

UNIVERSITA' degli STUDI del PIEMONTE  
ORIENTALE  
"Amedeo Avogadro"

DOTTORATO di RICERCA in  
MEDICINA MOLECOLARE  
XXI CICLO

Relazione per l'anno 2005/2006

**PATOGENESI**  
**dell'ANEMIA di DIAMOND-BLACKFAN**

Responsabile Scientifico:

Prof. UMBERTO DIANZANI

Dottoranda:

Dott.<sup>ssa</sup> MARTA ARMIRAGLIO

# INTRODUZIONE

## *L'anemia di Diamond-Blackfan*

L'anemia di Diamond-Blackfan (DBA, MIM 105650) è una rara ed eterogenea aplasia congenita pura della serie eritroide, che presenta un'incidenza in Europa pari a 5-7 casi per milione di nati vivi.

La maggioranza dei casi è sporadica, ma il 20% circa dei pazienti presenta una storia familiare positiva relativa alla patologia, con trasmissione generalmente autosomica dominante; una ereditarietà di tipo autosomico recessivo si può supporre laddove esista consanguineità tra i genitori degli individui affetti. La penetranza è incompleta e l'espressività variabile, come dimostrato dall'estrema variabilità fenotipica (Campagnoli *et al.*, 2004). Sebbene la maggioranza dei pazienti sia di razza caucasica, tutte le etnie ne sono parimenti colpite. Il rapporto dei malati tra i due sessi di circa 1:1 permette di escludere un'ereditarietà di tipo diagenico (Ramenghi *et al.*, 1999).

La principale caratteristica della DBA è l'anemia, normocromica e macrocitica, evidente già alla nascita nel 25% dei casi e comunque diagnosticata entro il primo anno di vita nella quasi totalità dei pazienti; le altre linee ematopoietiche sono invece normali. Il midollo osseo si presenta normocellulare, ma con un difetto selettivo a livello dei precursori eritroidi, causato presumibilmente dall'incapacità dei loro progenitori di differenziare. A causa del difetto a livello dell'eritropoiesi i pazienti DBA mostrano aumentati livelli sierici di acido folico, vitamina B<sub>12</sub>, eritropoietina (EPO) e adenosina deaminasi eritrocitaria (eADA) (Dianzani *et al.*, 1996).

In circa un terzo dei soggetti affetti dalla patologia sono inoltre riscontrabili malformazioni congenite, in particolare dismorfismi cranio-facciali, anomalie all'arto superiore, a carico del cuore e dell'apparato uro-genitale (Lipton *et al.*, 2001).

Il 75% dei pazienti risulta responsivo alla terapia steroidea, che costituisce quindi il trattamento di prima scelta per la cura della DBA. La risposta alla terapia è però molto variabile, sia da soggetto a soggetto, sia nello stesso paziente in tempi diversi: sono stati infatti registrati casi di remissione completa, così come sviluppo di steroideo-resistenza. Nei casi in cui il trattamento con steroidi non è applicabile l'alternativa è rappresentata dalla terapia trasfusionale cronica associata a ferro-chelazione, sebbene per i pazienti che debbano seguire tale via terapeutica l'aspettativa di vita sia drasticamente ridotta. Successi sono stati ottenuti anche con il trapianto di midollo osseo (BMT) o di cellule staminali (SCT), a cui comunque è associato un tasso di mortalità in conseguenza all'intervento

(Freedman, 2000).

Antecedentemente alla scoperta del primo gene DBA si riteneva probabile il coinvolgimento di fattori di crescita eritroidi nell'insorgenza della patologia. Esperimenti di stimolazione di cellule di pazienti con EPO, IL-3, IL-6 e GM-CSF non hanno però sortito esiti positivi, né utilizzando questi fattori singolarmente né in combinazione tra loro; la stimolazione con SCF (*stem cell factor*) in associazione con IL-3 ed EPO aumenta invece significativamente il numero dei precursori eritroidi in coltura (Dianzani *et al.*, 1997).

La svolta nello studio della DBA risale al 1997, quando venne identificata in una paziente una traslocazione reciproca bilanciata t(X;19)(p21;q13). Ciò ha radicalmente cambiato l'approccio all'eziopatogenesi della DBA, volgendo l'attenzione su geni scelti in base alla loro localizzazione cromosomica piuttosto che in base alla funzione fisiologica e permettendo di ipotizzare il coinvolgimento di un *locus* sul braccio lungo del cromosoma 19; è stato possibile escludere il coinvolgimento del cromosoma X in quanto, come precedentemente puntualizzato, il rapporto dei malati tra i due sessi è di circa 1:1 (Gustavsson *et al.*, 1997).

Successive analisi di *linkage* su famiglie *multiplex* hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa della patologia con il *locus* 19q13.2. Nel 1999, grazie al clonaggio del *breakpoint* della traslocazione, è stato identificato il primo gene DBA, *RPS19* (MIM 603474). Il gene codifica per una proteina di 16 kDa, componente strutturale della subunità minore del ribosoma, e si estende per 11 kb, comprendendo sei esoni, di cui il primo è trascritto e non tradotto. Successive analisi hanno riscontrato che circa un quarto dei pazienti presenta mutazioni in *RPS19*, sempre su un singolo allele (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

Successive analisi di *linkage* hanno identificato un secondo *locus* DBA (8p23.3-p22, in cui è ancora in corso l'analisi dei geni candidati) e hanno inoltre dimostrato che alcuni pazienti sono inconsistenti con il *linkage* ai due *loci* noti, permettendo così di postulare la presenza di un ulteriore *locus* DBA (Gazda *et al.*, 2001).

Le mutazioni in *RPS19* riscontrate nei pazienti si presentano molto eterogenee per tipo (*missense*, *nonsense*, inserzioni, delezioni e mutazioni ai siti di *splicing*) e localizzazione. Undici di queste sono state identificate in più di un paziente e un *hot-spot* di mutazioni *missense* è stato identificato tra i codoni 52 e 62; questa è una regione evolutivamente molto conservata e si ritiene quindi che possa avere un ruolo fondamentale nella funzione della proteina (Campagnoli *et al.*, 2004).

Sebbene l'identificazione del primo gene coinvolto nella patologia abbia rappresentato una significativa svolta nello studio dei meccanismi molecolari alla base della DBA, il ruolo patogenetico di RPS19 non è tuttora noto.

Il meccanismo alla base dell'insorgenza dell'anemia di Diamond-Blackfan, almeno nei pazienti portatori di mutazioni in *RPS19*, è l'aploinsufficienza; è stato dimostrato che tale condizione possa manifestarsi mediante NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay), un meccanismo di degradazione di quegli mRNA che portano codoni di stop in sede anomala (Chatr-aryamontri *et al.*, 2004); è stato inoltre postulato che tale condizione possa essere aggravata, almeno per alcuni mutanti, da un meccanismo di dominante negativo, quindi che la proteina mutata interferisca con la funzione della proteina prodotta dall'allele selvatico (Hamaguchi *et al.*, 2002).

Per determinare la localizzazione subcellulare di RPS19 sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza in cellule Cos-7. La proteina è stata identificata nel nucleo, dove colocalizza con la nucleolina, la più abbondante tra le proteine nucleolari; uno *staining* più debole e diffuso è presente anche a livello citoplasmatico. Per determinare la presenza di eventuali segnali di localizzazione nucleolari (NoS) sono stati preparati dei mutanti delezionali, che sono stati trasfettati in cellule Cos-7 e la cui localizzazione è stata analizzata mediante immunofluorescenza. Questi esperimenti hanno permesso di dimostrare che RPS19 possiede due regioni, M1-V15 e G120-N142, necessarie ma non sufficienti per l'importo della proteina nel nucleolo; il dato è avvalorato anche dal fatto che due mutanti, V15F e G127E, che portano quindi mutazioni all'interno delle ipotetiche sequenze NoS, non sono in grado di traslocare nel nucleolo, a differenza di altri mutanti *missense*. Analisi condotte mediante western blot hanno inoltre evidenziato una drammatica riduzione del livello proteico dei due mutanti che mostrano un'anomala localizzazione subcellulare, mentre il fenomeno non era osservato per altri mutanti; è stato perciò ipotizzato che le proteine incapaci di localizzarsi correttamente all'interno della cellula vadano incontro ad una rapida degradazione (Da Costa *et al.*, 2003).

### **RPS19 e la DBA**

Negli eucarioti la biogenesi del ribosoma avviene nel nucleolo. Il processo ha inizio con la sintesi, mediante due diverse RNA polimerasi, dei pre-rRNA 5S e 35S e richiede l'importo delle proteine ribosomali dal citoplasma. I componenti maturi a RNA (5.8S, 25S/28S e 5S rRNA per quanto riguarda la subunità 60S e 18S per la subunità minore) sono rilasciati dai pre-rRNA secondo un *pathway* complesso che coinvolge digestioni sia endo che

esonucleolitiche. Contemporaneamente i pre-rRNA sono ampiamente modificati e legati alle proteine ribosomali prima che le subunità pre-40S e pre-60S vengano esportate, separatamente, nel citoplasma. Il complesso pre-40S, infatti, è ulteriormente processato nel citoplasma, mentre la maturazione del pre-60S continua nel nucleo. Inoltre, la formazione del ribosoma eucariotico non richiede soltanto il coordinamento degli eventi di processamento e assemblaggio, ma anche l'ordine spazio-temporale di questi eventi che hanno inizio nel nucleolo e terminano nel citoplasma, permettendo di postulare la presenza di diversi fattori trans-agenti in grado di determinare l'esattezza del processo di assemblaggio e di esporto delle strutture pre-ribosomali attraverso i pori nucleari. Da saggi *in vitro* di assemblaggio del ribosoma batterico è stato possibile comprendere che l'assemblamento delle subunità ribosomali dalle singole proteine e dagli rRNA è un processo autoassemblante che richiede solo una iniziale energia di attivazione (Nierhaus, 1991). *In vivo*, sono necessari fattori addizionali che diminuiscano l'energia di attivazione delle reazioni limitanti sia nel complesso coinvolto nel *folding* dell'RNA sia nel riarrangiamento delle interazioni RNA-proteine. Non è sorprendente che in *E. coli* sono state scoperte soltanto poche di tali proteine accessorie in grado di idrolizzare l'ATP, mentre negli eucarioti la situazione è molto più complessa e la maturazione degli rRNA richiede un gran numero di fattori pre-ribosomali (Fromont-Racine *et al.*, 2003).

