

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

XIX ciclo del dottorato in Medicina Molecolare

Relazione del I 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 (OMIM No. 105650) è una rara aplasia congenita della serie eritroide che provoca una grave anemia normocromica-macrocitica. La patologia ha esordio nella prima infanzia e il 90% dei casi è diagnosticato nel primo anno di vita. La malattia è dovuta all'incapacità dei progenitori eritroidi a differenziare; la sola maturazione e differenziazione dei globuli rossi risulta compromessa, mentre le altre linee emopoietiche maturano normalmente (Dianzani *et al.*, 2000). In più di un terzo dei pazienti la DBA è associata a malformazioni tra cui: dismorfismi cranio-facciali, malformazioni cardiache e urogenitali, anomalie dell'arto superiore e in particolare del pollice, anomalie oculari, bassa statura e ritardo mentale. Le manifestazioni cliniche possono essere molto eterogenee e per questo la diagnosi è spesso difficoltosa.

In letteratura sono stati descritti più di 500 casi di DBA. Entrambi i sessi sono soggetti alla malattia in ugual misura (Alter *et al.*, 2002; Young e Alter, 1994). I dati relativi all'incidenza della malattia sono stati ottenuti grazie alla creazione di registri nazionali in Francia, Germania, Regno Unito, Nord America e Italia. L'incidenza della patologia nella popolazione italiana è di 6.5 casi per milione di nati vivi (Ramenghi *et al.*, 1999; 2000).

La maggior parte dei casi di DBA è sporadica, mentre circa il 10-20% dei malati presenta ricorrenza familiare. Nella maggioranza dei casi familiari è stata osservata una ereditarietà autosomica dominante, mentre una trasmissione autosomica recessiva è stata supposta nelle famiglie con presenza di consanguineità tra i genitori. Si pensa che la penetranza sia incompleta e l'espressività ampiamente variabile, come indicato dall'osservazione che all'interno della stessa famiglia i soggetti affetti possono differire per la presenza e il tipo di malformazioni congenite, la severità dell'anemia e la risposta alla terapia. Non è stata evidenziata una significativa diversità nell'incidenza di malformazioni e nei parametri ematologici tra casi sporadici e familiari.

La terapia consiste nel trattamento con steroidi, che è utile in almeno la metà dei casi (Halperin e Freedman, 1989; Young e Alter, 1994), sebbene non sia noto il meccanismo alla base di tale risposta. Spesso l'eritropoiesi può essere mantenuta con basse dosi di prednisone (Willig *et al.*, 2000), l'evoluzione della malattia è però molto variabile e col tempo i pazienti possono sviluppare la remissione della malattia, la resistenza o la dipendenza agli steroidi. I pazienti che non rispondono alla terapia farmacologica o che necessitano di dosi troppo alte devono essere sottoposti a trasfusioni croniche associate a chelazione del ferro; in questi casi l'aspettativa di

vita non supera i 30 anni. L'accumulo di ferro è responsabile di emocromatosi secondaria. L'alternativa alla terapia trasfusionale è rappresentata dal trapianto di cellule staminali, già effettuato con successo in un piccolo numero di casi.

La patogenesi della DBA e RPS19

Poiché l'incapacità a maturare riguarda solo i progenitori eritroidi e non le altre linee emopoietiche, nei primi studi sulla DBA si ipotizzò un difetto dei fattori di crescita eritroidi. Vennero effettuati esperimenti su colture cellulari di midollo dei pazienti stimolate con fattori emopoietici, singolarmente o in associazione (Abkoviz *et al.*, 1991; Dunbar *et al.*, 1991). Nei pazienti è stata tentata la terapia con alcuni fattori di crescita. Differenti saggi in vitro, così come studi molecolari e clinici, hanno però fallito nel dimostrare un ruolo diretto di fattori di crescita ematopoietici come l'eritropoietina (EPO), l'IL-3 e l'IL-6 o dei loro recettori nella patogenesi della DBA (Bagnara *et al.*, 1991; Nathan *et al.*, 1978; Dianzani *et al.*, 1996).

Un contributo fondamentale alla ricerca sulla DBA è stato dato dal rinvenimento in una paziente di una traslocazione reciproca bilanciata t(X;19)(p21;q13) (Gustavsson *et al.*, 1997). Tale scoperta ha radicalmente modificato l'approccio all'eziopatogenesi della DBA: alla scelta dei geni candidati in base alla funzione biologica si è sostituita una strategia posizionale. L'anomalia citogenetica individuata ha infatti permesso di ipotizzare la localizzazione del gene DBA sul braccio lungo del cromosoma 19, escludendo il coinvolgimento del cromosoma X poiché la DBA non è una malattia X-linked. Nel 1999 è stato identificato il gene interrotto dalla traslocazione, il gene **RPS19** (OMIM No. 603474) (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

Questo gene codifica per una proteina strutturale della subunità piccola del ribosoma, S19, composta da 145 amminoacidi e con una massa molecolare di 16 kDa. La proteina risulta localizzata sulla superficie esterna della subunità 40S, in prossimità del sito di legame per eIF-2 (Lutsch *et al.*, 1990).

Il gene è espresso ubiquitariamente, si estende per 11 kb e contiene sei esoni, di cui il primo è trascritto e non tradotto. Mutazioni in RPS19 sono state riscontrate nel 25% dei pazienti con DBA, sempre su un solo allele (Draptchinskaia *et al.*, 1999); nel 19.7% dei casi erano situate nelle sequenze codificanti o nei siti di splicing, nel 4.6% dei casi nelle sequenze non codificanti (Willig *et al.*, 1999). Le mutazioni riscontrate sono variabili per tipo e localizzazione: nonsense, frameshift, mutazioni ai siti di splicing, missense e delezioni (Fig. 1).

