



TÍTOL DEL TREBALL:

**ANÀLISI DEL DOMINI C-TERMINAL DE MCM3 DURANT EL
PROCÉS DE LICENSING**

Estudiant: Pol Rull Alibés

Correu electrònic: rull.pol@gmail.com

Grau en Biologia

Tutor acadèmic: Jessica Castro Gallegos

Correu electrònic: jessica.castro@udg.edu

Cotutor: Jordi Frigola Mas

Correu electrònic: jfrigola@idibgi.org

Empresa/Institució: Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI)

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 07 de juny de 2024

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria agrair a la Marina Guerrero, investigadora del grup de Replicació Cromosòmica a l'IDIBGI. És la persona que va estar amb mi en tot moment durant el treball. Em va saber guiar molt bé dia a dia, ajudant-me per tal d'obtenir uns resultats força satisfactoris. Gràcies a la seva planificació meticulosa vaig poder seguir un calendari per no saltar-me cap pas. A més, vaig gaudir molt la seva companyia i, treballant colze a colze, vaig poder aprendre molt d'ella. M'emporto una amiga.

També m'agradaria agrair amb en Jordi Frigola per obrir-me els braços i donar-me l'oportunitat de poder anar als laboratoris de l'IDIBGI. Igualment, vull agrair a la resta del grup de Replicació Cromosòmica, l'Alba i la Lucía per haver-me fet sentir un més del grup, i haver-me ajudat en alguns moments que ho he necessitat.

Finalment, m'agradaria agrair a la Jèssica, la meva tutora del TFG associada a la universitat, per l'atenció i la qualitat de les crítiques constructives durant l'elaboració de la memòria.

Moltes gràcies a tots per haver-me ajudat a fer-ho possible.

ÍNDIX

RESUM.....	4
RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE	7
REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA.....	7
REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT	7
1. INTRODUCCIÓ	8
1.1 EL CICLE CEL·LULAR I EL ROL DE L'HELICASA	8
1.2 REPLICACIÓ DEL DNA EUCARIOTA.....	8
1.3 MARCATGE DE L'ORÍGEN DE REPLICACIÓ "LICENSING"	9
1.3.1 PROTEÏNES IMPLICADES EN EL "LICENSING"	10
1.3.2 COM FUNCIONA EL LICENSING.....	11
1.4 L'MCM3	12
1.5 PUNT DE CONTROL DE G1	13
1.6 RELACIÓ ENTRE EL LICENSING I EL TRACTAMENT DEL CÀNCER	13
2. OBJECTIVES	15
3. METODOLOGIA	16
3.1 OBTENCIÓ M3CTED1	16
3.2 OBTENCIÓ M3CTD	19
3.3 OBTENCIÓ ORIGEN DE REPLICACIÓ ARS305	21
3.4 ASSAIG FORMACIÓ COMPLEX PRE-REPLICATIU.....	22
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	25
4.1 PURIFICACIÓ M3CTED1	25
4.2 PURIFICACIÓ M3CTD	28
4.3 ASSAIG FORMACIÓ COMPLEX PRE-REPLICATIU.....	30
5. CONCLUSIONS	36
6. BIBLIOGRAFIA	38

RESUM

La replicació cromosòmica és un procés essencial per qualsevol ésser viu, és el mecanisme pel qual la informació genètica pot passar a través de les generacions. El procés s'ha de donar només una vegada per cicle cel·lular, ja que el nombre de cromosomes per cèl·lula és un nombre determinat, que varia segons les espècies, però és invariable dins la mateixa espècie. La replicació s'inicia als orígens de replicació. En els eucariotes poc complexos, com és el cas de *Saccharomyces cerevisiae*, tenen pocs orígens de replicació i aquests són unes zones concretes del genoma, mentre que en eucariotes més complexos com els metazous, tenen un nombre molt elevat d'orígens de replicació, no determinats pel seu contingut genètic.

El primer pas de la replicació cel·lular és la formació del complex pre-replicatiu. Per tal que es pugui acoblar el complex a l'ADN, han de passar diferents fases. La primera fase es dona quan hi ha un reconeixement de l'origen de replicació per part del complex ORC-Cdc6. Al produir-se el reconeixement, el complex queda enrotllat al voltant de l'ADN i és capaç de reclutar al complex MCM-Cdt1. Aquest complex es podrà unir a l'ADN gràcies al primer complex ORC-Cdc6. Quedarà un anell format per les proteïnes MCM. Per cada origen de replicació ha de succeir aquest procés dues vegades, fins a formar-se l'estructura final que es diu doble hexàmer, amb dos anells de les proteïnes MCM junts, encarats cara a cara.

La proteïna MCM3 és l'encarregada de reconèixer el complex ORC-Cdc6 i seguidament recluta a la resta de subunitats. Té un domini a l'extrem C-terminal unida a la resta de la proteïna per una cua d'aminoàcids sense cap plegament concret. En aquest TFG, es talla aquesta cua i es fa un assaig per veure si, en diferents condicions, l'extrem C-terminal continua essent capaç d'unir-se a l'ADN. Es veu que el fragment C-terminal és incapaç d'unir-se de forma independent a l'ADN, ni tampoc en presència del fragment restant de la proteïna, quan no estan units. Es destaca la possible necessitat d'interacció entre els dominis de la proteïna per un correcte funcionament de l'extrem C-terminal.

Gràcies a aquesta informació, es poden trobar inhibidors que causin interferència entre ambdues subunitats per tal que la MCM3 no es pugui unir a l'ADN, amb l'objectiu d'utilitzar-se en teràpies contra el càncer.

RESUMEN

La replicación cromosómica es un proceso esencial para cualquier ser vivo, es el mecanismo por el cual la información genética puede pasar a través de las generaciones. El proceso debe ocurrir solo una vez por ciclo celular, ya que el número de cromosomas por célula es un número determinado, que varía según las especies pero es invariable dentro de la misma especie. La replicación se inicia en los orígenes de replicación. Los eucariotas poco complejos, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, tienen pocos orígenes de replicación y estos son unas zonas concretas del genoma, mientras que en eucariotas más complejos como los metazoos, se encuentra un número muy elevado de orígenes de replicación, no determinados por su contenido genético.

El primer paso de la replicación celular es la formación del complejo pre-replicative. Para que el complejo pueda unirse al ADN, deben pasar diferentes fases. La primera fase ocurre cuando hay un reconocimiento del origen de replicación por parte del complejo ORC-Cdc6. Al darse el reconocimiento, el complejo queda enrollado alrededor del ADN y es capaz de reclutar al complejo MCM-Cdt1. Este complejo se podrá unir al ADN gracias al primer complejo ORC-Cdc6. Quedará un anillo formado por las proteínas MCM. Para cada origen de replicación debe suceder este proceso dos veces, hasta formarse la estructura final que se llama doble hexámero, con dos anillos de las proteínas MCM juntos, encarados cara a cara.

La proteína MCM3 es la encargada de reconocer el complejo ORC-Cdc6 y seguidamente recluta al resto de subunidades. Tiene un dominio en el extremo C-terminal unida al resto de la proteína por una cola de aminoácidos sin ningún plegamiento concreto. En este TFG, se corta esta cola y se hace un ensayo para ver si, en diferentes condiciones, el extremo C-terminal sigue siendo capaz de unirse al ADN. Se observa que el fragmento C-terminal es incapaz de unirse de forma independiente en el ADN, ni tampoco en presencia del fragmento restante de la proteína, cuando no están unidos. Se destaca la posible necesidad de interacción entre los dominios de la proteína para un correcto funcionamiento del extremo C-terminal.

Gracias a esta información, se pueden encontrar inhibidores que causen interferencia entre ambas subunidades para que la MCM3 no pueda unirse al ADN, con el objetivo de utilizarse en terapias contra el cáncer.

ABSTRACT

Chromosomal replication is an essential process for any living being; it is the mechanism by which genetic information can pass through generations. The process must occur only once per cell cycle, as the number of chromosomes per cell is a determined number, which varies between species but is invariable within the same species. Replication starts at the origins of replication. In less complex eukaryotes, such as *Saccharomyces cerevisiae*, there are few replication origins, and these are specific areas of the genome. In more complex eukaryotes like metazoans, there is a large number of replication origins, not determined by its genetic content.

The first step in cellular replication is the formation of the pre-replicative complex. For the complex to attach to the DNA, several phases must occur. The first phase happens when the replication origin is recognized by the ORC-Cdc6 complex. Upon recognition, the complex wraps around the DNA and can recruit the MCM-Cdt1 complex. This complex can bind to the DNA thanks to the initial ORC-Cdc6 complex. An annulus formed by MCM proteins will be established. This process must occur twice for each replication origin, forming the final structure called the double hexamer, with two rings of MCM proteins together, facing face to face.

The MCM3 protein is responsible for recognizing the ORC-Cdc6 complex and subsequently recruiting the other subunits. It has a domain at the C-terminal end connected to the rest of the protein by a tail of amino acids without any specific folding. In this TFG, this tail is cut, and an assay is performed to see if, under different conditions, the C-terminal end remains capable of binding to the DNA. It is observed that the C-terminal fragment is unable to independently bind to DNA, nor in the presence of the remaining protein fragment when they are not connected. This highlights the possible need for interaction between the protein domains for the correct functioning of the C-terminal end.

Thanks to this information, inhibitors can be found that cause interference between both subunits, preventing MCM3 from binding to DNA, with the aim of being used in cancer therapies.

REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE

El poc nombre de dones en alts càrrecs executius és un tema controvertit. Segons la Washington State University, només un 14% dels alts executius millor remunerats als EUA eren dones el 2021, comparat amb un 86% d'homes (*The Rise of Women Executives | Washington State University*, s. f.). A Europa, només un 7.7% de les empreses més potents tenen una dona com a CEO, segons el European Gender Diversity Barometer (Hinks, 2023). Malgrat que l'INE indica que el 54.2% de les graduades en estudis superiors són dones, només un 29.8% dels matriculats en un MBA a Espanya el 2018 eren dones (*5 motivos del interés de las mujeres en estudiar un MBA*, s. f.). Aquesta desigualtat es deu, en part, al sostre de vidre, que limita l'accés de les dones als alts càrrecs per raó de gènere i no per aptituds. També existeix la síndrome de l'impostor que fa que les dones creguin que no estan preparades per a aquestes funcions, tot i estar-ho. És necessari promoure la meritocràcia i combatre la síndrome de l'impostor perquè les dones qualificades accedeixin a aquests llocs.

REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA

Són nombrosos els casos d'escàndols ètics que hi ha hagut durant la història de la ciència, alguns dels quals han tardat anys a desemmascarar-se (Venegas et al., 2023). És comprensible que després d'una hipòtesi ben fonamentada, i molts recursos destinats en una investigació, hi hagi una alta expectativa en els resultats. Quan, de sobte, els resultats no surten tal com s'esperaven, però hi ha certs indicis que els resultats poden ser els esperats, és molt fàcil caure a la temptació d'adulterar els resultats per augmentar la rellevància d'aquests. Durant aquest treball m'ha passat. He obtingut resultats que poden donar indici que la meva hipòtesi es pot complir, però en cap moment he estat capaç d'obtenir rèpliques del resultat. En aquest cas, adulterar els resultats hauria estat la forma més fàcil de fer una interpretació. Tot i això, s'ha de mantenir el rigor científic i ser conscient de la responsabilitat de treure unes conclusions i publicar-les.

REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT

El concepte de sostenibilitat està a l'ordre del dia de tots els projectes actuals. No es pot concebre cap projecte actual, sense la seva implicació sostenible i tenint en compte les repercussions mediambientals. L'institut d'investigació biomèdica de Girona (IDIBGI) no és una excepció. Es dona una gran importància al reciclatge, havent-hi un coordinador encarregat de garantir el compliment dels principis ètics i de sostenibilitat. És important gestionar els residus, sobretot en centres científics on s'utilitzen productes químics i reactius altament contaminants. És important tenir consciència del gran impacte mediambiental que tenen les nostres accions, i actuar amb diligència per, entre tots, aconseguir ser cada vegada més ecologistes.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 EL CICLE CEL·LULAR I EL ROL DE L'HELICASA

El cicle cel·lular són el conjunt d'esdeveniments que ocorren a la cèl·lula que acaben derivant en la divisió d'aquesta i l'obtenció de dues cèl·lules filles. Les diferents fases que componen la divisió cel·lular són la fase G1, la fase S, la fase G2 i finalment la fase M (Wang, 2022). Aquestes fases comprenen des del creixement de la cèl·lula filla, la qual durant la seva fase G1 augmenta de mida, la divisió del genoma cel·lular en la fase S, el creixement més pronunciat junt amb la duplicació dels orgànuls en la fase G2 i finalment la mitosi en la fase M.

Per tal d'iniciar la replicació cel·lular, és necessari que l'enzim helicasa s'uneixi a un gran nombre de posicions anomenades orígens de replicació (Costa & Diffley, 2022). El rol de les helicases consisteix en translocar-se a través de l'ADN, separant les dues cadenes d'àcids nucleics (Abdelhaleem, 2010). Un cop es tenen les dues cadenes separades, és la DNA polimerasa l'enzim encarregat de replicar el DNA per obtenir finalment dues còpies exactes de la molècula inicial, cada una de les còpies serà el material genètic de les dues cèl·lules filles.

1.2 REPLICACIÓ DEL DNA EUCARIOTA

L'inici de la replicació és un procés que consta de dos passos. El primer pas és l'"origin licensing" en el qual les subunitats de MCM 2-7 es carreguen als orígens de replicació per formar els complexos pre-replicatius (pre-RC). Per tal que es puguin unir les subunitats de MCM, és necessari que es reclutin les proteïnes del complex de reconeixement de l'origen (ORC) junt amb les proteïnes Cdc6 i Cdt1 (Boos et al., 2012). El pas final de l'"origin licensing" és el doble hexàmer, també conegut com a complex pre-replicatiu. Aquest és la unió de dos complexos MCM 2-7, encerclant el DNA, i units entre ells pel seu domini N-terminal (Champasa et al., s. f.). El licensing succeeix durant la fase G1 del cicle cel·lular.

El segon pas de la replicació consisteix en l'"origin firing", que succeeix durant la fase S. En aquest punt s'activen les helicases replicatives a través de l'acció de dues quinases, i cada hexàmer comença a desplaçar-se per les cadenes de DNA en direccions contràries (Mei & Cook, 2021).

Per tal d'aconseguir una duplicació exitosa, es necessita una alta coordinació entre la càrrega i l'activació de l'helicasa per tal que cada origen de replicació es desenrotlli i es formin els replisomes funcionals només una vegada per cicle (Boos et al., 2012). Degut a la gran mida del genoma humà, són necessaris milers d'orígens de replicació per replicar de forma eficient tot el

material genètic. No obstant, tot i els milers d'òrgens de replicació, només aproximadament el 10% d'aquests s'acaben utilitzant durant la replicació (Mei & Cook, 2021).

1.3 MARCATGE DE L'ORÍGEN DE REPLICACIÓ "LICENSING"

Els òrgens de replicació de l'ADN es preparen durant la fase G1 del cicle cel·lular. Aquest procés, ja explicat de forma breu anteriorment, és el que anomenem l'òrigen "licensing". Consisteix en la preparació de la maquinària encarregada d'iniciar la replicació per quan s'arriba a la fase S del cicle cel·lular (figura 1). Hi ha dos factors que es miren de forma global en tot el genoma que són els que defineixen que el genoma hagi dut a terme un bon "licensing". El primer factor a tenir en compte és que s'ha de dur a terme aquest procés a una velocitat adequada, per tal de tenir suficients òrgens de replicació amb la maquinària adherida abans que la cèl·lula passi de la fase G1 a la fase S. El segon factor a tenir en compte és que els òrgens de replicació que han patit el "licensing" estiguin homogèniament repartits per tot el genoma per tal que el procés de replicació sigui eficient i es puguin cometre el mínim d'errors possibles (Mei & Cook, 2021).

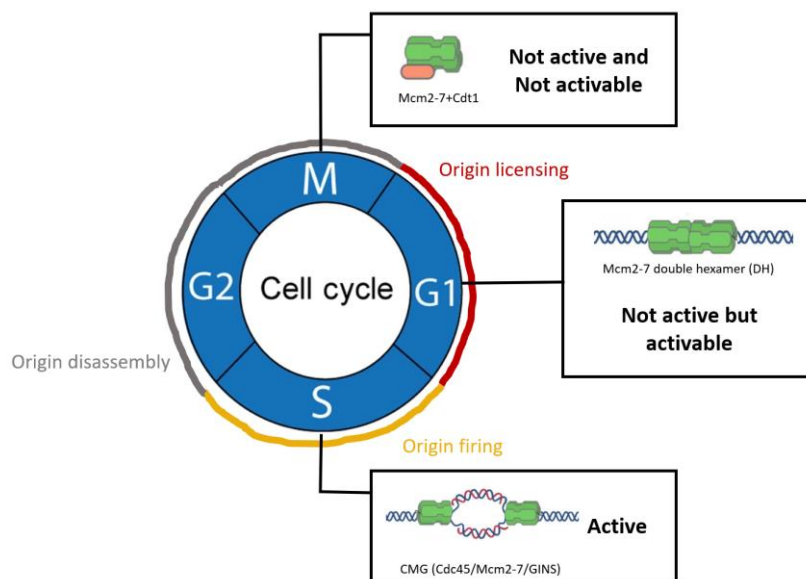


Figura 1: Fases del cicle cel·lular i estat del doble hexàmer en cadascuna d'elles.

1.3.1 PROTEÏNES IMPLICADES EN EL "LICENSING"

El primer protagonista durant l'"origin licensing" és el complex de reconeixement de l'origen. L'ORC eucariota és un complex proteic hexamèric el qual té la capacitat d'unir-se al DNA, sempre que tingui un ATP unit, sense la necessitat d'hidrolitzar-lo. Té una forma de mitja lluna amb un forat central per on es troba la doble cadena d'ADN. Les subunitats es troben en una disposició particular: Orc1 →Orc4→Orc5→Orc3→Orc2. Totes aquestes subunitats presenten una estructura comuna, un domini AAA+ (proteïna ATPasa) a l'extrem N-terminal (Orc3, 4 i 5) i C-terminal (Orc1 i 2). La subunitat Orc6 no forma part de l'anell i ocupa el forat entre Orc2 i Orc3. No té cap aparença estructural amb cap de les altres proteïnes ORC però si s'assembla amb el factor de transcripció TFIIB (Liu et al., 2011).

Una altra proteïna implicada en el procés del "origin licensing" és la Cdc6. La funció d'aquesta proteïna és el canvi de conformació d'ORC, reorientant Orc1. Amb la presència de Cdc6 i d'ATP, la forma de mitja lluna es transforma en un anell tancat amb una cavitat central pel DNA (Sun et al., 2012).

La Cdt1 és una altra de les proteïnes protagonistes per tal que es pugui donar el procés del licensing. La funció d'aquesta proteïna és establir l'entrada de l'ADN (Guerrero-Puigdevall et al., 2021).

El complex MCM és un complex hexamèric, les seves proteïnes mostren un domini AAA+ ATPasa. Aquest complex conforma el "core" o l'estructura basal de l'helicasa replicativa dels eucariotes. Les 6 subunitats s'anomenen des de la 2 a la 7 i es troben ordenades en la seva estructura (2,3,4...). Totes les subunitats MCM tenen un domini N-Terminal (NTD) amb un domini OB el qual s'uneix al DNA, i un domini C-terminal (CTD) AAA+ amb activitat ATPasa. Aquests dos dominis envolten una regió central amb activitat ATPasa. El domini N-terminal té 3 subdominis NTD-A, NTD-B i NTD-C. NTD-A té una forma semblant a l'hèlix helicoidal, característica d'algunes proteïnes d'unió al DNA, NTD-B presenta dits de Zinc, responsables de l'estabilitat de l'hexàmer quan es forma, i NTD-C presenta l'OB fold, que mitjançant interaccions hidrofòbiques participa en els contactes amb l'ADN. Per part de l'extrem CTD, aquest és el motor de l'helicasa. S'hi distingeixen diferents regions, la regió WA, els bucles de la forquilla β , la regió WB, el presensor 1 d'unió al DNA i un dit d'arginina. La primera interacció entre el complex MCM 2-7 amb l'ADN té lloc a través de la regió de la forquilla β , la qual facilita el contacte de la proteïna ATPasa (Riera et al., 2017)

1.3.2 COM FUNCIONA EL LICENSING

El complex proteic ORC és el primer d'entrar en contacte amb l'ADN, mitjançant una interacció DNA-depenent. El DNA s'uneix al canal central d'ORC, on el contacte entre les proteïnes i el material genètic es dona mitjançant els elements AAA+ i els dominis de doble hèlix de les proteïnes. En *S. Cerevisiae*, l'associació selectiva entre el complex ORC i l'ADN es dona mitjançant el reconeixement d'unes seqüències consens "ACS" (Singh & Krishnamachari, 2016). En altres eucariotes, com els metazous, no hi ha unes seqüències concretes de DNA on es pugui donar la unió sinó que aquesta depèn més de la forma, compactació i context de la cromatina (Méchalí, 2010).

L'anell d'ORC conté un forat que permet l'entrada del DNA al canal central. Després de la unió amb el DNA, la proteïna Cdc6 és l'encarregada de tancar-lo, quedant el DNA atrapat en el complex ORC-Cdc6. Aquest complex serà l'encarregat de reclutar l'helicasa (complex MCM 2-7) al genoma. El complex MCM 2-7 no es troba sol sinó que ve acompanyat de la proteïna Cdt1 la qual reforça les subunitats MCM2,4 i 6 lateralment, prevenint així el tancament de l'anell. El primer contacte entre el complex MCM 2-7 i el complex ORC es dona mitjançant la proteïna MCM3, domini WH de la qual interactua directament amb Cdc6 i el domini WH d'Orc2. Quan tenim una estructura conformada per DNA, ORC-Cdc6 i MCM 2-7-Cdt1 s'anomena complex OCCM (Yuan et al., 2020).

El procés anterior explica el carregament d'un complex MCM 2-7 al DNA, però realment l'estructura final és el doble hexàmer, on es troben 2 d'aquests complexos en contacte cap amb cap, en contacte pels costats N-terminal (figura 2). Per unir-se el segon complex MCM 2-7, es tornen a necessitar les mateixes proteïnes que en el cas anterior: Orc, Cdc6, Cdt1 i l'extrem C-terminal d'MCM3 (Yuan et al., 2020). Un cop tenim format el doble hexàmer, aquest roman inactiu fins que s'arriba a la fase S del cicle cel·lular. En aquest moment, es dona un augment dels nivells de les proteïnes quinaes DDK i CDK. Aquestes fosforilen diferents subunitats del complex MCM. Així, s'uniran les proteïnes Cdc45 i GINS, formant finalment el complex CMG (Boos & Ferreira, 2019).

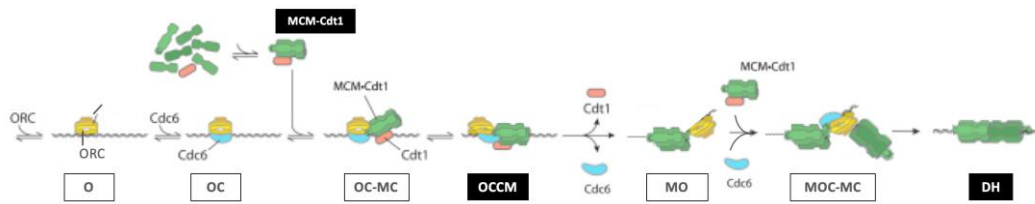


Figura 2: Diferents fases de la formació del doble hexàmer, des del primer contacte d'ORC, passant per l'OCCM i finalment el doble hexàmer.