La DBA è la prima patologia umana nota causata da mutazioni in una proteina ribosomale e per chiarire il collegamento tra RPS19 e la DBA sono state avanzate due ipotesi patogenetiche indipendenti, non mutuamente esclusive.

La prima non attribuisce nessuna specifica proprietà a RPS19, ma sostiene che il nesso tra la proteina ribosomale e l'anemia di Diamond-Blackfan sia da ricercare nell'ambito del complesso processo di assemblaggio dei ribosomi. Infatti, nei mammiferi, le proteine ribosomali sono espresse in quantità differenti l'una rispetto all'altra in maniera tessuto-specifica e l'aploinsufficienza per una particolare proteina ribosomale fa in modo che questa risulti limitante per la corretta sintesi del ribosoma in un tessuto piuttosto che in un altro. Inoltre, si ritiene che polimorfismi in fattori che controllano l'espressione del gene di una particolare proteina ribosomale possano alterare la sua espressione in modo da poter modulare su base individuale la gravità del difetto genetico. Secondo questa ipotesi, il sito principale in cui l'aploinsufficienza di RPS19 diventa limitante per l'assemblaggio del ribosoma è localizzato nel midollo osseo, in particolar modo a livello dei progenitori eritroidi; questo porterebbe quindi alle caratteristiche cliniche proprie della DBA. In questo contesto è possibile inserire l'eterogeneità del fenotipo clinico osservato, che in alcuni

pazienti è osservabile anche in altri tessuti e non solamente in quello emopoietico; ciò potrebbe presumibilmente riflettere i polimorfismi nei fattori che regolano l'espressione di RPS19, che renderebbero questa proteina ribosomale limitante per la sintesi del ribosoma in specifici tessuti. Ipotizzando inoltre che tali polimorfismi siano in grado di aumentare l'espressione di RPS19 sarebbe possibile spiegare come alcuni individui portatori di mutazioni che inattivano RPS19 possano comunque avere profili ematologici normali (Ellis e Massey, 2006).

Per contro, la seconda ipotesi asserisce che mutazioni in *RPS19* portino scompensi in funzioni extra-ribosomali della proteina. A sostegno di tale tesi è possibile portare evidenze del fatto che RPS19 possieda anche funzioni indipendenti dal suo ruolo all'interno del ribosoma: infatti, RPS19 libero è in grado di interagire con FGF-2, sebbene il ruolo biologico dell'interazione non sia noto (Soulet *et al.*, 2001) e dimeri di RPS19 hanno una funzione chemiotattica nei confronti dei monociti (Shibuya *et al.*, 2001). E' stato inoltre dimostrato che anche altre proteine ribosomali possiedono ruoli extra-ribosomali: ad esempio, RPL13a e RPL26 sono coinvolte nella regolazione traduzionale di specifici trascritti, rispettivamente la ceruloplasmina e p53 (Mazumder *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2005); alla luce di ciò è quindi ipotizzabile un ruolo analogo per RPS19.

E' inoltre da sottolineare che recentemente è stato dimostrato, nel lievito, un coinvolgimento dell'ortologo di RPS19 nel processamento degli rRNA (Léger-Silvestre *et al.*, 2005); successivi esperimenti hanno confermato il medesimo ruolo per la proteina anche in linee cellulari ottenute da pazienti DBA (Flygare *et al.*, 2006).

## RISULTATI PRECEDENTI

Nel nostro laboratorio è stato deciso di approfondire la teoria secondo la quale la DBA possa essere causata da un difetto in funzioni extra-ribosomali specifiche di RPS19, ad oggi sconosciute. Si è quindi cercato di chiarire il ruolo della proteina identificando i suoi interattori; in questo modo sarebbe infatti possibile identificare i *pathway* in cui RPS19 è coinvolta e collegare quindi le mutazioni rinvenute nei pazienti con lo sviluppo della patologia.

La ricerca degli interattori di RPS19 è stata effettuata in primo luogo mediante l'utilizzo di una tecnica genetica, il doppio ibrido nel lievito. Lo *screening* ha portato all'identificazione di una serina/treonina chinasi, PIM-1, espressa ad alti livelli nei tessuti emopoietici e la cui espressione è regolata da fattori di trascrizione eritroidi; allo stato dell'arte, PIM-1 è l'unico anello di congiunzione tra RPS19 e l'emopoiesi. Esperimenti successivi hanno dimostrato che l'interazione è mantenuta in cellule di mammifero, sia mediante saggi *in vitro* che mediante immunoprecipitazione. Inoltre, è stato dimostrato che PIM-1 localizza sui polisomi. Esperimenti svolti su alcuni mutanti *missense* della proteina ribosomale conservano la capacità di interagire con la serina/treonina chinasi, ma con diversa affinità di legame; le conseguenze di tali variazioni sono ancora motivo di studio (Chiocchetti *et al.*, 2005).

Per caratterizzare ulteriormente la relazione esistente tra RPS19 e PIM-1 è stato deciso di mappare il dominio di interazione sulle due proteine. Per fare questo sono stati preparati dei mutanti delezionali di RPS19 fusi con l'epitopo Flag. Il disegno sperimentale prevedeva la trasfezione di questi costrutti in cellule 293T e la preparazione di un estratto proteico totale, che sarebbe stato utilizzato in un esperimento di purificazione per affinità mediante l'utilizzo della proteina ricombinante GST-PIM-1. Questa tecnica non è risultata adeguata al nostro scopo, in quanto alcuni mutanti non potevano essere rilevati nel lisato cellulare, analizzato mediante un western blot con un anticorpo anti-flag. E' stato quindi ipotizzato che queste proteine, forse per le loro ridotte dimensioni, andassero incontro a degradazione.

Si è quindi deciso di intraprendere una nuova strada, sfruttando una nuova tecnica, la PCA (Protein Fragment Complementation Assay), messa a punto dal Prof. Daniele Sblattero (Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara), che verrà in seguito descritta.

Parallelamente è proseguita la ricerca di interattori sia proteici che a RNA di RPS19,

utilizzando tecniche ad alta resa. Precedentemente al mio arrivo in laboratorio è stato preparato un costrutto codificante per la proteina di fusione GST-RPS19, che è stata fatta esprimere in un sistema batterico e purificata mediante cromatografia di affinità con una resina *GST-binding*. Tale resina coniugata alla proteina ricombinante è stata in seguito utilizzata in un *pulldown* volto a purificare gli interattori di RPS19 da un estratto totale di cellule K-562. Le proteine, dopo l'eluizione dalla resina GST-RPS19 e dal controllo negativo GST, sono state separate mediante SDS/PAGE e analizzate mediante spettrometria di massa ( $\mu$ LC-MS/MS). Un'aliquota dell'eluato è stata analizzata mediante western blot utilizzando un anticorpo anti-PIM-1 per confermare l'esito positivo del *pulldown*.

Lo stesso esperimento, svolto in presenza di inibitori delle RNasi e seguito dall'estrazione dell'RNA totale, è stato utilizzato per identificare gli mRNA mediante un'analisi con *microarray*.

L'analisi spettrometrica è stata svolta nel laboratorio della Prof.<sup>ssa</sup> Margherita Ruoppolo (Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università "Federico II", Napoli). La tabella 1 mostra la lista completa dei 159 nuovi interattori di RPS19 identificati, che sono stati classificati in base alle categorie di Gene Ontology: funzione, localizzazione subcellulare, processi cellulari in cui la proteina è coinvolta (figura 1).

L'analisi mediante *microarray*, di cui siamo in attesa dei risultati, è stata invece svolta nel laboratorio del Prof. Stefano Gustincich (International School for Advanced Studies I.S.A.S.-S.I.S.S.A., Trieste).

**Tabella 1.** Identificazione dell'interattoma di RPS19 mediante spettrometria di massa in tandem.

GENE	PROTEIN	YEAST GENE
<b><u>NTPase activity</u></b>		
GTPBP4	GTP/binding protein NGB (G protein binding CRFG)	NOG1
PSMC5	proteasome 26S ATPase subunit 5	RPT6
PSMC6	proteasome 26S ATPase subunit 6	RPT4
RAB11B	RAB11B member RAS oncogene family	YPT31



XAB1	XPA binding protein 1, GTPase	NPA3
<b><u>Hydrolase/helicase activity</u></b>		
DDX5	Growth regulated nuclear 68 protein (DEAD box polypeptide 5)	DBP2
DDX17	DDX17 protein	
DDX18	RNA helicase (DEAD box polypeptide 18)	HAS1
DDX21	RNA helicase II / Gu protein (DEAD box polypeptide 21)	
DDX24	DEAD box polypeptide 24	MAK5
DDX3X	dead box , X isoform (DEAD box polypeptide 3)	
DDX41	DEAD box protein abstrakt	
DDX50	DEAD box polypeptide 50 (Nucleolar protein GU2)	
DDX54	ATP/dependent RNA helicase (DEAD box polypeptide 54)	DBP10
DHX9	RNA helicase A (DEAH box polypep. 9)	
DHX15	DEAH box polypeptide 15	PRP43
DHX36	DEAH box polypeptide 36	
MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	MCM2
MCM6	p105MCM (MCM6 minichromosome maintenance deficient 6)	MCM6
MCM7	p85MCM protein (MCM7 minichromosome maintenance deficient 7)	CDC47

