

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

**XIX ciclo del dottorato in Medicina Molecolare**

**Relazione del III anno**

**Patogenesi dell'Anemia di Diamond Blackfan**

**Dottoranda: Anna Aspesi**

**Responsabile scientifico: Prof. Irma Dianzani**

# INTRODUZIONE

## ***L'anemia di Diamond Blackfan (DBA)***

L'anemia di Diamond Blackfan o DBA è un'aplasia pura della serie eritroide caratterizzata da anemia normocromica macrocitica e associata a malformazioni nel 30% dei casi. La maggior parte dei casi di DBA è sporadica, mentre circa il 10-20% dei malati presenta ricorrenza familiare. La terapia consiste nel trattamento con steroidi o con emotrasfusioni (Dianzani *et al.*, 2000).

Il primo locus DBA è stato identificato nella regione 19q13.2 e codifica per la proteina ribosomiale S19. RPS19 è una proteina strutturale della subunità 40S del ribosoma, composta da 145 amminoacidi e con massa molecolare di 16 kDa. Mutazioni in RPS19 variabili per tipo e localizzazione sono state riscontrate nel 25% dei pazienti DBA, sempre in eterozigosi (Draptchinskaia *et al.*, 1999). Non è nota alcuna correlazione tra la natura delle mutazioni e il tipo di ereditarietà o il fenotipo clinico. Recentemente è stato identificato un secondo gene DBA sul cromosoma 10 (10q22-q23) che codifica per la proteina ribosomiale S24 (Gazda *et al.*, 2006). Con l'analisi di linkage è stato identificato un ulteriore locus DBA sul cromosoma 8 (8p23.3-p22) (Gazda *et al.*, 2001).

## ***RPS19 e la sintesi proteica***

La DBA è l'unica patologia umana causata da mutazioni in un gene codificante per una proteina ribosomiale. Esistono tuttavia altre sindromi, caratterizzate da aplasia midollare, la cui patogenesi è collegata a fattori coinvolti nella sintesi proteica.

Queste patologie includono:

- la Discheratosi Congenita (DC), la cui forma X-linked è causata da mutazioni nel gene *DKCI* codificante per la discherina, una pseudouracilsintasi necessaria per il processamento dell'rRNA (Heiss *et al.*, 1998);
- la Cartilage Hair Hypoplasia (CHH), dovuta a difetti nel gene *RMRP* che codifica per la componente RNA di una ribonucleoproteina che partecipa al processamento dell'rRNA (Ridanpaa *et al.*, 2001);

- la sindrome di Shwachmann Diamond (SDS), il cui gene causale, *SBDS*, codifica per una proteina coinvolta nel metabolismo dell'rRNA (Boocock *et al.*, 2003).

Il nesso tra il difetto nella sintesi ribosomiale e la patogenesi di queste sindromi non è noto; è possibile che mutazioni in queste proteine e RNA, che spesso fanno parte di complessi, alterino multiple funzioni cellulari.

Nel caso di RPS19 è stata ipotizzata l'esistenza di una funzione extraribosomiale che se alterata potrebbe provocare la DBA. E' stato dimostrato che altre proteine ribosomiali sono coinvolte in processi cellulari distinti dalla sintesi proteica. In particolare, RPS6 ha un ruolo nella regolazione del ciclo cellulare, mentre RPL13 è coinvolta nel controllo traduzionale del trascritto della ceruloplasmina (Volarevic *et al.*, 2001; Mazumder *et al.*, 2003). Recentemente è stato identificato il proteoma di RPS19 (Orrù *et al.*, submitted) ed esso comprende proteine implicate nella biogenesi del ribosoma, nel controllo traduzionale e nello splicing.

Tuttavia, altri studi supportano l'ipotesi che la DBA sia causata da un difetto nella sintesi proteica. Pazienti DBA con RPS19 wild type presentano una ridotta espressione dei geni codificanti per proteine ribosomiali (Koga *et al.*, 2006). Nel lievito la proteina omologa ad RPS19 è coinvolta nel processo di maturazione dell'estremità 3' dell'rRNA 18S e nella formazione delle subunità 40S. Nelle cellule di lievito difettive per RPS19 i precursori delle subunità 40S vengono trattenuti nel nucleo e non possono reclutare i fattori necessari per gli ultimi stadi della maturazione della subunità 40S (Leger-Silvestre *et al.*, 2005).

Nelle cellule di mammifero la formazione dei ribosomi richiede l'assemblaggio di 4 molecole di rRNA e di 79 differenti proteine. La subunità ribosomiale 40S contiene solo l'rRNA 18S, mentre la 60S contiene gli rRNA 28S, 5.8S e 5S. Mentre l'rRNA 5S è prodotto dall'RNA polimerasi III, gli rRNA 28S, 5.8S e 18S vengono trascritti dall'RNA polimerasi I sotto forma di un unico precursore (pre-rRNA) che va incontro a processamento per l'eliminazione delle sequenze spaziatrici secondo due pathway alternativi che differiscono nella sequenza temporale di clivaggio degli enzimi ai siti 1 e 2 (Fig. 1). Durante queste fasi di maturazione le proteine ribosomiali vengono assemblate sugli rRNA per formare i complessi ribonucleoproteici pre-60S e pre-40S, che vengono processati nelle subunità mature e infine esportati fuori dal nucleo. E' stato recentemente dimostrato che nelle cellule umane l'ultima fase di maturazione della subunità 40S avviene nel citoplasma, dove l'rRNA 18S-E, contenente una porzione della sequenza ITS1, viene processato in 18S (Rouquette *et al.*, 2005).