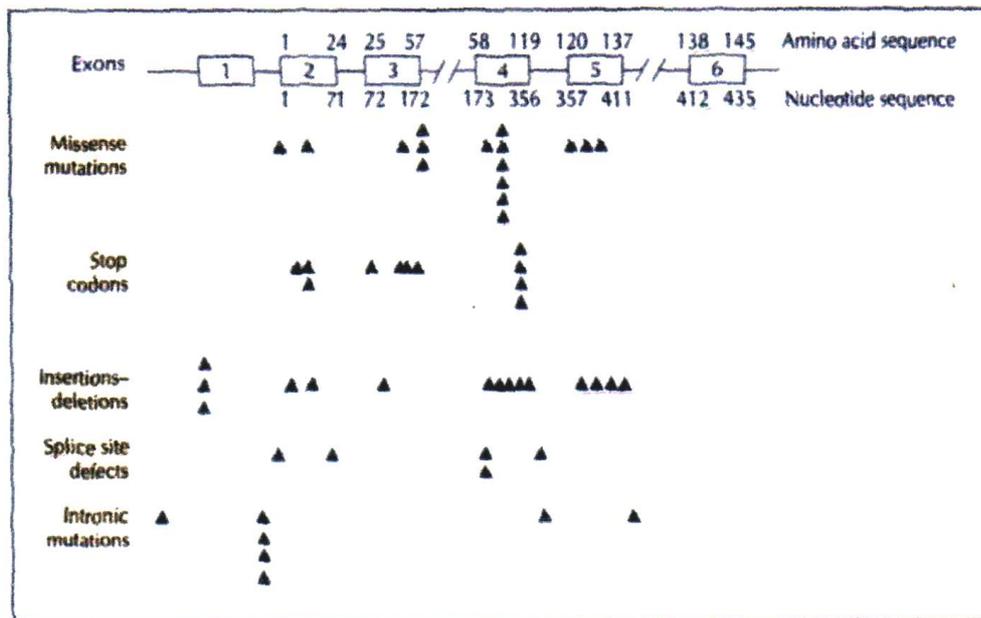


Fig.1: Mutazioni identificate nel gene RPS19 (da Willig *et al.*, 1999).

Il locus è responsabile sia di casi familiari che di casi sporadici. Non è stata riscontrata una correlazione tra la natura delle mutazioni e le differenti modalità di espressione clinica, quali l'età di insorgenza della malattia, la presenza di malformazioni e la risposta alla terapia.

Studi di linkage hanno dimostrato che in 15 famiglie con DBA recessiva o dominante la malattia non segrega con la regione 19q13.2, dimostrando l'esistenza di eterogeneità genetica (Gustavsson *et al.*, 1998; Ramenghi *et al.*, 1999). Con l'analisi di linkage è stato identificato un secondo locus DBA sul cromosoma 8 (8p23.3-p22) (Gazda *et al.*, 2001), ma è ancora in corso l'analisi dei geni candidati di questa regione. Sette famiglie sono risultate invece inconsistenti con il linkage a 8p o 19q e non presentano mutazioni nel gene RPS19, suggerendo la presenza di un ulteriore locus DBA. I geni che codificano per proteine in grado di interagire con Rps19 rappresentano ottimi candidati per le forme di DBA non riconducibili a mutazioni in RPS19. Le manifestazioni cliniche non consentono di differenziare le forme associate a questo gene da quelle non associate.

La localizzazione subcellulare di Rps19 è stata studiata in linee cellulari di fibroblasti (cellule COS-7) utilizzando la proteina wild type e diverse forme mutanti (Da Costa *et al.*, 2003). Rps19 è stata rilevata principalmente nel nucleo, e più specificamente nei nucleoli, dove colocalizza con una delle principali proteine nucleolari, la nucleolina. Utilizzando vari costrutti delezionali all'N-terminale e al C-terminale, sono stati identificati 2 segnali di localizzazione nucleolare (NoS) in Rps19, uno comprendente i primi 16 amminoacidi all'N-terminale (Met1-Arg16), l'altro comprendente 22 amminoacidi al C-terminale (Gly120-Asn142). È stato inoltre osservato che i

livelli di espressione di Rps19 diminuiscono drasticamente (oltre il 90%) quando la sua localizzazione nucleolare risulta alterata, forse in seguito a degradazione.

Le proteine ribosomali (RPs)

Il ribosoma rappresenta il componente cellulare responsabile della sintesi proteica. Nelle cellule di mammifero la formazione dei ribosomi richiede l'assemblaggio di 4 molecole di rRNA e di 79 differenti proteine. La maturazione dell'rRNA (pre-rRNA) nelle cellule eucariotiche avviene nel nucleolo. In concomitanza, nel reticolo endoplasmatico ha luogo la sintesi delle proteine ribosomali, le quali vengono traslocate nel nucleo e assemblate nel nucleolo con 4 molecole di rRNA; successivamente questo complesso viene esportato nel citoplasma come subunità ribosomale 60S o 40S, per realizzare poi la formazione del ribosoma e quindi la traduzione dell'mRNA.