1.4 L'MCM3

MCM, igual que la resta de proteïnes MCM, presenta un domini N-terminal i un domini AAA+, els quals estan ben conservats, des dels *Saccharomyces cerevisiae* als *Homo sapiens*, especialment el domini AAA+. A més, aquesta presenta un domini C-terminal el qual té la funció de reconeixement entre la MCM3 i el complex ORC-Cdc6 (Frigola et al., 2013). Al ser la proteïna MCM3 la primera del complex MCM en reconèixer la regió on hi ha el complex ORC-Cdc6, el domini C terminal té una funció vital per la formació del complex pre-replicatiu.

L'estructura de la MCM3 consisteix en una subunitat gran que està composta per l'extrem N-terminal, el qual té una funció de reclutament de la resta de proteïnes MCM i el domini AAA+ amb la funció principal d'hidrolitzar l'ATP. Seguidament d'aquestes dues regions, hi ha una regió d'enllaç que es pot veure molt fàcilment a la figura 3, on es veu la regió de l'esquerra (extrem N-terminal) i la regió de la dreta (extrem C-terminal) units per una cadena d'aminoàcids simple sense cap plegament concret. La regió de la dreta equival a l'extrem C-terminal, regió amb funció de reconeixement inicial entre la MCM3 i el complex ORC-Cdc6 (Riera et al., 2017).

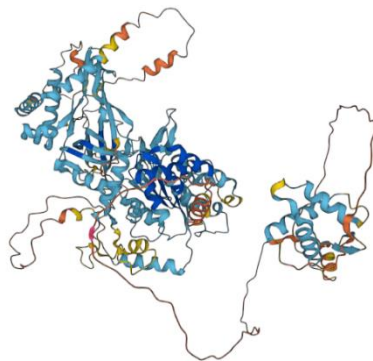


Figura 3: Imatge en 3D de l'estructura de la proteïna MCM3.

1.5 PUNT DE CONTROL DE G1

És molt important per la cèl·lula que es repliqui el genoma sencer, però només un cop per cycle cel·lular. El regulador per tal que això succeeixi és la CDK. Aquesta inhibeix la formació del complex pre-replicatiu "licensing", des de finals de la fase G1 fins a la mitosis, permetent que només es pugui formar als inicis de la fase G1 i per tant que durant la resta del cycle cel·lular no es puguin tornar a formar complexos i una nova replicació parcial o total del genoma. Inhibeix el licensing mitjançant la fosforil·lació de les proteïnes Orc2 i Orc6 (Blow & Dutta, 2005)

Tot i estar unit al DNA a partir dels inicis de la fase G1, el doble hexàmer roman inactiu fins a la fase S, en la qual es dona la replicació del genoma. En aquesta fase, tant la DDK com la CDK fosforilen les proteïnes MCM o altres proteïnes involucrades com SLD2, SLD3 o Cdc45, que acaben formant el replisoma funcional. Això ens indica la importància de la CDK, la qual segons la fase cel·lular actua com a inhibidora del licensing però activadora del replisoma (Diffley, 2004).

1.6 RELACIÓ ENTRE EL LICENSING I EL TRACTAMENT DEL CÀNCER

La quimioteràpia i la radioteràpia són dos dels principals tractaments utilitzats per combatre el càncer. Tot i que ambdós tractaments tenen com a objectiu destruir les cèl·lules canceroses, funcionen de manera diferent i tenen aplicacions específiques en el tractament oncològic.

La quimioteràpia utilitza fàrmacs per destruir les cèl·lules canceroses. Els fàrmacs quimioterapèutics funcionen principalment interrompent la capacitat de les cèl·lules de dividir-se i proliferar, afectant especialment aquelles que es divideixen ràpidament, com són les cèl·lules canceroses (Provencio et al., 2013). Hi ha diferents tipus de fàrmacs per dur a terme la quimioteràpia, els quals difereixen el seu mètode d'acció:

- Agents alquilants: Afegeixen grups alquil a l'ADN de les cèl·lules canceroses, afectant a la seva replicació i conduint les cèl·lules a la mort.
- Antimetabòlits: Imiten components naturals de l'ADN integrant-se en el material genètic de les cèl·lules cancerígenes inhibint la síntesi d'ADN i conduint a les cèl·lules a la seva mort.
- Inhibidors de topoisomerasa: Bloqueig de l'acció de les topoisomerases provoca trencaments en l'ADN que són irreparables i condueixen les cèl·lules a la mort.

Hi ha altres fàrmacs quimioterapèutics, però la dinàmica és la mateixa: provocar danys a l'ADN per tal d'evitar una correcta replicació i conseqüentment, la mort cel·lular.

En la radioteràpia s'utilitzen diferents radiacions amb rajos X o rajos Gamma. L'objectiu és el mateix que a la quimioteràpia, generar mutacions i dany general a l'ADN que acabi causant la mort de les cèl·lules canceroses. Els efectes secundaris d'aquests tractaments són molt variades, van des de la pèrdua del cabell fins a nàusees i vòmits, problemes gastrointestinals o mielosupressió (pancitopènia), la qual afecta al sistema immunitari i a les defenses del pacient. Aquests efectes són deguts a que els fàrmacs afecten, principalment, a les cèl·lules amb ràpida proliferació, com són les cèl·lules dels teixits afectats, a part dels tumors.

A conseqüència de les altes càrregues de fàrmac o de radiació utilitzades en els tractaments, els efectes secundaris són molt perjudicials pels pacients. Hi ha estudis que indiquen que, a causa d'aquests tractaments, els quals són mutagènics, hi ha una probabilitat major de patir altres càncers després d'un primer.

Tots els tractaments actuals estan centrats en la fase S, és a dir, evitar una replicació correcta mitjançant l'afectació en la replicació. Entenent com funciona el "licensing" durant la fase G1, i el mecanisme d'acció de totes les proteïnes implicades, es poden buscar fàrmacs que evitin la formació del doble hexàmer. Com ja se sap, el doble hexàmer és el complex previ a les bombolles de replicació. Si s'aconsegueix inhibir o baixar significativament la formació de dobles hexàmers, amb una concentració menor de fàrmacs pel tractament del càncer, es pot arribar a inhibir la replicació de les cèl·lules. D'aquesta manera, amb molta menys concentració de fàrmac, es poden evitar o reduir molts efectes secundaris, com la mielosupressió, i d'aquesta manera augmentar la qualitat de vida dels pacients. De la mateixa manera, en rebre dosis molt més baixes d'agents mutagènics com a tractament, s'evita una possible recaiguda per culpa d'aquest.

2. OBJECTIVES

The protein to be studied in this work is MCM3 from *Saccharomyces cerevisiae*. As explained in the introduction, it has different domains with the main functions of binding with the ORC-Cdc6 complex, ATP hydrolysis, and recruitment of the other MCM proteins. The experimentation involves making a shorter protein, separating the C-terminal end from the rest of the protein. We want to make a cut in the chain that links the C-terminal domain and the rest of the protein, which does not have a very specific functionality (this is known because it is a very poorly conserved region among different species, unlike the other regions). By making a cut in this binding region, we want to see if the C-terminal end of the protein is functional independently, and especially if being in the same pool but separated, they can perform the complete function of MCM3 or if it is necessary for them to be linked by this binding region to be functional. The cut is made at Serine 777 because it is a protein with a small radical group, which means it is very flexible and can easily change structure. This leads us to believe that it is a good amino acid to make the cut since it does not have a high impact on the final structure of the protein.

To carry out our experiment, an assay for the formation of the pre-replicative complex will be performed. As a control group, an MCM3wt protein is used, which demonstrates the expected structures to be seen in the assay. The assay will also be performed with the M3CTD protein (MCM3 C-terminal domain), the part of the MCM3 protein equivalent to the C-terminal part up to 2 amino acids before Serine 777. The next sample for the assay is the M3CTED1 protein (MCM3 C-terminal extension deletion), which corresponds to the N-terminal region up to the amino acid before Serine 777. The last part of the assay involves combining the M3CTD and M3CTED1 proteins in the same assay to see if they can perform the initial function of MCM3 together or if they need to be linked to function correctly.

Hypothesis 1: Perhaps the C-terminal end (M3CTD) can bind to the ORC complex on its own and does not need the rest of the protein to make contact.

Hypothesis 2: Perhaps if we put the two subunits of the M3 protein in the same pool (M3CTD and M3CTED), even if they are not linked, they will be able to perform the full function of the protein.

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENCIÓ M3CTED1

S'aïlla el fragment M3CTED1 del genoma de *Saccaromyces cerevesiae*. Per fer-ho s'utilitzen dos primers de la casa IDT (integrated DNA technologies). El primer *M3 Sc BamHI forward* amb seqüència 5' AAG CAT GGA TCC ATG GAA GGC TCA ACG G 3' i el primer *M3 Sc S777 XhoI reverse* 5' CGA GTT CTC GAG TCA GCT TGC TGG TTG TCT GAC 3', ens permeten obtenir el fragment que correspon a l'extrem N terminal des de la primera base del gen fins a la Serina 777. Es duu a terme la PCR i seguidament mitjançant una columneta de sílice (New England Biolabs) es fa un aïllament del DNA obtingut de la PCR.

Paral·lelament, es sembra un stock de cèl·lules d'E.coli que contenen el vector pet28hisSUMO. Es fan cultius de nit per obtenir un gran nombre de cèl·lules, i així, un gran nombre de vectors. Finalment, mitjançant el kit G-spin de la casa comercial iNtRON biotechnology es fa un aïllament del DNA plasmídic.

Seguidament, es van fer les digestions tant del DNA plasmídic de pet28hisSUMO com d'M3CTED1 obtingut de la PCR. Per fer la digestió afegim 10µL en el cas del DNA d'M3CTED1 i 15 µL en el cas de la mostra del vector, 1µL de XhoI i de BamHI, 5 µL del buffer CutSmart i la part faltant per arribar als 50 µL d'aigua miliQ (10 µL en el cas de la PCR i 15 µL en el cas del vector). En el cas del vector, per tal que aquest no ens recircularitzi un cop l'haguem digerit, li afegim CIP (calf intestinal phosphatase) al cap de les 2 hores de digestió. La funció de CIP és desfosforil·lar els extrems del DNA per tal d'evitar que aquest no pugui fer enllaços fosfodièster entre els seus extrems, i per tan que no recircularitzi. S'afegeix CIP amb el vector, així serà el fragment de M3CTED1 el que aportarà els fosfats per la futura unió. Seguidament, es purifica el DNA amb el kit Monarch de la casa comercial New England Biolabs.

Es torna a fer un gel d'agarosa per mirar les quantitats de DNA que tenim, ja que per tal de fer la lligació hi ha uns valors estipulats de vector 1:3 insert. S'intueix la quantitat de DNA mitjançant fluorescència de les bandes. La reacció de lligació es dona mitjançant l'ús de la T4 DNA lligasa junt amb el vector, l'insert i un buffer especial per la T4 lligasa. Es deixa la barreja O/N a 16°C.

