



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901562011
Data Deposito	05/10/2007
Data Pubblicazione	05/04/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

ACIDO NUCLEICO CODIFICANTE PER UNA PROTEINA REGOLATRICE SPECIFICA DELLA TRASCRIZIONE DELL'UTROFINA, PROTEINA DA ESSO CODIFICATA E SUE APPLICAZIONI.

DESCRIZIONE

A corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

"Acido nucleico codificante per una proteina regolatrice specifica della trascrizione dell'utrofina; proteina da esso codificata e sue applicazioni."

Titolare: Consiglio Nazionale delle Ricerche

Inventori: Claudio Passananti, Nicoletta Corbi, Annalisa Onori, Maria Grazia Di Certo.

CAMPO TECNICO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne un acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per una proteina regolatrice della trascrizione dell'utrofina, chiamata "UtroUp". UtroUp è in grado di legare, con altissima affinità e specificità, una sequenza bersaglio di DNA lunga 18 nucleotidi presente sia nel promotore umano che murino del gene "utrofina" e di modularne la trascrizione.

STATO DELLA TECNICA

Mutazioni del gene della distrofina sono responsabili di miopatie legate al cromosoma X, chiamate distrofie muscolari Duchenne (DMD) e Becker (BMD). Il fenotipo DMD è caratterizzato dalla completa assenza della distrofina, dovuta a difetti del promotore o a mutazioni di tipo non senso o delezioni. DMD colpisce 1 su 3500 nati maschi e comporta un progressivo indebolimento muscolare con esiti letali. Il fenotipo BMD è meno grave e più variabile, in quanto è associato ad

un abbassamento dei livelli di espressione di versioni mutate della distrofina.

Il gene della distrofina si estende per circa 2.5 megabasi di DNA, nel locus Xp21, con un corrispondente trascritto di 14 kilobasi (numero accesso BC127103) e una proteina di 427 kilodalton (numero accesso AA127104) (Davies et al. 1983). Nel 1989 è stato descritto per la prima volta un omologo autosomale del gene della distrofina (Love et al., 1989). Tale proteina inizialmente definita DRP (dystrophin related protein), è stata successivamente chiamata utrofina. Il gene dell'utrofina mappa nel cromosoma 6q24, ha un trascritto di 13 kilobasi (numero accesso NM_007124) e un prodotto proteico di 400 kilodalton (numero accesso NP_009055). Utofina e distrofina presentano forti omologie strutturali e funzionali: entrambe fanno da ponte di connessione tra l'actina citoscheletrica, la membrana cellulare ed, in ultimo, la matrice extracellulare attraverso le proteine collettivamente indicate come DAPs (dystrophin associated proteins) (Matsumura et al. 1992). Nel muscolo adulto l'utrofina è localizzata nella giunzione neuromuscolare, mentre la distrofina è disposta lungo tutto il sarcolemma. Studi su topi "mdx" (modello murino della DMD), transgenici per l'utrofina hanno dimostrato che una over-espressione e rilocalizzazione dell'utrofina induce un netto miglioramento del fenotipo distrofico (Tinsley et al 1996, Rafael et al 1998). L'aumento dei livelli di espressione della utrofina è quindi al momento uno degli approcci terapeutici più promettenti per il trattamento della DMD (Miura and Jasmin 2006). A tal fine vari trattamenti farmacologici sono stati

proposti (Khurana and Davies 2003, Bogdanovich et al. 2004, Voisin and La Porte 2004).

Gli autori, per ottenere una over-espressione dell'utrofina hanno progettato e realizzato diversi fattori trascrizionali sintetici su base zinc-finger in grado di legare e attivare la trascrizione del gene dell'utrofina (Corbi et al. 2000, Corbi et al. 2004, Onori et al. 2007, Mattei et al. 2007).

L'affinità e la specificità di legame al DNA è uno dei punti critici nella costruzione di zinc finger sintetici. Nel contesto cellulare un ipotetico fattore trascrizionale riconoscerà sequenze di DNA multiple con un differente grado di affinità, esercitando così un ulteriore livello di regolazione trascrizionale. Per fattori trascrizionali naturali la capacità di riconoscere specificamente una determinata sequenza bersaglio è stata accuratamente selezionata nel corso dell'evoluzione, così che ogni proteina regolatrice operi nel "pathway" appropriato. Statisticamente, assumendo una distribuzione stocastica delle basi del DNA, una sequenza di DNA lunga 9 basi è presente nel genoma umano ($\cong 3.5 \times 10^9$ bp) circa 1.3×10^4 volte, una sequenza di 12 basi circa 210 volte, mentre una sequenza di 16 basi è presente una sola volta.