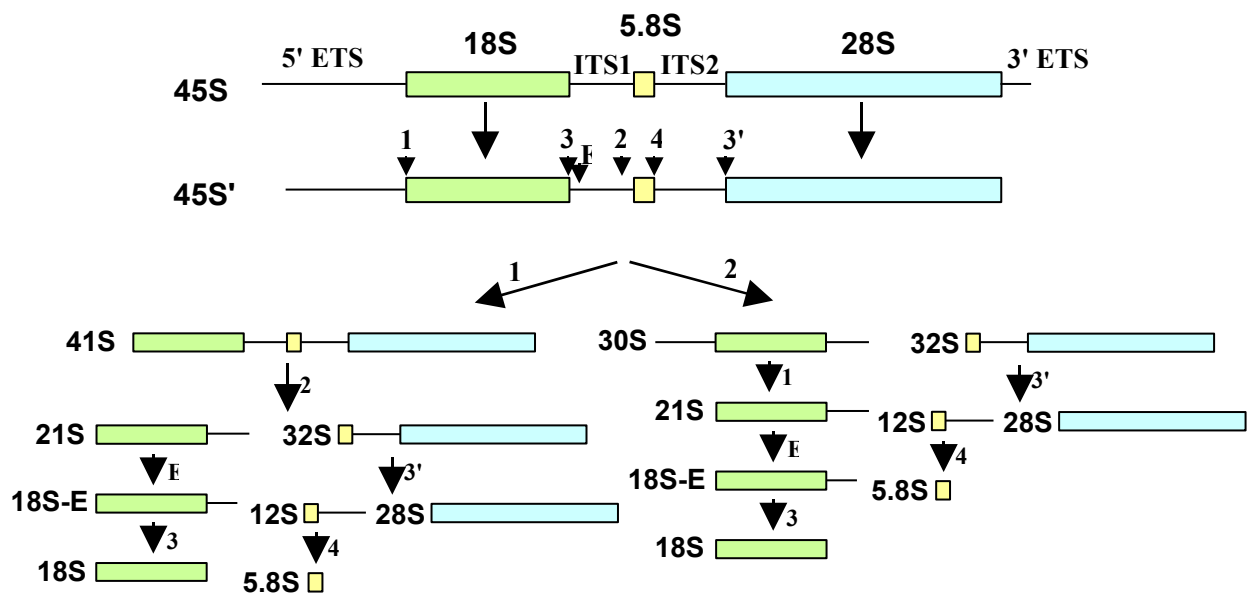


Fig. 1 Processamento del pre-rRNA nelle cellule di mammifero (Rouquette *et al.*, 2005).

## ***RPS19 e l'eritropoiesi***

Il nesso tra le mutazioni in *RPS19* che si riscontrano in un quarto dei pazienti DBA e le manifestazioni cliniche della malattia, e in particolare l'aplasia midollare della linea eritroide, è tuttora sconosciuto. E' stata avanzata un'ipotesi secondo la quale le proteine ribosomiali verrebbero espresse in quantità relative differenti a seconda del tessuto, perciò l'aploinsufficienza per *RPS19* potrebbe essere un fattore limitante per l'assemblaggio dei ribosomi nel tessuto emopoietico, e in particolare nei progenitori eritroidi, ma non in altri tessuti (Ellis and Massey, 2005). Questo spiegherebbe anche l'osservazione di Gazda *e coll.* (2004) che mentre la quantità di mRNA per *RPS19* è molto minore nei pazienti DBA rispetto ai controlli sia nelle cellule mononucleate del sangue periferico sia nelle cellule di midollo osseo CD34<sup>+</sup>, la quantità di proteina nei pazienti si riduce solo nei CD34<sup>+</sup>. Infatti, il basso livello di espressione di *RPS19* potrebbe essere sufficiente per la sintesi proteica nelle cellule di sangue periferico ma limitare la produzione delle subunità 40S nelle cellule CD34<sup>+</sup> provocando così una riduzione della traduzione generale o specifica per alcuni trascritti.

Le cellule CD34<sup>+</sup> isolate dal midollo osseo dei pazienti con DBA presentano un difetto intrinseco della differenziazione in senso eritroide che si traduce in una diminuzione nel numero delle BFU-E e CFU-E (Hamaguchi *et al.*, 2003). E' stato dimostrato che questo difetto può essere corretto nei CD34<sup>+</sup> derivanti da pazienti con mutazione in RPS19 tramite la trasfezione di un vettore esprimente il cDNA wild type di RPS19 (Hamaguchi *et al.*, 2002). L'efficacia del trapianto allogenico di midollo osseo nella cura di questa patologia è un'ulteriore prova che la causa della DBA è intrinseca al tessuto emopoietico. Tuttavia, il contributo di RPS19 nell'eritropoiesi normale o patologica è ancora da definire. Le basi del difetto molecolare non sono note, sebbene sia stata postulata un'insensibilità all'eritropoietina (EPO) dei progenitori eritroidi dei pazienti, supportata dal drastico aumento dell'apoptosi in queste cellule dopo deprivazione dell'EPO (Perdahl *et al.*, 1994).

Nel tentativo di ottenere un modello murino per la DBA è stato sviluppato un topo eterozigote RPS19<sup>+/-</sup> che però presenta livelli normali di mRNA per RPS19 e non mostra alcuna anomalia ematologica, mentre il topo omozigote RPS19<sup>-/-</sup> ha un fenotipo letale a livello embrionale (Matsson *et al.*, 2004). Gli unici modelli disponibili per la DBA sono perciò quelli ottenuti silenziando RPS19 con siRNA specifici in cellule primarie CD34<sup>+</sup> (Flygare *et al.*, 2005) o in linee cellulari immortalizzate (Miyake *et al.*, 2005).

Nel nostro laboratorio in passato ci siamo focalizzati sull'identificazione di interattori di RPS19 che potessero collegare questa proteina ribosomiale ai pathway coinvolti nell'eritropoiesi e quindi alla patogenesi della malattia. Dato che la letteratura recente ha evidenziato l'importanza di RPS19 nella biogenesi dei ribosomi, la nostra attenzione si è rivolta allo studio del ruolo di RPS19 nel processamento dell'rRNA e nella produzione delle subunità ribosomiali. A questo scopo sono state utilizzate sia cellule primarie isolate dal midollo osseo di pazienti, sia cellule TF-1 in cui l'espressione di RPS19 può essere silenziata inducendo la trascrizione di siRNA (Flygare *et al.*, 2006).

Tutti gli esperimenti descritti sono stati effettuati nel Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università di Louisville, KY, USA, sotto la supervisione del Prof. Steven R. Ellis.