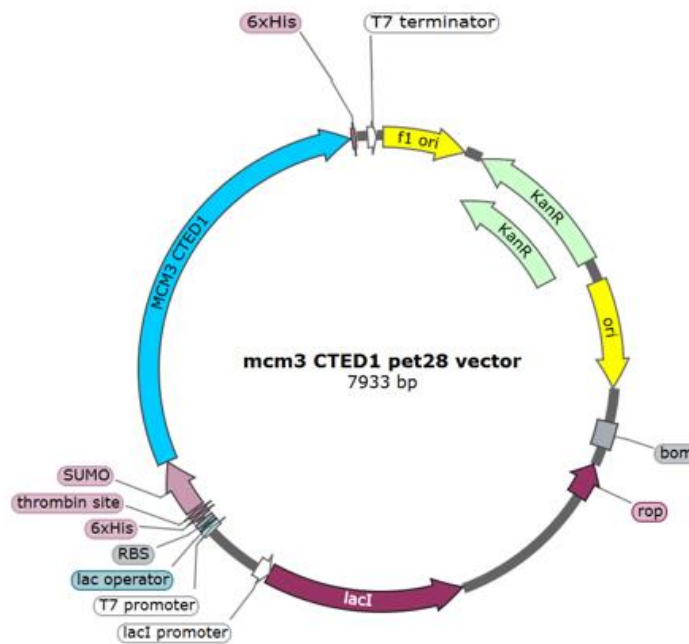


Figura 4: Esquema del vector circular, amb les parts més importants destacades, inclòs el nostre insert M3CTED1.

A partir de la reacció de lligació que hem obtingut, ja tenim el vector junt amb l'insert (figura 4). El resultat de la reacció de lligació s'ha de transformar en unes cèl·lules d'amplificació *E. coli* top 10. Per fer-ho es fa servir el protocol de transformació basat en el xoc tèrmic on posem les cèl·lules junt amb la lligació en gel durant 30 minuts, tot seguit es posen 30 segons exactes a 42°C i es torna a posar 2 minuts en gel. Tot seguit es posen 100 µL de medi de cultiu SOC en condicions estèrils i es deixa incubar una hora a 37 °C. Finalment es fa un sembratge a una placa amb kanamicina, antibiòtic el qual el nostre vector confereix resistència.

Per fer un grup control i comprovar que la CIT va funcionar bé i no tenim relligats del plasmidi, es fa servir el mateix procediment, però sense afegir-li l'insert a la mostra que hem deixat O/N per fer la lligació. Si la molècula CIT va actuar bé, sense l'insert el plasmidi no podrà circularitzar i les cèl·lules no el podran incorporar, per tant, no mostraran resistència a la kanamicina.

Amb les cèl·lules *E. coli* top 10 transformades amb el nostre vector els fem un cultiu O/N en medi LB junt amb Kanamicina en una concentració de 50 µg/mL, amb l'objectiu d'aconseguir una quantitat més alta del nostre vector que la inicial. L'endemà es fa una miniprep kit G-spin de la casa comercial iNTRON biotechnology. Un cop tornem a tenir el vector aïllat, es transformen les cèl·lules de propagació *E. coli* XL10-Gold mitjançant el procediment de transformació de xoc tèrmic. S'afegeixen 0,5 µL de β-mercaptoetanol per tal d'augmentar l'eficiència de

transformació. Després de posar-hi el β -mercaptoetanol a la solució de cèl·lules, es deixen reposar 10 minuts en gel. Tot seguit s'afegeix 1,5 μ L del clon, i es deixa reposar 30 minuts en gel. Després es posa la solució durant 30 segons a 42°C per tal que es pugui donar la transformació i es torna a posar en gel durant 2 minuts més per tal que es tornin a establir les membranes de les cèl·lules i es completi el procés de forma adequada. Tot seguit es posen durant 1 hora a 37 °C junt amb 100 μ L de medi de cultiu SOC. Finalment, sembrem tot el contingut en plaques de cultiu amb kanamicina per seleccionar les cèl·lules que han incorporat correctament el nostre vector, i les deixem tota la nit a 37°C. La resistència a la kanamicina ve donada pel nostre insert. Piquem les colònies que han crescut a la placa i fem cultius de nit en 100mL de medi LB amb kanamicina en concentració 1:1000.

Amb els cultius O/N es fa la inducció de la proteïna M3-CTED1. Es posen 25mL del cultiu de nit a 4 matrassos diferents amb 700 mL de LB. També hi afegim la kanamicina en dilució 50 μ g/mL. Es deixen aproximadament 2 hores a 37°C i 300rpm per tal que creixin les cèl·lules fins arribar a una densitat òptica d'entre 0,6 i 0,8 UA a 600nm i després s'hi afegeix IPTG (0,5mM). L'IPTG activa l'operó LAC i permet que es pugui produir la proteïna en grans quantitats. Es deixen 4 hores d'incubació amb la molècula a 20°C i 300rpm. És centrifuguen les cèl·lules per separar-les del sobrenedant durant 5 minuts a 4500rpm.

Un cop es té la proteïna M3-CTED1 expressada en grans quantitats, es procedeix a purificar-la. Per aconseguir la proteïna que es troba intracel·lular, s'han de lissar les cèl·lules. Es resuspenen les cèl·lules en 40 mL de tampó de lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05% NP-40, 10% glicerol)/1 M NaCl/2 mM DTT/inhibidors de proteases (Roche)/1mM PMSF i 1mM lisozim). Tot seguit, es soniquen durant 6 minuts. Amb aquest procediment, s'aconsegueix lissar les cèl·lules i que alliberin tot el contingut del seu citoplasma, inclosa la proteïna M3-CTED1. Es centrifuga durant 30 minuts a 10000rpm i es manté el sobrenedant, mentre que es prescindeix del pellet. S'incuba el sobrenedant durant 30' a 4°C amb 1 mL de beads de Níquel, els quals s'uneixen a la cua d'histidines. Seguidament, es centrifuga durant 30 segons a 1000rpm per tal de sedimentar els beads, i es descarta el sobrenedant. Es fa un rentat amb la columna de níquel, la qual reté els beads i ens permet separar-los de la resta de proteïnes i molècules que havien quedat sedimentades junt amb els beads. El primer rentat es fa amb el buffer de rentat A (10mM imidazol, 0.7MNaCl i 20mM Tris-HCl pH 7.6), el qual conté una baixa concentració d'imidazol, molècula que trenca els enllaços Níquel-histidina. L'objectiu està en separar dels beads les proteïnes que contenen histidines que s'han unit amb els beads, però no les que tenen moltes histidines, com és el cas de la nostra proteïna. El segon rentat es fa amb el buffer B (200mM

imidazole, 0.7MNaCl i 20mM Tris·HCl pH 7.6), amb una quantitat major d'imidazole per eluir la nostra proteïna d'interès de la columna. Recollim la nostra proteïna en petites mostres de 0,5mL fins a arribar a un total de 8 elucions diferents. Tot seguit es realitza un gel de poliacrilamida on es carrega mostra de cadascuna de les elucions per veure en quines hi ha una quantitat de proteïna més alta i continuar treballant amb aquelles.

S'ajunten les 2 elucions amb més proteïna i se'ls afegeix proteasa ULP1, la qual té la capacitat de digerir la regió SUMO (que confereix solubilització a la proteïna) i la cua d'histidines de la resta de la proteïna. Es deixa durant 15 minuts en gel i es fa una cromatografia gelfiltració (HPLC) mitjançant una columna superdetex 10/300 de 24 mL, equilibrada prèviament i amb el buffer compost per: 0.3MKacetat, 25mM HEPES pH7.6 i 10% glicerol (figura 7).

Amb els resultats de la gelfiltració es fa un gel de poliacrilamida. Les alíquotes amb una quantitat major de la proteïna M3CTED1 s'emmagatzemen a -80°C.

3.2 OBTENCIÓ M3CTD

Per aïllar aquesta proteïna, es parteix d'un vector obtingut d'una casa comercial (figura 5), i el primer pas és transformar aquest vector a les cèl·lules d'expressió E.coli BL21(DE3)RIL. El vector M3-CTD (pAM6) confereix resistència a l'ampicil·lina mentre que les cèl·lules d'E.coli BL21(DE3)RIL confereixen resistència al cloramfenicol (CAM).

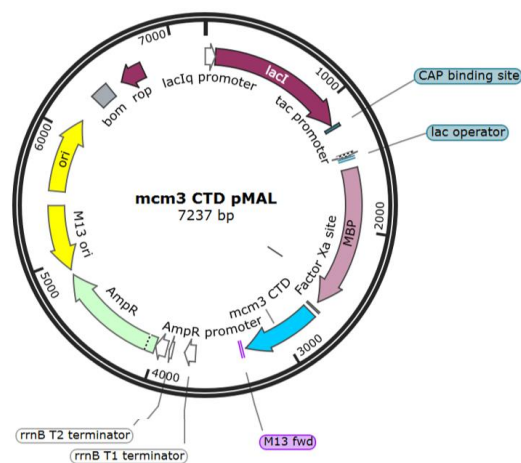


Figura 5: Esquema del vector circular, amb les parts més importants destacades, inclòs el nostre insert M3CTD.

Per transformar el vector a les cèl·lules BL21(DE3)RIL, es fa servir un xoc tèrmic. Amb 10mL cèl·lules, se'ls afegeix 0,5 µL de β-mercaptoetanol i es deixa 10 minuts en gel. Seguidament es posen 1,5 µL de vector i es deixa durant 30 minuts en gel. Per induir el xoc tèrmic, es passa la mostra a 42°C durant 20 segons exactes i es torna a deixar en gel durant 2 minuts més, com a mínim, per tal de que la membrana es torni a estabilitzar. S'afegeixen 100 µL de medi de cultiu SOC i es deixa durant 1 hora a 37°C i 300 rpm. Es sembra a una placa de cultiu d'LB amb els antibiòtics ampicil·lina i CAM en concentració 50 µg/mL cadascun i es deixa tota la nit a 37°C. Piquem alguna de les colònies que han crescut i les posem a un matràs de 100mL amb Ampicil·lina i CAM en concentració 50 µg/mL i es deixa durant unes 18-20 hores a 37°C i 300 rpm.

Amb els cultius O/N es fa la inducció de la proteïna M3-CTD. Es posen 25mL del cultiu O/N a 4 matrassos diferents de 700 mL de LB. També hi afegim la Ampicil·lina i CAM en dilució 50 µg/mL. Es deixen aproximadament 2 hores a 37°C i 300rpm per tal de que creixin les cèl·lules fins arribar a una densitat òptica de entre 0,6 i 0,8 UA a 600nm i després s'hi afegeix IPTG (0,5mM). Gràcies a l'operó LAC que incorpora el vector, l'IPTG permet activar-lo de forma permanent i permet que es pugui produir la proteïna en grans quantitats. Es deixen 4 hores d'incubació amb la molècula a 20°C i 300rpm. És centrifuguen les cèl·lules per separar-les de tot el sobrenedant durant 5 minuts a 4500rpm.

Es resuspenen els cèl·lules en 40 mL de tampó de lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05% NP-40, 10% glicerol)/1 M NaCl/2 mM DTT/inhibidors de proteases (Roche)/1mM PMSF i 1mM lisozim). Tot seguit, es sonifiquen durant 6 minuts. Amb aquest procediment, s'aconsegueix lisar les cèl·lules i que alliberin tot el contingut del seu citoplasma, inclosa la proteïna M3-CTD. Es centrifuga durant 30 minuts a 10000rpm i es manté el sobrenedant, mentre que es prescindeix del pellet. El sobrenedant s'incuba a 4°C durant 1 hora amb 1mL de beads d'amilosa (NEB), els quals s'enganxen a la cua MBP, una cua artificial afegida a la proteïna amb l'objectiu de facilitar la purificació. Es fa un rentat mitjançant una columna que reté el midó, en la qual els beads i les proteïnes unides a aquests es queden retingudes mentre que la resta es filtren. El rentat es duu a terme amb el tampó D (0,3 M NaCl/2 mM DTT). Tot seguit s'elueixen les proteïnes amb el tampó C (0,3 M NaCl/2 mM DTT/10 mM Maltosa), tot recollint les mostres en 8 alíquotes de 0,5mL. Tot seguit es realitza un gel de poliacrilamida on es carrega mostra de cadascuna de les elucions per veure en quines hi ha una quantitat de proteïna més alta i seguir treballant amb aquelles.

