

Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”

**XIX ciclo del dottorato in Medicina Molecolare**  
**Relazione del IV anno**

**Patogenesi dell'Anemia di Diamond-Blackfan**

**Dottoranda: Anna Aspesi**

**Responsabile scientifico: Prof. Irma Dianzani**

# INTRODUZIONE

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

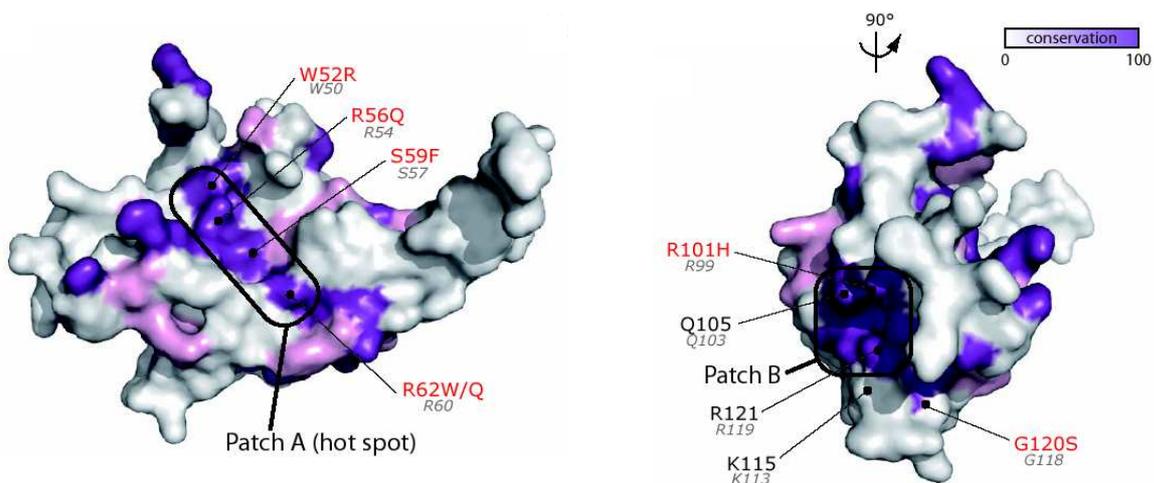
L'anemia di Diamond Blackfan (DBA) è un'aplasia congenita della serie rossa caratterizzata da grave anemia normocromico macrocitica spesso associata a malformazioni. Sebbene sia una malattia rara, avendo un'incidenza intorno ai 6 casi per milione di nati vivi, lo studio della sua patogenesi occupa un posto di rilievo in ematologia in quanto esempio di disordine genetico intrinseco dei progenitori eritroidi. Nel midollo osseo dei pazienti si osserva un difetto specifico nella differenziazione dei progenitori in senso eritroide, mentre le altre cellule del sangue maturano normalmente. In circa metà dei casi è utile la terapia steroidea, negli altri si ricorre a trasfusioni di sangue o trapianti di cellule staminali. La DBA è una malattia solitamente sporadica, ma una ereditarietà di tipo autosomico dominante si osserva nel 20% circa dei casi (Campagnoli *et al.*, 2004).

Il primo gene DBA individuato codifica per la proteina ribosomiale (RP) S19 ed è mutato nel 25% dei pazienti, sempre su un singolo allele (Willig *et al.*, 1999). Non è disponibile un modello animale per la DBA poiché il knock-out di RPS19 nel topo ha un fenotipo letale in omozigosi, e normale in eterozigosi (Matsson *et al.*, 2004 e 2006). Cellule di eritroleucemia che esprimono siRNA contro il messaggero di RPS19 mostrano una riduzione nella proliferazione e nella capacità di differenziare in senso eritroide (Miyake *et al.*, 2005). Le cellule CD34<sup>+</sup> isolate dai pazienti con DBA presentano un difetto intrinseco della differenziazione eritroide che può essere corretto, nei pazienti con RPS19 mutata, tramite trasfezione di un vettore esprimente il cDNA wild type di RPS19 (Hamaguchi *et al.*, 2003). La DBA è la prima malattia umana dovuta a mutazioni nel gene codificante per una proteina ribosomiale. Non è nota alcuna correlazione tra il tipo di mutazione e la modalità di trasmissione o il fenotipo clinico. Un esiguo numero di pazienti riporta mutazioni nel gene per RPS24 (Gazda *et al.*, 2006a) o RPS17 (Cmejla *et al.*, 2007). E' interessante notare che uno studio di microscopia immunoelettronica localizza RPS19 sulla superficie esterna della subunità 40S, in prossimità di RPS24, RPS17 e della regione di interazione con il fattore di inizio della traduzione eIF-2 (Bommer *et al.*, 1988).

