamenti del DNA e scorrendo lungo di esso, escluda l'altro effettuando così l'apertura dell'elica (Fig. 5A).

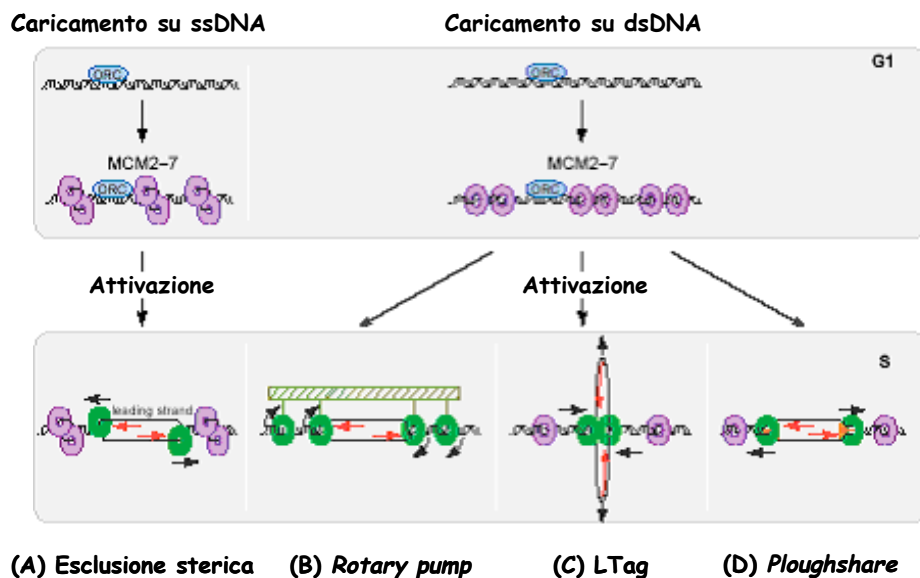
Il secondo modello, noto come modello della *rotary pump*, propone che il complesso MCM 2-7 legghi il doppio filamento di DNA e l'apertura dell'elica sarebbe dovuta ad un movimento torsionale effettuato da complessi MCM (abbondantemente presenti sulla cromatina) situati a distanza dall'origine di replicazione (Laskey and Madine, 2003; Fig. 5B).

Il terzo modello è stato formulato sulla base della struttura cristallografica ai raggi-X del fattore LTag di SV40 e su osservazioni di EM. Esso propone, che i due filamenti di DNA siano separati all'interno del canale centrale del complesso proteico e che uno di essi sia quindi estruso attraverso i fori presenti sulle pareti laterali del canale stesso (Li *et al.*, 2003; Gai *et al.*, 2004; Fig. 5C).

L'ultimo modello proposto in ordine di tempo è stato denominato del *ploughshare* (elemento separatore; Takahashi *et al.*, 2005). Secondo tale modello il complesso MCM 2-7 si muoverebbe lungo il doppio filamento di DNA come singolo esamero ed un "elemento separatore" interverrebbe a separare i due filamenti. Rispetto al modello proposto per LTag, l'elemento separatore non sarebbe più il canale fortemente positivo ma un fattore proteico ausiliario (Fig. 5D).

Ancora non è molto chiaro quale di questi modelli possa essere considerato valido per il funzionamento del complesso MCM. I primi due modelli sembrano non essere applicabili al sistema eucariotico. Infatti, nel caso fosse valido il modello dell'esclusione sterica, se si considera il grande numero di origini di replicazione degli eucarioti, è facile pensare che una grande quantità di DNA a singolo filamento

si troverebbe ad essere esposta nel nucleo cellulare per un lungo tempo e questo comporterebbe danni al DNA. Il secondo modello contrasta invece con il fatto che le cellule contengono le DNA topoisomerasi, enzimi che intervengono a “rilassare” i super-avvolgimenti del DNA nel corso della replicazione. Questo escluderebbe, come proposto dal secondo modello, che sia la tensione torsionale generata dalla DNA elicasi responsabile della separazione dei due filamenti di DNA. Entrambi gli altri due modelli potrebbero essere validi. Recenti osservazioni indicano che due fattori proteici, Cdc45 e GINS vengono caricati contemporaneamente sull'origine di replicazione ed entrambi sembrano essere necessari nelle fasi di elongazione (Pacek and Walter, 2004). E' stato quindi ipotizzato che tali proteine costituiscano “l'elemento separatore” (*ploughshare*) che caratterizza appunto il quarto modello (Takahashi *et al.*, 2005).



**Fig. 5. Modelli ipotetici di funzionamento del complesso MCM 2-7.** I singoli modelli proposti sono indicati in figura e descritti nel testo (Takahashi *et al.*, 2005, modificata).

## 2. RISULTATI

La descrizione dei risultati ottenuti è suddivisa in due parti.

Nella prima parte riporto i dati riguardanti la produzione e la caratterizzazione biochimica di quattro mutanti in residui aminoacidici della porzione N-terminale di SsoMCM che sono ipoteticamente orientati verso il centro del canale sulla base della struttura cristallografica di MthMCM. Lo scopo è quello di verificare il ruolo di tali residui aminoacidici nel legame e nel rimodellamento del DNA.

Nella seconda parte invece descrivo la caratterizzazione dei putativi elementi di struttura  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM equivalenti a quelli identificati nella struttura cristallografica ai raggi-X di MthMCM (Fletcher *et al.*, 2003) per analizzare il loro ruolo nel legame al DNA e nell'attività elicastica dell'enzima. Cambi conformazionali di tali  $\beta$ -*hairpin fingers* indotti dal legame ai nucleotidi-trifosfato sono stati monitorati mediante tecniche di spettroscopia di fluorescenza.

## Parte I

### **2.1 Identificazione di quattro residui aminoacidici basici (Lisina 129, 134 e 194 e Istidina 146) di SsoMCM putativamente responsabili del legame al DNA**

La struttura del dominio N-terminale di MthMCM rappresenta un ottimo modello al quale riferirsi per studiare le relazioni struttura-funzione delle proteine omologhe MCM.

Dall'allineamento di dodici sequenze MCM archeobatteriche effettuato mediante il programma *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1997) (descritto nel Paragrafo 4.21 dei Metodi) è stato estrapolato un allineamento binario fra le sequenze di MthMCM ed SsoMCM corrispondente al solo dominio N-terminale delle due proteine e perfezionato sulla struttura nota del frammento N-terminale di MthMCM (Fig. 6). Mediante tale analisi è stato possibile individuare in SsoMCM aminoacidi carichi positivamente che avessero le catene laterali putativamente rivolte verso il lume interno del canale, e che presentassero un elevato livello di conservazione tra le sequenze delle proteine MCM archeobatteriche ed eucariotiche.

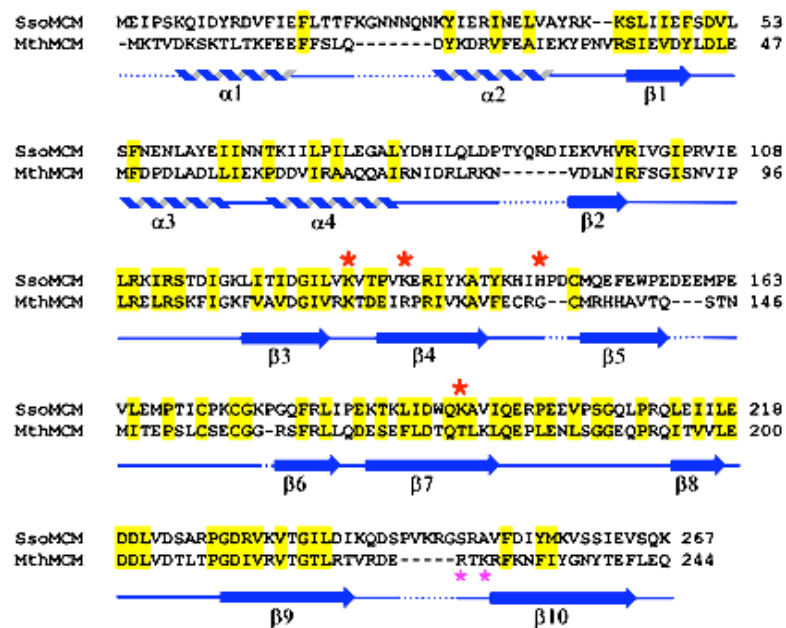
Come evidenziato nelle Figure 6 e 7, sono stati individuati quattro residui che soddisfacevano il suddetto criterio: Lisina 129 (K129), Lisina 134 (K134), Istidina 146 (H146) e Lisina 194 (K194).

La K129, equivalente alla Lisina 117 nella struttura cristallografica di MthMCM, è risultata essere conservata in dieci sequenze archeobatteriche, mentre in altre due è presente l'aminoacido Arginina. Nella stessa posizione è stata rilevata la presenza di residui carichi positivamente nelle proteine MCM 3, 4, 6, 7 eucariotiche.

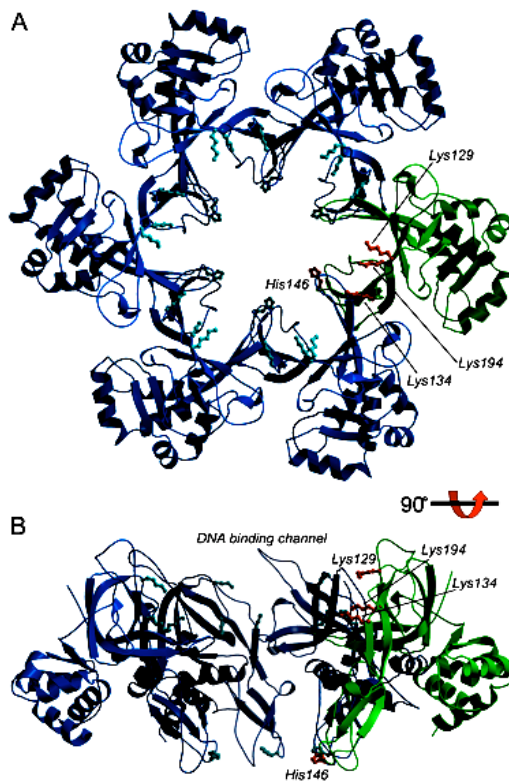
La K134 è equivalente al residuo di Arginina 122 nella struttura di MthMCM. In MCM 3, 5 sono stati individuati residui di Arginina, mentre in MCM 6, 7 sono presenti gli aminoacidi Istidina e Lisina rispettivamente.

La H146, anche se nell'allineamento di sequenza corrisponde alla Glicina 134 di MthMCM, è un residuo con catena laterale carica positivamente ed è presente in cinque su dodici sequenze archeobatteriche analizzate ed in MCM 2 e 3 eucariotici.

La Lisina K194 è un residuo conservato in tutte le sequenze MCM archeobatteriche (fatta eccezione per MthMCM) nonché in MCM 3, 4, 6, 7 degli eucarioti, dove è talvolta conservativamente sostituita da residui di Arginina.



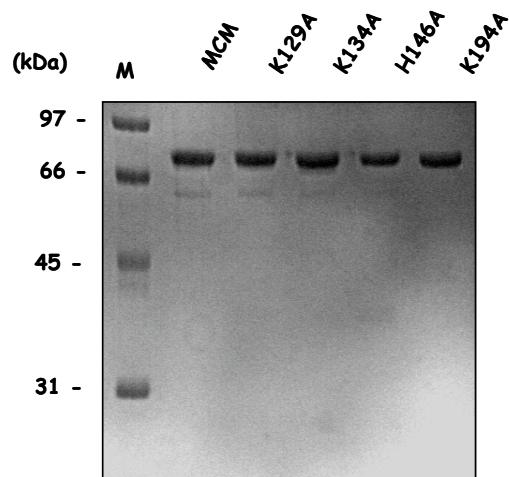
**Fig. 6. Allineamento delle sequenze aminoacidiche di MthMCM e SsoMCM.** Gli aminoacidi conservati in almeno nove delle dodici sequenze MCM archeobatteriche sono evidenziati in giallo (il seguente gruppo di aminoacidi sono stati considerati simili: Ile/Val/Leu/Met, Phe/Tyr/Trp, Asp/Glu, Ser/Thr, Arg/Lys, Gly/Ala). Gli elementi di struttura secondari della porzione N-terminale di MthMCM sono riportati sotto la sequenza. La posizione dei residui mutagenizzati è indicata con l'asterisco rosso, mentre i residui mutagenizzati in MthMCM sono indicati con l'asterisco rosa (Pucci *et al.*, 2004).