Les mostres amb més quantitat de proteïna s'ajunten per fer una cromatografia de gelfiltració amb una columna Superdex 200 10/300 GL, equilibrada prèviament amb tampó C.

S'agafen totes les mostres de la gelfiltració i sels fa un tall amb la proteasa PreScission de la casa comercial Sigma-aldrich. Seguidament es fa un gel de poliacrilamida per veure en quin dels eppendorfs es troba la nostra proteïna d'interès, i s'emmagatzema a -80°C .

3.3 OBTENCIÓ ORIGEN DE REPLICACIÓ ARS305

Per dur a terme l'assaig, es necessita un origen de replicació de llevat, en el qual poder-li carregar el pre-RC. Mitjançant dos primers, un forward (ARS305-F-PC-Bio-Eco) i un reverse (ARS305-R) (taula 1), es fa una PCR junt a material genètic de llevat, aconseguint el fragment que es sap que conté l'oriC al seu interior. El DNA amplificat té 1022 pb i conté una biotina fotoescindible a l'extrem 5'. En aquesta biotina, s'hi uneixen beads d'estreptovidina amb propietats magnètiques (Dynabeads M-280 (Life Technologies)) mitjançant una incubació a 4°C durant 1 hora. L'ensamblatge entre el DNA i l'estreptovidina es renta mitjançant els buffers: KOAc 1M, HEPES-KOH 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM i amb HEPES-KOH 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, amb una última resuspensió de 0,25 volums de la suma del volum del DNA i els beads.

Taula 1: Primers utilitzats per aconseguir la regió de l'origen de replicació de Saccharomyces cerevisiae.

PRIMER	SEQÜÈNCIA
ARS305-F-PC-Bio-Eco	GGTGTATGCATGCTACTGTTTGAATTCCCATTATCGAAGGCAC
ARS305-R	TAGTACCGGTACCCTCTAGCAAAAAGTCTAC

3.4 ASSAIG FORMACIÓ COMPLEX PRE-REPLICATIU

L'assaig de formació del complex pre-replicatiu consisteix en ajuntar totes les proteïnes implicades en la formació d'aquest complex, junt amb una molècula de DNA que conté l'oriC de *Saccharomyces cerevisiae*. L'objectiu és que es formin les estructures iniciadores de la replicació, l'OCCM i el doble hexàmer. En el nostre assaig, s'utilitzaran diferents variants de la proteïna MCM3, posant la variant wt, la M3CTD, la M3CTED i la M3CTD junt amb la M3CTED. A més, es farà 2 vegades, posant ATP γ S (un ATP el qual té capacitat d'unir-se als punts d'unió d'ATP però no té capacitat d'hidrolitzar-se) i ATP. La diferència és que amb l'ATP γ S es pot arribar fins a l'OCCM, estructura la qual necessita la presència d'ATP però no la hidròlisi d'aquest, mentre que amb l'ATP es pot arribar fins a la fase de doble hexàmer.

En l'experiment es treballarà amb 16 mostres diferents, per poder fer 2 rèpliques de concentració diferent, de les nostres proteïnes a estudiar. A més, als 2 carrils inicials s'inoculen només les nostres proteïnes M3CTD i M3CTED, per veure el seu pes molecular i poder-les identificar si es mostren en els assajos.

Es comença fent dues mix amb els diferents components que seran iguals per a totes les mostres, essent més fàcil fer inicialment una mostra més gran que moltes de petites. Les dues mix diferencien en funció de l'ATP utilitzat.

Taula 2: Taula de dilucions per l'assaig.

	X1	X9 (ATP)	X9 (ATP γ S)
H2O	13,8 μ L	124,2 μ L	124,2 μ L
LRB (x5)	8 μ L	72 μ L	72 μ L
ATP (1mM)	1 μ L	9 μ L	9 μ L
DTT (1mM)	0,4 μ L	3,6 μ L	3,6 μ L
Acetat de Zinc	0,8 μ L	7,2 μ L	7,2 μ L

Aquest mix conté l'LRB (25Mm HEPES-KOH ph=7,6, 10mM MgOAc, 0,02% IGEPAL CA630 (Sigma), 5% Glycerol i 100mM KOAc) com a buffer. Després de mesclar-se i que quedi tot homogeni, es divideix el contingut en 16 eppendorf diferents, afegint 24 μ L de la mescla a cadascun. Seguidament s'han d'afegir totes les proteïnes implicades en la formació del complex pre-replicatiu. Es posa 1 μ L de cada una de les proteïnes: ORC 1-6, Cdc6, Cdt1 i MCM 2,4,5,6 i 7. S'han de posar de forma independent a cada un dels eppendorf, sense fer un pool anteriorment, ja

que s'ha vist que la eficiència augmenta. Un cop tenim totes les mescles fetes, hem d'afegir l'MCM3. Primer posem l'MCM3wt, agafarem 4 eppendorfs, 2 amb ATP i 2 amb ATPyS. En un de cada tipus, hi posarem 0,25 µL de la proteïna, mentre que en els altres 2 hi posem 0,75 µL. L'objectiu de posar 2 concentracions diferents és que, tot i esperar que el resultat sigui el mateix, a vegades aquestes proteïnes són les limitants i podríem veure un resultat no esperable, i amb posar més quantitat, evitem que això passi. Es repeteix el mateix procediment amb les mostres que contenen la proteïna M3CTD, la proteïna M3CTED i la mostra que conté ambdues proteïnes juntes. Un cop hem posat les proteïnes adients a cada mostra, s'afegeix la quantitat d'aigua suficient per arribar als 40 µL en cada eppendorf.

Un cop feta la mescla, es deixa incubar durant 20 minuts a 30°C i 1100 rpm. Seguidament, es posen les mostres en una gradeta magnètica la qual atrau els beads d'estreptovidina, els quals estan units al DNA, i junt amb el material genètic, les diferents proteïnes que s'hagin unit a aquest. Traiem tota l'aigua i fem un rentat amb 400 µL de LSW ((25mM HEPES-KOH ph=7,6, 5mM MgOAc, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,02% IGEPAL CA630, 10% Glycerol i 300mM KOAc) en totes les mostres. Després del primer rentat, amb les mostres amb ATPyS els tornem a fer un rentat amb LSW mentre que les mostres amb ATP normal fem el rentat amb HSW (el mateix que LSW però canviant 500mM de NaCl pels 300mM de KOAc). La diferència entra la HSW i la LSW és la concentració de sals. S'ha vist que la HSW és capaç de rentar totes les proteïnes que no estan unides de forma perfecta al DNA (totes menys les MCM que formen el doble hexàmer). En canvi el LSW té una concentració salina inferior que permet el rentat d'algunes proteïnes que no estan unides al DNA (com la Cdc6 o la Cdt1) però no les proteïnes ORC ni les MCM que formen l'OCCM (Green & Sambrook, 2019). Finalment traiem els buffers i tornem a fer un rentat amb LSW i resuspenem els beads.

Un cop hem fet els rentats, apliquem llum UVA a les mostres durant 2,5 minuts, trencant així els enllaços entre la biotina i l'estreptovidina, alliberant el DNA dels beads magnètics. Tot seguit, es tornen a posar les mostres a la gradeta magnètica i ens quedem amb la fracció líquida mentre que els beads quedaran units magnèticament i separats. La fracció líquida es posa durant 3 minuts a 100°C per tal que les proteïnes es desnaturalitzin i tinguin totes la mateixa forma i per tant facin només una banda al gel de poliacrilamida. Finalment carreguem el gel de Tris-Acetad de Biorad amb buffer de tricina, i li apliquem una càrrega elèctrica de 150V durant 65 minuts. Un cop el gel ha acabat, fem una tinció de plata per veure el resultat.

Per fer la tinció de plata, es segueix el protocol de “silver staining” de invitrogen. En el gel se li aplica una solució fixadora durant un temps aproximat de 15 minuts. Es retira la solució fixadora i s’afegeix una solució sensibilitzadora durant uns 15 minuts, també. Aquests passos inicials és recomanable que es duguin a terme amb una lleu agitació. Es posa la solució reveladora fins que les bandes esdevenen visibles, i abans que el gel quedi massa tenyit i les bandes perdin claredat, s’ha de posar una solució aturadora, que para de forma immediata el procés de tinció.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 PURIFICACIÓ M3CTED1

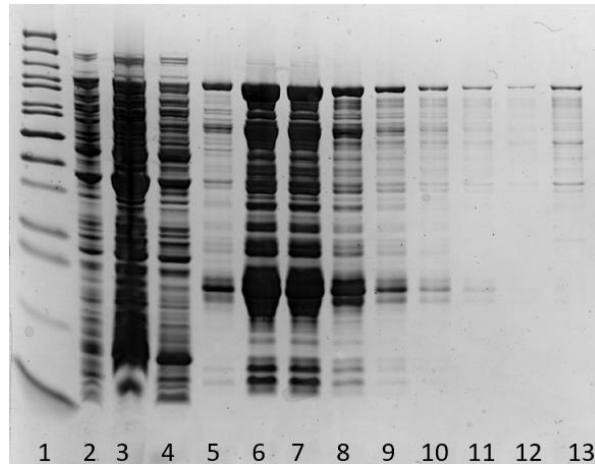


Figura 6: Gel de poliacrilamida per escollir les mostres amb més quantitat de proteïna. Carril 1: Marcador de pes molecular; Carril 2: pel·let; Carril 3: Sobrenedant; Carril 4: Eluent; Carrils 5-12: E1 → E8; Carril 13: Beads després de la dilució.

El gel de la figura 6 equival a la mostra carregada de les diferents elucions dels beads, i es fa amb l'objectiu de seleccionar les elucions que contenen més quantitat de proteïna. Podem veure carregades mostres de diferents fases de la elució, és a dir, mostres recollides durant diferents etapes de la purificació. Aquestes mostres es carreguen juntament amb el conjunt de mostres de la elució, dins les quals esperem trobar la nostra proteïna d'interès. En el carril número 1 trobem el marcador de pes molecular, que es sol carregar en la majoria de gels, per tenir una aproximació de la mida de les proteïnes. En el carril dos s'hi carrega una mostra del pellet obtingut seguidament de la sonicació, amb l'objectiu de comprovar que la nostra proteïna no hagi sedimentat accidentalment. En el tercer carril s'hi carrega el sobrenedant que s'obté després de la incubació amb els beads de Níquel, amb l'objectiu d'assegurar-nos que la majoria de les proteïnes, les quals no tenen histidines o baixa quantitat d'aquestes, no s'uneixen als beads i en aquests hi queden unides només les proteïnes amb alta quantitat d'Histidines. En el quart carril es veu el resultat de la primera elució amb el buffer de rentat A el qual desenganxa les proteïnes que contenen histidines, però amb menys quantitat i per tant afinitat més baixa pel Níquel. En els carrils 5 a 12 s'utilitza el buffer B amb més quantitat d'imidazole, el qual trenca els enllaços Níquel-Histidina. Ens interessen aquestes mostres ja que la nostra proteïna d'interès presenta una cua de 6 Histidines amb alta afinitat pel Níquel i es desenganxa amb les altes concentracions d'imidazole. De les mostres obtingudes, es miren les que tenen una quantitat de

proteïnes major, en el nostre cas es veu que els carrils 6 i 7 tenen una quantitat de proteïnes molt superior a la resta i per tan seran les mostres amb les quals seguirem la nostra experimentació per purificar la proteïna. La mostra del carril 13 és la dels beads després de fer el rentat, amb l'objectiu d'assegurar-nos que gran part de les proteïnes han estat eluïdes i, tal com es pot veure, així ha estat.