Nella presente invenzione è stato sintetizzato e saggiato un nuovo dominio di legame al DNA su base zinc finger chiamato "UtroUp". UtroUp presenta sei domini zinc finger ed è in grado di legare, con altissima affinità e specificità, una sequenza bersaglio di DNA lunga 18 nucleotidi presente sia nel promotore umano che murino del gene "utrofina".

L'intento è di disporre di fattori trascrizionali sintetici per un'azione mirata alla esclusiva sovra-regolazione dell'utrofina.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica che codifica per una proteina caratterizzata da avere almeno quattro domini zinc finger e di modulare la trascrizione del gene dell'utrofina.

Preferibilmente la proteina comprende sei domini zinc finger. Ancora preferibilmente i domini zinc finger sono selezionati fra: SEQ ID 1, SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 4, SEQ ID 5 o SEQ ID 6.

Preferibilmente i domini zinc finger sono SEQ ID 1, SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 4, SEQ ID 5 e SEQ ID 6.

In una forma preferita la sequenza nucleotidica codifica per la proteina avente essenzialmente la SEQ ID 12.

Ancora preferita è la sequenza nucleotidica che codifica per la proteina avente essenzialmente la SEQ ID 8 o SEQ ID 10.

Preferibilmente l'acido nucleico ha essenzialmente la SEQ ID 11.

Ancora preferibilmente l'acido nucleico ha essenzialmente la SEQ ID 7 o SEQ ID 9.

Forma oggetto della presente invenzione un vettore d'espressione comprendente l'acido nucleico dell'invenzione.

E' ulteriore oggetto della presente invenzione una cellula ospite ricombinante comprendente il vettore descritto come sopra.

Forma ancora oggetto della presente invenzione una proteina caratterizzata da avere almeno quattro domini zinc finger e di modulare la trascrizione del gene dell'utrofina.

Preferibilmente la proteina è in grado di legare una sequenza nucleotidica compresa nel promotore del gene dell'utrofina.

Preferibilmente la sequenza nucleotidica compresa nel promotore del gene dell'utrofina comprende essenzialmente la sequenza: GCT GCT GCG GGC TGG GAG.

Ancora preferita è la proteina avente essenzialmente la SEQ ID 12.

Preferibilmente la proteina ha essenzialmente la SEQ ID 8 o SEQ ID 10.

E' oggetto della presente invenzione l'uso della proteina come descritto sopra per la preparazione di un medicamento per una patologia muscolare.

Preferibilmente la patologia muscolare è la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) o di Becker (BMD).

Nella presente domanda di brevetto il dominio a base zinc-finger si definisce come: dominio amminoacidico sintetico in grado di legare specificamente una sequenza di DNA interna al promotore del gene dell'utrofina.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi non limitativi, con particolare riferimento alla seguente figura:

Figura 1; A) Sequenza nucleotidica del promotore murino "A" dell'utrofina. La sequenza di DNA bersaglio di UtroUp è sottolineata ed in grassetto. I siti di legame dei principali fattori trascrizionali sono indicati. B) Sequenza amminoacidica del dominio di legame al DNA

UtroUp. Le sequenze dei sei domini zinc finger sono numerate e sottolineate (SEQ ID 1, SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 4, SEQ ID 5 e SEQ ID 6). C e D) Schemi dei costrutti sintetici B-UtroUp per produrre e purificare la proteina in batteri e V-UtroUp per saggiare le proprietà trascrizionali in cellule di mammifero.

Figura 2: A) Saggio di mobilità elettroforetica per la determinazione della costante di dissociazione (K_d) del complesso proteina B-UtroUp/DNA bersaglio. Le concentrazioni della proteina espresse in nanomoli dal primo al nono canale sono: 1, 2, 4, 8, 12, 30, 60, 120, 0. B) Istogramma relativo all'attività luciferasica dei costrutti pXP (contenente una piccola porzione del promotore dell'utrofina che include il sito di legame di UtroUp) e pGL2-Control. Entrambi i costrutti sono stati cotrasfettati con UtroUp, contenente solo il dominio di legame al DNA, o V-UtroUp contenente il dominio di legame al DNA fuso al dominio di attivazione della trascrizione Vp16. I risultati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti effettuati in triplicato e sono riportati rispetto all'attività basale (a cui è stato dato il valore 1) rispettivamente dei costrutti pXP e pGL2-Control.