Altre sindromi di aplasia midollare come la Sindrome di Shwachman Diamond e la Discheratosi Congenita, che condividono alcune caratteristiche del fenotipo DBA, sono causate da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo ribosomiale. E' stato dimostrato che nel lievito il knock-down

di RPS19 provoca un blocco nella maturazione dell'rRNA 18S, l'accumulo del suo precursore 21S e la riduzione nella quantità di subunità 40S mature (Léger-Silvestre *et al.*, 2005). Lo stesso avviene in cellule umane in cui RPS19 è silenziata e nelle cellule dei pazienti DBA (Flygare *et al.*, 2007). Nei pazienti DBA, con o senza mutazioni in *RPS19*, è stata dimostrata un deficit nella traduzione (Cmejlova *et al.*, 2006) e nell'espressione di proteine ribosomiali e di proteine coinvolte nella traduzione (Koga *et al.*, 2006; Gadza *et al.*, 2006b).

Recentemente è stato cristallizzato l'omologo di RPS19 nel *Pyrococcus abyssi* (Gregory *et al.*, 2007), la cui struttura si organizza in 5  $\alpha$ -eliche localizzate intorno a un' $\alpha$ -elica centrale anfipatica. In questo studio le mutazioni missense dei pazienti DBA vengono suddivise in due classi a seconda del loro impatto sul folding della proteina o sulle interazioni con altre molecole. In particolare sono state individuate due superfici che recano residui aminoacidici molto conservati e con carica positiva, che sembrano importanti per il legame con altre proteine e/o RNA, e che infatti sono essenziali per l'incorporazione di RPS19 nel ribosoma (Gregory *et al.*, 2007).



**Fig.1** Struttura tridimensionale di RPS19 in *P. abyssi*. Sono indicate le due superfici importanti per le interazioni intermolecolari e il loro grado di conservazione durante l'evoluzione (Tratto da Gregory *et al.*, 2007).

### ***Le ipotesi sulla patogenesi della DBA***

Gli studi finora compiuti evidenziano il ruolo di RPS19 nella biogenesi dei ribosomi e nella traduzione. Rimane ignoto il nesso con l'eritropoiesi e il meccanismo di insorgenza del difetto midollare. È 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 e Massey, 2006). Un'altra possibilità è che la riduzione del numero di subunità 40S possa alterare il caricamento sui polisomi di specifici mRNA importanti per lo sviluppo eritroide (Flygare e Karlsson, 2007). Infatti nel 1974 Lodish dimostrò che se il rapporto tra gli mRNA totali della cellula e il numero di subunità 40S aumenta viene ridotta preferenzialmente l'espressione dei trascritti con una costante di inizio della traduzione più bassa (Lodish, 1974). Inoltre il modello murino della Discheratosi Congenita presenta un difetto nel caricamento sui polisomi di alcuni trascritti che portano il motivo IRES, tra cui i fattori antiapoptotici XIAP e Bcl-xL (Yoon *et al.*, 2006).

RPS19 potrebbe anche essere un regolatore della traduzione di specifici trascritti, come avviene nel caso di altre proteine ribosomiali: RPL13a e RPL26 controllano rispettivamente la traduzione della ceruloplasmina e di p53 (Mazumder *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2005). RPL13a viene fosforilata in seguito alla stimolazione con IFN- $\gamma$  e questo provoca il suo rilascio dal ribosoma e l'interazione con il dominio GAIT del messaggero della ceruloplasmina, bloccandone la traduzione (Mazumder *et al.*, 2003). Anche RPS19 può essere fosforilata, almeno in vitro, da una serina-treonina chinasi indotta da fattori di crescita eritroidi, PIM-1 (Chiocchetti *et al.*, 2005) e questo supporta l'ipotesi di un meccanismo simile a quello di RPL13a. Un altro esempio di controllo dell'espressione di un messaggero specifico a opera di una proteina ribosomiale è dato da RPS13, che può interagire con il suo messaggero, alterarne lo splicing e bloccarne così la traduzione (Malygin *et al.*, 2007).

In passato il nostro laboratorio, in collaborazione con il laboratorio diretto dalla Prof.ssa Margherita Ruoppolo nel Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche dell'Università Federico II di Napoli, si è impegnato nell'identificazione dell'interattoma proteico di RPS19 (Orrù *et al.*, 2007). Tra le proteine individuate molte sono implicate nella biogenesi del ribosoma, nel controllo traduzionale e nello splicing. Abbiamo anche trovato alcune proteine in grado di legare l'RNA messaggero. Questo ci ha convinto a intraprendere lo studio degli interattori a RNA di RPS19, per scoprire se mediante il legame con specifici trascritti essa può intervenire nella regolazione traduzionale o in altri processi cellulari.

