

**Università degli Studi del Piemonte Orientale**  
**“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca in**  
**Medicina Molecolare**

*Ciclo XXI*

**Relazione III° anno**

**MUTAZIONI di RPS19 in PAZIENTI con**  
**ANEMIA di DIAMOND-BLACKFAN**

Candidato: Dr.<sup>ssa</sup> ARMIRAGLIO MARTA

*Tutor:* Prof. Umberto Dianzani

# SEZIONE 1 – RISULTATI SCIENTIFICI

## INTRODUZIONE

### ANEMIA di DIAMOND-BLACKFAN

Il ribosoma è il macchinario deputato alla sintesi proteica e consiste di due subunità (maggiore e minore) che presentano lievi differenze tra eucarioti e procarioti. In particolare, il ribosoma dei mammiferi è composto da 4 diverse molecole di RNA e circa 80 proteine (RP), di cui 34 sono in comune tra eucarioti, procarioti e archebatteri, 33 tra eucarioti e archebatteri; 11 sono invece esclusive degli eucarioti (Lecompte *et al.*, 2002).

Che una patologia umana potesse essere causata da alterazioni in una RP divenne evidente quando *RPS19* (MIM #603474) fu trovato mutato nel 25% dei pazienti affetti da anemia di Diamond-Blackfan (Draptchinskaia *et al.*, 1999). La DBA (MIM #105650) è una rara ed eterogenea aplasia congenita pura della serie rossa che presenta un'incidenza in Europa di circa 6 casi per milione di nati vivi (Campagnoli *et al.*, 2004). La sua caratteristica principale è l'anemia normocromica e macrocitica che nella quasi totalità dei casi si manifesta entro il primo anno di vita. Le altre linee emopoietiche sono normalmente prive di anomalie evidenti. Il midollo osseo è normocellulare, ma i precursori eritroidi sono assenti o in numero molto ridotto, probabilmente perché i loro progenitori sono proapoptotici e incapaci di 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 presenta malformazioni (Lipton *et al.*, 2001).

Il trattamento di prima linea per la DBA è l'utilizzo di steroidi, che ottiene buoni risultati durante il primo ciclo di trattamento nel 70% dei pazienti (Ball *et al.*, 1996; Willig *et al.*, 1999b; Campagnoli *et al.*, 2004; Lipton *et al.*, 2006). La risposta a lungo termine, invece, è molto variabile: alcuni pazienti vanno incontro a remissione, altri sviluppano resistenza. Nei casi in cui la terapia steroidea non possa essere continuata, obbligatoriamente si passa alle trasfusioni, croniche, i cui effetti collaterali portano ad una prognosi sfavorevole. Il solo trattamento definitivo e curativo è il trapianto di cellule staminali (SCT) (Lipton *et al.*, 2006).

Il nesso tra mutazioni in una proteina ribosomale e comparsa dell'anemia è tuttora oscuro, ma l'opinione generale attualmente si concentra sulla difettiva biogenesi del ribosoma (*review* Liu e Ellis, 2006). La scoperta di mutazioni in altre 5 proteine ribosomali, *RPS24* (Gazda *et al.*, 2006), *RPS17* (Cmejla *et al.*, 2007), *RPL35a* (Farrar *et al.*, 2007) *RPL11* e *RPL5* (Gazda *et al.*, 2007), hanno definitivamente permesso di classificare la DBA tra le ribosomopatie. Altre patologie di questo tipo sono la discheratosi congenita, le sindromi di Treacher-Collins e di Shwachman-

Diamond e probabilmente anche la CHH (*cartilage hair hypoplasia syndrome*) (review Liu e Ellis, 2006).

## RPS19

Il gene *RPS19* (*locus* 19q13.2) si estende per 11 kb e comprende sei esoni, il primo dei quali è lungo 372 bp e non viene tradotto; come molti altri mRNA codificanti per RP, contiene un tratto di oligopirimidine di 13 nucleotidi (*terminal oligopyrimidine (TOP) sequence*) coinvolto nel controllo traduzionale dell'mRNA. Gli altri cinque esoni (435 bp) codificano per una proteina di 145 aminoacidi (MW 16 kDa). Complessivamente, la lunghezza del trascritto di RPS19 è quindi 872 bp (GenBank NM\_001022.3). La proteina è piccola, non presenta nessun motivo funzionale noto, è ubiquitariamente espressa ed è una componente strutturale della subunità minore del ribosoma; dati sperimentali suggeriscono una sua localizzazione vicina al sito di legame per eIF2 (Lutsch *et al.*, 1990). La sintesi di RPS19, così come quella delle altre RP dei vertebrati, è regolata prevalentemente a livello traduzionale; tale regolazione è dipendente dalle sequenze TOP e dalla via di trasduzione del segnale di PI3K. E' anche stato dimostrato che gli aminoacidi stimolano la traduzione degli mRNA delle RP (Caldarola *et al.*, 2004): la somministrazione di leucina per via orale a ratti in condizioni di affamamento induce, nel fegato, un aumento dell'associazione polisomiale dell'mRNA delle RP (Antony *et al.*, 2001).

L'identificazione di mutazioni in *RPS19* nei pazienti DBA ha spinto ad investigare il suo ruolo molecolare. Studi di immunofluorescenza hanno rivelato che la proteina è localizzata principalmente nel nucleo, ed in particolar modo nel nucleolo, dove colocalizza con la nucleolina, la più abbondante tra le proteine nucleolari (Da Costa *et al.*, 2003). Come è ovvio, RPS19 è presente anche nel citoplasma, principalmente come componente ribosomale (Angelini *et al.*, 2007). Grazie all'utilizzo di mutanti delezionali è stato possibile identificare due segnali di localizzazione nucleolare (NoS): il primo comprende i primi 16 aminoacidi (Met1-Arg16), mentre il secondo si estende da Gly120 a Asn142. Mutazioni che cadono in queste regioni determinano una drammatica riduzione del livello della proteina e si ritiene che l'errata localizzazione possa essere causa di un'aumentata degradazione (Da Costa *et al.*, 2003).

Così come altre RP (quali RPL13 e RPL26), RPS19 possiede anche funzioni extra-ribosomali. Suoi dimeri estratti da lesione sinoviale da artrite reumatoide (Nishiura *et al.*, 1996) mostrano attività chemiotattica per i monociti (Shibuia *et al.*, 2001). Inoltre, RPS19 interagisce con FGF2 (Soulet *et al.*, 2001), con una proteina nucleolare, RPS19 Binding Protein, dalla funzione tuttora sconosciuta (Maeda *et al.*, 2006) e con PIM-1 (Chiocchetti *et al.*, 2005), una serina-treonina chinasi la cui espressione è strettamente correlata a citochine ematopoietiche. Recentemente, è stato pubblicato

l'interattoma completo di RPS19: è interessante notare che la maggior parte degli interattori sono proteine nucleolari, tra cui molte RP, componenti del pre-ribosoma ed elicasi (Orrù *et al.*, 2007). Ciò è coerente con la scoperta che RPS19 è indispensabile per la corretta maturazione dell'rRNA 18S (Flygare *et al.*, 2007; Choismel *et al.*, 2007; Idol *et al.*, 2007) e per l'assemblaggio del complesso pre-40S (Léger-Silvestre *et al.*, 2005). La produzione delle subunità 40S e l'assemblaggio sui ribosomi di svariati fattori non ribosomali dipendono quindi dalla capacità di RPS19 di svolgere correttamente la sua funzione.

L'elevata solubilità di RPS19 umana ha impedito finora gli studi di cristallizzazione. Questo problema è stato ora risolto grazie all'utilizzo dell'archebatterio ipertermofilo *Pyrococcus abissi*, la cui RPS19 mostra il 36% di identità ed il 57% di omologia con il suo ortologo umano. E' stato quindi dimostrato che la struttura di RPS19 è una matassa composta da cinque  $\alpha$ -eliche, che comprendono gli aminoacidi bersaglio delle mutazioni *missense* (Gregory *et al.*, 2007).

## **SCOPO del LAVORO**

In questo terzo anno di dottorato (per parte del quale ho sospeso la frequenza per maternità) mi sono dedicata alla stesura di una *review* dove sono state raccolte tutte le 77 mutazioni note di *RPS19*, oltre alla descrizione di sei nuove mutazioni identificate nel laboratorio del Prof. Ugo Ramenghi (Dipartimento di Scienze Pediatriche, Università di Torino). Nel lavoro è quindi presente l'analisi relativa a 127 famiglie DBA.

La novità di questo lavoro rispetto ai precedenti è la classificazione delle mutazioni in base ai dati funzionali che si sono resi disponibili di recente.

## **MATERIALI e METODI**

La numerazione utilizzata per indicare le mutazioni del DNA è basata sulla sequenza del cDNA, in linea con gli standard internazionali ([www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)); in questa numerazione, +1 corrisponde alla A del codone di inizio della traduzione (ATG) della sequenza GenBank NM\_001022.3. Il codone di inizio è indicato come codone 1.

Le 6 nuove mutazioni qui presentate (p.Phe21Ser, p.Trp52Cys, p.Thr76Pro, p.Ala135Thr, c.412delG e c.417delA) sono state validate presso il laboratorio del Prof. Ramenghi utilizzando questi criteri:

1. sono state confermate in un secondo campione e in un secondo prodotto di PCR;
2. per ogni paziente è stata determinata la completa sequenza codificante per escludere la presenza di altre mutazioni;
3. le mutazioni ai codoni 21, 52 e 135 coinvolgono aminoacidi conservati, mentre la mutazione

*missense* al codone 76 inserisce un residuo di prolina che si pensa possa alterare la struttura 3D della proteina;

4. le due mutazioni *missense* (p.Trp52Cys e p.Thr76Pro) per cui erano disponibili altri membri della famiglia segregano con la malattia;
5. le due delezioni sono mutazioni *de novo*.