Tre differenti RNA polimerasi sono coinvolte nella produzione di questi RNA e di queste proteine: l'RNA polimerasi I (POL I) è coinvolta nella produzione degli rRNA 28S, 18S e 5.8S, l'RNA polimerasi II (POL II) nella produzione delle proteine ribosomali e l'RNA polimerasi III (POL III) nella produzione dell'rRNA 5S.

La regolazione della sintesi dei componenti ribosomali è stata studiata in parecchi sistemi sperimentali eucariotici. Sebbene vi siano evidenze di coordinamento nella produzione di RPs e di rRNA, i meccanismi molecolari che sottendono un tale tipo di regolazione non sono ancora chiari. Nel lievito la trascrizione delle proteine ribosomali è coordinata da alcuni fattori di trascrizione comuni (Warner, 1999). È stato dimostrato che l'assenza di una proteina ribosomale causa una produzione sbilanciata di RPs (Moritz *et al.*, 1990). Nelle cellule di mammifero livelli di RP mRNA approssimativamente equivalenti sono ottenuti grazie ad una generale equipotenza dei promotori, che differiscono per la richiesta dei fattori di trascrizione (Hariharan *et al.*, 1989), ma la coordinazione nella sintesi delle RP è dovuta principalmente alla regolazione traduzionale. Esistono diversi modelli animali di malattie riconducibili ad alterazioni nei ribosomi:

- i mutanti “minute” (min) di *Drosophila*, che presentano mutazioni nei geni RP (Crampton & Laski, 1994; Kongsuwan *et al.*, 1985) e che manifestano ritardo nello sviluppo larvale e nella sopravvivenza, fertilità e dimensioni ridotte, setole sottili;
- i mutanti “anucleolate” e il “partial nucleolus” dell'anfibio *Xenopus laevis*, che hanno delezioni complete o parziali del *cluster* dei geni per l'rRNA (Miller & Gurdon, 1970) e che mostrano ritardo di sviluppo e di crescita, microcefalia, microftalmia, edema oculare, cardiaco ed addominale;

- il topo “knock-out” eterozigote per una delezione di tre esoni del gene RPS19 mostra un fenotipo normale anche a livello ematologico (Draptchinskaia *et al.*, 2004).

La DBA rappresenta la prima patologia umana in cui un difetto a carico di una proteina ribosomale è coinvolto nella patofisiologia della malattia, anche se non è ancora stata chiarita la causa dell’alterata eritropoiesi e delle malformazioni.

Sono state proposte due ipotesi patogenetiche:

1. la DBA può essere espressione di un difetto della sintesi proteica, particolarmente evidente in tessuti ad alto turn-over, quali il midollo osseo o i tessuti embrionali. A questo meccanismo potrebbero essere ricondotti l’anemia, la bassa statura e le malformazioni, a somiglianza di quanto ipotizzato nei mutanti di *Drosophila* e di *Xenopus*. I dati in letteratura indicano che, almeno in lievito, il difetto di una proteina ribosomale può causare l’accumulo dei precursori di rRNA e una produzione sbilanciata delle subunità ribosomali.
2. La seconda ipotesi prevede l’esistenza di una funzione extra-ribosomale per Rps19 e il fenotipo DBA potrebbe essere causato da alterazioni a carico di questa funzione: il “link” mancante tra l’eritropoiesi e il ribosoma potrebbe essere rappresentato proprio da questa funzione extra-ribosomale. Questa ipotesi non è mutuamente esclusiva con quella di un difetto nella sintesi proteica, ma i due meccanismi potrebbero combinarsi per produrre il complesso fenotipo DBA.

È stato ipotizzato che nel corso dell’evoluzione siano state utilizzate come proteine ribosomali delle proteine pre-esistenti con una funzione differente nella cellula, ma in grado di legarsi agli acidi nucleici. L’esistenza di funzioni extra-ribosomali per diverse RP è stata chiaramente dimostrata in molti casi o solo ipotizzata in altri, basandosi su omologie di sequenza con altre proteine (Wool, 1996). Funzioni extra-ribosomali includono un ruolo:

- nella replicazione (*E.Coli*)
- nella trascrizione, Rps10 (*E.Coli*), Rps20 (*S.Cerevisiae*)
- nella processazione dell’RNA (*E.Coli*)
- nella riparazione del DNA, Rps9 e Rps12 (*E.Coli*), Rps3 (*D.Melanogaster*; *H.Sapiens*)
- nella trasformazione tumorale (*H.Sapiens*)
- nel controllo della proliferazione cellulare, Rps6 (*H.Sapiens*)

In particolare per Rps19 sono stati individuati:

- 1) *in vitro*, un ruolo chemiotattico per monociti e macrofagi durante i processi di *clearance* di cellule apoptotiche (Shrestha *et al.*, 1999);
- 2) una interazione diretta della proteina con FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) a livello citoplasmatico, sia *in vitro* che *in vivo* (Soulet *et al.*, 2001), il cui significato è da definire.

Recentemente è stato dimostrato che la proteina ribosomale L13, se fosforilata, può staccarsi dalla subunità 60S del ribosoma e legare una particolare regione sul 3'UTR dell'mRNA della ceruloplasmina, impedendo la sua traduzione (Mazumder *et al.*, 2003). I nostri studi potrebbero portarci a trovare una situazione simile anche per Rps19.

La ricerca di interattori per Rps19

Il nostro gruppo ha già in passato cercato possibili interattori di Rps19 con la tecnica del doppio ibrido in lievito. Dallo screening di una library di fegato fetale umano sono stati identificati tre possibili interattori: ACP, S-100 A10 e PIM-1.

