

CLONAGGIO DELLA Dp71, PRINCIPALE PRODOTTO DEL GENE DELLA DISTROFINA NEL SISTEMA NERVOSO.

Marina Ceccarini, Giovanni Rizzo, Pompeo Macioce, Tamara C. Petrucci
Laboratorio di Biologia Cellulare-Istituto Superiore di Sanità-Roma

INTRODUZIONE

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia ereditaria causata da una mutazione del gene DMD localizzato sul cromosoma X. La distrofina, il prodotto del gene DMD, è una proteina citoscheletrica di 427 kDa espressa prevalentemente nel muscolo. E' ancorata al sarcolemma attraverso un complesso glicoproteico oligomerico di almeno sei proteine associate alla membrana. La distrofina è stata identificata anche nel cervello. La forma muscolare e quella neuronale sono trascritte da promotori diversi e differiscono per pochi aminoacidi N-terminali codificati da differenti primi esoni. Recentemente è stata identificata una famiglia di proteine correlate alla distrofina che mostrano identità od omologia di sequenza con il C-terminale della distrofina. Tra queste è classificabile la Dp71, codificata da un trascritto più corto del gene DMD sotto il controllo di un differente promotore. La Dp 71 è espressa in molti tessuti, particolarmente nel cervello, dove sembra essere il maggior prodotto del gene DMD. Il ruolo svolto dalla Dp71 nel tessuto nervoso potrebbe essere particolarmente importante dal momento che circa un terzo dei pazienti DMD mostra un qualche grado di ritardo mentale; l'identificazione di quei componenti della cellula nervosa con i quali la proteina interagisce in maniera specifica può fornire informazioni utili alla comprensione della sua funzione.

RISULTATI

L'intera sequenza codificante della Dp71 è stata amplificata a partire da RNA di tessuto nervoso fetale umano mediante l'uso di RT-PCR. Il prodotto di amplificazione è stato clonato in pCRII (Invitrogen), attraverso il legame tra singoli residui di T presenti sul vettore all'estremità 3' del sito di inserzione e i singoli residui di A aggiunti dalla polimerasi all'estremità 3' delle molecole amplificate. Il cDNA è stato sequenziato e subclonato nel vettore di espressione procariotico pQE-31 (Qiagen). La proteina ricombinante presenta all'estremità N-terminale una sequenza di sei istidine consecutive che ne permettono la successiva purificazione su una resina che lega Ni^{2+} . La proteina purificata è stata iniettata in conigli per la produzione di un anticorpo specifico. Esperimenti di binding della Dp71 a proteine presenti in specifici compartimenti subcellulari della cellula neuronale sono in corso di studio.