# MATERIALI E METODI

## *Culture cellulari e preparazione del lisato*

Le cellule di eritroleucemia umana K562 (ATCC #CCL-243) sono state coltivate in RPMI-1640 addizionato di siero fetale bovino al 10%, 100 U di penicillina e 0.1 mg/ml streptomina, a 37°C in atmosfera satura di vapor d'acqua e CO<sub>2</sub> al 5%.

Per preparare il lisato di K562,  $5 \times 10^7$  cellule sono state raccolte, lavate con PBS e risospese in 4 volumi di buffer H composto da: 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-metabisulfito, 100U/ml RNaseOUT (Invitrogen). La soluzione è stata mantenuta in ghiaccio ed in agitazione per 10 minuti, sono stati aggiunti 4 volumi di una soluzione 25% saccarosio, 50% glicerolo in buffer H e poi 1 volume di ammonio solfato saturo. Dopo 20 minuti di agitazione la soluzione è stata centrifugata a 34.000 rpm a 4°C per 3 ore. Il surnatante è stato trasferito attraverso una garza sterile in un becker e le proteine sono state precipitate con 0.33 g/ml di ammonio solfato mantenendo il pH a 7.5-8.0 con NaOH. La soluzione è stata centrifugata a 10.000 rpm a 4°C per 30 minuti e il pellet risospeso in 1 ml di 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, 100U/ml RNaseOUT). L'estratto proteico infine è stato privato dei debris insolubili tramite centrifugazione a 10.000 rpm a 4°C per 5 minuti. Per gli esperimenti di RT-PCR il PMSF è stato omesso da tutte le soluzioni in quanto può interferire con l'attività della retrotrascrittasi.

## *Preparazione delle proteine di fusione con GST*

Il vettore pGEX4T-1 (Amersham) è stato utilizzato per l'espressione inducibile di RPS19 fusa con la glutatione-S-transferasi (GST). I batteri competenti BL21 sono stati trasformati con il vettore pGEX o pGEX-RPS19, lasciati crescere in LB con ampicillina a 37°C sino ad una OD<sub>600</sub> pari a 0.5, poi trattati con IPTG 0.5 mM. Dopo 1 ora sono stati pellettati e lisati in lysis buffer (PBS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA) freddo, a cui sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina, 0.5 µg/ml aprotinina), lasciati in ghiaccio per 15 minuti e poi sonicati. Il lisato ottenuto è stato centrifugato a 4°C per 15 minuti a 4000 rpm e il surnatante è stato recuperato e incubato per un'ora a 4°C con GST-bind resin (Novagen). La

resina coniugata alle proteine di fusione è stata lavata varie volte con lysis buffer e conservata a 4°C.

### ***Pull-down***

Il lisato di cellule K562 è stato incubato per 2 ore a 4°C con 300 µl (≅150 µg) della resina coniugata a *GST* o *GST-S19*. Le resine sono state lavate in buffer TM 0.1 (buffer TM 0.0 + 100 mM KCl) e eluite con buffer TM 0.5 (buffer TM 0.0 + 500 mM KCl).

### ***RT-PCR***

Successivamente al pull-down l'RNA totale è stato estratto con Trizol® (Invitrogen) da input, flow through e eluati. I campioni di RNA sono stati sottoposti a RT-PCR con il kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) utilizzando i primer: 5'- CAGTTCGTCTGTGGGGAC -3' e 5'- CAATCAGGGGACGGTGAC -3'. Il DNA amplificato è stato usato a sua volta come template per una nested pcr effettuata con i seguenti primer: 5'- CGTTGAGGAGTGCTGTTTCC -3' e 5'- GGACTGCTTCCAGGTGTCAT -3'. La banda ottenuta dall'eluato GST-RPS19 è stata escissa da gel, purificata e sequenziata utilizzando il kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e il sequenziatore automatico a 16 capillari 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

### ***Trascrizione e traduzione in vitro (TNT®)***

Per la produzione della proteina FLAG-RPS19 è stato utilizzato il kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) secondo il protocollo consigliato. 1 µg di vettore pcDNA3 FLAG-RPS19 in cui il cDNA di RPS19 è sotto il controllo del promotore T7 è stato trascritto e tradotto in presenza o assenza di metionina marcata con <sup>35</sup>S. La produzione della proteina è stata controllata tramite SDS-PAGE e autoradiografia.