MATERIALI E METODI

Costruzione delle sequenze

UtroUp consta di sei domini zinc finger (Tabella 1) posti in tandem, ed è stato realizzato con l'intento di legare, con altissima affinità e specificità, la sequenza bersaglio di DNA lunga 18 nucleotidi: 5'- GCT GCT GCG GGC TGG GAG- 3', presente sia nel promotore umano che murino del gene "utrofina" (Fig. 1A).

Tabella 1. Sequenza nucleotidica dei domini di UtroUp (SEQ ID 11)

```

5' TACGCCTGCCCTGTGGAATCTTGCACCCGCGGTTCTCCCGCAGCGATAACCTGGT
GCGGCACATCCGGATTCACACCCGGCCAGAAACCTTTCCAGTGCAGGATCTGCATGAGA
AATTTCTCCCGGTCCGACCACCTGACCACCCACAATAGGACCCACACCCGGCGAGAAAC
CCTTTGCCTGCGACATCTGCGGGAGAAAGTTGCGCCGACCCCGGCCACCTGGTGAGACA
CAATAGAATCCACACCCGGTAAAAGCCCTTCGCCTGTCCCGTGGAGAGCTGCGATCGC
AGATTCAGCCGCAGCGACGAGCTGACAAGGCACATCAGAATCCACACCCGGCGAGAAGC
CTTTTCAGTGCCGGATCTGCATGAGGAACTTCAGCTCCCGGGACGTGCTGAGACGCCA
CAATCGCACACACCCGGCGAAAAGCCCTTCGCCTGTGATATTTGCGGGCGGAAATTT
GCCTCCAGAGATGTGCTGCGCCGCCACAACCGCATTACCTGAGACAGAACGATCTCG
AG 3'

```

Sequenza amminoacidica dei domini di UtroUp (SEQ ID 12)

```

I LDRPYACPVE SCDRRF SRSDNLVRHIRIHTG
QKPFQCRICMRNF SRSDHLTTHNRTHTGEKPF
ACDICGRKFADPGHLVRHNR IHTGEKPFACPV
ESCDRRF SRSE LTRHIRIHTGQKPFQCRICM
RNFSSRDVLRRHNRHTHTGEKPFACDICGRKFA
SRDVLRRHNR IHLRQNDLE

```

UtroUp è stato fuso a diversi domini proteici (GST:AAB03573, VP16: P04486) al fine di poter testare le sue proprietà biochimiche e funzionali.

Sono stati prodotti due diversi costrutti di base:

1) B-UtroUp (Tabella 2 e 3)

B-UtroUp si esprime in sistemi batterici (Fig 1C). E' una proteina di fusione con la proteina batterica Glutazione S-trasferasi (GST) che ne permette espressione e purificazione in quantità sufficienti per poterne saggiare le proprietà di legame al DNA (specificità e affinità).

Tabella 2. Sequenza nucleotidica di B-UtroUp (SEQ ID 7)

```

5' ATGGCCATCATACTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCA
AAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGG
TGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTA
GCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATAT
TTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGT
TGTTTATACATGGACCCAATGTGCCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTA
AAAAACGTATTGAAGCTATCCACAAAATGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTAT
ATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCC
AAAATCGGATCTGGTTCGCGCTGGATCCCCGGAATCCCCGGGGATCCTGGATCGCC
CTTACGCCTGCCCTGTGGAATCTTGCAGCCGCGGTTCTCCCGCAGCGATAACCTG
GTGCGGCACATCCGGATTACACCCGCCAGAAACCTTCCAGTGCAGGATCTGCAI
GAGAAATTTCTCCCGGTCCGACCACCTGACCACCCACAATAGGACCCACACCGGGC
AGAAACCCTTTGCCTGCGACATCTGCGGGAGAAAAGTTCCGCCACCCCGGCCACCTG
GTGAGACACAATAGAATCCACACCGGTGAAAAGCCCTTCGCCTGTCCCGTGGAGAG
CTGCGATCGCAGATTGAGCCGAGCGACGAGCTGACAAGGCACATCAGAATCCACA
CCGGGCAGAAGCCTTTTTCAGTGCCCGATCTGCATGAGGAACTTCACTCCCGGGAC
GTGCTGAGACGCCACAATCGCACACACACCGGGCGAAAAGCCCTTCGCCTGTGATAT
TTGCGGGCGGAAATTTGCCTCCAGAGATGTGCTGCGCCGCCACAACCGCATTCACC
TGAGACAGAACGATCTCGAGTAA 3'