**Fig. 7. Localizzazione strutturale dei residui aminoacidici basici K129, 134 e 194 e H146 di SsoMCM.** A, rappresentazione di un esamero del dominio N-terminale di MthMCM in cui sono evidenziati i residui aminoacidici di SsoMCM caratterizzati mediante mutagenesi sito-diretta in questo studio. Nella figura, un monomero è evidenziato in verde. B, rotazione di 90° lungo l'asse orizzontale della rappresentazione A; per evidenziare l'interno del canale in cui è legato il DNA, due monomeri sono stati rimossi dalla parte anteriore della molecola.



I residui aminoacidici carichi positivamente così individuati nella sequenza di SsoMCM sono stati sostituiti tutti in Alanina mediante mutagenesi sito-diretta ed i mutanti sono stati denominati: SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A. Le proteine corrispondenti sono state espresse in forma solubile in cellule di *E. coli* e purificate come descritto nei Metodi (Fig. 8).



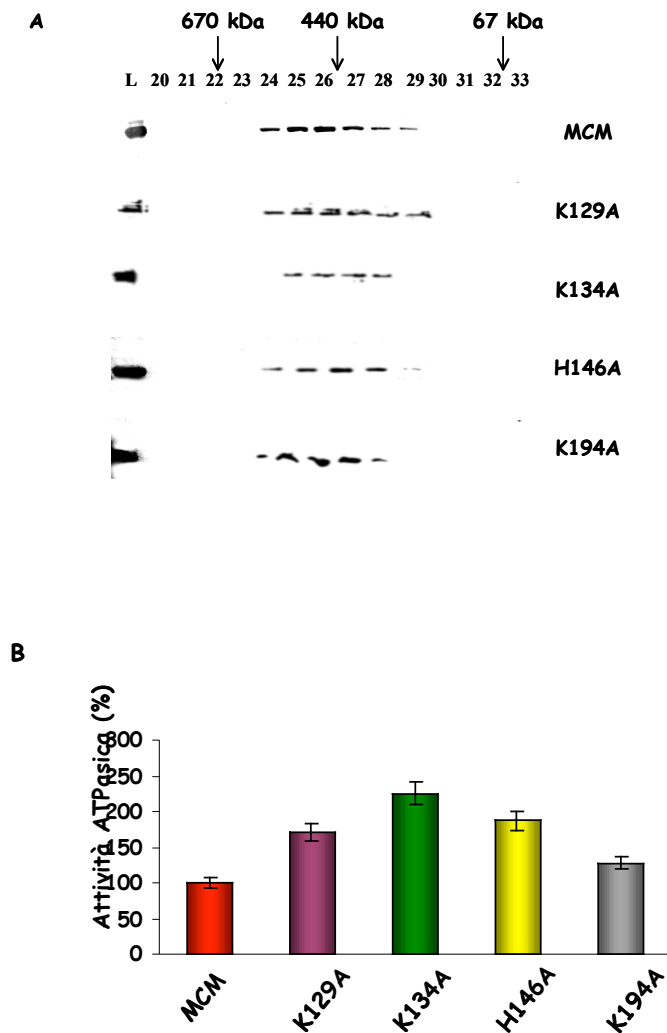
**Fig. 8. Analisi per SDS-PAGE dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A.** Aliquote di 4  $\mu$ g delle proteine purificate sono state analizzate per SDS-PAGE 10%. Il gel è stato colorato con Coomassie Blue. M: marcatori di peso molecolare; MCM: proteina *wt.*

## 2.2 Stato oligomerico ed attività ATPasica dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A

Per verificare un possibile cambio nelle caratteristiche strutturali dei quattro mutanti di SsoMCM come conseguenza delle singole sostituzioni aminoacidiche introdotte sono state analizzate due caratteristiche biochimiche: lo stato oligomerico in soluzione e la attività ATPasica.

La cromatografia ad esclusione molecolare di tipo analitico su colonna Superose 6 opportunamente calibrata con proteine di riferimento (Paragrafo 4.14) ha evidenziato che i mutanti di SsoMCM hanno un profilo di eluizione simile tra loro (come mostrato in Figura 9A) e corrispondente ad un peso molecolare di circa 440 kDa. Questi risultati suggeriscono che le quattro proteine mutanti formano esameri in soluzione come la proteina *wt*. La successiva analisi dell'attività ATPasica ha mostrato che la capacità di idrolizzare l'ATP da parte dei mutanti di SsoMCM è paragonabile a quella della proteina *wt*, come mostrato in Figura. 9B. Questo dato non è inatteso visto che la mutagenesi ha interessato la porzione N-terminale della catena polipeptidica di SsoMCM mentre il modulo AAA+ responsabile dell'attività ATPasica è situato nella parte C-terminale della proteina.

Questi risultati, supportati dal dato riguardante la metodologia di purificazione delle quattro proteine che è stata identica a quella eseguita per SsoMCM *wt*, indicano che le sostituzioni aminoacidiche introdotte non hanno alterato in maniera significativa la struttura quaternaria del complesso.



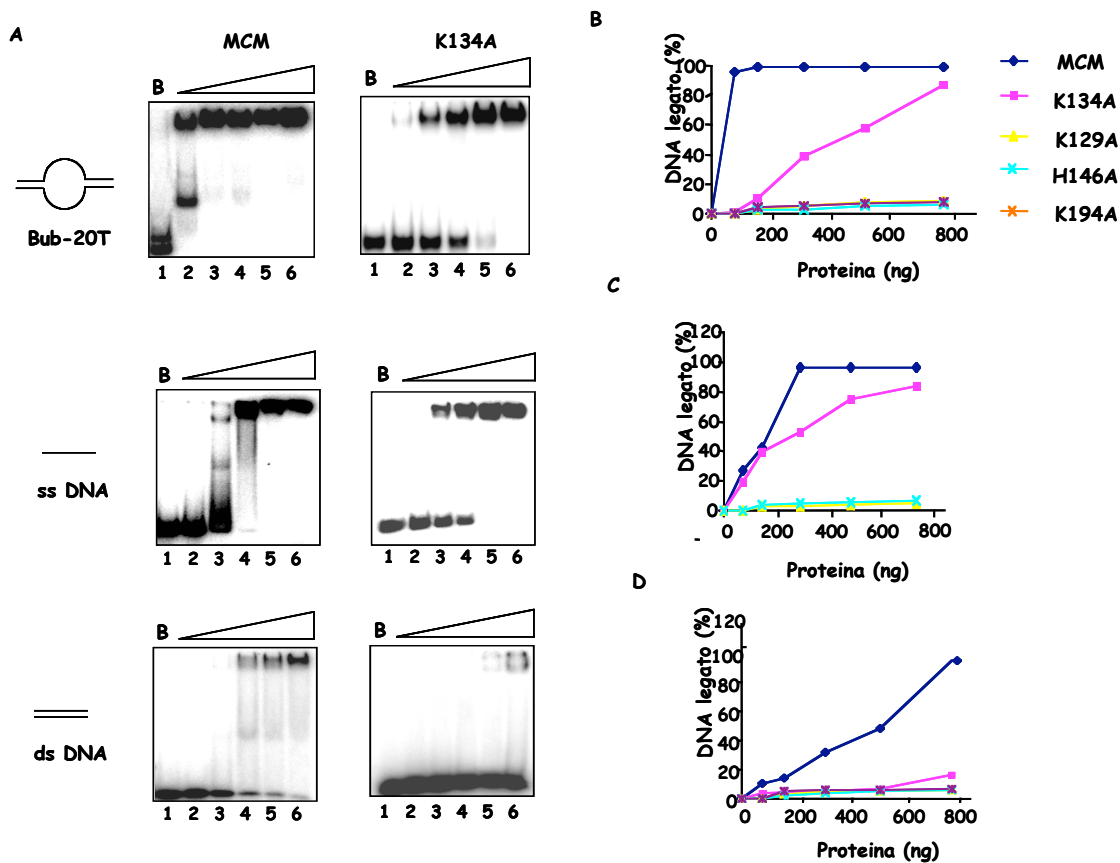
**Fig. 9. Gel filtrazione analitica ed attività ATPasica dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A.** A, SsoMCM *wt* ed i mutanti (100  $\mu$ g in 250  $\mu$ l) sono stati sottoposti a gel filtrazione analitica su colonna Superose 6. Aliquote di 20  $\mu$ l delle frazioni indicate sono state analizzate per Western Blotting utilizzando un antisiero anti-Sso MCM come descritto nei Metodi. Le frecce indicano i volumi di eluizione dei marcatori di peso molecolare utilizzati per calibrare la colonna (L: SsoMCM utilizzata come riferimento). B, l'istogramma riporta l'attività ATPasica (%) di SsoMCM *wt* e dei mutanti ottenuta utilizzando 70 ng di ciascuna proteina e quantificando mediante analisi al PhosphorImager l'orto-fosfato rilasciato nella reazione di idrolisi. L'attività per il *wt* è stata posta pari al 100%.

### **2.3 Proprietà di legame al DNA dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A -H146A e -K194A**

Per verificare l'effetto delle singole sostituzioni aminoacidiche in SsoMCM sul legame al DNA, sono stati effettuati esperimenti di EMSA utilizzando vari tipi di molecole di DNA come ligandi e descritti nel Paragrafo 4.17 dei Metodi. Negli esperimenti sono state utilizzate quantità crescenti di ciascun mutante sito-specifico di SsoMCM e sono state comparate le attività di legame ottenute per ciascuna proteina mutante rispetto al *wt*.

Come si può osservare dai gel e dai corrispondenti grafici ottenuti quantificando le bande radioattive rilevate al PhosphorImager (programma *ImageQuant*), la proteina SsoMCM *wt* mostra una più alta affinità di legame per le strutture di DNA a bolla (Fig. 10AB) e per quelle a singolo filamento (Fig. 10AC) rispetto a molecole a doppio filamento (Fig. 10AD). Il DNA contenente struttura a bolla sembra essere il ligando preferito. L'analisi per EMSA dei mutanti ha invece evidenziato che la sostituzione degli aminoacidi K129, H146 e K194 con Alanina determina una completa abolizione del legame al DNA (Fig. 10B-D). Invece, il mutante SsoMCM-K134A conserva la capacità di legare il DNA a singolo filamento con un'affinità paragonabile a quella della proteina *wt* (Fig. 10AC), le strutture a bolla con affinità più bassa (Fig. 10AB), mentre il suo legame a strutture di DNA a doppio filamento risulta essere completamente abolito (Fig. 10AD).

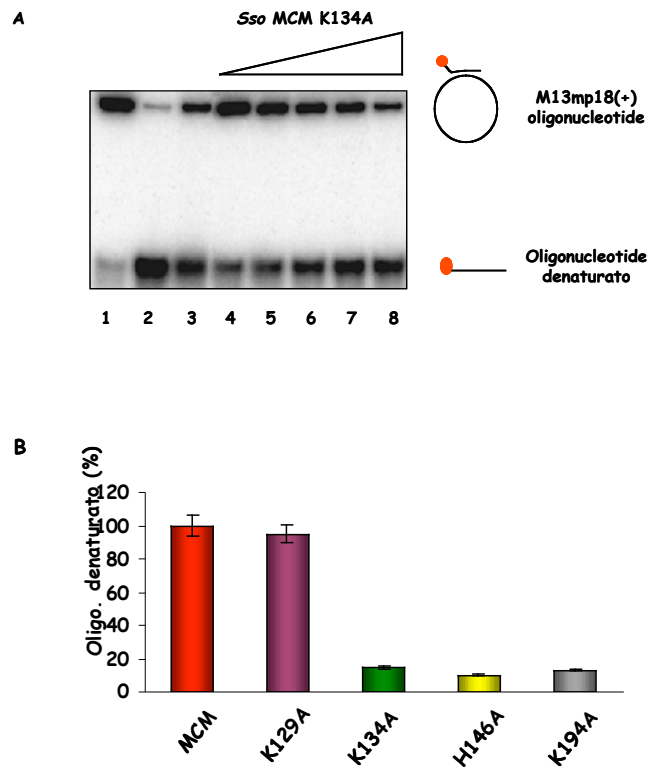
Questi risultati indicano che i residui aminoacidici K129, H146 e K194 di SsoMCM sono critici per il legame del DNA sia a singolo che a doppio filamento mentre la sostituzione del residuo aminoacidico K134 con Alanina ha effetto solo nel legame al DNA a doppio filamento (Pucci *et al.*, 2004).