### ***Trascrizione in vitro***

I costrutti contenenti gli RNA da testare sono stati acquistati dalla ditta RZPD, linearizzati e sottoposti a trascrizione in vitro utilizzando il kit MEGAscript® (Ambion). La trascrizione è

avvenuta tramite l'attività della T7 o SP6 RNA polimerasi, a seconda del promotore contenuto nel vettore, in presenza o assenza di  $^{32}\text{P}$ -UTP. La produzione degli RNA è stata controllata tramite elettroforesi su gel di agarosio.

### ***Saggio di interazione***

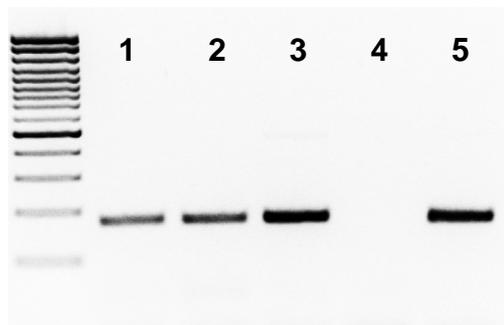
Per i saggi di interazione 1/5 della proteina FLAG-S19 ottenuta con la TNT® è stata incubata per 2 ore in ghiaccio in TM 0.1 con 1/10 degli RNA ottenuti con la trascrizione in vitro. Dopo un passaggio di pre-clearing con proteina G, RPS19 è stata incubata con 2 µg di anticorpo anti-FLAG o anti-HA e immunoprecipitata tramite aggiunta di proteina G. Le resine sono state abbondantemente lavate in TM 0.1 e caricate su gel di agarosio 1.5% contenente formaldeide. Dopo l'elettroforesi il gel è stato trattato con acido acetico 10%, essiccato e esposto ad autoradiografia.

# RISULTATI

## *L'interattoma a RNA di RPS19*

Da uno studio precedente effettuato nel nostro laboratorio è stato ottenuto l'interattoma proteico di RPS19 (Orrù *et al.*, 2007). Alcune tra le proteine identificate sono mRNA binding proteins. Due in particolare hanno attirato la nostra attenzione: IMP1 e IMP3, entrambi capaci di interagire con il messaggero dell'Insulin-like Growth Factor II (IGFII).

E' stato quindi approntato un esperimento di pull-down in presenza di un inibitore delle RNasi in cui la proteina batterica GST-RPS19 è stata utilizzata come esca per purificare RNA messaggeri da un lisato cellulare totale di K562. L'eluato ottenuto, contenente i trascritti interagenti direttamente o indirettamente con RPS19, è stato sottoposto a RT-PCR e nested PCR utilizzando primer specifici per l'IGFII. L'mRNA dell'IGFII è effettivamente presente nell'eluato da resina GST-RPS19, come confermato da sequenziamento della banda amplificata, ma non nell'eluato da resina GST (Fig.2).



**Fig.2** Gli RNA isolati dopo pull-down con lisato di cellule K562 incubato con resina GST o GST-RPS19 sono stati sottoposti a RT-PCR e nested pcr con primer specifici per l'IGFII. Il gel di agarosio mostra: 1. Input; 2. Flow through GST; 3. Flow through GST-RPS19; 4 Eluato GST; 5. Eluato GST-RPS19

L'esperimento di purificazione dei trascritti tramite pull-down è stato ripetuto altre due volte e dagli eluati è stato isolato l'RNA. Grazie a una collaborazione con il laboratorio diretto dal Prof. Stefano Gustincich alla Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati di Trieste, questi RNA sono stati ibridizzati su microarray RIKEN di cDNA murino in cui ogni gene è presente in

triplicato e confrontati con l'RNA totale delle cellule K562. Dall'analisi dei risultati sono stati esclusi i geni la cui espressione è abbondante e sono stati considerati solo i trascritti presenti in limitata quantità nelle cellule ma molto arricchiti nell'eluato. Sono stati ottenuti circa 600 trascritti arricchiti almeno 8 volte e fra questi 120 trascritti positivi in almeno 5 casi su 6. L'analisi della lista dei corrispondenti 120 geni umani con il programma DAVID secondo i termini di Gene Ontology, non ha mostrato un'evidente preponderanza di geni deputati a una particolare funzione molecolare (Tab.1).

GO-Term	%	P Value
Response to stress	17%	4.51E-4
Gametogenesis	7%	2.06E-3
Response to abiotic stimulus	10%	2.47E-3
Reproduction	7%	4.48E-3
Transferase activity, transferring phosphorus- containing groups	14%	9.3E-3

**Tab.1** Suddivisione dei geni dell'interattoma di RPS19 secondo Gene Ontology

### ***Conferma delle interazioni***

Dalla lista di 120 interattori candidati di RPS19 sono stati scelti alcuni geni che hanno un particolare interesse biologico (Tab.2).