```

Tabella 3. Sequenza amminoacidica di B-UtroUp (SEQ ID 8)

```

5' MAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLS
KLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKR
IEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPFPFGILDRPYACP
VESCDRRFSRSDNLVRHRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHNRHTHTGKPFACD
ICGRKFADPGHLVRHNRHTGKPFACPVESCDRRFSRSDHLTRHRIHTGQKPFQCR
ICMRNFSRSDVLRHNRHTHTGKPFACDICGRKFASRDVLRHNRHRLRQNDLE 3'

```

2) V-UtroUp (Tabella 4 e 5)

V-UtroUp è stato costruito per l'espressione in cellule di mammifero (Fig.1D) ed è stato realizzato sintetizzando e assemblando varie parti qui di seguito descritte:

- a) Il costrutto contiene la regione promotrice del gene citomegalovirus CMV (GenBank ADDGENE_VECDB_5506 4661, dal nucleotide 15 al 591).
- b) Il trascritto V-UtroUp è stato corredato di un introne proveniente dalla regione precoce del virus SV40 (dal nucleotide 276 al 621 della sequenza AJ012749). La presenza di questo introne e il suo

conseguente processamento aumenta la stabilità del trascritto V-UtroUp.

c) Nella regione carbossi-terminale è stato aggiunto il segnale (proveniente dal virus SV40):

```
5' -AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTAC
AAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT
ATCATGTCTGGAT -3'
```

che permette una corretta poliadenilazione del trascritto.

d) La regione proteica responsabile del legame al DNA è del tipo zinc-finger, è completamente sintetica ed è composta da sei domini zinc finger assemblati in tandem ed opportunamente modificati (Figura 1B) per riconoscere la sequenza bersaglio: 5'-GCT GCT GCG GGC TGG GAG-3' presente sia nel promotore umano che murino del gene "utrofina".

e) Alla regione zinc-finger è stato fuso il dominio di forte attivazione della trascrizione "Vp16" proveniente dal virus herpes simplex (P04486).

Nella porzione ammino-terminale della proteina V-UtroUp sono stati inoltre aggiunti due domini:

f) Un segnale di localizzazione nucleare proveniente dalla proteina precoce Large T del virus SV40 (NLS, MAPKKRKV).

g) Una sequenza di 13 amminoacidi riconosciuta specificamente dall'anticorpo monoclonale 9E10 che permette di rivelare la presenza della proteina (MEQKLISEEDLNE).

Tabella 4. Sequenza nucleotidica di V-UtroUp (SEQ ID 9)

```

5'ATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCT
CATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGAC
TTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGC
AAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGAGCTTGGGCGACCTCAC
CATGGGCCCTAAAAAGAAGCGTAAAGTCGCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGG
GACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAG
ACGATTTGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCGGGTCCGGGATTTAC
CCCCACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAG
CAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGGAATTCCTGGGGA
TCCTGGATCGCCCTTACGCCCTGCCCTGTGGAATCTTGCGACCGCCGGTCTCCCG
CAGCGATAACCTGGTGGCGGCACATCCGGATTCACACCGGCCAGAAACCTTTCCAG
TGCAGGATCTGCATGAGAAATTTCTCCCGGTCCGACCCTGACCACCCACAATA
GGACCCACACCGGCGAGAAACCTTTGCCCTGCGACATCTGCGGGAGAAAGTTTCG
CGACCCCGGCCACCTGGTGAGACACAATAGAATCCACACCGGTGAAAAGCCCTTC
GCCTGTCCCGTGGAGAGCTGCGATCGCAGATTCAGCCGACGCGAGCTGACAA
GGCACATCAGAATCCACACCGGGCAGAAGCCTTTTCAGTGCCGGATCTGCATGAG
GAACTTCAGCTCCCGGGACGTGCTGAGACGCCACAATCGCACACACCGGGCGAA
AAGCCCTTCGCCTGTGATATTTGCGGGCGGAAATTTGCCTCCAGAGATGTGCTGC
GCCGCCACAACCGCATTCACCTGAGACAGAACGATCTCGAGTAA 3'

