

Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in
Medicina Molecolare

Ciclo XXI

Relazione II° anno

PATOGENESI
dell'ANEMIA di DIAMOND-BLACKFAN

Candidato: **Dr.^{ssa} ARMIRAGLIO MARTA**

Tutor: **Prof. Umberto Dianzani**

ATTIVITA' DI RICERCA

INTRODUZIONE

Universalmente, la sintesi proteica ha luogo nel ribosoma, una macchina macromolecolare a composizione ribonucleoproteica composta da due subunità, la maggiore e la minore, che presenta alcune differenze tra eucarioti e procarioti. In particolare, il ribosoma dei mammiferi comprende quattro molecole di RNA e circa 80 proteine ribosomali (RPs); 49 sono omologhe a RP archebatteriche e 32 di queste hanno anche un omologo eubatterico, mentre le rimanenti 31 sono presenti solamente negli eucarioti (Wool *et al.*, 1995).

L'eventualità che una patologia umana potesse essere causata da mutazioni in una RP divenne evidente per la prima volta nel 1999, quando mutazioni nel gene *RPS19* (MIM #603474) furono riscontrate nel 25% dei pazienti con anemia di Diamond-Blackfan (DBA) (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

La DBA (MIM #105650) è una rara ed eterogenea aplasia pura della serie rossa e presenta un'incidenza in Europa di circa sei casi per milione di nati vivi (Campagnoli *et al.*, 2004). La sua caratteristica clinica distintiva è l'anemia normocromica e macrocitica, che si rende evidente entro il primo anno di vita nella quasi totalità dei pazienti, mentre le altre linee emopoietiche si presentano generalmente prive di anomalie. Il midollo osseo è caratterizzato da normocellularità; ciò nonostante, i precursori eritroidi sono assenti o, se presenti, il loro numero risulta drammaticamente ridotto, probabilmente a causa dell'incapacità dei loro progenitori a differenziare. Il difetto eritropoietico è associato ad alti livelli sierici di acido folico, vitamina B12, eritropoietina (EPO) e adenosina deaminasi eritrocitaria (eADA) (Campagnoli *et al.*, 2004). Circa un terzo dei pazienti presentano malformazioni congenite (Lipton *et al.*, 2001).

Il 70% circa dei pazienti risulta responsivo alla terapia con steroidi, che di conseguenza è il trattamento più largamente seguito (Ball *et al.*, 1996; Willig *et al.*, 1999; Campagnoli *et al.*, 2004; Lipton *et al.*, 2006). La responsività a lungo termine è comunque estremamente variabile: sono stati infatti registrati casi di remissione completa così come casi di steroideo-resistenza. Se si verificano controindicazioni al proseguimento della terapia steroidea l'unica alternativa è rappresentata dalle trasfusioni croniche; purtroppo, gli effetti collaterali a lungo termine risultano in una prognosi infausta. L'unico trattamento curativo per la patologia, ad oggi, è rappresentato dal trapianto di cellule staminali (SCT) (Freedman, 2000).

Recentemente sono stati scoperte mutazioni in altri due geni codificanti per RP, *RPS24* (Gazda *et al.*, 2006) e *RPS17* (Cmejla *et al.*, 2007); ciò ha permesso di classificare definitivamente la DBA come ribosomopatia. Altri esempi di questo tipo di patologia sono la discheratosi congenita, la

sindrome di Treacher-Collins, la sindrome di Shwachman Diamond, e probabilmente anche la *cartilage hair hypoplasia* (CHH). E' interessante osservare che tutte le malattie elencate sono caratterizzate da disfunzioni a livello del midollo osseo e i pazienti affetti possono presentare malformazioni a livello scheletrico (Liu e Ellis 2006).

Il *link* tra il difetto in una proteina ribosomale e l'insorgenza di queste patologie non è ancora chiaro, ma l'attenzione è ora concentrata su un difetto biogenetico del ribosoma, sebbene l'ipotesi di una disfunzione di un ruolo extra-ribosomale di RPS19 resti sempre valida (Liu e Ellis, 2006).

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'rRNA 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).

RPS19

Il gene *RPS19* (*locus* 19q13.2) è composto da sei esoni e si estende per 11 kb. Il primo esone (372 bp) include la regione 5' UTR e, come molti altri mRNA codificanti per RPs, contiene un tratto di oligopirimidine di 13 nucleotidi (sequenza TOP) coinvolto nella regolazione traduzionale del messaggero. I restanti cinque esoni (435 bp) codificano per una proteina di 145 aminoacidi con peso

molecolare di 16 kDa; il 3' UTR si estende poi per 40 nucleotidi. Le dimensioni previste per l'intero trascritto di RPS19 sono quindi di 847 bp (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

RPS19, ubiquitariamente espressa, è una componente strutturale della subunità piccola del ribosoma e si colloca nelle vicinanze del sito di legame per eIF2 (Lutsch *et al.*, 1990); è una proteina piccola e non presenta motivi funzionali conosciuti.

L'identificazione di mutazioni in *RPS19* nei pazienti affetti da DBA ha portato a cercare di capire più a fondo quali siano i suoi ruoli molecolari. Esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che RPS19 si localizza principalmente nel nucleo e in modo particolare nel nucleolo, dove colocalizza con la più abbondante tra le proteine nucleolari, la nucleolina (Da Costa *et al.*, 2003). Come atteso, RPS19 è però presente anche nel citoplasma, soprattutto in qualità di costituente del ribosoma (Angelini *et al.*, 2007). Grazie all'utilizzo di mutanti delezionali all'N- o al C-terminale sono stati identificati due segnali di localizzazione nucleolare (NoS): uno comprende i primi 16 aminoacidi (Met1-Arg16), mentre il secondo si estende da Gly120 a Asn142. Mutazioni che cadono all'interno di questi NoS portano ad una drammatica diminuzione del livello proteico, probabilmente incentivata da un'errata localizzazione subcellulare che porta ad un aumento della degradazione (Da Costa *et al.*, 2003).

