

Dissezione della rete d'interazioni proteiche dei fattori trascrizionali HLH con l'ausilio del phage display

R. Ciarapica, J. Rosati, S. Nasi

Universita' La Sapienza, Centro Acidi Nucleici CNR

I fattori trascrizionali HLH (MyoD, Id2, Mash1, E2A, Myc, Max, Mad, Rox etc.) sono potenti effettori nei programmi di proliferazione, differenziazione e morte cellulare. Queste proteine riconoscono e legano sotto forma di dimeri elementi di sequenza esamerici sul DNA e la specificità di dimerizzazione è determinante per la loro potenzialità funzionale. Esiste una vera e propria rete d'interscambio tra i monomeri finemente regolata attraverso la variazione dei livelli di concentrazione intracellulare. Studi di modellizzazione molecolare ed esperimenti di mutagenesi sito-specifica hanno mostrato la possibilità di modificare il riconoscimento molecolare dei dimeri tramite la sostituzione mirata di alcuni aminoacidi. E' stato così ottenuto un dominio mutante in grado di interferire specificamente con l'attività biologica di Myc (Soucek et al., 1998). Per studiare come i moduli strutturali HLH e HLHZip decodifichino l'informazione al fine di specificare le affinità differenziali d'interazione ci siamo avvalsi della tecnologia del phage display su fago lambda che è un potente mezzo per scoprire i criteri che regolano il costituirsi di dimeri attivatori o repressori nei programmi di regolazione dell'espressione genica. Attraverso uno studio sistematico di strutture primarie, secondarie e terziarie dei numerosi domini 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 degenerate di domini (circa 6 milioni di varianti) e successivamente costruito librerie fagiche esponenti due repertori molecolari dei domini di dimerizzazione HLH e bHLHZip. Abbiamo selezionato con le proteine Myc, Mad e Rox il repertorio bHLHZip e con le proteine Id2 e MyoD il repertorio HLH. Attraverso esperimenti di immunoscreening e di ELISA abbiamo isolato diversi mutanti specifici per l'interazione con i suddetti modulatori chiave del destino cellulare. Tali mutanti sono stati sequenziati e allineati secondo diversi criteri. Disponiamo ora di una grande quantità di dati dalla quale è possibile, attraverso l'uso di adeguati strumenti bioinformatici, derivare l'informazione necessaria a definire le regole della dimerizzazione di queste proteine e, in particolare, ad identificare i residui aminoacidici presenti all'interfaccia di dimerizzazione che determinano la specificità di riconoscimento per determinati partners, in modo da predire associazioni stabili tra questi fattori e da promuovere sistemi d'interferenza molecolare in vivo.