## RISULTATI

Tutte le mutazioni di *RPS19* sono state trovate in eterozigosi con la sequenza selvatica, in accordo con la trasmissione a carattere dominante e con il fatto che il topo *knock-out* è letale prima dell'impianto (Mattson *et al.*, 2004). Le mutazioni sono eterogenee e sono presenti in tutto il gene. 31 mutazioni (37%) sono transizioni: 8 *nonsense*, 17 *missense* e 6 mutazioni ai siti di *splicing*. Di queste, 11 (3 *nonsense* e 8 *missense*) sono mutazioni C>T la cui possibile causa è una deaminazione della metil-citosina a livello dei dinucleotidi CpG. 2 mutazioni *nonsense*, 9 *missense* e 4 difetti ai siti di *splicing* sono trasversioni e rappresentano il 18% delle mutazioni totali. 5 mutazioni (6%) sono causate da meccanismi di *slippage* e sono tutte piccole inserzioni o delezioni in regioni con ripetizioni di una singola base.

### CLASSIFICAZIONE delle MUTAZIONI

#### Nonsense:

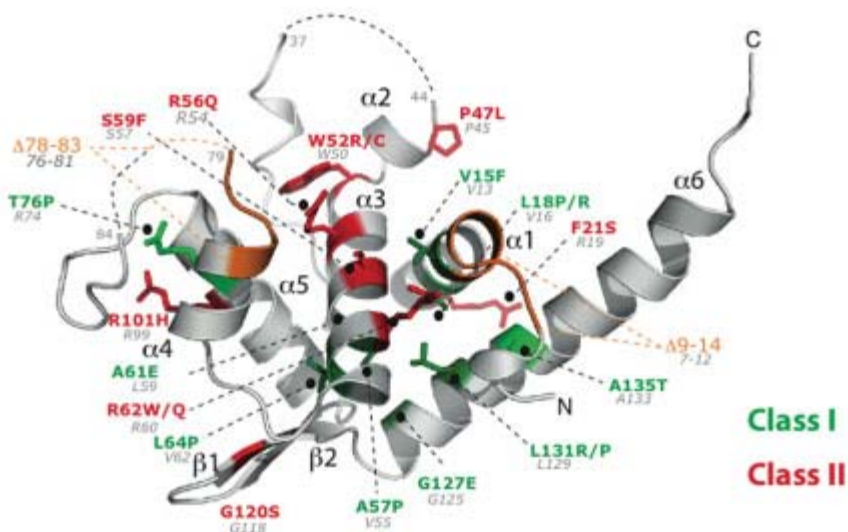
Il 19% (24) delle famiglie da noi analizzate presenta mutazioni *nonsense*. p.Arg94X è presente in 8 famiglie indipendenti, mentre p.Gln11X, p.Gln12X, p.Trp33X e p.Arg56X sono state identificate in più di un paziente. Si ritiene che la maggior parte delle mutazioni *nonsense* causino aploinsufficienza mediante *nonsense-mediated decay* (NMD) degli mRNA alterati.

#### Missense:

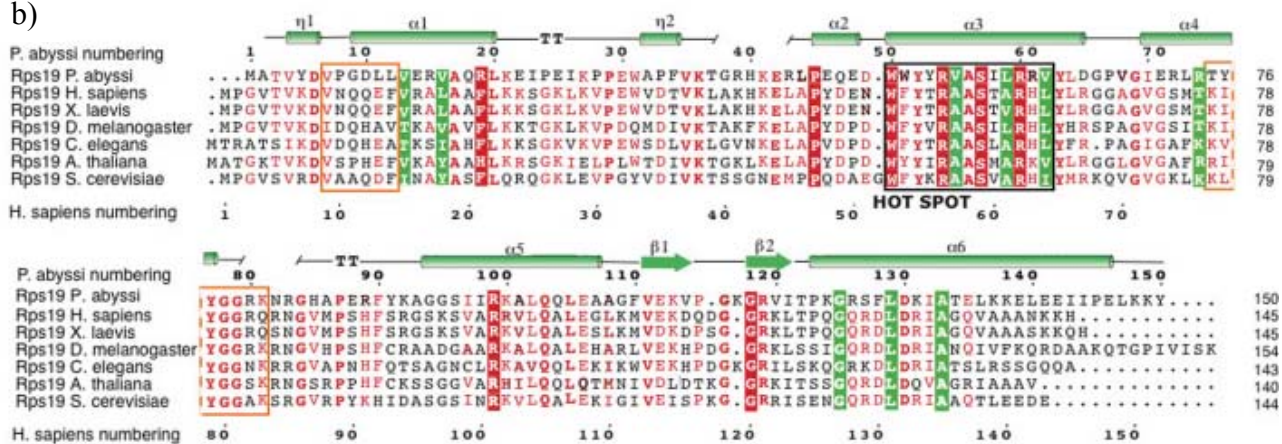
Le mutazioni *missense* sono le più comuni, essendo presenti nel 38% delle famiglie. 4 mutazioni sono qui riportate per la prima volta: p.Phe21Ser, p.Thr52Cys, p.Thr76Pro e p.Ala135Thr. p.Trp52Cys e p.Thr76Pro sono state ereditate dai pazienti dalle madri, che in infanzia soffrivano di anemia, aumentati livelli di adenosin-deaminasi (ADA) ed esadattilia la prima, alti livelli di ADA l'altra. p.Thr76Pro è stata riscontrata anche in una zia materna, che ha sofferto durante l'infanzia di anemia e aumentati livelli di ADA. Non sono disponibili dati familiari per le mutazioni p.Phe21Ser e p.Ala135Thr.

Diverse mutazioni *missense* sono ricorrenti in più di un paziente; le più frequenti sono p.Arg56Gln, p.Arg62Trp e p.Arg62Gln, riscontrate in 7, 10 e 7 pazienti, rispettivamente. 8 mutazioni *missense* ricorrenti sono localizzate in una regione altamente conservata tra i codoni 52 e 62 (*hotspot*).

a)



b)



**Figura 1.** a) Struttura di RPS19 di *P. abyssi*. Le mutazioni *missense* riscontrate nei pazienti DBA sono evidenziate in verde (classe I) o in rosso (classe II) come descritto in Gregory *et al.*, 2007. Le delezioni sono segnate in arancione. Il grassetto corrisponde alla numerazione dell'ortologo umano, mentre il grigio indica la numerazione di *P. abyssi*.

b) Allineamento delle sequenze dei due ortologi. Sequenze di RPS19 appartenenti a diverse specie sono state allineate utilizzando il software PipeAlign (Plewniak *et al.*, 2003). Le mutazioni *missense* e le delezioni sono evidenziate come precedentemente descritto. La numerazione umana e di *P. abyssi* sono mostrate, rispettivamente, sotto e sopra l'allineamento delle sequenze. Gli elementi della struttura secondaria sono indicati sopra le sequenze.

La recente definizione della struttura 3D ha aiutato a capire l'effetto delle mutazioni *missense* (Gregory *et al.*, 2007). Secondo la localizzazione di questi aminoacidi sulla struttura, in Gregory *et al.*, 2007 vengono definite due categorie di mutazioni *missense* (figura 1). La classe I coinvolge residui localizzati nel *core* idrofobico della proteina e che si pensa quindi possano essere fondamentali per il corretto ripiegamento e conseguentemente la corretta funzione di RPS19. Questa classe comprende p.Val15Phe, p.Leu18Pro, p.Phe21Ser, p.Ala57Pro, p.Ala61Glu, p.Leu64Pro, p.Gly127Glu, p.Leu131Pro e p.Ala135Thr. Le mutazioni della classe II, cioè p.Pro47Leu, p.Trp52Arg, p.Trp52Cys, p.Arg56Gln, p.Ser59Phe, p.Arg62Trp, p.Arg62Gln, p.Arg101His e p.Gly120Ser, si collocano sulla superficie esterna di RPS19 e quindi possono compromettere le sue interazioni con l'ambiente circostante e di conseguenza la sua funzione,

senza però che il ripiegamento della proteina venga alterato. Gli aminoacidi colpiti da mutazioni di classe II sono molto più conservati rispetto a quelli di classe I: questo potrebbe riflettere la loro importanza per la funzione di RPS19. I residui colpiti da mutazioni della classe II sono localizzati in due superfici conservate, entrambe caratterizzate da una forte carica positiva. La prima superficie corrisponde alla  $\alpha$ -elica 3, formata dai residui dal 52 al 67, che occupa una posizione centrale e critica all'interno della struttura. L'*hotspot* tra i codoni 52 e 62 cade all'interno di questa struttura secondaria, che è ritenuta essere di importanza fondamentale per il ripiegamento di RPS19 e per le sue interazioni. È interessante notare che le mutazioni di classe I che colpiscono residui al di fuori di questo *hotspot* spesso alterano le interazioni delle altre eliche con l' $\alpha$ -elica 3 (Gregory *et al.*, 2007).

#### Delezioni e inserzioni:

Il 26% delle famiglie (31) portano 29 piccole delezioni o inserzioni, localizzate nell'intero gene; la maggior parte di loro sposta la cornice di lettura, causando così la soppressione del codone di stop oppure l'inserimento di un codone di stop prematuro. Molte di queste mutazioni si pensa possano causare NMD o *nonstop decay* degli mRNA. Abbiamo riportato due delezioni *de novo* di un singolo nucleotide (c.412delG e c.417delA) che portano ad un *frameshift* ai codoni 138 e 139, con soppressione del codone di stop.

#### Difetti ai siti di *splicing*:

Sono stati riportati 13 difetti ai siti di *splicing*: tutti tranne uno sono mutazioni uniche (14 famiglie/127, 11%). Nella maggior parte dei casi l'allele mutato è soppresso mediante degradazione dell'mRNA aberrante.