Gene Symbol [Homo sapiens]	GeneID [Homo sapiens]	Official name [ <i>Homo sapiens</i> ]	Gene aliases
<b>BMPR1B</b>	658	Bone morphogenetic protein receptor, type IB.	<b>ALK6</b> ; ALK-6; CDw293
<b>CDKN1A</b>	1026	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20, CDKN1, CIP1, MDA-6, <b>P21</b> , SDI1, WAF1, p21CIP1
<b>DAPK2</b>	23604	Death-associated protein kinase 2	DRP-1; MGC119312
<b>PDGFD</b>	80310	Platelet derived growth factor D	IEGF; MSTP036; SCDGF-B; MGC26867
<b>ACVRL1</b>	94	Activin A receptor, type II-like 1	HHT; <b>ALK1</b> ; HHT2; ORW2; SKR3; ALK-1; ACVRLK1
<b>ALOX5AP</b>	241	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	FLAP

**Tab.2** Geni selezionati dalla lista ottenuta con gli esperimenti di microarray.

I cloni contenenti il cDNA umano di questi geni sono stati ottenuti dalla ditta RZPD, insieme a quelli dei geni codificanti per la tubulina B (TUBB1), l'emoglobina gamma A (HBG1), e la proteina ribosomiale S11 (RPS11), che sono stati scelti come controlli negativi.

Sono stati allestiti degli esperimenti per validare l'interazione emersa dagli array. I geni da testare sono stati trascritti in vitro in presenza di un tracciante radiattivo e incubati con la proteina FLAG-RPS19 prodotta tramite Trascrizione e Traduzione in vitro. RPS19 è stata immunoprecipitata con anticorpo specifico anti-FLAG o con l'anticorpo di controllo anti-HA. Gli immunoprecipitati sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio-formaldeide, successivamente essiccato e sottoposto a autoradiografia. Questa tecnica non ha dato i risultati attesi in quanto non è stato ottenuto un segnale netto in nessuno degli esperimenti effettuati, la cui interpretazione è stata resa più difficile dalla presenza di un significativo background e dalla mancanza di un controllo positivo, cioè di un trascritto noto in grado di legare direttamente RPS19.

Si è quindi deciso di utilizzare una diversa strategia, sul modello degli esperimenti effettuati per RPL13a (Mazumder *et al.*, 2003), che prevede l'immunoprecipitazione di RPS19 da un lisato cellulare trattato con inibitore delle RNasi, l'isolamento dell'RNA dall'immunoprecipitato, la retrotrascrizione e l'amplificazione degli interattori candidati. Questi esperimenti sono attualmente in corso.

# DISCUSSIONE

L'anemia di Diamond Blackfan è una rara aplasia congenita della serie eritroide la cui patogenesi è sconosciuta. E' una malattia eterogenea a livello sia clinico sia genetico. I pazienti presentano mutazioni nel gene per RPS19 nel 25% dei casi, e nei geni per RPS24 o RPS17 in circa il 2% dei casi.

Non è noto come le mutazioni in questi geni possano causare il fenotipo DBA. RPS19 potrebbe avere una funzione extraribosomiale indispensabile per l'eritropoiesi, oppure alterare il processo traduzionale solo in particolari tipi cellulari, come i progenitori eritroidi. Recentemente è stato dimostrato che il silenziamento di RPS19 nel lievito e in cellule umane provoca un difetto nel processamento del precursore dell'rRNA 18S e il blocco della maturazione della subunità piccola del ribosoma (Léger-Silvestre *et al.*, 2005; Flygare *et al.*, 2007). Inoltre è stata osservata una ridotta sintesi proteica sia nei pazienti con mutazioni in RPS19 sia in quelli senza mutazioni (Cmejlova *et al.*, 2006).