```

Tabella 5. Sequenza amminoacidica di V-UtroUp (SEQ ID 10)

```

5'MEQKLISEEDLNEMEQKLISEEDLNEMEQKLISEEDLNEMEQKLISEEDLNEMEQK
LISEEDLNEMESLGLTMDGPKKRKRVAPPTDVS LGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDL
DMLGDGDSPPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMF DALGIDEYGGFFPGLDRPYAC
PVESCDRRFRRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHNRHTHTGKPFAC
DICGRKFADPGLVRRNRHTHTGKPFACPVESCDRRFRRSDELTRHIRIHTGQKPFQ
RICMRNFSRSDVLRNRHTHTGKPFACDICGRKFASRDVLRNRHRIHLRQNDLE 3'

```

Costruzione di B e V-UtroUp**Costruzione di B-UtroUp**

Il gene sintetico B-UtroUp (Tabella 2) è stato clonato nel vettore di espressione batterico pGEX-4T1 (Pharmacia) in posizione carbossiterminale rispetto alla proteina batterica Glutazione S-trasferasi (GST).

Costruzione di V-UtroUp

Il gene sintetico UtroUp fuso al dominio di forte attivazione della trascrizione "Vp16" proveniente dal virus herpes simplex è stato

clonato nel vettore di espressione eucariotico pRK5 (Clontec) sotto il controllo delle sequenze regolatrici del citomegalovirus (CMV). Il costrutto finale oltre all' epitopo myc (in cinque copie), presenta un segnale di localizzazione nucleare, un introne e un segnale di poliadenilazione, tutti elementi derivati dal virus SV40 (Tabella 4).

Espressione in batteri o cellule di mammifero

B-UtroUp è stata espressa nel ceppo batterico BL21 (ceppo di E.Coli privo di proteasi (Invitrogen) e purificata con la resina Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia).

L'espressione del transgene V-UtroUp è stata controllata utilizzando l'anticorpo monoclonale anti myc 9E10 (Calbiochem) in esperimenti di Western Blot, effettuati con estratti totali e nucleari derivanti da cellule HeLa trasfettate transientemente. Saggi di attività luciferasica sono stati effettuati su estratti cellulari derivanti da esperimenti di trasfezione transiente in cellule HeLa. L'attività luciferasica è stata misurata al luminometro modello Berthold LB9506.

Esperimenti di ritardo elettroforetico (EMSA)

Per misurare la costante di dissociazione (K_d) di B-UtroUp per il suo DNA target (GCT GCT GCG GGC TGG GAG) sono stati eseguiti esperimenti di ritardo elettroforetico (EMSA). Nel saggio EMSA quantità crescenti di B-UtroUp (concentrazioni da 1 a 120 nM), sono state messe ad incubare con una quantità fissata (10000 cpm pari circa a 0.5 ng) dell'oligonucleotide marcato (a doppio filamento) contenente 1 copia del DNA target. Dopo l'incubazione, la mix di reazione è stata caricata su un gel di acrilammide in condizioni non denaturanti. L'immagine radioattiva del gel è stata acquisita al

PhosphorImager (Molecular Dynamics) e l'intensità delle bande alle diverse concentrazioni di proteina è stata misurata col programma ImageQuant. I dati sono stati analizzati con il programma KaleidaGraph (Abelbeck Software), assumendo come valore della K_d la concentrazione della proteina espressa in nM alla quale è trattenuto il 50% del segnale radioattivo.

RISULTATI

Gli autori hanno progettato, sintetizzato e saggiato per alcune proprietà biochimiche un nuovo dominio di legame al DNA su base zinc-finger chiamato "UtroUp" (Fig. 1B).