# MATERIALI E METODI

## *Colture cellulari*

Le cellule emopoietiche multipotenti TF-1 contenenti i vettori lentivirali inducibili che esprimono siRNA di controllo o per RPS19 provenienti dal laboratorio del Prof. Stefan Karlsson (Lund University, Lund, Sweden) e già descritte da Miyake *e coll.* (2005) sono state coltivate in RPMI-1640 addizionato di siero fetale bovino al 10%, 100 U/ml di penicillina, 0.1 mg/ml streptomicina, e 5 ng/ml GM-CSF, a 37°C in atmosfera satura di vapor d'acqua e CO<sub>2</sub> al 5%. Per indurre l'espressione degli siRNA le cellule sono state trattate con 0.5 µg/ml doxiciiclina per 4 giorni.

Le cellule mononucleate CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup> sono state ottenute dal midollo osseo di controlli sani o pazienti DBA nel laboratorio del Prof. Stefan Karlsson e isolate con il CD34 MicroBead kit (Miltenyi Biotec).

## *Western blotting*

2x10<sup>6</sup> cellule sono state lavate con PBS, risospese in lysis buffer, sonicate 3 volte e centrifugate per eliminare i debris cellulari. Dopo quantizzazione con il metodo di Bradford 80 µg di proteine totali sono state risospese in Laemmli buffer ridotto e sottoposte a SDS-PAGE. Le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa che è stata poi saturata con milk 6% in TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) per almeno un'ora a temperatura ambiente e incubata con anticorpo monoclonale anti-RPS19 (Abnova). Il filtro è stato lavato più volte con TBST, incubato con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi per 1 ora a temperatura ambiente e di nuovo lavato. Le proteine sono state rivelate mediante reazione in ECL (Amersham Biosciences).

### ***Northern blotting***

L'RNA totale da  $0.5-1 \times 10^6$  cellule di midollo osseo o cellule TF-1 è stato isolato con il kit RNaqueous-Micro (Ambion). L'RNA è stato frazionato su un gel di agarosio 1.5% contenente formaldeide e trasferito su una membrana Zetaprobe (Biorad). La membrana è stata lavata overnight a  $55^\circ\text{C}$  con buffer SSC 2x (0.3M NaCl e 0.03M NaCitrato a pH 7.0) e 1% SDS e poi preibridizzata con ULTRA hyb oligonucleotide hybridization buffer (Ambion). Gli oligonucleotidi usati come sonde per l'identificazione di sequenze specifiche sull'RNA sono:

**$\alpha$** : 5'-ACCGGTCACGACTCGGCA-3' (complementare alla sequenza 1786-1804 nell'ETS1 del trascritto dell'RNA ribosomiale);

**$\beta$** : 5'- GCATGGCTTAATCTTTGAGACAAGCATAT-3' (complementare alla sequenza 3681-2709 nell'rRNA 18S);

**$\gamma$** : 5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3' (complementare alla sequenza 5520-5547 che si trova tra l'rRNA 18S e l'ITS1);

**$\delta$** : 5'-TCTCCCTCCCGAGTTCTCGGCTCT-3' (complementare alla sequenza 5687-5710 nella porzione 5' di ITS1);

**$\epsilon$** : 5'-CTAAGAGTCGTACGAGGTCG-3' (complementare alla sequenza 6613-6632 che si trova tra l'ITS1 e l'rRNA 5.8S).

Le sonde sono state marcate con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  usando la T4 polinucleotide chinasi (New England Biolabs) e ibridizzate con la membrana a  $37^\circ\text{C}$  overnight con il buffer usato per la preibridizzazione. Dopo 3 lavaggi con SSC 6x a  $37^\circ\text{C}$  la membrana è stata sottoposta ad analisi con Phosphorimager SF (Molecular Dynamics).

### ***Pulse and chase***

Cellule TF-1 sono state coltivate per 4 giorni in presenza o assenza di DOX, raccolte, lavate con RPMI senza metionina e incubate nello stesso terreno per 2 ore a  $37^\circ\text{C}$ . Le cellule sono state trattate con  $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  [metil- $^3\text{H}$ ]-Met per 30 minuti e successivamente in terreno con metionina per 0, 45 o 90 minuti. L'RNA totale è stato estratto e analizzato come descritto per i northern blot. La membrana è stata poi esposta su film BioMax MS a  $-80^\circ\text{C}$ .

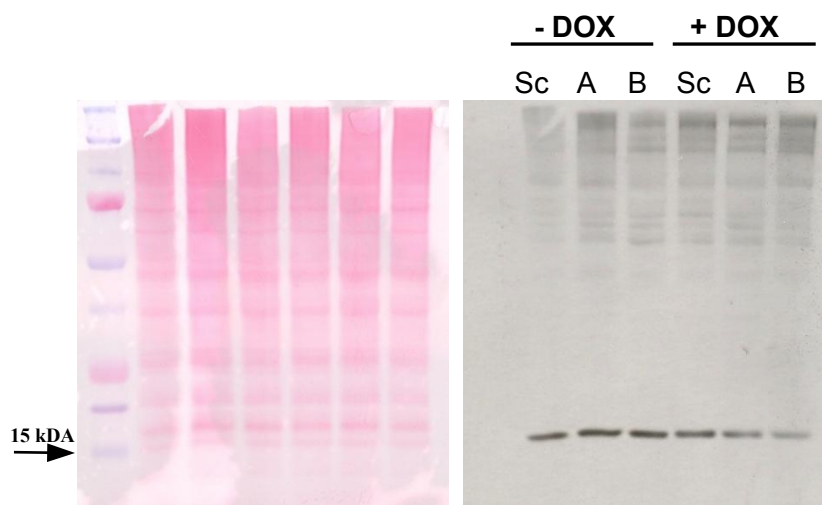
### ***Profilo polisomiale***

Cellule TF-1 A sono state cresciute per 4 giorni in presenza o assenza di DOX e lisate secondo il protocollo descritto da Tang (Tang *et al.*, 2001). Gli estratti sono stati poi caricati su gradiente di

saccarosio 15-55% e centrifugati per 5 ore a 28000 RPM. L'analisi dei gradienti è stata effettuata ad un'assorbanza di 254 nm usando un ISCO model 185 gradient fractionator e un UA-6 absorbance detector.