#### Delezioni di grandi dimensioni e riarrangiamenti:

Nove pazienti (7% delle famiglie) presentano delezioni dell'intero gene o riarrangiamenti di grosse dimensioni del cromosoma 19, che portano ad aploinsufficienza. Tra queste sono incluse tre traslocazioni reciproche, due delle quali sono sbilanciate, due grosse delezioni e due delezioni intrageniche che coinvolgono più di un esone. Le delezioni intrageniche sono state identificate mediante la perdita di eterozigosi (LOH) degli SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) di RPS19 nei due casi in cui era possibile l'analisi dell'aplotipo. È probabile che la frequenza di queste mutazioni sia sottostimata in quanto le tecniche basate sull'analisi mediante PCR non possono rivelare la delezione di un esone; metodi di analisi alternativi, quali la *Multiple Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) potranno portare ad un quadro più completo.

## POLIMORFISMI

Diversi SNPs intragenici sono elencati in *database* genomici ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org);

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Sei (c.1-450T>C; c.71+80\_71+81insC; c.71+89C>G; c.356+14A>G; c.357-90C>T e c.412-175C>T) sono localizzati vicino a regioni di transizione tra introni ed esoni e possono essere di aiuto nel valutare la presenza di delezioni in studi di segregazione (Proust *et al.*, 2003; Orfali *et al.*, 2004).

Un'inserzione frequente di 4 bp all'interno del promotore (c.1-631\_1-632insGCCA), che un tempo veniva considerata una mutazione, oggi è considerata un polimorfismo (Huang *et al.*, 2006).

## CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE

Diversi articoli hanno esaminato l'effetto delle mutazioni in *RPS19* sulla sua funzione sia *in vivo* che *in vitro*. Dati funzionali sono quindi disponibili per 25/83 mutazioni. I dati *in vivo* includono l'espressione del trascritto, la valutazione della sintesi proteica e la biogenesi del ribosoma in cellule di pazienti che portano una mutazione.

Le mutazioni *missense* sono state oggetto di numerosi studi *in vitro*, nella speranza che la comprensione del comportamento delle proteine mutate potesse far luce sulla patogenesi della DBA. I mutanti sono stati espressi in un modello di lievito: l'ortologo di lievito RPS19B è stato mutagenizzato per accertarsi della sua capacità di sostenere la crescita cellulare e la biogenesi del ribosoma. La capacità dei mutanti umani di localizzarsi nel nucleolo e di assemblarsi nei ribosomi tradizionalmente attivi è stata invece studiata nelle linee cellulari.

La classificazione funzionale che noi proponiamo suddivide le mutazioni in 3 classi (tabella 2): 1) mutazioni che riducono i livelli dell' mRNA; 2) mutazioni che riducono i livelli della proteina e che impediscono la localizzazione nucleolare; 3) mutazioni che impediscono l'associazione con il ribosoma, ma non la localizzazione nucleolare. A causa della mancanza di dati, alcune mutazioni rimangono ancora difficili da classificare.

### Mutazioni che riducono i livelli dell'mRNA:

Questa categoria include grosse delezioni e traslocazioni che causano la perdita di un allele, ma anche mutazioni *nonsense* e quelle che portano allo spostamento della cornice di lettura, le quali possono generare un codone di stop prematuro (PTC) o un mRNA senza codone di stop. Un PTC o un mRNA senza codone di stop possono indurre un rapido *turnover* degli mRNA mediante NMD o mediante un meccanismo denominato *nonstop mediated decay* (reviews: Byers, 2002; Shell *et al.*, 2002; Wagner e Lykke-Andersen, 2002; Kuzmiaz e Maquat, 2006).

Sei mutazioni sono state analizzate in dettaglio a livello dell'mRNA in linee cellulari linfoblastoidi ottenute da pazienti DBA (Chatr-Aryamontri *et al.*, 2004). E' stato confermato che la delezione allelica fa diminuire i livelli dell'mRNA di RPS19 del 50%, indicando che la compensazione, sia trascrizionale che post-trascrizionale, è assente. Una transizione nell'introne 5 (c.411+1G>A), una



delezione dell'esone 5 (c.357\_411del), una mutazione *frameshift* nell'esone 2 (c.14\_15insA) e una mutazione *missense* nel codone d'inizio (p.Met1Val) portano ad una chiara diminuzione dei livelli di equilibrio dell'mRNA. Dato che il trattamento con inibitori della traduzione aumenta l'mRNA totale di RPS19 in tutte le linee cellulari con PTC o mutazioni che originano mRNA senza codone di stop, questa diminuzione è probabilmente dovuta a NMD e *nonstop decay*.

I livelli di mRNA sono stati analizzati anche mediante RT-PCR su cellule mononucleate di pazienti DBA (Gazda *et al.*, 2004). Quattro mutazioni che danno origine a PTC fanno diminuire i livelli dell'mRNA, mentre una mutazione al sito di *splicing* (c.356+1G>A) genera un PTC al codone 124, nell'esone 5, ma non ha effetto sui livelli del messaggero. Ciò è in accordo con il fatto che mutazioni che creano un PTC nell'ultimo esone della proteina o a livello di 50-55 nt a monte dell'ultima giunzione esone-esone non vanno incontro a NMD. Dato che l'esone 5 è composto da 55 nt, ci aspettiamo che nessuno dei PTC che mappano negli esoni 5 o 6 inducano NMD. Queste includono c.341delA, c.344\_345insAA, c.356+1G>A, c.196\_206del, c.238\_239insG, c.250\_251delAG, c.250\_251insA, c.293\_294delGT, c.383\_384delAA, c.390\_391delTC, p.Gln126X e p.Gln128X. Nei due casi che sono stati analizzati, diminuiti livelli di mRNA riducono in maniera sostanziale i livelli della proteina (Gazda *et al.*, 2004).

Tre mutazioni che possono ridurre i livelli dell'mRNA di RPS19 colpiscono il processamento del pre-rRNA (Flygare *et al.*, 2007). In questo studio, cellule CD34- mononucleate prelevate dal midollo osseo di pazienti DBA hanno dimostrato un aumento del rapporto pre-rRNA 21S/18SE. Il medesimo risultato è stato ottenuto studiando fibroblasti da due pazienti DBA con mutazioni in *RPS19* (Choemmel *et al.*, 2007) e in un modello sperimentale in cui RPS19 è stato silenziato utilizzando l'RNA *interference* (Flygare *et al.*, 2007; Choemmel *et al.*, 2007; Idol *et al.*, 2007).

La dimostrazione che diminuiti livelli di RPS19 portino ad un difetto funzionale della subunità piccola del ribosoma è in linea con l'ipotesi che vede la biogenesi del ribosoma coinvolta nell'eziologia della DBA.

#### Mutazioni che riducono i livelli della proteina e impediscono la localizzazione nucleolare:

L'effetto dei mutanti *missense* è stato studiato in pochi sistemi sperimentali, tra cui *Saccharomyces cerevisiae* e cellule di mammifero. L'analisi di 11 mutazioni mediante espressione di mutanti RPS19 in cellule *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293 ha permesso di identificare due classi con diverse caratteristiche funzionali (Angelini *et al.*, 2007). La prima classe, di cui fanno parte p.Val15Phe, p.Leu18Pro, p.Ala57Pro, p.Ala61Glu e p.Gly127Glu, include mutazioni che portano ad un drastico incremento del *turnover* della proteina, la cui degradazione è parzialmente mediata dal proteasoma. Oltre ad essere molto instabili, questi mutanti presentano anche un'alterata localizzazione intracellulare: infatti non è stato possibile rilevarli nel nucleolo mediante

esperimenti di immunofluorescenza, mentre la proteina selvatica e altri mutanti RPS19 erano chiaramente visibili. La relazione tra instabilità e assenza della proteina nel nucleolo non è ancora chiara; queste alterazioni sembrano non essere indipendenti ed è possibile che siano l'una la causa dell'altra (Da Costa *et al.*, 2003). Uno studio recente di Lam *et al.* ha mostrato che le RP, normalmente, si accumulano molto rapidamente nel nucleolo, ma per la maggior parte vengono degradate poiché in eccesso rispetto alla capacità di assemblaggio del ribosoma (Lam *et al.* 2007). Questa scoperta è in linea con l'idea che RPS19, se assemblato in maniera anomala con le altre proteine ribosomali, possa venire degradata molto rapidamente all'interno del nucleolo (Angelini *et al.*, 2007).

#### Mutazioni che impediscono l'assemblaggio nel ribosoma, ma non la localizzazione nucleolare:

Questa classe comprende 6 mutazioni *missense* (p.Pro47Leu, p.Trp52Arg, p.Arg56Gln, p.Arg62Trp, p.Arg62Gln e p.Arg101His) (Angelini *et al.*, 2007). Come precedentemente accennato, le proteine mutate sono visualizzabili nel nucleolo mediante immunofluorescenza. Analisi mediante western blot di estratti citoplasmatici frazionati hanno dimostrato che queste mutazioni impediscono l'assemblaggio di RPS19 in un ribosoma funzionale e quindi alterano la biogenesi del ribosoma stesso. In accordo con il difetto a livello del ribosoma, le due mutazioni p.Arg56Gln e p.Arg62Gln riducono l'efficienza di traduzione nei linfociti del sangue periferico dei pazienti DBA e in cellule K562 che esprimano cDNA codificante per mutanti di RPS19 (Cmejlova *et al.*, 2006).

#### Mutazioni non classificabili:

Nove mutazioni studiate funzionalmente non sono ancora classificabili nelle categorie precedentemente descritte. In questo gruppo si collocano 3 mutazioni *nonsense* e 2 *frameshift* ipotizzate causare PTC ma non NMD. Alcune di loro presentano livelli normali di mRNA o di proteina.