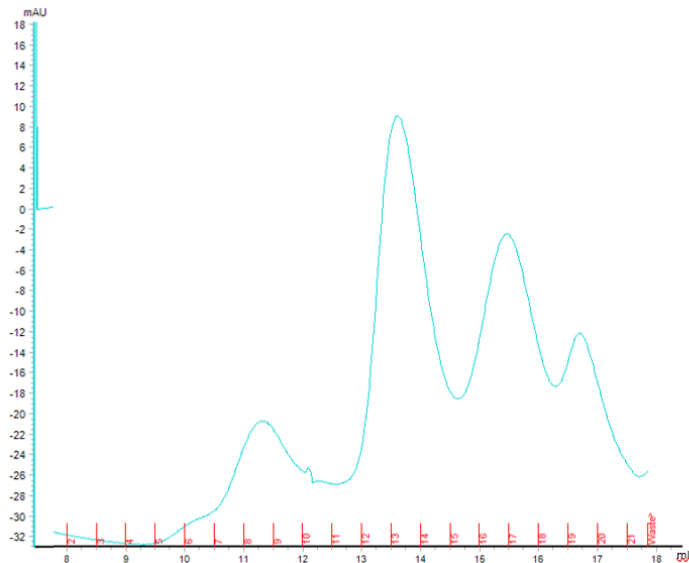


Figura 7: Gràfic resultant de la gelfiltració amb cada pic simbolitzant una proteïna diferent.

En aquesta gràfica obtinguda de la gelfiltració veiem els diferents pics que equivalen a diferents proteïnes. Els dos pics més destacables i on es sospita que hi ha la nostra proteïna són entre l'elució 11 i la 18 (les elucions que fa l'aparell AKTA es veuen marcades en vermell) aproximadament, tot i així es fa un gel de poliacrilamida d'entre les alíquotes 5 a 18 per trobar quin d'ells presenta la nostra proteïna d'interès.

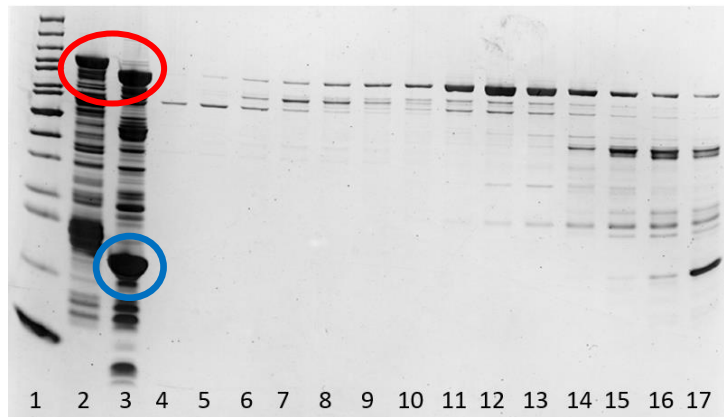


Figura 8: Gel de poliacrilamida del 12% termofisher. Gel resultant de les mostres obtingudes a partir de la gelfiltració. Carril 1: Marcadore de pes molecular; Carril 2: Abans digestió proteïna; Carril 3: Després digestió proteïna; Carrils 4-17: F5 →F18.

En el gel de poliacrilamida obtingut, es vol mirar quina de les mostres separades gràcies a la gelfiltració conté la nostra proteïna d'interès pràcticament aïllada. Es pot saber quina és la nostra proteïna d'interès ja que es va utilitzar una proteasa per tal de tallar-li la cua d'histidines. En els carrils 2 i 3 es carreguen unes alíquotes obtingudes de l'elució, però una d'elles ja tallada amb la proteasa i l'altra sense tallar. Veiem que a la part superior hi ha una banda molt fosca que entre ambdues mostres presenta una lleugera diferència en la distància correguda al gel (marcades en vermell), degut a la diferència de mida de la proteïna abans i després del tall. A part, veiem com apareix una gran banda a la part inferior del carril 3 (marcada en blau) corresponent a l'altra fracció de la proteïna obtinguda després del tall. Així doncs, a part de tallar la part no funcional de la proteïna, ens va ser útil per tal de saber identificar en les mostres de la gelfiltració quines d'elles contenen la nostra proteïna d'interès. S'observa que en les mostres 12 i 14 hi ha una gran quantitat de la nostra proteïna d'interès (es veu observant que es troben a la altura de la banda superior que s'ha mogut entre els carrils 2 i 3). A més, la proteïna està pràcticament aïllada, per tan s'agafen els eppendorfs 12,13 i 14 de 0,5mL obtinguts de la gelfiltració i se'n fan alíquotes per tal de guardar la proteïna pel moment de l'assaig.

4.2 PURIFICACIÓ M3CTD

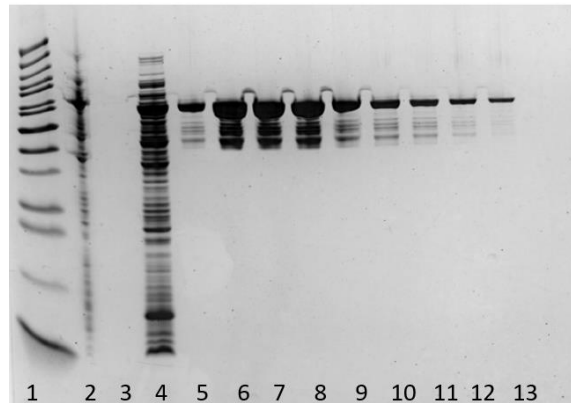


Figura 9: Gel de poliacrilamida per escollir les mostres amb més quantitat de proteïna. Carril 1: Marcador molecular; Carril 2: Pellet; Carril 3: Sobrenedant; Carril 4: eluent; Carril 5-12: E1 → E8; Carril 13: Beads després de les dilucions.

En el gel de la figura 9, podem veure carregades mostres de diferents fases de la elució, junt amb el conjunt de mostres eluides dins les quals esperem trobar la nostra proteïna d'interès. En el carril número 1 trobem el marcador de pes molecular, que es sol carregar en la majoria de gels, per tenir una aproximació de la mida de les proteïnes. En el carril dos s'hi carrega una mostra del pellet obtingut seguidament de la sonicació, amb l'objectiu de comprovar que la nostra proteïna no hagi sedimentat accidentalment. En el tercer carril s'hi carrega el sobrenedant que s'obté després de la incubació amb els beads d'amilosa, la mostra no va quedar tenyida i no es pot interpretar cap resultat. En el quart carril es veu el resultat de la primera elució amb el tampó D, el qual desenganxa les proteïnes que poden haver quedat enganxades a la columna. En els carrils 5 a 12 s'utilitza el tampó C amb Maltosa, la qual té molta afinitat amb l'amilosa i allibera la nostra proteïna d'interès. De les mostres obtingudes de les elucions, es miren les que tenen una quantitat de proteïnes major, en el nostre cas es veu que les mostres 2 i 3 que equivalen als carrils 6 i 7 tenen una quantitat de proteïnes molt alta i per tan seran les mostres amb les quals seguirem la nostra experimentació per purificar la proteïna. La mostra del carril 13 és la dels beads després de fer el rentat, amb l'objectiu d'assegurar-nos que gran part de les proteïnes han estat eluides i, tal com es pot veure, encara hi ha una petita fracció de la nostra proteïna d'interès unida als beads que no s'ha eluït.

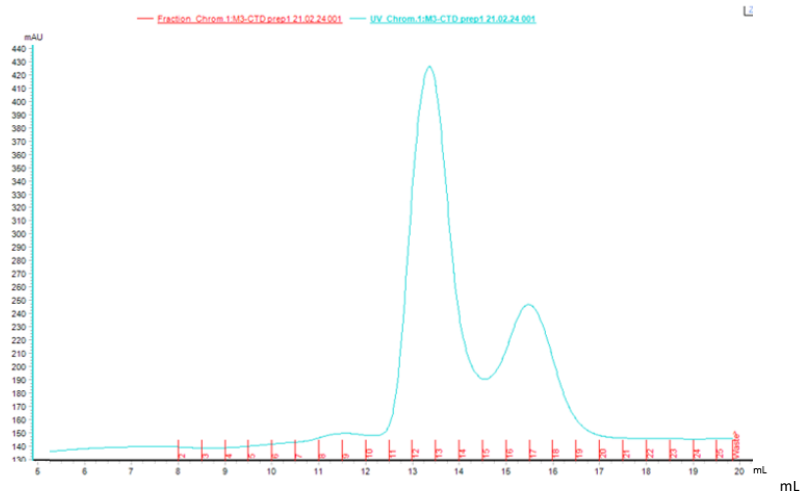


Figura 10: Gràfic resultant de la gelfiltració amb cada pic simbolitzant una proteïna diferent.

En aquesta gràfica obtinguda de la gelfiltració veiem els diferents pics que equivalen a diferents proteïnes. Es veu com a partir de la mostra 8 (les alíquotes que fa la màquina AKTA es miren mitjançant els valors vermells) es comença a mostrar algun tipus de proteïna, però en quantitats ínfimes. Els dos pics més destacables i on es sospita que hi ha la nostra proteïna es troben entre les alíquotes 11-15 i 16-19. La proteïna M3CTD probablement equivaldrà a un d'aquests pics. Per assegurar-nos de recollir la nostra proteïna, s'agafen les mostres des de la 8 fins a la 21, i es fa un gel de poliacrilamida per trobar quina de les alíquotes presenta la nostra proteïna d'interès.

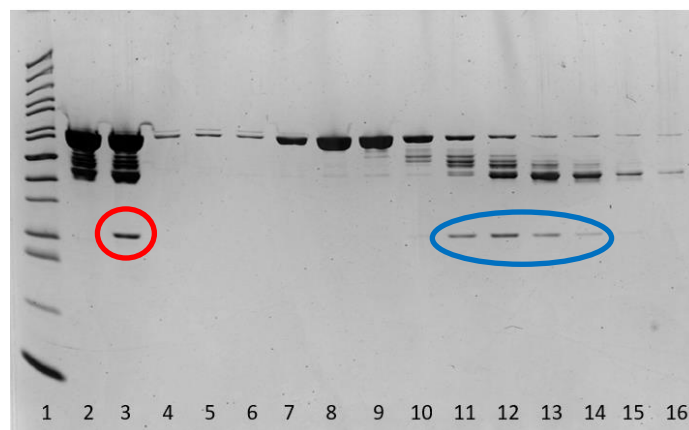


Figura 11: Gel de poliacrilamida del 12% termofisher. Gel resultant de les mostres obtingudes a partir de la gelfiltració. Carril 1: Marcador de pes molecular; Carril 2: Abans digestió proteïna; Carril 3: Després digestió proteïna; Carrils 4-16: F8 → F21.

En el gel de poliacrilamida obtingut, es vol mirar quina de les mostres, separades gràcies a la gelfiltració, conté la nostra proteïna d'interès pràcticament aïllada. Es pot saber quina és la nostra proteïna d'interès ja que es va utilitzar una proteasa per tal de tallar-li la regió MBP. En els

carrils 2 i 3 es carreguen unes alíquotes obtingudes de l'elució, abans de la gelfiltració, però una d'elles ja tallada amb la proteasa i l'altra sense tallar. Es veu que després de tallar la nostra proteïna d'interès mitjançant la proteasa, apareix una nova banda que equival a al nostre fragment de la proteïna (marcada en vermell), el qual ja es sap que té una mida bastant petita, d'aproximadament 30 kDa. Veient els resultats, pot semblar anti-intuïtiu que la nostra mostra no sigui la que es presenta en els carrils 7,8 i 9, la qual està completament aïllada i en altes quantitats. Tot i això, si ens fixem amb la banda obtinguda després de la digestió amb la proteasa, es veu que la nostra proteïna d'interès realment es troba en els carrils 11,12 i 13 (marcat en blau). És important destacar que són mostres molt brutes, on hi ha varies proteïnes en concentracions superiors a la nostra proteïna d'interès. Per obtenir una proteïna més pura, s'hauria d'utilitzar una altra columneta per a la gelfiltració, una amb unes característiques una mica diferents que ens permetés aïllar millor la proteïna M3CTD, perquè en aquest cas s'obté una mostra molt bruta que ens pot perjudicar en el moment de dur a terme l'assaig. També, obtenim una quantitat final molt petita de la nostra proteïna d'interès. Creiem que s'hauria d'utilitzar una nova proteasa ja que la quantitat de proteïna tallada (sense la resta de TAG que portava afegit artificialment) és molt baixa en comparació amb la que s'esperava obtenir. Igualment, s'agafen alíquotes de les mostres dels carrils 11,12 i 13, que equivalen a les mostres 15, 16 i 17 de 0,5mL de la gelfiltració, i se'n fan alíquotes per tal de guardar la proteïna pel moment de l'assaig.