Legame a DNA bersaglio

La capacità di B-UtroUp di legare il DNA è stata valutata mediante esperimenti di ritardo elettroforetico (EMSA), che hanno permesso di calcolare la sua costante di dissociazione (K_d) (Fig 2A). La costante di dissociazione di B-UtroUp è risultata pari a 3,5 nM. Questo valore indica un ottimo grado di affinità/specificità di B-UtroUp rispetto al suo DNA bersaglio. La costante di dissociazione di B-UtroUp è confrontabile con i valori ottenuti per altre proteine zinc finger naturali ed è significativamente minore (più affine) delle K_d determinate per altre proteine zinc finger sintetiche da noi prodotte (Corbi et al. 2000, Corbi et al. 2004, Libri et al. 2004).

Esperimenti di ritardo elettroforetico effettuati con altre sequenze di 18 bp opportunamente mutagenizzate, simili alla sequenza di DNA bersaglio di UtroUP, rivelano un forte decremento/assenza di legame

da parte di UtroUp, a conferma della sua alta specificità di legame al DNA.

E' importante notare che UtroUp, contenente sei domini zinc finger (tre dei quali provenienti da Vp16-Jazz (sequenza nucleotidica di Jazz: AJ243577, sequenza amminoacidica di Jazz: CAB52142, Corbi et al. 2000), mostra una affinità di circa dieci volte maggiore rispetto a Vp16-Jazz contenente solo tre domini zinc finger (domanda di brevetto RM 2005 A 000493 del 30/09/ 2005) (Corbi et al. 2000). L' affinità al DNA aumenta proporzionalmente al crescere del numero dei domini zinc finger e al conseguente incremento del numero di contatti DNA/proteina (Beltran et al. 2006, Onori et al. 2007).

Trascrizione

E' stata verificata la capacità della proteina V-UtroUp (Fig. 1D) di modulare la trascrizione del gene reporter luciferasi sotto il controllo del promotore dell'utrofina, che include la sequenza di DNA bersaglio di UtroUp (pXP).

Nell'istogramma presentato in figura 2B V-UtroUp evidenzia una elevata capacità di attivare la trascrizione.

BIBLIOGRAFIA

- Beltran A et al., 2006. *ASSAY and Drug Dev Technol* 4: 317-331
- Bogdanovich S et al., 2004. *J Mol Med.* 82(2):102-15
- Corbi N et al., 2000. *Gene Ther* 7:1076-83
- Corbi N et al., 2004. *Biochem Cell Biol* 82(4):428-36
- Davies KE et al., 1983. *Nucleic Acids Res* Apr 25;11(8):2303-12

- Khurana TS, Davies KE. 2003. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:379-90
- Libri V, et al., 2004. *FEBS Lett.* 560 (1-3): 75-80
- Love DR et al., 1989. *Nature.* May 4;339(6219):55-8
- Mattei E, et al., 2007. *PLoS ONE* 22;2(1):e774
- Matsumura K et al., 1992. *Nature* 10;360(6404):588-91
- Miura P, Jasmin BJ. 2006. *Trends Mol Med.* 3:122-9
- Onori A et al., 2007. *Biochem Cell Biol,* (3)358-365
- Rafael JA et al., 1998. *Nat. Genet.* 19:79-82
- Tinsley JM et al., 1996. *Nature* 384:349-53
- Voisin V, de la Porte S.2004. *Therapeutic Int Rev Cytol.*240:1-30

RIVENDICAZIONI

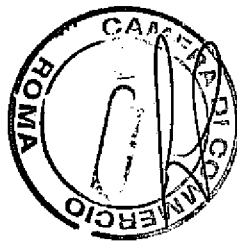
1. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica che codifica per una proteina caratterizzata da avere almeno quattro domini zinc finger e di modulare la trascrizione del gene dell'utrofina.
2. Acido nucleico secondo la rivendicazione 1 in cui la proteina comprende sei domini zinc finger.
3. Acido nucleico secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui i domini zinc finger sono selezionati fra: SEQ ID 1, SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 4, SEQ ID 5 o SEQ ID 6.
4. Acido nucleico secondo la rivendicazione 3 in cui i domini zinc finger sono SEQ ID 1, SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 4, SEQ ID 5 e SEQ ID 6.
5. Acido nucleico secondo una delle rivendicazioni da 2 a 4 codificante per una proteina avente essenzialmente la SEQ ID 12.
6. Acido nucleico secondo la rivendicazione 1 codificante per la proteina avente essenzialmente la SEQ ID 8 o SEQ ID 10.
7. Acido nucleico secondo la rivendicazione 1 avente essenzialmente la SEQ ID 11.
8. Acido nucleico secondo la rivendicazione 1 avente essenzialmente la SEQ ID 7 o SEQ ID 9.
9. Vettore d'espressione comprendente l'acido nucleico secondo una delle rivendicazioni precedenti.
10. Cellula ospite ricombinante comprendente il vettore secondo la rivendicazione 9.
11. Proteina caratterizzata da avere almeno quattro domini zinc finger e di modulare la trascrizione del gene dell'utrofina.