Le altre 4 mutazioni comprendono una delezione *in-frame* di tre aminoacidi e tre mutazioni *missense*. Le proteine mutate non sono state espresse *in vitro* e non si hanno perciò notizie precise sul loro comportamento. La delezione dei residui 58-60 potrebbe avere ripercussioni sull'interazione di RPS19 con altre proteine.

La mutazione p.Thr55Met è stata trovata sullo stesso allele di p.Val15Phe (Da Costa *et al.*, 2003). La proteina portatrice della mutazione p.Val15Phe non può entrare nel nucleolo ed è instabile (Da Costa *et al.*, 2003; Angelini *et al.*, 2007) mentre p.Thr55Met si localizza nel nucleolo (Da Costa *et al.*, 2003). Questi risultati suggeriscono che p.Thr55Met possa essere una variante silente.

La mutazione *missense* p.Leu64Pro, una mutazione nuova, colpisce un residuo localizzato nell' $\alpha$ -elica 3 della struttura 3D. Il residuo di prolina così introdotto potrebbe compromettere l'intero *folding* della proteina. p.Gly120Ser, un'altra mutazione nuova, colpisce invece un aminoacido

localizzato sulla superficie esterna della proteina e potrebbe quindi compromettere le interazioni con altre proteine. Finché non saranno disponibili dati funzionali riguardo al comportamento di questi mutanti, queste mutazioni non potranno essere classificate in uno dei gruppi precedentemente descritti.

L'effetto delle mutazioni *missense* di RPS19 è stato studiato in *Saccharomyces cerevisiae*, in cui sono stati introdotti (in un *background* RPS19-null) mutanti di RPS19 che portano nell'ortologo mutazioni corrispondenti a quelle dei pazienti DBA. Le mutazioni di lievito equivalenti a p.Leu64Pro, p.Arg62Gln, p.Val15Phe, p.Arg56Gln, p.Ser59Phe e p.Arg101His erano incapaci di crescere (Lèger-Silvestre *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2007), mentre p.Ala61Glu, p.Gly120Ser e p.Arg62Trp avevano un impatto limitato sulla vitalità cellulare. Il fatto che queste mutazioni siano patogeniche (con la possibile esclusione di p.Ala61Glu), ma non abbiano conseguenze sulla crescita cellulare del lievito, suggerisce che le proprietà e le funzioni di RPS19 sono leggermente diverse rispetto a quelle dell'ortologo umano. L'analisi ha inoltre rilevato un effetto diverso di due mutazioni nello stesso residuo aminoacidico (p.Arg62Gln e p.Arg62Trp). Ciò potrebbe indicare che la mutazione p.Arg62Trp presenti un effetto più marcato in RPS19 umana.

In conclusione, rappresentanti di ognuna delle classi sopra descritte sono associate con un difetto nella biogenesi del ribosoma. Questo suggerisce che tutte concorrano ad una insufficiente produzione di ribosomi mediante il loro effetto sui livelli di mRNA, di proteina o di assemblaggio del ribosoma.

## CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

La letteratura conferma che le mutazioni in *RPS19* sono caratterizzate da un'estrema variabilità di espressione fenotipica. La medesima mutazione è frequentemente associata con vari gradi di anemia, differenti risposte al trattamento e malformazioni di diverso tipo. Inoltre, i casi familiari dimostrano che mutazioni in RPS19 si associano anche con fenotipi DBA minori, quali macrocitosi isolata, isolati alti livelli di eADA o anemia transiente. Abbiamo osservato differenze nell'incidenza di anomalie congenite nelle nostre classi di pazienti: quelli con mutazioni che si pensa possano sopprimere l'espressione allelica (*nonsense* e *frameshift*) mostrano un tasso di malformazioni somatiche più elevato di quelli le cui mutazioni alterano un singolo aminoacido (*missense* e delezioni/inserzioni che mantengono la cornice di lettura). È interessante notare che i riarrangiamenti cromosomici che colpiscono il *locus* 19q13.2 sono sempre associati a malformazioni multiple. C'è quindi un gruppo di pazienti che presenta uno stato malformativo significativamente peggiore ( $p=0.0002$ ). Una *contiguous gene syndrome* potrebbe parzialmente spiegare questo fenotipo più severo, che include anche il ritardo mentale (Tentler *et al.*, 2000).

La gravità dell'anemia e la risposta al trattamento sono simili per tutti i sottotipi di mutazioni. In un precedente lavoro, siamo giunti alla conclusione che pazienti con riarrangiamenti cromosomici importanti presentano una scarsa risposta al trattamento con steroidi (6/7 sono trasfusione-dipendenti) e questo fenotipo è di solito associato ad una prognosi infausta (Campagnoli *et al.*, 2004). Nonostante ciò sia ancora da considerarsi corretto, ora è chiaro che la scarsa sensibilità agli steroidi sia comune a tutti i pazienti che mostrano alterazioni in *RPS19*. La loro risposta ad un primo trattamento con steroidi è del 46% (42/91 pazienti di cui sono disponibili dati, 2 dei quali mostrano una risposta parziale) contro il 70% di tutta la popolazione DBA (Ball *et al.*, 1996; Willig *et al.*, 1999b; Campagnoli *et al.*, 2004; Lipton *et al.*, 2006). Negli ultimi 10 anni sono stati pubblicati i dati clinici dei registri Europeo e Nordamericano (Ball *et al.*, 1996; Willig *et al.*, 1999b; Campagnoli *et al.*, 2004; Lipton *et al.*, 2006). La nostra revisione di questi *reports* con i dati relativi ad oltre 800 pazienti ha mostrato che mutazioni in *RPS19* mostrano una risposta agli steroidi significativamente più bassa ( $p < 0.0001$ ) e sono significativamente più predisposti a diventare trasfusione-dipendenti o richiedere SCT ( $p < 0.0001$ ) (Tabella 3). Come precedentemente detto, l'età di insorgenza della malattia sembra essere più precoce, ma il dato non è significativo.

Mutazioni in *RPS19* sono costantemente associate ad alti livelli di eADA. Tutti i 14 pazienti valutati (11 della nostra serie e 3 dalla letteratura: Gazda *et al.*, 2001; Proust *et al.*, 2003) presentano un'attività significativamente più elevata rispetto ai controlli. In tre famiglie, tutti i componenti che portano la mutazione presentano un'attività aumentata dell'enzima, il quale invece presenta un'attività a livelli normali negli individui portatori di *RPS19* selvatico senza mutazioni (dato non mostrato). L'attività di eADA è quindi un test utile per l'identificazione di casi di DBA associati a mutazioni in *RPS19*.

Alcune mutazioni in *RPS19*, i.e. p.Ala61Glu, p.Gly120Ser, p.Arg62Gln e p.Arg62Trp, hanno poche conseguenze sulla crescita cellulare e sull'accumulo del pre-rRNA 21S nel lievito (Lèger-Silvestre *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2007), mentre pazienti che portano queste stesse mutazioni presentano fenotipi DBA classici, incluse le malformazioni, con alti livelli di eADA e risposta variabile agli steroidi. p.Arg62Trp, in particolare, è spesso associata con una bassa risposta al trattamento con steroidi e quindi i pazienti che la portano sono trasfusione-dipendenti (Campagnoli *et al.*, 2004).

## DISCUSSIONE

La DBA è dovuta, per la maggior parte, a meccanismi di aploinsufficienza, anche se i meccanismi molecolari sono diversi.

Trattamenti disegnati sull'effetto molecolare delle mutazioni stanno attirando molto l'interesse (per

la fibrosi cistica, cfr. Kerem, 2005). Per esempio, mutazioni che riducono i livelli dell'mRNA potrebbero rispondere a farmaci che inibiscono l'NMD (Kuzmiak e Maquat, 2006) o a quelli che aumentano la trascrizione generale o specifica (quali gli inibitori delle HDAC: Cao *et al.*, 2005; Kernochan *et al.*, 2005; Hirtz *et al.*, 2005; Gardian *et al.*, 2004; Insinga *et al.*, 2005). Le proteine instabili che si formano in conseguenza alla presenza di alcune mutazioni potrebbero essere stabilizzate con inibitori del proteasoma (Vij *et al.*, 2006). Mutazioni a cui questo trattamento potrebbe essere applicabile sono quelle che modificano la struttura 3D della proteina, ma sono ugualmente in grado di localizzarsi nel nucleolo e di far parte di un ribosoma funzionale. Queste proprietà, comunque, non sono ancora state descritte per ognuno dei mutanti noti di RPS19. Queste ipotesi dovrebbero quindi essere testate *in vitro*.

La terapia genica è stata proposta anche per la DBA (Hamaguchi *et al.* 2002). La mancanza di un modello animale è il principale ostacolo per la valutazione dei suoi effetti *in vivo*. In generale, sembra che le mutazioni facenti parte della classe I siano le più adatte ad essere trattate con la terapia genica. Nonostante non ci sia indicazione che ogni mutazione *missense* abbia un effetto dominante negativo, esperimenti *in vitro* e *in vivo* sono necessari per identificare gli effetti del trascritto e della proteina mutanti in un contesto di terapia genica.

Infine, la somministrazione di leucina è stata proposta per stimolare la sintesi proteica (Cmejlova *et al.*, 2006). Un solo paziente è andato in remissione clinica dopo somministrazione di leucina (Pospisilova *et al.*, 2007). Un *trial* clinico è necessario per validare questo approccio terapeutico.

In conclusione, vorremmo marcare l'importanza della definizione dello stato di RPS19 nei pazienti DBA. Se i nostri dati sono confermati questa definizione non sarà importante solo per la diagnosi, ma anche per la prognosi e forse per una trattamento personalizzato al paziente.

