

Librerie di domini bHLH(Zip)

R. Ciarapica, J. Rosati, L. Soucek, S. Nasi

Università La Sapienza, Centro Acidi Nucleici CNR, P.le A. Moro 5, 00185 Roma. E-mail s.nasi@caspur.it

I fattori di trascrizione bHLH e bHLHZip sono componenti essenziali dei programmi di crescita, differenziamento e morte cellulare, e pertanto molti hanno un ruolo nell'insorgenza del cancro. Sono contraddistinti da una struttura tridimensionale altamente conservata che comprende un dominio basico (b) di legame al DNA ed un dominio di dimerizzazione elica-ansa-elica (HLH), seguito da una cerniera di leucine (Zip) nelle bHLHZip. Queste proteine agiscono come dimeri e riconoscono sequenze di DNA, le E box, esameriche e palindromiche. La dimerizzazione è fondamentale per l'attivazione del programma genetico e la specificità di dimerizzazione determina la potenzialità funzionale dei dimeri. Studi di modellizzazione molecolare hanno mostrato la possibilità di modificare il riconoscimento molecolare dei dimeri tramite mutagenesi mirata di aminoacidi nella cerniera di leucine. E' stato così ottenuto un dominio bHLHZip mutante in grado di interferire specificamente con l'attività biologica del gene Myc. Attraverso uno studio sistematico di strutture primarie, secondarie e terziarie dei numerosi domini di dimerizzazione bHLH e bHLHZip presenti in banche dati, abbiamo derivato i criteri per l'introduzione di mutazioni nelle posizioni ritenute critiche per la specificità di riconoscimento; abbiamo quindi ottenuto per PCR una varietà di domini adatta ad essere rappresentata per phage display. Prima di costruire le librerie fagiche, abbiamo confrontato quattro diversi vettori al fine di identificare quello ottimale per la corretta esposizione dei domini. Tali domini sono stati fusi con le proteine di rivestimento pIII e pVIII di fagi filamentosi, e con la proteina D del capsido di lambda. Il fago lambda è risultato il più idoneo, poichè è l'unico in cui è stato possibile esporre a buoni livelli l'intera regione bHLHZip, conservandone la capacità di dimerizzazione. Le librerie di domini bHLH(Zip) permetteranno di studiarne in vitro le proprietà di riconoscimento molecolare e di isolare sequenze varianti in grado di interferire specificamente con bHLHZip naturali e quindi di potenziale interesse farmacologico.