

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**  
**"AMEDEO AVOGADRO"**

**Corso di Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare**  
**XXI ciclo**

**PATOGENESI**  
**DELL'ANEMIA DI**  
**DIAMOND-BLACKFAN**

**Coordinatore: Prof. Umberto DIANZANI**  
**Responsabile Scientifico: Prof.<sup>SSa</sup> Irma DIANZANI**

**Tesi di Dottorato di**  
**Marta ARMIRAGLIO**

**Anno Accademico 2007/2008**

*Felix qui potuit rerum  
cognoscere causas*

Virgílio

## RINGRAZIAMENTI

Dalla mia prima volta qui a Novara sono passati quasi quattro anni e vorrei cogliere questa occasione per ringraziare tutti coloro che hanno contribuito a renderli belli e importanti.

Innanzitutto, desidero ringraziare la Prof.<sup>ssa</sup> Irma Dianzani, per avermi accolto nel suo gruppo di lavoro e per avermi aiutato in ogni tappa di questo mio percorso. Ha saputo essere un buon capo non solo dal punto di vista scientifico, ma anche da quello umano, tenendomi sempre in considerazione, sapendo essere sempre gentile e disponibile e rendendo piacevole il mio lavorare per lei e, soprattutto, con lei.

Un sincero grazie al Prof. Claudio Santoro per l'importante contributo scientifico ed i fondamentali suggerimenti tecnici che hanno contribuito al mio lavoro.

Desidero poi ringraziare i nostri collaboratori,

il Prof. Stefan Karlsson (Università di Lund, Svezia), per averci fornito il modello cellulare,

il Prof. Stefano Gustincich (SISSA, Trieste), per aver effettuato l'analisi mediante *microarray*,

la Prof.<sup>ssa</sup> Margherita Ruoppolo (Università "Federico II", Napoli), per aver effettuato l'analisi di proteomica differenziale.

Un sentito grazie alle mie colleghe di laboratorio, a tutte per avermi sempre sopportato, e poi a Federica, per il confine sottile tra quello che le stavo insegnando e quello che imparavo da lei, o forse per avermi fatto credere di avere qualcosa da insegnarle...

a Elisa, "l'amica ritrovata" che sta collezionando ringraziamenti in tutte le mie tesi, chissà se il destino ci porterà di nuovo ad essere colleghe!

ad Anna, per il suo particolare modo di vedere le cose e per gli utili "suggerimenti tecnici"

a Marta, per avermi insegnato che i pomodori si possono mangiare anche senza una pizza sotto! Vorrei che come regalo per il mio dottorato mi promettesse di vedere Lost, ma credo abbia già comprato qualcosa... :-)

a Lucia, "la tesista abbandonata", perché quando le parlavo delle "cose che succedono solo a me" anche lei ne aveva delle belle da raccontare!

a Katia, eletta *honoris causa* membro del laboratorio di patologia genetica!

a Ilenia, la "collega dimenticata per pranzo", perché... bubu... ha saputo sempre mettere allegria alle nostre giornate

a Valeria, compagna di sclero pre-tesi

alle due "new entry", Alessandra e Roberto, perché mi hanno conosciuto in un momento un po' particolare ma nonostante tutto non mi credono pazzo... o almeno lo nascondono bene!

Un simpatico grazie a Marianna, per aver reso il mio ultimo periodo di dottorato surreale e pieno di *suspance*.

Un ringraziamento ad Andrea, perché tutte le volte che sembrava convinto che io avessi capito il funzionamento di un pc doveva ricredersi... ma con tanta pazienza ha sempre sistemato tutto!

A tutte le persone che lavorano nel dipartimento, grazie per aver reso ogni giorno piacevole e per aver sopportato le mie "stranezze" (incendi, sparizioni di cellule...)

Ad Alessandra, *my best friend forever*, e Francesco, un grazie davvero di cuore per essermi sempre vicini nel vostro modo speciale e per volermi bene nonostante il mio caratteraccio...

Vorrei poi ringraziare la mia famiglia,

i miei suoceri, un grazie per il loro sincero affetto e perché il loro essere nonni perfetti mi ha dato la tranquillità necessaria per poter finire il mio dottorato.

I miei genitori, che credo non abbiano ancora idea di cosa ho fatto per tutto il giorno in questi anni, ma nonostante tutto sono contenti per me,

mio fratello, che sono sicura non abbia idea di cosa ho fatto per tutto il giorno in questi anni, ma nonostante tutto è un po' schifato!

Io, nonostante tutto, vi voglio bene!

*Dulcis in fundo*, un megagrazie a Fabio, perché mi ha appoggiato e continua ad appoggiarmi in ogni mia scelta, anche scriteriata, perché sopporta sempre il mio lato peggiore, e soprattutto perché sa che sotto sotto c'è anche un lato migliore... Tante sono le incertezze nella mia vita, ma lui è stato, è e sarà sempre il mio punto fermo, e lo amo all'infinito!

a Rebecca, anche se non può capire, perché mi sono imbarcata in tante avventure, in tante altre magari mi imbarcherò in futuro, ma la più meravigliosa di tutte sarà sempre quella di essere la sua mamma!

L'ultima riga dei miei ringraziamenti la lascio per il destino, che mi ha permesso di incontrare tutte le persone che mi hanno fatto diventare quella che sono adesso e avere la vita che sto vivendo e... beh, credo proprio di non poter fare altro che ringraziare!

## SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>1 INTRODUZIONE</b>	3
1.1 Il ribosoma	4
1.1.1 Biogenesi del ribosoma	5
1.2 Sindromi ereditarie da insufficienza midollare	6
1.2.1 Discheratosi Congenita (DC)	7
1.2.2 Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS)	8
1.2.3 Ipoplasia cartilagine-capillizio	8
1.3 Anemia di Diamond-Blackfan	9
1.3.1 Quadro clinico	9
1.3.2 Terapia	10
1.3.3 Cause molecolari	10
1.4 Il gene <i>RPS19</i>	11
1.4.1 <i>Hum Mutat</i> , 29:911-920: riassunto del lavoro	14
1.4.2 <i>Hum Mutat</i> , 29:911-920	15
1.5 Modelli animali che ricapitolano la DBA	25
1.6 DBA e ribosomi	27
1.7 Ipotesi patogenetiche	28
<b>2 SCOPO DEL LAVORO</b>	31
<b>3 <i>Mol Cell Proteomics</i>, 6:382-393, 2007</b>	33
3.1 Scopo del lavoro	34
3.2 Risultati e conclusioni	34
3.3 <i>Mol Cell Proteomics</i> , 6:382-393, 2007	36
3.3.1 <i>Mol Cell Proteomics</i> , 6:382-393, 2007: supplemental data	48
<b>4 PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA</b>	78
4.1 Scopo del lavoro	79
4.2 Materiali e metodi	80
4.2.1 Linea cellulare	80
4.2.2 Curve di downregolazione	80

4.2.3	Estrazione dell'RNA, <i>microarray</i> ed analisi dei dati	81
4.2.4	<i>Real-Time</i> RT-PCR	82
4.2.5	Estratto proteico, 2D-DIGE ed analisi dei dati	83
4.2.6	Validazione dei risultati ottenuti dalla 2D-DIGE	84
4.3	Risultati	85
4.3.1	Profili di espressione genica – analisi del trascrittoma	85
4.3.2	Profili di espressione genica – analisi del proteoma	95
4.4	Discussione	103
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>107</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>111</b>

## RIASSUNTO

Il ribosoma è il complesso macromolecolare deputato alla sintesi proteica. Per la biogenesi del ribosoma eucariotico è necessario l'intervento di oltre 200 proteine, che controllano la maturazione dei precursori degli rRNA. Gli rRNA maturi vengono inglobati, insieme alle proteine ribosomali, nelle subunità pre-40S e pre-60S; i due complessi, dopo ulteriori eventi maturativi, formeranno il ribosoma 80S funzionale.

Il ribosoma ha una funzione essenziale per la vita cellulare, ma le patologie causate da mutazioni in proteine ribosomali o in altre molecole coinvolte nel processo di biogenesi del ribosoma presentano un fenotipo limitato ad un difetto di funzioni specifiche. I pazienti, infatti, manifestano nella maggior parte dei casi aplasia midollare e/o un quadro malformativo.

In questo gruppo di malattie troviamo l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA), una rara aplasia eritroide pura. La caratteristica clinica principale è l'anemia normocromica macrocitica, causata dall'incapacità dei progenitori eritroidi di differenziare. In circa un terzo dei soggetti affetti da DBA sono presenti malformazioni congenite.

Nel 1999 è stato scoperto il primo gene DBA, *RPS19*, codificante per una componente strutturale del ribosoma. Mutazioni in questo gene sono state trovate nel 25% dei pazienti. Successivamente, sono state evidenziate mutazioni anche in *RPS17*, *RPS24*, *RPL5*, *RPL11* e *RPL35a*, tutti geni che codificano per proteine ribosomali.

Recentemente è stato dimostrato che in condizioni di difetto di una RP si verifica un'alterazione a livello della biogenesi del ribosoma, con incapacità di portare a termine in maniera efficiente la maturazione degli rRNA. Tali dati non riescono però a spiegare perché nella DBA siano presenti disfunzioni soltanto a livello del midollo osseo e dell'embriogenesi.

Per chiarire la patogenesi della malattia sono state presentate diverse ipotesi. Una di queste propone l'esistenza di una funzione, presumibilmente tessuto-specifica, delle proteine ribosomali coinvolte nell'insorgenza della patologia, un'altra presuppone l'attivazione di un meccanismo di risposta allo stress ribosomale causato dal blocco maturativo a livello della biogenesi del ribosoma. È stato ipotizzato che un tessuto ad elevato *turn-over*, quale quello emopoietico, possa essere più sensibile al conseguente difetto della sintesi proteica.

Per chiarire quale sia il meccanismo patogenetico alla base della DBA, nel mio corso di dottorato mi sono dapprima dedicata all'identificazione degli interattori di RPS19. La determinazione dei complessi proteici a cui una proteina si associa può, infatti, suggerire indicazioni sulle sue funzioni.

In seguito, abbiamo analizzato le differenze nei profili di espressione genica nella linea cellulare eritroleucemica umana TF-1. Queste cellule sono state trasdotte con siRNA contro RPS19 o con un siRNA *scramble* (controllo negativo). L'analisi è stata effettuata utilizzando tecniche ad alta resa che ci hanno permesso di evidenziare le alterazioni nell'espressione genica sia a livello dei trascritti sia delle proteine.

Dalla nostra indagine sperimentale è emerso che gli interattori di RPS19 sono proteine a localizzazione principalmente nucleare e nucleolare, molti coinvolti nella biogenesi ribosomale. Il 20% degli interattori da noi identificati è coinvolto nel metabolismo delle proteine; tra questi troviamo anche la metionina-tRNA sintetasi (MARS) ed un fattore di allungamento della sintesi proteica (EEF1B2). Dall'analisi del modello cellulare emerge che l'espressione di geni facenti parte di queste due categorie è deregolata a livello sia del trascrittoma sia del proteoma. I dati ottenuti risultano quindi in accordo tra loro e suggeriscono un difetto a livello della sintesi proteica e della biogenesi del ribosoma. Non sono emersi dati relativamente ad una seconda funzione eritroide-specifica di RPS19.

L'analisi di espressione ha poi sottolineato una deregolazione di geni coinvolti nel cancro. Ciò potrebbe spiegare l'aumentato rischio di sviluppare tumori che presentano questi pazienti. L'alterazione nell'espressione di geni implicati nella morte cellulare programmata è invece in linea con il fatto che nei soggetti affetti da DBA i progenitori eritroidi, incapaci di differenziare, vanno incontro ad apoptosi.

Ulteriori studi sono necessari per definire se lo stesso quadro è presente anche nei difetti delle altre RP mutate nei pazienti DBA.



# **CAPITOLO 1**

## **INTRODUZIONE**

## 1.1 IL RIBOSOMA

In tutti i tipi di cellule, la sintesi proteica avviene nei ribosomi. Questi complessi ribonucleoproteici furono scoperti all'inizio degli anni '40, ma il loro ruolo venne chiarito oltre un decennio più tardi ed il nome "ribosoma" fu assegnato solo nel 1958 (Hoagland *et al.*, 1958).

Ribosomi procariotici ed eucariotici presentano la stessa struttura di base, ma hanno dimensioni diverse. Ogni ribosoma è comunque composto da due subunità, la maggiore e la minore, di cui fanno parte specifici RNA ribosomali (rRNA) e proteine (RP). Il ribosoma procariotico ha un coefficiente di sedimentazione pari a 70S ed è composto dalla subunità 50S, comprendente 31 proteine e due molecole di rRNA, 23S e 5S, e dalla subunità 30S, formata da 21 proteine e un rRNA 16S (Maguire e Zimmermann, 2001). Nel caso del ribosoma eucariotico, che presenta invece un coefficiente di sedimentazione di 80S, le due subunità sono denominate 60S e 40S; la prima contiene tre molecole di rRNA, 5S, 5.8S e 28S, e 45 proteine, mentre la seconda contiene un solo rRNA, 18S, e 35 proteine. La regione compresa tra le due subunità rappresenta la superficie attiva del complesso, a livello della quale l'RNA messaggero (mRNA) e gli aminoacil-tRNA interagiscono (Fromont-Racine *et al.*, 2003).

Alle due subunità sono assegnati ruoli funzionali ben distinti. La maggiore catalizza due processi che hanno luogo nel centro peptidiltrasferasico del ribosoma: il primo consiste nella formazione del legame peptidico tra gli aminoacil-tRNA e il peptidil-tRNA durante la fase di allungamento della sintesi proteica, mentre il secondo riguarda l'idrolisi del peptidil-tRNA stesso alla fine del processo di traduzione. Mediante approfonditi studi biochimici sul ribosoma procariotico (Noller *et al.*, 1992), nonché grazie alla cristallizzazione del ribosoma archebatterico (Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000) ed eubatterico (Harms *et al.*, 2001), è stato dimostrato che tale attività catalitica è svolta dalla componente a RNA del complesso (Nissen *et al.*, 2000).

La subunità minore ha invece il ruolo di legare l'mRNA ed è responsabile di garantire la fedeltà della traduzione, assicurando il corretto appaiamento degli aminoacil-tRNA con i codoni del messaggero (Ogle *et al.*, 2001).

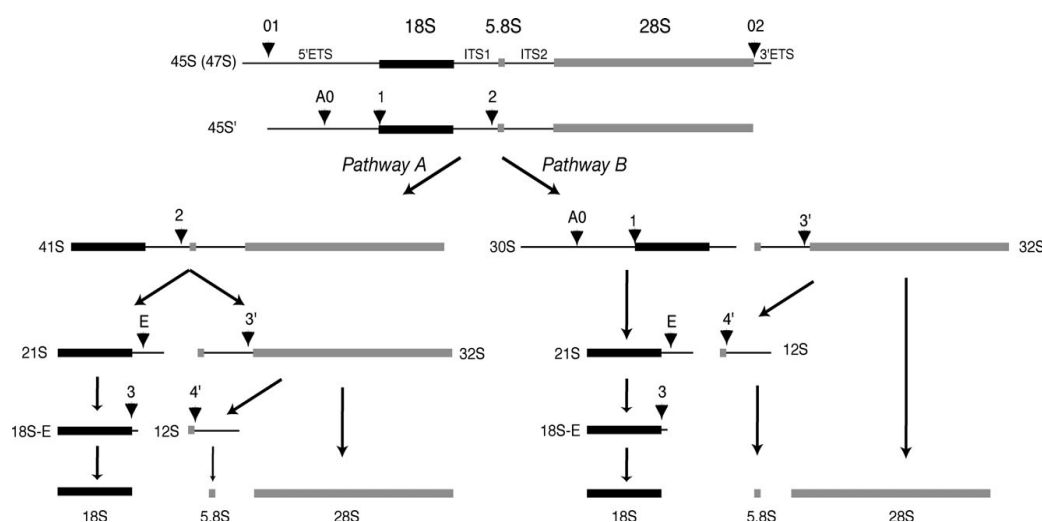
Il ribosoma è inoltre coinvolto nel ripiegamento del polipeptide nascente nella corretta struttura secondaria, agendo così come una chaperonina (Yonath, 2005). Studi biochimici più recenti hanno evidenziato il coinvolgimento del ribosoma anche in altri meccanismi; tra questi troviamo un'attività mRNA elicastica, che ha la funzione di svolgere le eliche a valle durante la fase di allungamento della traduzione (Takyar *et al.*, 2005).

L'intensivo studio dei ribosomi batterico ed archeobatterico ha fornito un'ampia mole di dati riguardo alla struttura ed alla funzione di questo complesso ribonucleoproteico; tali acquisizioni indubbiamente serviranno da base per comprendere il funzionamento del ribosoma eucariotico. Il ribosoma 80S però presenta componenti peculiari, che lo differenziano da quello procariotico e lo rendono ancora più complesso. Queste molecole includono alcune RP evolutivamente nuove, rRNA dalle sequenze più lunghe e addirittura una nuova molecola di rRNA, la 5.8S, omologa della regione 5' del 23S batterico. Dato che la struttura terziaria del ribosoma è conservata, ci si interroga su quale sia il ruolo di queste nuove componenti. Ad oggi ci sono evidenze di un loro coinvolgimento nella biogenesi del ribosoma stesso; non è escluso, però, che svolgano anche un ruolo funzionale (Dresios *et al.*, 2006).

### **1.1.1 BIOGENESI DEL RIBOSOMA**

La biogenesi del ribosoma eucariotico avviene nel nucleolo. Il processo ha inizio con la sintesi dei pre-rRNA 45S e 5S mediante due diverse RNA polimerasi, rispettivamente la Pol I e la Pol III, e richiede il trasporto nel nucleo delle proteine ribosomali dal loro luogo di sintesi, il citoplasma. Gli rRNA maturi sono rilasciati dai pre-rRNA secondo un *pathway* complesso che coinvolge digestioni sia endo- sia esonucleolitiche (figura 1.1). Contemporaneamente, i pre-rRNA sono modificati e legati alle proteine ribosomali prima del trasporto dal nucleo al citoplasma dei precursori delle due subunità, denominati pre-40S e pre-60S. Tale processo avviene in maniera indipendente per ciascuno dei due complessi; infatti, la pre-40S è ulteriormente processata nel citoplasma, mentre la maturazione della pre-60S continua a livello nucleare. Inoltre, la formazione del

ribosoma eucariotico non richiede soltanto il coordinamento degli eventi di processamento ed assemblaggio, ma anche dell'ordine spazio-temporale di questi eventi che hanno inizio nel nucleolo e terminano nel citoplasma, permettendo di ipotizzare la presenza di diversi fattori in grado di determinare la correttezza del processo di assemblaggio e di trasporto dal nucleo al citoplasma delle strutture pre-ribosomali attraverso i pori nucleari. Da saggi *in vitro* di assemblaggio del ribosoma batterico è stato possibile comprendere che la formazione delle subunità ribosomali dalle singole proteine e dagli rRNA è un processo autoassemblante che richiede solo un'energia di attivazione iniziale (Nierhaus, 1991). *In vivo*, sono necessari fattori addizionali che diminuiscano l'energia di attivazione delle reazioni limitanti, sia nel ripiegamento dell'rRNA sia nel riarrangiamento delle interazioni rRNA-RP. Non è sorprendente che in *E. coli* siano state scoperte soltanto poche di tali proteine accessorie in grado di idrolizzare l'ATP, mentre negli eucarioti la situazione è molto più complessa e la maturazione degli rRNA richiede un gran numero di fattori pre-ribosomali (Fromont-Racine *et al.*, 2003).



**Figura 1.1** Schema del processamento dell'rRNA (da Choesmel *et al.*, 2008).

## 1.2 SINDROMI EREDITARIE DA INSUFFICIENZA MIDOLLARE

Le sindromi ereditarie da insufficienza midollare (IBMFS, *Inherited Bone Marrow Failure Syndromes*) costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie

caratterizzate dall'incapacità del midollo osseo di produrre un numero adeguato di cellule ematiche e sono associate ad una riduzione dell'aspettativa di vita. L'insufficienza midollare, che può coinvolgere una come tutte e tre le linee emopoietiche, è solitamente presente già nell'infanzia, ma sono stati riscontrati casi in cui la malattia è stata diagnosticata in età adulta (Ganapathi e Shimamura, 2008).

Le principali patologie classificate in questa categoria sono la discheratosi congenita (MIM #305000), la sindrome di Shwachman-Diamond (MIM #260400), l'ipoplasia cartilagine-capillizio (MIM #250250) e l'anemia di Diamond-Blackfan (MIM #105650). In ciascuna di queste malattie sono state trovate mutazioni causative in geni codificanti per RP o molecole comunque coinvolte nel processo biogenetico del ribosoma (Liu e Ellis, 2006).

La caratterizzazione genetica di queste malattie non solo ha permesso di far luce sulla loro patogenesi, ma ha consentito anche di meglio comprendere sia la fisiologia dell'emopoiesi normale, sia alcuni importanti processi biologici, quali la biogenesi del ribosoma, la stabilità genomica ed il mantenimento dei telomeri.

### 1.2.1 DISCHERATOSI CONGENITA (DC)

La DC è una rara malattia ereditaria che presenta un'estrema eterogeneità sia clinica sia genetica. Classicamente è caratterizzata dalla triade fenotipica costituita da distrofia ungueale, leucoplachia delle mucose ed aplasia midollare. Quest'ultimo tratto fenotipico è, in generale, la principale causa di morte di questi pazienti, i quali presentano anche un aumentato rischio di sviluppare leucemie e tumori solidi (Ganapathi e Shimamura, 2008).

Ad oggi sono state identificate, nei pazienti, mutazioni nei geni *DKC1*, *TERT*, *TERC*, *TINF2*, *NOLA2* e *NOLA3* (Kirwan e Dokal, 2008; Vulliamy *et al.*, 2008; Walne *et al.*, 2007). I primi tre codificano ciascuno per una componente del complesso telomerasico, deputato al mantenimento della lunghezza dei telomeri durante la divisione cellulare. La discherina, *NHP2* (*alias* *NOLA2*) e *NOP10* (*alias* *NOLA3*) presentano però una funzione aggiuntiva. Infatti,

all'interno del nucleo, formano un complesso multiproteico, a cui si associa anche GAR1 (*alias* NOLA1), e vanno ad associarsi con gli RNA dell'H/ACA box, svolgendo un ruolo nella pseudouridilazione e nella maturazione dell'rRNA (Dokal e Vulliamy, 2003). E' stato inoltre osservato, mediante esperimenti effettuati in un topo ipomorfo DKC1<sup>m</sup>, che la discherina influenza l'espressione genica attraverso un controllo traduzionale su specifici mRNA. Il lavoro, infatti, suggerisce che, in assenza di questa proteina, ci sia un difetto nel meccanismo di traduzione IRES-mediato (Yoon *et al.*, 2006).