RUVBL2	RuvB-like 2	RVB2
SKIV2L2	superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S. cerevisiae)	MTR4
SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	ISW2
XRN2	Dhm1-like protein (5'-3' exoribonuclease 2)	RAT1
<b><u>Isomerase activity</u></b>		
DKC1	Cbf5p homolog (dyskerin)	CBF5
PPIH	peptidyl prolyl isomerase H	
<b><u>Kinase activity</u></b>		
CSNK2A1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	
SRP72	signal recognition particle 72	SRP72
PRKCQ	delta 2 isopentenyl pyrophosphate transferase like protein (protein kinase C, theta)	
<b><u>Splicing factor activity</u></b>		
SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	HSH155
SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa	CUS1
SF3B3	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	RSE1
SFRS9	splicing factor Arg/Ser 9	
SFRS10	splicing factor arg/ser rich 10	
<b><u>Structural constituent of Ribosome</u></b>		
RPL10A	60S ribosomal protein L10a	RPL1B
RPL14	60S ribosomal protein L14	RPL4B

RPL24	60S ribosomal protein L24	RPL24A
RPL27A	60S ribosomal protein L27a	RPL28
RPL3	60S ribosomal protein L3	RPL3
RPL4	60S ribosomal protein L4	RPL4B
RPL6	60S ribosomal protein L6	RPL6B
RPL7	60S ribosomal protein L7	
RPL7A	60S ribosomal protein L7a	RPL8B
RPL8	60S ribosomal protein L8	RPL2A
RPL9	60S ribosomal protein L9	RPL9B
RPLP0	60S ribosomal protein P0	RPP0
RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1 isoform 1	RPP1A
RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	RPP2B
RPS10	40S ribosomal protein S10	RPS10A
RPS14	40S ribosomal protein S14	RPS14B
RPS16	40S ribosomal protein S16	RPS16A
RPS2	40S ribosomal protein S2	RPS2
RPS23	40S ribosomal protein S23	RPS23A
RPS24	40S ribosomal protein S24	RPS24B
RPS26	40S ribosomal protein S26	RPS26B
RPS3	40S ribosomal protein S3	RPS3
RPS4X	40S ribosomal protein S4, X-linked	RPS4A

RPS5	40S ribosomal protein S5	RPS5
RPS6	40S ribosomal protein S6	RPS6B
RPS7	40S ribosomal protein S7	RPS7A
RPS8	40S ribosomal protein S8	RPS8B
RPSA	ribosomal protein SA	RPS0A
RSL1D1	PBK1 protein	

**Transcription factor**

BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	
HNRPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D2	
ILF2	interleukin enhancer binding factor 2	
ILF3	nuclear factor associated with dsRNA NFAR-2	
NKRF	transcription factor NRF	
PURA	purine-rich element binding protein A	
TAF15	TLS protein (TBP-associated factor 15)	NPL3
TRIM28	tripartite motif-containing 28	
UBTF	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	
XPO5	exportin 5	MSN5
YBX1	DNA binding protein B	

**Transferase activity**

FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	ERG9
-------	--	------

FTSJ3	FtsJ homolog 3 (E. coli)	SPB1
NAT10	N-acetyltransferase 10 (FLJ10774)	
NOL1	proliferating cell nuclear protein p120 (NOL protein 1)	NOP2
ZC3HAV1	Zinc finger CCCH type, antiviral 1	
<b><u>Transporter activity</u></b>		
COPA	coatamer protein complex, subunit alpha	COP1
COPB2	coatamer protein complex, subunit beta 2	SEC27
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1
IPO4	importin 4	KAP123
IPO7	importin 7	
NPEPL1	aminopeptidase like 1	
STAU1	Staufen protein	
SSR4	signal sequence receptor delta	
XPO1	exportin 1 (CRM1 homolog yeast)	CRM1
<b><u>DNA/RNA/protein binding capacity</u></b>		
AATF	Ded protein (Apoptosis antagonizing transcription factor )	BFR2
ACTR1B	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, cetractin beta	
C1orf77	DKFZP547E1010 protein	
CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	CCT2

CCT8	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	CCT8
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein zeta	MAK21
CENPC1	centromere protein C 1	
COPG	coatomer protein complex, subunit gamma 1	SEC21
DHX30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box	
DNAJC9	DnaJ homolog, subfamily C, member 9	
FBL	fibrillarin, U3 small nucleolar interacting protein 1	NOP1
FUSIP1	FUS interacting protein (serine/arginine rich) 1	
GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	
HIST1H1C	Histone H1b	
HIST1H1D	Histone H1 member 3	
HIST1H2AK	H2A histone family	
HIST1H2BL	H2B histone family, member C	
HIST1H2BO	Histone 1, H2bo	
HIST2H4	Histone 2 H4	
HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	
HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	
HNRPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	

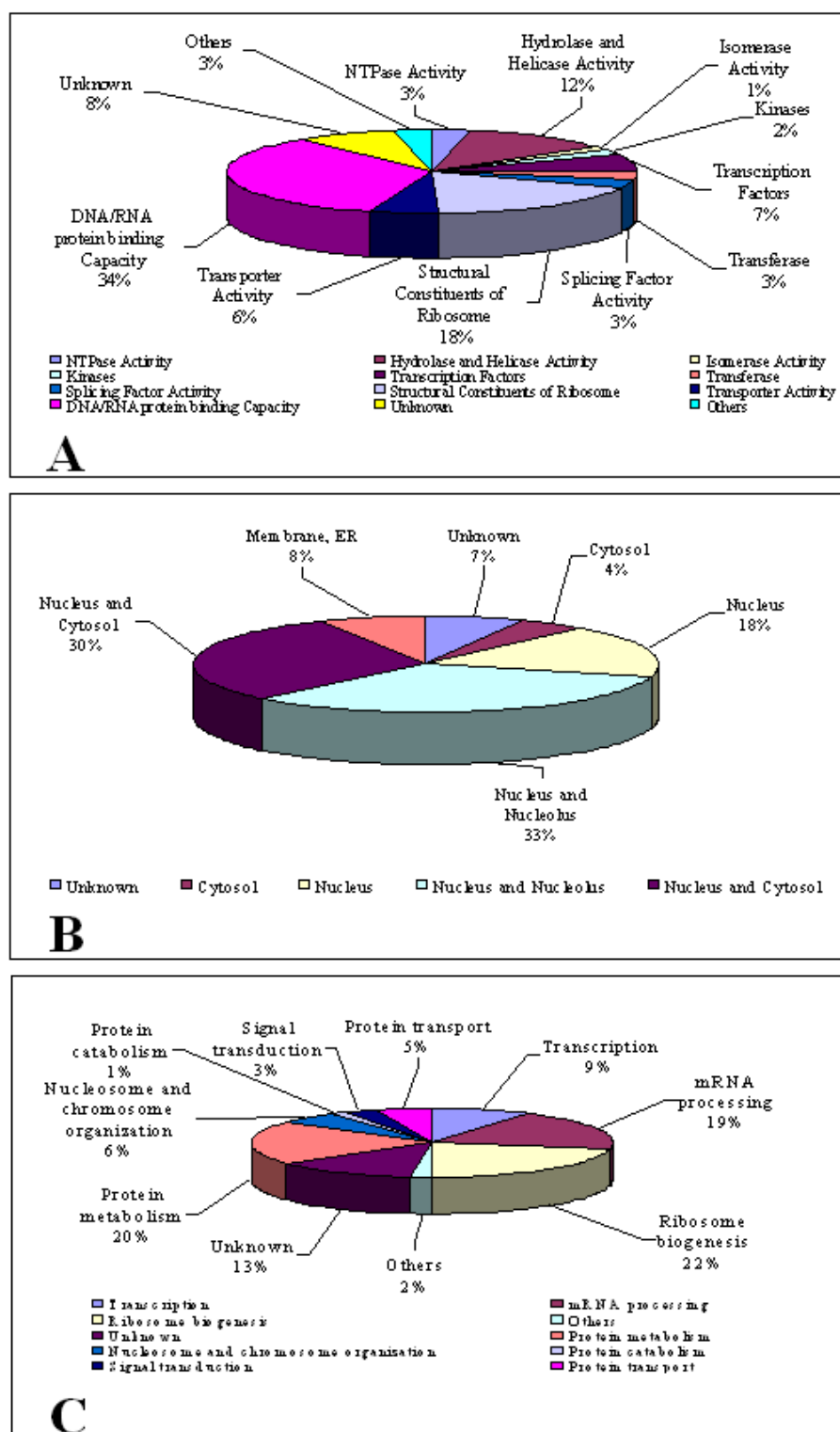
HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (A+U-rich element RNA binding factor)	
HNRPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	
HNRPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	
HNRPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	
HNRPUL2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	
HP1BP3	HP1-BP74	
IGF2BP1	IGF-II mRNA-binding protein 1	
IGF2BP3	Koc1 (IGF-II mRNA-binding protein 3)	
IMP3	U3 snoRNP protein 3 homolog	IMP3
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	TIF6
LYAR	hypothetical protein FLJ20425	YCR087C-A
NCL	Nucleolin	NSR1
NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein Nip7 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	NIP7
NOLA1	nucleolar protein family A member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)	GAR1
NOL5A	hNop56	SIK1
PABPC3	poly(A) binding protein	
PAK1IP1	PAK/PLC-interacting protein 1	MAK11
PNN	pinin, desmosome associated protein	