Come altre RP, RPS19 possiede anche funzioni extra-ribosomali. Dimeri di RPS19 isolati da estratti di lesioni sinoviali nell'artrite reumatoide (Nishiura *et al.*, 1996) mostrano un'attività chemiotattica per i monociti (Shibuya *et al.*, 2001). Inoltre, RPS19 interagisce con FGF-2 (Soulet *et al.*, 2001), con la *RPS19 binding protein*, una proteina nucleolare la cui funzione è ad oggi sconosciuta (Maeda *et al.*, 2006), e PIM-1, una serina-treonina chinasi la cui espressione è strettamente correlata con le citochine ematopoietiche. *In vitro*, l'interazione tra RPS19 e PIM-1 conduce alla fosforilazione della proteina ribosomale (Chiocchetti *et al.*, 2005).

Recentemente è stato pubblicato l'intero interattoma di RPS19: è interessante osservare che la maggior parte degli interattori sono nucleolari e includono numerose RP, componenti del pre-ribosoma ed elicasi (Orrù *et al.*, 2007). Ciò è in accordo con la scoperta che RPS19 è essenziale per la maturazione dell'rRNA 18S sia nel lievito (Léger-Silvestre *et al.*, 2005) che nell'uomo (Flygare *et al.*, 2007; Choesmel *et al.*, 2007; Idol *et al.*, 2007) e per l'assemblamento del complesso pre-40S (Léger-Silvestre *et al.*, 2005).

L'elevata solubilità di RPS19 umana ha impedito per lungo tempo gli studi di cristallizzazione. Questo problema è stato recentemente risolto grazie alla scelta di utilizzare *Pyrococcus abissi*, un archebatterio ipertermofilo la cui RPS19 ha un'identità del 36% ed un'omologia del 57% con RPS19 umana. La struttura della RP ha potuto quindi essere definita come una matassa di cinque α -elicche contenenti gli aminoacidi *target* delle mutazioni *missense* (Gregory *et al.*, 2007).

SCOPO DEL LAVORO

Durante il secondo anno di dottorato la mia ricerca si è focalizzata sulla comprensione del ruolo extra-ribosomale di RPS19 studiando i suoi interattori.

In primo luogo mi sono concentrata su PIM-1, interattore identificato grazie ad uno *screening* per *two-hybrid* effettuato nel nostro laboratorio (Chiocchetti *et al.*, 2005). Durante il mio primo anno di dottorato avevo cercato di mappare il sito di interazione tra le due proteine utilizzando una nuova tecnica, il *Protein Complementation Assay* (PCA) messa a punto dal Prof. Daniele Sblattero del nostro dipartimento. Purtroppo, avendo incontrato numerosi problemi, abbiamo concluso che questa tecnica non fosse adatta al nostro scopo e, di conseguenza, è stata abbandonata.

Ho quindi deciso di identificare la regione di PIM-1 coinvolta nell'interazione con RPS19 utilizzando l'approccio dei mutanti delezionali.

Inoltre dal lavoro dello scorso anno, grazie alla collaborazione con la Prof.^{ssa} Margherita Ruoppolo dell'Università "Federico II" di Napoli, è stato pubblicato l'interattoma completo di RPS19 (Orrù *et al.*, 2007). I risultati sono stati interessanti e a questo punto ci siamo chiesti se alcune mutazioni *missense* riscontrate nei pazienti DBA possano influire sull'interattoma della nostra RP. La ricerca degli interattori delle proteine mutate è stata quindi condotta come descritto per la proteina *wild-type* (Orrù *et al.*, 2007).

Inoltre, grazie ad una collaborazione con il Prof. Stefan Karlsson dell'Università di Lund (Svezia), abbiamo avuto la possibilità di lavorare su cellule TF-1 trasdotte con un lentivirus codificante per dei siRNA in grado di downregolare l'espressione di RPS19. Quello che vogliamo fare è quindi mimare la situazione di aploinsufficienza riscontrata nei pazienti e quindi ridurre l'espressione della RP del 50% per analizzare le variazioni dell'espressione genica globale, valutando la variazione dei livelli sia del trascrittoma (in collaborazione con il Prof. Stefano Gustincich, SISSA, Trieste) che del proteoma (in collaborazione con la Prof.^{ssa} Margherita Ruoppolo).

MATERIALI E METODI

Preparazione dei mutanti delezionali di PIM-1

Per mappare la regione di PIM-1 impegnata nell'interazione con RPS19 è stato deciso di costruire dei mutanti delezionali della serina-treonina chinasi.