## BIBLIOGRAFIA

- Angelini M, Cannata S, Mercaldo V, Gibello L, Santoro C, Dianzani I, Loreni F. 2007. Diamond-Blackfan Anemia affect the assembly of ribosomal protein S19 into the ribosome. *Hum Mol Genet.* 16:1720-7.
- Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR, Jefferson LS. 2001. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J Nutr.* 131:1171-1176.
- 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.
- Byers PH. Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. 2002. *J Clin Invest.* 109:3-6.
- Caldarola S, Amaldi F, Proud CG, Loreni F. 2004. Translational regulation of terminal oligopyrimidine mRNAs induced by serum and amino acids involves distinct signaling events. *J*

Biol Chem. 279:13522-13531.

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.

Cao H, Jung M, Stamatoyannopoulos G. 2005. Hydroxamide derivatives of short-chain fatty acid have erythropoietic activity and induce gamma gene expression in vivo. *Exp Hematol*. 33:1443-1449.

Chatr-Aryamontri A, Angelini M, Garelli E, Tchernia G, Ramenghi U, Dianzani I, Loreni F. 2004. Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 24:526-533.

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, Blafkova J, Stopka T, Zavadil J, Pospisilova D, Mihal V, Petrtlyova K, Jelinek J. 2000. Ribosomal protein S19 gene mutations in patients with Diamond-Blackfan Anemia and identification of ribosomal protein S19 pseudogenes. *Blood Cells Mol Dis*. 26:124-132.

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].

Cmejlova J, Cerna Z, Votava T, Pospisilova D, Cmejla R. 2006. Identification of a new in-frame deletion of six amino acids in ribosomal protein S19 in a patient with Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 36:337-341.

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

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.

Dianzani I, Garelli E, Ramenghi U. 1996. Diamond-Blackfan anemia: a congenital defect in erythropoiesis. *Haematologica*. 81:560-572.

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.

Eitan Kerem. 2005. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatric Pulmonology* 40:183-196.

Farral J, Nater M, Caywood E, McDevitt M, Kowalski J, Takemoto C, Talbot C, Meltzer P, Esposito D, Beggs A, Schneider H, Grabowska A, Ball S, Niewiadomska E, Sieff C, Vlachos A, Atsidaftos E, Ellis S, Lipton J, Gazda H, Arceci RJ. 2007. A large ribosomal subunit protein abnormality in Diamond-Blackfan Anemia (DBA). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 110:422.

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.

Gardian G, Browne SE, Choi DK, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF. 2005. Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem*. 280:556-563.

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, Schratt 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.

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. 2001. Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23.3-p22 and for non-19q non-8p disease. *Blood* 97:2145-2150.

Gazda HT, Sheen MR, Darras N, Shneider H, Sieff CA, Ball SE, Niewiadomska E, Newburger PE, Atsidaftos E, Vlachos A, Lipton JM, Beggs AH. 2007. Mutations of the genes for Ribosomal Proteins L5 and L11 are common cause of Diamond-Blackfan Anemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 110:421.

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. 2004. RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. *Br J Haematol*. 127:105-113.

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

Gustavsson P, Garelli E, Draptchinskaia N, Ball S, Willig TN, Tentler D, Dianzani I, Punnett HH, Shafer FE, Cario H, Ramenghi U, Glomstein A, Pfeiffer RA, Goringe A, Olivieri NF, Smibert E, Tchernia G, Elinder G, Dahl N. 1998. Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 63:1388-1395.

Gustavsson P, Skeppner G, Johansson B, Berg T, Gordon L, Kreuger A, Dahl N. 1997. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J Med Genet*. 34:779-782.

Gustavsson P, Willig TN, van Haeringen A, Tchernia G, Dianzani I, Donner M, Elinder G, Henter JI, Nilsson PG, Gordon L, Skeppner G, van't Veer-Korthof L, Kreuger A, Dahl N. 1997. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet*. 16:368-371.

Hamaguchi I, Ooka A, Brun A, Richter J, Dahl N, Karlsson S. 2002. Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 100:2724-2731.

Hirtz D, Iannaccone S, Heemskerk J, Gwinn-Hardy K, Moxley R 3rd, Rowland LP. 2005. Challenges and opportunities in clinical trials for spinal muscular atrophy. *Neurology*. 65:1352-

1357.

- Huang Q, Robledo S, Wilson DB, Bessler M, Mason PJ. 2006. A four base pair insertion in exon 1 of the RPS19 gene is a common polymorphism in African-Americans. *Br J Haematol.* 135:745-746.
- 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.
- Insinga A, Minucci S, Pelicci PG. 2005. Mechanisms of selective anticancer action of histone deacetylase inhibitors. *Cell Cycle.* 4:741-743.
- Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ. 2005. The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum Mol Genet.* 14:1171-1182.
- Kuzmiak HA, Maquat LE. 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med.* 12:306-316.
- Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS. 2007. Analysis of Nucleolar Protein Dynamics Reveals the Nuclear Degradation of Ribosomal Proteins. *Curr Biol.* 17:749-760.
- Lecompte O, Ripp R, Thierry J-C, Moras D, Poch O. 2002. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucl Acids Res.* 30:5382-5390.
- 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.
- Lipton JM, Federman N, Khabbaze Y, Schwartz CL, Hilliard LM, Clark JI, Vlachos A. 2001. Diamond-Black Anemia Registry. Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *J Pediatr Hematol Oncol.* 23:39-44.
- 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. Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver. *Eur J Cell Biol.* 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.
- Matsson H, Davey EJ, Draptchinskaia N, Hamaguchi I, Ooka A, Leveen P, Forsberg E, Karlsson S, Dahl N. 2004. Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol Cell Biol.* 24:4032-4037.
- Matsson H, Klar J, Draptchinskaia N, Gustavsson P, Carlsson B, Bowers D, de Bont E, Dahl N. 1999. Truncating ribosomal protein S19 mutations and variable clinical expression in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet.* 105:496-500.
- 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.
- Orfali KA, Ohene-Abuakwa Y, Ball SE. 2004. Diamond Blackfan anaemia in the UK: clinical and genetic heterogeneity. *Br J Haematol.* 125:243-252. Erratum in: *Br J Haematol.* 2005 128:130.



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.

Plewniak F, Bianchetti L, Brelivet Y, Carles A, Chalmel F, Lecompte O, Mochel T, Moulinier L, Muller A, Muller J, Prigent V, Ripp R, Thierry J-C, Thompson J-D, Wicker N, Poch O. 2003. PipeAlign: A new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Research*. 31::3829-3832.

Pospisilova D, Cmejlova J, Hak J, Adam T, Cmejla R. 2007. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Haematologica*. 92:92e066.

Proust A, Da Costa L, Rince P, Landois A, Tamary H, Zaizov R, Tchernia G, Delaunay J; 2003. SHIP Working Group on DBA. Ten novel Diamond-Blackfan anemia mutations and three polymorphisms within the RPS19 gene. *Hematol J*. 4:132-136.

Ramenghi U, Campagnoli MF, Garelli E, Carando A, Brusco A, Bagnara GP, Strippoli P, Izzi GC, Brandalise S, Riccardi R, Dianzani I. 2000. Diamond-Blackfan anemia: report of seven further mutations in the RPS19 gene and evidence of mutation heterogeneity in the Italian population. *Blood Cells Mol Dis*. 26:417-422.

Schell T, Kulozik AE, Hentze MW. 2002. Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome Biol*. 3: reviews1006.1–reviews1006.6.

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.

Tentler D, Gustavsson P, Elinder G, Eklof O, Gordon L, Mandel A, Dahl N. 2000. A microdeletion in 19q13.2 associated with mental retardation, skeletal malformations, and Diamond-Blackfan anaemia suggests a novel contiguous gene syndrome. *J Med Genet*. 37:128-131.

Vij N, Fang S, Zeitlin PL. 2006. Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications. *J Biol Chemistry*. 281:17369–17378.

Wagner and Lykke-Andersen J. 2002. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol*. 22:8114-8121.

Willig TN, Drapchinskaia 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. 1999. Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond Blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood*. 94:4294-4306.

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.

**Tabella 1.** Mutazioni di *RPS19* nei pazienti con anemia di Diamond-Blackfan. La numerazione è basata sulla sequenza del cDNA.

| Type of mutation | Region   | cDNA Mutation | Expected Protein Alteration | Nr of families | References   |                              |
|------------------|----------|---------------|-----------------------------|----------------|--|------------------------------|
| Nonsense         |          |               |                             | <b>24</b>      |  |                              |
|                  | Exon 2   | c.31C>T       | p.Gln11X                    | 4              | Willig et al. [1999a]; Proust et al. [2003]; Gazda et al. [2004]   |                              |
|                  | Exon 2   | c.34C>T       | p.Gln12X                    | 3              | Willig et al. [1999a]; Orfali et al. [2004]  |                              |
|                  | Exon 3   | c.99G>A       | p.Trp33X                    | 2              | Willig et al. [1999a]; Matsson et al. [1999]   |                              |
|                  | Exon 3   | c.144C>A      | p.Tyr48X                    | 1              | Willig et al. [1999a]  |                              |
|                  | Exon 3   | c.156G>A      | p.Trp52X                    | 1              | Willig et al. [1999a]  |                              |
|                  | Exon 3   | c.166C>T      | p.Arg56X                    | 2              | Willig et al. [1999a]; Proust et al. [2003]  |                              |
|                  | Exon 4   | c.280C>T      | p.Arg94X                    | 8              | Draptchinskaia et al. [1999]; Willig et al. [1999a]; Matsson et al. [1999]; Proust et al. [2003]; Orfali et al. [2004]; this paper |                              |
|                  | Exon 4   | c.340G>T      | p.Glu114X                   | 1              | Idol et al. [2007]   |                              |
|                  | Exon 5   | c.376C>T      | p.Gln126X                   | 1              | Idol et al. [2007]   |                              |
|                  | Exon 5   | c.382C>T      | p.Gln128X                   | 1              | Proust et al. [2003]   |                              |
|                  | Missense |               |                             |                | <b>49</b>  |                              |
|                  |          | Exon 2        | c.1A>G                      | p.Met1Val      | 1  | Draptchinskaia et al. [1999] |
| Exon 2           |          | c.3G>C        | p.Met1Ile                   | 1              | Ramenghi et al. [2000]   |                              |
| Exon 2           |          | c.3G>T        | p.Met1Ile                   | 2              | Ramenghi et al. [2000]; Orfali et al. [2004]   |                              |
| Exon 2           |          | c.3G>A        | p.Met1Ile                   | 2              | Proust et al. [2003]; this paper   |                              |
| Exon 2           |          | c.43G>T       | p.Val15Phe                  | 1              | Willig et al. [1999a]  |                              |
| Exon 2           |          | c.53T>C       | p.Leu18Pro                  | 1              | Ramenghi et al. [2000]   |                              |
| Exon 2           |          | c.53T>G       | p.Leu18Arg                  | 1              | Gazda et al. [2004]  |                              |
| Exon 2           |          | c.62T>C       | p.Phe21Ser                  | 1              | this paper   |                              |
| Exon 3           |          | c.140C>T      | p.Pro47Leu                  | 1              | Ramenghi et al. [2000]   |                              |