PPP2R1A	PPP2R1A (Ser/Thr protein phosphatase 2A)	
RAB1B	RAB1B member RAS oncogene family	
RAP1B	RAP1B member RAS oncogene family	RSR1
RBM19	RNA binding motif 19	MRD1
RBMX	RNA binding motif protein, X-linked (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G)	
RNPC2	RNA-binding region containing protein 2	
SART3	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells 3	
SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' (U2 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A')	
SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	SMX2
SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	
SRP68	signal recognition particle 68	SRP68
SURF6	surfeit protein 6	RRP14
SYNCRIP	NS1 associated protein	
<b><u>Other function</u></b>		
<b><i>Dehydrogenase activity</i></b>		
DPYD	dehydropyrimidine dehydrogenase	GLT1
<b><i>Ligase activity</i></b>		
MARS	methionine-tRNA synthetase	MES1
<b><i>Peptidase activity</i></b>		



SEC11L1	signal peptidase complex 18kDa	SEC11
 <i>Receptor activity</i>		
REEP6	receptor accessory protein 6	
 <i>Translation elongation factor activity</i>		
EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	
 <b><u>Unknown function</u></b>		
EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2	EBP2
GPIAP1	GPI-anchored protein p137 precursor	
HDCMA18P	hypothetical protein DKFZp564K112.1 (HDCMA18P)	
LOC389217	similar to SET protein (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (Template activating factor I) (TAF-I) (HLA-DR associated protein II) (PHAPII) (Inhibitor of granzyme A-activated DNase) (IGAAD)	
MGC3731	hypothetical protein LOC79159	
NOC2L	nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae; hypothetical protein DKFZp564C186.1)	NOC2
NOC3L	nucleolar complex associated 3 homolog (S. cerevisiae)	NOC3
NOL10	nucleolar protein 10 (hypothetical protein FLJ14075)	ENP2
NOLA3	nucleolar protein family A, member 3	NOP10
PES1	Pescadillo homolog 1 containing BRCT domain	NOP7

RBM12B	RNA binding motif protein 12B
RP13-36C9.1	cancer/testis antigen CT45-2
SYNGR2	synaptogyrin 2



**Figura 1.** La figura mostra la classificazione degli interattori identificati in base alle tre categorie di Gene Ontology: funzione (A), localizzazione subcellulare (B), processi cellulari in cui la proteina è coinvolta (C).

# MATERIALI e METODI

## PCA – Protein Fragment Complementation Assay

La  $\beta$ -lattamasi è un enzima batterico in grado di scindere l'anello  $\beta$ -lattamico dell'ampicillina e quindi di conferire la resistenza a tale antibiotico ai batteri che la posseggono. Sono stati identificati una coppia di frammenti di questa proteina,  $\alpha$ -197 e  $\omega$ -198, che, se fusi con due eliche che formano un *leucine zipper*, sono in grado di complementare tra loro. Per capire come abbassare il rumore di fondo è stata screenata una libreria di tripeptidi *random* clonati nel *breakpoint* dell'enzima; mediante ciò è stato dimostrato che Asn/Gly/Arg (NGR), quando clonato a valle della porzione  $\alpha$ , aumenta di molto l'attività dell'enzima (Galarneau *et al.*, 2002; Wehrman *et al.*, 2002).

Partendo da queste considerazioni è stato pensato che si potrebbero costruire degli opportuni vettori all'interno dei quali clonare due proteine di interesse in grado di interagire tra loro, nel nostro caso RPS19 e PIM-1. Le proteine selvatiche costituirebbero il controllo positivo, dimostrando il buon funzionamento del sistema nel nostro caso specifico; se questo esperimento preliminare darà un riscontro positivo, i due cDNA verranno sonicati e ridotti in frammenti di lunghezza compresa tra 100 e 200 bp; il clonaggio degli interattori nell'opportuno vettore permetterà la costruzione di una mini libreria, che potrà essere screenata con RPS19 fuso con la regione  $\alpha$  della  $\beta$ -lattamasi nel caso la libreria sia stata costruita con frammenti del cDNA di PIM-1, mentre sarà utilizzato  $\omega$ -PIM-1 nel caso della libreria costituita da frammenti di RPS19. In tal modo sarebbe possibile mappare il dominio di interazione sulle due proteine.

## Costruzione dei vettori di espressione batterica

I vettori pALFA e pOMEGA, all'interno del quale sono stati clonati i cDNA di RPS19, PIM-1 e PIM-1 *kinase-dead* (PIM-1-KD), sono stati costruiti nel laboratorio del Prof. Sblattero e presentano alcune caratteristiche peculiari.

- pALFA: codifica per la regione  $\alpha$  della  $\beta$ -lattamasi, comprendente i primi 197 aa, di cui i 23 all'N-terminale costituiscono il peptide segnale deputato alla localizzazione dell'enzima nello spazio periplasmatico. A valle di  $\alpha$ , che porta una mutazione M182T, che aumenta di molto l'attività dell'enzima, troviamo due importanti regioni: un tripeptide NGR, che fa aumentare la capacità di complementazione tra i due peptidi, e il linker Gly/Ser, che conferisce al costrutto la flessibilità necessaria per il corretto instaurarsi dell'interazione tra le due proteine clonate nell'MCS.

Altre caratteristiche da sottolineare sono una coda di sei istidine a valle del sito multiplo di clonaggio ed un gene in grado di conferire resistenza alla kanamicina.

- pOMEGA: il vettore porta un peptide segnale per il trasporto della proteina di fusione da esso codificata nel periplasma, a valle del quale troviamo, nell'ordine, il MCS, il tag SV5 e la regione  $\omega$  della  $\beta$ -lattamasi, comprendente gli aa 198-288. E' inoltre presente una resistenza al cloramfenicolo.

Sono stati costruiti opportuni *primer* che hanno permesso di amplificare i cDNA di RPS19, PIM-1 e PIM-1 KD, inserendo contemporaneamente in questi frammenti i siti di taglio per gli opportuni enzimi di restrizione, nello specifico EcoRI e HindIII per RPS19, BssHII e NheI per PIM-1 e PIM-1 KD:

RPS19 *forward*: 5' CAAGGAATTCATGCCTGGAGTACTG 3'

RPS19 *reverse*: 5' ATCGAAGCTTATGCTTCTTGTGGCAGC 3'

PIM-1 *forward*: 5' AGCGGCGCGCATGCCATGCTCTTGTCCAAAATCAACTGC  
GTTGCCACCTGCGAGCCGCGCCCTGCAACGACCTG 3'

PIM-1 *reverse*: 5' GCCGCTAGCTTTGCTGGGCCCGGCGACAGGCTGTGGA  
GGTG 3'

Gli amplificati, così come i vettori, sono stati quindi digeriti con gli appositi enzimi di restrizione, ligati, trasformati in batteri *E. coli* appartenenti al ceppo DH5 $\alpha$ . e piastrati su terreno solido LB/agar contenente l'opportuno antibiotico. I plasmidi estratti dalle colonie positive sono stati poi sequenziati per verificare che la reazione polimerasica non avesse introdotto mutazioni e che fosse stata mantenuta la corretta cornice di lettura.

### Controllo dell'espressione proteica

I batteri sono stati inoculati da una singola colonia in 3 ml di terreno LB liquido in presenza dell'opportuno antibiotico (50  $\mu$ g/ml di kanamicina per pALFA-RPS19 e 34  $\mu$ g/ml di cloramfenicolo per pOMEGA-PIM-1 e pOMEGA-PIM-1 KD) e fatti crescere in agitazione a 37 °C fino al raggiungimento di una OD<sub>600</sub> di circa 0,5. L'espressione delle proteine è stata poi indotta mediante IPTG 1 mM per 16 ore a 30 °C; 1 ml della coltura di partenza è invece stato fatto crescere senza IPTG e costituirà il controllo non indotto.

Il campione controllo, così come 1 ml della coltura indotta, è stato centrifugato a 4.000 rpm per 10'; le cellule così raccolte sono state lisate con 200  $\mu$ l di Sample Buffer 2x (375 mM Tris/HCl pH 8.8, 2,5% SDS, 20% glicerolo, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol).

Dalla coltura rimasta è stato invece preparato un estratto periplasmico, ottenuto mediante lisi osmotica: le cellule, raccolte mediante centrifugazione, sono state risospese in 70  $\mu$ l di

acqua e 50 µl di TES (0,5 M saccarosio, 0,2 M Tris/HCl pH 7,9, 1 mM EDTA) e incubate per 45' in ghiaccio. Il sovranatante ottenuto mediante una successiva operazione di centrifugazione a 13.000 rpm per 20' a 4 °C costituisce l'estratto periplasmico.

Aliquote di questi campioni (estratto totale non indotto e indotto, nonché estratto periplasmico del campione indotto) sono stati separati mediante SDS/PAGE e la presenza delle proteine di interesse è stata rilevata mediante western blot, effettuato utilizzando sia anticorpi specifici per le proteine di interesse, nello specifico anti-RPS19 (gentilmente donatoci dal Prof. Fabrizio Loreni, Dipartimento di Biologia, Università "Tor Vergata", Roma) e anti-PIM-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), sia anti-tag, ovvero anti-His e anti-SV5, rispettivamente (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **Prova di interazione**

Per testare l'interazione specifica tra PIM-1 e RPS19 in questo sistema abbiamo dovuto utilizzare gli opportuni controlli, gentilmente fornitici dal laboratorio del Prof. Santoro (Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Novara). Dato che RON e SC7 interagiscono tra loro, i plasmidi pALFA-RON e pOMEGA-SC7, quando cotrasformati in batteri, permettono la formazione di colonie su un terreno solido contenente ampicillina.