Sono stati preparati quattro costrutti, codificanti rispettivamente per il dominio chinasi, la regione N-terminale, la porzione centrale della proteina e la regione C-terminale. I mutanti delezionali di PIM-1 sono stati ottenuti mediante PCR utilizzando come stampo il plasmide pGEX4T-1-PIM-1 ed i seguenti primer:

Dominio chinasi:

Pim1 38-290 fwd 5' AAGGAATTCTACCAGGTGGGCCCG 3'

Pim1 38-290 rev 5' AAGTCTAGACTACATCCATGGATGGTTCTG 3'

Regione N-terminale:

Pim1 38-290 Rev 5' AAGTCTAGACTACATCCATGGATGGTTCTG 3'

PCF 5' TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT 3'

PIM1 1-120 rev 5' AAGTCTAGACTACAGGATCAGGACGAAAC 3'

Regione centrale:

PIM1 121-220 fwd 5' AAGGAATTCGAGAGGCCCGAGCCGGTG 3'

PIM1 121-220 rev 5' AAGTCTAGACTAGCCATGGTAGCGATGGTAGCG 3'

Regione C-terminale:

PIM1 221-313 fwd 5' AAGGAATTCAGGTCGGCGGCAGTC 3'

PCR 5' GCAACTAGAAGGCACAGTCGAG 3'

Le condizioni di PCR utilizzate sono: 50 ng di DNA template, 0,5 μ M di ogni primer, 200 μ M di miscela di dNTPs, 2,5 mM di magnesio. E' stata utilizzata la Taq polimerasi (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) con il suo buffer.

I prodotti della reazione sono stati controllati su gel di agarosio per verificarne l'esatto peso molecolare.

Il vettore pcDNA3-Flag e gli inserti ottenuti mediante PCR sono stati digeriti con EcoRI e XbaI (New England Biolabs) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

La ligazione è stata eseguita con la T4 DNA Ligase (Invitrogen) seguendo il protocollo consigliato dal fornitore. Il prodotto della ligazione è stato trasformato in batteri *E. coli* del ceppo TOP10. Il costrutto di interesse è stato estratto dai batteri mediante miniprep (Sigma-Aldrich) e sequenziato per verificare l'assenza di mutazioni.

Traduzione in vitro

La sintesi di proteine *in vitro* è stata effettuata utilizzando il kit TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega), che permette la trascrizione accoppiata alla traduzione di un cDNA sotto il controllo del promotore T7.

La reazione è stata effettuata seguendo le istruzioni della casa produttrice. In breve, 1 µg di DNA plasmidico è stato incubato con 25 µl di reticolociti di coniglio, 2 µl di buffer TNT, 1 µl di polimerasi T7, 0,5 µl di miscela di aminoacidi privi di metionina, 0,5 µl di miscela di aminoacidi privi di cisteina, 1 µl di RNasi-in e acqua sterile priva di nucleasi fino al volume finale di 50 µl. Nel controllo negativo il DNA stampo consiste nel plasmide vuoto.

I campioni vengono incubati per 2 ore a 30 °C e controllati caricando 1, 2, 5 e 10 µl di ogni reazione su un SDS-Page e rivelate con un anticorpo monoclonale anti-Flag.

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) per ottenere il costrutto pGEX-RPS19. Come controllo negativo è stato utilizzato il vettore pGEX4T-1 vuoto, codificante per il GST.

L'espressione delle proteine GST e GST-RPS19 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 (Amersham Biosciences). 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.

Coltura cellulare

Le cellule eritroleucemiche umane K-562 (ATCC#CCL-243) e TF-1 (ATCC#CRL-2003) sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) al 10% di siero fetale bovino (Invitrogen Gibco) e addizionato di antibiotici (100 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomina), in un incubatore a 37 °C con atmosfera satura di vapore acqueo e al 5% di CO₂.

Nelle cellule TF-1 è stato aggiunto il fattore di sopravvivenza GM-CSF ad una concentrazione di 5 ng/ml. L'attivazione dei siRNA per la downregolazione di RPS19 è stata effettuata mediante trattamento con doxiciclina ad una concentrazione di 0,5 µg/ml per 96 ore.

Preparazione dell'estratto proteico totale di cellule K-562

Per preparare l'estratto proteico totale sono state raccolte 10^8 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 μ g/ml leupeptina, 8 μ g/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 $MgCl_2$, 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).

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 μ g) e ripetendo l'esperimento per sei volte per poter ottenere una sufficiente quantità di materiale.

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. 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.

Spettrometria di massa

L'analisi spettrometrica per l'identificazione degli interattori proteici di RPS19 è stata eseguita presso il laboratorio della Prof.^{ssa} Margherita Ruoppolo.

Dagli eluati, ottenuti rispettivamente dalle resine coniugate a GST e GST-RPS19, sono stati preparati due *pool* proteici, successivamente frazionati su gel monodimensionale di 13 cm all'8-18% di poliaccrilammide e rivelati con blue di Coomassie. Ciascuna corsia del gel è stata poi suddivisa in 65 frammenti da 2 mm e le proteine sono state sottoposte a riduzione con DTT (ditiotreitolo), alchilate con iodoacetammide e infine digerite con tripsina modificata. Le miscele di peptidi così ottenute sono state analizzate in duplicato tramite μ LCMS/MS (Orrù *et al.*, 2003).

I dati sono stati convertiti in formato Mascot e analizzati con il software MatrixScience (www.matrixscience.com), utilizzando il *NCBI non-redundant protein sequence database*.

Allo scopo di individuare la mappa di interazioni proteiche, è stato utilizzato un approccio combinatorio tra spettrometria di massa e metodi ortogonali *in silico* (Miles *et al.*, 2005).

Western blot

Dopo la separazione mediante SDS-PAGE i campioni sono stati trasferiti dal gel ad una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad) 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 anti-Flag (Sigma-Aldrich) preparato in BSA, che è stato utilizzato seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Successivamente il filtro è stato lavato per 4 volte in TBS-T, incubato per 1 ora a RT con l'appropriato anticorpo secondario AP-coniugato e lavato in TBS-T. Le proteine sono state visualizzate con il metodo colorimetrico.

RISULTATI

Mappaggio del sito di interazione tra RPS19 e PIM-1

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.