4.3 ASSAIG FORMACIÓ COMPLEX PRE-REPLICATIU

Per comprovar els resultats obtinguts durant l'assaig de formació de l'OCCM i del doble hexàmer, el mètode utilitzat és un gel de tricina 3-8%. L'objectiu és veure les proteïnes que conformen, en un cas l'OCCM o el doble hexàmer, depenent de si durant l'assaig s'utilitza l'ATPyS o l'ATP. Per saber quines proteïnes es veuen en el gel, es fa servir la referència de la figura 12.

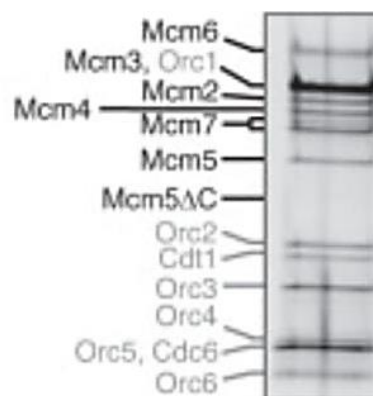


Figura 12: Referència de les bandes que formen totes les proteïnes del complex Pre-Replicatiu.

L'assaig és una pràctica amb bastants passos, bastant elaborada i on, en alguns moments fa falta molta precisió per no afectar al resultat final. Es van repetir els assajos nombroses vegades per comprovar si els resultats obtinguts eren reproduïbles o no. Seguidament es mostren els dos gels més informatius obtinguts, on el primer mostrat (figura 13) és el resultat obtingut repetidament durant el temps, mentre que el segon gel (figura 14) és un resultat destacable però que no es va aconseguir replicar.

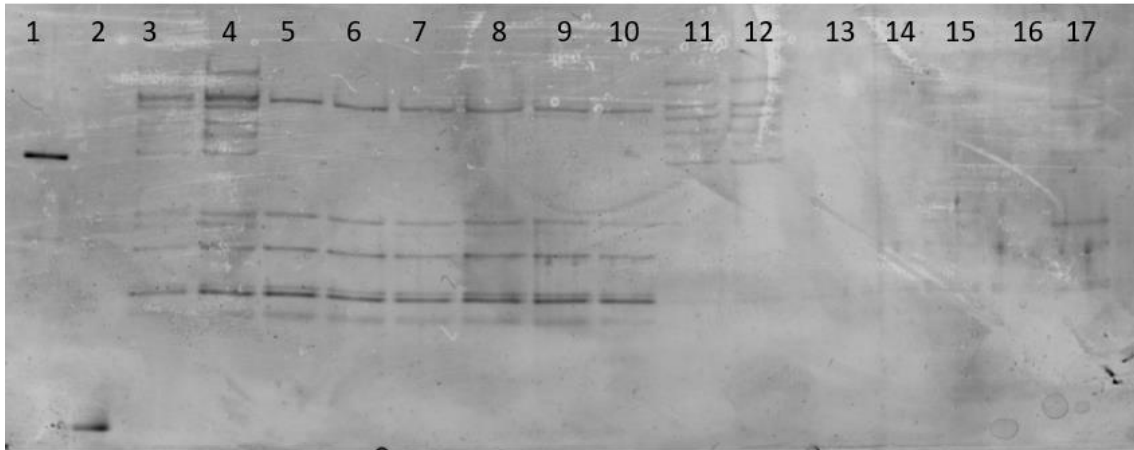


Figura 13: Gel de poliacrilamida 3-8% amb tricina. Carril 1: Input M3CTED1; Carril 2: Input M3CTD; Carrils 3-10: γ S LSW, Carrils 3-4: M3 wt (0,25-0,75 μ L); Carrils 5-6: M3-CTD (0,5-1 μ L), Carrils 7-8: M3CTED1 (0,35-1,05 μ L); Carrils 9-10: M3-CTD (0,5-1 μ L)+ M3CTED1 (0,35-1,05 μ L). Carrils 11-18 HSW: , Carrils 11-12: M3 wt (0,25-0,75 μ L); Carrils 13-14: M3-CTD (0,5-1 μ L), Carrils 15-16: M3CTED1 (0,35-1,05 μ L); Carril 17: M3-CTD (0,5-1 μ L)+ M3CTED1 (0,35-1,05 μ L).

Per llegir el gel correctament i interpretar els resultats, és necessari saber fins a quin punt ha de córrer la nostra proteïna, ja que al ser la primera vegada que se li fa aquest tall, es desconeix fins a quin punt corre aquesta en el gel. Les dues primeres mostres, doncs, són mostres pures de les proteïnes M3CTD i M3CTED1, les quals es carreguen per saber on esperem veure les bandes, en cas de que s'hagi unit alguna de les dues fraccions de l'M3 en els nostres assajos.

Els següents carrils són el 3 i la 4, en les quals es va carregar la proteïna MCM3wt junt a la resta de les proteïnes que formen el complex pre-replicatiu, i també es va afegir ATP γ S. Com ja s'ha explicat anteriorment, l'ATP γ S permet que es formi l'estructura de l'OCCM, en la qual formen part totes les proteïnes del complex pre-replicatiu, però no permet que s'acabi formant el doble hexàmer. Així doncs, al quedar bloquejat el complex pre-replicatiu, en el gel som capaços de veure totes les proteïnes del complex. Comparant els resultats obtinguts amb la figura 12, podem saber a quina proteïna correspon cada una de les bandes.

Els carrils següents són el 5 i el 6, les quals corresponen al pool de proteïnes junt amb la nostra proteïna M3CTD i ATPγS. Aquest fragment de la proteïna correspon a la part que s'encarrega de fer el primer contacte entre l'MCM3 i el complex ORC-Cdc6. Veiem que en la columna 2, on s'ha inoculat la M3CTD, és on esperaríem també veure la nostra proteïna si s'hagués unit. No veiem cap banda, cosa que ens indica que la nostra proteïna no s'ha unit. L'MCM3 és la primera proteïna del complex MCM en fer contacte amb el complex ORC-Cdc6. Si la nostra proteïna no es pot unir, la resta de proteïnes tampoc es poden unir al complex ORC-Cdc6 i no es pot formar l'estructura de l'OCCM. En el gel veiem que la quantitat de bandes és molt menor, degut a que es poden veure les subunitats de ORC i també la Cdc6 però no es poden veure cap de les subunitats de la MCM ni la Cdt1.

Els carrils consecutius són el 7 i el 8, on s'hi va carregar el fragment M3CTED1 de la proteïna MCM3 junt amb ATPγS. Aquest fragment té poca probabilitat d'unió, ja que la part de la proteïna que fa el primer contacte amb el complex ORC-Cdc6 és el fragment equivalent a la M3CTD (Frigola et al., 2013). Tot i això es va fer la prova per corroborar-ho i, efectivament, no es va veure unió de la proteïna M3CTED1 i conseqüentment tampoc la unió de la resta de subunitats de la MCM.

En els carrils 9 i 10 es van inocular les dues proteïnes aïllades durant el projecte juntes, junt amb ATPγS. L'objectiu era comprovar si, en cas d'unió de la subunitat petita de la proteïna MCM3, la part equivalent a la M3CTD, si la resta de proteïnes MCM es podien unir amb només la subunitat petita o també es necessitava la subunitat gran (equivalent a la M3CTED) per un reclutament correcte. Com la subunitat petita no s'uneix al complex ORC-Cdc6, com hem pogut veure als carrils 5 i 6, i la subunitat gran tampoc s'uneix, com hem pogut veure als carrils 7 i 8, tot i fer la conjunció de totes no veiem cap resultat diferent. Quan l'extrem C-terminal no es troba unit a la resta de la proteïna, no s'uneix a l'ADN. Això ens indica que hi ha certa interacció entre les subunitats de la proteïna que fan que l'extrem C-terminal sigui capaç d'unir-se a l'ADN. Aquestes interaccions només es poden donar si les subunitats de la proteïna es troben unides físicament, en cas contrari, encara que estiguin totes les subunitats en la mateixa solució no poden interactuar correctament i no hi ha unió del fragment M3CTD a l'ADN. És important recalcar que el funcionament de l'extrem C-terminal es dona només quan té interacció amb la resta de la proteïna

En els carrils 11 i 12 es torna a inocular la proteïna MCM3wt junt amb la resta de les proteïnes i ATP. Donat que hi posem ATP, aquest permet que es segueixi avançant de la fase de OCCM i s'arribi a la fase de doble hexàmer, la fase definitiva a partir de la qual es poden formar les

bombolles de replicació. Com la MCM3 és completament funcional, s'ha pogut unir al complexe ORC-Cdc6 i ha pogut reclutar a la resta de les proteïnes que formen part del complexe MCM. S'ha format l'OCCM i gràcies a que l'ATP s'ha pogut hidrolitzar, s'ha pogut arribar a la fase final del doble hexàmer. Es pot interpretar en el gel perquè la fase de doble hexàmer només la conforma el complex MCM i per tant només podem veure les subunitats MCM 2-7 i tan les subunitats d'ORC 1-6 com Cdc6 i Cdt1 ja no es poden veure ja que, al formar-se l'estructura de doble hexàmer, aquestes es desenganxen del DNA.

Els carrils 13 i 14 estan constituïts pel pool de proteïnes junt amb la M3CTD i ATP. Al no poder-se unir la M3CTD i al no poder-se reclutar la resta de subunitats de la MCM, ja hem vist que no es forma l'OCCM i, per tan, el doble hexàmer, que és un pas més endavant de l'OCCM, tampoc es pot formar. És interessant fixar-se que encara que no s'hagi format el doble hexàmer, tampoc hi ha rastre del complex ORC-Cdc6, el qual en teoria no ha de tenir cap problema en unir-se al DNA i per tan s'hauria de veure en el gel final igualment. El que passa és que per veure el doble hexàmer, l'últim rentat s'ha de fer amb una concentració major de sals (HSW) en comparació en quan volem veure només l'OCCM (LSW). Això és perquè la unió del doble hexàmer amb el DNA és més estable i és necessari un rentat de sals més concentrat per eliminar la resta de proteïnes i poder veure el doble hexàmer correctament. Per això, en el gel no es veu cap banda.

El mateix passa amb els carrils 15 i 16 on, si no s'havia format l'OCCM, tampoc es pot formar el doble hexàmer encara que hi afegim ATP enlloc de ATPγS. Igual que en els carrils 13 i 14, no es pot veure cap banda corresponent a cap proteïna. El mateix passa al carril 17 on hi posem una barreja de les dues proteïnes M3CTD i M3CTED1, i no es veu cap de les proteïnes que hem inoculat al pool inicial ja que, o bé no s'han pogut unir en el cas de les MCM o s'han eluït durant el rentat amb alta concentració de sals.

Amb els resultats obtinguts, es pot entendre que la subunitat M3CTD (la qual sabem que és la que fa el primer contacte amb el complex ORC-Cdc6) no pot fer la seva funció sense estar unida a l'altra subunitat M3CTED1. En cas contrari, veuríem que en els carrils 5,6,9 i 10 hi hauria una banda a la part inferior corresponent a la M3CTD. El resultat esperat no és el que s'ha vist a l'experiment, ja que fins ara es pensava que amb només la subunitat M3CTD n'hi ha suficient per tal de que es reconegui el complex ORC-Cdc6. Tot i això, els resultats obtinguts podrien ser plausibles i fer-nos pensar que, efectivament, és necessària una interacció entre les dues subunitats de la MCM3 per aquesta funció primària de reconeixement.