Abbiamo quindi trasformato in batteri DH5'α pALFA-RON e pALFA-RPS19; tali batteri trasformati hanno quindi assunto la capacità, conferita dal plasmide pALFA, di crescere in presenza di kanamicina. Entrambi i ceppi sono stati resi competenti mediante trattamento con cloruro di calcio e trasformati con pOMEGA-SC7 e pOMEGA-PIM-1 (o pOMEGA-PIM-1 KD); da queste trasformazioni abbiamo ottenuto quattro diversi ceppi batterici, che, sia in base ai plasmidi che contengono, sia in base alla capacità delle proteine per cui tali plasmidi codificano di interagire tra loro, si comporteranno in modo diverso se piastrati su diversi antibiotici. I risultati attesi sono riassunti in tabella 2.

Batteri	Kana/Chl	Amp 30 µg/ml	Amp 50 µg/ml	Amp 100 µg/ml
RON + SC7	+	+	+	+/-
RON + PIM-1	+	-	-	-
RPS19 + SC7	+	-	-	-
RPS19 + PIM-1	+	?	?	?

**Tabella 2.** Riassunto dei risultati attesi nell'esperimento. Ci aspettiamo che RON e SC7 interagiscano tra loro, ma non con PIM-1 e RPS19, rispettivamente.

I doppi trasformanti sono stati piastrati su LB/agar contenente kanamicina e cloramfenicolo; alcune colonie selezionate sono state poi inoculate in terreno liquido, fatte crescere e piastrate su terreno selettivo, contenente tre diverse concentrazioni di ampicillina (30, 50 e 100 µg/ml).

### **Coltura cellulare e preparazione dell'estratto proteico totale di cellule K-562**

Le cellule eritroleucemiche umane K-562 (ATCC#CCL-243) sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) al 10% di siero fetale bovino (Invitrogen Gibco, Grand Island, NY, USA) e addizionato di antibiotici (100 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomycina), in un incubatore a 37 °C con atmosfera satura di vapore acqueo e al 5% di CO<sub>2</sub>.

Per preparare l'estratto proteico totale sono state raccolte 10<sup>8</sup> cellule K-562, che sono state poi risospese in 4 PCV (packed cell volume) di Buffer H freddo (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 20 µg/ml leupeptina, 8 µg/ml pepstatina, 0.2 U/ml aprotinina, 2 mM PMSF, 5 mM DTT, 2 mM sodio metabisolfito). Le cellule sono state sottoposte a lisi osmotica aggiungendo 4 PCV di una soluzione contenente il 50% di glicerolo e il 25% di saccarosio e 1 PCV di una soluzione satura di ammonio solfato. I *debris* cellulari sono stati rimossi ultracentrifugando i campioni a 35000 rpm per 3 ore. Le proteine sono state poi precipitate con 0.33 g/ml di ammonio solfato e il *pellet* proteico è stato risospeso nel tampone Tm 0.0 (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF).

Per preparare l'estratto totale proteico e di RNA è stata aggiunta, oltre agli inibitori delle proteasi, l'RNasi OUT (Invitrogen).

### **Estrazione dell'RNA totale**

Per estrarre l'RNA totale dal lisato cellulare di K-562 e dall'eluato del *pulldown* al campione sono stati aggiunti 3 volumi di TRIzol (Invitrogen) e 1 volume di cloroformio, che ha permesso la precipitazione delle proteine e del DNA. Dopo aver centrifugato, è stata prelevata la fase acquosa, da cui è stato precipitato l'RNA con 2 volumi di isopropanolo. Il pellet è stato poi lavato con etanolo al 70%, fatto asciugare all'aria e risospeso in acqua sterile e *RNasi free*. La soluzione è quindi stata incubata a 60 °C per eliminare le strutture secondarie e conservata a -80 °C.

### **Espressione e purificazione delle proteine di fusione**

Il cDNA di *RPS19* è stato amplificato mediante RT-PCR (come descritto in Chiocchetti *et al.*, 2005) e clonato nel vettore plasmidico pGEX4T-1 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) per ottenere il costrutto pGEX-RPS19. Come controllo negativo è stato utilizzato il vettore pGEX4T-1 vuoto, codificante per il GST. Un ulteriore controllo negativo è costituito dal costrutto pGST-NTGATA1, che codifica per una proteina di fusione tra il GST e il dominio N-terminale del fattore di trascrizione GATA1 (Secco *et al.*, 2003).

L'espressione delle proteine GST, GST-RPS19 e GST-GATA è stata indotta in batteri del ceppo BL21 di *E. coli* mediante induzione con 0.5 mM IPTG per 1 ora a 37 °C. I batteri sono stati risospesi nel tampone di lisi (PBS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina e 1 µg/ml pepstatina). Il lisato è stato poi sonicato e centrifugato per rimuovere i *debris* cellulari. Le proteine di fusione con il GST sono state purificate per affinità sfruttando la loro capacità di legare la resina GST·Bind (Novagen, Madison, WI, USA). La purezza e la concentrazione delle proteine sono state determinate separando i campioni mediante SDS-PAGE, seguito da una colorazione con Blue di Coomassie, e comparazione con quantità note di albumina sierica bovina.

### **GST-pulldown**

La purificazione per affinità degli interattori di RPS19 per l'analisi mediante spettrometria di massa è stata effettuata utilizzando una grande quantità di proteina ricombinante (300 µg) e ripetendo l'esperimento per sei volte per poter ottenere una sufficiente quantità di materiale. Negli esperimenti di conferma è invece stata utilizzata una quantità minore (40 µg). In entrambi i casi gli esperimenti sono stati effettuati come descritto di seguito.

1 mg di estratto cellulare totale è stato sottoposto a prepulizia mediante incubazione per 1 ora a 4 °C con la proteina GST ricombinante legata alla resina. Le proteine non legate sono quindi state incubate per 16 ore a 4 °C con la stessa quantità di resina GST-RPS19 e, negli esperimenti di conferma, con la stessa quantità di resina GST-GATA. Le resine sono state poi ripetutamente lavate con il tampone Tm 0.1 (tampone Tm 0.0, 0,1 M KCl) e le proteine legate sono state eluite con il tampone Tm 0.5 (tampone Tm 0.0, 0,5 M KCl), precipitate con acido tricloroacetico al 20%, lavate due volte con acetone e fatte asciugare all'aria.

I campioni sono stati poi separati mediante SDS-PAGE e colorati con Blue di Coomassie (campioni per la spettrometria di massa) o analizzati mediante western-blot con anticorpi specifici per PIM1, IGF2BP1, MCM6, DDX5, STAU1, DKC1 e NCL (conferma risultati).



### **Co-immunoprecipitazione**

1 mg dell'estratto totale di cellule K-562 è stato addizionato dello 0.5% di Triton X-100 e prepulito mediante incubazione per 1 ora a 4 °C con la proteina-G Agarosio (Sigma-Aldrich).

Il sovrantante è stato poi incubato con un anticorpo monoclonale (surnatante da ibridomi, gentilmente fornito dal Prof. Fabrizio Loreni, Università "Tor Vergata", Roma) anti-RPS19 e con la proteina-G Agarosio sulla ruota a 4 °C per 16 ore. Come controllo negativo è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-HA (Santa Cruz Biotechnology).

Gli immunoclomplessi sono stati recuperati mediante centrifugazione e ripetutamente lavati con il tampone di lavaggio (Tm 0.1, 0,5 % Triton X-100), risospesi in SDS-PAGE Sample Buffer (750 mM Tris/HCl pH 8.8, 5% SDS, 40% glicerolo, 10%  $\beta$ -mercaptoetanolo) e analizzati mediante western blot, utilizzando anticorpi specifici per PIM1, IGF2BP1, MCM6, DDX5, STAU1, DKC1 and NCL.

### **Western blot**

Dopo la separazione mediante SDS-PAGE i campioni sono stati trasferiti dal gel ad una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) per 1 ora a 400 mA a 4 °C. L'avvenuto trasferimento è stato verificato tramite colorazione della membrana con Red Ponceau.

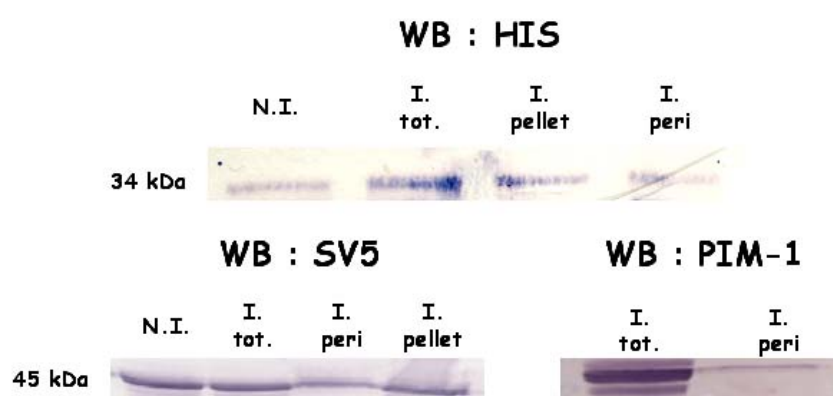
La nitrocellulosa è stata poi saturata per 30' a RT con una soluzione di BSA al 5% preparata in TBS-T (10 mM Tris/HCl pH 7,9, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) e incubata per 90' con l'anticorpo primario, preparato in BSA. Gli anticorpi specifici per PIM1 (Upstate, Charlottesville, VA, USA), IGF2BP1 (IMP1), MCM6, DDX5 e NCL (C23) (Santa Cruz Biotechnology) sono stati utilizzati seguendo le istruzioni fornite dal produttore. L'anticorpo monoclonale anti-STAU1 (Dugre-Brisson *et al.*, 2005), gentilmente donato dal Dr. Luc DesGroseillers, Università di Montreal, Canada, e il policlonale per DKC1 (Mochizuki *et al.*, 2004), gentilmente donato dal Prof. Philip Mason, Università di Washington, St.Louis, MO, USA, sono stati utilizzati rispettivamente ad una diluizione di 1:1000 e 1:5000. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario il filtro è stato lavato per 4 volte in TBS-T, incubato per 1 ora a RT con l'appropriato anticorpo secondario HRP-coniugato e lavato nuovamente con TBS-T. La rivelazione delle proteine di interesse è stata ottenuta mediante chemiluminescenza (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA), ad eccezione di NCL, dove è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich).