I costrutti sono stati preparati come descritto in materiali e metodi e la corretta espressione delle proteine è stata testata mediante western-blot con un anticorpo monoclonale anti-Flag. Purtroppo non è stato possibile rilevare la presenza delle proteine con questo metodo, probabilmente perché la quantità di proteina ottenuta era troppo bassa per la sensibilità della tecnica. In futuro quindi prepareremo delle proteine marcate con [³⁵S], tecnica che permetterà di visualizzare anche quantità molto minori di proteina.

Identificazione dell'interattoma dei mutanti missense di RPS19

Per determinare se le mutazioni *missense* rinvenute nei pazienti DBA influissero sull'interattoma di RPS19 abbiamo deciso di ripetere l'esperimento descritto in Orrù *et al.*, 2007, utilizzando come esche i tre mutanti V15F, R62W e R101H. I costrutti per questi tre mutanti sono stati ottenuti come descritto in Chiocchetti *et al.*, 2005.

Dopo l'analisi mediante spettrometria di massa abbiamo ottenuto i risultati mostrati in tabella 1.

Determinazione della variazione della sintesi proteica globale in assenza di RPS19

Per determinare se l'aploinsufficienza per RPS19 riscontrabile nei pazienti DBA porti ad una deregolazione della sintesi proteica globale abbiamo deciso di utilizzare il modello cellulare descritto in Miyake *et al.*, 2005. Dopo aver ridotto l'espressione di RPS19 fino al 50% del totale le cellule sono state raccolte e inviate nel laboratorio della Prof.^{ssa} Margherita Ruoppolo presso l'Università "Federico II" di Napoli per l'analisi mediante DIGE e nel laboratorio del Prof. Stefano Gustincich presso il SISSA di Trieste per un'analisi mediante microarray per valutare le variazioni di espressione degli RNA messaggeri.

Siamo in attesa dei risultati di entrambi gli esperimenti.

Tabella 1. Interattoma di RPS19 wild-type e dei mutanti missense V15F, R62W e R101H.

Gene	Protein description	n peptidi identificati			
		WT	R101H	R62W	V15F
NTPase activity					
DOCK8	dedicator of cytokinesis 8		2		
GTPBP4	GTP/binding protein NGB (G protein binding CRFG)	5		1	
PSMC5	proteasome 26S ATPase subunit 5	6			
PSMC6	proteasome 26S ATPase subunit 6	1	1		
RAB11B	RAB11B member RAS oncogene family	1			
XAB1	XPA binding protein 1, GTPase	1	1		
Hydrolase/helicase activity					
DDX5	growth regulated nuclear 68 protein (DEAD box polypeptide 5)	5			
DDX17	DDX17 protein	1			2
DDX18	RNA helicase (DEAD box polypeptide 18)	4		1	
<u>DDX21</u>	<u>RNA helicase II / Gu protein (DEAD box polypeptide 21)</u>	<u>25</u>	<u>6</u>	<u>1</u>	<u>4</u>
DDX24	DEAD box polypeptide 24	1			
DDX3X	dead box , X isoform (DEAD box polypeptide 3)	2			
DDX41	DEAD box protein abstrakt	1			
DDX50	DEAD box polypeptide 50 (Nucleolar protein GU2)	4			1
<u>DDX54</u>	<u>ATP/dependent RNA helicase (DEAD box polypeptide 54)</u>	<u>17</u>		<u>2</u>	
<u>DHX9</u>	<u>RNA helicase A (DEAH box polypep. 9)</u>	<u>28</u>	<u>14</u>	<u>1</u>	<u>3</u>
DHX15	DEAH box polypeptide 15	1			
DHX36	DEAH box polypeptide 36	3			
MCM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	2			
MCM6	p105MCM (MCM6 minichromosome maintenance deficient 6)	3			
MCM7	p85MCM protein (MCM7 minichromosome maintenance deficient 7)	2			

RUVBL2	RuvB-like 2	1			2
SKIV2L2	superkiller viralicidic activity 2-like 2 S. Cearevisie	1			
<u>SMARCA5</u>	<u>SWI/SNF related, matrix associated,actin dependent regulator of chromatin,subfamily a, member 5</u>	<u>14</u>			
XRN2	Dhm1-like protein (5'-3' exoribonuclease 2)	4			1
Isomerase activity					
<u>DKC1</u>	<u>Cbf5p homolog (dyskerin)</u>	<u>2</u>			
PPIH	peptidyl prolyl isomerase H	2			
Kinase activity					
CSNK2A1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	1			
SRP72	signal recognition particle 72	2			
PRKCQ	delta 2 isopentenyl pyrophosphate transferase like protein (protein kinase C,theta)	1			
Splicing factor activity					
SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	6			
SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa	2			
SF3B3	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	9)	3		2
SFRS9	splicing factor Arg/Ser 9	2			1
SFRS10	splicing factor arg/ser rich 10	2		1	1
Structural constituent of Ribosome					
RPL10A	60S ribosomal protein L10a	2			
RPL14	60S ribosomal protein L14	3		2	2
RPL24	60S ribosomal protein L24	2		1	1
RPL27A	60S ribosomal protein L27a	1		1	1
RPL3	60S ribosomal protein L3	1	1	2	
RPL4	60S ribosomal protein L4	1		1	
RPL6	60S ribosomal protein L6	1			
RPL7	60S ribosomal protein L7	8	5	2	1
RPL7A	60S ribosomal protein L7a	1	1	1	1
RPL8	60S ribosomal protein L8	1		1	1
RPL9	60S ribosomal protein L9	1			
RPLP0	60S ribosomal protein P0	1		1	
RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1 isoform 1	1			
RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	1			
RPS10	40S ribosomal protein S10	1			
RPS11	40S ribosomal protein S11		2		1
RPS14	40S ribosomal protein S14	1		1	
RPS15A	40S ribosomal protein S15A				2
RPS16	40S ribosomal protein S16	6		2	
RPS18	40S ribosomal protein S18				3
RPS2	40S ribosomal protein S2	1		1	
RPS21	40S ribosomal protein S21				1
RPS23	40S ribosomal protein S23	1		1	1
RPS24	40S ribosomal protein S24	2			
RPS25	40S ribosomal protein S25		1		2
RPS26	40S ribosomal protein S26	2		1	1
RPS3	40S ribosomal protein S3	7	7	5	1
RPS4X	40S ribosomal protein S4, X-linked	4		1	2
RPS5	40S ribosomal proteinS5	1			