### 1.2.2 SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND (SDS)

La SDS è caratterizzata da una disfunzione a livello del pancreas esocrino, nonché da aplasia midollare. La neutropenia rappresenta la manifestazione più comune del difetto a livello del midollo osseo, ma possono essere presenti anche anemia e trombocitopenia. I pazienti SDS presentano alto rischio di sviluppare aplasia trilineare e leucemia mieloide acuta (AML), ma ad oggi non sono mai stati riportati casi di tumori solidi (Ganapathi e Shimamura, 2008).

Mutazioni bialleliche nel gene *SBDS* sono state riscontrate nel 90% dei pazienti. La proteina SBDS copurifica proteine coinvolte nel processamento dell'rRNA e componenti della 60S, quindi è possibile supporre che almeno una delle sue funzioni riguardi la biogenesi del ribosoma. Dati sperimentali dimostrano che Sdo1 (ortologo di *SBDS* nel lievito) interagisce sia con fattori nucleolari coinvolti nella maturazione degli rRNA sia con RP, nonché con l'rRNA maturo; la proteina potrebbe quindi legare il complesso pre-60S e rimanervi associata durante il suo processamento ed il suo trasporto dal nucleo al citoplasma (Luz *et al.*, 2009).

Nel modello di lievito della SDS, i profili polisomiali dimostrano una riduzione della subunità 60S (Menne *et al.*, 2007).

### 1.2.3 IPOPLASIA CARTILAGINE-CAPILLIZIO

L'ipoplasia cartilagine-capillizio (CHH, *Chartilage-Hair Hypoplasia*) è una rara malattia con ereditarietà autosomica recessiva descritta per la prima volta in

una comunità Amish nel 1965 (McKusick *et al.*, 1965). Le caratteristiche cliniche principali sono il nanismo disarmonico, la disostosi metafisaria ed altre anomalie scheletriche. Dal punto di vista ematologico, i pazienti CHH presentano un'anemia ipoplastica macrocitica, linfopenia e neutropenia; la malattia è associata anche ad un aumentato rischio di sviluppare linfomi (Makitie *et al.*, 1995). Il gene responsabile è *RMRP* (Sulisalo *et al.*, 1993), il quale interviene nel clivaggio dei precursori degli rRNA (Schmitt e Clayton, 1993).

### **1.3 ANEMIA DI DIAMOND-BLACKFAN**

L'anemia di Diamond-Blackfan (DBA) è una rara ed eterogenea aplasia congenita pura della serie eritroide, che presenta un'incidenza in Europa pari a 5-7 casi per milione di nati vivi. La maggioranza dei casi è sporadica, ma il 20% circa dei pazienti presenta familiarità per la malattia, con trasmissione autosomica dominante. La penetranza è incompleta e l'espressività variabile, come dimostrato dall'estrema eterogeneità fenotipica (Campagnoli *et al.*, 2004). Sebbene la maggioranza dei pazienti sia di razza caucasica, tutte le etnie ne sono parimenti colpite. Il rapporto dei malati tra i due sessi è di circa 1:1 (Ramenghi *et al.*, 1999).

#### **1.3.1. QUADRO CLINICO**

La principale caratteristica della DBA è l'anemia, normocromica e macrocitica, evidente già alla nascita nel 25% dei casi e comunque diagnosticata entro il primo anno di vita nella quasi totalità dei pazienti; le altre linee emopoietiche sono invece normali. Il midollo osseo si presenta normocellulare, ma con un difetto selettivo a livello dei precursori eritroidi, causato presumibilmente dall'incapacità dei loro progenitori di differenziare. Altre caratteristiche cliniche dei pazienti DBA sono aumentati livelli sierici di acido folico, vitamina B<sub>12</sub>, eritropoietina (EPO) e adenosina deaminasi eritrocitaria (eADA) (Dianzani *et al.*, 1996).

In circa un terzo dei soggetti affetti sono inoltre riscontrabili malformazioni

congenite, in particolare dismorfismi cranio-facciali, nonché anomalie a carico dell'arto superiore, del cuore e dell'apparato uro-genitale (Lipton *et al.*, 2001).

### 1.3.2. TERAPIA

Il 75% dei pazienti risponde al trattamento con steroidi, che costituiscono quindi la terapia di prima scelta per la cura della DBA. La risposta è però molto variabile, sia da soggetto a soggetto, sia nello stesso paziente in tempi diversi: sono stati infatti registrati casi di remissione completa, così come sviluppo di steroido-resistenza. Nei casi in cui il trattamento con steroidi non è applicabile, l'alternativa è rappresentata dalla terapia trasfusionale cronica associata a ferro-chelazione, sebbene per i pazienti che debbano seguire tale via terapeutica l'aspettativa di vita venga drasticamente ridotta. Successi sono stati ottenuti anche con il trapianto di midollo osseo (BMT) o di cellule staminali (SCT), a cui comunque è associato un tasso di mortalità in conseguenza all'intervento (Freedman, 2000).

Più recentemente sono state sperimentate nuove vie terapeutiche, quali il trattamento con acido valproico (Jabr e Taher, 2006) o la somministrazione di leucina (Pospisilova *et al.*, 2007). In entrambi i casi, però, i dati disponibili si riferiscono ad un solo paziente e sono quindi necessari studi clinici più approfonditi.

### 1.3.3. CAUSE MOLECOLARI

Nel 1997 venne identificata in una paziente la traslocazione reciproca bilanciata  $t(X;19)(p21;q13)$ . Ciò ha radicalmente cambiato l'approccio allo studio dell'eziopatogenesi della DBA, volgendo l'attenzione su geni scelti in base alla localizzazione cromosomica piuttosto che in base alla loro funzione fisiologica e permettendo di ipotizzare il coinvolgimento di un *locus* sul braccio lungo del cromosoma 19. E' stato possibile escludere il ruolo di un gene del cromosoma X in quanto, come precedentemente puntualizzato, il rapporto dei malati tra i due sessi è di circa 1:1 (Gustavsson *et al.*, 1997).

Successive analisi di *linkage* su famiglie *multiplex* hanno mostrato



un'associazione statisticamente significativa della DBA con il *locus* 19q13.2. Nel 1999, grazie al clonaggio del punto di rottura della traslocazione, è stato identificato il primo gene DBA, *RPS19* (MIM 603474). Il gene codifica per la proteina RPS19, componente strutturale della subunità minore del ribosoma. Successive analisi hanno riscontrato che circa un quarto dei pazienti DBA presenta mutazioni in questo gene, sempre su un singolo allele (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

Dal 2006 ad oggi la lista dei geni coinvolti nell'insorgenza della malattia si è notevolmente allungata e comprende esclusivamente geni codificanti per RP: *RPS24* (2% dei casi, Gazda *et al.*, 2006a) e *RPS17* (due casi, Cmejla *et al.*, 2007; Gazda *et al.*, 2008) fanno parte della subunità piccola del ribosoma, mentre *RPL35a* (2% dei casi, Farrar *et al.*, 2008), *RPL5* (10% dei casi) e *RPL11* (6,5% dei casi, Gazda *et al.*, 2008) sono parte della subunità maggiore.

#### **1.4 IL GENE *RPS19***

Il gene *RPS19* è composto da sei esoni e si estende per 11 kb. Il primo esone (372 bp) include la regione 5' UTR e, come molti altri mRNA codificanti per RPs, contiene un tratto di oligopirimidine di 13 nucleotidi (sequenza TOP) coinvolto nella regolazione traduzionale del messaggero. I restanti cinque esoni (435 bp) codificano per una proteina di 145 aminoacidi con peso molecolare di 16 kDa; il 3' UTR si estende poi per 40 nucleotidi. Le dimensioni previste per l'intero trascritto di *RPS19* sono quindi di 847 bp (Draptchinskaia *et al.*, 1999).

La proteina, piccola, priva di motivi funzionali conosciuti ed ubiquitariamente espressa, è una componente strutturale della subunità minore del ribosoma, dove si colloca nelle vicinanze del sito di legame per eIF2 (Lutsch *et al.*, 1990).

La scoperta di mutazioni in *RPS19* nei pazienti affetti da DBA ha portato alla produzione di numerosi dati sperimentali volti ad una migliore comprensione del funzionamento di questa RP, al fine di identificarne i ruoli molecolari. Esperimenti di immunofluorescenza hanno dimostrato che *RPS19* si localizza principalmente nel nucleo ed in modo particolare nel nucleolo, dove colocalizza con la più abbondante tra le proteine nucleolari, la nucleolina (Da Costa *et al.*,

2003). Come atteso, RPS19 è però presente anche nel citoplasma, soprattutto in qualità di costituente del ribosoma (Angelini *et al.*, 2007). Grazie all'utilizzo di mutanti delezionali all'N- o al C-terminale sono stati identificati due segnali di localizzazione nucleolare (NoS): uno comprende i primi 16 aminoacidi (Met1-Arg16), mentre il secondo si estende da Gly120 a Asn142. Mutazioni che cadono all'interno di questi NoS portano ad una drammatica diminuzione dei livelli della proteina (Da Costa *et al.*, 2003). Recenti esperimenti effettuati inibendo il proteasoma hanno inoltre dimostrato che questa errata localizzazione subcellulare porta ad un aumento della degradazione della proteina mutante (Angelini *et al.*, 2007; Crétien *et al.*, 2008).

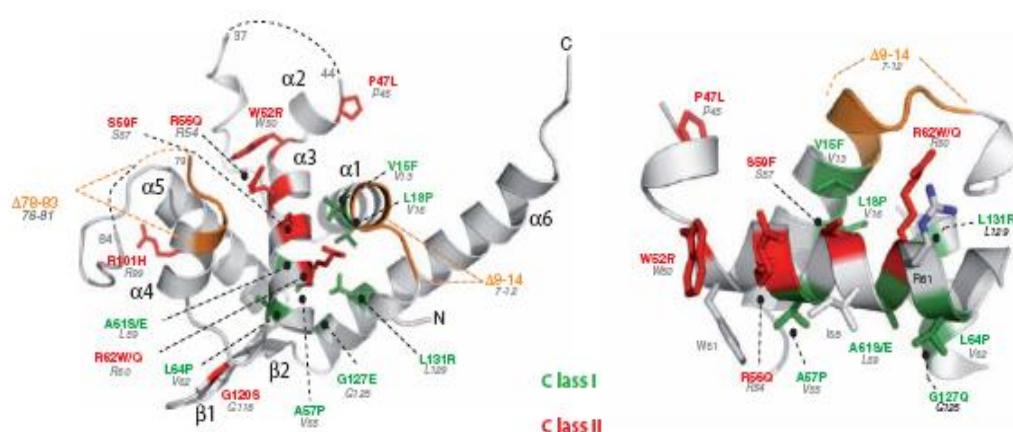
Come altre RP, RPS19 possiede anche funzioni extra-ribosomali. Dimeri di RPS19 isolati da estratti di lesioni sinoviali nell'artrite reumatoide (Nishiura *et al.*, 1996) mostrano un'attività chemiotattica per i monociti (Shibuya *et al.*, 2001). Inoltre, RPS19 interagisce con FGF-2 (Soulet *et al.*,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

RPS19 si è inoltre dimostrata essenziale per la maturazione dell'rRNA 18S sia nel lievito (Léger-Silvestre *et al.*, 2005) sia nell'uomo (Flygare *et al.*, 2007; Choismel *et al.*, 2007; Idol *et al.*, 2007).

L'elevata solubilità di RPS19 umana ha impedito per lungo tempo gli studi di cristallizzazione. Questo problema è stato recentemente risolto grazie alla scelta di utilizzare *Pyrococcus abissi*, un archebatterio ipertermofilo la cui RPS19 ha un'identità del 36% ed un'omologia del 57% con RPS19 umana. La struttura della RP ha potuto quindi essere definita come una matassa di sei  $\alpha$ -eliche contenenti gli aminoacidi *target* delle mutazioni missenso, come rappresentato in figura 1.2. Tali mutazioni, in base alla loro localizzazione all'interno di questa struttura tridimensionale, sono state catalogate in due classi, che sarebbero associate a conseguenze diverse sia sul ripiegamento della proteina sia sulla sua

funzione. La classe I (evidenziata in verde) coinvolge infatti residui localizzati nel *core* idrofobico della proteina. Si pensa quindi che possano essere fondamentali per il corretto ripiegamento e, di conseguenza, per la corretta funzione di RPS19. Le mutazioni della classe II (evidenziate in rosso) si collocano invece sulla superficie esterna della proteina e possono compromettere le sue interazioni con l'ambiente circostante e quindi la sua funzione, senza però che la struttura venga alterata. 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 (Gregory *et al.*, 2007).

Una revisione di tutte le mutazioni di RPS19 identificate nei pazienti DBA e delle loro conseguenze funzionali è stata l'argomento di un lavoro a cui ho partecipato nel mio corso di dottorato (cfr. § 1.4.1).



**Figura 1.2** Struttura tridimensionale di RPS19. Le due classi in cui sono state catalogate le mutazioni missenso trovate nei pazienti DBA sono indicate con colori diversi (da Gregory *et al.*, 2007).

**1.4.1 Hum Mutat. 29:911-920, 2008: RIASSUNTO DEL LAVORO**

Ad oggi, sono state identificate in *RPS19* un totale di 77 mutazioni. La maggior parte sono delezioni dell'intero gene, traslocazioni o mutazioni che portano ad prodotto proteico tronco (nonsense o spostamento della cornice di lettura). Questo suggerisce un meccanismo di aploinsufficienza alla base della DBA. Sono state anche identificate 22 mutazioni missenso, di cui sono disponibili diversi dati funzionali, risultanti da studi *in vitro*, sulle proteine mutanti. In questo lavoro abbiamo poi descritto sei mutazioni nuove.

Lo scopo di questa *review* è stato quello di classificare funzionalmente, per la prima volta, le mutazioni già note in letteratura. Sono state quindi definite tre classi funzionali. La prima comprende mutazioni che riducono i livelli del messaggero, quali grandi delezioni e traslocazioni, nonché mutazioni nonsense e *frameshift* che introducono codoni di stop prematuri o generano mRNA privi del codone di stop. Nella seconda categoria troviamo invece quelle mutazioni che riducono i livelli proteici ed impediscono la localizzazione nucleolare delle proteine mutanti; questa classe comprende solamente mutazioni missenso. Nella terza categoria sono infine comprese sei mutazioni missenso che impediscono l'associazione della proteina mutante al ribosoma, ma non la sua localizzazione nucleolare.

Da questo lavoro emerge inoltre che i pazienti portatori di mutazioni in *RPS19* sono meno responsivi alla terapia steroidea e presentano una prognosi a lungo termine peggiore rispetto a quelli portatori di mutazioni in altri geni.

## MUTATION UPDATE

## RPS19 Mutations in Patients With Diamond-Blackfan Anemia

Maria Francesca Campagnoli,<sup>1</sup> Ugo Ramenghi,<sup>1</sup> Marta Armiraglio,<sup>2</sup> Paola Quarello,<sup>1</sup> Emanuela Garelli,<sup>1</sup> Adriana Carando,<sup>1</sup> Federica Avondo,<sup>2</sup> Elisa Pavesi,<sup>2</sup> Sébastien Fribourg,<sup>3,4</sup> Pierre-Emmanuel Gleizes,<sup>5</sup> Fabrizio Loreni,<sup>6</sup> and Irma Dianzani<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Sciences, Università di Torino, Torino, Italy; <sup>2</sup>Interdisciplinary Research of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Medical Sciences, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy; <sup>3</sup>INSERM U869, Institut Européen de Chimie et Biologie, Bordeaux, France; <sup>4</sup>Université Victor Segalen, Bordeaux, France; <sup>5</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire des Eucaryotes, CNRS and Université Paul Sabatier, Toulouse, France; <sup>6</sup>Department of Biology, Università "Tor Vergata," Rome, Italy

Communicated by Maria Rita Passos-Bueno

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is an inherited disease characterized by pure erythroid aplasia. Thirty percent (30%) of patients display malformations, especially of the hands, face, heart, and urogenital tract. DBA has an autosomal dominant pattern of inheritance. De novo mutations are common and familial cases display wide clinical heterogeneity. Twenty-five percent (25%) of patients carry a mutation in the ribosomal protein (RP) S19 gene, whereas mutations in RPS24, RPS17, RPL35A, RPL11, and RPL5 are rare. These genes encode for structural proteins of the ribosome. A link between ribosomal functions and erythroid aplasia is apparent in DBA, but its etiology is not clear. Most authors agree that a defect in protein synthesis in a rapidly proliferating tissue, such as the erythroid bone marrow, may explain the defective erythropoiesis. A total of 77 RPS19 mutations have been described. Most are whole gene deletions, translocations, or truncating mutations (nonsense or frameshift), suggesting that haploinsufficiency is the basis of DBA pathology. A total of 22 missense mutations have also been described and several works have provided in vitro functional data for the mutant proteins. This review looks at the data on all these mutations, proposes a functional classification, and describes six new mutations. It is shown that patients with RPS19 mutations display a poorer response to steroids and a worse long-term prognosis compared to other DBA patients. *Hum Mutat* 29(7), 911–920, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Diamond-Blackfan anemia; ribosomal protein S19; erythropoiesis; ribosome biogenesis

## INTRODUCTION

Protein is universally synthesized in the ribosome. This macromolecular ribonucleoprotein machinery consists of a small and a large subunit with slight eukaryote and prokaryote differences. The mammalian ribosome comprises four RNAs and 80 ribosomal proteins (RPs), of which 34 are common to eukaryotes, archaea, and eubacteria, 33 to eukaryotes and archaea, and 11 unique to eukaryotes [Lecompte et al., 2002].

That a human disease could be caused by an RP first became apparent when RPS19 (MIM# 603474) was shown to be mutated in 25% of Diamond-Blackfan anemia (DBA) patients [Draptchinskaia et al., 1999]. DBA (MIM# 105650) is a rare, heterogeneous pure red cell aplasia with an estimated incidence of about six per million live births in Europe [Campagnoli et al., 2004]. Its main clinical feature is normochromic and macrocytic anemia that nearly always becomes evident within the first year of life. Other hematopoietic lineages are usually free from evident abnormalities. The bone marrow is normocellular, but erythroid precursors are absent or markedly decreased in number, probably because their progenitors are proapoptotic and are unable to differentiate. The erythropoietic defect is associated with high serum levels of folic acid, vitamin B12, erythropoietin (EPO), and erythrocyte adenosine deaminase

(eADA) [Campagnoli et al., 2004]. About one-third of patients present congenital craniofacial, upper limb, heart, and urogenital malformations [Lipton et al., 2001].

DBA is primarily treated with steroids and more than 70% of patients respond to the first course [Ball et al., 1996; Willig et al., 1999b; Campagnoli et al., 2004; Lipton et al., 2006]. The long-term response, however, is extremely variable: some patients go into remission, others develop steroid-resistance. If steroid therapy cannot be continued, chronic transfusion is mandatory and its

The Supplementary Material referred to in this article can be accessed at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1059-7794/suppmat>.

Received 5 September 2007; accepted revised manuscript 14 January 2008.

\*Correspondence to: Irma Dianzani, Prof., Medical Sciences and IRCAD, University of Eastern Piedmont, Via Solaroli 17, Novara, 28100, Italy. E-mail: [irma.dianzani@med.unipmn.it](mailto:irma.dianzani@med.unipmn.it)

Grant sponsors: Diamond Blackfan Anemia Foundation; Telethon; MIUR 2006.

Maria Francesca Campagnoli and Ugo Ramenghi contributed equally to this work.

DOI 10.1002/humu.20752

Published online 15 April 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

## 912 HUMAN MUTATION 29(7), 911-920, 2008

long-term side effects result in a poorer prognosis. The only definitive and indeed curative alternative is stem cell transplantation (SCT) [Lipton et al., 2006].

The link between a RP defect and the development of anemia is still unclear, but the general view is now focused on a biogenesis defect of the ribosome [reviewed in Liu and Ellis, 2006]. The discovery of mutations in another five RP genes, i.e., RPS24 [Gazda et al., 2006], RPS17 [Cmejla et al., 2007], RPL35A [Farrar et al., 2007], RPL11 and RPL5 [Gazda et al., 2007], has enabled DBA to be classified as a ribosome-based disease. Other ribosomal disorders include dyskeratosis congenita, Treacher-Collins syndrome, Shwachman Diamond syndrome, and perhaps the cartilage hair hypoplasia (CHH) syndrome [reviewed in Liu and Ellis, 2006].

**RPS19**

The RPS19 gene (locus 19q13.2) encompasses six exons and spans 11 kb. The first exon spans 372 bp and is included in the 5' UTR region; like many other mRNAs encoding RPs, it contains an oligopyrimidine tract of 13 nucleotides (nt) (terminal oligopyrimidine [TOP] sequence) involved in translational regulation of the mRNA. The other five exons (435 bp) encode for a 145-amino acid (aa) protein (molecular weight [MW] 16 kDa); the 3' UTR spans 40 nt. Thus, the predicted size of the whole RPS19 transcript is 872 bp (GenBank NM\_001022.3). Synthesis of RPS19, like that of the other vertebrate RPs, is regulated predominantly at the translational level. Polysomal association of RP-mRNA changes according to the cell growth status [Meyuhas and Hornstein, 2000]. This regulation is dependent on the TOP sequence and on the PI3K signaling pathway. It has also been shown that amino acids stimulate the translation of RP-mRNA [Caldarola et al., 2004]. Oral administration of leucine to starved rats induced an increase in liver polysomal association of RP mRNAs [Anthony et al., 2001]. RPS19 is ubiquitously expressed. It is a structural component of the small subunit of the ribosome, and immunoelectron microscopy experiments suggest that it is located beside the eIF2 binding site [Lutsch et al., 1990]; it is a small protein and does not include known functional motifs.