| Type of mutation         | Region       | cDNA Mutation     | Expected Protein Alteration | Nr of families | References   |
|--------------------------|--------------|-------------------|-----------------------------|----------------|--|
| Missense                 | Exon 3       | c.154T>C          | p.Trp52Arg                  | 1              | Draptchinskaia et al. [1999]   |
|                          | Exon 3       | c.156G>C          | p.Trp52Cys                  | 1              | this paper   |
|                          | Exon 2 and 3 | c.[43G>T; 164C>T] | p.[Val15Phe; Thr55Met]      | 1              | Da Costa et al. [2003]   |
|                          | Exon 3       | c.167G>A          | p.Arg56Gln                  | 6              | Willig et al. [1999a]; Cmejla et al. [2000]; Orfali et al. [2004]; this paper  |
|                          | Exon 3       | c.169G>C          | p.Ala57Pro                  | 1              | Orfali et al. [2004]   |
|                          | Exon 4       | c.176C>T          | p.Ser59Phe                  | 1              | Gazda et al. [2004]  |
|                          | Exon 4       | c.182C>A          | p.Ala61Glu                  | 1              | Willig et al. [1999a]  |
|                          | Exon 4       | c.184C>T          | p.Arg62Trp                  | 10             | Draptchinskaia et al. [1999]; Willig et al. [1999a]; Ramenghi et al. [2000]; Campagnoli et al. [2004]; Gazda et al. [2004] |
|                          | Exon 4       | c.185G>A          | p.Arg62Gln                  | 7              | Cmejla et al. [2000]; Gazda et al. [2001]; Proust et al. [2003]; Gazda et al. [2004]                                       |
|                          | Exon 4       | c.191T>C          | p.Leu64Pro                  | 1              | Léger-Silvestre et al. [2005]  |
|                          | Exon 4       | c.226A>C          | p.Thr76Pro                  | 1              | this paper   |
|                          | Exon 4       | c.302G>A          | p.Arg101His                 | 2              | Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]   |
|                          | Exon 5       | c.358G>A          | p.Gly120Ser                 | 1              | Willig et al. [1999a]  |
|                          | Exon 5       | c.380G>A          | p.Gly127Glu                 | 1              | Willig et al. [1999a]  |
|                          | Exon 5       | c.392T>G          | p.Leu131Arg                 | 1              | Gazda et al. [2001]  |
|                          | Exon 5       | c.392T>C          | p.Leu131Pro                 | 1              | Proust et al. [2003]   |
|                          | Exon 5       | c.403G>A          | p.Ala135Thr                 | 1              | this paper   |
| Insertions and deletions |              |                   |                             | <b>31</b>      |  |
|                          | Exon 2       | c.14_15insA       | p.Val6CysfsX45              | 1              | Draptchinskaia et al. [1999]   |
|                          | Exon 2       | c.20_32del        | p.Lys7SerfsX18              | 1              | Proust et al. [2003]   |

| Type of mutation         | Region      | cDNA Mutation                        | Expected Protein Alteration    | Nr of families       | References  |
|--------------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------|---|
| Insertions and deletions | Exon 2      | c.25_42del                           | p.Val9_Phe14del                | 1                    | Proust et al. [2003]  |
|                          | Exon 2      | c.36_37insAG                         | p.Glu13ArgfsX17                | 1                    | Gazda et al. [2004]   |
|                          | Exon 2      | c.53_54insAGA                        | p.Leu18_Ala19insGlu            | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 2      | c.58delG                             | p.Ala20ProfsX9                 | 1                    | Campagnoli et al. [2004]  |
|                          | Exon 3      | c.104_105insA                        | p.Asp35GlufsX16                | 1                    | Draptchinskaia et al. [1999]  |
|                          | Exon 3      | c.106_107insA                        | p.Thr36AsnfsX15                | 1                    | Gazda et al. [2004]   |
|                          | Exon 3      | c.[157_158delinsAA;<br>160_161insCT] | p.[Phe53Asn;<br>Tyr54SerfsX23] | 1                    | Matsson et al. [1999]   |
|                          | Exon 4      | c.196_206del                         | p.Leu66ArgfsX84                | 1                    | Cmejla et al. [2000]  |
|                          | Exon 4      | c.222delC                            | p.Met75X                       | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 4      | c.233_250del                         | p.Ile78_Gln83delinsArg         | 1                    | Cmejlova et al. 2006  |
|                          | Exon 4      | c.238_239insG                        | p.Arg82ThrfsX72                | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 4      | c.250_251delAG                       | p.Arg84LysfsX69                | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 4      | c.250_251insA                        | p.Arg84LysfsX70                | 1                    | Gazda et al. [2004]   |
|                          | Exon 4      | c.274_304del                         | p.Phe92GlyfsX9                 | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 4      | c.293_294delGT                       | p.Val99GlyfsX54                | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 4      | c.307delG                            | p.Val103SerfsX8                | 1                    | Matsson et al. [1999]   |
|                          | Exon 4      | c.328delC                            | p.Leu110X                      | 1                    | Orfali et al. [2004]  |
|                          | Exon 4      | c.341delA                            | p.Lys115ArgfsX9                | 2                    | Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]  |
|                          | Exon 4      | c.344_345insAA                       | p.Asp116ArgfsX9                | 1                    | Orfali et al. [2004]  |
|                          | Exon 5      | c.383_384delAA                       | p.Asp130SerfsX23               | 4                    | Willig et al. [1999a]; Ramenghi et al. [2000]; Campagnoli et al. [2004]; Orfali et al. [2004] |
|                          | Exon 5      | c.386_387ins8                        | p.Leu131Lysfs                  | 1                    | Cmejla et al. [2000]  |
|                          | Exon 5      | c.390_391delTC                       | p.Leu131GlyfsX22               | 1                    | Willig et al. [1999a]   |
|                          | Exon 6      | c.412delG                            | p.Val138Trpfs                  | 1                    | this paper  |
| Exon 6                   | c.417delA   | p.Ala140Leufs                        | 1                              | this paper           |   |
| Exon 6                   | c.435_*3del | p.His145Glnfs                        | 1                              | Proust et al. [2003] |   |

| Type of mutation               | Region         | cDNA Mutation                      | Expected Protein Alteration | Nr of families | References  |
|--------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------|---|
| Splice site mutations          |                |                                    |                             | <b>14</b>      |   |
|                                | Intron 1       | c.1-1G>T                           | No protein                  | 1              | Draptchinskaia et al. [1999]                        |
|                                | Intron 1       | c.1-1G>A                           | No protein                  | 1              | Campagnoli et al. [2004]                            |
|                                | Intron 2 and 4 | c.[71+1G>A;<br>356+169_356+170del] | No protein                  | 1              | Proust et al. [2003]                                |
|                                | Intron 2       | c.71+1_71+4delGTGA                 | No protein                  | 1              | Draptchinskaia et al. [1999]                        |
|                                | Intron 2       | c.71+1G>A                          | No protein                  | 1              | Orfali et al. [2004]                                |
|                                | Intron 3       | c.173-2A>T                         | p.Ala58_Thr60del            | 1              | Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]          |
|                                | Intron 3       | c.173-1delG                        | p.Ala58_Thr60del            | 1              | Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]          |
|                                | Intron 3       | c.173-1G>A                         | p.Ala58_Thr60del            | 1              | Gazda et al. [2004]                                 |
|                                | Intron 4       | c.356+2T>A                         | p.Ser59AlafsX4 (ex. 4 del)  | 1              | Willig et al. [1999a]                               |
|                                | Intron 4       | c.357-1G>T                         | p.Gly120Trpfs (ex. 5 del)   | 1              | Campagnoli et al. [2004]                            |
|                                | Intron 4       | c.357-1G>A                         | p.Gly120Trpfs (ex. 5 del)   | 1              | Campagnoli et al. [2004]                            |
|                                | Intron 4       | c.356+1G>A                         | p.Ser59AlafsX4 (ex. 4 del)  | 1              | Gazda et al. [2004]                                 |
|                                | Intron 5       | c.411+1G>A                         | p.Gly120Trpfs (ex. 5 del)   | 2              | Ramenghi et al. [2000]; this paper                  |
| Cytogenetic or large deletions |                |                                    |                             | <b>9</b>       |   |
|                                |                | t(X;19) (p21;q13)                  | NA                          | 1              | Gustavsson et al. [1997a]                           |
|                                |                | t(8;19)(q35;q13)                   | NA                          | 1              | Gustavsson et al. [1998]                            |
|                                |                | t(1;19)(p32;q13)                   | NA                          | 1              | Campagnoli et al. [2004]                            |
|                                |                | deletion of a complete allele      | NA                          | 2              | Gustavsson et al. [1997b]; Gustavsson et al. [1998] |
|                                |                | deletion of exon 5                 | p.Gly120Trpfs               | 2              | Draptchinskaia et al. [1999]; Proust et al. [2003]  |
|                                |                | LOH 3' to exon 3                   |                             | 1              | Orfali et al. [2004]                                |
|                                |                | LOH 5' to exon 4                   |                             | 1              | Orfali et al. [2004]                                |
|                                |                |                                    |                             | <b>127</b>     |   |