# RISULTATI

## CARATTERIZZAZIONE dell'INTERAZIONE tra PIM-1 e RPS19

Per capire meglio la natura dell'interazione e nel contempo trovare una spiegazione alla differente affinità di legame tra la serina/treonina chinasi e alcuni mutanti di RPS19 ci siamo proposti di mappare il dominio di interazione tra le due proteine.

Sono quindi stati preparati i costrutti, come descritto in materiali e metodi, di cui è stata testata la corretta espressione proteica (figura 2).



**Figura 2.** Prova dell'espressione proteica dei costrutti. Il pannello superiore mostra l'espressione di pALFA-RPS19 rivelata con un anticorpo anti-His, mentre nel pannello inferiore è visualizzato il risultato del western blot per confermare la corretta espressione di PIM-1, sia con un anticorpo anti-tag (pannello a sinistra) sia con un anticorpo specifico per la proteina (pannello a destra).

Sono state quindi preparate cellule pALFA-RPS19 e pALFA-RON competenti, all'interno delle quali sono stati trasformati pOMEGA-PIM-1 e pOMEGA-SC7. I doppi trasformanti sono stati piastrati su un terreno solido contenente sia kanamicina che cloramfenicolo e ci siamo accorti di un primo problema: le cellule cotrasformate con pOMEGA-PIM-1 e un altro plasmide pALFA (vuoto o con un qualsiasi inserto) non erano in grado di formare colonie in presenza del doppio antibiotico, mentre i batteri trasformati con pALFA-RPS19 + pOMEGA-SC7 e con pALFA-RON + pOMEGA-SC7 crescevano normalmente. E' stato quindi ipotizzato che l'attività chinasi di PIM-1 potesse essere, mediante un meccanismo ignoto, tossica per i batteri o, in alternativa, interferire con la resistenza alla kanamicina, che è noto essere conferita da un enzima ad attività chinasi.

Abbiamo quindi deciso di clonare in pOMEGA un mutante di PIM-1, K67M, in grado di

abolire l'attività chinasi della proteina. Dopo aver confermato la corretta espressione della proteina (dato non mostrato) abbiamo ottenuto nuovamente i doppi trasformanti, che in questo caso erano in grado di crescere sul terreno selettivo. Abbiamo quindi piastrato alcune colonie sulle tre concentrazioni di ampicillina: la crescita è stata osservata nel caso del controllo positivo, ma non sono comparse colonie né sulle piastre corrispondenti ai controlli negativi, né in quelle dove erano stati piastrati i doppi trasformanti pALFA-RPS19 + pOMEGA-PIM-1 KD.

## **IDENTIFICAZIONE dell'INTERATTOMA di RPS19 con la SPETTROMETRIA di MASSA**

### **Conferma dei risultati mediante western blot e co-immunoprecipitazione**

Quando mi sono inserita nel progetto era stata di recente completata l'analisi spettrometrica. A questo punto abbiamo voluto validare i risultati ottenuti dall'analisi proteomica per alcuni interattori rappresentativi. Per fare questo è stato messo a punto un nuovo saggio di *pull-down* utilizzando le resine GST-RPS19 e GST, utilizzate già nella precedente analisi. Gli eluati di questi esperimenti sono stati analizzati mediante western blot con anticorpi specifici per la serina/treonina chinasi PIM-1, l'insulin-like growth factor 2 binding protein 1 (IGF2BP1), la minichromosome maintenance deficient protein 6 (MCM6), la DEAD box polypeptide 5 (DDX5), Staufen (STAU1), la discherina (DKC1) e la nucleolina (NCL). Per tre di questi interattori (DDX5, DKC1 e NCL) è stato ripetuto l'esperimento utilizzando un ulteriore controllo negativo, la resina GST-GATA. In entrambi i casi è stato possibile confermare la specificità dell'interazione tra RPS19 e le proteine analizzate (figura 3, pannello A).

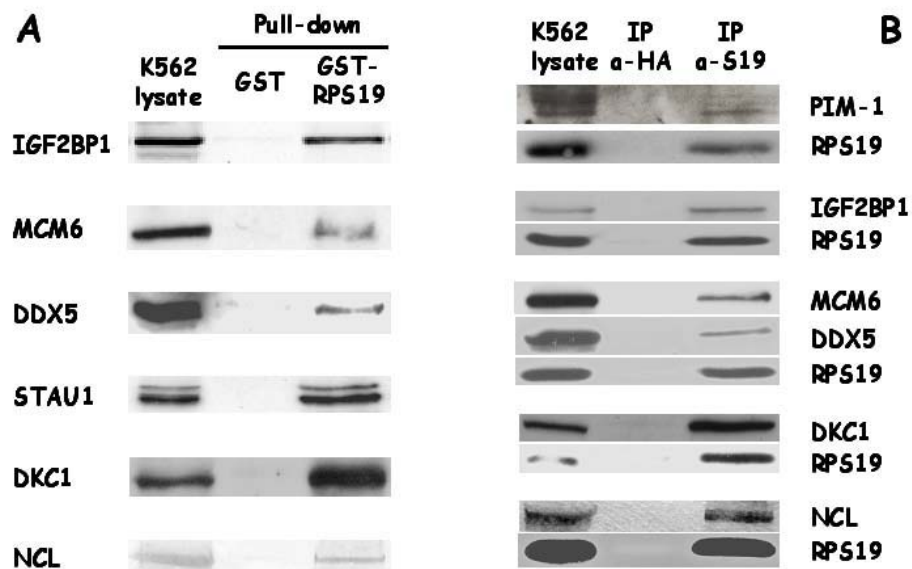
Essendosi nel contempo reso disponibile un anticorpo in grado di immunoprecipitare RPS19 è stato messo a punto un esperimento di immunoprecipitazione, effettuato nuovamente su un estratto proteico totale di cellule K-562: ciò ha permesso di dimostrare che le stesse interazioni da noi identificate mediante un saggio *in vitro* sono riscontrabili anche in un sistema cellulare (figura 3, pannello B).

### **Analisi in silico**

E' stata condotta un'analisi proteomica *in silico* per confrontare i dati presenti nei database HPRD e PubMed con i risultati da noi ottenuti. Da questa analisi sono emersi 4 interattori diretti e 32 indiretti di RPS19. Gli interattori primari noti di RPS19 non sono stati ritrovati nell'analisi spettrometrica; probabilmente ciò è dipeso dal fatto che sono stati identificati in

condizioni particolari. FGF2 è infatti stato dimostrato interagire con la proteina libera e, nel caso specifico, l'esperimento di *pull-down* è stato condotto utilizzando un estratto citoplasmatico di cellule NIH3T3 o ECV303 (Soulet *et al.*, 2001). Nel caso di C5R1, l'interazione è stata riportata in estratti sinoviali di artrite reumatoide, dove è presente un dimero covalente per trans-glutaminazione di RPS19 (Shibuya *et al.*, 2001). Per quanto riguarda la RPS19BP (Maeda *et al.*, 2006), non essendo ancora disponibile un anticorpo specifico, non è stato possibile effettuare un western blot che complementi i dati ottenuti dalla spettrometria di massa.

La nostra analisi mostra che diverse proteine identificate in questo studio interagiscono tra loro. Ad esempio, DDX5, PES, DDX21, GTPBP4, NOL5A e NCL interagiscono con RPL4, RPL6, RPL7a, RPL10a, RPLP0 e RPS3. Comunque la loro relazione con RPS19 non è illustrata nel *database* HPRD né in letteratura: rappresentano quindi nuovi *partner* proteici di RPS19.



**Figura 3.** Conferma dei risultati ottenuti mediante l'analisi spettrometrica tramite western blot effettuato su esperimenti di *pull-down* (pannello A) e di immunoprecipitazione (B).

## DISCUSSIONE

La DBA è una forma rara di anemia infantile caratterizzata da un difetto selettivo a livello dei precursori eritroidi ed associata a malformazioni in circa un terzo dei casi. Nel 25% dei pazienti sono riscontrabili mutazioni nel gene *RPS19*, codificante per una proteina strutturale della subunità minore del ribosoma; ciò rende l'anemia di Diamond-Blackfan la prima malattia umana causata da un difetto in una proteina ribosomale (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

Il collegamento tra le mutazioni riscontrate e l'insorgenza della patologia non è noto, ma sono state avanzate due ipotesi indipendenti, entrambe accreditate: la prima postula un difetto globale nella sintesi proteica, mentre la seconda propone che la DBA possa essere causata da alterazioni in funzioni extra-ribosomali specifiche di *RPS19*, ancora sconosciute.

Nel nostro laboratorio si è cercato di fare chiarezza su tali funzioni peculiari della proteina ribosomale; per fare ciò è stato deciso di identificare i suoi interattori, con l'intento di poter identificare un *pathway* specifico in cui *RPS19* possa essere coinvolta.

Da una prima indagine, condotta mediante uno *screening* per doppio ibrido nel lievito, è emerso il legame di *RPS19* con una serina/treonina chinasi, PIM-1; tale interazione è stata confermata in vari sistemi biologici e, mediante un saggio *in vitro*, è stata dimostrata l'abilità di PIM-1 di fosforilare *RPS19* (Chiocchetti *et al.*, 2005).