## RISULTATI

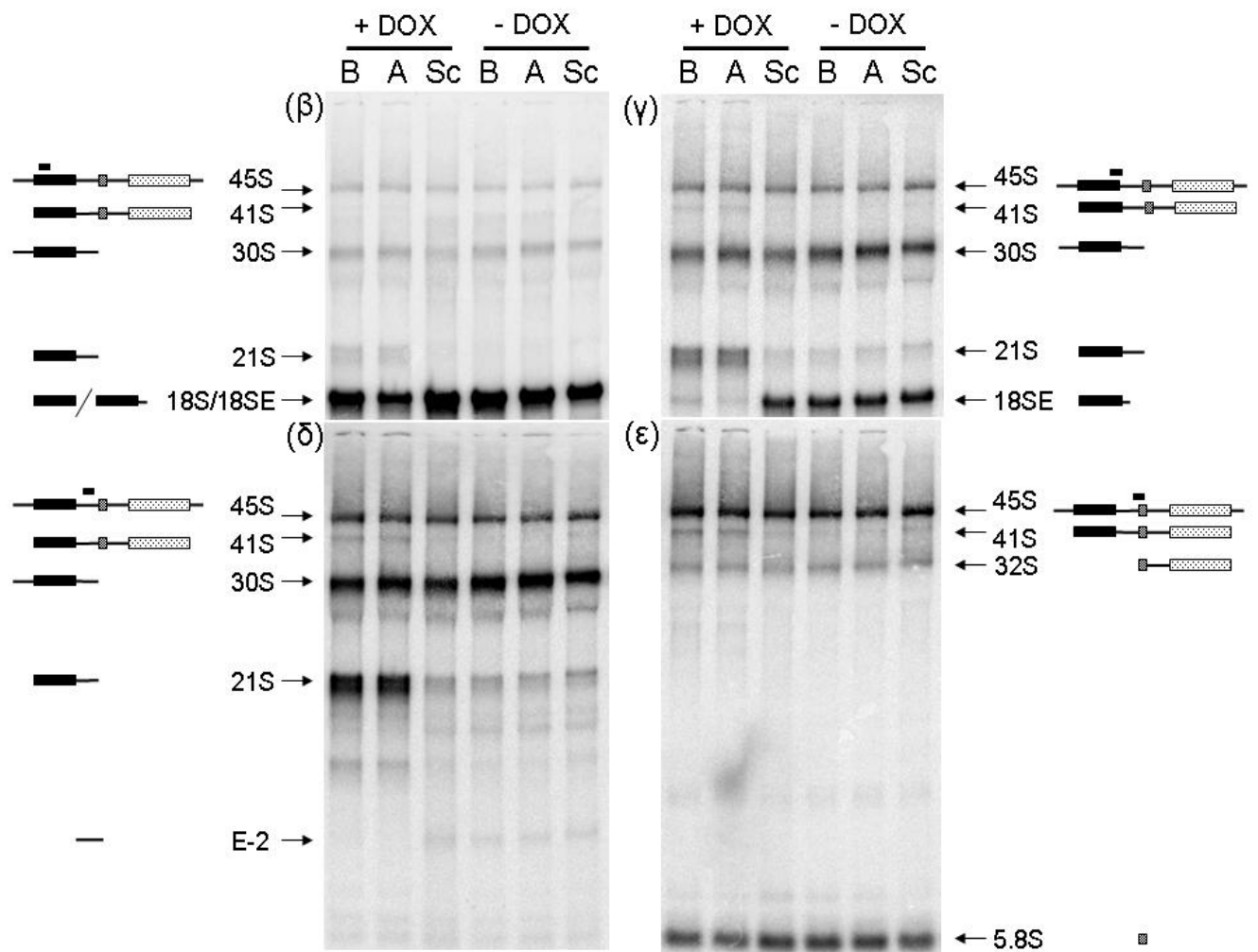
Per studiare gli effetti della riduzione di RPS19 sulla sintesi dei ribosomi abbiamo utilizzato un sistema cellulare in cui l'espressione di RPS19 è controllata dalla produzione inducibile di siRNA. Cellule emopoietiche multipotenti TF-1 sono state trasdotte con i vettori lentivirali codificanti per degli siRNA di controllo (scrambled) o specifici per il silenziamento di RPS19 (A e B) come descritto in precedenza da Miyake *e coll.* (2005). Le cellule sono state trattate con doxiciclina (DOX) per 4 giorni per indurre l'espressione degli siRNA. In queste condizioni la riduzione dell'espressione di RPS19 è pari al 40-60% (Fig. 2).



**Fig. 2** Western blot effettuato su lisati da cellule TF-1 con siRNA scrambled (Sc) o specifici per RPS19 (A e B). A sinistra colorazione con red ponceau, a destra immunoblot con anticorpo  $\alpha$ -S19.