**Fig. 10. Proprietà di legame al DNA di SsoMCM *wt* e del mutante K134A.** A, saggi di legame al DNA di SsoMCM *wt* e del mutante K134A con quantità crescenti di proteina (75, 150, 300, 450, e 700 ng di esamero, 2-6 di ciascun gel). Saggio di controllo senza proteina (1). B, C e D: grafici ottenuti riportando la quantità di DNA legato (%) negli esperimenti di EMSA contro la quantità di proteina utilizzata (ng) con DNA a bolla (Bub-20T), DNA a singolo filamento (ss DNA) e molecole di DNA a doppio filamento (ds DNA), rispettivamente. Il DNA legato è stato quantificato mediante analisi al PhosphorImager.

## **2.4 Attività DNA elicastica dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A e -K194A**

Come descritto precedentemente (Carpentieri *et al.*, 2002), SsoMCM mostra attività elicastica su molecole formate da oligonucleotidi appaiati al DNA a singolo filamento circolare di M13mp18(+) contenenti una coda di 30 nucleotidi all'estremità 5' non appaiata come mostrato in Figura 11A. Utilizzando tale substrato, sono stati effettuati saggi per verificare l'attività con la quale viene denaturato l'oligonucleotide da parte dei mutanti di SsoMCM. Come atteso, i mutanti SsoMCM-K129A, -H146A e -K194A, che non mostrano attività di legame al DNA, non presentavano attività DNA elicastica pur utilizzando 800 ng di ciascuna proteina per saggio. Invece, il mutante SsoMCM-K134A conserva un'attività DNA elicastica paragonabile a quella ottenuta per la proteina *wt* (Fig. 11AB). Questo risultato, mostra una correlazione tra il legame al DNA a singolo filamento e l'attività DNA elicastica per SsoMCM e suggerisce che la capacità di legare il DNA a singolo filamento possa essere sufficiente all'enzima per separare i due filamenti dell'elica.



**Fig. 11. Attività DNA elicastica di SsoMCM *wt* e del mutante K134A.** A, il saggio è stato effettuato su molecole di DNA a singolo filamento di M13mp18(+) a cui è stato fatto ibridare un oligonucleotide con una coda non appaiata al 5' di 30 nucleotidi. Il substrato non denaturato M13/oligonucleotide migra nella parte superiore del gel mentre l'oligonucleotide denaturato dall'enzima migra nella parte inferiore (come schematizzato nel disegno). Nei saggi sono state utilizzate quantità crescenti di SsoMCM-K134A (100, 200, 300, 400 e 800 ng, 4-8). Reazioni di controllo senza enzima sono state incubate a 70°C e a 95°C rispettivamente (1-2). Reazione con SsoMCM *wt* (800 ng, 3). B, l'istogramma riporta l'attività DNA elicastica (%) di SsoMCM *wt* e dei mutanti ottenuta utilizzando 400 ng di ciascuna proteina e quantificando mediante analisi al PhosphorImager l'oligonucleotide denaturato nella reazione DNA elicastica. L'attività per il *wt* è stata posta pari al 100%.

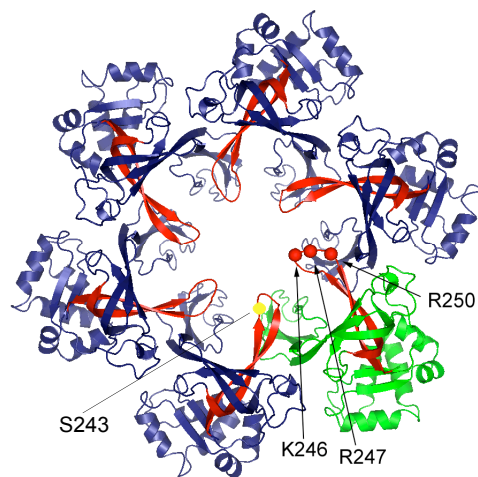
## Parte II

### 2.5 Identificazione dei putativi elementi di struttura $\beta$ -hairpin fingers nella sequenza aminoacidica di SsoMCM

L'identificazione nella sequenza aminoacidica di SsoMCM degli ipotetici elementi di struttura  $\beta$ -hairpin fingers, è stata effettuata mediante l'allineamento con la sequenza di MthMCM ottimizzato sulla base della struttura cristallografica ai raggi-X del frammento N-terminale di quest'ultima come descritto nella Parte I (vedi Fig.6). L'analisi ha portato all'identificazione in SsoMCM di un ipotetico loop di connessione tra i  $\beta$ -strands  $\beta$ 9 e  $\beta$ 10.

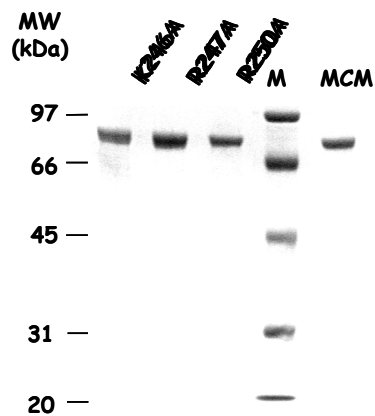
Tale loop di connessione risulta essere più lungo in SsoMCM così come nelle proteine MCM eucariotiche e contiene vari residui aminoacidici basici. Tra questi la Lisina 246 (K246), l'Arginina 247 (R247) e l'Arginina 250 (R250) si allineano ai residui R226 ed R228 di MthMCM che si è ipotizzato possano essere coinvolti nel legame al DNA (Fig. 12).





**Fig. 12. Localizzazione strutturale dei residui S243, K246, R247 e R250 di SsoMCM.** Nella figura è riportata la posizione dei residui aminoacidici di SsoMCM mutagenizzati in questo studio. Nella figura, un monomero è evidenziato in verde, mentre i  $\beta$ -hairpin fingers sono evidenziati in rosso.

La caratterizzazione delle ipotetiche strutture  $\beta$ -hairpin fingers di SsoMCM è stata effettuata innanzitutto analizzando il ruolo dei tre residui basici suddetti nel legame al DNA e nell'attività DNA elicastica. Tali residui sono stati quindi sostituiti con Alanina e sono state prodotte le proteine denominate: SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A. Queste sono state purificate all'omogeneità e successivamente caratterizzate (Fig. 13).

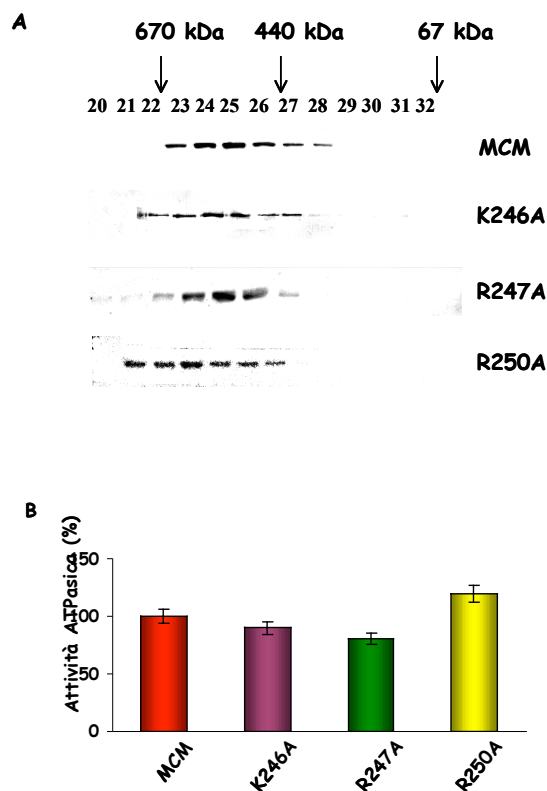


**Fig. 13. Analisi per SDS-PAGE dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A.** Aliquote di 4  $\mu$ g delle proteine purificate sono state analizzate per SDS-PAGE 10%. Il gel è stato colorato con Coomassie Blue. M: marcatori di peso molecolare; MCM: proteina *wt*.

## 2.6 Stato oligomerico ed attività ATPasica dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A

Per verificare che le sostituzioni aminoacidiche introdotte non avessero significativamente alterato le proprietà strutturali, sono stati analizzati lo stato oligomerico e l'attività ATPasica dei tre mutanti sito-diretti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A localizzati negli ipotetici  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM. Gli esperimenti di cromatografia ad esclusione molecolare indicano che i tre mutanti sono in grado di formare esameri in soluzione mostrando un profilo di eluizione su colonna Superose 6 simile a quello ottenuto per la proteina *wt* (Fig. 14A). Inoltre, i saggi di attività ATPasica mostrano che i tre mutanti hanno una capacità di

idrolizzare l'ATP simile a quella della proteina *wt* (Fig. 14B). Quindi, come rilevato per l'altro gruppo di mutanti, le singole sostituzioni aminoacidiche non alterano in maniera rilevante la struttura quaternaria del complesso proteico.



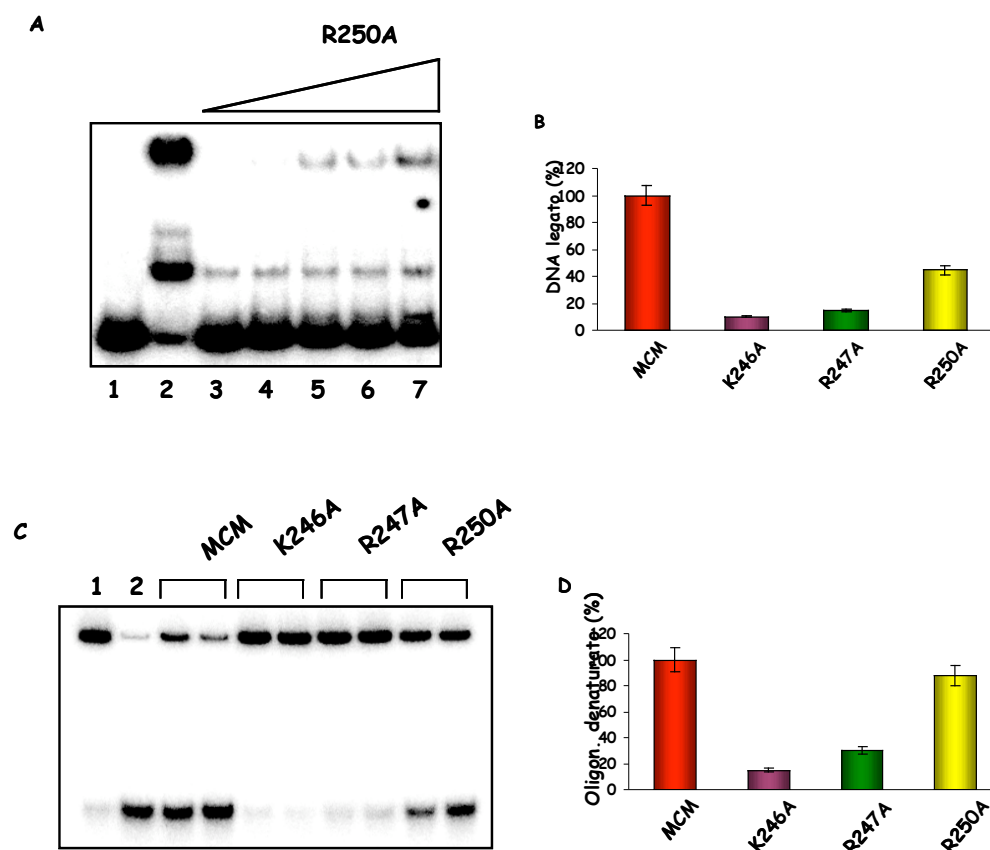
**Fig. 14. Stato oligomerico ed attività ATPasica dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A.** A, SsoMCM *wt* ed i mutanti (100  $\mu$ g in 250  $\mu$ l) sono stati sottoposti a gel filtrazione analitica su colonna Superose 6. Aliquote di 20  $\mu$ l delle frazioni indicate sono state analizzate per Western Blotting utilizzando un antisiero anti-SsoMCM. Le frecce indicano i volumi di eluizione dei marcatori di peso molecolare utilizzati per calibrare la colonna (L: SsoMCM utilizzata come riferimento). B, l'istogramma riporta l'attività ATPasica (%) di SsoMCM *wt* e dei mutanti ottenuta utilizzando 700 ng di ciascuna proteina e quantificando mediante analisi al PhosphorImager l'orto-fosfato rilasciato nella reazione di idrolisi. L'attività per il *wt* è stata posta pari al 100%.

## **2.7 Analisi del legame al DNA e dell'attività DNA elicastica dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e -R250A**

Il ruolo delle ipotetiche strutture  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM nel legame e nel rimodellamento del DNA è stato analizzato mediante esperimenti di EMSA e saggi di attività DNA elicastica.