Identification of RPS19 mutations in DBA patients has prompted investigation of its molecular role(s). Immunofluorescence studies revealed that RPS19 is primarily located in the nucleus, particularly in the nucleolus, where it colocalizes with nucleolin, the most abundant nucleolar protein [Da Costa et al., 2003]. Obviously, RPS19 is also present in the cytoplasm, mostly as a ribosomal component [Angelini et al., 2007]. Two nucleolar localization signals (NoS) were identified by using N- and C-terminal deletion mutants: one comprises the first 16 aa (Met1-Arg16), the other spans from Gly120 to Asn142. Mutations that affect the nucleolar localization determine a dramatic decrease in protein levels; mislocalization is thought to accelerate degradation [Da Costa et al., 2003].

Like other RPs (such as RPL13 and RPL26), RPS19 has some extraribosomal functions. RPS19 dimers isolated from extracts of rheumatoid arthritis synovial lesion [Nishiura et al., 1996] display monocyte chemotactic activity [Shibuya et al., 2001]. Furthermore, RPS19 interacts with FGF-2 [Soulet et al., 2001], with RPS19 binding protein, a nucleolar protein whose function is still unknown [Maeda et al., 2006], and with PIM-1, a serine-threonine kinase whose expression is strictly related to hematopoietic cytokines. In vitro, interaction between RPS19 and PIM-1 leads to its phosphorylation [Chiocchetti et al., 2005]. The entire

RPS19 interactome has been published: interestingly, most interactors are nucleolar, and include many RPs, pre-ribosome components, and helicases [Orrù et al., 2007]. This is consistent with the finding that RPS19 is essential for the maturation of 18S rRNA [Flygare et al., 2007; Choessel et al., 2007; Idol et al., 2007] and assembly of pre-40S particles [Léger-Silvestre et al., 2005]. Depletion of Rps19 in yeast causes strong inhibition of pre-rRNA cleavage at site A2 within ITS1 and of the subsequent maturation of the 3' end of 18S rRNA [Léger-Silvestre et al., 2005]. Similar effects are observed in human cells [Flygare et al., 2007; Choessel et al., 2007; Idol et al., 2007]. Production of 40S ribosomal subunits and assembly to ribosomes of several nonribosomal factors thus depend on proper RPS19 function.

The high solubility of human RPS19 has hampered crystallization studies. This problem has now been solved thanks to *Pyrococcus abissi*, an hyperthermophilic archaeon whose RPS19 shares 36% identity and 57% similarity with human RPS19. The structure of RPS19 is a bundle of five  $\alpha$ -helices bearing amino acids that are the targets of missense mutations [Gregory et al., 2007].

**RPS19 MUTATIONS**

In this work we update the list of RPS19 mutations published by Campagnoli et al. [2004] and Orfali et al. [2004], and propose their classification in accordance with recently reported functional data. The DNA mutation numbering that we use is based on cDNA sequence according to international standards (www.hgvs.org/mutnomen). For cDNA nucleotide numbering, +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon in the GenBank reference sequence NM\_001022.3. The initiation codon is codon 1. We include all of the 77 mutations so far reported and six new mutations from a total of 127 DBA families (Table 1). Clinical data are summarized in Supplementary Table S1 (available online at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1059-7794/suppmat>), which also comprises the six patients with new mutations and four new patients with previously described mutations. The six new mutations (p.Phe21Ser, p.Tip52Cys, p.Thr76Pro, p.Ala135Thr, and c.412delG, c.417delA) have been validated by the following criteria: 1) they have been confirmed on a second sample and on a second PCR product; 2) for each patient the complete coding sequence has been determined to rule out the possibility of other mutations; 3) mutations at codons 21, 52, and 135 affect conserved amino acids, while the mutation at codon 76 involves a proline residue expected to disrupt the 3D structure; 4) the two missense mutations for which family members were available (p.Tip52Cys, p.Thr76Pro) segregate with the disease (see below); and 5) the two deletions are de novo mutations.

All the RPS19 mutations were found in heterozygosity with the wild-type sequence; this is consistent with the dominant inheritance pattern and with the evidence that the RPS19 knockout is lethal prior to implantation in mice [Matsson et al., 2004]. Mutations are heterogeneous and span the whole gene. A total of 37% (31/83) of the RPS19 mutations are transitions: eight nonsense, 17 missense, and six splice-site mutations. Of these, 11 (three nonsense and eight missense) are C>T mutations possibly caused by methyl-cytosine deamination at CpG dinucleotides. Two nonsense, nine missense and four splice site defects are transversions and account for the 18% of total mutations. Five mutations (6%) are caused by a slippage mechanism. They are all small insertions or deletions in regions with a single base repeat. The mutation subtypes are described below.

TABLE 1. Summary of RPS19 Mutations in Patients With Diamond-Blackfan Anemia\*

Mutation type	Region	cDNA mutation	Expected protein alteration	Number of families	References	
Nonsense	Exon 2	c.31C>T	p.Gln11X	24	Willig et al. [1999a]; Proust et al. [2003]; Gazda et al. [2004]	
	Exon 2	c.34C>T	p.Gln12X	4	Willig et al. [1999a]; Orfalli et al. [2004]	
	Exon 3	c.99G>A	p.Tyr33X	3	Willig et al. [1999a]; Mattsson et al. [1999]	
	Exon 3	c.144C>A	p.Tyr48X	2	Willig et al. [1999a]	
	Exon 3	c.156G>A	p.Tyr52X	1	Willig et al. [1999a]	
	Exon 3	c.166C>T	p.Arg56X	1	Willig et al. [1999a]; Proust et al. [2003]	
	Exon 3	c.280C>T	p.Arg94X	2	Draptchinskaja et al. [1999]; Willig et al. [1999a]; Mattsson et al. [1999]; Proust et al. [2003]; Orfalli et al. [2004]; this work	
	Exon 4	c.340G>T	p.Glu114X	8	Proust et al. [2007]	
	Exon 5	c.376C>T	p.Gln126X	1	Ida et al. [2007]	
	Exon 5	c.382C>T	p.Gln128X	1	Proust et al. [2003]	
	Missense	Exon 2	c.1A>G	p.Met1Val	49	Draptchinskaja et al. [1999]
		Exon 2	c.3G>C	p.Met1Ile	1	Ramenghi et al. [2000]
Exon 2		c.3G>T	p.Met1Ile	1	Ramenghi et al. [2000]; Orfalli et al. [2004]	
Exon 2		c.3G>A	p.Met1Ile	2	Proust et al. [2003]; this work	
Exon 2		c.48G>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 work	
Exon 3		c.140C>T	p.Pro47Leu	1	Ramenghi et al. [2000]	
Exon 3		c.194T>C	p.Tyr52Arg	1	Draptchinskaja et al. [1999]	
Exon 3		c.196G>C	p.Tyr52Cys	1	This work	
Exons 2 and 3		c.[48G>T;164C>T]	p.[Val15Phe; Thr55Met]	1	De Costa et al. [2003]	
Nonsense	Exon 3	c.167G>A	p.Arg56Gln	6	Willig et al. [1999a]; Cmejla et al. [2000]; Orfalli et al. [2003]; this work	
	Exon 3	c.169G>C	p.Ala57Pro	1	Orfalli et al. [2004]	
	Exon 4	c.176G>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	Draptchinskaja 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. [2003]; Proust et al. [2003]; Gazda et al. [2004]	
	Exon 4	c.191T>C	p.Leu64Pro	1	Lejeune-Silvestre et al. [2005]	
	Exon 4	c.226A>C	p.Thr76Pro	1	This work	
	Exon 4	c.302G>A	p.Arg101His	2	Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]	
	Exon 5	c.358G>A	p.Glu120Ser	1	Willig et al. [1999a]	
	Exon 5	c.380G>A	p.Glu127Glu	1	Willig et al. [1999a]	
	Exon 5	c.392T>G	p.Leu131Arg	1	Gazda et al. [2004]	
Exon 5	c.392T>C	p.Leu131Pro	1	Proust et al. [2003]		
Exon 5	c.403G>A	p.Ala135Thr	1	This work		
Insertions and deletions	Exon 2	c.14_15insA	p.Val6Cys4x45	31	Draptchinskaja et al. [1999]	
	Exon 2	c.20_32del	p.Lys7SerfsX18	1	Proust et al. [2003]	
	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	Draptchinskaja et al. [1999]	
	Exon 3	c.106_107insA	p.Thr36AfsX15	1	Gazda et al. [2004]	
	Exon 3	c.[157_158delinsAA;160_161insCT]	p.[Phe53Asn; Tyr54SerfsX23]	1	Mattsson 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. 2006a	

TABLE 1. Continued

Mutation type	Region	cDNA mutation	Expected protein alteration	Number of families	References
	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_253insA	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.307 delG	p.Val103SerfsX8	1	Mattson et al. [1999]
	Exon 4	c.328delC	p.Leu10X	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. [2004]
	Exon 5	c.390_391delTC	p.Leu131GlyfsX22	1	Willig et al. [1999a]
	Exon 6	c.412delG	p.Val138Trpfs	1	This work
	Exon 6	c.417 delA	p Ala140Leufs	1	This work
Exon 6	c.435_*3del	p.His145Glnfs	1	Proust et al. [2003]	
Splice-site mutations	Intron 1	c.I-IG>T	No protein	14	Draptchinskaja et al. [1999]
	Intron 1	c.I-IG>A	No protein	1	Campagnoli et al. [2004]
	Intron 2 and 4	c.I71+IG>A;356+I69_356+I70del	No protein	1	Proust et al. [2003]
	Intron 2	c.71+I_71+4delGTGA	No protein	1	Draptchinskaja et al. [1999]
	Intron 2	c.71+IG>A	No protein	1	Orfali et al. [2004]
	Intron 3	c.I73-2A>T	p.Ala58_Thr60del	1	Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]
	Intron 3	c.I73-1delG	p.Ala58_Thr60del	1	Willig et al. [1999a]; Gazda et al. [2004]
	Intron 3	c.I73-IG>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-IG>T	p.Gly120Trpfs (ex. 5 del)	1	Campagnoli et al. [2004]
	Intron 4	c.357-IG>A	p.Gly120Trpfs (ex. 5 del)	1	Campagnoli et al. [2004]
	Intron 4	c.356+IG>A	p.Ser59AlafsX4 (ex. 4 del)	1	Gazda et al. [2004]
	Intron 5	c.411+IG>A	p.Gly120Trpfs (ex. 5 del)	2	Ramenghi et al. [2000]; this work
	Cytogenetic or large deletions		t(X;19)(p21;p13)	NA	1
		t(8;19)(q35;q13)	NA	1	Gustavsson et al. [1999a]
		t(1;19)(p22;p13)	NA	1	Campagnoli et al. [2004]
		Deletion of complete allele	NA	2	Gustavsson et al. [1997b]; Gustavsson et al. [1998]
		LOH 3 to exon 3	p.Gly120 Trpfs	2	Draptchinskaja et al. [1999]; Proust et al. [2003]
		LOH 5 to exon 4		1	Orfali et al. [2004]
Total				127	

\*GenBank Reference sequence: NM\_000223.3 DNA mutation numbering is based on cDNA sequence according to journal standards (www.hgvs.org/mutno men). For cDNA nuc.leotide numbering, +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence, the initiation codon is codon 1.



### Nonsense Mutations

A total of 24 families (24/127; 19%) carry nonsense mutations. p.Arg94X recurs in eight unrelated families and p.Gln11X, p.Gln12X, p.Trp33X, and p.Arg56X are detected in more than one patient; five mutations are unique. Most nonsense mutations are expected to cause haploinsufficiency by nonsense-mediated decay (NMD) of aberrant mRNA.

### Missense

This is the most frequent subtype: 26 missense mutations in 49 families (49/127, 38%). Four mutations are reported for the first time: p.Phe21Ser, p.Trp52Cys, p.Thr76Pro, and p.Ala135Thr. p.Trp52Cys and p.Thr76Pro were inherited from the proband mothers, who had anemia in infancy, elevated adenosine deaminase (ADA) and hexadactyly, and isolated increased ADA, respectively. p.Thr76Pro was also found in a maternal aunt, who showed anemia in infancy and elevated ADA. Familial data were not available for p.Phe21Ser and p.Ala135Thr.

Several missense mutations independently recur in more than one patient, the most frequent being p.Arg56Gln, p.Arg62Trp, and p.Arg62Gln, found in seven, 10, and seven patients, respectively.

Eight recurrent missense mutations are located in a highly conserved region between codons 52 and 62 (hotspot). Recent definition of the three-dimensional (3D) structure has helped to illustrate the effect of missense mutations [Gregory et al., 2007]. According to their location on this structure, Gregory et al. [2007] distinguished two classes of missense mutations (Fig. 1). Class I mutations affect residues located within the hydrophobic core of RPS19 and are thus expected to impair its folding and function. This class comprises p.Val15Phe, p.Leu18Pro, p.Phe21Ser, p.Ala57Pro, p.Ala61Glu, p.Leu64Pro, p.Gly127Glu, p.Leu131Pro, and p.Ala135Thr. Class II mutations, namely p.Pro47Leu, p.Trp52Arg, p.Trp52Cys, p.Arg56Gln, p.Ser59Phe, p.Arg62Trp, p.Arg62Gln, p.Arg101His, and p.Gly120Ser, are located on the surface of RPS19 and hence may affect its interaction with its environment and impair its function without altering its folding. The amino acid residues affected by class II mutations are much more conserved than those affected by class I mutations; this could reflect their importance for RPS19 function. Residues affected by class II mutations are located within two conserved patches, both presenting a strong positive charge. The first patch corresponds to the  $\alpha$ -helix 3 formed by residues 52 to 67, which occupies a critical central position in the structure. The hotspot between codons 52

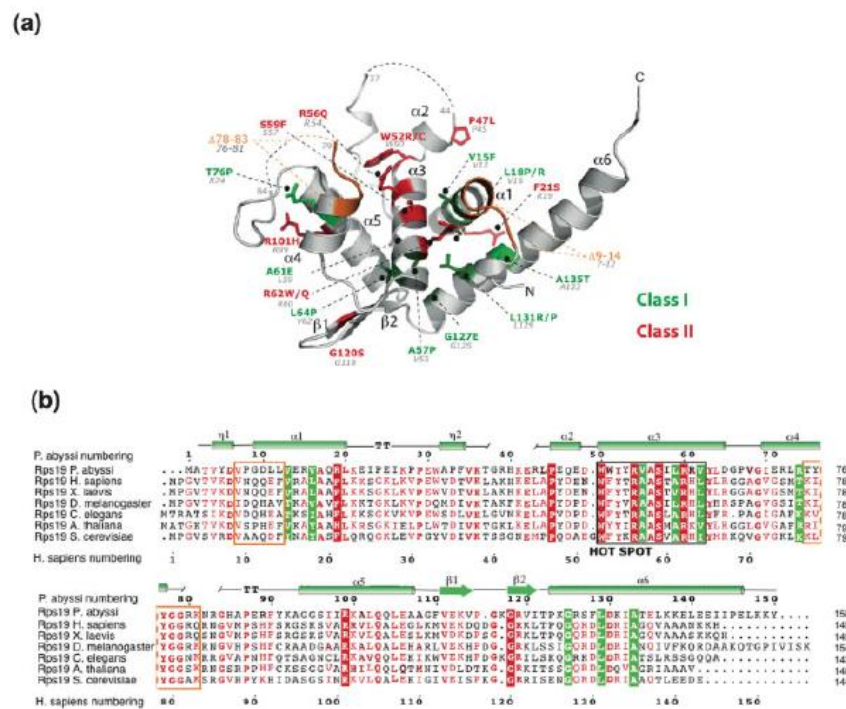


FIGURE 1. **a:** Ribbon model for RPS19 from *P. abyssus*. Missense mutations encountered in DBA patients have been labeled and colored according to their belonging to Class I (green and structural) or Class II (red and solvent exposed) as described in Gregory et al. [2007]. Deletions are colored in orange. Bold labeling corresponds to human numbering whereas gray labeling (underneath) corresponds to *P. abyssus* numbering. **b:** Sequence alignment of RPS19 orthologs. Various sequences of RPS19 in different species were aligned using PipeAlign software [Plewniak et al., 2003]. Missense mutations and deletions are colored as described in (a). Human and *P. abyssus* numbering are shown below and above the alignment, respectively. Secondary structure elements are displayed above the sequences.

## 916 HUMAN MUTATION 29(7), 911–920, 2008

to 62 is comprised in this secondary structure, which is thought to be of critical importance in RPS19 folding and in the surface interactions. Significantly, class I mutations affecting residues outside this hotspot often alter the interactions of other helices with the  $\alpha$ -helix 3 [Gregory et al., 2007].

**Deletions and Insertions**

A total of 31 families (31/127, 26%) carry 29 small deletions or insertions that span the entire gene and mostly shift the reading frame so as to cause premature or suppressed stop codons. Many of these mutations are expected to cause NMD or nonstop decay of mRNA. We report two new de novo single nucleotide deletions, c.412delG and c.417delA, that cause frameshift at codons 138 and 139, respectively, with suppression of the stop codon.

**Splice-Site Defects**

A total of 13 splice-site defects have been reported, all but one are unique mutations (14/127 families, 11%). In most cases the allele is suppressed by aberrant mRNA degradation.

**Large Deletions and Rearrangements**

Nine patients (7%) carry whole-gene deletions or gross rearrangements of chromosome 19 causing haploinsufficiency. These include three reciprocal translocations, two of which are unbalanced, two large deletions, and two intragenic deletions involving more than one exon. The intragenic deletions were found by loss of heterozygosity (LOH) of RPS19 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in two cases in which haplotype analysis was possible. It is likely that such mutations are underestimated because PCR-based techniques cannot reveal exon deletions; alternative mutation detection methods such as multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) could provide a more complete picture.

**POLYMORPHISMS**

Many intragenic SNPs are listed in genomic databases ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org); [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)). Six (c.1-450T>C; c.71+80\_71+81insC; c.71+89C>G; c.356+14A>G; c.357-90C>T; and c.412-175C>T) located close to intron-exon boundaries and transmitted en bloc may be of assistance in evaluating the presence of the deletion in segregation studies [Proust et al., 2003; Orfali et al., 2004]. A frequent 4-bp insertion in the promoter (c.1-631\_1-632insGCCA) was once regarded as a mutation, but is now known to be a polymorphism [Huang et al., 2006].

**FUNCTIONAL CLASSIFICATION**

Several works have examined the effects of RPS19 mutations on its functions in vivo and in vitro. Functional data are available for 25/83 mutations. The in vivo data include transcript expression, evaluation of protein synthesis, and ribosome biogenesis in cells from mutated patients.

Missense mutations have been subjected to intense study in vitro in the hope that their behavior could shed light on the pathogenesis of DBA. Mutants have been expressed in a yeast model: the yeast *RPS19B* ortholog has been mutagenized to ascertain its ability to support growth and ribosome biogenesis. The ability of human mutants to locate in the nucleolus and on translationally active ribosomes has also been studied in cell lines.

Our proposed functional classification is formed of three classes: 1) mutations that reduce mRNA level; 2) mutations that reduce

protein levels and impair nucleolar localization; and 3) mutations that impair ribosomal association, but not nucleolar localization. Because of the lack of data, some functionally studied mutations are still unclassifiable (Supplementary Table S2).

**Mutations That Reduce mRNA Levels**

This class includes large deletions and translocations that cause allelic loss, but also nonsense mutations, and those leading to frameshift, which in turn generates a premature stop codon (PTC) or an mRNA without stop codon (nonstop mRNA). A PTC or a nonstop mRNA can induce a rapid turnover of the mRNA by NMD or nonstop mediated decay mechanisms [reviewed in Byers, 2002; Schell et al., 2002; Lykke-Andersen, 2002; Kuzniak and Maquat, 2006]. Six mutations have been analyzed in detail at the mRNA level in lymphoblastoid cell lines from DBA patients [Chatr-Aryamontri et al., 2004]. It has been confirmed that allelic deletion decreases RPS19 mRNA to 50%, indicating that transcriptional or posttranscriptional compensation is absent. A transition in the 5th intron (c.411+1G>A), an exon 5 deletion (c.357\_411del), a frameshift mutation in exon 2 (c.14\_15insA), and a missense mutation at the start codon (p.Met1Val) cause a clear decrease in the mRNA steady state level. Since treatment with a translation inhibitor increases total RPS19 mRNA in all the cell lines with PTCs or nonstop mutations, this decrease is probably due to NMD and nonstop decay. The mRNA level has also been assessed by quantitative real-time RT-PCR of mononuclear cells from DBA patients [Gazda et al., 2004]. Four PTC mutations decreased mRNA, whereas a splice-site mutation (c.356+1G>A) generated a PTC at codon 124 in exon 5, but did not affect the mRNA level. This is consistent with the fact that mutations which create a PTC on the last exon or in the 50 to 55 nt upstream from the last exon-exon junction do not undergo NMD. Since exon 5 includes 55 nt, all PTC that map in exon 5 or 6 are not expected to induce NMD. These include 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, and p.Gln128X. Decreased mRNA substantially reduced the RPS19 protein in the two cases studied [Gazda et al., 2004].

Three mutations that may decrease RPS19 mRNA level affect pre-rRNA processing [Flygare et al., 2007]. In this study, CD34+ mononuclear bone marrow cells from DBA patients displayed an increase in 21S pre-rRNA relative to the downstream species 18SE. This has also been observed in fibroblasts from two DBA patients with RPS19 mutations [Choessel et al., 2007] and in an experimental model in which RPS19 was knocked down by RNA interference [Flygare et al., 2007; Choessel et al., 2007; Idol et al., 2007]. The fact that decreased RPS19 levels result in a functional defect in 40S ribosomal subunit maturation supports the view that ribosome biogenesis is involved in the etiology of DBA.

**Mutations That Reduce Protein Levels and Impair Nucleolar Localization**

The effect of missense mutations has been investigated in a few experimental systems including *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. An extensive analysis on 11 mutations elicited by expression of mutated RPS19 in human embryonic kidney (HEK) 293 cells identified two classes with different functional properties [Angelini et al., 2007]. The first class (p.Val15Phe, p.Leu18Pro, p.Ala57Pro, p.Ala61Glu, and p.Gly127Glu) included mutations that caused a drastic increase in protein turnover.