12. Proteina secondo la rivendicazione 9 in grado di legare una sequenza nucleotidica compresa nel promotore del gene dell'utrofina.
13. Proteina secondo la rivendicazione 12 in cui la sequenza nucleotidica comprende essenzialmente la sequenza: GCT GCT GCG GGC TGG GAG.
14. Proteina secondo una delle rivendicazioni da 11 a 13 avente essenzialmente la SEQ ID 12.
15. Proteina secondo una delle rivendicazioni da 11 a 13 avente essenzialmente la SEQ ID 8 o SEQ ID 10.
16. Uso della proteina secondo una delle rivendicazioni da 11 a 15 per la preparazione di un medicamento per una patologia muscolare.
17. Uso secondo la rivendicazione 16 in cui la patologia muscolare è la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) o di Becker (BMD).

p.p. Consiglio Nazionale delle Ricerche

De Simone & Partners SpA (OC)

De Simone



A

utrophin promoter "A"

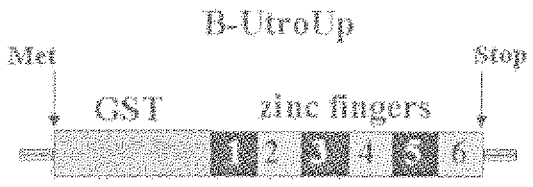
AGCTTCTGGCTTCCAGCACCCACGACT 372
 GGTTCCGGGATTCCTCCACCCGCSACC 399
 N-Box
 GCACCGAGCCCGCTGGCTGGCGCTGGG 426
 UtroUp
 AGGGCGCCTAGCCCTACCCCTGATTGA 453
 CCGCCCGCGCCCTCAGGTGACCCGAGG 480
 E-Box
 CGCCACCTTCTGGGAGCCCGCCCGCG 507
 GTGGCTTCCAGGCGCGGGCCAGGACCG 534
 AACCCGGAGCCCGAGGGGACTGCTCTC 561
 CCGGGAGAGACAAAGTTGCCCGGCTG 588
 GGGCCCGGGGCGCCCGGAGCCGGGAGA 615
 CGGCGGGTCCGACCTCGGGATCCAGG 642
 Sp1
 GTTCCGAGGTTGGCTGATTCGTGCTGG 669
 GAGACCGGAGCCCGCTACCCGGGGTGG 696
 GGGCGGAGCCAGCAGCGCCCGCCACCTC 723
 Sp1
 GTTCTCCAAACAAGGGCCCGG, 744

B

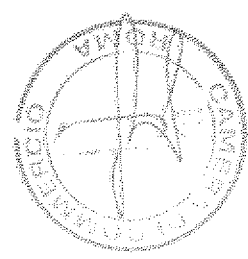
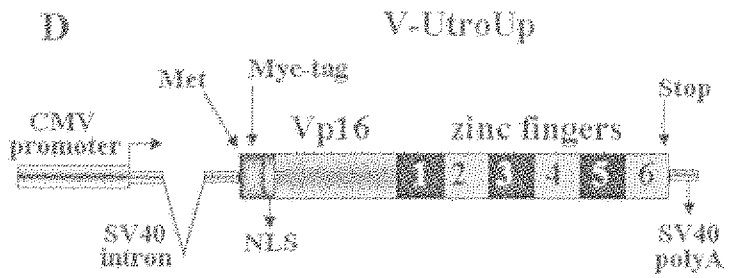
"UtroUp" zinc finger domains

I LDRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRRHIRIHTG
 SEQ ID 1
 QKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHNRTHTGKPF
 SEQ ID 2
 ACDICGRKFADPGHLVRRHNRHTGKPFACPV
 SEQ ID 3
 ESCDRRF SRSELTTRHIRIHTGQKPFQCRICM
 SEQ ID 4
 RNFSSRDVLRHNRHNRHTGKPFACDICGRKFA
 SEQ ID 5
 SRDVLRRHNRHNRHNRHTGKPFACDICGRKFA
 SEQ ID 6