I saggi EMSA effettuati su molecole di DNA a bolla evidenziano che le sostituzioni in Alanina dei residui aminoacidici K246 ed R247 aboliscono completamente il legame al DNA, mentre il mutante SsoMCM-R250A è in grado di legare il DNA anche se con ridotta affinità rispetto alla proteina *wt* (Fig. 15AB).

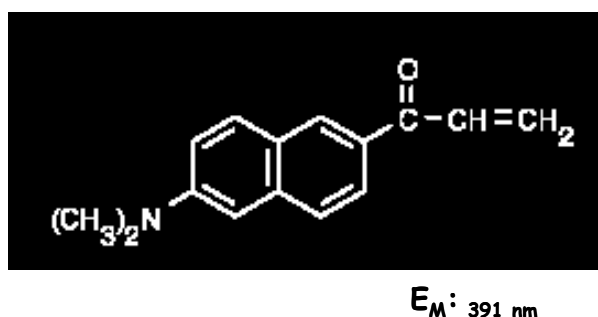
I dati di EMSA concordano con la successiva determinazione dell'attività DNA elicastica effettuata utilizzando le molecole di DNA mostrate in Figura 11A. Infatti, come atteso, i mutanti SsoMCM-K246A e -R247A non sono in grado di denaturare l'oligonucleotide appaiato al DNA di M13, mentre la sostituzione del residuo R250 con Alanina causa solo una minima riduzione dell'attività DNA elicastica (Fig. 15CD).



**Fig. 15. Proprietà di legame al DNA ed attività DNA elicastica di SsoMCM *wt* e dei mutanti SsoMCM-K246A, -R247A e R250A.** A, saggi di legame al DNA a bolla con quantità crescenti di SsoMCM-R250A di proteina (75, 150, 300, 500 e 750 ng di proteina, 3-7). Saggio di controllo senza proteina (1); saggio con SsoMCM *wt* (750 ng, 2). B, l'istogramma riporta l'attività di legame al DNA (%) di SsoMCM *wt* e dei mutanti ottenuta utilizzando 500 ng di ciascuna proteina e quantificando al PhosphorImager il DNA legato negli esperimenti di EMSA. L'attività per il *wt* è stata posta pari al 100%. C, saggi di attività DNA elicastica effettuati utilizzando 200 e 400 ng delle proteine indicate. Reazioni di controllo senza enzima trattate a 70°C e a 95°C rispettivamente (1-2). D, l'istogramma riporta l'attività DNA elicastica (%) di SsoMCM *wt* e dei mutanti ottenuta utilizzando 400 ng di ciascuna proteina e quantificando mediante analisi al PhosphorImager l'oligonucleotide denaturato nella reazione DNA elicastica. L'attività per il *wt* è stata posta pari al 100%.

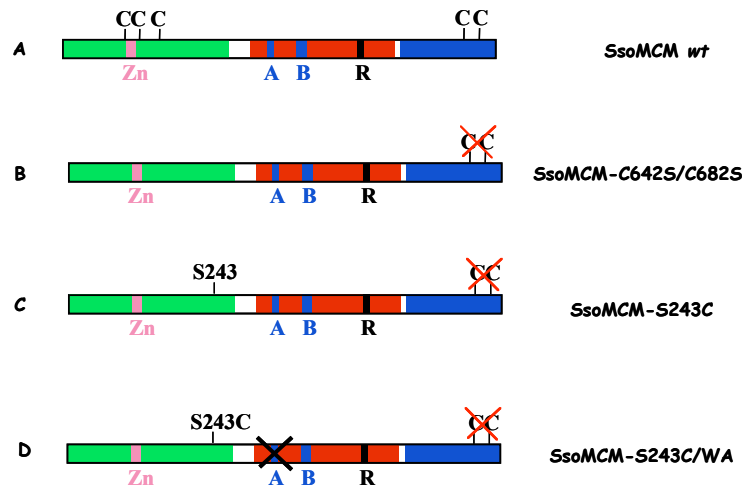
## 2.8 Produzione e caratterizzazione dei mutanti SsoMCM-S243C e SsoMCM-S243C/WA

Per registrare possibili cambi conformazionali dei putativi  $\beta$ -hairpin fingers di SsoMCM in seguito al legame del nucleotide-trifosfato, è stato introdotto un fluoroforo in maniera sito-specifica sui suddetti elementi di struttura e, successivamente, si sono registrati gli spettri di emissione di fluorescenza della proteina marcata in presenza ed in assenza dei nucleotidi. Il fluoroforo utilizzato per la marcatura è stato l'*acrylodan* (Fig. 16), un composto aromatico che reagisce in maniera specifica e selettiva con il gruppo tiolico della Cisteina e sensibile a locali variazioni del mezzo. Pertanto, cambi conformazionali degli elementi di struttura a cui l'*acrylodan* è legato producono variazioni sia nell'intensità dello spettro di emissione e sia nel massimo della lunghezza d'onda ( $\lambda_{\max}$ , Prendergast *et al.*, 1983).



**Fig. 16. Struttura NMR dell'*acrylodan*.** Molecola fluorescente selettivamente reattiva con il gruppo tiolico della Cisterna a pH 7.0-7.5.  $E_M$ : lunghezza massima di assorbimento.

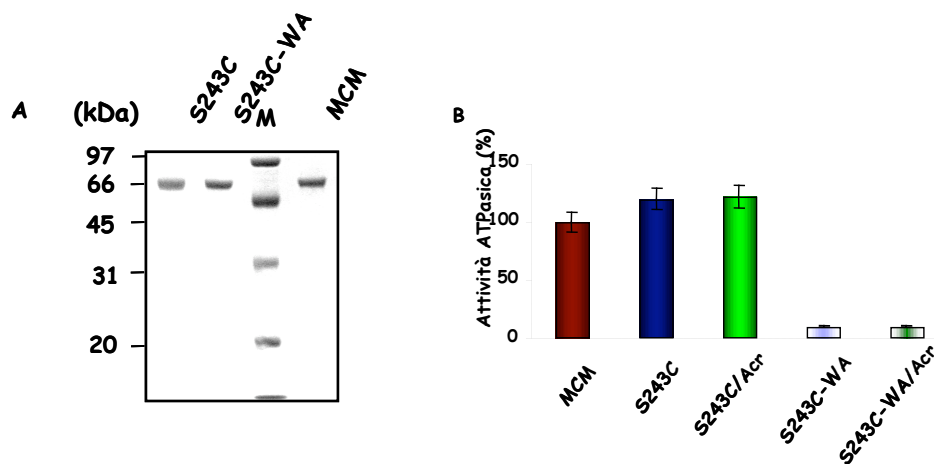
Per effettuare la marcatura sito-specifica dei putativi  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM, sono stati effettuati esperimenti di mutagenesi sito-diretta in maniera tale da inserire un residuo di Cisteina in tali elementi di struttura. E' stata scelta la Serina in posizione 243 putativamente situata al vertice del  $\beta$ -*hairpin finger* (vedi Fig. 12). E' stata inoltre analizzata la catena polipeptidica di SsoMCM per verificare la presenza e posizione di Cisteine potenzialmente reattive con il fluoroforo. L'analisi ha portato all'individuazione di cinque residui di Cisteina (Fig. 17A): le Cisteine 149, 171 e 179, fanno parte del motivo di sequenza legante lo zinco (Cys<sub>3</sub>-His) e sono perciò non reattive; le Cisteine 642 e 682, nella estremità C-terminale della catena polipeptidica, sono invece potenzialmente reattive. Come schematizzato nella Figura 17B, è stato necessario innanzitutto abolire le Cisteina 642 e 682 mediante sostituzione con Serina; successivamente, il costrutto genico ottenuto è stato utilizzato come stampo per sostituire il residuo di Serina 243 con Cisteina ed è stato così prodotto il mutante SsoMCM-S243C/C642S/C682S denominato per semplicità SsoMCM-S243C (Fig. 17C). Inoltre, siccome le finalità di questi esperimenti sono state quelle di rilevare possibili cambi conformazionali nei  $\beta$ -*hairpin fingers* in seguito al legame dei nucleotidi, si è pensato di produrre un derivato di SsoMCM-S243C che avesse anche una mutazione nel motivo Walker A tale da abolire la capacità della proteina di legare i nucleotidi-trifosfato. Quindi mediante mutagenesi mirata è stata sostituita la Lisina in posizione 346, conservata nei motivi Walker A delle proteine MCM di Archaea ed Eucarioti, con Alanina e si è così prodotto il mutante SsoMCM-S243C/WA (Fig. 17D).



**Fig. 17. Rappresentazione schematica della catena polipeptidica di SsoMCM *wt* e dei mutanti SsoMCM-S243C e -S243C/WA.** Le posizioni del motivo di sequenza legante lo zinco, dei motivi Walker A e B, dell'*Arginine finger* sono indicate come *Zn*, *A*, *B* e *R*.

Le due proteine, espresse in cellule di *E. coli* e purificate in forma solubile (Fig. 18A) risultano formare esameri in soluzione. Per quello che riguarda SsoMCM-S243C l'attività ATPasica è risultata paragonabile a quella della proteina *wt*, mentre, come atteso, il mutante SsoMCM-S243C/WA non è in grado di idrolizzare ATP (Fig. 18B).



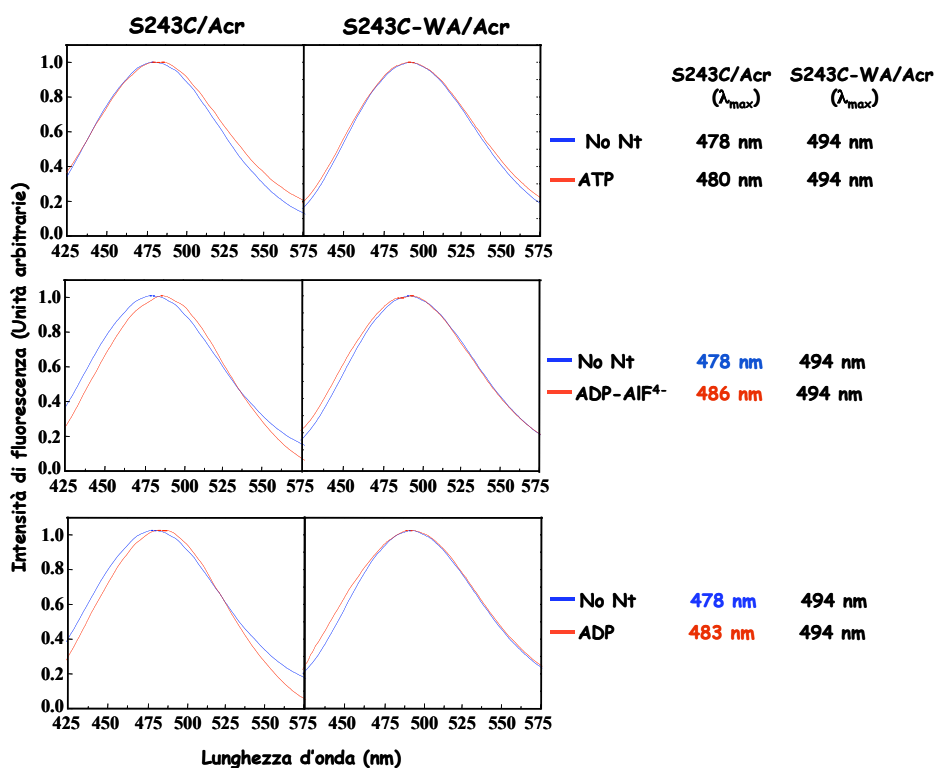


**Fig. 18. Analisi per SDS-PAGE dei mutanti SsoMCM-S243C e -S243C/WA e loro attività ATPasica.** A, aliquote di 4  $\mu$ g delle proteine purificate sono state analizzate per SDS-PAGE 10%. Il gel è stato colorato con Coomassie Blue. (M: marcatori di peso molecolare. MCM: proteina *wt*). B, l'istogramma riporta l'attività ATPasica (%) di SsoMCM *wt* e dei mutanti ottenuta utilizzando 400 ng di ciascuna proteina e quantificando mediante analisi al PhosphorImager l'orto-fosfato rilasciato nella reazione di idrolisi. L'attività per il *wt* è stata posta pari al 100%. S243C/Acr e S243C/WA/Acr: proteine marcate con l'*acrylodan*.