Degradation of the mutated RPS19 was shown to be partly mediated by the proteasome. In addition to this high instability, its intracellular localization was altered. Immunofluorescence microscopy failed to detect any signal in the nucleolus, where wild-type and other mutated RPS19 were clearly visible. The relationship between instability and absence in the nucleolus is not clear. These alterations are unlikely to be independent and hence may be responsible for each other. The missense mutations p.Val15Phe and p.Gly127Glu produced essentially similar results in another study and alteration of amino acid sequences necessary for nucleolar localization was suggested [Da Costa et al., 2003]. A recent study from Lam et al. [2007] showed that RPs normally accumulate very rapidly in the nucleolus but most are degraded because they are in excess with respect to the capacity of ribosome assembly. These findings are consistent with the idea that an RPS19 defectively assembled with the other ribosomal components would be turned over very quickly in the nucleolus [Angelini et al., 2007].

#### Mutations That Impair Ribosomal Association, But Not Nucleolar Localization

This class consists of six missense mutations (p.Pro47Leu, p.Trp52Arg, p.Arg56Gln, p.Arg62Trp, p.Arg62Gln, and p.Arg101His) [Angelini et al., 2007]. As already indicated, mutated RPS19 proteins are detected in the nucleolus by immunofluorescence microscopy. However, Western blot analysis of fractionated cytoplasmic extracts has shown that these mutations impair the assembly of RPS19 into a functional ribosome and hence alter ribosome biogenesis. Consistently with a ribosome defect, the two mutations p.Arg56Gln and p.Arg62Gln reduce translation efficiency in peripheral blood lymphocytes from DBA patients and in K562 cells expressing cDNA coding for mutated RPS19 [Cmejlova et al., 2006b].

#### Unclassified Mutations

Nine functionally-studied mutations still await specific classification. They include three nonsense and two frameshift mutations expected to cause a PTC, but not NMD. Some of these show normal mRNA or protein levels. The other four mutations include one in-frame deletion of three amino acids and three missense mutations. The mutant proteins have not been expressed *in vitro* and their behavior is uncertain. Deletion of residues 58 to 60 may affect interaction with other proteins.

Mutation p.Thr55Met has been found on the same allele as p.Val15Phe [Da Costa et al., 2003]. The protein carrying p.Val15Phe cannot reach the nucleolus and is unstable [Da Costa et al., 2003; Angelini et al., 2007], whereas p.Thr55Met localizes in the nucleolus [Da Costa et al., 2003]. These data suggest that p.Thr55Met may be a silent variant. Missense p.Leu64Pro, a new mutation, is localized in  $\alpha$ -helix 3 of the 3D structure. The proline residue may disrupt the entire folding. p.Gly120Ser, another new mutation, is located on the protein surface and may disrupt interaction with other proteins. Since no functional data are available for these mutants, they are provisionally included in this list.

The effect of RPS19 missense mutations has been studied in *Saccharomyces cerevisiae*. RPS19 mutated in positions equivalent to DBA mutations was introduced into an RPS19-null background. The yeast equivalent of the mutations p.Leu64Pro, p.Arg62Gln, p.Val15Phe, p.Arg56Gln, p.Ser59Phe, and p.Arg101His completely abolished cell growth [Léger-Silvestre et al., 2005; Gregory et al., 2007], whereas p.Ala61Glu, p.Gly120Ser, and p.Arg62Trp

had only a limited impact on cell viability. The fact that these mutations are pathogenic (with the possible exception of p.Ala61Glu), but do not affect growth in yeast, suggests that the properties or function of its RPS19 are slightly different from those of the human form. The analysis also revealed a different effect of two mutations of the same amino acid (p.Arg62Gln and p.Arg62Trp). This may indicate that the p.Arg62Trp mutation has a more critical effect in human RPS19.

In conclusion, representatives from each class of mutations are associated with a ribosome biogenesis defect. This suggests that they all result in an insufficient production of ribosomes through their effects on mRNA level, protein level or ribosome assembly.

#### GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION

A review of the literature confirms that RPS19 mutations are characterized by a wide variability of phenotypic expression. The same mutation is frequently associated with various degrees of anemia, different responses to treatment, and dissimilar malformations (Supplementary Table S1). Furthermore, familial cases demonstrate that RPS19 mutations associate with both overt DBA and minor phenotypes, such as isolated macrocytosis, isolated high eADA levels, or transient anemia.

We have observed differences in the incidence of congenital abnormalities in our patient classes: patients with mutations expected to suppress allele expression (nonsense and frameshift mutations) display a somewhat higher rate of somatic malformations than those with mutations that alter a single amino acid (missense mutations and in-frame insertions/deletions). Interestingly, chromosome rearrangements at locus 19q13.2 are always associated with multiple malformations. There is thus a specific group of patients with a significantly worse malformative status ( $p = 0.0002$ ). A contiguous gene syndrome may partially account for this severe phenotype, which also includes mental retardation [Tentler et al., 2000].

Severity of anemia and response to treatment are similar for all mutation subtypes (Supplementary Table S1). In a previous report, we came to the conclusion that patients with gross chromosomal rearrangements show a poor response to steroid treatment (6/7 were transfusion-dependent) and that this subtype was associated with a poor prognosis [Campagnoli et al., 2004]. While this is still true, it is now clear that poor steroid sensitivity is common to all patients with RPS19 alterations. Their response to the first steroid course is 46% (42/91 patients whose data were available, two of them showing a partial response) compared with more than 70% of the overall DBA population [Ball et al., 1996; Willig et al., 1999b; Campagnoli et al., 2004; Lipton et al., 2006]. Over the last 10 years, clinical data from the main European and North American DBA registries have been published [Ball et al., 1996; Willig et al., 1999b; Campagnoli et al., 2004; Lipton et al., 2006]. Our review of these reports with data for over 800 DBA patients has shown that those with RPS19 mutations display a significantly lower sensitivity to steroids ( $p < 0.0001$ ) and are significantly more likely to become transfusion dependent or require SCT ( $p < 0.0001$ ) (Table 2). As previously reported, their age of presentation of anemia seems lower, though not significantly.

A RPS19 mutation is constantly associated with high eADA levels. All 14 patients evaluated (11 from our series and three from the literature) [Gazda et al., 2001; Proust et al., 2003] had significantly higher activity than the controls. In three families, all relatives with the mutation had high enzyme activity, whereas it was always normal in those without it (data not shown). eADA

## 918 HUMAN MUTATION 29(7), 911–920, 2008

TABLE 2. Comparison of Clinical Data of DBA Patients From the Overall European and American DBA Population and the Subgroup of RPS19 Mutated Patients\*

	DBA population	RPS19 mutated DBA patients	p
Number of patients <sup>a</sup>	824	130	
Age at diagnosis (median)	2 months to 3 months <sup>b</sup>	2 months	No differences <sup>c</sup>
Malformations	30–47% <sup>b</sup>	31% (32/103)	No differences
Response to steroids (first course)	71% (505/708)	46% (42/91)	p < 0.0001
Status at last follow-up <sup>d</sup> :			p < 0.0001 (groups 1+2 vs 3+4)
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)	

\*DBA patient data from the DBA Registries of the United States/Canada, France/Germany, UK, and Italy [Ball et al., 1996; Willig et al., 1999b; Campagnoli et al., 2004; Lipton et al., 2006].

<sup>a</sup>Complete clinical data were not available for all patients.

<sup>b</sup>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].

<sup>c</sup>Mean age in RPS19 mutated patients  $2.5 \pm 3$  months (mean age in patients with no RPS19 mutation from the Italian Registry,  $5.9 \pm 8$  months).

<sup>d</sup>Only alive patients were included.

SD, steroid dependent; TD, transfusion dependent.

activity is thus a useful test for identification of DBA associated with an RPS19 mutation.

Some RPS19 mutations, i.e., p.Ala61Glu, p.Gly120Ser, p.Arg62Gln, and p.Arg62Trp, have little impact on cell growth and on 21S pre-rRNA accumulation in yeast [Léger-Silvestre et al., 2005; Gregory et al., 2007], whereas patients who carry them present classic DBA phenotypes, including malformations, high eADA levels, and variable response to steroids. p.Arg62Trp, in particular, is usually associated with a poor response to steroids and transfusion-dependence [Campagnoli et al., 2004].

## CONCLUSION AND NEW TREATMENT PROSPECTS

Our overview shows that DBA is mostly due to a haploinsufficiency mechanism, even if the molecular mechanisms are different.

Treatments tailored on the molecular effect of mutations are attracting great interest (for cystic fibrosis, see Kerem, [2005]). For example, mutations that reduce mRNA levels may respond to drugs that inhibit NMD [Kuzniak and Maquat, 2006] or those that increase general or specific transcription (such as HDAC inhibitors) [Cao et al., 2005; Kermochan et al., 2005; Hirtz et al., 2005; Gardian et al., 2005; Insinga et al., 2005]. The function of mutants that lead to unstable proteins may be stabilized by treatment with proteasome inhibitors [Vij et al., 2006]. Mutations suitable for this treatment are those that modify the protein structure, but are still able to localize to the nucleolus and the functional ribosome. These properties, however, have not yet been described for any of the known RPS19 mutations. These hypotheses should be tested in vitro.

Gene therapy has also been proposed for DBA [Hamaguchi et al., 2002]. The lack of an animal model is a main drawback to evaluate its effect in vivo. In general, we feel that class I mutations are the most suitable for gene therapy. Although there is no indication that any missense mutation has a dominant-negative effect, we feel that in vitro and in vivo experiments are needed to ascertain the effect of the mutant transcript/protein in a gene therapy context.

Last, leucine administration has been proposed to boost protein synthesis [Cmejlova et al., 2006]. A single patient attained clinical remission after leucine supplementation [Pospisilova et al., 2007]. A controlled trial is needed to validate this approach.

In conclusion, we would like to stress the importance of the definition of RPS19 status in DBA patients. If our data are confirmed, this definition will be not only important for diagnosis,

but may also be relevant for prognosis and perhaps for patient-tailored treatment.

## ACKNOWLEDGMENTS

Part of the work mentioned in this article was supported by grants from the Diamond Blackfan Anemia Foundation (to I.D. and F.L.), from Telethon (to I.D. and F.L.), and from MIUR 2006 (to I.D.). We also thank the Daniella Maria Arturi Foundation for supporting communication among DBA researchers.

## REFERENCES

- 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: 1720–1727.
- 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 CE, Jenkins G, Gordon-Smith EC. 1996. Diamond-Blackfan anaemia in the UK: analysis of 80 cases from a 20-year birth cohort. *Br J Haematol* 94:645–653.
- Byers PH. 2002. Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *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, Nouillac-Depeyre J, Fribourg S, Cretien A, Lehlanc T, Tchemia G, Da Costa L, Gleizes PE. 2007. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 109:1275–1283.

- Cmejla R, Blaukova J, Stopka T, Zavadi J, Pospisilova D, Mihal V, Petrylova 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* 28:1178-1182.
- Cmejlova J, Cema Z, Votava T, Pospisilova D, Cmejla R. 2006a. 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, Petrylova K, Petrak J, Cmejla R. 2006b. Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 91:1456-1464.
- Da Costa L, Tcherna G, Gascard P, Lo A, Meerpohl J, Niemeyer C, Chasis JA, Fidler 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.
- Drapchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tcherna G, Klar J, Mattsson 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.
- Farrar 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, Atsidafos E, Ellis S, Lipton J, Gazda H, Arceci RJ. 2007. A large ribosomal subunit protein abnormality in Diamond-Blackfan Anemia (DBA) [ASH Annual Meeting Abstracts]. *Blood* 110:422.
- Figare 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.
- 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 N17182Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem* 280:556-563.
- Gazda H, Lipton JM, Willig TN, Ball S, Niemeyer CM, Tcherna 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, Zhong R, Long L, Niewiadomska E, Lipton JM, Ploszynska A, Zaucha JM, Vlachos A, Atsidafos 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.
- Gazda HT, Grabowska A, Menda-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, Vlachos A, Atsidafos E, Ball SE, Orfali KA, Niewiadomska E, Da Costa L, Tcherna G, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Stahl J, Schmitt 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 HT, Sheen MR, Darras N, Schneider H, Sieff CA, Ball SE, Niewiadomska E, Newburger PE, Atsidafos 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 [ASH Annual Meeting Abstracts]. *Blood* 110:421.
- 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, Skeppner G, Johansson B, Berg T, Gordon L, Kreuger A, Dahl N. 1997a. 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, Tcherna G, Dianzani I, Donner M, Elinder G, Henter JI, Nilsson PG, Gordon L, Skeppner G, van't Veer-Korthof L, Kreuger A, Dahl N. 1997b. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8Mb. *Nat Genet* 16:368-371.
- Gustavsson P, Garelli E, Drapchinskaia 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, Tcherna 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.
- 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, Heemskerck 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.
- Kerem E. 2005. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatric Pulmonol* 40:183-196.
- 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.
- Kuzniak 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, Roch O. 2002. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic 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, Fedeman N, Khabbaz 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.
- Lipton JM, Atsidafos E, Zyskind I, Vlachos A. 2006. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 46:558-564.
- Liu JM, Ellis SR. 2006. Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood* 107:4583-4588.
- Lutsch G, Stahl J, Kargel HJ, Noll F, Biella 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.
- Lykke-Andersen J. 2002. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol* 22:8114-8121.
- Maeda N, Toki S, Kenmochi N, Tanaka T. 2006. A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun* 339:41-46.
- Mattsson H, Klar J, Drapchinskaia N, Gustavsson P, Carlsson B, Bowers D, de Bont E, Dahl N. 1999. Truncating ribosomal protein S19 mutations

## 920 HUMAN MUTATION 29(7), 911–920, 2008

- and variable clinical expression in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet* 105:496–500.
- Matsson H, Davey EJ, Drapchinskaja 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.
- Meyuhas O, Hornstein E. 2000. Translational control of TOP mRNAs. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, editors. *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p671–693.
- 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-Awuakwa 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.]
- Omù S, Aspesi A, Armiraglio M, Caterino M, Loreni F, Ruoppolo M, Santoro C, Dianzani I. 2007. Analysis of the ribosomal protein S19 interactor. *Mol Cell Proteomics* 3:382–393.
- Plewniak F, Bianchetti L, Brelivet Y, Carles A, Chalmel F, Leconte O, Mochel T, Moulinier L, Muller A, Muller J, Prigent V, Ripp R, Thiery J-C, Thompson J-D, Wicker N, Roch O. 2003. PipeAlign: a new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3829–3832.
- Popisilova 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, Tcherna 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, Camando A, Brusco A, Bagnara GP, Strippoli P, Izi 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, Kulocik 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 anemia 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 Chem* 281:17369–17378.
- Willig TN, Drapchinskaja 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, Tcherna G. 1999a. 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, Budd J, Lambilliotte A, Kohne E, Souillet G, Eber S, Stephan JL, Girot R, Bordigoni P, Cornu G, Blanche S, Guillard JM, Mohandas N, Tcherna G. 1999b. 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 Pédiatrique (SHIP), Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI). *Pediatr Res* 46:553–561.

## 1.5 MODELLI ANIMALI CHE RICAPITOLANO LA DBA

Il primo tentativo di creare un topo *knock-out* (KO) per *RPS19* ha dimostrato che il gene è essenziale per la vita; gli embrioni omozigoti infatti muoiono prima dell'impianto (Mattson *et al.*, 2004). Al contrario, topi eterozigoti *RPS19*<sup>+/-</sup> si presentano con un fenotipo paragonabile a quello del *wild-type*, sia per quanto riguarda lo sviluppo embrionale sia a livello di crescita; anche il sistema emopoietico risulta normale (Mattson *et al.*, 2006).

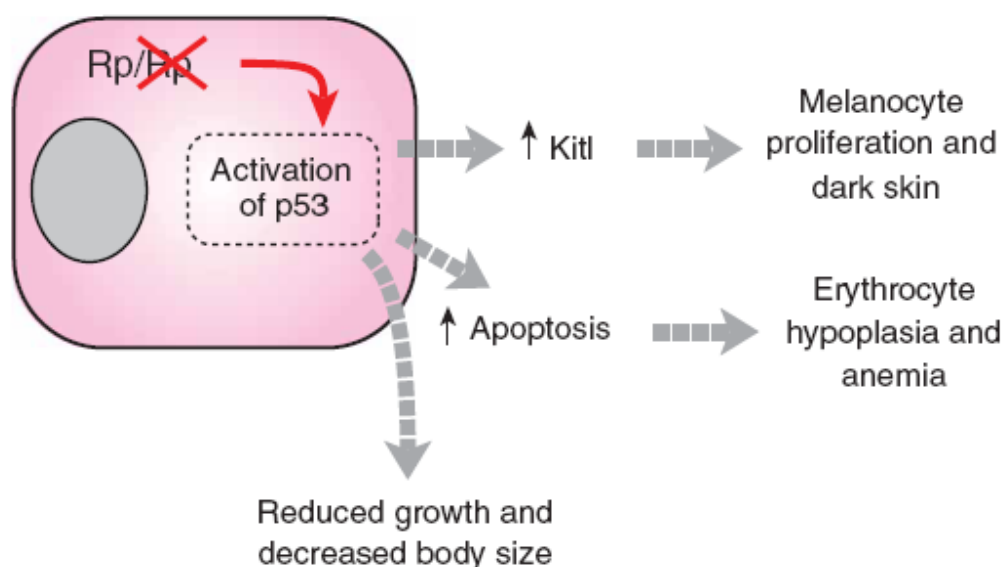
Due studi recenti hanno proposto un modello di *Zebrafish* per comprendere il meccanismo patogenetico alla base della DBA. In entrambi i casi, l'espressione di *RPS19* è stata abolita mediante *morpholino* (Danilova *et al.*, 2008; Uechi *et al.*, 2008). Nel lavoro di Uechi *et al.* si dimostra che la diminuzione dei livelli di *RPS19* causa una drammatica riduzione del numero delle cellule ematiche, nonché malformazioni nelle regioni sia cefalica sia caudale degli embrioni. È importante sottolineare che l'iniezione dell'mRNA *wild-type* di *RPS19* porta alla reversione del fenotipo, mentre gli mRNA portatori delle mutazioni riscontrate nei pazienti DBA non permettono di ottenere significativi miglioramenti. Gli stessi autori hanno successivamente ridotto l'espressione di altre 20 RP ed hanno raggruppato i mutanti in base alla gravità del fenotipo; questo metodo ha permesso loro di individuare altre tre RP, tra cui *Rpl35a*, che causano un difetto emopoietico simile a quello causato da mutazioni in *Rps19*.

Il lavoro di Danilova *et al.* ha descritto nei mutanti per *Rps19* un difetto a livello emopoietico e anomalie nello sviluppo che ricapitolano il fenotipo DBA. Inoltre, ridotti livelli di questa RP portano ad alterazioni nella trascrizione di *p53* e *p63*. Risultati simili sono stati riscontrati in modelli di *Zebrafish* mutanti per *Rps8*, *Rps11* e *Rps18*. Gli autori hanno proposto che lo stress ribosomale causato da ridotti livelli di *RPS19*, in *Zebrafish*, porti ad una upregolazione della famiglia di *p53*, con un conseguente sbilanciamento tra i componenti del *network*, che condurrebbe alle alterazioni nello sviluppo e nel differenziamento osservate in questi animali. Nel modello, il fenotipo veniva alleviato mediante la somministrazione di inibitori di *p53*. Quest'ultimo dato ha permesso di suggerire una nuova, controversa proposta di trattamento per i pazienti DBA.



Risulta, infatti, fondamentale ricordare che i soggetti affetti da anemia di Diamond-Blackfan presentano un aumentato rischio di sviluppare tumori (Campagnoli *et al.*, 2004).

Si è recentemente reso disponibile un nuovo modello DBA murino (McGowan *et al.*, 2008). Il topo è stato prodotto mediante mutagenesi chimica *random* che ha introdotto la mutazione R32L in RPS19. Presenta un fenotipo diverso da quello del topo KO per RPS19 precedentemente descritto (Mattson *et al.*, 2006). In entrambi i casi, l'omozigosi risulta letale a livello embrionale, ma, mentre il topo RPS19<sup>+/-</sup> presenta un fenotipo sovrapponibile a quello del *wild-type*, nell'eterozigote R32L si riscontra un livello lievemente ridotto di eritrociti, aumentata apoptosi dei precursori eritroidi nel midollo osseo, dimensioni ridotte, nonché aree iperpigmentate sulle zampe anteriori e sulla coda. Tale fenotipo è molto simile a quello dei pazienti DBA, sebbene i topi non presentino malformazioni. Inoltre, la discromia non è solitamente un fattore clinico caratterizzante questa malattia. Per spiegare questo tratto fenotipico, gli autori hanno costruito l'ipotesi che prevede un'attivazione p53-dipendente di KITL (figura 1.3; Cui *et al.*, 2007).



**Figura 1.3** Modello patogenetico conseguente a mutazioni in diverse RP. Un ridotto dosaggio di Rps6, Rps19 o Rps20, in *Zebrafish*, determina la stabilizzazione di p53, che porta ad un fenotipo pleiotropico specifico per ogni tipo cellulare. I fenotipi sono annullati silenziando p53 (da McGowan *et al.*, 2008).



## 1.6 DBA E RIBOSOMI

Studi effettuati nel lievito sull'ortologo di RPS19 hanno dimostrato che la proteina è necessaria in un preciso *step* della maturazione della subunità 40S del ribosoma. In cellule di lievito prive di Rps19, la pre-40S si accumula nel nucleo; si determina, quindi, una diminuzione della subunità 40S matura nel citoplasma (Léger-Silvestre *et al.*, 2005). Partendo da questa osservazione, è stato monitorato il processamento dell'rRNA 18S, nonché la maturazione della subunità 40S, nella linea cellulare eritroleucemica umana TF-1 trasdotta con un siRNA in grado di ridurre l'espressione di RPS19 (Miyake *et al.*, 2005) e in cellule di pazienti portatori di mutazioni in *RPS19*. Questi esperimenti hanno dimostrato che il profilo polisomiale di queste cellule è alterato rispetto ai controlli: il numero di subunità 40S infatti risulta drammaticamente ridotto, mentre c'è un aumento delle subunità 60S, che possono maturare normalmente e quindi si accumulano; sia i ribosomi 80S sia i polisomi risultano diminuiti. Inoltre, è possibile riscontrare un accumulo del pre-rRNA 21S ed una conseguente diminuzione del 18S maturo (Flygare *et al.*, 2007).