Il gene ACP (Acyl Carrier Protein), conosciuto anche come NDUFB1 (OMIM No. 603836), codifica per una piccola subunità della NADH-ubichinone ossidoreduttasi, il primo complesso enzimatico mitocondriale della catena di trasporto degli elettroni. Questa proteina svolge anche un ruolo di trasportatore di acili nel corso delle reazioni che portano alla sintesi *de novo* degli acidi grassi e delle porzioni glicolipidiche esposte sulla membrana dei batteri.

Il gene S-100 A10 (OMIM No. 114085) codifica per una proteina di 97 amminoacidi, conosciuta anche come p11, appartenente alla famiglia delle proteine S100, i cui membri sono caratterizzati da un motivo strutturale comune, una regione elica-loop-elica, che conferisce loro la capacità di legare gli ioni calcio. Nonostante A10 appartenga a questa famiglia, presenta diversi caratteri unici dovuti a una serie di delezioni e sostituzioni amminoacidiche che hanno reso inattivi entrambi i siti di legame per gli ioni calcio. In tutte le cellule e i tessuti studiati, p11 è stata rinvenuta all'interno di un complesso eterotetramericco con *annessina II*, un'altra proteina in grado di legare il calcio. Alcune delle proprietà biochimiche dell'*annessina II* sono modulate dalla formazione di questo complesso, che prevede il legame di un dimero di p11 a 2 monomeri di *annessina II*.

Nel corso di questo studio la nostra attenzione si è focalizzata sul terzo gene individuato, PIM-1 (OMIM No. 164960), che codifica per una serina/treonina chinasi coinvolta in numerose funzioni cellulari.

PIM-1

Il gene PIM-1 è localizzato, nel genoma umano, sul cromosoma 6p21.2 e si compone di sei esoni e cinque introni; codifica per una proteina di 313 amminoacidi, con una massa molecolare di circa 34 kDa. Originariamente identificato come un sito preferenziale per l'integrazione del virus della leucemia murina Moloney (MuLV), PIM-1 risulta coinvolto in molteplici aspetti della vita cellulare quali la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e l'oncogenesi. Pim-1 si trova

over-espresso nei linfomi a cellule B, nelle eritroleucemie e in varie leucemie umane. Recentemente il potenziale oncogeno di Pim-1 è stato dimostrato attraverso esperimenti condotti su topi transgenici, nei quali il gene è stato posto sotto il controllo trascrizionale dell'*enhancer* delle immunoglobuline: questi topi hanno sviluppato linfomi a cellule T, anche se con una bassa incidenza (5-10%) e un lungo periodo di latenza (circa 7 mesi).

Il gene è espresso ubiquitariamente, ma ad alti livelli soprattutto nei tessuti ematopoietici. Nei topi transgenici e knock-out il volume dei globuli rossi sembra essere correlato con il livello di espressione del gene: topi Pim-1^{-/-} si presentano normali, in buona salute e fertili, ma, ad una analisi più dettagliata, rivelano microcitosi, mentre una iperespressione è associata a macrocitosi (Laird *et al.*, 1993).

L'espressione di Pim-1 è indotta da citochine e fattori di crescita tramite l'attivazione del pathway di JAK2/STAT5. L'interazione di questi ligandi con i rispettivi recettori porta alla rapida attivazione di uno o più membri della famiglia JAK (tirosina-chinasi associate ai recettori). Una volta attivate, queste chinasi fosforilano membri della famiglia STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), i quali dimerizzano, traslocano nel nucleo e si legano alle regioni regolatrici di specifici geni.

Per quanto concerne la localizzazione cellulare, Pim-1 è stato inizialmente osservato nel citoplasma, e solo recentemente è stato rilevato anche nel nucleo (Maita *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001a).

L'utilizzo di peptidi sintetici ha permesso di identificare la sequenza consenso necessaria per la fosforilazione da parte di Pim-1:

Lys/Arg-Lys/Arg-Arg-Lys/Arg-Leu-Ser/Thr-X

dove X non deve essere né un residuo basico né un residuo idrofobico di grosse dimensioni.

Finora sono stati individuati 13 interattori di Pim-1; l'elenco comprende fattori di trascrizione, proteine coinvolte nella crescita e nella proliferazione cellulare e proteine correlate con l'apoptosi:

- Pim-1 può aumentare l'attività trascrizionale di c-Myb attraverso la fosforilazione del suo co-attivatore, **p100** (Levenson *et al.*, 1998);
- Pim-1 interagisce fisicamente con **Cdc25A** e ne aumenta l'attività fosfataseica attraverso la fosforilazione (Mochizuki *et al.*, 1999);
- la proteina **HP1** (Heterochromatin Protein 1) risulta associata con Pim-1 nelle cellule HeLa: Pim-1 regola negativamente l'attività di repressore trascrizionale di HP1 attraverso la sua fosforilazione (Koike *et al.*, 2000);

- **PAP-1** (Pim-1 Associated Protein-1) è una proteina in grado di legare Pim-1 la cui funzione è attualmente sconosciuta, ma risulta mutata in una forma di retinite pigmentosa (Maita *et al.*, 2000);
- Pim-1 regola negativamente l'attività fosfatase di **PTP-U2S**, e questo potrebbe rallentare il processo di differenziazione e la successiva apoptosi delle cellule mieloidi U937 (Wang *et al.*, 2001b);
- Pim-1 fosforila e regola la stabilità di **Socs-1**, un potente inibitore dell'attivazione di JAK/STAT (Chen *et al.*, 2002). È stato suggerito che l'interazione tra le due proteine potrebbe avere un importante ruolo nel segnale regolato dalle citochine;
- Pim-1 interagisce con le heat shock protein 90 α e β (**Hsp90 α e β**), che ne controllano la stabilità e la funzione (Mizuno *et al.*, 2001);
- Pim-1 fosforila **C-TAK1** riducendo la sua attività di fosforilare e inattivare Cdc25C, una proteina che promuove la progressione del ciclo cellulare G2/M (Bachmann *et al.*, 2004);
- il fattore trascrizionale **NFATc1**;
- **TFAF2/SNX6**, che viene fosforilato e traslocato nel nucleo dopo il legame con Pim-1;
- **NuMA** (nuclear mitotic apparatus protein);
- **p21^{Cyp1/WAF1}**, un inibitore del ciclo cellulare.