## 2.9 Analisi dei cambiamenti conformazionali degli ipotetici $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM mediante spettroscopia di fluorescenza

Gli spettri di emissione di fluorescenza dei mutanti SsoMCM-S243C e SsoMCM-S243C/WA marcati con l'*acrylodan* sono stati registrati in assenza ed in presenza dei nucleotidi ATP, ADP e ADP-AIF<sup>4-</sup> (analogo dello stato di transizione della reazione di idrolisi dell'ATP, Fig. 19).

Gli spettri di emissione registrati per SsoMCM-S243C in assenza del nucleotide mostrano una lunghezza d'onda di emissione massima ( $\lambda_{\max}$ ) di 478 nm. Le registrazioni effettuate in presenza di ATP mostrano invece una minima variazione nella  $\lambda_{\max}$ , mentre in presenza di ADP-AIF<sup>4-</sup> o di ADP si osserva una variazione della  $\lambda_{\max}$  di 8 nm (da 478 a 486 nm) e di 5 nm (da 478 a 483 nm), rispettivamente. Negli esperimenti di controllo effettuati con la proteina SsoMCM-S243C/WA marcata con l'*acrylodan*, gli spettri di emissione registrati risultano sovrapponibili. Questo risultato dimostra che i cambi della  $\lambda_{\max}$  sono determinati esclusivamente dal legame alla proteina dei nucleotidi e non da un effetto aspecifico.



**Fig. 19. Spettri di emissione di fluorescenza delle proteine SsoMCM-S243C -S243C/WA marcate con l'*acrylodan*.** Gli spettri sono stati registrati in assenza (linee blu) ed in presenza (linee rosse) dei nucleotidi indicati nella figura. Nt: nucleotide.

### 3. Discussione e Conclusioni

Una grande quantità di conoscenze circa i complessi MCM è stata accumulata negli ultimi venti anni. I geni MCM di molti organismi eucariotici sono stati clonati con il fine di produrre su larga scala le proteine per la caratterizzazione biochimica e strutturale. La conoscenza dei dettagli molecolari che sono alla base della funzione biologica delle molecole proteiche è di particolare interesse soprattutto se, come nel caso del complesso MCM, queste costituiscono fattori essenziali in processi cellulari importanti e possono essere coinvolte in eventi patologici. Recenti studi hanno infatti evidenziato l'esistenza di un alto livello di espressione dei geni MCM sia in cellule tumorali maligne e sia in cellule non completamente trasformate (pre-cancerose, Lei, 2005) rendendo di fatto particolarmente interessante il loro studio sia quali potenziali bersagli molecolari per progettare farmaci antitumorali sia come *markers* per diagnosi precoci.

Recentemente, il completo sequenziamento dei genomi di molti organismi archeobatterici ha evidenziato l'esistenza di un alto grado di similarità di sequenza tra le proteine coinvolte nella replicazione del DNA degli Archaea e quelle degli eucarioti facendo degli archeobatteri un modello semplificato per lo studio del più complesso meccanismo replicativo eucariotico. Un perfetto esempio a tale proposito è rappresentato dal complesso replicativo MCM. In tutti gli Archaea dei quali è stata determinata la sequenza genomica completa è presente un unico omologo delle proteine MCM eucariotiche. Dati di tipo biochimico e la similarità riscontrata nell'attività enzimatica *in vitro* indicano una forte conservazione tra i complessi MCM dei due domini dei viventi.

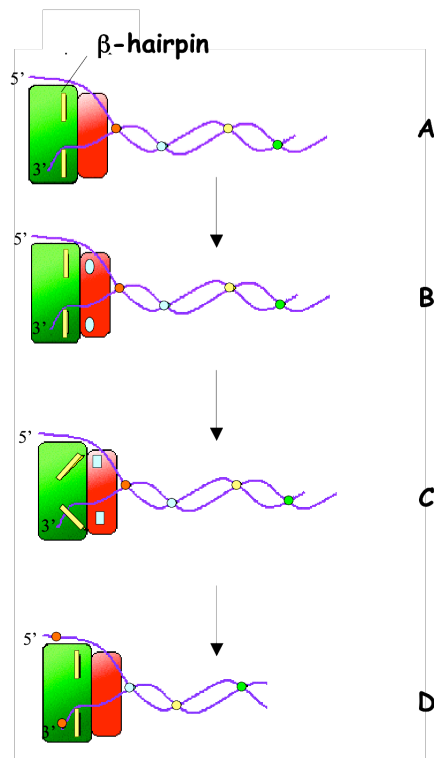
Con questo lavoro sperimentale sulle relazioni struttura-funzione del complesso SsoMCM si è inteso aggiungere nuovi dati per la comprensione del funzionamento delle DNA elicasi. Il meccanismo mediante il quale tali proteine separano i due filamenti del DNA non è ancora noto, nonostante la risoluzione delle strutture cristallografiche di alcune DNA elicasi, come per esempio la T7 gp4 DNA elicasi (Singleton *et al.*, 2000), RepA (Niedenzu *et al.*, 2001), la proteina Rep40 dell'*Adeno-associated virus 2* (AAV-2) (James *et al.*, 2003), LTag di SV40 (Li *et al.*, 2003) e la porzione N-terminale di MthMCM (Fletcher *et al.*, 2003). Come evidenziato da queste analisi strutturali l'elemento che accomuna tali le DNA elicasi è l'organizzazione ad anello formante un canale centrale di dimensioni tali da alloggiare DNA sia singolo che a doppio filamento.

Nel nostro studio abbiamo caratterizzato, mediante analisi per mutagenesi sito-specifica, il ruolo di residui aminoacidici basici di SsoMCM (Lisine 129, 134 e 194 ed Istidina 146) conservati tra le sequenze archeobatteriche ed eucariotiche e putativamente rivolti verso il centro del canale. I dati di EMSA indicano, per la prima volta in proteine MCM, che la loro sostituzione con residui di Alanina determina una drastica riduzione dell'attività di legame al DNA, suggerendo così un loro diretto coinvolgimento nella interazione con gli acidi nucleici. Questi risultati supportano le ipotesi formulate per MthMCM sul ruolo funzionale che il canale centrale svolgerebbe nel legare il doppio filamento di DNA. Nel paragrafo 1.6 sono stati descritti i modelli ipotetici proposti per il funzionamento delle DNA elicasi replicative. In merito a queste osservazioni, i dati riguardanti il mutante SsoMCM-K134A sono risultati particolarmente interessanti. Il confronto dei dati di EMSA con i saggi di attività elicasica per tale mutante indicano l'esistenza di una relazione diretta tra il legame all'acido nucleico a singolo filamento e la capacità da parte

dell'enzima di denaturare il DNA (Pucci *et al.*, 2004). Quindi l'interazione con il DNA a doppio filamento non è richiesta per l'attività dell'enzima, come invece proposto per le DNA elicasi LTag di SV40 (Li *et al.*, 2003). Questi risultati suggeriscono che SsoMCM adotterebbe un meccanismo di azione di tipo ad "esclusione sterica", come proposto per la DNA elicasi batterica DnaB e per il complesso MCM 4/6/7 di *S. cerevisiae* (Kaplan *et al.*, 2003). Questa ipotesi è inoltre in accordo con la osservazione che la proteina SsoMCM ha una più alta affinità di legame per molecole di DNA a singolo filamento o contenenti giunzioni singolo/doppio filamento piuttosto che su molecole di DNA a doppio filamento con estremità piatte (De Felice *et al.*, 2004). Inoltre, l'enzima mostra attività DNA elicasi soltanto su strutture che presentano una "coda" al 5' e tale attività è stimolata dalla *single-strand DNA-binding protein* (SSB) (Carpentieri *et al.*, 2002).

Un'altra caratteristica che è emersa dalle strutture ai raggi-X di alcune DNA elicasi, è la presenza di  $\beta$ -*hairpin fingers* basici orientati verso il centro del canale ed importanti proprio per il legame al DNA, come confermato da diversi studi di mutagenesi di residui aminoacidici localizzati in questi elementi di struttura (Notarnicola *et al.*, 1995; Washington *et al.*, 1996; Zieglin *et al.*, 2003; Fletcher *et al.*, 2003; Yoon-Robarts *et al.*, 2004). Comunque, solo nel caso di LTag di SV40 è stato dimostrato direttamente, mediante analisi cristallografica (paragrafo 1.5) che tali elementi di struttura vanno incontro a cambi conformazionali durante il ciclo dell'idrolisi dell'ATP. Tale movimento longitudinale dei *fingers* lungo il canale sarebbe responsabile della traslocazione e separazione dei due filamenti del DNA (Gai *et al.*, 2004, Shen *et al.*, 2005). Le nostre analisi effettuate mediante studi di mutagenesi dei residui K246, R247 ed R250 posti all'estremità degli ipotetici  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM suggeriscono per tali elementi strutturali un ruolo critico

sia nel legame al DNA sia nell'attività DNA elicastica. Inoltre, mediante marcatura sito-specifica dei  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM con il fluoroforo *acrylodan* e spettroscopia di fluorescenza è stato dimostrato che questi ultimi vanno incontro a cambi conformazionali in presenza di ADP-AIF<sup>-4</sup> o ADP e non in seguito al legame dell'ATP. Sulla base di questi dati possiamo quindi ipotizzare che l'idrolisi dell'ATP, e non il suo legame, provochi un movimento dei  $\beta$ -*hairpin fingers* di SsoMCM all'interno del canale centrale e che questo favorisca la traslocazione della molecola e l'apertura dei due filamenti di DNA (Fig. 20).



**Fig. 20. Modello proposto per il funzionamento di SsoMCM.**

Rappresentazione schematica di un esamero legante DNA a singolo filamento e che trasloca lungo di esso in direzione  $3' \rightarrow 5'$ . Il secondo filamento invece viene escluso dal canale centrale dell'esamero e "spiazzato" con un meccanismo di "esclusione sterica". Nella figura è rappresentato il movimento del putativo  $\beta$ -hairpin finger e la traslocazione dell'acido nucleico all'interno del sito attivo dell'enzima durante le fasi di apertura dell'elica del DNA. A: assenza di nucleotide-trifosfato. B: ATP legato. C: idrolisi dell'ATP. D: rilascio dei prodotti dell'idrolisi.

Il dettagliato meccanismo molecolare tramite cui il ciclo di idrolisi dell'ATP determina il movimento di tali  $\beta$ -hairpin fingers rappresenta un obiettivo per studi successivi. L'individuazione degli specifici residui aminoacidici responsabili del trasferimento dell'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP dai siti di legame del

nucleotide-trifosfato ai  $\beta$ -*hairpin fingers* contribuirà a chiarire ulteriormente i dettagli molecolari del funzionamento delle DNA elicasi di tipo MCM.



## 4. Materiali e Metodi

Gli enzimi di restrizione e di modificazione utilizzati sono della *New England Biolabs*. I nucleotidi radioattivi sono stati acquistati dall'*Amersham Biosciences*. Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati dalla *Proligo* (Francia). Il fluoroforo *acrylodan* è stato acquistato dalla *Molecular Probes*.

### 4.1 Mezzi di coltura ed antibiotici

Il mezzo di coltura utilizzato è il Luria-Bertani LB (*Sigma*). Gli antibiotici (*Sigma*) utilizzati per la selezione sono stati ampicillina (Amp), kanamicina (Kan) e cloranfenicolo (Clf).

### 4.2 Ceppi batterici e vettori

Per la propagazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* DH5a (*Invitrogen*). Per l'espressione delle proteine ricombinanti è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* BL21-CodonPlus<sup>TM</sup> (DE3) Rosetta (*Novagen*) derivato dal ceppo BL21(DE3) isolato da Studier e Moffat (Studier and Moffat, 1986).

Per l'espressione delle proteine ricombinanti in *E. coli* sono stati utilizzati i vettori di espressione pET19b e pET28a (*Invitrogen*). I vettori pET consentono di ottenere un'elevata e selettiva espressione di geni posti sotto il controllo dei segnali di trascrizione del batteriofago T7. Tale espressione dipende dalla RNA polimerasi del

fago T7 il cui gene, contenuto nel genoma del ceppo di *E. coli* utilizzato, è regolato dal promotore inducibile *lac UVS*. L'espressione della T7 RNA polimerasi è indotta dall'aggiunta di IPTG al terreno di coltura. Il pET19b contiene il gene per la resistenza all'Amp, mentre il pET28a conferisce resistenza alla Kan. Entrambi i vettori contengono il sito d'origine della replicazione del fago M13 (f1 ori).