Dopo la scoperta di mutazioni in *RPS24* nella DBA, sono stati eseguiti esperimenti simili in cellule di pazienti portatori di mutazioni in questo gene. I risultati ottenuti sono sovrapponibili per quanto riguarda i profili polisomiali, mentre relativamente al processamento del pre-rRNA si evidenzia un blocco ad un diverso *step* di maturazione, con un accumulo del precursore 30S (Choesmel *et al.*, 2008). La medesima linea sperimentale è stata seguita anche per analizzare le mutazioni in *RPL35a*. Tale indagine ha evidenziato profili polisomiali in cui le singole subunità, i ribosomi completi ed i polisomi sono drasticamente diminuiti, mentre il difetto a livello del processamento dell'rRNA colpisce i precursori dei componenti della subunità maggiore: si osserva infatti una diminuzione dell'rRNA 28S, accoppiata ad un accumulo di 45S e 41S (Farrar *et al.*, 2008).

Recentemente, sono stati eseguiti esperimenti volti a chiarire il ruolo di diverse RP nella biogenesi del ribosoma, per evidenziare eventuali aspetti comuni tra le RP trovate mutate nei pazienti DBA (Robledo *et al.*, 2008). Cellule HeLa sono

state trasfettate con siRNA volti ad abolire l'espressione di svariate RP, facenti parte sia della subunità piccola (RPS6, RPS7, RPS15, RPS16, RPS17, RPS19, RPS24, RPS25, RPS28) sia di quella grande (RPL5, RPL7, RPL11, RPL14, RPL26, RPL35a) e sono stati studiati gli effetti della mancanza di ciascuna RP sul processamento degli rRNA e sulla biogenesi del ribosoma. E' stato così dimostrato che la diminuzione dei livelli di una RP porta ad una diminuzione della quantità di tutte le proteine facenti parte di quella subunità, nonché dei ribosomi completi e dei polisomi. Inoltre, c'è un accumulo di specifici precursori degli rRNA, fatto che conferma un loro ruolo nel processamento dell'rRNA stesso. Costituiscono un'eccezione RPS25 e RPL26, la cui deplezione conferisce alle cellule un fenotipo intermedio tra il controllo e gli altri mutanti.

## 1.7 IPOTESI PATOGENETICHE

La biogenesi del ribosoma è un processo cellulare essenziale; per questo sarebbe ovvio pensare che mutazioni in geni codificanti per RP causino una disfunzione cellulare globale. Rimane quindi da chiarire come l'alterazione di differenti *step* nel meccanismo di biogenesi del ribosoma risulti in specifici difetti fenotipici e perché il midollo osseo sia particolarmente suscettibile al malfunzionamento del ribosoma. La scoperta, nei pazienti DBA, di mutazioni in numerosi geni codificanti per RP lascia supporre che il processo biogenetico ribosomale svolga un ruolo di primo piano nell'insorgenza della malattia. Resta comunque da determinare se l'alterazione della biogenesi del ribosoma abbia conseguenze direttamente sul processo emopoietico oppure se l'insufficienza midollare dipenda da un difetto a livello della sintesi proteica, *in toto* o mediante una deregolazione di specifici trascritti.

Diverse ipotesi patogenetiche sono state proposte per spiegare come disfunzioni a livello ribosomale possano alterare il processo emopoietico. Il modello proposto da Ellis e Massey (2006) prevede che cellule in fase altamente proliferativa, quali sono i progenitori eritroidi, abbiano bisogno di mantenere elevati livelli di sintesi proteica per rispondere alla necessità di disporre di un'enorme quantità di emoglobina. Anche le cellule staminali

emopoietiche, il cui ciclo cellulare si svolge molto rapidamente, sarebbero particolarmente sensibili a questa ridotta produzione di ribosomi.

Recentemente, è stato osservato che il fattore trascrizionale Runx2, indispensabile per la morfogenesi scheletrica, controlla la trascrizione dei geni codificanti per l'rRNA. Ciò dimostra l'esistenza di un controllo tessuto-specifico della biogenesi del ribosoma (Young *et al.*, 2007).

Data la sorprendente variazione tessuto-specifica della quantità dei trascritti di diverse RP (Bortoluzzi *et al.*, 2001) è possibile che alcuni tessuti siano più suscettibili di altri alla ridotta produzione di specifiche RP, normalmente sintetizzate in quantità limitanti (Ellis e Massey, 2006). Dato che i livelli delle RP sono regolati in maniera coordinata per garantire un loro assemblaggio equimolare all'interno del ribosoma (Perry, 2007), la diminuita produzione di una determinata RP potrebbe indurre una downregolazione anche delle altre. Infatti, in cellule dove RPS19 risulti depleto sono riscontrabili bassi livelli anche di altre RP facenti parte della subunità 40S (Idol *et al.*, 2007). Inoltre, il profilo di espressione genica in due pazienti DBA non portatori di mutazioni in *RPS19* mostrano una ridotta espressione di altri geni codificanti per RP, a differenza di quanto avviene nell'anemia aplastica (Koga *et al.*, 2006).

E' anche possibile che un determinato difetto a livello del ribosoma possa avere conseguenze sulla traduzione di specifici trascritti, indispensabili per il corretto funzionamento del midollo osseo. E' noto infatti il meccanismo alla base della traduzione di mRNA portatori di una sequenza IRES, che prevede un legame al ribosoma e l'inizio della traduzione in maniera *cap*-indipendente (*review* Komar e Hatzoglou, 2005); questo *pathway* di controllo traduzionale è utilizzato dalla cellula per svariati geni coinvolti nella risposta allo stress. Tale sistema di regolazione risulta alterato in un topo ipomorfo *DKC1<sup>m</sup>*, sebbene l'importanza della pseudouridilazione degli rRNA nella traduzione IRES-mediata non sia, ad oggi, stata chiarita (Yoon *et al.*, 2006).

In letteratura è possibile rinvenire un numero crescente di esempi di regolazione traduzionale di specifici trascritti da parte di RP. RPL26 infatti lega la regione 5' UTR del messaggero di p53 e ne upregola l'espressione in risposta

al danno al DNA (Takagi *et al.*, 2005). RPL13a è fosforilata in risposta all'interferone gamma e lega la regione 3' UTR del messaggero della ceruloplasmina, inibendone la traduzione (Mazumder *et al.*, 2003).

Un esempio di regolazione post-traduzionale deriva dallo studio di RPL5, RPL11 e RPL23, che legano ed inibiscono MDM2, portando alla stabilizzazione ed all'attivazione di p53 (Zhang *et al.*, 2003). Partendo da quest'ultima osservazione è stata formulata una nuova ipotesi patogenetica. Infatti, la riduzione della sintesi di una RP o dell'rRNA nei pazienti DBA porterebbe ad un aumento di RP libere nel citoplasma. In particolare, l'aumentata concentrazione di RPL5 e RPL11 libere potrebbe indurre la stabilizzazione di p53. In queste condizioni, è possibile che alcuni tessuti, più sensibili di altri, vadano incontro ad arresto del ciclo cellulare ed apoptosi (Dianzani e Loreni, 2008).

E' fondamentale sottolineare, infine, che molti geni implicati nelle IBMFS sono coinvolti in processi extra-ribosomali; è perciò ipotizzabile che anche i geni implicati nella DBA abbiano dei ruoli, tuttora non noti, indipendenti da quello strutturale nel ribosoma.

## **CAPITOLO 2**

### **SCOPO DEL LAVORO**

## 2.1 SCOPO DEL LAVORO

Durante il mio corso di dottorato ho voluto cercare di chiarire i meccanismi patogenetici alla base dell'anemia di Diamond-Blackfan.

Obiettivo della ricerca era spiegare il motivo per cui mutazioni in una proteina ribosomale, quindi ubiquitariamente espressa, conducessero ad un fenotipo patologico soltanto in un tessuto specifico. Ci siamo focalizzati su RPS19, che fino al 2006 ha rappresentato l'unica causa molecolare nota della DBA. Sono state seguite due diverse vie sperimentali.

Dapprima ci siamo concentrati sulla ricerca di interattori di RPS19 utilizzando una tecnica di proteomica ad alta resa, la  $\mu$ LCMS/MS ( $\mu$ Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry). L'identificazione dei complessi multiproteici a cui una proteina prende parte può infatti suggerire nuovi ruoli ad essa attribuibili e, nel caso specifico, fare emergere delle nuove funzioni extra-ribosomali per la proteina di nostro interesse.

Inoltre, abbiamo eseguito studi di espressione, a livello sia trascrizionale sia di proteomica, in cellule TF-1 in cui l'espressione di RPS19 è stata abolita mediante siRNA, confrontate con cellule TF-1 di controllo trasdotte con un siRNA *scramble* (Miyake *et al.*, 2005). Con questo approccio ci siamo proposti di evidenziare i processi biologici alterati in condizioni di aploinsufficienza di una RP.

Fondamentale è stata la scelta del modello sperimentale. In entrambi i casi, sono state utilizzate linee cellulari eritroleucemiche umane, in quanto rappresentano un sistema simile al tessuto maggiormente colpito nei pazienti DBA.

## **CAPITOLO 3**

***Mol Cell Proteomics,***

**6:382-393, 2007**

### **3.1 SCOPO DEL LAVORO**

Quando è stato disegnato il progetto di ricerca che ha condotto ai risultati riportati in questo mio lavoro, mutazioni in *RPS19* rappresentavano l'unica causa molecolare nota della DBA, ma il rapporto di causa/effetto non era, e non è tuttora, stato definito. Lo scopo che ci siamo proposti è stato quello di far chiarezza sull'esistenza di una putativa funzione svolta da *RPS19* e non strettamente legata al suo ruolo di componente strutturale del ribosoma.

Sono disponibili infatti dati sperimentali riguardanti altre RP, quali *RPS6* (Ruvinsky e Meyuhas, 2006), *RPL13* (Mazumder *et al.*, 2003), *RPL26* (Takagi *et al.*, 2005), *RPL5* e *RPL11* (Zhang *et al.*, 2003), che attribuiscono a queste proteine ruoli funzionali indipendenti da quello strutturale. Tale ipotesi era inoltre suffragata da dati sperimentali ottenuti studiando l'ortologo di *RPS19* nel lievito, di cui si è dimostrato un coinvolgimento nel processamento degli rRNA (Léger-Silvestre *et al.*, 2005). Un ruolo simile è stato successivamente evidenziato anche nell'uomo (Flygare *et al.*, 2007; Choesmel *et al.*, 2007; Idol *et al.*, 2007).

Per chiarire eventuali nuove funzioni di *RPS19* si è deciso di identificare i suoi interattori, dapprima mediante uno *screening* per *two-hybrid* nel lievito, che ha portato all'identificazione della serina-treonina chinasi PIM-1 (Chiocchetti *et al.*, 2005), e successivamente utilizzando una tecnica proteomica ad alta resa, la  $\mu$ LCMS/MS. Quest'ultimo approccio ha dato origine ai risultati presentati di seguito.

### **3.2 RISULTATI E CONCLUSIONI**

Per isolare le proteine ed i complessi proteici con cui *RPS19* è in grado di stabilire dei rapporti di interazione abbiamo sintetizzato, nei batteri, la proteina di fusione GST-*RPS19*. Tale prodotto proteico è stato utilizzato per purificare gli interattori, sia diretti sia indiretti, di *RPS19* da un estratto proteico totale di cellule eritroleucemiche umane K562. La scelta della linea cellulare è stata dettata dalla necessità di avere un modello il più possibile simile al tessuto maggiormente colpito nei pazienti DBA. I complessi proteici così purificati sono



stati sottoposti ad analisi mediante  $\mu$ LCMS/MS; l'utilizzo di questa tecnica, accoppiata all'analisi dei dati mediante opportuni strumenti bioinformatici, ha permesso l'identificazione di 159 *partner* proteici di RPS19, successivamente classificati secondo le seguenti categorie di Gene Ontology: NTPasi (ATPasi e GTPasi; 5 proteine), idrolasi/elicasasi (19 proteine), isomerasi (2 proteine), chinasi (3 proteine), fattori di *splicing* (5 proteine), componenti strutturali del ribosoma (29 proteine), fattori di trascrizione (11 proteine), transferasi (5 proteine), trasportatori (9 proteine), proteine in grado di legare gli acidi nucleici (53 proteine). A questa lista si aggiungono una deidrogenasi, una ligasi, una peptidasi, un recettore ed un fattore di allungamento della sintesi proteica, nonché 13 proteine di funzione ignota.

Questi risultati sono stati validati tramite un saggio di purificazione per affinità seguito da rilevazione dell'avvenuta interazione mediante western blot. In corso d'opera si è inoltre reso disponibile un anticorpo monoclonale anti-RPS19, gentilmente fornitoci dal Prof. Fabrizio Loreni (Università "Tor Vergata", Roma), che ha permesso di confermare questi dati anche con saggi di co-immunoprecipitazione.

Il risultato di questo lavoro è stato significativo, in quanto a fianco di molti interattori a localizzazione nucleolare, che erano attesi in base alle conoscenze sulla localizzazione cellulare di RPS19, sono stati rinvenuti anche altri interattori quali chinasi, componenti del proteasoma ed integrine, che suggeriscono per RPS19 nuove funzioni che potrebbero aggiungere un tassello a quel complesso *puzzle* che è la comprensione della patogenesi della DBA.

E' interessante sottolineare che tra gli interattori identificati sono presenti, direttamente o indirettamente, proteine coinvolte in altre IBMFS. Ciò potrebbe suggerire un meccanismo patogenetico comune alla base di queste malattie.

Nel complesso, tuttavia, i processi biologici più rappresentati sono quelli legati alla biogenesi del ribosoma ed alla sua funzione traduzionale. Non è stato invece riscontrato, tra gli interattori, un fattore eritroide-specifico. Quindi questo studio suggerisce un ruolo precipuo di RPS19 connesso con la biogenesi del ribosoma e la sintesi proteica.

Supplemental Material can be found at:  
<http://www.mcponline.org/cgi/content/full/M600156-MCP200/DC1>

Research

## Analysis of the Ribosomal Protein S19 Interactome<sup>\*</sup>

Stefania Orrù<sup>§</sup>, Anna Aspesi<sup>¶</sup>, Marta Armiraglio<sup>¶</sup>, Marianna Caterino<sup>§</sup>,  
 Fabrizio Loreni<sup>\*\*</sup>, Margherita Ruoppolo<sup>§</sup>, Claudio Santoro<sup>¶††</sup>, and Irma Dianzani<sup>¶††§§</sup>

Ribosomal protein S19 (RPS19) is a 16-kDa protein found mainly as a component of the ribosomal 40 S subunit. Its mutations are responsible for Diamond Blackfan anemia, a congenital disease characterized by defective erythroid progenitor maturation. Dysregulation of RPS19 has therefore been implicated in this defective erythropoiesis, although the link between them is still unclear. Two not mutually exclusive hypotheses have been proposed: altered protein synthesis and loss of unknown functions not directly connected with the structural role of RPS19 in the ribosome. A role in rRNA processing has been surmised for the yeast ortholog, whereas the extracellular RPS19 dimer has a monocyte chemotactic activity. Three proteins are known to interact with RPS19: FGF2, complement component 5 receptor 1, and a nucleolar protein called RPS19-binding protein. We have used a yeast two-hybrid approach to identify a fourth protein: the serine-threonine kinase PIM1. The present study describes our use of proteomics strategies to look for proteins interacting with RPS19 to determine its functions. Proteins were isolated by affinity purification with a GST-RPS19 recombinant protein and identified using LCMS/MS analysis coupled to bioinformatics tools. We identified 159 proteins from the following Gene Ontology categories: NTPases (ATPases and GTPases; five proteins), hydrolases/helicases (19 proteins), isomerases (two proteins), kinases (three proteins), splicing factors (five proteins), structural constituents of ribosome (29 proteins), transcription factors (11 proteins), transferases (five proteins), transporters (nine proteins), DNA/RNA-binding protein species (53 proteins), other (one dehydrogenase protein, one ligase protein, one peptidase protein, one receptor protein, and one translation elongation factor), and 13 proteins of still unknown function. Proteomics results were validated by affinity purification and Western blot-

ting. These interactions were further confirmed by co-immunoprecipitation using a monoclonal RPS19 antibody. Many interactors are nucleolar proteins and thus are expected to take part in the RPS19 interactome; however, some proteins suggest additional functional roles for RPS19. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:382-393, 2007.

RPS19<sup>1</sup> is a structural component of the ribosomal 40 S subunit. It was considered to have only a structural role until its loss-of-function mutations were identified in patients with a rare hematological disease, Diamond-Blackfan anemia (DBA) (OMIM 105650) (1-3). DBA is characterized by defective erythroid progenitor maturation and is the first human disease due to mutations in a structural ribosomal protein. Dysregulation of RPS19 has thus been surmised as the cause of this defective erythropoiesis, although the link between them is still unclear. The finding that most RPS19 mutations suppress the expression of the allele has suggested that haploinsufficiency is the main cause of the defect (4, 5). However, some patients carry missense mutations in the RPS19 gene. Deficient nucleolar localization may lead to abnormal ribosome incorporation and has been found for four missense mutants (6, 7)<sup>2</sup>; this means that the disease mechanism may not be univocal.

RPS19 expression is increased during the intense proliferation at the start of erythropoiesis compared with the maturation of precursors at its close (8). Enhanced erythroid burst-forming unit formation after overexpression of a wild type transgene in CD34+ bone marrow cells from DBA patients (9) and depressed *in vitro* erythropoiesis when RPS19 is knocked down (10) are other illustrations of its role.

Like other ribosomal proteins (RPs), RPS19 translocates from the cytoplasm to the nucleus where it participates in ribosome biogenesis. In yeast its absence is associated with

From the <sup>§</sup>Centro di Ingegneria Genetica (CEINGE) Advanced Biotechnologies e.s.c.r.l., 80131 Napoli, Italy, <sup>¶</sup>Faculty of Movement Sciences, Università di Napoli "Parthenope" and Fondazione SDN Napoli (Istituto di Ricerca Diagnostica e Nucleare), 80133 Napoli, Italy, <sup>‡</sup>Department of Biochemistry and Medical Biotechnologies, Università di Napoli "Federico II," 80131 Napoli, Italy, <sup>\*\*</sup>Department of Biology, Università "Tor Vergata," 00133 Roma, Italy, and <sup>¶¶</sup>Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Medical Sciences, Università del Piemonte Orientale, 28100 Novara, Italy

Received, April 27, 2006, and in revised form, September 12, 2006  
 Published, MCP Papers in Press, December 6, 2006, DOI 10.1074/mcp.M600156-MCP200

<sup>1</sup> The abbreviations used are: RPS19, ribosomal protein S19; RP, ribosomal protein; GATA1, globin transcription factor 1; DBA, Diamond-Blackfan anemia; HPRD, Human Protein Reference Database; FGF, fibroblast growth factor; PCV, packed cell volume; NCL, nucleolin;  $\mu$ LC, microcapillary LC; NCBI, National Center for Biotechnology Information; IGF2BP1, insulin-like growth factor 2-binding protein 1; MCM, minichromosome maintenance-deficient protein; RNP, ribonucleoprotein; OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.

<sup>2</sup> F. Loreni, manuscript in preparation.

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

abnormal rRNA cleavage and defective 40 S biogenesis (11, 12). It has recently been suggested that defective erythropoiesis in DBA is due to the faulty protein synthesis particularly evident in progenitors whose RPS19 levels are lower than in other tissues (13, 14).

We have used a yeast two-hybrid system to show that RPS19 binds PIM1, a ubiquitous serine-threonine kinase whose expression can be induced in erythropoietic cells by several growth factors, such as erythropoietin (15). We also showed that in human 293T cells PIM1 interacts with ribosomes and may be involved in translational control (15). A role in translational control of specific transcripts has been shown for other ribosomal proteins (*i.e.* RPL13 and RPL26) (16, 17).

It thus appears that RPS19, in addition to its structural role in the ribosome, is involved in ribosome biogenesis, specifically in rRNA processing and possibly in translation. These functions are probably assisted by interaction with different protein substrates.

In the study now reported, we used functional proteomics procedures to look for proteins interacting with RPS19 (18) and thus secure additional information regarding its function and regulation. We identified 159 RPS19-associated proteins. These included many ribosomal proteins and proteins with a known role in ribosome biogenesis. Furthermore the identification of proteins with other functions, such as translational control and splicing, indicates that RPS19 may also be involved in RNA processing/metabolism and translational control.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture and Whole Cell Extract**—Human erythroleukemia K562 cells (ATCC number CCL-243) were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 units/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

To prepare whole cell extract, 10<sup>8</sup> K562 cells were harvested and resuspended in 4 packed cell volumes (PCVs) of ice-cold buffer H (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 20 μg/ml leupeptin, 8 μg/ml pepstatin A, 0.2 units/ml aprotinin, 2 mM PMSF, 5 mM DTT, 2 mM sodium metabisulfite). Cells were disrupted with 4 PCVs of a solution containing 50% glycerol and 25% sucrose and 1 PCV of saturated ammonium sulfate. Cell debris were removed by centrifugation at 35,000 rpm for at least 3 h, and proteins were precipitated with 0.33 g/ml ammonium sulfate. The protein pellet was resuspended in 1 ml of TM 0.0 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) and stored at -20 °C.

**Expression and Purification of Fusion Proteins**—The human RPS19 cDNA was amplified by RT-PCR (15) and cloned into pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) to generate plasmid pGEX-RPS19. As a further control we used a pGST-NTGATA1 construct that encodes for a GST fusion protein with the N-terminal domain of the human GATA1 transcription factor (19).

GST, GST-RPS19, and GST-GATA fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* cells, strain BL21, by induction with 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside for 1 h at 37 °C. Bacteria were resuspended in PBS containing 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin, and 1 μg/ml pepstatin. Bacterial extracts were sonicated and centrifuged to remove cell debris. GST proteins were purified by affinity binding to GSTBind™ resin (Novagen, Madison, WI). Protein samples were separated by

SDS-PAGE and compared with known concentrations of bovine serum albumin after Coomassie Brilliant Blue staining.