C

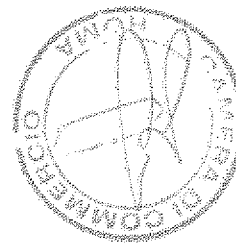
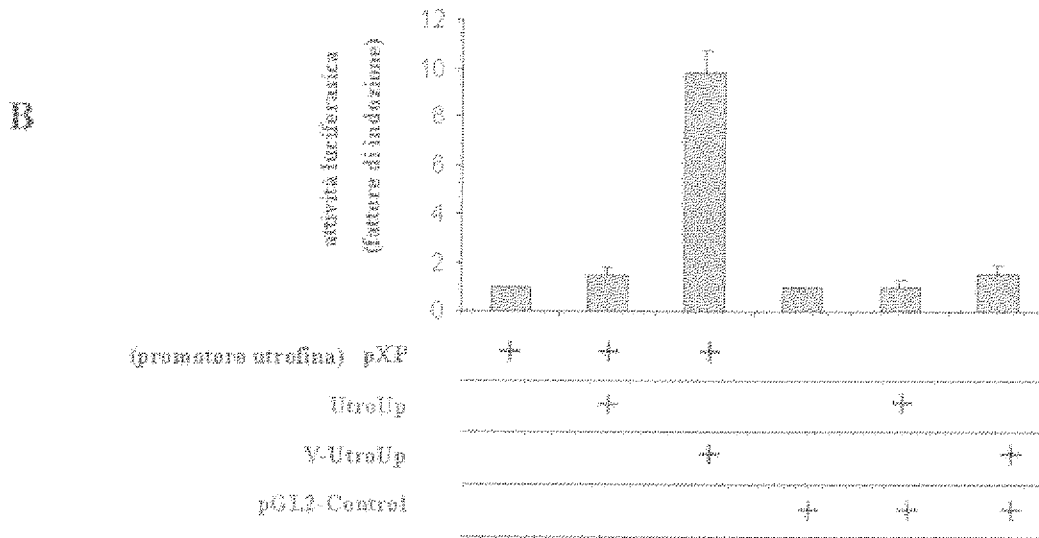
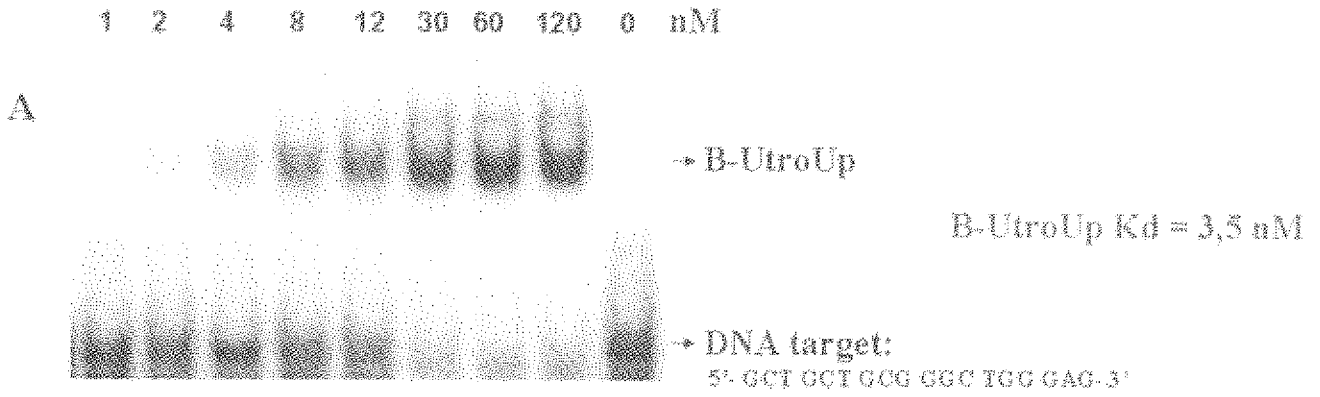


D



Olga Capasso
 UN MANDATARIO
 per lei e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)

Fig. 1



Olga Capasso
 UN MANDATARIO
 per sé e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)

Fig. 2