### **4.3 Preparazione di cellule competenti**

100 ml di terreno LB è stato inoculato con una singola colonia di cellule precedentemente strisciate su piastra LB agar (15 g di agar per litro di LB). La coltura è stata incubata a 37 °C con agitazione per 16 h. Quando le cellule hanno raggiunto una densità di 0.4-0.6 O.D. a 600 nm, sono state centrifugate a 4000 rpm per 15 min. Il *pellet* è stato risospeso in 50 ml di una soluzione 100 mM CaCl<sub>2</sub>. Dopo un'incubazione in ghiaccio per 30 min., la sospensione cellulare è stata centrifugata per 15 min. a 4000 rpm ed il *pellet* è stato poi risospeso in 10 ml di una soluzione 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 % Glicerolo. Le cellule sono state aliquotate e conservate a -80 °C.

### **4.4 Mini e midi preparazione di DNA plasmidico**

La mini e la midi preparazione di DNA plasmidico sono state effettuate con il sistema della *Qiagen*. La resa finale di DNA plasmidico ottenuta è stata di circa 25 e 80 µg rispettivamente.

## 4.5 Elettroforesi del DNA su gel di agarosio

L'elettroforesi per la separazione dei frammenti di DNA è stata effettuata su gel di agarosio all'1% (peso/volume) in TAE (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM acido acetico, 10 mM EDTA) ed in presenza di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 1 µg/ml. Le bande sono state rilevate mediante esposizione del gel ai raggi UV e le dimensioni dei frammenti sono state stimate prendendo come riferimento *markers* di peso molecolare (DNA del fago λ digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HindIII*).

La purificazione dei frammenti di DNA è stata effettuata con il sistema QIAEX II (*Qiagen*).

## 4.6 Produzione dei costrutti genici pET19b-SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A, -K194A, -K246A, -R247A e -R250A

La sostituzione dei residui aminoacidici basici con Alanina è stata effettuata mediante un protocollo di mutagenesi mirata basata sulla PCR (Ho *et al.*, 1989) sul costrutto pET19b-SsoMCM (Carpentieri *et al.*, 2002) utilizzando i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

MCM-K129A-for 5'-CTATTGATGGAATCTTAGTTGCAGTTACTCCGGTAAAAGAG-3'

MCM-K129A-rev 5'-CTCTTTTACCGGAGTAACTGCAACTAAGATTCCATCAATAG-3'

MCM-K134A-for 5'-TAGTTAAAGTTACTCCGGTAGCAGAGAGAATTTACAAGGCA-3'

MCM-K134A-rev 5'-TGCCTTGTAATTCTCTCTTGCTACCGGAGTAACTTTAACTA-3'

MCM-H146A-for 5'-GCAACTTATAAGCACATTGCTCCCAGACTGTATGCAGGAG-3'

MCM-H146A-rev 5'-CTCCTGCATACAGTCTGGAGCAATGTGCTTATAAGTTGC-3'

(Le triplette mutageniche sono sottolineate).

Oligonucleotidi esterni:

**MCM-*NcoI*-for 5'-GGTTGGCCATGGTTGGAAATTCCTAGTAAACAGATT-3'**

**MCM-*KpnI*-rev 5'-CCTAGGTAAC TGACCTGAGGGTACCTC-3'**

Oligonucleotidi per il costrutto pET19b-SsoMCM- K194A:

**MCM-*NcoI*-for 5'- GGTTGGCCATGGTTGGAAATTCCTAGTAAACAGATT-3'**

**MCM-K194A-*KpnI*-rev5'-**

**CCTGAGGGTACTCTTCTGGTCTCTCCTGGATTACCGCTGCTTGCCAGTCA-3'**

(I siti di restrizione sono evidenziati in giallo).

Oligonucleotidi mutagenici per i costrutti pET19b-SsoMCM-K246A, -R247A e -  
R250A:

**MCM-K246A-for 5'-ACAAGACTCCCCGGTCCGCAAGGGGAAGTAGAGCAGTA-3'**

**MCM-K246A-rev 5'-TACTGCTCTACTTCCCCTTGCGACCGGGGAGTCTTGT-3'**

**MCM-R247A-for 5'-ACAAGACTCCCCGGTCAAAGCGGGAAGTAGAGCAGTA-3'**

**MCM-R247A-rev 5'-TACTGCTCTACTTCCCGCTTTGACCGGGGAGTCTTGT-3'**

**MCM-R250A-for 5'-CCGGTCAAAAGGGGAAGTGCAAGCAGTATTTGACATTTAT-3'**

**MCM-R250A-rev 5'-ATAAATGTCAAATACTGCTGCACTTCCCCTTTTGACCGG-3'**

Oligonucleotidi esterni:

**MCM-*KpnI*-for 5'-GAGAGACCAGAAGA GGTACCCTCAGGT-3'**

**MCM-*ClaI*-rev 5'-ATGGTGCTATCGATGATATGATTC-3'**

Ciascuna reazione di amplificazione è stata eseguita per 30 cicli (1 min. a 94 °C; 1 min. a 50 °C; 1 min. a 72 °C) ed il prodotto finale è stato purificato e subclonato nel costrutto pET19b-SsoMCM all'interno dei siti unici di restrizione. Gli inserti clonati sono stati sequenziati per verificare la presenza delle mutazioni volute introdotte e

l'assenza di mutazioni erroneamente introdotte dalla PCR (Servizio di sequenziamento *Primm*, Napoli).

#### **4.7 Produzione del costrutto genico pET28a-SsoMCM-*His tag***

Per la produzione del costrutto genico pET28a-SsoMCM-*His tag* codificante per SsoMCM con una coda di sei Istidine al C-terminale è stata effettuata una PCR sul costrutto genico pET19b-SsoMCM amplificando il gene con il seguente programma: 1 min. a 94 °C; 1 min. a 50 °C; 1 min. a 72 °C (per 30 cicli) ed utilizzando i seguenti oligonucleotidi:

**MCM-*NcoI*-for 5'-GGTTGGCCATGGTTGGAAATTCCTAGTAAACAGATT-3'**

**MCM-*XhoI*-rev 5'-GGTTGGCTCGAGGACTTTTTTGTAACATTCTGGTTTTGCTTCAT-3'**

Il prodotto ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *NcoI/XhoI* e ligato (reazione di DNA ligasi per 16 h a temperatura ambiente) nel vettore di espressione pET28a precedentemente linearizzato con i suddetti enzimi. Il gene clonato è stato sequenziato per escludere la presenza di mutazioni introdotte erroneamente durante la PCR.

## 4.8 Produzione dei costrutti genici pET28a-SsoMCM-S243C e pET28a-SsoMCM- S243C/WA

Il costrutto genico pET28a-SsoMCM-*His tag* è stato mutagenizzato sostituendo con Serina due residui di Cisteina 642 e 682 mediante un protocollo di mutagenesi mirata basato sulla PCR (Ho 1989).

Inizialmente è stato prodotto il costrutto genico pET28a-SsoMCM-C642S utilizzando i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

**MCM-C642S-for 5'-CTGTAAGTTCTGAGTCCGCAAAAAGTTAAGG-3'**

**MCM-C642S-rev 5'-TCCTTAACTTTTGCGGACTCAGAACTTACA-3'**

Oligonucleotidi esterni:

**MCM-*NdeI*-for 5'-AGAAAATATATAGCATATGCAAGGAAATAC-3'**

**MCM-*XhoI*-rev 5'-GGTTGGCTCGAGGACTTTTTTGTAACATTCTGGTTTTGCTTCAT-3'**

Successivamente, per produrre il costrutto pET28a-SsoMCM-C642S/C682S (doppio mutante), è stata effettuata una PCR sul costrutto genico pET28a-SsoMCM-C642S utilizzando i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

**MCM-C642S-for 5'-CTGTAAGTTCTGAGTCCGCAAAAAGTTAAGG-3'**

**MCM-C682S-*XhoI*-rev 5'-GTGGTGCTCGAGGACTTTTTTGTAAGATTCTGGTTT-3'**

ed i seguenti oligonucleotidi esterni:

**MCM-*NdeI*-for 5'-AGAAAATATATAGCATATGCAAGGAAATAC-3'**

**MCM-C682S-*XhoI*-rev 5'-GTGGTGCTCGAGGACTTTTTTGTAAGATTCTGGTTT-3'**

I prodotti di PCR (1 min. a 94 °C; 1 min. a 50 °C; 1 min. a 72 °C per 30 cicli) sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *NdeI/XhoI* e subclonati nel costrutto

pET28a-SsoMCM-*His tag*, precedentemente linearizzato con gli stessi enzimi, mediante reazione di DNA ligasi (per 16 h a temperatura ambiente). Il costrutto genico pET28a-SsoMCM-C642S/C682S sequenziato, è stato successivamente utilizzato come stampo per produrre il costrutto pET28a-SsoMCM-S243C mediante mutagenesi mirata basata sulla PCR (Ho *et al.*, 1989) ed utilizzando i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

**MCM-S243C-for 5'-TAGATATAAAACAAGACTIGTCCGGTCAAAAGGGGAAGTAG-3'**

**MCM-S243C-rev 5'-CTACTTCCCCTTTTGACCGGACAGTCCTTGTTTTATATCTA-3'**

Oligonucleotidi esterni:

**MCM-*KpnI*-for 5'-GAGAGACCAGAAGAGGTACCCCTCAGGT-3'**

**MCM-C682S-*XhoI*-rev 5'-GTGGTGCTCGAGGACTTTTTTGTAAGATTCTGGTTT-3'**

I prodotti di PCR (1 min. a 94 °C; 1 min. a 50 °C; 1 min. a 72 °C, per 30 cicli) sono stati digeriti con gli enzimi di restizione *KpnI/XhoI* e subclonati nel costrutto pET28a-SsoMCM-*His tag*, precedentemente linearizzato con gli stessi enzimi, mediante reazione di DNA ligasi.

Il costrutto pET28a-SsoMCM-S243C-WA, infine, è stato ottenuto sostituendo il residuo aminoacidico di Lisina 346 nel motivo di sequenza Walker A con Alanina utilizzando come stampo per la PCR mutagenica il costrutto pET28a-SsoMCM-S243C ed i seguenti oligonucleotidi mutagenici:

**MCM-K346A-for 5'-TGATCCCGGTACTGCCGCATCACAAATGCT-3'**

**MCM-K346A-rev 3'-AGCATTTGTGATTGCGGCAGTACCGGGATCA-3'**

Oligonucleotidi esterni:

**MCM-*KpnI*-for 5'-GAGAGACCAGAAGAGGTACCCCTCAGGT-3'**

MCM-C682S-*XhoI*-rev 5'-GTGGTGCTCGAGGACTTTTTTGTAAGATTCTGGTTT-3'

Per il clonaggio è stata eseguita la strategia utilizzata per il costrutto pET28a-SsoMCM-S243C.

#### **4.9 Trasformazione dei ceppi di *E. coli* con DNA plasmidico**

La miscela della reazione di DNA ligasi (50 ng/μl di plasmide), è stata aggiunta a 200 μl di sospensione di cellule competenti. La miscela così ottenuta è stata incubata in ghiaccio per 30 min. quindi a 37 °C per 5 min. ed ancora in ghiaccio per 10 min. Successivamente la stessa, dopo l'aggiunta di 800 μl di LB, è stata incubata a 37 °C per 45 min. con agitazione. Circa 300 μl sono stati piastrati su terreno LB agar addizionato con l'opportuno antibiotico (100 μg/ml per Amp, 30 μg/ml per Kan e 30μg/ml per Clf). Le piastre sono state incubate a 37°C per 16 h.

#### **4.10 Espressione e purificazione dei mutanti SsoMCM-K129A, -K134A, -H146A -K194A, -K246A, -R247A, -R250A e della proteina SsoMCM *wt***

Le cellule del ceppo di *E. coli* BL21-CodonPlus™ (DE3) Rosetta, trasformate con i diversi costrutti genici, sono state cresciute in 1 litro di terreno LB contenente 100 μg/ml di Amp e 30 μg/ml di Clf. Quando la coltura ha raggiunto una densità di 0.7 OD a 600 nm, l'espressione della proteina è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG ad una concentrazione finale di 0.2 mM. La coltura batterica è stata incubata a



37 °C per 2 h e poi centrifugata a 8000 rpm per 10 min. I *pellets* cellulari sono stati conservati a -20 °C.