**Affinity Purification**—Whole cell extract was preincubated with GST resin (300 μg of recombinant protein) for 1 h at 4 °C. Unbound proteins were then incubated with the same quantity and volume of GST-RPS19 resin overnight at 4 °C on a rocker. The resin was extensively washed with TM 0.1 buffer (0.1 M KCl in TM 0.0 buffer), and bound proteins were eluted with TM 0.5 buffer (0.5 M KCl in TM 0.0 buffer) and precipitated with 20% trichloroacetic acid. The pellets were washed twice with acetone, dried, and used for mass spectrometry. This experiment was repeated six times to provide enough samples.

**Monoclonal Antibody against RPS19**—Immunization and screening for putative monoclonal antibodies have been carried out according to Cianfriglia *et al.* (20). Briefly BALB/c mice (age, 12 weeks) were repeatedly intraperitoneally injected (five times) with 30 μg of purified GST-human RPS19 (the first injection was diluted with Freund's complete adjuvant; the second injection, after 10 days, was diluted with Freund's incomplete adjuvant; the other boosters, every 4 days, were with saline solution). Hybrid cells were obtained by fusion of myeloma cells (SP2/0-AG-14) with polyethylene glycol (Sigma) and were screened by ELISA with recombinant GST-RPS19. Positive clones were expanded, and the supernatant was analyzed by Western blotting. Highly positive hybridomas were cloned by limiting dilution, and the stable line C3 was selected for the production of antibody specific for RPS19. The heavy chain isotype of C3 monoclonal antibody is IgG1 with κ light chains as determined by a mouse hybridoma subtyping kit (Roche Applied Science).

**Validation by Western Blot and Co-immunoprecipitation**—To validate the MS/MS results, new preparations of GST-RPS19 pull-downs were subjected to Western blot analysis. Antibodies specific for PIM1 (Upstate, Charlottesville, VA), insulin-like growth factor 2-binding protein 1 (IGF2BP1) (IMP1), minichromosome maintenance-deficient protein 6 (MCM6), DDX5, and nucleolin (NCL) (C23) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used according to the manufacturer's instructions. Monoclonal anti-STAU1 antibody was a gift from Dr. Luc DesGroselliers (21) (University of Montreal, Montreal, Canada) and used at a dilution of 1:1000. The polyclonal antibody against DKC1 was a gift from Philip Mason (Washington University, St. Louis, MO) (22) and used at a dilution of 1:5000. All immunoblot detections were carried out using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences) with the exception of the nucleolin blots where an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody was used (Sigma).

For co-immunoprecipitation analyses, 0.5% Triton X-100 was added to K562 whole cell extracts, prepared as described above. Extracts were cleared by incubation with protein G-agarose (Sigma) on a rocker for 1 h at 4 °C.

The supernatant was incubated with an anti-RPS19 monoclonal antibody (hybridoma supernatant) and with protein G-agarose on a rocker at 4 °C for 16 h. As a negative control, we used an anti-hemagglutinin monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology).

Immunocomplexes were pelleted by centrifugation, extensively washed with Washing Buffer (TM 0.1 + 0.5% Triton X-100), resuspended in SDS-PAGE Sample Buffer (750 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 40% glycerol, 10% β-mercaptoethanol), and subjected to Western blot analysis using antibodies specific for PIM1, IGF2BP1, MCM6, DDX5, STAU1, DKC1, and NCL.

**SDS-PAGE, In-gel Digestion, Peptide Mapping, and Mass Spectrometry**—The six pellets obtained by affinity purification were resuspended in SDS-PAGE sample buffer and pooled for one-dimensional electrophoresis. The total volume for each sample (GST and GST-RPS19) was 50 μl. The two protein mixtures were fractionated by 8–18% SDS-PAGE. Molecular masses of protein bands were esti-



### Analysis of RPS19-interacting Proteins

mated by using Precision Plus All Blue protein standards (Bio-Rad). Protein electrophoretic patterns were then visualized using GelCode Blue Stain Reagent (Pierce).

The GST-RPS19 and GST gel lanes were cut to create 65 2-mm slices per lane. Each slice was crushed and washed first with acetonitrile and then with 0.1 M ammonium bicarbonate. Protein samples were reduced by incubation in 10 mM dithiothreitol for 45 min at 56 °C and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 0.1 M ammonium bicarbonate for 30 min at room temperature in the dark as described previously (23). The gel particles were then washed with 0.1 M ammonium bicarbonate and acetonitrile. Enzymatic digestions were carried out with modified trypsin (Sigma) (10 ng/ $\mu$ l) in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5, at 4 °C for 45 min. The enzymatic solution was then removed. A new aliquot of the buffer solution was added to the gel particles and incubated at 37 °C for 18 h. A minimum reaction volume sufficient for complete rehydration of the gel was used. Peptides were extracted by washing the gel particles in acetonitrile at 37 °C for 15 min and lyophilized.

The peptide extract volumes were divided in two to inject the peptide mixtures two times. The analysis were performed by  $\mu$ LCMS/MS with a Q-TOF hybrid mass spectrometer (Waters, Milford, MA) equipped with a Z-spray source and coupled on line with a capLC chromatography system (Waters) or alternatively by using the LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a 1100 HPLC system and a chip cube (Agilent Technologies). After loading, the peptide mixture (7  $\mu$ l in 0.5% TFA) was first concentrated and washed (i) at 1  $\mu$ l/min onto a  $C_{18}$  reverse-phase precolumn (Waters) or (ii) at 4  $\mu$ l/min in a 40-nl enrichment column (Agilent Technologies chip) with 0.1% formic acid as the eluent. The sample was then fractionated on a  $C_{18}$  reverse-phase capillary column (75  $\mu$ m  $\times$  20 cm in the Waters system, 75  $\mu$ m  $\times$  43 mm in the Agilent Technologies chip) at a flow rate of 200 nl/min with a linear gradient of eluent B (0.1% formic acid in acetonitrile) in A (0.1% formic acid) from 5 to 80% in 50 min. Elution was monitored on the mass spectrometers without any splitting device. Peptide analysis was performed using data-dependent acquisition of one MS scan (mass range from 400 to 2000  $m/z$ ) followed by MS/MS scans of the three most abundant ions in each MS scan. Dynamic exclusion was used to acquire a more complete survey of the peptides by automatic recognition and temporary exclusion (2 min) of ions from which definitive mass spectral data had been acquired previously. Moreover a permanent exclusion list of the most frequent peptide contaminants (keratins and trypsin doubly and triply charged peptides: 403.20, 517.00, 519.32, 525.00, 532.90, 559.32, 577.30, 587.86, 616.85, 618.23, 721.75, 745.90, 747.32, 756.43, 854.30, 858.43, 896.30, and 1082.06) was included in the acquisition method to focus the analyses on significant data.

**Data Analysis**—Raw data from  $\mu$ LCMS/MS analyses were converted into a Mascot format text to identify proteins by means of the Matrix Science software (24). The protein search was governed by the following parameters: non-redundant protein sequence database (NCBI nr, January 24, 2006 download, 3,229,765 sequences), specificity of the proteolytic enzyme used for the hydrolysis (trypsin), taxonomic category of the sample (*Homo sapiens*), no protein molecular weight was considered, up to one missed cleavage, cysteines as S-carbamidomethylcysteines, unmodified N- and C-terminal ends, methionines both unmodified and oxidized, putative pyro-Glu formation by Gln, precursor peptide maximum mass tolerance of 150 ppm, and a maximum fragment mass tolerance of 300 ppm. In the experience of the authors' laboratory all the MS/MS spectra displaying a Mascot score (24) higher than 38 show a good signal/noise ratio leading to an unambiguous interpretation of the data. Individual MS/MS spectra for peptides with a Mascot score (24) equal to 38 were inspected manually and only included in the statistics if a series

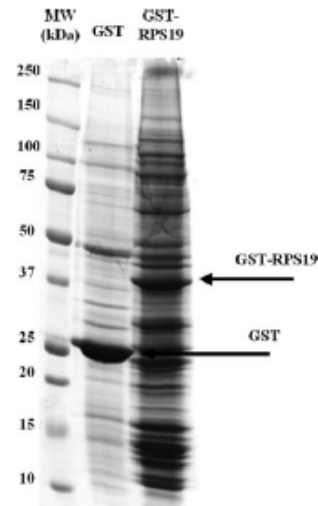


Fig. 1. GST-RPS19 affinity purification. Proteins from K562 whole cell extract were affinity-purified using GST or GST-RPS19 resins. Bound proteins were eluted, resolved on an 8–18% SDS-polyacrylamide gel, and stained with colloidal Coomassie.

of at least four continuous y or b ions were observed.

**In Silico Analysis**—A list of primary (direct) and secondary (indirect) protein-protein interactions of RPS19 was created using the web-available Human Protein Reference Database ([www.hprd.org](http://www.hprd.org)). In April 2006, the database contained 20,097 human protein entries, 33,710 documented protein-protein interactions, and 171,677 links to the PubMed literature. Primary interactions of RPS19 were screened for protein interactors to define an *in silico* interaction map with the indirect protein partners. This map was then compared with the RPS19 protein partners identified in this study. In addition a list of primary interactions was created by HPRD for each identified protein.

Lastly the list of RPS19 protein partners was compared with the Nucleolar Proteome Database ([www.lamondlab.com/NoPDB](http://www.lamondlab.com/NoPDB)) (25) and with the Pre-Ribosomal Network yeast database ([www.pre-ribosome.de/Home.html](http://www.pre-ribosome.de/Home.html)) (26). Ortholog *Saccharomyces cerevisiae* gene names were determined using the web-available database Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

### RESULTS

**Identification of RPS19-interacting Proteins**—To determine the RPS19 interactome in K562 cells, we performed LCMS/MS analysis of proteins purified by pulldown experiments on a GST-RPS19 affinity resin. The proteins eluted from the GST-RPS19 or the negative control GST resins were fractionated by 13-cm 8–18% SDS-PAGE and revealed by colloidal Coomassie stain (Fig. 1). SDS-PAGE indicated that the RPS19-associated proteins span a broad molecular weight range. The two major bands at 26 kDa (Fig. 1, lane GST) and at 43 kDa (Fig. 1, lane GST-RPS19) correspond to the bait proteins as verified by Western blotting with anti-GST antisera (data not shown). To check the efficiency of the

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

pulldown experiments, aliquots of the proteins eluted from the GST or the GST-RPS19 resins were analyzed by Western blotting using an anti-PIM1 antibody. PIM1 (i.e. the positive control) was identified in the GST-RPS19 lanes only (see Fig. 4).

The procedure described under "Experimental Procedures" gave 65 peptide mixture samples from each lane. The peptide extract volumes were divided in two to analyze peptide mixtures two times by  $\mu$ LCMS/MS. These duplicates showed a high level of reproducibility where in all cases identifications from the first analysis were confirmed from the second one. Peptide mixtures deriving from the GST lane constituted our control for the analysis of GST-RPS19 lane and were therefore always injected before the peptides from the GST-RPS19 lane. Mass spectrometry data were then analyzed with the Mascot software on the NCBI human protein sequence database. To select proteins that interact specifically with RPS19, we subtracted species common to the GST and GST-RPS19 lanes (Fig. 1). These proteins are shown in Supplemental Table 1.

Table I displays the complete list of RPS19 protein interactors identified in this study. Proteins are grouped according to their known function, and for each identification the human gene name, the corresponding protein name, and the ortholog *S. cerevisiae* gene name is reported. Supplemental Table 2 reports for each protein entry the identified peptides together with their sequences, the observed mass errors on the precursor peptides, the Mascot score for each peptide, and the protein sequence coverage expressed as the number of amino acids spanned by the identified peptides divided by the sequence length. All protein species identified by a single peptide were further checked. First the peptide sequence stretch, manually verified, was searched on the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) software at the NCBI web site ([ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast)) against human taxonomy. When other matches were possible, the candidate was removed from the list. The remaining single peptide protein species were added to the list only when involved in protein complexes known to interact with mRNA/rRNA or reported to interact with one of the proteins identified in this study (27–32). Fig. 2 (A–D) shows the MS full scan, the MS/MS scan, and the amino acid sequence relative to four identified RPS19-associated proteins: IGF2BP1 (Fig. 2A), MCM6 (Fig. 2B), DDX5 (Fig. 2C), and STAU1 (Fig. 2D). STAU1 is an example of protein species identified by a single peptide. Supplemental Fig. S3 shows additional examples like CCT2 (A), DDX17 (B), and NOLA3 (C).

The 159 human proteins identified in this study were divided into Gene Ontology functional groups as shown in Fig. 3A: NTPases (ATPases and GTPases, five proteins), hydrolases/helicases (19 proteins), isomerases (two proteins), kinases (three proteins), splicing factors (five proteins), structural constituents of ribosome (29 proteins), transcription factors (11 proteins), transferases (five proteins), transporters (nine proteins), DNA/RNA-binding protein species (53 pro-

teins), other (one dehydrogenase protein, one ligase protein, one peptidase protein, one receptor protein, and one elongation factor), and 13 proteins of still unknown function. They were also grouped according to their Gene Ontology cellular localization (Fig. 3B) and the biological processes in which they are involved (Fig. 3C). Moreover according to the Human Nucleolar Database, 101 are nucleolar proteins (Supplemental Table 3); many of these are part of the 90 S preribosome as assessed by comparison with the yeast Pre-Ribosomal Network (Supplemental Table 4).

Among the interactors we identified RPS8, a ribosomal protein found in a previous yeast two-hybrid study.<sup>9</sup> In the same study we also revealed PIM1 (15), which was not detected in the proteomics analysis despite its presence in the eluate from GST-RPS19 resin (Fig. 4) and in the immunoprecipitate obtained with the anti-RPS19 monoclonal antibody (Fig. 5). The difference is presumably ascribable to the sensitivity limitations of proteomics analysis compared with antibody-based assays.

**Validation of MS/MS Data by Western Blotting and Immunoprecipitation**—To corroborate the authenticity of the proteins identified by MS/MS, we confirmed the presence of representative proteins in the eluates from GST-RPS19 resins by immunoblotting: the serine-threonine kinase PIM1, IGF2BP1, MCM6, the DEAD box polypeptide 5 (DDX5), Staufen (STAU1), dyskerin (DKC1), and NCL (Fig. 4).

Affinity purification was also performed using as negative controls a GST-GATA1 protein and different amounts of the GST protein. The bound proteins were eluted from the resins and analyzed by Western blot using specific antibodies for three selected interactors (DDX5, DKC1, and NCL). All these negative controls confirmed the specificity of the interaction between RPS19 and the proteins analyzed (Supplemental Fig. S1).

In addition, we performed immunoprecipitations using K562 lysates and a monoclonal antibody to RPS19 to show that the same interactions occur in living cells. Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with specific antibodies (Fig. 5 and Supplemental Fig. S2). In Fig. 5 we omitted the results regarding the positive co-precipitation of STAU1 because the close co-migration of the immunoglobulin heavy chains affects the quality of the data (as shown in Supplemental Fig. 2A). Supplemental Fig. S2, A, B, and C, shows the whole image of the co-immunoprecipitation assay.

**In Silico Analysis of RPS19-interacting Proteins and Comparison with In Vitro Strategies**

We carried out an *in silico* proteomics analysis of proteins known to directly or indirectly interact with RPS19. Examination of the publicly available databases HPRD and PubMed showed that four proteins interact with RPS19 directly and

<sup>9</sup> A. Aspesi, M. Ammiraglio, M. C. Santoro, and I. Dianzani, unpublished data.

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

TABLE I  
 Identification of RPS19-interacting proteins by tandem mass spectrometry  
 dsRNA, double-stranded RNA; GPI, glycosylphosphatidylinositol; snRNP, small nucleolar RNP; HLA, human leukocyte antigen.

Gene (Ref.)	Protein	Yeast gene
<b>NTPase activity</b>		
<i>GTPBP4</i> (28, 29, 47)	GTP-binding protein NGB (G protein binding CRFG)	<i>NOG1</i>
<i>PSMC5</i>	Proteasome 26 S ATPase subunit 5	<i>RPT6</i>
<i>PSMC6</i>	Proteasome 26 S ATPase subunit 6	<i>RPT4</i>
<i>RAB11B</i>	RAB11B member RAS oncogene family	<i>YPT31</i>
<i>XAB1</i>	XPA-binding protein 1, GTPase	<i>NPA3</i>
<b>Hydrolase/helicase activity</b>		
<i>DDX5</i> (28-30, 47)	Growth-regulated nuclear 68 protein (DEAD box polypeptide 5)	<i>DBP2</i>
<i>DDX17</i> (28, 30)	DDX17 protein	
<i>DDX18</i> (28, 29, 47)	RNA helicase (DEAD box polypeptide 18)	<i>HAS1</i>
<i>DDX21</i> (28, 29, 47)	RNA helicase II/Gu protein (DEAD box polypeptide 21)	
<i>DDX24</i> (29, 47)	DEAD box polypeptide 24	<i>MAK5</i>
<i>DDX3X</i> (28)	DEAD box, X isoform (DEAD box polypeptide 3)	
<i>DDX41</i>	DEAD box protein abstract	
<i>DDX50</i> (28, 29)	DEAD box polypeptide 50 (nucleolar protein GU2)	
<i>DDX54</i> (28, 29)	ATP-dependent RNA helicase (DEAD box polypeptide 54)	<i>DBP10</i>
<i>DHX9</i> (28, 29, 31)	RNA helicase A (DEAH box polypeptide 9)	
<i>DHX15</i> (28, 29, 47)	DEAH box polypeptide 15	<i>FRP43</i>
<i>DHX36</i>	DEAH box polypeptide 36	
<i>MCM2</i>	MCM2 minichromosome maintenance-deficient 2, mitotin ( <i>S. cerevisiae</i> )	<i>MCM2</i>
<i>MCM6</i>	p105MCM (MCM6 minichromosome maintenance-deficient 6)	<i>MCM6</i>
<i>MCM7</i>	p85MCM protein (MCM7 minichromosome maintenance-deficient 7)	<i>CDC47</i>
<i>RUVBL2</i> (25)	RuvB-like 2	<i>RVB2</i>
<i>SKI1V2L2</i> (28, 29)	Superkiller viralicidic activity 2-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )	<i>MTR4</i>
<i>SMARCA5</i>	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	<i>ISW2</i>
<i>XRN2</i> (29)	Dhm1-like protein (5'-3' exoribonuclease 2)	<i>RAT1</i>
<b>Isomerase activity</b>		
<i>DKC1</i> (28, 29)	Cbf5p homolog (dyskerin)	<i>CBF5</i>
<i>PPIH</i>	Peptidyl-prolyl isomerase H	
<b>Kinase activity</b>		
<i>CSNK2A1</i> (25, 29)	Casein kinase 2, $\alpha$ 1 polypeptide	
<i>SRP72</i>	Signal recognition particle 72	<i>SRP72</i>
<i>PRKCO</i>	$\Delta^2$ -Isopentenylpyrophosphate transferase-like protein (protein kinase C, $\theta$ )	
<b>Splicing factor activity</b>		
<i>SF3B1</i>	Splicing factor 3b, subunit 1, 155 kDa	<i>HSH155</i>
<i>SF3B2</i>	Splicing factor 3b, subunit 2, 145 kDa	<i>CUS1</i>
<i>SF3B3</i>	Splicing factor 3b, subunit 3, 130 kDa	<i>RSE1</i>
<i>SFRS9</i> (28)	Splicing factor Arg/Ser-rich 9	
<i>SFRS10</i>	Splicing factor Arg/Ser-rich 10	
<b>Structural constituent of ribosome</b>		
<i>RPL10A</i> (25, 28, 29)	60 S ribosomal protein L10a	<i>RPL1B</i>
<i>RPL14</i> (28, 29, 32)	60 S ribosomal protein L14	<i>RPL4B</i>
<i>RPL24</i>	60 S ribosomal protein L24	<i>RPL24A</i>
<i>RPL27A</i> (25, 28, 29)	60 S ribosomal protein L27a	<i>RPL2B</i>
<i>RPL3</i> (25, 28, 29)	60 S ribosomal protein L3	<i>RPL3</i>
<i>RPL4</i> (25, 28, 29)	60 S ribosomal protein L4	<i>RPL4B</i>
<i>RPL6</i> (25, 28, 29, 31, 32)	60 S ribosomal protein L6	<i>RPL6B</i>
<i>RPL7</i> (25, 28, 29)	60 S ribosomal protein L7	
<i>RPL7A</i> (25, 28, 29, 32)	60 S ribosomal protein L7a	<i>RPL8B</i>
<i>RPL8</i> (25, 28)	60 S ribosomal protein L8	<i>RPL2A</i>
<i>RPL9</i> (25, 28, 29)	60 S ribosomal protein L9	<i>RPL9B</i>
<i>RPLP0</i> (28, 29, 31, 32)	60 S ribosomal protein P0	<i>RPP0</i>
<i>RPLP1</i>	60 S acidic ribosomal protein P1 isoform 1	<i>RPP1A</i>
<i>RPLP2</i> (25)	60 S acidic ribosomal protein P2	<i>RPP2B</i>
<i>RPS10</i> (25)	40 S ribosomal protein S10	<i>RPS10A</i>
<i>RPS14</i> (25, 29)	40 S ribosomal protein S14	<i>RPS14B</i>
<i>RPS16</i> (25, 28)	40 S ribosomal protein S16	<i>RPS16A</i>
<i>RPS2</i> (25, 32)	40 S ribosomal protein S2	<i>RPS2</i>