Hi ha un fet, però, que ens porta a ser reticents a acceptar la teoria d'aquesta interacció entre les dues subunitats per un correcte acoblament al complex ORC-Cdc6. Degut a l'alta complexitat

per dur a terme un assaig, aquests es van haver de repetir nombroses vegades per obtenir uns resultats clars i entenedors com els mostrats en la figura 13. En la majoria d'assajos els resultats van ser molt similars amb el del gel presentat en aquest treball, però en un dels assajos vam obtenir un resultat inesperat:

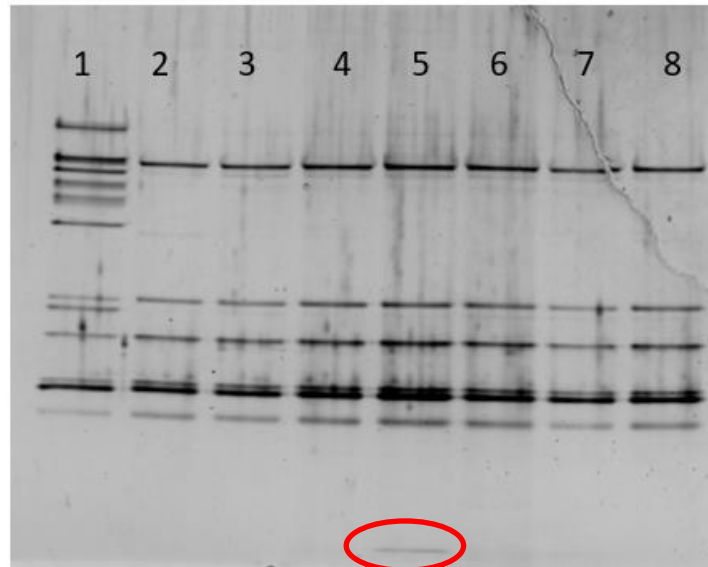


Figura 14: γ S LSW 3-8% TRICINA. Carril 1: M3wt, Carril 2: M3CTED1+M3CTD (mostra bona); Carril 3: M3CTED1+M3CTD(amb el tag); Carril 4: M3CTED+M3CTD (bruta); Carril 5: M3CTD (bona), Carril 6: M3CTD (amb el tag), Carril 7: M3CTD (bruta); Carril 8: M3CTED1

Com es pot veure en la figura 14, en el carril 5 es veu una petita banda a la part inferior (marcada en vermell). Un dels múltiples errors que es van cometre en aquest assaig, va ser que no es van posar les proteïnes pures als primers carrils per poder identificar-ne la banda en cas de que aquestes es mostressin (tal com va passar). El fet de no posar les proteïnes al inici, no ens permet comparar si la banda obtinguda és efectivament la M3CTD, però el fet de veure una banda anormal és un indicatiu que efectivament és la nostra proteïna d'interès. El gel presentat en la figura 13, es van posar les proteïnes als primers carrils per poder fer aquesta comprovació, i veiem que efectivament, la banda apareix a la longitud on corre la proteïna M3CTD.

Aquest resultat només va sortir una vegada, i al no haver-hi rèpliques, no se'n pot treure una conclusió, tot i que ens pot fer sospitar que és un possible resultat, però que els assajos no ens funcionen per algun motiu.

Després de analitzar detingudament sobre les possibilitats del perquè d'aquest resultat, hi ha algunes possibilitats que poden haver derivat a aquesta baixa fiabilitat dels resultats. La hipòtesi més plausible és que durant els assajos no es va utilitzar la proteïna aïllada durant la estada al IDIBGI. Tot i fer tot el procés d'aïllament, a l'hora de fer la purificació mitjançant la gelfiltració,

faltava la columneta específica per la mida de proteïna de la M3CTD (aprox. 30KDa). Per la falta d'aquesta columneta específica, la proteïna no es va purificar del tot bé i va quedar una mostra impura. Per tan, a la hora de fer assajos es va utilitzar la mateixa proteïna, però que s'havia purificat feia 11 anys (2013). És possible que, al haver estat tan de temps congelada, hagués perdut la funcionalitat i per tan, durant els assajos, no funcionés correctament. S'hauria d'haver intentat fer un aïllament correcte o tornar a fer els assajos, per tal d'assegurar si realment es necessita la interacció entre totes les subunitats de la proteïna per dur a terme, com a mínim, la funció inicial d'acoblament o si, pel contrari, és culpa de la proteïna que després de tan de temps congelada ha perdut funcionalitat.

5. CONCLUSIONS

Although one of the assays showed indications that the C-terminal end might have the capacity to bind independently to DNA, the results were not replicable. If more time had been available, the assays should have been replicated with a new M3CTD protein, as it is likely that the one used had lost functionality since it was purified 10 years ago. In the new isolation, a new gel filtration column with the appropriate filtration size for independently filtering the M3CTD should have been used. The results obtained from the first commented gel (figure 14) are considered definitive because they are reproducible.

It was observed that in an assay with the M3CTD protein without the rest of the protein, it was unable to bind to DNA. Therefore, for the first null hypothesis, an alternative hypothesis must be formulated: Perhaps the C-terminal end of MCM3 is incapable of independently binding to the ORC-Cdc6 complex and requires the presence of the rest of the protein.

The assays also aimed to see if the C-terminal end could bind to the ORC-Cdc6 complex in the presence of the rest of the protein, equivalent to our M3CTED1 fragment, even if both fragments were not physically joined. Therefore, the null hypothesis is rejected, and an alternative hypothesis must be formulated: Perhaps, for correct interaction between the M3CTD and M3CTED subunits, they need to be physically connected.

From the obtained results, it seems that an interaction between the C-terminal end and the rest of the protein is necessary for the correct functioning of the recognition and binding region to the ORC-Cdc6 complex. This information is very interesting since the MCM3 protein plays a crucial role in forming the double hexamer. Any defect in this protein inhibits the formation of the double hexamer, as without the ability to recognize the ORC-Cdc6 complex or to recruit the rest of the MCM proteins, the formation of the final structure is impossible.

In currently known cancer treatments, such as chemotherapy or radiotherapy, the objective is to damage the DNA to prevent it from replicating. These are very aggressive therapies that, due to the high levels of drugs necessary for effective treatment, cause many side effects in patients, including a high mutation rate that can lead to other cancers. If a way is found to inhibit the MCM3 protein, or another with an essential function in forming the double hexamer, the number of replication origins leading to replication bubbles could be significantly reduced. If the number of replication bubbles can be significantly reduced, a joint therapy with currently known

treatments could be applied, but with a much lower amount of drugs, reducing the side effects they have and achieving the same result: ineffective replication and cell death of malignant cells.

With the results obtained in our experiment, it would be interesting to search for a drug capable of disrupting the interactions between the C-terminal end of the protein and the rest of it, thus inhibiting the functioning of MCM3 and preventing the formation of double hexamers, precursors of the functional helicase.

6. BIBLIOGRAFIA

- 5 motivos del interés de las mujeres en estudiar un MBA. (s. f.). Recuperado 30 de mayo de 2024, de <https://www.master-sevilla.com/formacion/mujeres-estudiar-mba/>
- Abdelhaleem, M. (2010). Helicases: An overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 587, 1-12. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-355-8_1
- Blow, J. J., & Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(6), 476-486. <https://doi.org/10.1038/nrm1663>
- Boos, D., & Ferreira, P. (2019). Origin Firing Regulations to Control Genome Replication Timing. *Genes*, 10(3), 199. <https://doi.org/10.3390/genes10030199>
- Boos, D., Frigola, J., & Diffley, J. F. (2012). Activation of the replicative DNA helicase: Breaking up is hard to do. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(3), 423-430. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.01.011>
- Champasa, K., Blank, C., Friedman, L. J., Gelles, J., & Bell, S. P. (s. f.). A conserved Mcm4 motif is required for Mcm2-7 double-hexamers formation and origin DNA unwinding. *eLife*, 8, e45538. <https://doi.org/10.7554/eLife.45538>
- Costa, A., & Diffley, J. F. X. (2022). The Initiation of Eukaryotic DNA Replication. *Annual Review of Biochemistry*, 91, 107-131. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072321-110228>
- Diffley, J. F. X. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Current Biology: CB*, 14(18), R778-786. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.019>
- Frigola, J., Remus, D., Mehanna, A., & Diffley, J. F. X. (2013). ATPase-Dependent Quality Control of DNA Replication Origin Licensing. *Nature*, 495(7441), 339-343. <https://doi.org/10.1038/nature11920>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Isolation of Poly(A)+ Messenger RNA Using Magnetic Oligo(dT) Beads. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(10). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101733>
- Guerrero-Puigdevall, M., Fernandez-Fuentes, N., & Frigola, J. (2021). Stabilisation of half MCM ring by Cdt1 during DNA insertion. *Nature Communications*, 12(1), 1746. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21932-8>
- Hinks, G. (2023, marzo 9). Less than a third of FTSE 100 executives are women. *Board Agenda*. <https://boardagenda.com/2023/03/09/less-than-a-third-of-ftse-100-executives-are-women/>
- Liu, S., Balasov, M., Wang, H., Wu, L., Chesnokov, I. N., & Liu, Y. (2011). Structural analysis of human Orc6 protein reveals a homology with transcription factor TFIIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7373-7378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013676108>
- Méchalí, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: Many choices for appropriate answers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(10), 728-738. <https://doi.org/10.1038/nrm2976>
- Mei, L., & Cook, J. G. (2021). Efficiency and equity in origin licensing to ensure complete DNA replication. *Biochemical Society transactions*, 49(5), 2133-2141. <https://doi.org/10.1042/BST20210161>

Provencio, M., Sánchez, A., Artal, A., Sánchez Torres, J. M., De Castro, J., Dómine, M., Viñolas, N., Sánchez, A., & Pérez, F. J. (2013). Cisplatin plus oral vinorelbine as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer: A prospective study confirming that the day-8 hemogram is unnecessary. *Clinical and Translational Oncology*, *15*(8), 659-664.

<https://doi.org/10.1007/s12094-012-0989-6>

Riera, A., Barbon, M., Noguchi, Y., Reuter, L. M., Schneider, S., & Speck, C. (2017). From structure to mechanism-understanding initiation of DNA replication. *Genes & Development*, *31*(11), 1073-1088. <https://doi.org/10.1101/gad.298232.117>

Singh, V. K., & Krishnamachari, A. (2016). Context based computational analysis and characterization of ARS consensus sequences (ACS) of *Saccharomyces cerevisiae* genome.

Genomics Data, *9*, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.07.005>

Sun, J., Kawakami, H., Zech, J., Speck, C., Stillman, B., & Li, H. (2012). Cdc6-induced Conformational Changes in ORC Bound To Origin DNA Revealed by Cryo-Electron Microscopy. *Structure(London, England:1993)*, *20*(3), 534-544. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.011>

The Rise of Women Executives | Washington State University. (s. f.). Recuperado 30 de mayo de 2024, de <https://onlinemba.wsu.edu/blog/the-rise-of-women-executives>

Venegas, C., Fuentes, R., Venegas, C., & Fuentes, R. (2023). Una Revisión de los tipos de Fraude Científico más Frecuentes. *International journal of odontostomatology*, *17*(2), 200-205.

<https://doi.org/10.4067/S0718-381X2023000200200>

Wang, Z. (2022). Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2579*, 3-23. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_1

Yuan, Z., Schneider, S., Dodd, T., Riera, A., Bai, L., Yan, C., Magdalou, I., Ivanov, I., Stillman, B., Li, H., & Speck, C. (2020). Structural mechanism of helicase loading onto replication origin DNA by ORC-Cdc6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(30), 17747-17756. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006231117>