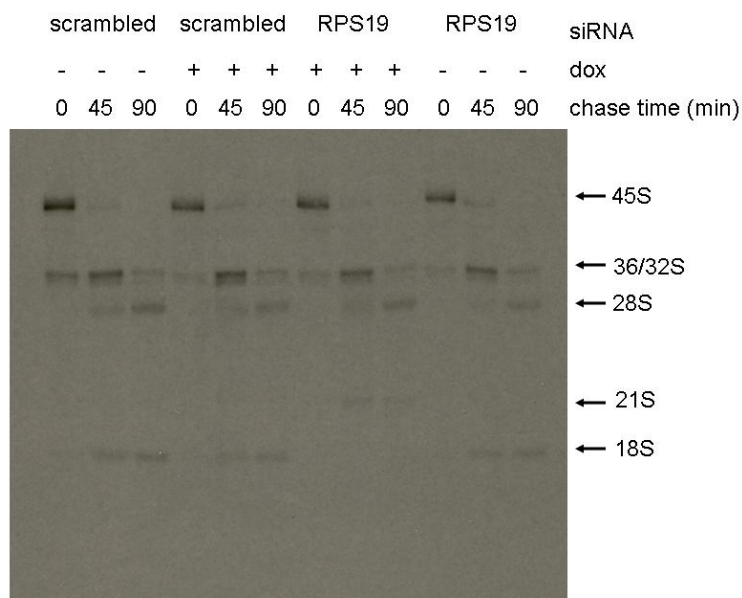


L'RNA totale estratto dalle cellule è stato separato per elettroforesi, trasferito su membrana di nylon e ibridato con oligonucleotidi marcati complementari a sequenze specifiche dell'rRNA (Fig. 3). Le cellule che esprimono gli siRNA per RPS19 mostrano una riduzione della forma matura del 18S e la comparsa di un precursore 21S (Fig. 3  $\beta$ ). Studi precedenti effettuati in lievito dimostrano che la delezione dei geni per RPS19 provoca l'accumulo di una forma immatura di rRNA 21S data dall'estensione dell'rRNA 18S in direzione 3' all'interno della sequenza ITS1. Perciò la membrana è stata strippata e incubata con tre sonde che ibridizzano l'rRNA in diverse posizioni della regione ITS1 (Fig 3  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) in modo da evidenziare che il silenziamento di RPS19 provoca la drastica riduzione del precursore 18S-E e l'accumulo della forma 21S che potrebbe terminare al sito 2 all'interno dell'ITS1, come suggerisce il confronto dei pannelli  $\delta$  e  $\epsilon$ .



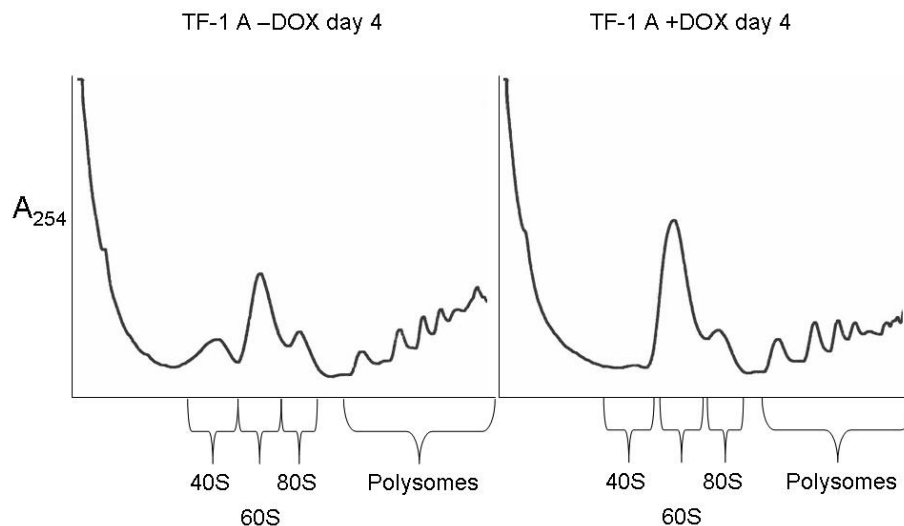
**Fig. 3** Northern blot da cellule TF-1 trattate o non trattate con DOX. A lato di ogni immagine è mostrata la posizione delle sonde utilizzate.

Per esaminare meglio il difetto nel processamento dell'rRNA nelle cellule difettive per RPS19 abbiamo effettuato un pulse and chase utilizzando cellule TF-1 B e scrambled coltivate in presenza o assenza di DOX. Durante il periodo di pulse la metionina marcata con trizio si equilibra con il pool di S-adenosil-metionina che è usato per metilare il pre-rRNA. Nel periodo di chase è stato aggiunto nuovo terreno di coltura contenente metionina non marcata. Come mostrato in Fig. 4 le cellule che esprimono gli siRNA per RPS19 producono una scarsa quantità di RNA 18S maturo nel corso dei 90' di chase e presentano un accumulo della forma 21S, in contrasto con quanto accade nelle cellule di controllo.



**Fig. 4** Pulse and chase effettuato su cellule TF-1 di controllo o esperimenti siRNA per RPS19.

Per capire se le cellule difettive per RPS19 hanno un'alterazione nella produzione delle subunità 40S sono stati esaminati i profili polisomiali dopo separazione dei lisati cellulari su gradiente di saccarosio. Le cellule cresciute in presenza di DOX mostrano il profilo tipico delle cellule difettive per la subunità 40S, caratterizzato dalla riduzione dei picchi 40S e 80S e dall'aumento della subunità libera 60S.



**Fig. 5** Profilo polisomiale di cellule TF-1 A trattate o non trattate con doxiciclina.

Per studiare se il difetto nella biogenesi della subunità ribosomiale 40S si ritrova anche nelle cellule dei pazienti l'RNA totale da cellule di midollo osseo CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup> ottenute da controlli sani e pazienti con o senza mutazioni in *RPS19* (Tabella 1 e 2) è stato isolato e sottoposto a northern blot.

Stato clinico	Genotipo	n <sup>c</sup>	21S/18S-E <sup>d</sup>	P value <sup>e</sup>
Controllo-1		2	1.3	
Controllo-2		5	1.0	
DBA-1	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	2	1.2	
DBA-2	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	2	1.2	
DBA-3	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	2	1.2	<0.4892
DBA-4	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	2	1.2	
DBA-5	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	2	0.8	
DBA-6	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	2	0.9	
DBA-7	<i>RPS19</i> <sup>-</sup> /breakpoint intron 3	2	3.1	