## Analysis of RPS19-interacting Proteins

TABLE I— continued

Gene (Ref.)	Protein	Yeast gene
<i>RPS23</i> (25)	40 S ribosomal protein S23	<i>RPS23A</i>
<i>RPS24</i> (25)	40 S ribosomal protein S24	<i>RPS24B</i>
<i>RPS26</i> (26)	40 S ribosomal protein S26	<i>RPS26B</i>
<i>RPS3</i>	40 S ribosomal protein S3	<i>RPS3</i>
<i>RPS4X</i> (25, 28, 29)	40 S ribosomal protein S4, X-linked	<i>RPS4A</i>
<i>RPS5</i> (25, 26, 29)	40 S ribosomal protein S5	<i>RPS5</i>
<i>RPS6</i> (31, 32)	40 S ribosomal protein S6	<i>RPS6B</i>
<i>RPS7</i> (25)	40 S ribosomal protein S7	<i>RPS7A</i>
<i>RPS8</i> (25, 26, 31, 32)	40 S ribosomal protein S8	<i>RPS8B</i>
<i>RPSA</i> (26)	Ribosomal protein SA	<i>RPS0A</i>
<i>RSL1D1</i> (29)	PBK1 protein	
Transcription factor		
<i>BAZ1B</i> (25)	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	
<i>HNRPD</i> (25, 30)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D2	
<i>ILF2</i> (28–30)	Interleukin enhancer binding factor 2	
<i>ILF3</i> (29, 30, 32)	Nuclear factor associated with dsRNA NFAR-2	
<i>NKRF</i> (29)	Transcription factor NRF	
<i>PURA</i>	Purine-rich element-binding protein A	
<i>TAF15</i> (25)	TLS protein (TBP-associated factor 15)	<i>NPL3</i>
<i>TRIM28</i> (25)	Tripartite motif-containing 28	
<i>UBTF</i> (28)	Upstream binding transcription factor, RNA 4 polymerase I	
<i>XPO5</i>	Exportin 5	<i>MSN5</i>
<i>YBX1</i>	DNA-binding protein B	
Transferase activity		
<i>FDT1</i>	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	<i>ERG9</i>
<i>FTSJ3</i> (29, 47)	FtsJ homolog 3 ( <i>E. coli</i> )	<i>SPB1</i>
<i>NAT10</i> (29)	<i>N</i> -Acetyltransferase 10 (FLJ10774)	
<i>NOL1</i> (28, 29, 47)	Proliferating cell nuclear protein p120 (NOL protein 1)	<i>NOP2</i>
<i>ZC3HAV1</i>	Zinc finger CCCH type, antiviral 1	
Transporter activity		
<i>COPA</i>	Coatomer protein complex, subunit $\alpha$	<i>COP1</i>
<i>COPB2</i>	Coatomer protein complex, subunit $\beta$ 2	<i>SEC27</i>
<i>CSE1L</i>	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	<i>CSE1</i>
<i>IPO4</i>	Importin 4	<i>KAP123</i>
<i>IPO7</i>	Importin 7	
<i>NPEPL1</i>	Aminopeptidase-like 1	
<i>STAU1</i>	Staufen protein	
<i>SSR4</i>	Signal sequence receptor $\delta$	
<i>XPO1</i>	Exportin 1 (CRM1 homolog yeast)	<i>CRM1</i>
DNA/RNA/protein binding capacity		
<i>AATF</i> (25, 28, 29)	Ded protein (apoptosis-antagonizing transcription factor)	<i>BFR2</i>
<i>ACTR1B</i>	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, cactactin $\beta$	
<i>C1orf77</i>	DKFZP547E1010 protein	
<i>CCT2</i> (25, 29)	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 ( $\beta$ )	<i>CCT2</i>
<i>CCT8</i>	Chaperonin containing TCP1, subunit 8 ( $\beta$ )	<i>CCT8</i>
<i>CEBPZ</i> (28, 29, 47)	CCAAT/enhancer-binding protein $\zeta$	<i>MAK21</i>
<i>CENPC1</i>	Centromere protein C 1	
<i>COPG</i>	Coatomer protein complex, subunit $\gamma$ 1	<i>SEC21</i>
<i>DHX30</i>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box	
<i>DNAJC9</i>	DnaJ homolog, subfamily C, member 9	
<i>FBL</i> (28, 29, 47)	Fibrillarin, U3 small nucleolar interacting protein 1	<i>NOP1</i>
<i>FUSIP1</i> (29)	FUS-interacting protein (serine/arginine-rich) 1	
<i>GNB2L1</i> (25)	Guanine nucleotide-binding protein (G protein), $\beta$ polypeptide 2-like 1	
<i>HIST1H1C</i> (25)	Histone H1b	
<i>HIST1H1D</i> (25)	Histone H1 member 3	
<i>HIST1H2AK</i> (25)	H2A histone family	
<i>HIST1H2BL</i> (25, 29)	H2B histone family, member C	
<i>HIST1H2BO</i> (25)	Histone 1, H2bo	
<i>HIST2H4</i> (28)	Histone 2 H4	
<i>HNRPA2B1</i> (25, 28–30)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	
<i>HNRPA3</i> (30)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

TABLE I—continued

Gene (Ref.)	Protein	Yeast gene
<i>HNRPC</i> (25, 28, 30)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	
<i>HNRPD</i> (25)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (A + U-rich element RNA binding factor)	
<i>HNRPF</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	
<i>HNRPR</i> (25)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	
<i>HNRPU</i> (25, 30–32)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	
<i>HNRPUL2</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	
<i>HP1BP3</i>	HP1-BP74	
<i>IGF2BP1</i>	IGF-II mRNA-binding protein 1	
<i>IGF2BP3</i>	Koc1 (IGF-II mRNA-binding protein 3)	
<i>IMP3</i> (28)	U3 snoRNP protein 3 homolog	<i>IMP3</i>
<i>ITGB4BP</i> (25, 28, 29)	Integrin $\beta$ 4-binding protein	<i>TIF6</i>
<i>LYAR</i> (28, 29)	Hypothetical protein FLJ20425	<i>YCR087C-A</i>
<i>NCL</i> (28, 29, 31, 32)	Nucleolin	<i>NSR1</i>
<i>NIP7</i> (29)	60 S ribosome subunit biogenesis protein Nip7 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	<i>NIP7</i>
<i>NOLA1</i> (25, 28)	Nucleolar protein family A member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)	<i>GAR1</i>
<i>NOL5A</i> (25, 28, 29, 47)	hNop56	<i>SIK1</i>
<i>PABPC3</i> (30)	Poly(A)-binding protein	
<i>PAK1IP1</i> (25, 29)	PAK/PLC-interacting protein 1	<i>MAK11</i>
<i>PNN</i>	Pinin, desmosome-associated protein	
<i>PPP2R1A</i>	PPP2R1A (Ser/Thr protein phosphatase 2A)	
<i>RAB1B</i>	RAB1B member RAS oncogene family	
<i>RAP1B</i>	RAP1B member RAS oncogene family	<i>RSR1</i>
<i>RBM19</i> (28, 29)	RNA binding motif 19	<i>MRD1</i>
<i>RBMX</i> (28)	RNA binding motif protein, X-linked (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G)	
<i>RNPC2</i>	RNA-binding region-containing protein 2	
<i>SART3</i>	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3	
<i>SNRPA1</i> (25, 26)	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' (U2 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A')	
<i>SNRPG</i> (25)	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	<i>SMX2</i>
<i>SNRPN</i>	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	
<i>SRP68</i>	Signal recognition particle 68	<i>SRP68</i>
<i>SURF6</i> (25, 26)	Surfeit protein 6	<i>RRP14</i>
<i>SYNCRIP</i> (30)	NS1-associated protein	
Other function		
Dehydrogenase activity		
<i>DPYD</i>	Dehydropyrimidine dehydrogenase	<i>GLT1</i>
Ligase activity		
<i>MARS</i>	Methionine-tRNA synthetase	<i>MES1</i>
Peptidase activity		
<i>SEC11L1</i>	Signal peptidase complex 16 kDa	<i>SEC11</i>
Receptor activity		
<i>REEF6</i>	Receptor accessory protein 6	
Translation elongation factor activity		
<i>EEF1B2</i>	Eukaryotic translation elongation factor 1 $\beta$ 2	
Unknown function		
<i>EBNA1BP2</i> (25, 28, 29)	EBNA1-binding protein 2	<i>EBP2</i>
<i>GPIAP1</i>	GPI-anchored protein p137 precursor	
<i>HDCMA18P</i>	Hypothetical protein DKFZp564K112.1 (HDCMA18P)	
<i>LOC389217</i>	Similar to SET protein (phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (template-activating factor I) (TAF-I) (HLA-DR-associated protein II) (PHAPII) (inhibitor of granzyme A-activated DNase) (IGAAD)	
<i>MGC3731</i>	Hypothetical protein LOC79159	
<i>NOC2L</i> (28, 29)	Nucleolar complex-associated 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ; hypothetical protein DKFZp564C186.1)	<i>NOC2</i>
<i>NOC3L</i> (29)	Nucleolar complex-associated 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	<i>NOC3</i>
<i>NOL10</i> (28, 29)	Nucleolar protein 10 (hypothetical protein FLJ14075)	<i>ENP2</i>
<i>NOLA3</i> (25)	Nucleolar protein family A, member 3	<i>NOP10</i>
<i>PES1</i> (25, 28, 29, 47)	Pescadillo homolog 1 containing BRCT domain	<i>NOP7</i>
<i>RBM12B</i>	RNA binding motif protein 12B	
<i>RP13-36C9.1</i>	Cancer/testis antigen CT45–2	
<i>SYNGR2</i>	Synaptogyrin 2	



Analysis of RPS19-interacting Proteins

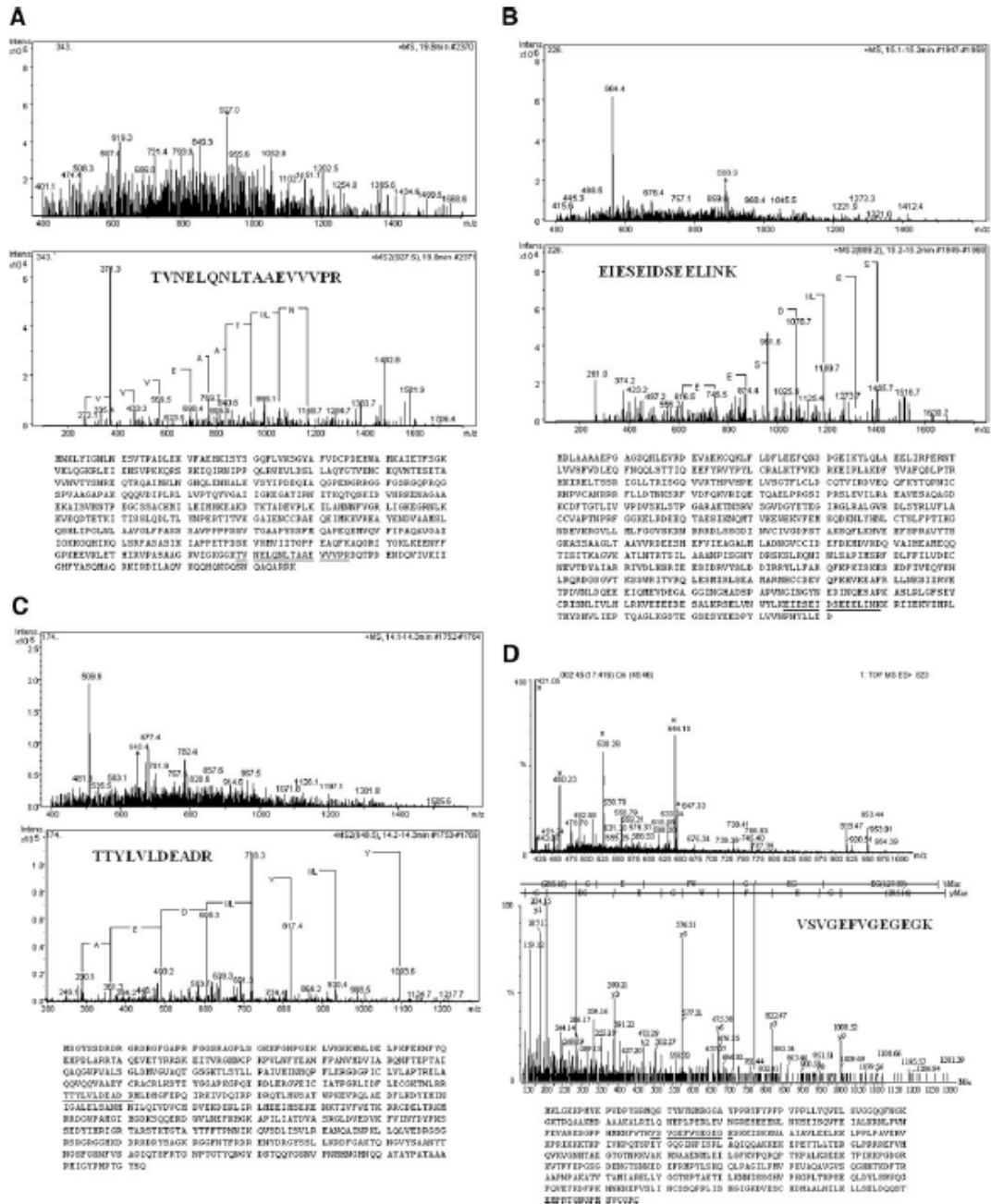


FIG. 2. Protein identification by tandem mass spectrometry. MS full scan, MS/MS scan, and amino acid sequence of IGF2BP1 (A), MCM6 (B), DDX5 (C), and STAU1 (D) are shown. Each MS/MS spectrum shows the predicted peptide sequence and the tryptic identified fragment. In protein sequences identified peptides are underlined. ♦, m/z signal fragmented. In D, □ indicates peaks fragmented in previous scans.

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

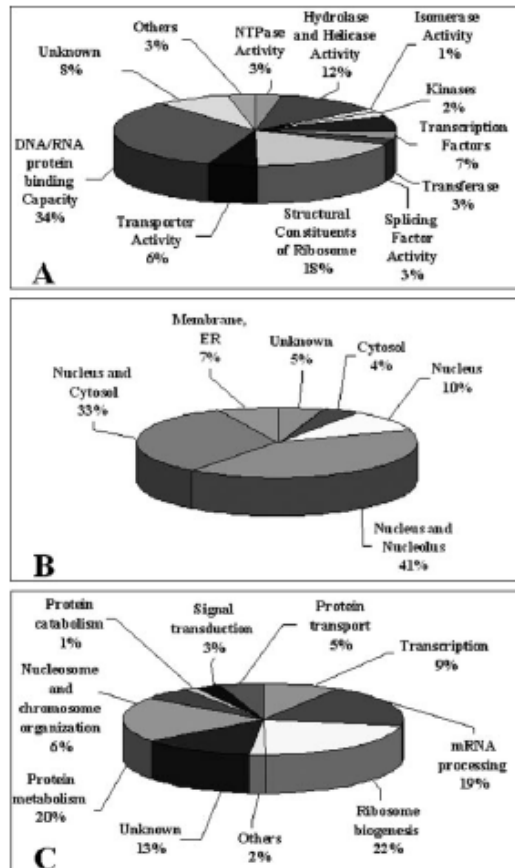


FIG. 3. Classification of the identified proteins according to Gene Ontology molecular function (A), cellular localization (B), and biological processes (C). ER, endoplasmic reticulum.

that 32 interact indirectly (Table II).

The already known primary interactors of RPS19 reported in the *in silico* analysis were not identified in this proteomics study. However, they were identified interacting with RPS19 in very particular conditions. In the case where FGF2 was reported to interact with free RPS19, in fact the GST pull-down experiment was performed with only the cytoplasmic extracts of NIH3T3 or ECV304 cells (33). In the case of complement component 5 receptor, the protein-protein interaction was reported in extracts of a rheumatoid arthritis synovial lesion when a covalent dimer of RPS19 by transglutamination occurs (34). In the case of RPS19-binding protein the specific antibody is not available (35) to perform an antibody-based assay to complement mass spectrometric data.

Our analysis shows that several proteins identified in this

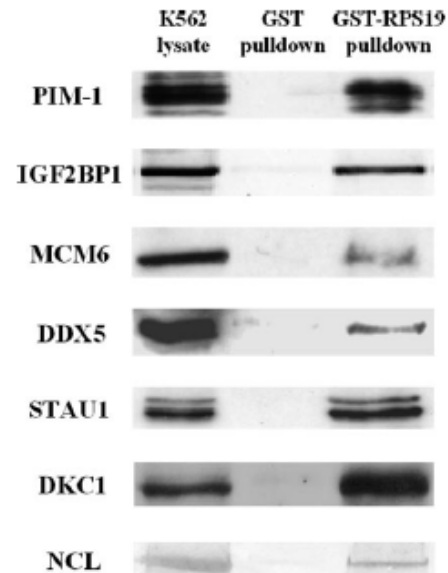


FIG. 4. GST-RPS19 pull-down. Proteins from K562 whole cell extracts were affinity-purified with GST and GST-RPS19 resins. Total lysates (K562 lysate) and bound proteins eluted from the GST control resin (GST) or the GST-RPS19 resin (GST-RPS19) were analyzed by Western blotting with antibodies specific to the indicated proteins. All blots were revealed by the chemiluminescence method except for NCL, which was revealed by alkaline phosphatase.

study interact with each other. DDX5, PES1, DDX21, GTPBP4, NOL5A, and NCL, for example, interact with RPL4, RPL6, RPL7a, RPL10a, RPLP0, and RPS3. Their relationship with RPS19, however, is not illustrated in the HPRD database nor in the literature, and they are therefore new RPS19 partners.

## DISCUSSION

This study represents the first global, high throughput functional proteomics approach to identify the proteins that interact with RPS19. Our analysis of the GST-RPS19 pull-down revealed 159 proteins, most of them not previously known to associate with RPS19. On the other hand, *in silico* analysis and PubMed data show that many proteins interact with each other. They may thus participate with RPS19 in the same multiprotein complex or complexes.

It is known that ribosomal proteins are involved at different stages of ribosome biogenesis and/or in distinct translation steps (36). In particular, they have been thought to play a central role in rRNA processing, protein assembly, RNA folding, transport of the ribosomal precursors, stabilization of the subunit structure, and/or interaction with other factors required for either ribosome biogenesis or translation (37-39). Their involvement in cotranslational processes, such as the interaction with protein folding factors at the exit tunnel of the

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

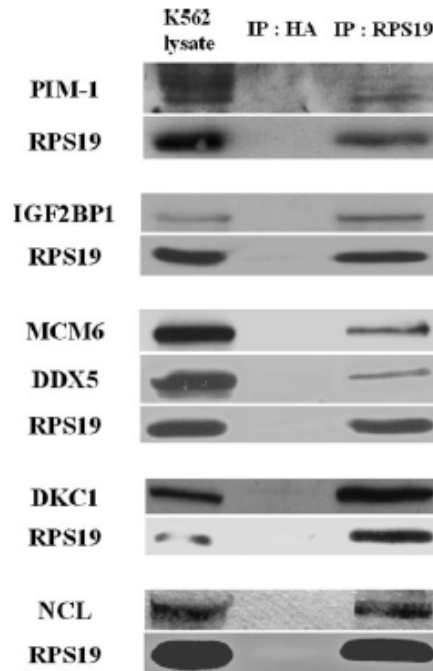


FIG. 5. Co-immunoprecipitation. Proteins from K562 cell lysates were immunoprecipitated with a monoclonal anti-RPS19 or an anti-hemagglutinin antibody as negative control. Immunocomplexes were fractionated by SDS-PAGE, blotted on nitrocellulose, and revealed by the specific antibodies. All blots were revealed by the chemiluminescence method except for NCL, which was revealed by alkaline phosphatase. *IP*, immunoprecipitate; *HA*, hemagglutinin.

ribosome (40, 41), cotranslational translocation (42, 43), and important enzymatic activities for ribosome function, e.g. the mRNA helicase activity of bacterial ribosomes (44), has also been proposed.

Interestingly most proteins reported in this study, such as nucleolar or ribosomal proteins, play a role in processes related to RPS19. It should be stressed that we used a total cell lysate and not a nuclear extract and that the complex formation was extracellular. Nevertheless proteins abundant in cytoplasm were not found. This suggests that the structure of the recombinant RPS19 protein is functionally suitable to recruit multiple cellular partners.

Comparison with the Human Nucleolar Database showed that two-thirds of the RPS19 interactome is composed of nucleolar proteins (Supplemental Table 3). As expected, a large group of interactors includes other structural ribosomal proteins. RPS19 is part of the 40 S ribosomal subunit: we have found 14 proteins that share this location (*i.e.* S2, S3, S4X, S5, S6, S7, S8, S10, S14, S16, S23, S24, S26, and SA). Many proteins belong to the pre-40 S nucleolar complex

TABLE II  
Identification of RPS19-interacting proteins by *in silico* proteomics

Primary
RPS19
Complement component 5 receptor 1
Fibroblast growth factor 2
PIM1
RPS19-binding protein
Secondary
Complement component 5 receptor 1
Complement component 5
RPS19
GNAI2
G protein-coupled receptor 77
Fibroblast growth factor 2
Apoptosis inhibitor 5
Protein-arginine <i>N</i> -methyltransferase 1
FGF receptor 1
RPS19
CD44
Vitronectin
Chemokine, CXC motif, ligand 13
Glypican 4
Transloklin
Casein kinase II, $\alpha$ 1*
RPL6*
FGF receptor 2
FGF receptor 4
Syndecan 3
FGF-binding protein 1
Perlecan
Platelet factor 4
Glypican 3
Casein kinase 2, $\alpha$ 2
PIM1
NFATC1
Sorting nexin 6
p100
EBNA2 coactivator p100
HP1 $\beta$
Nuclear mitotic apparatus protein 1
HP1 $\gamma$
Dynactin 1
Dynein
CDC 25A
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
Protein tyrosine phosphatase U2
HSP90A
SNX6

\* Proteins identified in this study.

(Supplemental Table 4). We have also found 11 proteins belonging to the 60 S subunit (L3, L4, L6, L7, L7a, L8, L9, L10a, L14, L24, and L27a).

The identification of RPs belonging to the small and the large subunits suggests that we have purified components of the preribosome (90 S), the structure formed before processing of the pre-rRNA. The subsequent cut at a specific site (A2) divides these subunits. The preribosome is a highly dynamic structure that comprises more than 150 non-ribosomal proteins with various activities, including nucleases, RNA helicases, GTPases, AAA ATPases, kinases, etc. (for reviews, see Refs. 45 and 46). We have, indeed, found 23 of 31 proteins with orthologs in the yeast preribosome network that belong to the 90 S subunit. Many interactors are shared between



## Analysis of RPS19-interacting Proteins

RPS19 and parvulin, a peptidyl-prolyl isomerase involved in early ribosome biogenesis (*i.e.* L3, L4, L6, L7, L7a, L8, L10a, L14, S3, S4X, S6, S8, and DDX16) (47).