E' stato quindi deciso di mappare il dominio di interazione tra le due proteine; identificando infatti la precisa localizzazione della regione di interazione potremmo capire il ruolo della serina/treonina chinasi nella patologia e trovare una spiegazione biologica della sua differente affinità di legame con alcuni mutanti *missense* di *RPS19* identificati nei pazienti. Dopo un fallito tentativo di mappaggio, effettuato mediante l'utilizzo di mutanti delezionali, abbiamo pensato di servirci di una nuova tecnica, la PCA. Sfortunatamente, la proteina pOMEGA-PIM-1, quando cotrasformata con un plasmide pALFA, impedisce la formazione di colonie su un terreno contenente il doppio antibiotico kana/chl. Per questo abbiamo provato a utilizzare il mutante *kinase-dead* di PIM-1, che sappiamo interagire con *RPS19* (dimostrato tramite esperimenti di *GST-pulldown* effettuati utilizzando una resina GST-PIM-1 KD per purificare per affinità *RPS19* da un estratto proteico totale di cellule K-562, dato non mostrato). L'utilizzo di questo costrutto ha permesso di risolvere il problema della tossicità, ma, quando piastrate su terreno contenente ampicillina, le colonie non erano comunque in grado di crescere. E' stato quindi ipotizzato che questo sistema, molto efficiente per la rilevazione delle interazioni antigene-anticorpo, non sia adatto,

almeno nel nostro caso, allo studio di altri tipi di interazione. Questo è probabilmente imputabile all'intensità dell'interazione stessa: la forza di legame tra una chinasi ed il suo substrato, infatti, non può essere paragonabile a quella anticorpo-antigene. Nuovamente, dovremo cambiare strategia sperimentale.

La ricerca degli interattori di RPS19 ha invece portato a buoni risultati, identificando 159 suoi *partner* proteici, la maggioranza dei quali non era mai stata in precedenza associata alla nostra proteina ribosomale. Da ricerche in letteratura e in banca dati abbiamo appreso che molti di essi interagiscono tra loro, permettendo di avanzare l'ipotesi secondo la quale partecipino ad uno stesso complesso multiproteico comprendente anche RPS19.

E' noto che le proteine ribosomali sono coinvolte in stadi diversi della biogenesi del ribosoma, così come in distinti momenti del processo traduzionale (Léger-Silvestre *et al.*, 2004). In particolare, si pensa abbiano un ruolo centrale nel processamento degli rRNA, nell'assemblaggio delle proteine, nel *folding* degli RNA, nel trasporto dei precursori del ribosoma, nonché nella stabilizzazione della struttura delle due subunità; non è poi da escludere una loro interazione con fattori necessari per la sintesi del ribosoma o per la traduzione (Dresios *et al.*, 2006). Sono state anche proposte varie ipotesi che vedrebbero le proteine ribosomali coinvolte in processi cotraduzionali, quali le interazioni con i fattori responsabili del corretto ripiegamento delle catene polipeptidiche neosintetizzate all'uscita del *tunnel* ribosomale (Kramer *et al.*, 2002; Pool *et al.*, 2002), la traslocazione cotraduzionale (Beckmann *et al.*, 2001; Clemons *et al.*, 2004) e attività enzimatiche importanti per la funzione stessa del ribosoma, tra cui l'attività della mRNA elicasi del ribosoma batterico (Takyar *et al.*, 2005).

E' importante sottolineare che la maggioranza delle proteine qui identificate sono proteine ribosomali o comunque a localizzazione nucleolare, e quindi partecipano a processi correlati a RPS19. Questo dato è particolarmente significativo alla luce del fatto che abbiamo utilizzato un estratto cellulare totale, non nucleare e la formazione del complesso è avvenuta *ex cellula*; nonostante ciò, non sono state rinvenute proteine citoplasmatiche abbondanti. Ciò suggerisce che la struttura della proteina RPS19 ricombinante sia funzionalmente capace di reclutare diversi *partner* cellulari.

Da un confronto con lo Human Nucleolar Database (Lam *et al.*, 2005) è emerso che circa due terzi degli interattori sono proteine a localizzazione nucleolare. Come atteso, sono state identificate numerose proteine ribosomali, delle quali 14 appartenenti alla subunità minore (i.e. S2, S3, S4X, S5, S6, S7, S8, S10, S14, S16, S23, S24, S26, SA) e 11 a quella maggiore. Sono state inoltre purificate componenti del pre-40S, ma l'identificazione di

proteine appartenenti ad entrambe le subunità fa supporre di essere in presenza anche del complesso del pre-ribosoma 90S, ovvero la struttura che si forma prima del processamento del pre-rRNA. Un successivo taglio ad un sito specifico (A2) separa le due subunità. Il pre-ribosoma è una struttura altamente dinamica che ingloba oltre 150 proteine non ribosomali a diversa attività, tra le quali nucleasi, RNA elicasi, GTPasi, AAA ATPasi, chinasi. Confrontando la nostra lista di interattori con il pre-ribosome network di lievito (Milkereit *et al.*, 2003) abbiamo identificato 31 proteine appartenenti al pre-ribosoma, di cui ben 23 fanno parte del complesso 90S.

RPS19 possiede diversi interattori in comune con la parvulina, una peptidil-prolil-isomerasi coinvolta nelle fasi precoci della biogenesi del ribosoma (i.e. L3, L4, L6, L7, L7a, L8, L10a, L14, S3, S4X, S6, S8 and DDX18) (Fujiyama *et al.*, 2002).

L'interazione con la maggior parte delle proteine ribosomali essenziali per il trasporto della subunità minore dal nucleo al citoplasma (i.e. RPS10, RPS26, RPS3, and RPS2) e con l'esportina XPO, nota per controllare l'esporto di entrambe le subunità, suggerisce un ruolo di RPS19 in questo processo. Ciò è in accordo con recenti evidenze del suo coinvolgimento nelle fasi iniziali del processamento dell'rRNA (Léger-Silvestre *et al.*, 2005) e nel suo esporto dal nucleo (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005).

Abbiamo inoltre identificato componenti del complesso H/ACA-*box small nucleolar* RNP, quali la discherina, NOLA1 e NOLA3. Tale complesso, che include anche NOLA2, è necessario per la pseudouridilazione sito-specifica degli rRNA coinvolti negli stadi precoci della biogenesi del ribosoma (Wang e Meier, 2004); l'eliminazione di una di queste quattro proteine compromette sia la produzione dell'rRNA sia la sua pseudouridilazione.

Un ulteriore gruppo di interattori include proteine che controllano la sintesi proteica, ovvero proteine coinvolte nella traslocazione cotraduzionale (Beckmann *et al.*, 2001; Clemons *et al.*, 2004), ad esempio srp68, e regolatori della traduzione, quali IGF2BP1 e STAU1.

Possiamo infine considerare che, mediante questo studio, è stato possibile associare a RPS19 un gruppo di proteine molto eterogeneo da punto di vista funzionale, che include integrine, componenti del proteasoma e chinasi; sono comunque necessari ulteriori approfondimenti per chiarire il loro legame con la proteina ribosomale.

In conclusione, possiamo affermare che RPS19 sembra essere coinvolto nel processamento e nel metabolismo dell'rRNA, oltre che, probabilmente, nel controllo della traduzione. In ogni caso, deve essere puntualizzato che i nostri risultati non tengono in considerazione le interazioni in una precisa dimensione spazio-temporale, quindi sono necessari ulteriori

esperimenti per far maggior chiarezza su questo punto.

E' molto significativo l'aver identificato, tra gli interattori sia diretti che indiretti di RPS19, proteine coinvolte in patologie simili alla DBA. Queste includono: 1) DKC1, responsabile della discheratosi congenita (MIM 305000), che ha in comune con la DBA il difetto a livello del midollo osseo, 2) RPL24, le cui mutazioni spontanee conducono, nel topo, a ritardi nella crescita e malformazioni scheletriche (Oliver *et al.*, 2004), 3) TCOF1, coinvolto nella sindrome di Treacher-Collins (MIM 154500), che condivide con la DBA la presenza di malformazioni nei pazienti e interagisce con NOL5A e UBTF, 5) SBDBS (MIM 260400), interattore della nucleolina e responsabile della sindrome di Schwachman-Diamond. Ciò suggerisce un possibile meccanismo patogenetico comune alla base di queste malattie.



## PROSPETTIVE FUTURE

Un ruolo di primo piano nei nostri futuri esperimenti sarà dato indubbiamente alla comprensione del ruolo biologico dell'interazione tra RPS19 e PIM-1. Dal momento che la PCA non si è dimostrata essere la tecnica più adatta, è stata disegnata una nuova strategia operativa per mappare il dominio di interazione tra le due proteine. Verranno infatti costruiti dei vettori in grado di far esprimere in un sistema batterico le proteine ricombinanti Flag-RPS19 e PIM-1-HA. Queste proteine verranno purificate e utilizzate in un saggio di immunoprecipitazione. Se questo esperimento preliminare darà un riscontro positivo potremo costruire mutanti delezionali delle due proteine, sempre in fusione agli stessi *tag*. Utilizzando queste proteine in nuovi saggi di *pulldown* sarà possibile mappare il dominio di interazione.

Nel contempo uno dei nostri obiettivi sarà dimostrare la fosforilazione di RPS19 *in vivo*. Per fare questo, verrà preparato in presenza di inibitori delle fosfatasi un estratto proteico totale di cellule K-562, che verrà utilizzato in un esperimento di immunoprecipitazione con un anticorpo anti-RPS19. L'immunoprecipitato verrà poi analizzato mediante *western blot* con un anticorpo anti-fosfotreonina.

Se l'esperimento avrà esito positivo, potremo trasfettare un dominante negativo di PIM-1 e ripetere l'esperimento: questo permetterebbe di dimostrare che la proteina ribosomale è fosforilata anche *in vivo* dalla nostra serina/treonina chinasi.

Dai dati ottenuti mediante l'analisi proteomica abbiamo deciso di concentrare la nostra attenzione sulla discherina. Inizialmente sarà necessario chiarire se l'interazione sia diretta o indiretta. Per fare questo il cDNA di DKC1 verrà clonato in un opportuno vettore che consenta la traduzione *in vitro*. La proteina, marcata con metionina [<sup>35</sup>S], verrà utilizzata per un saggio di *GST-pulldown* condotto con la proteina ricombinante GST-RPS19 e visualizzato mediante autoradiografia.