GenBank Reference sequence: NM\_001022.3

**Tabella 2.** Classificazione funzionale delle mutazioni in *RPS19*.

MUTATIONS THAT REDUCE RPS19 mRNA LEVELS

| cDNA Mutation                 | Expected Protein Alteration | mRNA Expression   | Protein Expression | Protein Localization | Effects on rRNA Metabolism | Effects on Protein synthesis   | Effects on Cell Growth |
|-------------------------------|-----------------------------|---|--------------------|----------------------|----------------------------|--|------------------------|
| Deletion of a complete allele | Haploinsufficiency          | Decreased to 50% of controls (lymphoblastoid cell lines, BM CD34+) <sup>2,8</sup> .   |                    |                      |                            |  |                        |
| t(X;19)(q21;q13)              | Haploinsufficiency          | Normal in PB MNC, but reduced levels compared to controls in BM CD34+. No abnormal size transcript <sup>8</sup> .           |                    |                      |                            | 18S rRNA processing defect as indicated by increase in 21S pre-rRNA (increased 21S/18SE ratio). BM CD34- cells: ratio 3,3*. BM CD34+ cells: ratio 1,7* <sup>6</sup> . Similar effects in yeast <sup>10</sup> . |                        |
| c.14_15insA                   | p.Val6CysfsX45              | Decreased to 50-60% of controls due to NMD of the aberrant mRNA** (lymphoblastoid cell lines) <sup>2</sup> .                |                    |                      |                            |  |                        |
| c.36_37insAG                  | p.Glu13ArgfsX17             | 2 to 4-fold decreased compared to controls. Aberrant mRNA not detectable <sup>++</sup> (BM CD34+ and PB MNC) <sup>7</sup> . |                    |                      |                            |  |                        |

|                 |                    |   |   |
|-----------------|--------------------|---|---|
| c.106_107insA   | p.Thr36AsnfsX15    | 2 to 4-fold decreased compared to controls; low amounts of aberrant mRNA detectable <sup>++</sup> (BM CD34+ and PB MNC) <sup>7</sup> .  | 2-fold protein reduction in CD34+ BM cells, normal levels in peripheral MNC cells. Putative truncated protein not detectable <sup>7</sup> . |
| Exon 5 deletion | Gly120_Gln137delfs | Reduced to 60% of controls (wt 50%-mutant 10%)**, aberrant mRNA is subjected to nonstop decay (lymphoblastoid cell lines) <sup>2</sup>  |   |
| c.1A>G          | p.Met1Val          | Reduced to 70-80% of controls in lymphoblastoid cell lines <sup>2</sup> . Part of the mutated mRNA could use a downstream in-frame AUG, the other is degraded through NMD.                      |   |
| c.411+1G>A      | p.Gly120Trpfs      | Reduced to 60% of controls (10% mutant, 50% wt)** (lymphoblastoid cell lines) <sup>2</sup> . Nonstop decay of mRNA with skipped exon 5. More than one aberrantly spliced mRNA could be present. |   |

---

|         |          |   |   |
|---------|----------|---|---|
| c.31C>T | p.Gln11X | 2 to 4-fold decreased compared to controls <sup>++</sup> (BM CD34+ and PB MNC) <sup>7</sup> . | 3-fold protein reduction in CD34+ BM cells, normal levels in peripheral MNC cells. Putative truncated protein not detectable <sup>7</sup> . |
|---------|----------|---|---|

---

\*relative to normal controls.

\*\*translation inhibition by cycloheximide stabilizes the mutant mRNA form, as expected in NMD and nonstop decay.

<sup>++</sup>likely subjected to NMD.

BM=bone marrow, MNC=mononuclear cells, NMD=nonsense mediated decay, PB=peripheral blood.

#### MUTATIONS THAT REDUCE RPS19 PROTEIN LEVELS AND IMPAIR NUCLEOLAR LOCALIZATION

---

| cDNA Mutation | Expected Protein Alteration | mRNA Expression | Protein Expression               | Protein Localization                   | Effects on rRNA Metabolism | Effects on Protein Synthesis   | Effects on Cell Growth |
|---------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------------|--|----------------------------|--|------------------------|
| c.196_206del1 | p.Leu66ArgfsX84             |                 | Protein instability <sup>4</sup> | No nucleolar localization <sup>4</sup> |                            | Cellular translation rate is not affected in K562 cells, but translation is reduced in patient's lymphocytes (basal translation: 60% , activated translation: 50%)* <sup>4</sup> |                        |

---



|            |            |   |  |  |  |
|------------|------------|---|--|--|--|
| c.43G>T    | p.Val15Phe | Reduced protein levels. Protein instability (in Cos7 and HEK293 cells) <sup>1,5</sup> . | No nucleolar localization, no ribosome association (in Cos7 and HEK293 cells) <sup>1,5</sup> . | The yeast orthologue mutation (p.Ile15Phe) causes 18S rRNA processing defect, as indicated by increase of 21S rRNA and nucleolar accumulation of pre-40S particles <sup>10</sup> . | The yeast orthologue mutation (p.Ile15Phe) abolishes the ability of Rps19A protein to support cell growth <sup>10</sup> .          |
| c.53T>C    | p.Leu18Pro | Reduced protein levels. Protein instability (in HEK293 cells) <sup>1</sup> .            | No nucleolar localization, no ribosome association (in HeLa and HEK293 cells) <sup>1</sup>     |  |  |
| c.169G>C   | p.Ala57Pro | Reduced protein levels. Protein instability (in HEK293 cells) <sup>1</sup>              | No nucleolar localization, no ribosome association (in HeLa and HEK293 cells) <sup>1</sup>     |  |  |
| c.182C>A** | p.Ala61Glu | Reduced protein levels. Protein instability (in HEK293 cells) <sup>1</sup>              | No nucleolar localization, no ribosome association (in HeLa and HEK293 cells) <sup>1</sup>     | The yeast orthologue mutation (p.Ala62Ser) does not influence 21S/18S ratio <sup>10</sup> .  | The yeast orthologue mutation (p.Ala62Ser) does not influence the ability of Rps19A protein to support cell growth <sup>10</sup> . |

---

|          |             |   |  |
|----------|-------------|---|--|
| c.380G>A | p.Gly127Glu | Reduced protein levels. Protein instability (in Cos7 and HEK293 cells) <sup>1,5</sup> . | No nucleolar localization, no ribosome association (in Cos7, HeLa and HEK293 cells) <sup>1,5</sup> . |
|----------|-------------|---|--|

---

\*Translation was found reduced in lymphocytes from all the DBA subjects studied irrespective of the presence of RPS19 mutations<sup>4</sup>.

\*\*The pathogenetic role for this mutation was questioned by some authors<sup>10</sup>.

BM=bone marrow, MNC=mononuclear cells, NMD=nonsense mediated decay, PB=peripheral blood.

#### MUTATIONS THAT IMPAIR RIBOSOMAL ASSOCIATION BUT NOT NUCLEOLAR LOCALIZATION

---

| cDNA Mutation | Expected Protein Alteration | mRNA Expression | Protein Expression   | Protein Localization   | Effects on rRNA Metabolism  | Effects on Protein Synthesis | Effects on Cell Growth |
|---------------|-----------------------------|-----------------|--|--|---|------------------------------|------------------------|
| c.140C>T      | p.Pro47Leu                  |                 | Apparently normal protein levels. Intermediate stability (HEK293) <sup>1,9</sup> . | Nucleolar localization, but no ribosome association (HeLa-HEK293) <sup>1</sup> | No alteration in polysomal profile. 18S rRNA processing defect, as indicated by increased ratio of 21S to 18SE pre-rRNA* (lymphoblastoid cell lines) <sup>9</sup> . |                              |                        |
| c.154T>C      | p.Trp52Arg                  |                 | Apparently normal protein levels. Intermediate stability (HEK293) <sup>1</sup>     | Nucleolar localization, but no ribosome association (HeLa-HEK293) <sup>1</sup> |   |                              |                        |

---

|          |            |   |  |   |  |  |   |
|----------|------------|---|--|---|--|--|---|
| c.167G>A | p.Arg56Gln | Normal mRNA levels (BM CD34+ and PB MNC) <sup>8</sup> . | Apparently normal protein levels. Intermediate stability (Cos7-HEK293) <sup>1,5</sup> .  | Nucleolar localization, but no ribosome association (Cos7-HeLa-HEK293) <sup>1,5</sup> . | The yeast orthologue mutation (R63Q) causes 18S rRNA processing defect, as indicated by increase in 21S rRNA and nucleolar accumulation of pre-40S particles <sup>10</sup> . | Translation rate reduced to 63% of controls after transfection in K562 cells <sup>4</sup> . In lymphocytes, translation is reduced to 55% of controls both in basal conditions and after PHA activation <sup>**4</sup> . | The yeast orthologue mutation (p.Arg63Gln) impairs cell growth in yeast <sup>10</sup> . |
| c.184C>T | p.Arg62Trp |   | Apparently normal protein levels <sup>1,5</sup> . Intermediate stability and increased degradation, partly mediated by proteasome (Cos7-HEK293) <sup>1</sup> | Nucleolar localization, but no ribosome association (Cos7-HeLa-HEK293) <sup>1,5</sup> . |  |  |   |

|          |             |   |  |   |  |   |
|----------|-------------|---|--|---|--|---|
| c.185G>A | p.Arg62Gln  | Apparently normal protein levels . Intermediate stability (HEK293) <sup>1</sup> | Nucleolar localization, but no ribosome association (HeLa-HEK293) <sup>1</sup> . It alters the ultrastructural nucleolar organization in dermal fibroblasts <sup>3</sup> . | 18S rRNA processing defect both in yeast (orthologue mutation: p.Arg63Gln) and in human dermal fibroblasts, as indicated by increase in 21S pre-rRNA <sup>3,10</sup> . Accumulation of 45S and 41S precursors is observed in dermal fibroblasts <sup>3</sup> ; yeast cells show nucleolar accumulation of pre-40S particles <sup>10</sup> . | Translation rate reduced to 56% of controls after transfection in K562 cells <sup>4</sup> . In lymphocytes, translation is reduced to 66% of controls in basal conditions and to 62% after PHA activation <sup>**4</sup> . | The human mutation impairs growth of skin fibroblasts <sup>3</sup> and the yeast orthologue mutation (p.Arg63Gln) impairs but does not abolish cell growth in yeast <sup>10</sup> . |
| c.302G>A | p.Arg101His | Normal mRNA levels (PB MNC) <sup>7</sup> .                                      | Apparently normal protein levels. Intermediate stability and increased degradation, partly by proteasome <sup>1</sup>  | Nucleolar localization, but no ribosome association (HeLa-HEK293) <sup>1</sup>  |  |   |