La purificazione di SsoMCM *wt* e dei mutanti sito-diretti è stata ottenuta risospendendo il *pellet* batterico in 40 ml di *buffer* A (25 mM Tris-HCl pH 7.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>) in presenza di inibitori di proteasi (*Sigma*). Le cellule sono state lisate attraverso due passaggi nella *French Press* (*Aminco Co., Silver Spring, MD*) a 1500 p.s.i. Il lisato ottenuto è stato centrifugato per 30 min. a 30000 rpm (*Rotore Beckman 70.0 Ti*) a 10 °C. Il sovrnatante proveniente dalla centrifugazione (diluito 1:1 con *buffer* A) è stato trattato inizialmente al calore per 10 min. a 80 °C, successivamente incubato in ghiaccio per 10 min. ed infine centrifugato a 30000 rpm per 30 min. Il sovrnatante, filtrato con un filtro da 0.22 µm (*Millipore*), è stato caricato su colonna di *Heparin-Sepharose*<sup>TM</sup> (*Amersham Biosciences*) pre-equilibrata in *buffer* A. Dopo lavaggio della colonna, l'eluizione è stata effettuata con un gradiente lineare (1.0 ml/min. in 150 min.) di NaCl (0-1 M) in *buffer* A. Le frazioni raccolte (2.0 ml) sono state analizzate per SDS-PAGE. Quelle contenenti la proteina ricombinante sono state riunite e dializzate contro *buffer* B (25 mM Tris-HCl pH 8.5, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl) per 16 h a 4 °C. Il campione dializzato è stato caricato su colonna MonoQ HR 10/10 (*Amersham Biosciences*) equilibrata in *buffer* B. Dopo lavaggio della colonna, l'eluizione è stata effettuata con un gradiente lineare (1.0 ml/min. in 70 min.) di NaCl (0.05-1 M) in *buffer* B. Le frazioni raccolte (1.0 ml) sono state analizzate per SDS-PAGE. Quelle contenenti la proteina ricombinante sono state riunite e dializzate contro *buffer* C (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl). Il campione è stato successivamente concentrato mediante il sistema di ultrafiltrazione Amicon (*Millipore*) utilizzando una membrana con *cut-off* 30 kDa. La resa finale della purificazione è stata di circa 2.0 mg della proteina ricombinante.

#### 4.11 Espressione e purificazione della proteina SsoMCM-*His tag* e dei mutanti Sso MCM-S243C e -S243C/WA

Le cellule del ceppo di *E. coli* BL21-CodonPlus<sup>TM</sup> (DE3) Rosetta, trasformate con i diversi costrutti genici, sono state cresciute in 2 litri di terreno LB contenente 30 µg/ml di Kan e 30 µg/ml di Clf. Quando la coltura ha raggiunto una densità di 0.7 OD a 600 nm, l'espressione della proteina è stata indotta mediante l'aggiunta di IPTG ad una concentrazione finale di 0.2 mM. La coltura batterica è stata incubata a 37 °C per 2 h e poi centrifugata a 8000 rpm per 10 min.. I *pellets* cellulari sono stati conservati a -20 °C. Il *pellet* cellulare è stato risospeso in 30 ml di *buffer A* (25 mM Tris-HCl, pH 7.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM imidazolo) in presenza di inibitori di proteasi. Le cellule sono state lisate attraverso due passaggi nella *French Press* a 1500 p.s.i. Il lisato ottenuto è stato centrifugato per 30 min. a 30000 a 10 °C. Il sovrnatante proveniente dalla centrifugazione (diluito 1:1 con *buffer A*) è stato trattato inizialmente al calore per 10 min. a 80 °C, successivamente incubato in ghiaccio per 10 min. ed infine centrifugato a 30000 rpm per 30 min. Il sovrnatante è stato filtrato su filtro 0.22-µm (*Millipore*) e caricato su una colonna da 2 ml Ni-NTA (Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetate, *Superflow-agarose Qiagen*) equilibrata in *buffer A*. Dopo i lavaggi in *buffer A*, l'eluizione è stata effettuata con un gradiente a step (70 ml) di imidazolo (25–500 mM) in *buffer A*. Le frazioni raccolte (1.0 ml) sono state analizzate per SDS-PAGE. Quelle contenenti la proteina ricombinante sono state riunite e dializzate contro *buffer B* (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM NaCl) per 16 h a 4 °C. Successivamente il campione è stato concentrato mediante il sistema di ultrafiltrazione *Amicon* utilizzando una membrana con *cut-off* 30 kDa. La resa finale della purificazione è stata di circa 3.0 mg di proteina ricombinante.

#### **4.12 Determinazione della concentrazione proteica**

Per la determinazione della concentrazione proteica è stato utilizzato il saggio Bradford eseguito mediante il sistema della *Bio-Rad Laboratories*. Come proteina di riferimento è stata utilizzata la BSA. I valori di assorbanza letti a 595 nm sono stati riportati in grafico contro la concentrazione proteica. La concentrazione dei campioni analizzati è stata ottenuta per estrapolazione della retta di taratura.

#### **4.13 Elettroforesi delle proteine su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)**

Il gel di poliacrilammide utilizzato era al 10 % (acrilammide/bis-acrilammide, nel rapporto 29:1).

I campioni proteici sono stati preparati aggiungendo *sample buffer* di modo che la concentrazione finale fosse: 62 mM Tris/HCl pH 6.8, 1 % glicerolo, 0.5 % SDS, 0.5 % 2-mercaptoetanololo, 0.01 % blu di bromofenolo. Il gel è stato corso a 200 Volts in un tampone (25 mM Tris, 200 mM glicina, 0.1 % SDS). Le bande proteiche sono state rilevate con una soluzione contenente 0.25 % Comassie G, 25% isopropanolo, 10 % acido acetico e dopo decolorazione del gel con una soluzione 10 % acido acetico/25 % isopropanolo.

#### **4.14 Cromatografia ad esclusione molecolare**

Ciascuna delle proteine purificate (100 µg in 250 µl) è stata analizzata per cromatografia ad esclusione molecolare utilizzando una colonna Superose 6 HR 10/30 (*Amersham Biosciences*). La colonna è stata sviluppata in *buffer* (25 mM Tris-

HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl). La calibrazione della colonna è stata effettuata utilizzando i marcatori di peso molecolare: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), BSA (69 kDa) e la ribonucleasi A (13.7 kDa) (*Amersham Biosciences*). La cromatografia è stata eseguita con un flusso di 0.3 ml/min. a temperatura ambiente raccogliendo frazioni da 0.5 ml. Queste sono state successivamente analizzate per Western Blotting.

#### **4.15 Western Blotting**

Per l'analisi delle frazioni della cromatografia ad esclusione molecolare, 20 µl di ciascuna frazione sono stati caricati su SDS-PAGE al 10 % di acrilammide. Dopo trasferimento su filtro di nitrocellulosa (*Protan, Schleicher-Schuell*), i siti di interazione aspecifici sul filtro sono stati bloccati incubando il filtro in una soluzione contenete 3 % BSA in TBS-T (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) per 1 h. Il filtro è stato successivamente incubato in presenza dell'antisiero policlonale anti-SsoMCM diluito 1:5000 in TBS-T per 1 h. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro è stato incubato in presenza di un anticorpo secondario diretto contro le IgG di coniglio e coniugato con la fosfatasi alcalina (*Sigma*, diluito 1:30000 secondo istruzioni). Le proteine sono state visualizzate mediante una reazione colorimetrica su filtro ottenuta all'aggiunta del substrato specifico per la fosfatasi alcalina Sigma Fast™ (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphatase/Nitro Blue Tetrazolium).

#### 4.16 Saggi di attività ATPasica

La miscela di reazione utilizzata nei saggi di attività ATPasica (10  $\mu$ l finali) contiene: 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 mM sodio acetato, 5 mM  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$  P]ATP (0.5-1  $\mu$ Ci) e la quantità di proteina indicata. Tale miscela è stata incubata per 30 min. a 60 °C e poi trasferita in ghiaccio. Un aliquota da 1  $\mu$ l di ciascuna miscela è stata caricata su lastrina di polietileneimmuno-cellulosa (*Merck*). La lastrina è stata precorsa in 1 M acido formico e sviluppata con la soluzione contenente 0.5 M litio cloruro e 1 M acido formico. Le quantità di [ $\gamma$ - $^{32}$  P]ATP idrolizzato a [ $\gamma$  $^{32}$  P] orto-fosfato e quantificate utilizzando il PhosphorImager (*Molecular Dynamics*, programma *ImageQuant*, versione 1.2).

#### 4.17 Saggi di legame al DNA

Per i saggi di legame al DNA sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi: molecole di DNA contenente una regione a bolla di 20 timine (Bub-20T), ottenuta ibridando l'oligonucleotide Bub-20T-F, marcato, con l'oligonucleotide complementare Bub-20 R (utilizzato in un eccesso molare di 3 volte).

5'-TCTACCTGGACGACCGGG(T)<sub>20</sub>GGGCCAGCAGGTCCATCA-3' (Bub-20T-F)

5'-TGATGGACCTGCTGGCCC(T)<sub>20</sub>CCCGGTCGTCCAGGTAGA-3' (Bub-20T-R).

Molecole di DNA a doppio filamento con estremità piatte (*Blunt*) ottenuta ibridando l'oligonucleotide NoTail-1, marcato, con l'oligo complementare NoTail-2 (utilizzato in un eccesso molare di 3 volte).

5'-GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGA-3' (NoTail-1),  
5'-TCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGC-3' (NoTail-2).

La molecola di DNA utilizzata come singolo filamento è stata Bub-20T-F marcata.

Tali molecole sono state marcate con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP utilizzando la T4 polinucleotide chinasi (*New England Biolabs*) e purificate utilizzando il sistema Micro Bio Spin P-30 (*Bio-Rad Laboratories*).

Per preparare le molecole di DNA a doppio filamento, le miscele contenenti gli oligonucleotidi sintetici complementari sono state incubate per 5 min. a 95 °C e poi raffreddate lentamente fino a raggiungere la temperatura ambiente.

I saggi di legame al DNA sono stati effettuati in reazioni di 10  $\mu$ l contenenti 200 fmoli delle molecole di DNA marcate con [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.7 mM  $\beta$ -mercaptoetanololo e la quantità proteica indicata. Le miscele sono state incubate a temperatura ambiente per 10 min. e sottoposte ad elettroforesi nativa su gel al 5 % (poliacrilammide/bis in un rapporto 37.5:1) in 0.5x TBE (TBE 1X: 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 80 mM acido borico) a voltaggio costante di 100 Volts. Le bande radioattive sono state rilevate utilizzando il PhosphorImager.

#### **4.18 Saggi di attività DNA elicasic**

Il substrato utilizzato nei saggi di attività elicasic è stato ottenuto ibridando un oligonucleotide composto da 85 basi (85-mero) con il DNA a singolo filamento di M13mp18+ (*Amersham Biosciences*).

L' oligonucleotide:

**5'TTGAACCACCCCCTTGTTAAATCACTTCTACTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAG**  
**AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCG-3'**

è complementare alla sequenza del DNA di M13mp18(+) a singolo filamento tranne che per 30 nucleotidi al 5' (sottolineati). L'oligonucleotide è stato marcato all'estremità 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP ed il prodotto è stato purificato utilizzando le colonnine Quantum Prep PCR Kleen Spin (*Bio-Rad Laboratories*). Per preparare il substrato, miscele contenenti le stesse quantità molari di M13mp18(+) e del 85-mero, sono state incubate per 5 min. a 95 °C e poi raffreddate lentamente fino a raggiungere la temperatura ambiente.

Le miscele di reazione dei saggi di attività elicastica (20  $\mu$ l finali) contengono 50 fmoli di substrato marcato con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (circa  $1 \times 10^3$  cpm/fmoli) in 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 mM sodio acetato, 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Le reazioni sono state incubate per 30 min. a 70 °C e bloccate mediante l'aggiunta di 5  $\mu$ l di 5x *stop buffer* (0.5 % SDS, 40 mM EDTA, 0.5 mg/ml proteinasi K, 20 % glicerolo, 0.1 % blu di bromofenolo). I prodotti delle reazioni sono stati separati su un gel all' 8 % (poliacrilammide/bis in un rapporto 29:1) in TBE contenente 0.1 % SDS al voltaggio costante di 150 Volts. Le bande radioattive sono state rilevate mediante il PhosphorImager.