Siamo inoltre in attesa dei risultati dell'analisi mediante *microarray*. Per una selezione dei vari RNA interattori verrà confermato il dato ottenuto dai *microarray* mediante Real-Time RT-PCR; verrà inoltre messo a punto un saggio di *binding* per determinare se l'interazione con RPS19 sia diretta o indiretta. Per quanto riguarda le interazioni dirette, verrà mappato il dominio di interazione con la nostra proteina ribosomale mediante un saggio EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay). Inoltre, verrà valutata la variazione del livello di espressione delle proteine corrispondenti mediante *western blot* in cellule K-562 in cui l'espressione di RPS19 è stata silenziata mediante siRNA.

## BIBLIOGRAFIA

- Beckmann R, Spahn C.M, Eswar N, Helmers J, Penczek P.A, Sali A, Frank J, Blobel, G. Architecture of the proteinconducting channel associated with the translating 80S ribosome. (2001) *Cell* **107**:361–372.
- Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, Longoni D, Pecile V, Zecca M, Dufour C, Ramenghi U, Dianzani I. Molecular basis of Diamone-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica* (2004) **89**:480-489
- Chatr-Aryamontri A, Angelini M, Garelli E, Tchernia G, Ramenghi U, Dianzani I, Loreni F. Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia. (2004) *Hum Mutat.* **24**:526-33.
- Chiocchetti A, Gibello L, Carando A, Aspesi A, Secco P, Garelli E, Loreni F, angelici M, Biava A, Dahl N, Dianzani U, Ramenghi U, Santoro C, Dianzani I. Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica* (2005) **90**:1453-1462.
- Clemons WM Jr, Menetret J.F, Akey C.W, Rapoport T.A. Structural insight into the protein translocation channel. (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**:390–396.
- Da Costa L, Tchernia G, Gascard P, Lo A, Meerpohl J, Niemeyer C, Chasis JA, Fixler J, Mohandas N. Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. (2003) *Blood.* **101**:5039-45.
- Dianzani I, Garelli E, Crescenzo N, Timeus F, Mori PG, Varotto S, Nobili B, Brandalise S, Olivieri NF, Gabutti V, Ramenghi U. Diamond-Blackfan anemia: expansion of erythroid progenitors in vitro by IL-9, but exclusion of a significant pathogenetic role for the IL-9 gene and the hematopoietic gene cluster on chromosome 5q. *Exp Hematol.* (1997) **25**:1270-7.
- Dianzani I, Garelli E, Ramenghi U. Diamond-Blackfan anemia: a congenital defect in erythropoiesis. *Haematologica.* (1996) **81**:560-72.
- Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* (1999) **21**:169-75.
- Dresios J, Panopoulos P, Synetos D. Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart, important players in ribosomal function. (2006) *Mol. Microbiol.* **59**:1651–1663.
- Ellis SR, Massey AT. Diamond Blackfan anemia, a paradigm for a ribosome-based disease. (2006) *Med. Hypotheses* **66**:643-48.

- Ferreira-Cerca S, Poll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. (2005) *Mol. Cell.* **20**:263-75.
- Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis S. Human RPS19, the gene mutated in Diamond Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood.* 2006 Sep 21; [Epub ahead of print]
- Freedman MH. Diamond-Blackfan anaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* (2000) **13**:391-406.
- Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. Ribosome assembly in eukaryotes. (2003) *Gene* **313**:17-42.
- Fujiyama S, Yanagida M, Hayano T, Miura Y, Isobe T, Takahashi N. Isolation and Proteomic Characterization of Human Parvulin associating Preribosomal Ribonucleoprotein Complexes. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:23773–23780.
- Galarneau A, Primeau M, Trudeau LE, Michnick SW. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions. (2002) *Nat Biotechnol.* **20**:619-22.
- Gazda H, Lipton JM, Willig TN, Ball S, Niemeyer CM, Tchernia G, Mohandas N, Daly MJ, Ploszynska A, Orfali KA, Vlachos A, Glader BE, Rokicka-Milewska R, Ohara A, Baker D, Pospisilova D, Webber A, Viskochil DH, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA. Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23.3-p22 and for non-19q non-8p disease. (2001) *Blood* **97**:2145-50.
- Gustavsson P, Skeppner G, Johansson B, Berg T, Gordon L, Kreuger A, Dahl N. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J Med Genet.* (1997) **34**:779-82
- Hamaguchi I, Ooka A, Brun A, Richter J, Dahl N, Karlsson S. Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond-Blackfan anemia. (2002) *Blood* **100**:2724-31.
- Kramer G, Rauch T, Rist W, Vorderwulbecke S, Patzelt H, Schulze-Specking A, Ban N, Deuerling E, Bukau B. L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. (2002) *Nature* **419**:171–174.
- Lam Y.W, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. The nucleolus. (2005) *J. Cell Sci.* **118**:1335-7.
- Léger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, Alvarez-Arias DA, Gas N, Bertolone SJ, Gleizes, PE, Ellis SR. Specific role of yeast homologs of the Diamond-Blackfan anemia associated Rps19 protein in ribosome synthesis. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**:38177-85.
- Leger-Silvestre I, Milkereit P, Ferreira-Cerca S, Saveanu C, Rousselle J-C, Choismel V, Guinefoleau C, Gas N, Gleizes P-E. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. (2004) *The EMBO J.* **23**:2336–2347.

- Lipton JM, Federman N, Khabbaze Y, Schwartz CL, Hilliard LM, Clark JI, Vlachos A; Diamond-Black Anemia Registry. Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *J Pediatr Hematol Oncol.* (2001) **23**:39-44.
- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**: 4797-812.
- Maeda N, Toku S, Kenmochi N, Tanaka T. A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006) **339**:41–46.
- Mazumder B., Sampath P., Seshadri V., Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. (2003) *Cell* **115**:187–198.
- Milkereit P, Kuéhn H, Gas N, Tschochner H. The pre-ribosomal network. (2003) *Nucl. Ac. Res.* **31**:799-804.
- Mochizuki Y, He J, Kulkarni S, Bessler M, Mason PJ. Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10756–10761.
- Nierhaus KH. The assembly of prokaryotic ribosomes. (1991) *Biochimie.* **73**:739-55.
- Oliver ER, Saunders TL, Tarl SA, Glaser T. Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail ( Bst), a mouse Minute. (2004) *Development* **31**:3907-20.
- Pool M.R, Stumm J, Fulga T.A, Sinning I, Dobberstein B. Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. (2002) *Science* **297**:1345–1348.
- Ramenghi U, Garelli E, Valtolina S, Campagnoli MF, Timeus F, Crescenzo N, Mair M, Varotto S, D'Avanzo M, Nobili B, Massolo F, Mori PG, Locatelli F, Gustavsson P, Dahl N, Dianzani I. Diamond-Blackfan anaemia in the Italian population. *Br J Haematol.* (1999) **104**:841-8.
- Secco P, Cotella D, Santoro C. Selection of peptides with affinity for the N-terminal domain of GATA-1: identification of a potential interacting protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) **305**:1061-1066.
- Shibuya Y, Shiokawa M, Nishiura H, Nishimura T, Nishino N, Okabe H, Takagi K, Yamamoto T. Identification of receptor-binding sites of monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *Am. J. Pathol.* (2001) **159**:2293-2301.
- Soulet F, Al Saati T, Roga S, Amalric F, Bouche G (2001) Fibroblast Growth Factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) **289**:591–596.
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. (2005) *Cell* **123**:49–63.

Takyar S, Hickerson RP, Noller HF. mRNA helicase activity of the ribosome. (2005) *Cell* **120**:49–58.

Wang C, Meier UT. Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. (2004) *The EMBO J.* **23**:1857–1867.

Wehrman T, Kleaveland B, Her JH, Balint RF, Blau HM. Protein-protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of beta -lactamase enzyme fragments. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:3469-74.

## SEMINARI SEGUITI

- 18 Novembre 2005            Dr. Diego Cotella  
Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits
- 23 Novembre 2005           Prof. Luigi Elio Adinolfi  
HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications
- 25 Novembre 2005           Prof. Robert Tjian  
Mechanisms of transcriptional regulation and disease
- 19 Gennaio 2006            Prof.<sup>ssa</sup> Maria Grano  
Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation
- 13 Febbraio 2006            Prof. Ferdinando Nicoletti  
New perspectives in metabotropic glutamate receptors neurobiology
- 15 Febbraio 2006            Prof. Daniele Sblattero  
Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico
- 13 Marzo 2006              Dott.<sup>ssa</sup> Antonia Follenzi  
Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni pre la terapia cellulare e genica ell'emofilia
- 20 Marzo 2006              Prof. Mikael Knip  
The natural course of preclinical type 1 diabetes
- 30 Maggio 2006             Prof.<sup>ssa</sup> Marialuisa Lavitrano  
Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni
- 15 Giugno 2006             Prof. Guido Tarone  
Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptative cardiac remodeling to pressure overload
- 05 Luglio 2006              Dott.<sup>ssa</sup> Renata Grifantini  
DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design
- 11 Settembre 2006          Prof. Dieter Brömme  
The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis

## **CORSI SEGUITI**

Corso di inglese

## **PARTECIPAZIONI a CONGRESSI**

Proteine 2006, 1-3 Giugno 2006

Caterino M., Orrù S., Ruoppolo M., Aspesi A., Armiraglio M., Loreni F., Santoro C., Dianzani I. “Understanding human ribosomal protein RPS19 function through the definition of its interactome”.

FISV 2006, Riva del Garda, 28 Settembre – 1 Ottobre 2006