\*21S/18SE ratio was not reported for this single mutation, but for 6 DBA lymphoblastoid cell lines with 3 different RPS19 mutations (mean value DBA: 1.22-/-0.39; controls: 0.68+/-0.1)<sup>9</sup>.

\*\*Translation was found reduced in lymphocytes from all the DBA subjects studied irrespective of the presence of RPS19 mutations<sup>4</sup>.

BM=bone marrow, MNC=mononuclear cells, NMD=nonsense mediated decay, PB=peripheral blood.

UNCLASSIFIED MUTATIONS

| cDNA Mutation                      | Expected Protein Alteration | mRNA Expression  | Protein Expression                                     | Protein Localization                         | Effects on rRNA Metabolism   | Effects on Protein Synthesis | Effects on Cell Growth  |
|------------------------------------|-----------------------------|--|--|--|--|------------------------------|---|
| c.[157_158delinsAA; 160_161ins CT] | p.[Phe53Asn; Tyr54SerfsX23] | Levels similar to controls could exclude NMD (BM CD34+ and PB MNC <sup>8</sup> . |  |  | 18S rRNA processing defect, as indicated by increase in 21S pre-rRNA (21S/18SE ratio:3.8*) (BM CD34- cells) <sup>6</sup> .   |                              |   |
| c.164C>T                           | p.Thr55Met                  |  | Apparently normal protein levels (Cos7) <sup>5</sup> . | Nucleolar localization (Cos7) <sup>5</sup> . |  |                              |   |
| c.191T>C                           | p.Leu64Pro                  |  |  |  | The yeast orthologue mutation (p.Ile65Pro) causes 18S rRNA processing defect, as indicated by increase in 21S rRNA and nucleolar accumulation of pre-40S particles <sup>10</sup> . |                              | The yeast orthologue mutation (p.Ile65Pro) abolishes the ability of Rps19A protein to support cell growth <sup>10</sup> .           |
| c.358G>A                           | p.Gly120Ser                 |  |  |  | The yeast orthologue mutation (p.Gly121Ser) does not influence 21S/18S ratio <sup>10</sup> .   |                              | The yeast orthologue mutation (p.Gly121Ser) does not influence the ability of Rps19A protein to support cell growth <sup>10</sup> . |
| c.173-1G>A                         | p.Ala58_Thr60del            | Normal mRNA levels(PB MNC) <sup>7</sup> .  |  |  |  |                              |   |

|            |                |  |   |  |   |
|------------|----------------|--|---|--|---|
| c.356+1G>A | p.Ser59AlafsX4 | Normal mRNA levels (PB MNC). Abnormally spliced form detected by PCR. Aberrant mRNA is translated <sup>7</sup> . | Protein size and levels are normal in PB MNC <sup>7</sup> .                 |  |   |
| c.34C>T    | p.Gln12X       | Aberrant mRNA might undergo NMD.   |   | Lower rate of ribosomal biogenesis in human dermal fibroblasts and defect in ITS1 processing of 18S rRNA (increase in 21S to 18SE pre-rRNA ratio). Accumulation of 45S and 41S precursors. Dermal fibroblasts show rounded and condensed nucleoli, with changes in nucleolar organization <sup>3</sup> . | Impairs growth of skin fibroblasts <sup>3</sup> |
| c.340G>T   | p.Glu114X      | Aberrant mRNA is likely translated.  | Apparently normal protein levels (lymphoblastoid cell lines) <sup>9</sup> . | No alteration in polysomal profile. 18S rRNA processing defect, as indicated by increased ratio of 21S to 18SE pre-rRNA <sup>**</sup> (lymphoblastoid cell lines) <sup>9</sup> .   |   |
| c.376C>T   | p.Gln126X      | Aberrant mRNA is likely translated.  | Apparently normal protein levels (lymphoblastoid cell lines) <sup>9</sup> . | No alteration in polysomal profile. 18S rRNA processing defect, as indicated by increased ratio of 21S to 18SE pre-rRNA <sup>**</sup> (lymphoblastoid cell lines) <sup>9</sup> .   |   |

\*relative to controls

\*\* 21S/18SE ratio was not reported for this single mutation, but for 6 DBA lymphoblastoid cell lines with 3 different RPS19 mutations (mean value DBA: 1.22/-0.39; controls: 0.68+/-0.1)<sup>9</sup>.

BM=bone marrow, MNC=mononuclear cells, NMD=nonsense mediated decay, PB=peripheral blood.

**Tabella 3.** Confronto tra i dati clinici dei pazienti DBA della popolazione europea e americana (dati dai registri DBA di USA/Canada, Francia/Germania, UK e Italia) ed il sottogruppo dei pazienti con mutazioni in *RPS19*.

|                                     | DBA population      | RPS19 mutated DBA patients |                              |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------------|
| Number of patients*                 | 824                 | 130                        |                              |
| Age at diagnosis (median)           | 2 months-3 months** | 2 months                   | no differences***            |
| Malformations                       | 30-47%**            | 31% (32/103)               | no differences               |
| Response to steroids (first course) | 71% (505/708)       | 46% (42/91)                | p<0.0001                     |
| Status at last follow-up****:       |                     |                            |                              |
| 1.remission                         | 20% (135/668)       | 12% (11/90)                |                              |
| 2.SD                                | 38.5% (257/668)     | 22% (20/90)                |                              |
| 3.TD                                | 35.5% (237/668)     | 61% (55/90)                |                              |
| 4.SCT                               | 6% (39/668)         | 5% (4/90)                  | p<0.0001 (groups 1+2 vs 3+4) |

\*complete clinical data were not available for all patients

\*\*the range refers to different values from the different Registries (Ball *et al.*, 1996; Willig *et al.*, 1999b; Campagnoli *et al.*, 2004; Lipton *et al.*, 2006).

\*\*\*mean age in RPS19 mutated patients: 2,5+/-3months (mean age in patients with no RPS19 mutation from the Italian Registry:5,9+/-8 months)

\*\*\*\*only alive patients were included

## **ATTIVITA' FORMATIVA**

### **SEMINARI SEGUITI NEL CORSO DEL III ANNO**

- 04 ottobre 2007 Prof. Fabio Marra  
Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica  
*Dal 17 dicembre 2007 al 22 maggio 2008 ho sospeso la frequenza al corso di dottorato per maternità e quindi non ho potuto seguire i seminari che sono stati fatti in questo periodo.*
- 26 maggio 2008 Prof.<sup>ssa</sup> Orsetta Zuffardi  
Copy number variations: non solo ritardo mentale
- 05 giugno 2008 Prof. Piero Carninci  
Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) analysis of transcriptional complexity and regulation
- 01 luglio 2008 Prof. Andrew Bradbury  
Recombinant protein expression
- 02 luglio 2008 Prof. Andrew Bradbury  
Recombinant antibodies and other affinity reagents
- 18 luglio 2008 Prof. Andrew Bradbury  
Fluorescent proteins

## **SEZIONE 2**

### **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:

- 8<sup>th</sup> 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., Armiraglio 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., Armiraglio 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., Armiraglio 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. 2<sup>th</sup> 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

## III ANNO:

### A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Nessuna

### B) Altre comunicazioni

- Functional classification of RPS19 mutations and development of a new database for DBA genes. Dianzani I., Campagnoli, M.F., Pavesi E., Boria I., Armiraglio M., Aspesi A., Avondo F., Garelli E., Quarello P., Carando A., Fribourg S., Gleizes P.E., Loreni F., Ramenghi U. 9th Annual International Diamond Blackfan Anemia Consensus Conference, New York (NY, USA), March, 8<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2008
- Analisi di espressione in fibroblasti di pazienti con anemia di Diamond-Blackfan. Avondo F., Lazarevic D., Boria I., Campagnoli M.F., Crescenzo N., Armiraglio M., Quarello P., Aspesi A., Pavesi E., Ramenghi U., Gustincich S., Santoro C., Dianzani I. SIGU 2007, Montecatini Terme (PT, Italy), November, 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> 2007
- Mutazioni in RPS19 nei pazienti con Anemia di Diamond-Blackfan. Campagnoli M.F., Pavesi E., Armiraglio M., Aspesi A., Quarello P., Garelli E., Carando A., Avondo F., Loreni F., Ramenghi U., Dianzani I. SIGU 2007, Montecatini Terme (PT, Italy), November, 14<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> 2007

## **PUBBLICAZIONI OTTENUTE NEL CORSO DI DOTTORATO**

1. 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.
2. 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*. 2008. *Hum Mut*. **7**:911-920.