RISULTATI PRECEDENTI

Nel nostro laboratorio sono già stati effettuati in passato degli esperimenti per confermare se l'interazione tra S19 e Pim-1 vista nel lievito con la tecnica del doppio ibrido avvenisse anche in cellule umane in coltura.

Dapprima è stato svolto un pull-down (Fig.1): la proteina ricombinante GST-Pim-1 è stata purificata tramite legame con la resina glutatione-agarosio a cui si lega il GST, e poi incubata con un estratto proteico di cellule 293T trasfettate con un costrutto contenente il gene per Rps19 e per due mutanti naturali di Rps19 (R101H e R62W), tutti e tre marcati con l'epitopo flag. Il western blot della resina, rilevato con un anticorpo anti-flag, ha permesso di verificare che sia S19 wt, sia i due mutanti, associano con Pim-1, sebbene probabilmente con differente affinità, in quanto il mutante R101H sembra legare meno Pim-1 della proteina wild type e dell'altro mutante.

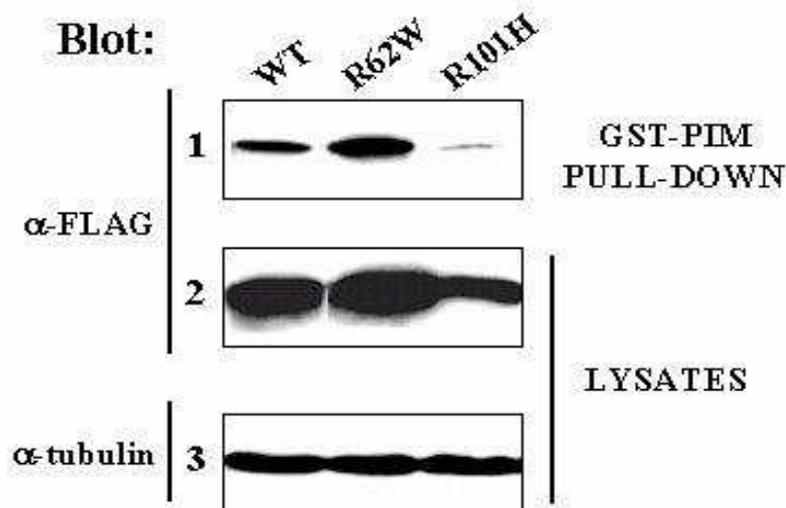


Fig.2: Pull-down

A questo esperimento, che ha confermato che esiste un'interazione *in vitro* nelle cellule umane, ne è seguito uno di co-immunoprecipitazione per studiare il legame *in vivo*. Le cellule 293T sono state co-trasfettate per esprimere le proteine Rps19-FLAG e Pim-1-HA. Il lisato cellulare è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-flag e con esso è stato effettuato un western blot rivelato con anticorpo anti-HA. La Fig.2 (pannello in alto a sinistra) mostra che l'immunoprecipitato di Rps19 contiene la proteina Pim-1.

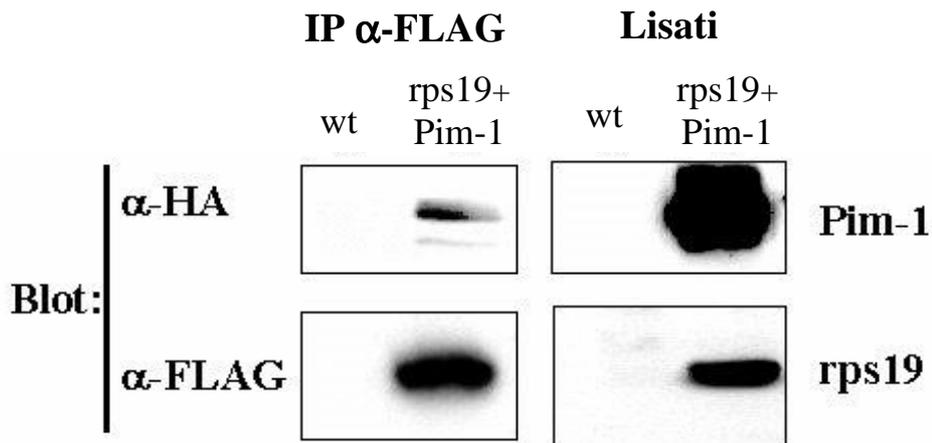


Fig.3: Immunoprecipitazione

Il passo successivo a questi esperimenti sarà l'indagine del significato funzionale dell'interazione tra Rps19 e Pim-1 nella patogenesi della DBA. A questo scopo è stato già effettuato un saggio di fosforilazione *in vitro*. Le proteine ricombinanti GST-Rps19 e GST-Pim-1 sono state prodotte in un ceppo di *E.Coli*, purificate tramite legame con la resina glutatione-agarosio e poi eluite. Il saggio chinasi effettuato con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e due diversi buffer ha mostrato che Pim-1 fosforila, oltre ai substrati di controllo MBP (myelin basic protein) e H1 (istone1), l'Rps19 (Fig.3). Come atteso, è visibile anche la banda relativa all'autofosforilazione.