#### **4.19 Marcatura delle proteine SsoMCM-S243C e -S243C/WA utilizzando il fluoroforo *acrylodan***

Il fluoroforo *acrylodan* (*Molecular Probes*) è stato disciolto in dimetilformammide alla concentrazione di 100 mM. Le proteine SsoMCM-S243C e -S243C/WA sono state marcate in reazioni di 2.5 ml contenenti la proteina alla concentrazione di 0.32 mg/ml ed un eccesso molare di 3 volte del fluoroforo in *buffer* A (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM NaCl). Le miscele di reazione sono state incubate per 2 h a temperatura ambiente al buio. Successivamente, il fluoroforo non legato è stato allontanato dalla miscela mediante una cromatografia su colonna PD-10 (*Amersham Biosciences*) precedentemente equilibrata in *buffer* A. La proteina marcata è stata rilevata registrando gli spettri di assorbimento nell'intervallo 220-600 nm delle singole frazioni della colonna (0.25 ml) allo spettrofotometro Cary 100 Scan UV-Visible. Le frazioni contenenti la proteina marcata sono state unite. Il campione così ottenuto è stato utilizzato per le misure spettrofluorimetriche. La stechiometria della marcatura per ciascun campione è stata effettuata rapportando la concentrazione dell'*acrylodan* (assorbimento a 391 nm, coefficiente di estinzione molare 20,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) alla concentrazione proteica (assorbimento a 280 nm, coefficiente di estinzione molare 49,880 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) ed è risultata essere 1 : 2 (moli di fluoroforo : moli di proteina monomeric).

#### **4.20 Spettroscopia di fluorescenza**

Gli spettri di emissione sono stati registrati allo stato stazionario alla temperatura di 25 °C utilizzando uno spettrofluorimetro ISS-K2 (*ISS, Urbana-Champaign, U. S. A.*) con una banda di eccitazione e di emissione di 1 e 2 nm



rispettivamente. La lunghezza d'onda di eccitazione per l'*acrylodan* è stata fissata a 391 nm mentre l'emissione è stata registrata tra 425 e 575 nm. Le misure sono state effettuate su volumi di campione di 0.3 ml contenenti le proteine SsoMCM-S243C e -S243C/WA alla concentrazione di 0.32 mg/ml in *buffer* A in assenza o in presenza dei nucleotidi-trifosfato (0.5 mM) ATP, ADP e ADP-AlF<sup>4</sup> (quest'ultimo preparato aggiungendo direttamente al campione da analizzare 0.5 mM AlCl<sub>3</sub> e 10 mM NaF). Gli spettri registrati sono stati analizzati mediante il programma *Origin*, versione 7.5.

#### 4.21 Metodi informatici

Il programma BLAST-PSI è stato utilizzato per la ricerca in *data base* delle sequenze omologhe di SsoMCM archeobatteriche. L'allineamento multiplo di sequenza è stato effettuato con il programma ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) e perfezionato sulla base della struttura cristallografica del dominio N-terminale di MthMCM (PDB codice di accesso 1LTL). Le sequenze delle proteine MCM utilizzate per l'allineamento sono delle seguenti specie archeobatteriche: *Sulfolobus solfataricus* (6015702), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (7428563), *Aeropyrum pernix* (5103579), *Pyrobaculum aerophilum* (18159702), *Archaeoglobus fulgidus* (32485665), *Methanosarcina barkeri* (48840405), *Methanosarcina mazei* (20906360), *Methanosarcina acetivorans* (19917905), *Ferroplasma acidarmanus* (48851904); *Thermoplasma acidophilum* (10640077), *Thermoplasma volcanium* (13541863) and *Picrophilus torridus* (48430937). In parentesi è indicato il codice identificativo del gene.

## 5. Bibliografia

Adachi Y., Usura J. and Yanagida M. (1997). A globular complex formation by Nda 1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. *Genes Cells* **2**: 467-479.

Boulikas T. (1996). Common structural features of replication origins in all life forms. *J. Cell. Biochem.* **60**: 297-316.

Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D. and Sutton G.G. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus janaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.

Carpentieri F., De Felice M., De Falco M., Rossi M. and Pisani F. M. (2002). Physical and functional interaction between the Mini-chromosome Maintenance-like DNA Helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **277**: 12118-12127.

Chong J. P. (2005). Learnig to unwind. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 734-736.

Chong J.P., Hayashi M.K., Simon M.N., Xu R.M. and Stillman B. (2000). A double-hexamer archaeal mini-chromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *PNAS* **97**: 1530-1535.

De Felice M., Esposito L., Pucci B., De Falco M., Rossi M. and Pisani F. M. (2004). A CDC6-like factor from the archaea *Sulfolobus solfataricus* promotes binding of the Mini-chromosome Maintenance complex to DNA. *J. Biol. Chem.* **279**: 43008-43012.

Edgell D.R. and Doolittle W.F. (1997). Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell* **89**: 995-998.

Ellis N.A., Groden J., Ye T.Z., Straughen J., Lennon D.J., Ciocci S., Proytcheva M. and German J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655-666.

Fletcher, R. J., Bishop., B. E., Leon, R. P., Sclafani, R. A., Ogata, C. M., and Chen, X. S. (2003). The structure and function of MCM from archaeal *M. thermoautotrophicum*. *Nature Struct. Biol.* **10**: 160-167.

Gai D., Zhao R., Li D., Finkielstein C. V. and Chen X. S. (2004). Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 Large Tumor Antigen. *Cell* **119**: 47-60.

Gomez-Lorenzo M.G., Valle M., Frank J., Gruss C., Sorzano C.O., Chen X.S., Donate L.E. and Carazo J.M. (2003). Large T antigen on the simian virus 40

origin of replication: a 3D snapshot prior to DNA replication. *EMBO J.* **22**: 6205-6213.

Grainge I., Scaife S. and Wigley D.B. (2003). Biochemical analysis of components of the pre-replication complex of *Archaeoglobus fulgidus*. *Nucleic Acids Res.* **31**: 4888-4898.

Gray M.D., Shen J.C., Kamath-Loeb A.S., Blank A., Sopher B.L., Martin G.M., Oshima J. and Loeb L.A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat. Genet.* **17**: 100-103.

Ho S. N., Hunt D. H., Horton R. M., Pullen J. K., and Pease L. R., (1989). Site-direct mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-5.

James, J. A., Escalante, C. R., Yoon-Robarts, M., Edwards, T. A., Linden, R. M., and Aggarwal, A. K. (2003). Crystal structure of the SF3 helicase from Adeno-Associated Virus type 2. *Structure* **11**: 1025-1035.

Kaplan D.L., Davey M.J. and O'Donnell M. (2003). Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex. *J. Biol. Chem.* **278**: 49171-49182.

Karow J.K., Chakraverty R.K. and Hickson I.D. (1997). The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J. Biol. Chem.* **272**: 30611-30614.

Kelman Z., Lee J.K. and Hurwitz J. (1999). The single minichromosome maintenance protein of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DeltaH contains DNA helicase activity. *PNAS* **96**: 14783-14788.

Kornberg A. and Baker T. A. (1992). Replication mechanisms and operations in DNA replication. 2<sup>nd</sup> edit, *Freeman W. H. & Co. New York*, pp. 355-378.

Labib K. and Diffley J. F. (2001). Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 64-70.

Laskey R.A. and Madine M.A. (2003). A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep.* **4**: 26-30.

Lee J. K. and Hurwitz J. (2000). Isolation and characterization of various complexes of the mini-chromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **275**: 18871-18878.

Lee J.K., Moon K.Y., Jiang Y. and Hurwitz J. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *PNAS* **98**: 13589-13594.

- Lei M. (2005). The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **5**: 365-380.
- Li D., Zhao R., Lilyestrom W., Gai D., Zhang R., DeCaprio J.A., Fanning E., Jochimiak A., Szakonyi G. and Chen X.S. (2003). Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**: 512-518.
- Lundgren M., Andersson A., Lanming C., Nilsson P. and Bernander R. (2004). Three replication origins in *Sulfolobus* species: synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *PNAS* **101**: 7046-7050.
- Matson S.W. and Kaiser-Rogers K.A. (1990). DNA helicases. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 289-329.
- Myllykallio H., Lopez P., Lopez-Garcia P., Heilig R., Saurin W., Zivanovic Y., Philippe H. and Forterre P. (2000). Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science* **288**: 2212-2215.
- Nieden zu, T., Roleke, D., Bains, G., Scherzinger, E., and Saenger, W. (2001). Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *J. Mol. Biol.* **306**: 479-487.
- Notarnicola, S. M., Park, K., Griffith, J. D., and Richardson, C. C. (1995). A domain of the gene 4 helicase/primase of bacteriophage T7 required for the formation of an active hexamer. *J. Biol. Chem.* **270**: 20215-20224.
- Olsen G.J. and Woese C.R. (1997). Archaeal genomics: an overview. *Cell* **89**: 991-994.
- Pacek M. and Walter J. C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J.* **23**: 3667-3676.
- Pape T., Meka H., Chen S., Vicentini G., van Heel M. and Onesti S. (2003). Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex. *EMBO Rep.* **4**: 1079-1083.
- Patel S. S. and Picha K. M. (2000). Structure and function of hexameric helicases. *Ann. Rev. Biochem.* **69**: 651-697.
- Pereira S.L., Grayling R.A., Lurz R. and Reeve J.N. (1997). Archaeal nucleosomes. *PNAS* **94**: 12633-12637.
- Prendergast F. G., Meyer M., Carlson G.L., Iida S. and Potter J. D. (1983). Synthesis, spectral properties, and use of 6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (Acrylodan). *J. Biol. Chem.* **258**: 7541-7544.

- Pucci B., De Felice M., Rossi M., Onesti S. and Pisani F. M. (2004). Amino Acid of *Sulfolobus solfataricus* Mini-chromosome Maintenance-like DNA Helicase involved in DNA binding/remodeling. *J. Biol. Chem.* **279**: 49222-49228.
- Reeve J.N., Sandman K. and Daniels C.J. (1997). Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation. *Cell* **89**: 999-1002.
- Robinson N. P., Dionne L., Lundgren M., Marsh V. L., Bernander R. and Bell S. D. (2004). Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell* **116**: 25-38.
- Shechter D., Ying C.Y. and Gautier J. (2004). DNA unwinding is an Mcm complex-dependent and ATP hydrolysis-dependent process. *J. Biol. Chem.* **279**: 45586-45593.
- Shechter D.F., Ying C.Y. and Gautier J. (2000). The intrinsic DNA helicase activity of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H mini-chromosome maintenance protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 15049-15059.
- Shen J., Gai D., Patrick A., Greenleaf W. B. and Chen X. S. (2005). The roles of the residues on the channel  $\beta$ -hairpin and loop structure of simian virus 40 hexameric helicase. *PNAS* **102**: 11248-11253.
- Shen J.C., Gray M.D., Oshima J. and Loeb L.A. (1998). Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2879-2885.
- Singleton, M. R., Sawaya, M. R., Ellenberger, T., and Wigely, D. B. (2000). Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell* **101**: 589-600.
- Smelkova N. V. and Borowiec J. A. (1997). Dimerization of simian virus 40 T antigen hexamers activates T-antigen DNA helicase activity. *J. Virol.* **71**: 8766-8773.
- Studier and Moffat (1986). *Molecular Cloning a Lab. Man.*, 3, A.9.
- Takahashi T. S., Wigley D. B. and Walter J. C. (2005). Pumps, paradoxes and ploughshares: mechanism of the MCM2-7 DNA helicase. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 437-444.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-82.
- Tye B. K. (1999). MCM proteins in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* **68**: 649-686.

Washington, M. T., Rosenberg, A. H., Griffin, K., Studier, F. W., and Patel, S. S. (1996). Biochemical analysis of mutant T7 primase/helicase proteins defective in DNA binding, nucleotide hydrolysis, and the coupling of hydrolysis with DNA unwinding. *J. Biol. Chem.* **271**: 26825-26834.

Woese C.R., Winker S. and Gutell R.R. (1990). Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *PNAS* **87**: 8467-8471.

Yoon-Robarts, M., Blouin, A. G., Bleker, S., Kleinschmidt, J. A., Aggarwal, A. K., Escalante, C. R., and Linden, R. M. (2004). Residues within the B' motif are critical for DNA binding by the superfamily 3 helicase Rep40 of adeno-associated virus type 2. *J. Biol. Chem.* **279**: 50472-50481.

Yu C.E., Oshima J., Fu Y.H., Wijsman E.M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G.M., Mulligan J. and Schellenberg G.D. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**: 258-262.

Zieglin, G., Niedenzu, T., Lurz, R., Saenger, W., and Lanka, E. (2003). Hexameric RSF1010 helicase RepA: the structural and functional importance of single amino acid residues. *Nucleic Acids Res.* **31**: 5917-5929.