In passato il nostro laboratorio si è occupato della caratterizzazione dell'interattoma proteico di RPS19, che ha portato all'individuazione di 159 proteine. Molte di esse sono proteine ribosomiali o implicate nella biogenesi dei ribosomi, ma parecchie altre sono proteine coinvolte nello splicing e nel controllo traduzionale (Orrù *et al.*, 2007). Due di esse, IMP1 e IMP3, hanno attratto la nostra attenzione perché sono in grado di legare un trascritto specifico, quello dell'Insulin-like Growth Factor II (IGFII). L'IGFII è prodotta per lo più durante l'embriogenesi e nell'adulto è secreta dal fegato e si ritrova nel siero. E' coinvolta nella proliferazione, nella differenziazione e nell'apoptosi (Denley *et al.*, 2005). Le IMP (IGFII mRNA binding proteins) sono una famiglia di proteine capaci di legare il trascritto dell'IGFII e di regolarne la localizzazione, la stabilità e la traduzione, spesso agendo in contrapposizione l'una con l'altra (Liao *et al.*, 2005). Recentemente è stata descritta la composizione dei granuli ribonucleoproteici contenenti IMP1. Questi granuli, similmente ai p-bodies e agli stress granules, contengono proteine coinvolte nei pathway di secrezione e degradazione, subunità ribosomiali e RNA messaggeri (Jønson *et al.*, 2007). Molte delle proteine che interagiscono con RPS19 si possono ritrovare in questi granuli e corpi citoplasmatici, supportando il coinvolgimento di RPS19 nel controllo traduzionale, forse anche in risposta allo stress. Un esperimento di pull-down e RT-PCR ha dimostrato che il trascritto dell'IGFII può essere legato, direttamente o indirettamente, da RPS19. La scoperta di altri RNA con questa proprietà può essere d'aiuto nell'indagine dei processi cellulari che interessano RPS19 e che sono alterati nei pazienti DBA. Per questa ragione

abbiamo intrapreso lo studio degli interattori a RNA di RPS19. I trascritti interagenti con la nostra esca sono stati purificati mediante pull-down da un lisato totale di cellule di eritroleucemia umana K562 e identificati tramite ibridazione su un microarray di cDNA full-length RIKEN. Gli RNA arricchiti di almeno 8 volte rispetto all'RNA cellulare totale in almeno 5 replicati su 6 sono stati 120. Tra essi, il 17% sono geni coinvolti nello stress cellulare; si potrebbe quindi speculare che RPS19 possa agire da sensore nella risposta cellulare allo stress e che gli effetti della perdita di questa regolazione si manifestino solo in alcuni tipi cellulari. Tra i trascritti individuati con gli array spiccano alcuni geni coinvolti nell'ematopoiesi, come ALK1, ALK6 e DAPK2, e p21, un importante regolatore del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

Gli esperimenti di conferma delle interazioni non hanno finora raggiunto l'accuratezza e riproducibilità sperate, perciò attualmente stiamo utilizzando tecniche alternative. L'eventuale validazione dell'interazione diretta tra RPS19 e gli RNA candidati focalizzerà ancora di più l'attenzione sul controllo della traduzione. Recentemente è stato dimostrato che altri due geni DBA codificano per proteine della subunità 40S del ribosoma, RPS24 e RPS17. Entrambe si trovano localizzate in vicinanza di RPS19 e della regione di interazione con il fattore di inizio della traduzione eIF-2 (Bommer *et al.*, 1988). E' stato dimostrato inoltre che il silenziamento o la mutagenesi di RPS19 causa la riduzione della sintesi proteica (Cmejlova *et al.*, 2006) ma non è noto se questo è un meccanismo di natura generale o specifico solo per alcuni trascritti, come avviene nel caso di un'altra malattia da insufficienza midollare, la Discheratosi Congenita (Yoon *et al.*, 2006). Altre proteine ribosomiali sono in grado di modulare la traduzione di trascritti specifici (Mazumder *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2005). Ad esempio RPL13a può bloccare l'espressione della ceruloplasmina in seguito a fosforilazione indotta dall'interferon- $\gamma$ . Anche RPS19 può essere fosforilata, almeno in vitro, dalla serina-treonina chinasi PIM1 (Chiocchetti *et al.*, 2005). Sarà interessante quindi esplorare la possibilità che RPS19 sia un regolatore mirato dell'espressione di alcuni geni. A questo scopo stiamo iniziando lo studio del profilo proteico delle cellule in cui RPS19 è silenziata tramite DIGE (Fluorescence 2-D Difference Gel Electrophoresis).

## BIBLIOGRAFIA

Bommer UA, Stahl J, Henske A, Lutsch G, Bielka H "Identification of proteins of the 40 S ribosomal subunit involved in interaction with initiation factor eIF-2 in the quaternary initiation complex by means of monospecific antibodies". *FEBS Lett* 233,114-8, 1988.

Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, Longoni D, Pecile V, Zecca M, Dufour C, Ramenghi U, Dianzan I. "Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature". *Haematologica* 89, 480-9, 2004.

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 "Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein". *Haematologica* 90, 1453-62, 2005.

Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D "Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia". *Hum Mutat* 2007 [Epub ahead of print]

Cmejlova J, Dolezalova L, Pospisilova D, Petrtylova K, Petrak J, Cmejla R, "Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia". *Haematologica* 91, 1456-1464, 2006.

Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE "Molecular interactions of the IGF system". *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 421-39, 2005.

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* 109, 980-6, 2007.

Flygare J, Karlsson S "Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation". *Blood* 109, 3152-4, 2007.

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 "Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia". *Am J Hum Genet* 79, 1110-8, 2006a.

Gazda HT, Kho AT, Sanoudou D, Zaucha JM, Kohane IS, Sieff CA, Beggs AH "Defective ribosomal protein gene expression alters transcription, translation, apoptosis, and oncogenic pathways in Diamond-Blackfan anemia". *Stem Cells* 24, 2034-44, 2006b.

Gregory LA, Aguisa-Touré AH, Pinaud N, Legrand P, Gleizes PE, Fribourg S "Molecular basis of Diamond Blackfan anemia: structure and function analysis of RPS19". *Nucleic Acids Res* 35, 5913-5921, 2007.

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.

- Jønson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC "Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules". *Mol Cell Proteomics* 6 798-811, 2007.
- 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.
- Léger-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.
- Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G "The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells". *J Biol Chem* 280, 18517-24, 2005.
- Lodish HF "Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis". *Nature* 251, 385-8, 1974.
- Malygin AA, Parakhnevitch NM, Ivanov AV, Eperon IC, Karpova GG. "Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism". *Nucleic Acids Res* 2007 [Epub ahead of print]
- Matsson H., Davey E.J., Draptchinskaia 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.
- Matsson H, Davey EJ, Fröjmark AS, Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Zahou E, Byman I, Landin B, Ronquist G, Karlsson S, Dahl N "Erythropoiesis in the Rps19 disrupted mouse: Analysis of erythropoietin response and biochemical markers for Diamond-Blackfan anemia". *Blood Cells Mol Dis* 36, 259-64, 2006.
- 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". *Mol Cell Proteomics* 6, 382-93, 2007.
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB "Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin". *Cell* 123, 49-63, 2005.
- Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, Ball S, Niemeyer C, Ramenghi U, Orfali K, Gustavsson P, Garelli E, Brusco A, Tiemann C, Perignon JL, Bouchier C, Cicchiello L, Dahl N, Mohandas N, Tchernia G. "Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression". *Blood* 94, 4294-306, 1999.
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D "Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita". *Science* 312, 902-6, 2006.

## Seminari seguiti durante il quarto anno di dottorato

- 19 Ottobre 2006 “Structure-activity relationship modeling: carcinogens, chemotherapeutics, and molecular targets”, Albert R. Cunningham, PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 2 Novembre 2006 “Role of cytochrome C oxidase in Ras transformation”, Kristin Nelson, PhD. University of Louisville, KY, USA.
- 10 Gennaio 2007 “Gene silencing by RNA interference (RNAi)”, Prof. Paola Defilippi, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 17 Gennaio 2007 “Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions”, Prof. Michele Caselle, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 1 Febbraio 2007 “Gene therapy strategies for phenylketonuria”, Prof. Beat Thöny, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 22 Febbraio 2007 “Fragile X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis”, Prof. Claudia Bagni, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 14 Marzo 2007 “Protein microarrays development of new supports for improved sensitivity”, Dr. Marina Cretich, Facoltà Scienze MFN, Alessandria.
- 12 Aprile 2007 “Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base”, Dr. Marco Milanese, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 19 Aprile 2007 “Pathogenic viruses: smart manipulators of the Interferon system”, Prof. Otto Haller, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 16 Maggio 2007 “Difetti genetici del pre-B Cell Receptor”, Dr. Simona Ferrari, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 25 Maggio 2007 “The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling”, Prof. Stefan Karlsson, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 28 Maggio 2007 “Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachman Diamond Syndrome”, Dr. Steven R. Ellis, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 4 Giugno 2007 “Sindromi autoinfiammatorie”, Dr. Alberto Martini, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 21 Giugno 2007 “Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts”, Dr. Flavio Mignone, Dipartimento Scienze Mediche, Novara.
- 21 Settembre 2007 “Meccanismi molecolari nella Corea di Huntington”, Dr. Francesca Persichetti, Facoltà Scienze MFN, Alessandria.