RPS6	40S ribosomal protein S6	2	1	3	
RPS7	40S ribosomal protein S7	1			
RPS8	40S ribosomal protein S8	1	1	1	1
RPS9	40S ribosomal protein S9				1
RPSA	ribosomal protein SA	5	2	2	
RSL1D1	PBK1 protein	15	4		
Transcription factor					
BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	1			
HNRPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D2	2	1		1
ILF2	interleukin enhancer binding factor 2	6	1	1	
ILF3	nuclear factor associated with dsRNA NFAR-2	6			1
NKRF	transcription factor NRF	6			
TAF15	TLS protein (TBP-associated factor 15)	1			
TRIM28	tripartite motif-containing 28	1			1
PURA	purine-rich element binding protein A	2	1		
UBTF	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	4			
<u>XPO5</u>	<u>exportin 5</u>	<u>3</u>			
YBX1	DNA binding protein B	2	3	2	1
Transferase activity					
FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	2		1	1
<u>FTSJ3</u>	<u>FtsJ homolog 3 (E. coli)</u>	<u>9</u>			
NAT10	N-acetyltransferase 10 (FLJ10774)	3		1	2
<u>NOL1</u>	<u>proliferating cell nuclear protein p120 (NOL protein 1)</u>	<u>9</u>			<u>1</u>
ZC3HAV1	Zinc finger CCCH type, antiviral 1	1			
Transporter activity					
COPA	coatamer protein complex, subunit alpha	14	6		2
COPB2	coatamer protein complex, subunit beta 2	1			
<u>CSE1L</u>	<u>CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)</u>	<u>9</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	
IPO4	importin 4	2			
IPO7	importin 7	2			
IPO8	importin 8				3
<u>KPNB1</u>	<u>karyopherin (importin) beta 1</u>		<u>5</u>		
NPEPL1	aminopeptidase like 1	1			
STAU1	Staufen protein	1			
SSR4	signal sequence receptor delta	1			
<u>XPO1</u>	<u>exportin 1 (CRM1 homolog yeast)</u>	<u>5</u>			
DNA/RNA/protein binding capacity					
AATF	Ded protein (Apoptosis antagonizing transcription factor)	1			
ACTR1B	ARP1 actin-related protein 1homolog B, contractin beta	1			
<u>ASCC3L1</u>	<u>activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1</u>		<u>8</u>		<u>1</u>
BYSL	bystin-like		2		
C1orf77	DKFZP547E1010 protein	1			
CCT2	chaperonin containing TCP1,subunit 2 (beta)	1			
CCT8	chaperonin containing TCP1,subunit 8 (theta)	1			
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein zeta	10	4		2
CENPC1	centromere protein C 1	3			
COPG	coatamer protein complex, subunit gamma 1	3			

<u>DHX30</u>	<u>DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box</u>	16			
DNAJC9	DnaJ homolog, subfamily C, member 9	2		1	
FBL	fibrillarin, U3 small nucleolar interacting protein 1	3			
FUSIP1	FUS interacting protein (serine/arginine rich) 1	1	1	1	1
<u>GCN1L1</u>	<u>GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)</u>		10		
GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like	1		3	
HIST1H1C	beta polypeptide 2-like 1	2			
HIST1H1D	Histone H1 member 3	2			2
HIST1H2AK	H2A histone family	1			
HIST1H2BL	H2B histone family, member C	1			
HIST1H2BO	histone 1, H2bo	2		1	1
HIST2H4	histone 2 H4	4		1	
HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	3			
HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1			1
HNRPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	3	6	1	3
HNRPCL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like1				1
HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (A+U-rich element RNA binding factor)	1			
HNRPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	5	5	2	
HNRPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)		1		
HNRPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	5	1	1	2
HNRPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	4		2	
HNRPUL2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	1			
HP1BP3	HP1-BP74	4		2	
IGF2BP1	IGF-II mRNA-binding protein 1	4			
IGF2BP3	Koc1 (IGF-II mRNA-binding protein 3)	5			
IMP3	U3 snoRNP protein 3 homolog	1		1	
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	1			
LYAR	hypothetical protein FLJ20425	2	2		
MKI67IP	MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein [<i>Homo sapiens</i>]		1		
<u>NCL</u>	<u>Nucleolin</u>	9			
NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein Nip7 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1			
NOLA1	nucleolar protein family A member 1(H/ACA small nucleolar RNPs)	3			
NOL5A	hNop56	1			
PABPC3	poly(A) binding protein	1			
PAK1IP1	PAK/PLC-interacting protein 1	3			
<u>PDCD11</u>	<u>programmed cell death 11 [<i>Homo sapiens</i>]</u>		9		
	<u>Involved in the biogenesis of rRNA</u>				
PNN	pinin, desmosome associated protein	3			
PPP2R1A	PAK/PLC-interacting protein 1	1			
PPP2R2A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform				3
RAB1B	RAB1B member RAS oncogene family	1			
RAP1B	RAP1B member RAS oncogene family	1			
RBM19	RNA binding motif 19	3			
RBM34	RNA binding motif protein 34				1
RBMX	RNA binding motif protein, X-linked (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G)	4	4	1	
RNPC2	RNA-binding region containing protein 2	2			
S100A7	S100 calcium binding protein A7				3