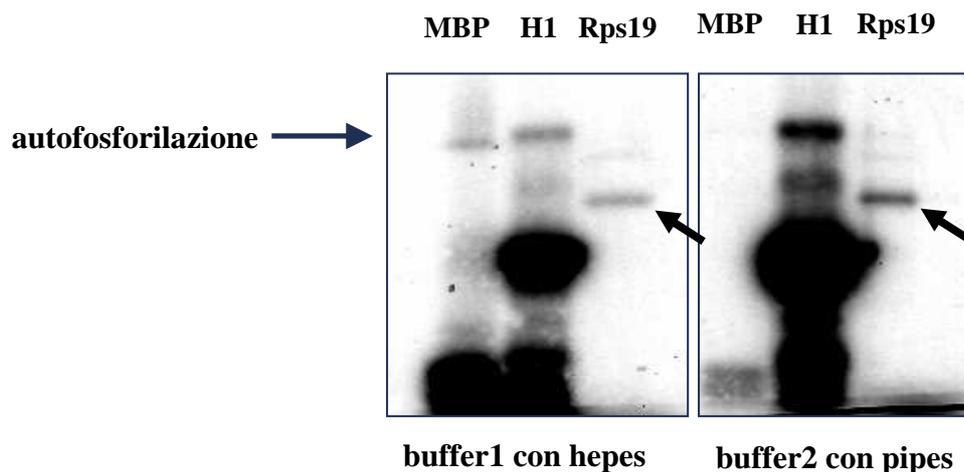


Fig.4: Saggio chinasi

PROSPETTIVE FUTURE

I risultati precedenti hanno dimostrato che Rps19 è un bersaglio, *in vitro* e *in vivo*, di Pim-1, ma il ruolo che queste due proteine rivestono nella patogenesi della DBA è ancora del tutto oscuro.

Si può ipotizzare che Pim-1, la cui espressione è indotta da citochine eritropoietiche e ormoni, vada a modulare in condizioni fisiologiche l'attività di Rps19, e che mutazioni nei geni di queste proteine possano impedire la normale maturazione dei progenitori eritroidi e causare la malattia.

In futuro, per studiare meglio la natura dell'interazione tra S19 e Pim-1 avremo innanzitutto bisogno di un appropriato modello cellulare, ad esempio le cellule CD34⁺, i progenitori degli eritrociti, che si possono isolare dal sangue periferico.

Abbiamo in programma di effettuare esperimenti di microscopia per confermare che c'è colocalizzazione e esperimenti di fosforilazione *in vivo* per confermare il dato già avuto *in vitro*.

Contemporaneamente vorremmo estendere l'indagine ai mutanti naturali di S19 e in particolare alle 9 mutazioni missense finora identificate nei pazienti con DBA per valutare se queste alterazioni influiscono sull'interazione con Pim-1 e sulla fosforilazione. Una prima indicazione è data dal pull-down in cui abbiamo notato una diminuzione dell'affinità per uno dei due mutanti missense. A questi esperimenti potrebbero accompagnarsi quelli con mutanti delezionali o peptici sintetici, utili per mappare il sito di interazione e di fosforilazione.

E' già stato effettuato uno screening su 130 pazienti con DBA alla ricerca di mutazioni nel gene PIM-1. Sono state identificate finora due mutazioni esoniche: P311T e C17Y, entrambe al di fuori del sito catalitico. Sarà interessante capire se i mutanti di Pim-1 presentano una capacità di legame e fosforilazione alterata.

Sul modello di quanto già fatto per la proteina Rpl13 vorremmo anche studiare l'eventualità che la forma fosforilata di Rps19 possa regolare la traduzione degli mRNA di fattori eritroidi, il che potrebbe spiegare il nesso tra le mutazioni e l'insorgenza della malattia. Per fare ciò si potrebbe immunoprecipitare S19 da un estratto cellulare e effettuare una retrotrascrizione sull'immunoprecipitato, in cui dovrebbero trovarsi eventuali mRNA, da clonare e sequenziare. In alternativa, si potrebbe eseguire una purificazione per affinità dei trascritti derivati da cellule eritroidi utilizzando Rps19 come esca.

Inoltre abbiamo intenzione di studiare gli altri due interattori emersi dallo screening in lievito per confermare che il legame si ritrovi nelle cellule umane. A questo scopo ripeteremo gli esperimenti di pull-down, immunoprecipitazione e colocalizzazione ed eventualmente andremo a verificare la presenza di mutazioni per questi geni nei pazienti con DBA.