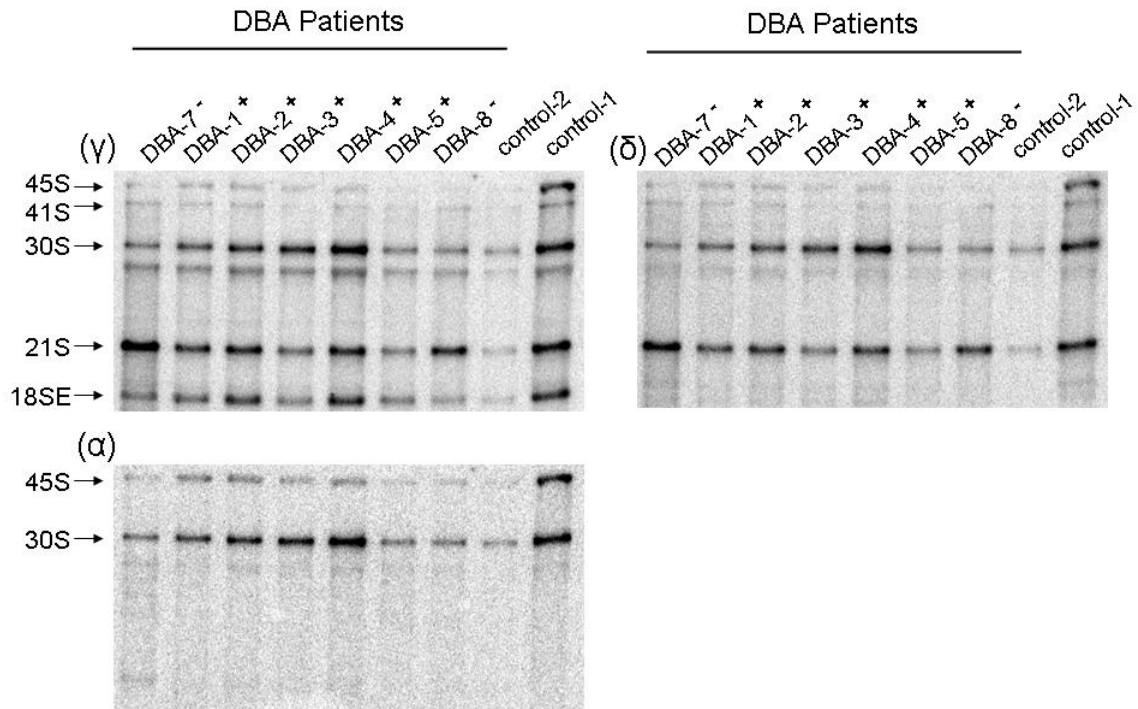
DBA-8	<i>RPS19</i> <sup>-</sup> /complete deletion	4	3.3	<0.0001
DBA-9	<i>RPS19</i> <sup>-</sup> /frameshift	2	3.8	

**Tab. 1** E' stato analizzato l'RNA isolato da cellule CD34<sup>-</sup> provenienti da 9 pazienti di cui 3 presentano mutazioni in *RPS19* (pazienti DBA-7, 8 e 9). Il rapporto densitometrico tra le bande 21S e 18S-E evidenziate dal northern blot e normalizzate per il Controllo-2 dello stesso gel è riportato come media di n° esperimenti. I P value derivano dal confronto tra la media dei valori per i pazienti *RPS19*<sup>+</sup> o *RPS19*<sup>-</sup> e la media dei controlli utilizzando il test t di Student.

Stato clinico	Genotipo	n <sup>c</sup>	21S/18S-E <sup>d</sup>	P value <sup>e</sup>
Controllo-1		3	1.4	
Controllo-2		3	1.0	
Controllo-3		2	1.2	
Controllo-4		3	1.2	
DBA-5	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	3	1.0	
DBA-6	<i>RPS19</i> <sup>+</sup>	3	0.9	
DBA-8	<i>RPS19</i> <sup>-</sup>	3	1.7	<0.003

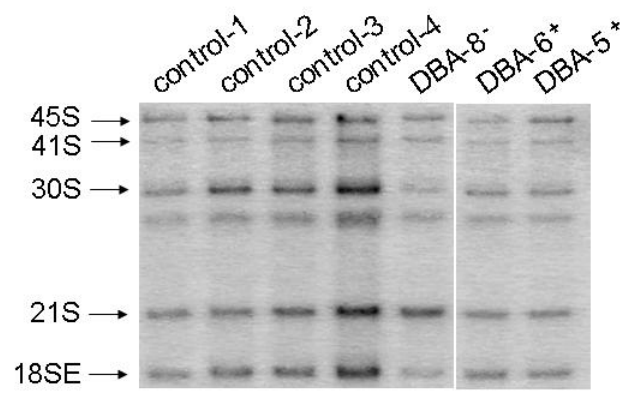
**Tab. 2** E' stato esaminato l'RNA isolato da cellule CD34<sup>+</sup> provenienti da 3 pazienti di cui 1 solo presenta una mutazione in *RPS19* (paziente DBA-8). Il rapporto densitometrico tra le bande 21S e 18S-E evidenziate dal northern blot e normalizzate per il Controllo-2 dello stesso gel è riportato come media di n° esperimenti. Il P value deriva dal confronto tra il valore del paziente DBA-8 e la media dei controlli utilizzando il test t di Student.

Il rapporto tra gli RNA 21S e 18S-E risulta aumentato nei pazienti con mutazioni in *RPS19* rispetto ai controlli, mentre non si rilevano differenze tra i controlli e i pazienti con *RPS19* wild type (Fig. 6  $\gamma$ ). La membrana è stata incubata anche con una sonda che ibridizza nella regione 5' dell'ITS1 e con una sonda per l'ETS1 in modo da confermare l'identificazione dei pre-RNA (Fig. 6  $\delta$  e  $\alpha$ ). Il rapporto 21S/18S-E nelle cellule con *RPS19* mutato è almeno 3 volte superiore a quello dei controlli, e questo indica che come avviene nelle cellule TF-1, in queste cellule CD34<sup>-</sup> il clivaggio del precursore rRNA a livello del sito E è alterato.



**Fig. 6** Northern blot di cellule CD34<sup>+</sup> isolate da controlli sani e pazienti DBA.

Si ipotizza che il difetto emopoietico primario nei pazienti DBA interessi gli stadi precoci della differenziazione eritroide; è stato pertanto esaminato il processamento dell'rRNA in cellule CD34<sup>+</sup> di pazienti e controlli sani. Le cellule CD34<sup>+</sup> del paziente DBA-8 con delezione in *RPS19* mostrano un aumento nel rapporto 21S/18S-E significativo ma modesto (Fig. 7 e Tab. 2), e il difetto del processamento di rRNA osservato nelle CD34<sup>-</sup> risulta essere meno marcato nelle CD34<sup>+</sup>.