SART3	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells 3	4			
SET	SET translocation (myeloid leukemia-associated)				1
SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' (U2 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A')	1	1	1	
SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	1			
SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	2		2	
SRP68	signal recognition particle 68	1			
SURF6	surfeit protein 6	1			
SYNCRIP	NS1 associated protein	2			
YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide [<i>Homo sapiens</i>] 14-3-3 epsilon; mitochondrial import stimulation factor L subunit; protein kinase C inhibitor protein-1; tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide			1	
Other function					
Dehydrogenase activity					
DPYD	dehydroypyrimidine dehydrgenase	1			
Ligase activity					
MARS	methionine-tRNA synthetase	3			
Oxidoreductase activity					
CBR1	carbonyl reductase 1				1
Peptidase activity					
SEC11L1	signal peptidase complex 18Kda	1			
Proteasome activator activity					
ADRM1	adhesion regulating molecule 1				1
Receptor activity					
REEP6	receptor accessory protein 6	1			
rRNA processing					
RRP1	ribosomal RNA processing 1 homolog (S. cerevisiae)		1		1
Translation elongation factor activity					
EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	2			
<u>EEF1A1</u>	<u>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</u>		<u>5</u>		<u>1</u>
Unknown function					
EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2	3	1		1
GPIAP1	GPI-anchored protein p137 precursor	1			
HDCMA18P	hypothetical protein DKFZp564K112.1 (HDCMA18P)	2			
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)	1	1		
MGC3731	hypothetical protein LOC79159	1			
NOC2L	nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae; hypothetical protein DKFZp564C186.1)	3			

NOC3L	nucleolar complex associated 3 homolog (S. cerevisiae)	5
NOL10	nucleolar protein 10 (hypothetical protein FLJ14075)	2
NOLA3	nucleolar protein family A, member 3	1
PES1	Pescadillo homolog 1 containing BRCT domain	1
<u>RBM12B</u>	<u>RNA binding motif protein 12B</u>	<u>12</u>
RP13-36C9.1	cancer/testis antigen CT45-2	2
SYNGR2	synaptogyrin 2	1

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. L'approccio scelto si basa sulla

costruzione di mutanti delezionali di PIM-1 i quali, dopo essere stati tradotti *in vitro*, verranno o meno purificati per affinità utilizzando la proteina ricombinante GST-RPS19. Purtroppo il kit utilizzato per la traduzione *in vitro* non produceva una quantità di proteina adeguata alla rilevazione tramite western-blot con l'anticorpo in nostro possesso, quindi l'esperimento verrà ripetuto producendo proteine marcate con [³⁵S].

L'identificazione dell'interattoma dei mutanti di RPS19 ha invece dato esiti positivi, nonostante i problemi sperimentali incontrati. Le proteine ricombinanti mutate, infatti, si esprimevano meno efficientemente rispetto alla proteina selvatica e risultavano probabilmente meno solubili e quindi meno capaci di interagire con gli interattori presenti nel lisato cellulare. Abbiamo quindi dato un significato all'esperimento cercando di non considerare le differenze con quelle proteine che nell'interattoma di RPS19 *wild-type* erano poco rappresentate. Parimenti, non sono state considerate quelle proteine identificate da un numero di peptidi diverso ma comunque simile nel *wild-type* rispetto ai mutanti.

I risultati ottenuti da questo studio sono stati rafforzati dalla recente pubblicazione della struttura tridimensionale di RPS19 (Gregory *et al.*, 2007), non disponibile quando abbiamo iniziato il nostro lavoro. I mutanti da noi utilizzati per l'esperimento fanno parte di due diverse categorie: V15 è un aminoacido molto importante per la struttura della proteina, quindi una sua mutazione fa cambiare radicalmente la struttura e quindi anche le interazioni ne risultano modificate. Da precedenti esperimenti effettuati nel laboratorio sappiamo inoltre che questo mutante ha una stabilità molto ridotta rispetto al *wild-type*. I rimanenti due aminoacidi di cui abbiamo considerato le mutazioni, R62 e R101, sono invece collocati all'esterno, quindi esposti al solvente e sicuramente più impegnati del precedente nelle interazioni. Inoltre, si trovano ognuno in una delle due regioni estremamente conservate e importanti per la proteina (Gregory *et al.*, 2007). Il fatto che i tre mutanti scelti da noi si collochino in regioni così diverse giustifica il fatto che gli interattomi identificati mediante spettrometria di massa presentino alcune differenze.

In tabella 1 è riportato l'elenco completo delle identificazioni, ma negli studi successivi saranno considerate solo quelle evidenziate dalla sottolineatura, scelti perché le differenze con la proteina selvatica sono state considerate rilevanti. Di questi interattori selezionati cercheremo quindi di capire meglio l'importanza dell'interazione con RPS19. Per fare questo, verranno prodotte sia la proteina selvatica sia le mutanti in fusione con gli epitopi Flag e GST e successivamente utilizzate in esperimenti di competizione.