## Corsi frequentati

<b>I anno</b>	Nessuno
<b>II anno</b>	Inglese, statistica
<b>III anno</b>	Nessuno
<b>IV anno</b>	Nessuno

## Congressi frequentati

<b>I anno</b>	Nessuno
<b>II anno</b>	XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia, Modena, 20-23 Febbraio 2005
<b>III anno</b>	1 <sup>st</sup> Scientific Colloquium in Biochemistry and Molecular Biology, General Butler State Resort Park, Carrollton (KY, USA), May 19-20, 2006 7 <sup>th</sup> International Conference on Ribosome Synthesis, Airlie Conference Center, Warrenton (VA, USA), August 16-20, 2006
<b>IV anno</b>	8 <sup>th</sup> Annual Diamond Blackfan Anemia International Consensus Conference, New York (NY, USA), March 17-19, 2007

## Comunicazioni a congressi

### *Comunicazioni presentate personalmente*

<b>I anno</b>	Nessuna
<b>II anno</b>	“La proteina ribosomale S19, responsabile della Anemia di Diamond-Blackfan, interagisce con l'oncoproteina Pim-1” <b>A. Aspesi</b> , A. Chiocchetti, L. Gibello, A. Carando, P. Secco, A. Biava, U. Dianzani, U. Ramenghi, C. Santoro, I. Dianzani. XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia, Modena, 20-23 Febbraio 2005 (presentazione orale)
<b>III anno</b>	Nessuna
<b>IV anno</b>	Nessuna

## *Altre comunicazioni*

- I anno** Nessuna
- II anno** “The Diamond-Blackfan gene product, ribosomal protein S19, interacts with the Pim-1 oncoprotein” Dianzani I, Chiocchetti A, Gibello L, Carando A, Secco P, Biava A, **Aspesi A**, Dianzani U, Ramenghi U, Santoro C. The American Society of Human Genetics, 54<sup>th</sup> Annual Meeting, Toronto, Ontario, Canada, October 26-30, 2004
- “Molecular basis of Diamond-Blackfan Anemia” Dianzani I, Santoro C, Gibello L, **Aspesi A**, Biava A, Chiocchetti A, Garelli E, Ramenghi U, Carando A, Amaldi F, Chatr-aryamontri A, Angelini M, Caldarola S, Giorgi M, Loreni F. Telethon, XIII Scientific Convention, Salsomaggiore Terme (PR), 6-8 Marzo 2005
- III anno** “A functional proteomic approach to unravel ribosomal protein S19 partners” Ruoppolo M, Orrù S, Caterino M, Gibello L, Secco P, Biava A, **Aspesi A**, Santoro C, Dianzani I. HUPO, 3<sup>rd</sup> Annual National Congress, Lodi, 29 Settembre-1 Ottobre 2005.
- “Search for protein interactors of ribosomal protein S19, mutated in Diamond Blackfan Anemia” Dianzani I, Chiocchetti A, Gibello L, Carando A, Secco P, Biava A, **Aspesi A**, Dianzani U, Ramenghi U, Orrù S, Angelini M, Caterino M, Ruoppolo M, Loreni F, Santoro C. The American Society of Human Genetics, 55<sup>th</sup> Annual Meeting, Salt Lake City, Utah (USA), October 25-29, 2005.
- “Human ribosomal pretein S19 interactome” Caterino M, Orrù S, Ruoppolo M **Aspesi A**, Armiraglio M, Loreni F, Santoro C, Dianzani I. Proteine 2006 Novara, 1-3 Giugno 2006
- “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
- IV anno** “Analysis of the interactome of RPS19, mutated in Diamond Blackfan Anemia” Dianzani I, **Aspesi A**, Orrù S, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F, Ruoppolo M, Santoro C. The American Society of Human Genetics, 56<sup>th</sup> Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, October 9-13, 2006
- “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. 8<sup>th</sup> Annual International Diamond Blackfan Anemia Consensus Conference, New York, March 17-19, 2007
- “Missense mutations in RPS19 affect protein stability, nucleolar localization and ribosome assembly” Angelini M, Gibello L, **Aspesi A**, Santoro C, Dianzani I, Loreni F. 8<sup>th</sup> Annual International Diamond Blackfan Anemia Consensus Conference, New York, March 17-19, 2007
- “Cellular consequences of ribosomal defects: a tale of two Diamonds” Quarello P, Moore JB, **Aspesi A**, Liu JM, Ellis SR. 8<sup>th</sup> Annual International Diamond Blackfan Anemia Consensus Conference, New York, March 17-19, 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, Napoli, April 26-28, 2007
- “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. 2<sup>th</sup> ItPA Conference, Acitrezza (CT), June 26-29, 2007

# Publicazioni

- I anno** Nessuna
- II anno** 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 “Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein”. *Haematologica* 90, 1453-62, 2005.
- III anno** 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* 109, 980-6, 2007.
- IV anno** Orru S, **Aspesi A**, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F, Ruoppolo M, Santoro C, Dianzani I. “Analysis of the ribosomal protein S19 interactome”. *Mol Cell Proteomics* 6, 382-93, 2007.