BIBLIOGRAFIA

- Abkowitz J.L., Sabo K.M., Nakamoto B., Blau C.A., Martin F.H., Zsebo K.M., Papayannopoulou T., "Diamond-Blackfan anemia: in vitro response of erythroid progenitors to the ligand for c-kit". *Blood* 78, 2198-2202, 1991.
- Alter B.P., "Bone marrow failure syndromes in children". *Pediatr. Clin. North Am.* 49, 973-88, 2002.
- Bachmann M., Hennemann H., Xing P.X., Hoffmann I., Moroy T., "The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of C-TAK1: a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint". *J. Biol. Chem.* In press, 2004.
- Bagnara G.P., Zauli G., Vitale L., Rosito P., Vecchi V., Paolucci G., Avanzi G.C., Ramenghi U., Timeus F., Gabutti V., "In vitro growth and regulation of bone marrow enriched CD34(+) hematopoietic progenitors in Diamond-Blackfan anemia". *Blood* 78, 2203-2210, 1991.
- Chen X.P., Losman J.A., Cowan S., Donahue E., Fay S., Vuong B.Q., Nawijn M.C., Capece D., Cohan V.L., Rothman P., "Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein". *PNAS* 99, 2175-2180, 2002.
- Cramton S.E. and Laski F.A., "String of pearls encodes Drosophila ribosomal protein S2, has Minute-like characteristics, and is required during oogenesis". *Genetics* 137, 1039-48, 1994.
- Da Costa L., Tchernia G., Gascard P., Lo A., Meerpohl J., Niemeyer C., Chasis J.-A., Fixler J., Mohandas N., "Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology". *Blood* 101, 5039-5045, 2003.
- Dianzani I., Garelli E., Dompè C., Crescenzo N., Locatelli F., Schilirò G., Castaman G., Bagnara G.P., Olivieri N.F., Gabutti V., Ramenghi U., "Mutations in the erythropoietin receptor gene are not a common cause of Diamond-Blackfan anemia". *Blood* 87, 2568-72, 1996.
- Dianzani I., Garelli E., Ramenghi U., "Diamond-Blackfan Anemia: an Overview". *Pediatr Drugs* 2, 345-355, 2000.
- Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig T.N., Dianzani I., Ball S., Tchernia G., Klar J., Matsson H., Tentler D., Mohandas N., Carlsson B., Dahl N., "The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia". *Nature Genetics* 21, 169-75, 1999.
- Draptchinskaia N., Davey E., Forsberg E., Leveen, Karlsson S., Dahl N., "Targeted disruption of the Diamond-Blackfan anemia homologue Rps19 in mice". *Am. J. Hum. Genet.* 69 (suppl.), abstract n. 2752.
- Dunbar C.E., Smith D.A., Kimball J., Garrison L., Nienhuis A.W., Young N.S., "Treatment of Diamond-Blackfan anaemia with haematopoietic growth factors, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: sustained remissions following IL-3". *Brit. J. Haemat.* 79, 316-321, 1991.
- Gazda H., Lipton J.M., Willig T.-N., Ball S., Niemeyer C.M., Tchernia G., Mohandas N., Daly M.J., Ploszynska A., Orfali K.A., Vlachos A., Glader B.E., Rokicka-Milewska R., Ohara A., Baker D., Pospisilova D., Webber A., Viskochil D.H., Nathan D.G., Beggs A.H., Sieff C.A., "Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23.3-p22 and for non-19q non-8p disease". *Blood* 97, 2145-2150, 2001.
- Gustavsson P., Skeppner G., Johansson B., Berg T., Gordon L., Kreuger A., Dahl N., "Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation". *J. Med. Genet.* 34, 779-782, 1997.
- Gustavsson P., Garelli E., Draptchinskaia N., Ball S., Willig T.-N., Tentler D., Dianzani I., Punnett H., Shafer F., Cario H., Ramenghi U., Glomstein A., Pfeiffer R., Goringe A., Olivieri N.F., Smibert E., Tchernia G., Elinder G., Dahl N., "Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity". *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1388-1395, 1998.
- Halperin D.S., Freedman M.H., "Diamond-Blackfan anemia: etiology, pathophysiology, and treatment". *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 11, 380-94, 1989.