Nel frattempo siamo in attesa dei risultati della DIGE e del microarray di espressione: risultati interessanti verranno successivamente approfonditi per capire se RPS19 possa svolgere un ruolo di controllo sulla traduzione o se possa influire sulla stabilità di proteine e/o RNA.

BIBLIOGRAFIA

- Angelini M, Cannata S, Mercaldo V, Gibello L, Santoro C, Dianzani I, Loreni F. Diamond-Blackfan Anemia affect the assembly of ribosomal protein S19 into the ribosome. 2007. *Hum Mol Genet.* 16:1720-1727.
- Ball SE, McGuckin CP, Jenkins G, Gordon-Smith EC. 1996. Diamond-Blackfan anaemia in the U.K.: analysis of 80 cases from a 20-year birth cohort. *Br J Haematol.* 94:645-653.
- Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, Longoni D, Pecile V, Zecca M, Dufour C, Ramenghi U, Dianzani I. 2004. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica.* 89:480-489.
- Chiocchetti A, Gibello L, Carando A, Aspesi A, Secco P, Garelli E, Loreni F, Angelini M, Biava A, Dahl N, Dianzani U, Ramenghi U, Santoro C, Dianzani I. 2005. Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica.* 90:1453-1462.
- Choesmel V, Bacqueville D, Rouquette J, Noaillac-Depeyre J, Fribourg S, Cretien A, Leblanc T, Tchernia G, Da Costa L, Gleizes PE. 2007. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 109:1275-1283.
- Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. 2007 Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2007 Jul 23; [Epub ahead of print].
- Da Costa L, Tchernia G, Gascard P, Lo A, Meerpohl J, Niemeyer C, Chasis JA, Fixler J, Mohandas N. 2003. 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. *Blood.* 101:5039-5045.
- 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. 1999. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* 21:169-175.

Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis S. 2007. Human RPS19, the gene mutated in Diamond Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*. 109:980-986.

Freedman MH. 2000. Diamond-Blackfan anaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 13:391-406.

Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313:17-42.

Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, Vlachos A, Atsidaftos E, Ball SE, Orfali KA, Niewiadomska E, Da Costa L, Tchernia G, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Stahl J, Schrott G, Glader B, Backer K, Wong C, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA. 2006. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet*. 79:1110-1118.

Gregory LA, Aguisa-Touré A-H, Pinaud N, Legrand P, Gleizes P-E, Fribourg S. 2007. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: structure and function analysis of RPS19. *Nucleic Acids Res*. 2007 Aug 28; [Epub ahead of print]

Idol RA, Robledo S, Du HY, Crimmins DL, Wilson DB, Ladenson JH, Bessler M, Mason PJ. 2007. Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells Mol Dis*. 39:35-43.

Léger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, Alvarez-Arias DA, Gas N, Bertolone SJ, Gleizes, PE, Ellis SR. 2005. Specific role of yeast homologs of the Diamond-Blackfan anemia associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *J. Biol. Chem*. 280:38177-38185.

Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. 2006. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer*. 46:558-564.

Liu JM, Ellis SR. 2006. Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood*. 107:4583-4588.

Lutsch G, Stahl J, Kargel HJ, Noll F, Bielka H. 1990. *European Journal of Cell Biology*. 51:140-150.

Maeda N, Toku S, Kenmochi N, Tanaka T. 2006. A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun*. 339:41-46.

Miles RR, Crockett DK, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. 2005. Analysis of BCL6-interacting proteins by tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 4:1898-1909.

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. 2005. *Mol Ther*. 11:627-637.

- Nierhaus KH. The assembly of prokaryotic ribosomes. 1991. *Biochimie*. 73:739-755.
- Nishiura H, Shibuya Y, Matsubara S, Tanase S, Kambara T, Yamamoto T. 1996. Monocyte chemotactic factor in rheumatoid arthritis synovial tissue. Probably a cross-linked derivative of S19 ribosomal protein. *J Biol Chem*. 271:878-882.
- Orrù S, Aspesi A, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F, Ruoppolo M, Santoro C, Dianzani I. 2007. Analysis of the ribosomal protein S19 interactome. *Mol Cell Proteomics*. 3:382-393.
- Orrù S, Caputo I, D'Amato A, Ruoppolo M, Esposito C. 2003. Proteomics identification of acyl-acceptor and acyl-donor substrates for transglutaminase in a human intestinal epithelial cell line. Implications for celiac disease. *J. Biol. Chem*. 278:31766-31777.
- Shibuya, Y., Shiokawa, M., Nishiura, H., Nishimura, T., Nishino, N., Okabe, H., Takagi, K., Yamamoto, T. 2001. Identification of receptor-binding sites of monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *Am. J. Pathol*. 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*. 289:591-596.
- Willig TN, Niemeyer CM, Leblanc T, Tiemann C, Robert A, Budde J, Lambiliotte A, Kohne E, Souillet G, Eber S, Stephan JL, Girot R, Bordigoni P, Cornu G, Blanche S, Guillard JM, Mohandas N, Tchernia G. 1999. Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond-Blackfan anemia patients. DBA group of Societe d'Hematologie et d'Immunologie Pediatrique (SHIP), Gesellschaft fur Padiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI). *Pediatr Res*. 46:553-561.
- Wool IG, Chan YL, Gluck A. 1995. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol* 73:933-947.