**Fig. 7** Northern blot di cellule CD34<sup>+</sup> isolate da controlli e pazienti.

# DISCUSSIONE

L'anemia di Diamond Blackfan è un'aplasia congenita della serie rossa dovuta all'incapacità intrinseca dei progenitori eritroidi a differenziare mentre la maturazione delle altre linee emopoietiche appare normale. Il 25% dei pazienti presenta mutazioni nel gene che codifica per RPS19, ma non è noto il nesso tra questa proteina ribosomiale e l'eritropoiesi. I meccanismi patogenetici della DBA non sono chiari. Si ipotizza che alla base della malattia ci siano un difetto generico della sintesi proteica o l'alterazione di una seconda funzione, ancora sconosciuta, di RPS19. Nel lievito RPS19 è necessaria per la maturazione della subunità ribosomiale 40S e in sua assenza il complesso pre-40S contenente l'rRNA 21S precursore del 18S si accumula nel nucleo e non può andare incontro agli ultimi stadi di maturazione.

Per studiare il processamento dell'rRNA e delle subunità 40S in cellule umane difettive per RPS19 abbiamo utilizzato delle cellule TF-1 che esprimono in maniera inducibile gli siRNA per RPS19, e inoltre cellule da midollo osseo di pazienti eterozigoti per mutazioni nel gene *RPS19*. I risultati degli esperimenti condotti sulle cellule TF-1 indicano che, come nel lievito, le cellule difettive per RPS19 accumulano un pre-rRNA 21S che si estende oltre al 3' dell'rRNA 18S per un tratto della sequenza ITS1, probabilmente fino al sito di clivaggio 2. Un esperimento di pulse and chase ha dimostrato una ridotta produzione dell'rRNA 18S maturo nelle cellule in cui *RPS19* è silenziato mentre il profilo ribosomiale delle stesse cellule rivela un deficit delle subunità 40S. Quindi, come avviene nel lievito, la proteina RPS19 umana è richiesta per la maturazione delle subunità 40S e in particolare per il clivaggio dell'estremità 3' dell'rRNA 18S.

Il rapporto 21S/18S-E è stato utilizzato come indicatore della funzione di RPS19 nelle cellule di pazienti DBA e controlli sani. L'analisi delle cellule CD34<sup>-</sup> nei pazienti DBA con mutazione in RPS19 ha evidenziato un aumento del rapporto 21S/18S-E di 3-4 volte rispetto ai controlli sani. Questo incremento risulta essere meno pronunciato rispetto a quello osservato nelle TF-1, probabilmente perchè le cellule della linea eritroide costituiscono solo il 25% delle cellule CD34<sup>-</sup> e sono ancora meno numerose nei pazienti DBA.

Il riscontro di un difetto funzionale nel processo di maturazione della subunità 40S associato a bassi livelli di RPS19 supporta l'ipotesi che una sintesi ribosomiale difettiva sia alla base della patogenesi della DBA.

In questo studio sono state anche analizzate le cellule CD34<sup>+</sup> di pazienti DBA per valutare se il processamento dell'rRNA era difettivo come nelle cellule CD34<sup>-</sup>. La differenza nel rapporto

21S/18S-E è risultata meno marcata nelle CD34<sup>+</sup> che nelle CD34<sup>-</sup> dello stesso paziente con delezione completa di *RPS19*. Questo suggerisce che il difetto sia più grave nelle ultime fasi della differenziazione eritroide dopo la perdita dell'antigene CD34.

E' noto che l'espressione della proteina RPS19 come anche il livello di mRNA per RPS19 diminuiscono durante le fasi terminali della differenziazione eritroide (Da Costa et al., 2003; Hamaguchi et al., 2002). E' pertanto possibile che l'aploinsufficienza di RPS19 sia limitante per la maturazione della subunità 40S solo negli ultimi stadi della differenziazione eritroide quando il livello di RPS19 risulta fisiologicamente ridotto.



## BIBLIOGRAFIA

Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, Rommens JM, "Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome". *Nat Genet* 33, 97-101, 2003.

Da Costa L, Narla G, Willig TN, Peters LL, Parra M, Fixler J, Tchernia G, Mohandas N, "Ribosomal protein S19 expression during erythroid differentiation". *Blood* 101, 318-24, 2003.

Dianzani I, Garelli E, Ramenghi U, "Diamond-Blackfan Anemia: an Overview". *Pediatr Drugs* 2, 345-355, 2000.

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". *Nature Genetics* 21, 169-75, 1999.

Ellis SR and Massey AT, "Diamond Blackfan anemia: a paradigm for a ribosome-based disease". *Med Hypotheses* 66, 643-8, 2006.

Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis SR, "Human *RPS19*, the gene mutated in Diamond Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits". *Blood*, in press.

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". *Blood* 97, 2145-2150, 2001.

Gazda HT, Zhong R, Long L, Niewiadomska E, Lipton JM, Ploszynska A, Zaucha JM, Vlachos A, Atsidaftos E, Viskochil DH, Niemeyer CM, Meerpohl JJ, Rokicka-Milewska R, Pospisilova D, Wiktor-Jedrzejczak W, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA, "RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with *RPS19* mutations". *Br J Haematol* 127, 105-13, 2004.

Gazda *et al.* "Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia", 7<sup>th</sup> International Conference on Ribosome Synthesis, Airlie Conference Center, Warrenton, Virginia, USA, August 16-20, 2006

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". *Blood* 100, 2724-2731, 2002.

Hamaguchi I, Flygare J, Nishiura H, Brun AC, Ooka A, Kiefer T, Ma Z, Dahl N, Richter J, Karlsson S, "Proliferation deficiency of multipotent hematopoietic progenitors in ribosomal protein S19 (*RPS19*)-deficient diamond-Blackfan anemia improves following *RPS19* gene transfer". *Molecular Therapy* 7, 613-622, 2003.

Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauk SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I, "X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions". *Nat Genet* 19, 32-38, 1998.

Koga YM, Ohga SM, Nomura AM, Takada HM, Hara TM. "Reduced Gene Expression of Clustered Ribosomal Proteins in Diamond-Blackfan Anemia Patients Without *RPS19* Gene Mutations". *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 28, 355-361, 2006.

Leger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, Alvarez-Arias DA, Gas N, Bertolone SJ, Gleizes PE, Ellis SR, "Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis". *J Biol Chem* 280, 38177-38185, 2005.

Matsson H., Davey E.J., Drapchinskaia N., Hamaguchi I., Ooka A., Leveen P., Forsberg E., Karlsson S., Dahl N., "Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation". *Mol Cell Biol* 24, 4032-7, 2004.

Mazumder B, Sampath P, Seshadri V, Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL, "Regulated release of L13a from 60S subunit as a mechanism of transcript-specific translational control". *Cell* 115, 187-198, 2003.

Miyake K, Flygare J, Kiefer T, Utsugisawa T, Richter J, Ma Z, Wiznerowicz M, Trono D, Karlsson S, "Development of cellular models for ribosomal protein S19 (RPS19)-deficient diamond-blackfan anemia using inducible expression of siRNA against RPS19". *Molecular Therapy* 11, 627-637, 2005.

Orrù S, Aspesi A, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F, Ruoppolo M, Santoro C, Dianzani I, "Analysis of RPS19's interactome". Submitted

Perdahl EB, Naprstek BL, Wallace WC, Lipton JM, "Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis". *Blood* 83, 645-50, 1994.

Ridanpaa M, van Eenennaam H, Pelin K, Chadwick R, Johnson C, Yuan B, vanVenrooij W, Pruijn G, Salmela R, Rockas S, Makitie O, Kaitila I, de la Chapelle A, "Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia". *Cell* 104, 195-203, 2001.

Rouquette J, Choesmel V, Gleizes PE, "Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells". *EMBO J* 24, 2862-2872, 2005.

Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, Avruch J, Meyuhas O, "Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation". *Mol Cell Biol* 21, 8671-8683, 2001.

Volarevic S and Thomas G, "Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth". *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 65, 101-27, 2001.



## Seminari seguiti durante il terzo anno di dottorato

- 2 Novembre 2005 “Vascular myogenesis in zebrafish”, Dr. Massimo Santoro. DISCAFF, Novara
- 18 Novembre 2005 “Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits”, Dr. Diego Cotella. Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 23 Novembre 2005 “HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications”, Prof. Luigi Elio Adinolfi. Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 25 Novembre 2005 “Mechanisms of transcriptional regulation and disease”, Prof. Robert Tjian. Facoltà di medicina, Novara
- 27 Gennaio 2006 “JAK2 V617F: just another activated kinase or a gateway to understanding myeloproliferative diseases”, Steven R. Ellis, PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 29 Marzo 2006 “Immune deficient mouse models to assess human stem cell homing to tissue injury and hypoxia”, Jan A. Nolte PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 6 Aprile 2006 “Artemisinin: for malaria and beyond!”, Steven Meshnick MD PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 20 Aprile 2006 “Peripheral blood stem cells mobilization: the chemokine paradigm”, Louis Pelus PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 21 Aprile 2006 “Magnesium in drinking water and cardiovascular disease risks – Epidemiological and environmental aspects”, Ragnar Rylander MD. University of Louisville, KY, USA.
- 18 Maggio 2006 “Exosome modulation of T cell activation in cancer”, Douglas D. Taylor PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 1 Giugno 2006 “The myths and realities of stem cell therapy for central nervous system repair”, Scott Whittemore PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 5 Giugno 2006 “Biochemistry of cerebral malaria: tryptophan, kynurenine and glucose”, Nick Hunt PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 8 Giugno 2006 “Intracellular trafficking of microdomain components along endocytic and secretory pathways”, Amit Choudhury PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 14 Giugno 2006 “Human stem cells reach for the stars: deep space radiation and flight planning for extended duration missions to the moon and Mars”, Alan M. Gewirtz MD. University of Louisville, KY, USA.
- 6 Luglio 2006 “Involvement of chemokines in prostate cancer progression”, Shailesh Singh PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 4 Agosto 2006 “Bone marrow failure”, Monte Martin MD. University of Louisville, KY, USA.
- 11 Settembre 2006 “The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis”, Dieter Brömme PhD. Dipartimento Scienze Mediche, Novara.

## **Partecipazioni a congressi**

7<sup>th</sup> International Conference on Ribosome Synthesis, Airlie Conference Center, Warrenton, Virginia, USA, August 16-20, 2006

### **Abstract**

“Search for protein interactors of ribosomal protein S19, mutated in Diamond Blackfan Anemia”, Irma Dianzani, Annalisa Chiocchetti, Luisa Gibello, Adriana Carando, Paola Secco, Alessandra Biava, Anna Aspesi, Umberto Dianzani, Ugo Ramenghi, Stefania Orrù, Mara Angelini, Marianna Caterino, Margherita Ruoppolo, Fabrizio Loreni, Claudio Santoro. The American Society of Human Genetics Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, USA, October 25-29, 2005

“Defective 18S rRNA maturation in patients with Diamond Blackfan anemia”, Anna Aspesi, Johan Flygare, Joshua Cory Bailey, Stefan Karlsson and Steven R. Ellis. 7<sup>th</sup> International Conference on Ribosome Synthesis, Airlie Conference Center, Warrenton, Virginia, USA, August 16-20, 2006

“Alterations of ribosomal protein S19 function caused by mutations associated to Diamond-Blackfan anemia”, Fabrizio Loreni, Mara Angelini, Luisa Gibello, Anna Aspesi, Claudio Santoro, Irma Dianzani. 7<sup>th</sup> International Conference on Ribosome Synthesis, Airlie Conference Center, Warrenton, Virginia, USA, August 16-20, 2006

### **Pubblicazioni**

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 in press