- Hariharan N., Kelley D.E. and Perry R.P., "Equipotent mouse ribosomal protein promoters have a similar architecture that includes internal sequence elements". *Genes Dev.* 3, 1789-1800, 1989.
- Koike N., Maita H., Taira T., Ariga H., Iguchi-Arigo S.M., "Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1". *FEBS Letters* 467, 17-21, 2000.
- Kongsuwan K., Yu Q., Vincent A., Frisardi M.C., Rosbash M., Lengyel J.A. and Merriam J., "A Drosophila Minute gene encodes a ribosomal protein". *Nature* 317, 555-8, 1985.
- Laird P.W., van der Lugt N.M., Clarke A., Domen J., Linders K., McWhir J., Berns A., Hooper M., "In vivo analysis of Pim-1 deficiency". *Nucleic Acids Res.* 21, 4750-4755, 1993.
- Leverson J.D., Koshinen P.J., Orrico F.C., Rainio E.M., Jalkanen K.J., Dash A.B., Eisenman R.N., Ness S.A., "Pim-1 kinase and p-100 cooperate to enhance c-Myb activity". *Mol. Cell.* 2, 417-425, 1998.
- Lutsch G., Stahl J., Kargel H.-J., Noll F., Bielka H., "Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver". *European Journal of Cell Biology* 51, 140-150, 1990.
- Maita H., Harada Y., Nagakubo D., Kitaura H., Ikeda M., Tamai K., Takahashi K., Ariga H., Iguchi-Arigo S.M., "PAP-1, a novel target protein of phosphorylation by pim-1 kinase". *Eur. J. Biochem.* 267(16), 5168-5178, 2000.
- 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.
- Mazumder B., Sampath P., Seshadri V., Maitra R.K., DiCorleto P.E., Fox P.L., "Regulated release of L13a from 60S subunit as a mechanism of transcript-specific translational control". *Cell* 115, 187-198, 2003.
- Miller L. and Gurdon J.B., "Mutations affecting the size of the nucleolus in *Xenopus leavis*". *Nature* 227, 1108-10, 1970.
- Mizuno K., Shirogane T., Shinohara A., Iwamatsu A., Hibi M., Hirano T., "Regulation of Pim-1 by Hsp90". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281, 663-669, 2001.
- Mochizuki T., Kitanaka C., Noguchi K., Muramatsu T., Asai A., Kuchino Y., "Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1 mediated activation of the c-Myc signaling pathway". *J. Biol. Chem.* 274, 18659-18666, 1999.
- Moritz M., Paulovich A.G., Tsay Y.F. and Woolford J.L. Jr., "Depletion of yeast ribosomal proteins L16 or rp59 disrupts ribosome assembly". *J. Cell Biol.* 111, 2261-74, 1990.
- Nathan D.G., Clarke B.J., Hillman D.G., Alter B.P., Housman D.E., "Erythroid precursors in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia". *J. Clin. Invest.* 61, 489-498, 1978.
- Ramenghi U., Garelli E., Valtolina S., Campagnoli M.F., Timeus F., Crescenzo N., Mair M., Varotto S., D'Avanzo G., Nobili B., Massolo F., Mori P.G., Locatelli F., Gustavsson P., Dahl N., Dianzani I., "Diamond-Blackfan Anaemia in the Italian population". *Brit. J. Haematol.* 104, 841-84, 1999.
- Ramenghi U., Campagnoli M.F., Garelli E., Carando A., Brusco A., Bagnara G.P., Strippoli P., Izzi G.C., Brandalise S., Riccardi R., Dianzani I., "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, 417-22, 2000.
- Shrestha A., Horino K., Nishiura H., Yamamoto T., "Acquired immune response as a consequence of the macrophage-dependent apoptotic cell clearance and role of the monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer in this connection". *Lab. Invest.* 94, 1629-1642, 1999.
- Soulet F., Al Saati T., Roga S., Amalric F., Bouche G., "Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19". *Biochem Biophys Res Commun.* 289, 591-6, 2001.

Wang Z., Bhattacharya N., Weaver M., Petersen K., Meyer M., Gapter L., Magnuson N.S., "Pim-1: A serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis". *J. Vet. Sci.* 2, 167-179, 2001a.

Wang Z., Bhattacharya N., Meyer M.K., Seimiya H., Tsuruo T., Magnuson N.S., "Pim-1 negatively regulates the activity of ptp-u2s phosphatase and influences terminal differentiation and apoptosis of monoblastoid leukemia cells". *Arch. Biochem. Biophys.* 390(1), 9-18, 2001b.

Warner J.R., "The economics of ribosome biosynthesis in yeast". *Trends Biochem Sci.* 11, 437-40, 1999.

Willig T.-N., Draptchinskaia N., Dianzani I., Ball S., Niemeyer C., Ramenghi U., Orfali K., Gustavsson P., Garelli E., Brusco A., Tiemann C., Perignon J.L., Bouchier C., Cicchiello L., Dahl N., Mohandas N., and Tchernia G., "Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond Blackfan Anemia: wide variations in phenotypic expression". *Blood* 94, 4294-306, 1999.

Willig T.-N., Gazda H., Sieff C.A., "Diamond-Blackfan anemia". *Current Opinion in Hematology* 7, 85-94, 2000.

Wool I.G., "Extraribosomal functions of ribosomal proteins". *Trends Biochem Sci* 21, 164-5, 1996.

Young N.S., Alter B.P., "Aplastic anemia: Acquired and Inherited". Philadelphia: W.B. Saunders Co, 361-83, 1994.

SEMINARI SEGUITI DURANTE IL PRIMO ANNO DI DOTTORATO

- 3 Maggio 2004 “Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes”, Prof. Frédéric Rieux-Laucat; Dip. Scienze Mediche, Novara.
- 5 Maggio 2004 “Come comprendere i meccanismi di patogenicità delle fibre di amianto? Necessità di un approccio multidisciplinare”, Prof. Bice Fubini; DISCAFF, Novara.
- 11 Maggio 2004 “Cellule staminali e clonazione” Seminari del corso di bioetica, relatori: Prof. G. Cossu, Prof. P. Vezzoni, Prof. P. Cattorini, Dott. C. Galli, Dott.ssa M. Fiumanò, Dott. A. Santosuosso; Università di Milano.
- 27 Maggio 2004 “I dati della sorella malata: l’accesso ai dati genetici condivisi”, Prof. A. Forabosco, Avv. S. Nespor; Palazzo di Giustizia di Milano.
- 28 Maggio 2004 “Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico”, Prof. Angiolo Benedetti; Dip. Scienze Mediche, Novara.
- 9 Giugno 2004 “Nuove tecnologie e sviluppi nell’analisi del proteoma”; Palazzo L.I.T.A., Milano
- 14 Giugno 2004 “Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems”, Prof. David Murphy; Dip. Scienze Mediche, Novara.
- 15 Giugno 2004 “Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity”, Prof. David Murphy; Dip. Scienze Mediche, Novara.
- 24 Giugno 2004 “La Real Time PCR verso nuove applicazioni”; Università degli Studi di Milano.
- 5 Luglio 2004 “From the bench to the bedside: galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions”, Prof. Armando Bartolazzi; Dip. Scienze Mediche, Novara.
- 7 Luglio, 2004 “Ethanol metabolism and toxicity in pregnancy”, Prof. Martin Ronis; Dip. Scienze Mediche, Novara.