ATTIVITA' FORMATIVA

SEMINARI SEGUITI NEL CORSO DEL II ANNO

- 17 Novembre 2006 Dr. Davide Rossi
Correlazioni clinico-molecolari nelle malattie linfoproliferative
- 17 Novembre 2006 Dr. Gianluca Baldanzi
Diacilglicerolo cinasi alpha nella trasduzione del segnale
- 27 Novembre 2006 Dr.^{ssa} Paola Secco
Creazione di “antigen protein microarray” a fini di ricerca e diagnostica
- 27 Novembre 2006 Dr.^{ssa} Daniela Capello
Patogenesi molecolare dei linfomi associati ad immunodeficienza
- 15 Dicembre 2006 Dr. Matteo Vidali
Caratterizzazione di reazioni autoimmuni nell'epatopatia alcolica
- 10 Gennaio 2007 Prof.^{ssa} Paola Defilippi
Gene silencing by RNA interference (RNAi)
- 12 Gennaio 2007 Dr. Diego Cotella
Modulazione funzionale del canale cardiaco Kv4.3 da parte di subunità accessorie

- 12 Gennaio 2007 Dr.^{ssa} Lucia Corrado
Studio di fattori genetici coinvolti nella suscettibilità alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)”
- 12 Gennaio 2007 Prof. Carlo Chizzolini
Autoantibodies in systemic sclerosis: from clinical subsets to pathogenetic functions
- 17 Gennaio 2007 Prof. Michele Caselle
Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions
- 19 Gennaio 2007 Dr.^{ssa} Nicoletta Filigheddu
Attività non endocrina di grelina
- 25 Gennaio 2007 Prof.^{ssa} Paola Defilippi
Nuovi ruoli per le proteine adattatrici p130Cas e p140Cap nella trasformazione tumorale e nel carcinoma alla mammella
- 01 Febbraio 2007 Prof. Beat Thöny
Gene Therapy strategies for Phenylketonuria
- 22 Febbraio 2007 Prof.^{ssa} Claudia Bagni
Fragile-X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis
- 14 Marzo 2007 Dr.^{ssa} Marina Cretich
Protein microarrays: development of new supports for improved sensitivity
- 29 Marzo 2007 Prof. Enrico Mini
Marcatori farmacogenomici nel carcinoma coloretale: quali prospettive per una terapia personalizzata?
- 12 Aprile 2007 Dr. Marco Milanesio
Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein database
- 19 Aprile 2007 Otto Haller
Pathogenic viruses: smart manipulators of the Interferon system
- 25 Maggio 2007 Prof. Stefan Karlsson
The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling
- 28 Maggio 2007 Prof. Steven Ellis
Translating basic sciences into therapeutic strategies for Schwachman Diamond syndrome

- 21 Giugno 2007 Dr. Flavio Mignone
Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts
- 21 Settembre 2007 Dr.^{ssa} Francesca Persichetti
Meccanismi molecolari della corea di Huntington

CORSI FREQUENTATI

Corso di inglese e corso di statistica.

CONGRESSI FREQUENTATI

I ANNO:

- Proteine 2006, Novara, 1-3 Giugno 2006
- VIII Congresso FISV, Riva del Garda (TN), 28 Settembre – 01 Ottobre 2007

II ANNO:

- 8th Annual International Diamond Blackfan Anemia Consensus Conference, New York (NY, USA), 17-19 Marzo 2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

I ANNO:

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Nessuna

B) Altre comunicazioni

- *Analysis of the interactome of RPS19, mutated in Diamond Blackfan Anemia.* Dianzani I., Aspesi A., Orrù S., Armiraaglio M., Caterino M., Loreni F., Ruoppolo M., Santoro C. ASHG Annual Meeting, New Orleans (LA, USA), 9-13 Ottobre 2006
- *The role of the kinase Pim1 on translation.* Iadevaia V., Angelini M., Pagliaroli F., Armiraaglio M., Pavesi E., Santoro C., Dianzani I., Loreni F. FISV 2006 - 8th Annual Meeting, Riva del Garda (TN, Italy), 28 September 01 Ottobre 2006
- *Human Ribosomal Protein S19 Interactome.* Caterino M., Orrù S., Ruoppolo M., Aspesi A., Armiraaglio M., Loreni F., Santoro C., Dianzani I. Proteine 2006, Novara (Italy), 1-3 Giugno 2006

II ANNO:

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Nessuna

B) Altre comunicazioni

- *Analysis of Rps19 protein and Rps19 missense mutant proteins interactome.* Orrù S., Aspesi A., Armiraglio M., Caterino M., Loreni F., Ruoppolo M., Santoro C., Dianzani I. 2th ItPA Conference, Acitrezza (CT), 26-29 Giugno 2007
- *Analysis of Rps19 protein and Rps19 missense mutant proteins interactome.* Caterino M., Orrù S., Aspesi A., Armiraglio M., Loreni F., Santoro C., Dianzani I., Ruoppolo M. BITS 2007, Napoli (Italy), 26-28 Aprile 2007
- *Missense mutations affect the RPS19 interactome.* Orrù S., Armiraglio M., Aspesi A., Caterino M., Avondo F., Pavesi E., Ruoppolo M., Loreni F., Santoro C., Dianzani I. 8th Annual International Diamond Blackfan Anemia Consensus Conference, New York (NY, USA), 17-19 Marzo 2007

PUBBLICAZIONI OTTENUTE NEL CORSO DI DOTTORATO

- Orrù S., Aspesi A., Armiraglio M., Caterino M., Loreni F., Ruoppolo M., Santoro C., Dianzani I. Analysis of the Ribosomal Protein S19 Interactome. 2007. *Mol Cell Proteomics*. **6**:382-393.
- Campagnoli M.F., Ramenghi U., Armiraglio M., Quarello P., Garelli E., Carando A., Avondo F., Pavesi E., Fribourg S., Gleizes P.-E., Loreni F., Dianzani I. RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan Anemia (submitted, *Hum Mut*).