The interaction with most of the RPs essential for the transport of the small subunit from the nucleus to the cytoplasm (*i.e.* RPS10, RPS26, RPS3, and RPS2) and to the exportin XPO (known to control the 40 S and 60 S export) suggests a role for RPS19 in this process. This is in agreement with two recent reports of its involvement in the early processing of rRNA (11) and possibly in its export from the nucleus (12). Concordantly the greater portion of the RPS19-interacting proteins identified in this study includes proteins involved in pre-rRNA processing, such as RNA helicases, and major components of the box C-D small nucleolar RNAs (48, 49), such as fibrillarin and Nop56.

We also found major components of the H/ACA box small nucleolar RNP complex, *i.e.* dyskerin, NOLA1, and NOLA3. This complex (that includes a fourth protein, NOLA2) is required for the site-specific pseudouridylation of rRNA involved in the early stages of ribosome biogenesis (50). Both 18 S rRNA production and rRNA pseudouridylation are impaired if any one of the four proteins is depleted.

A further group of interactors includes proteins controlling protein synthesis, such as proteins involved in cotranslational translocation (42, 43) (such as signal recognition particle 66) and translation regulators, such as IGF2BP1 and STAU1. Other ribosomal proteins (*i.e.* RPL13 and RPL26) (16, 17) are known to regulate translation of specific transcripts. It is intriguing that RPS19 could have a similar role. Our previous studies showing interactions of PIM1 and RPS19 on the 40 S subunit suggested such a role (15).

Lastly this study identified proteins with more diverse cellular functions. These included proteins such as integrins, proteasome components, and kinases. Further studies are needed to clarify their involvement in the RPS19 interactome.

The scenario disclosed by our study clearly shows that RPS19 is definitely involved in RNA processing and metabolism and perhaps in translation control. Although it must be stressed that our results do not take the spatial-temporal dimension of RPS19 interactome into account, future experiments will be directed toward the comprehension of this point.

It is intriguing that among the direct or indirect RPS19 interactors we also found proteins involved in pathologies with phenotypes similar to DBA (14). These include the following: 1) DKC1, responsible for dyskeratosis congenita (OMIM 305000), that shares bone marrow failure with DBA; 2) RPL24, whose spontaneous defect in mice produces growth retardation and skeletal malformations (51); 3) TCOF1, responsible for the Treacher-Collins syndrome (OMIM 154500), which shares some malformations with DBA, and that interacts with NOL5A and UBTF; and 5) SBDS (OMIM 260400), responsible for the Schwachman-Diamond syndrome, that interacts with nucleolin. This suggests a link between the

ribosomal diseases, possibly a common pathogenetic mechanism.

In short, we have identified several new protein interactions with RPS19. This should lead to a fuller understanding of its activities and a more complete picture of its cellular roles and/or regulation. A clearer understanding of the function of RPS19 could help to elucidate the pathogenesis of DBA.

**Acknowledgments**—Drs. Luc DeGroesseillers and Philip Mason are thanked for the gifts of the STAU1 and DKC1 antibodies, respectively.

\* This work was supported by Telethon GGP02434 (to I. D.), COFIN grants (to I. D. and M. R.), Compagnia di San Paolo (to C. S.), and the Diamond-Blackfan Anemia Foundation (to I. D.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.mcponline.org>) contains supplemental material.

‡‡ Both authors contributed equally to this work.

§§ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Medical Sciences, Università del Piemonte Orientale, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. Tel.: 39-0321-860-844; Fax: 39-0321-860-421; E-mail: [ima.dianzani@med.unipmn.it](mailto:ima.dianzani@med.unipmn.it).

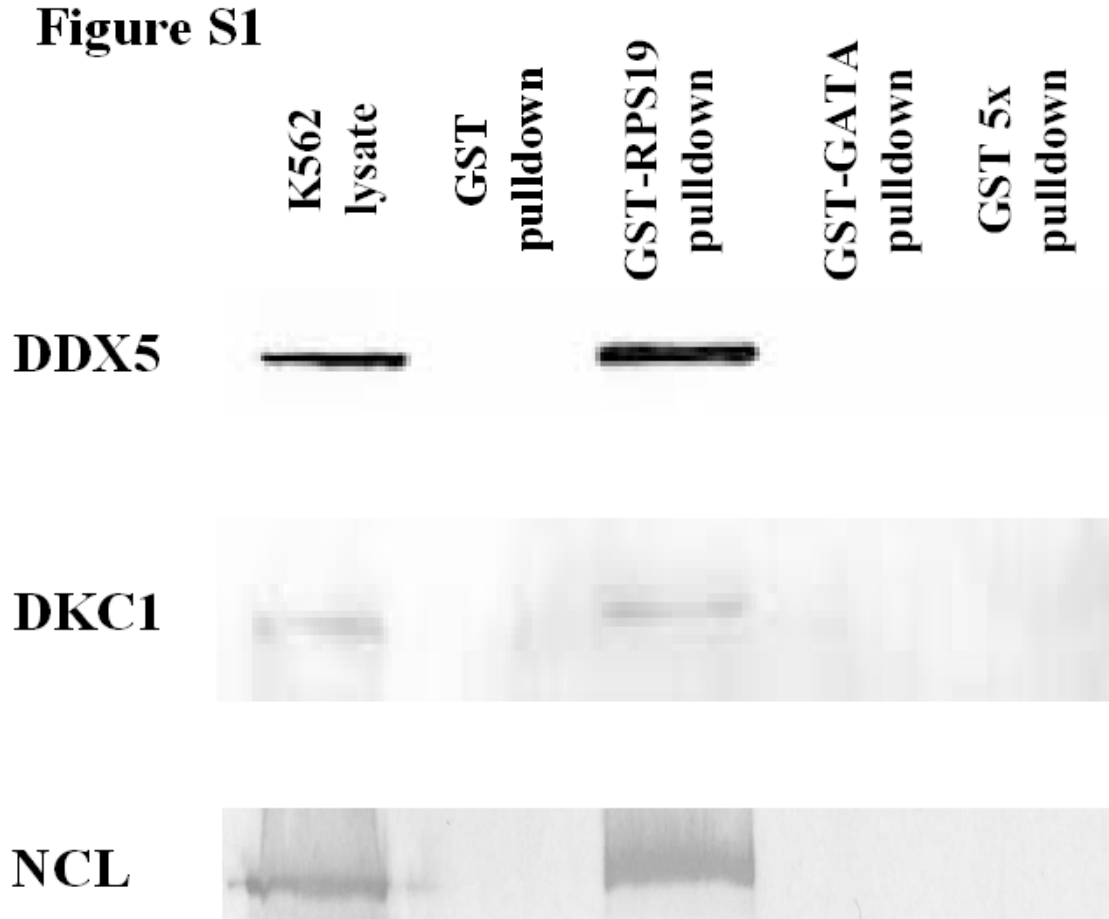
## REFERENCES

- Campagnoli, M. F., Garelli, E., Quarello, P., Carando, A., Varotto, S., Nobili, B., Longoni, D., Pedla, V., Zecca, M., Dufour, C., Ramenghi, U., and 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.
- Draptchinskaya, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchermia, G., Klar, J., Matsson, H., Tentler, D., Mohandas, N., Carlsson, B., and Dahl, N. (1999) The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat. Genet.* 21, 169–175.
- Willig, T. N., Draptchinskaya, N., Dianzani, I., Ball, S., Niemeyer, C., Ramenghi, U., Orfal, K., Gustavsson, P., Garelli, E., Brusco, A., Tiemann, C., Perignon, J. L., Bouchier, C., Cicchiello, L., Dahl, N., Mohandas, N., and Tchermia, G. (1999) Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond Blackfan anemia, wide variations in phenotypic expression. *Blood* 94, 4294–4306.
- Chatr-Aryamontri, A., Angelini, M., Garelli, E., Tchermia, G., Ramenghi, U., Dianzani, I., and Loreni, F. (2004) Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.* 24, 526–533.
- Gazda, H. T., Zhong, R., Long, L., Niewiadomska, E., Upton, J. M., Ploszynska, A., Zaucha, J. M., Vlachos, A., Afsifaftos, E., Viskochil, D. H., Niemeyer, C. M., Meerpohl, J. J., Rokicka-Milewska, R., Pospisilova, D., Wiktor-Jedrzejczak, W., Nathan, D. G., Beggs, A. H., and Sleff, C. A. (2004) RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. *Br. J. Haematol.* 127, 105–113.
- Da Costa, L., Tchermia, G., Gascard, P., Lo, A., Meerpohl, J., Niemeyer, C., Chasis, J. A., Ruder, J., and 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.
- Cretien, A., Da Costa, L. M., Rince, P., Proust, A., Mohandas, N., Gazda, H., Niemeyer, C., Delaunay, J., and Tchermia, G. (2003) Subcellular localization and protein expression level of twelve ribosomal protein S19 mutants identified in DBA patients, in American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 6–9, 2003, Abstr. 717, American Society of Hematology, Washington, D. C.
- Da Costa, L., Naria, G., Willig, T. N., Peters, L. L., Parra, M., Ruder, J., Tchermia, G., and Mohandas, N. (2003) Ribosomal protein S19 expres-

## Analysis of RPS19-interacting Proteins

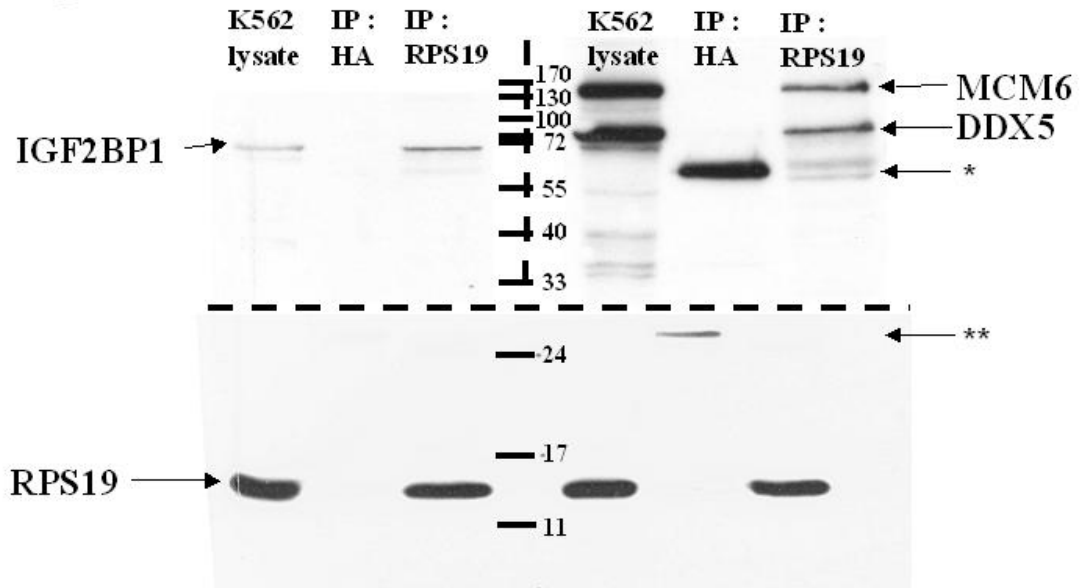
- sion during erythroid differentiation. *Blood* 101, 319–324
9. Hamaguchi, I., Ooka, A., Brun, A., Richter, J., Dahl, N., and Karlsson, S. (2002) Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 100, 2724–2731
  10. Flygare, J., Klefer, T., Miyake, K., Utsugisawa, T., Hamaguchi, I., Da Costa, L., Richter, J., Davey, E. J., Matsson, H., Dahl, N., Wtznrowicz, M., Trono, D., and Karlsson, S. (2005) Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 105, 4627–4634
  11. Léger-Silvestre, I., Caffrey, J. M., Darwallby, R., Alvarez-Arias, D. A., Gas, N., Bertolone, S. J., Gleizes, P. E., and Ellis, S. R. (2005) Specific role of yeast homologs of the Diamond-Blackfan anemia associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *J. Biol. Chem.* 280, 39177–39185
  12. Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P. E., Tschochner, H., and Milkeritt, P. (2005) Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol. Cell* 20, 263–275
  13. Ellis, S. R., and Massey, A. T. (2006) Diamond Blackfan anemia, A paradigm for a ribosome-based disease. *Med. Hypotheses* 68, 643–648
  14. Liu, J. M., and Ellis, S. R. (2008) Ribosomes and marrow failure, coincidental association or molecular paradigm? *Blood* 107, 4589–4598
  15. Chiochetti, A., Gibello, L., Carando, A., Aspesi, A., Secco, P., Garelli, E., Loreni, F., Angelini, M., Blava, A., Dahl, N., Dianzani, U., Ramenghi, U., Santoro, C., and Dianzani, I. (2005) Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica* 90, 1453–1462
  16. Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V., Maltra, R. K., DiCorleto, P. E., and Fox, P. L. (2003) Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* 115, 187–198
  17. Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., and Kastan, M. B. (2005) Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123, 49–63
  18. Monti, M., Orri, S., Pagnozzi, D., and Pucci, P. (2005) Interaction proteomics. *Biosci. Rep.* 25, 45–66
  19. Secco, M., Cotella, D., and Santoro, C. (2003) Selection of peptides with affinity for the N-terminal domain of GATA-1: Identification of a potential interacting protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 1061–1066
  20. Cianfriglia, M., Mariani, M., Armellini, D., Massone, A., Lafata, M., Presentini, R., and Antoni, G. (1986) Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of the monoclonal antibodies obtained. *Methods Enzymol.* 121, 193–210
  21. Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chak, L., Moulard, A. J., and DesGroselliers, L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 4797–4812
  22. Mochizuki, Y., He, J., Kuikami, S., Bessler, M., and Mason, P. J. (2004) Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10756–10761
  23. Orri, S., Caputo, I., D'Amato, A., Ruoppolo, M., and Esposito, C. (2003) Proteomic identification of acyl-acceptor and acyl-donor substrates for transglutaminase in human intestinal epithelial cell line: Implications for celiac disease. *J. Biol. Chem.* 278, 31766–31777
  24. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567
  25. Lam, Y. W., Tinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A. I. (2005) The nucleolus. *J. Cell Sci.* 118, 1335–7
  26. Milkeritt, P., KuEhn, H., Gas, N., and Tschochner, H. (2003) The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res.* 31, 799–804
  27. Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I., and Mann, M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77–83
  28. Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K. L., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A. I. (2002) Directed proteomic analysis of human nucleolus. *Curr. Biol.* 12, 1–11
  29. Scherl, A., Couté, Y., Déon, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D., and Diaz, J. J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* 13, 4100–4109
  30. Emra, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X. K., Serrano, A., Fan, X., Del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A. W., Boismenu, D., Lacaille, J. C., McPherson, P. S., Desgroselliers, L., and Sossin, W. S. (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 635–651
  31. Villacé, P., Marjón, R. M., and Ortín, J. (2004) The composition of staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 32, 2411–2420
  32. Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* 384, 239–246
  33. Soulet, F., Al Saati, T., Roga, S., Amalric, F., and Bouche, G. (2001) Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 591–596
  34. Shibuya, Y., Shikawa, M., Nishihara, H., Nishimura, T., Nishino, N., Okabe, H., Takagi, K., and Yamamoto, T. (2001) Identification of receptor-binding sites of monocyte chemoattractant S19 ribosomal protein dimer. *Am. J. Pathol.* 159, 2293–2301
  35. Maeda, N., Toku, S., Kenmochi, N., and Tanaka, T. (2006) A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 41–46
  36. Léger-Silvestre, I., Milkeritt, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J. C., Choemai, V., Guinefaleau, C., Gas, N., and Gleizes, P. E. (2004) The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.* 23, 2336–2347
  37. Blaha, G. (2004). Structure of the ribosome. In *Protein Synthesis and Ribosome Structure* (Nierhaus, K. H., and Wilson, D. N., eds) pp. 53–84, Wiley-VCH, Weinheim, Germany
  38. Nierhaus, K. H. (2004). Assembly of the prokaryotic ribosome. In *Protein Synthesis and Ribosome Structure* (Nierhaus, K. H., and Wilson, D. N., eds) pp. 85–106, Wiley-VCH, Weinheim, Germany
  39. Dresios, J., Panopoulos, P., and Synetos, D. (2006) Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart, important players in ribosomal function. *Mol. Microbiol.* 59, 1651–1663
  40. Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwulbecke, S., Patzelt, H., Schütze-Specking, A., Ban, N., Deuring, E., and Bukau, B. (2002) L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* 419, 171–174
  41. Pool, M. R., Stumm, J., Fulga, T. A., Shirling, I., and Dobberstein, B. (2002) Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science* 297, 1345–1348
  42. Beckmann, R., Spahn, C. M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001) Architecture of the protein conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107, 361–372
  43. Clemons, W. M., Jr., Menetret, J. F., Akey, C. W., and Rapoport, T. A. (2004) Structural insight into the protein translocation channel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 390–396
  44. Takyar, S., Hickerson, R. P., and Noller, H. F. (2005) mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* 120, 49–58
  45. Fatca, A., and Tollervey, D. (2002) Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 313–318
  46. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene (Amst.)* 313, 17–42
  47. Fujlyama, S., Yanagida, M., Hayano, T., Miura, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. (2002) Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 23773–23780
  48. Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (1997) KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7088–7099
  49. Lafontaine, D. L. J., and Tollervey, D. (2000) Synthesis and assembly of the box C/D small nucleolar RNAs. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2650–2659
  50. Wang, C., and Meier, U. T. (2004) Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *EMBO J.* 23, 1857–1867
  51. Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarié, S. A., and Glaser, T. (2004) Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* 131, 3907–3920

## SUPPLEMENTAL DATA

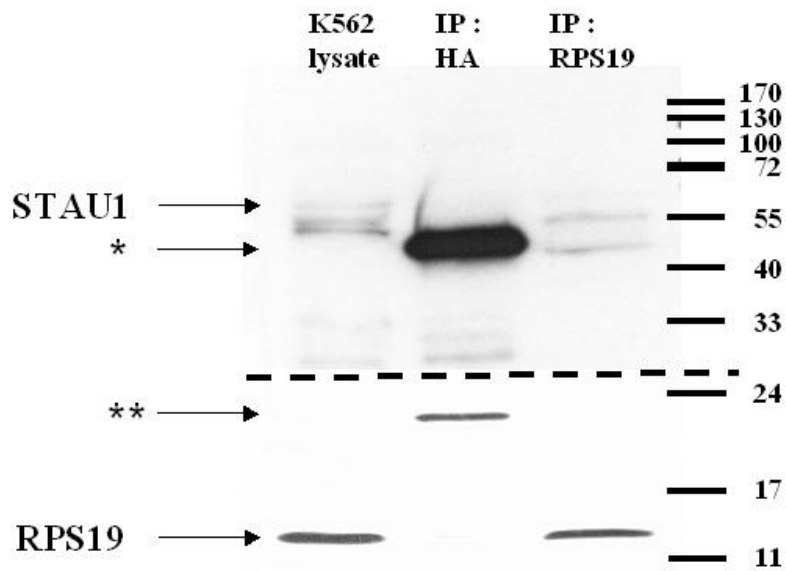


**Supplementary Figure S1.** Affinity purification including a negative control. Proteins from K562 whole cell extracts were affinity-purified with GST, GST-RPS19 and GST-GATA resins. In the lane named GST 5x pulldown we used a quantity of GST protein five fold higher than in the GST-pull-down lane. Total lysates (K562 lysate) and bound proteins eluted from the GST control resin (GST), the GST-RPS19 resin (GST-RPS19) or the GST-NTGATA1 resin (GST-GATA) were analysed by western blotting with antibodies specific to the three selected interactors, as indicated. All blots were revealed by the chemiluminescence method except the for NCL which was revealed by the alkaline-phosphatase.

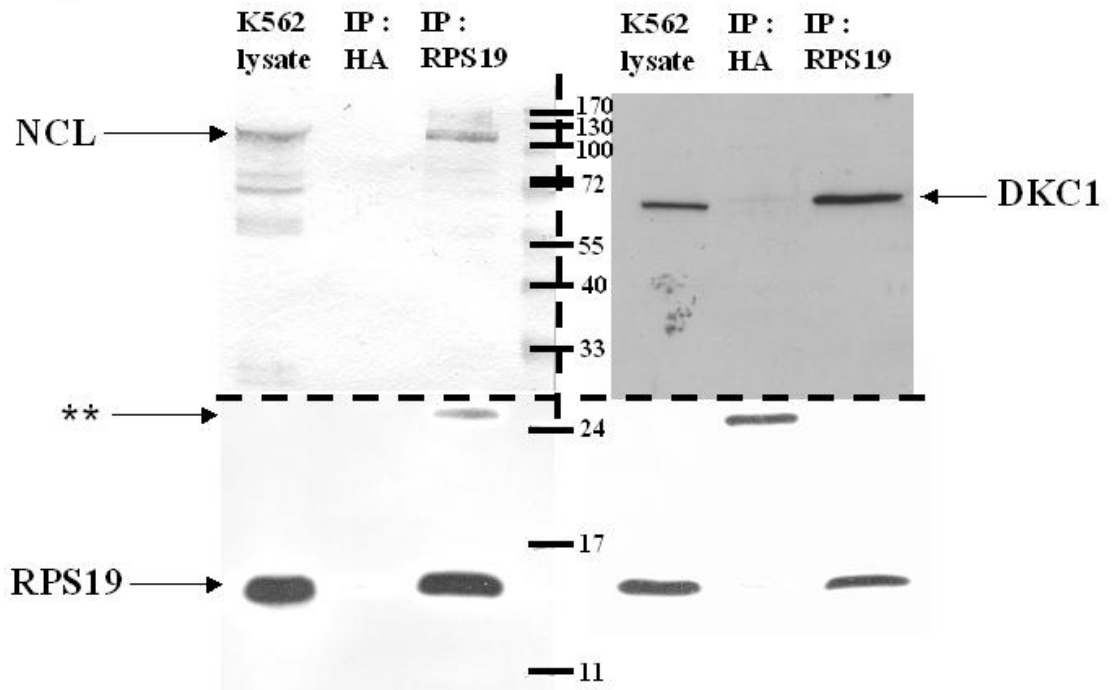
**Figure S2A**



**Figure S2B**

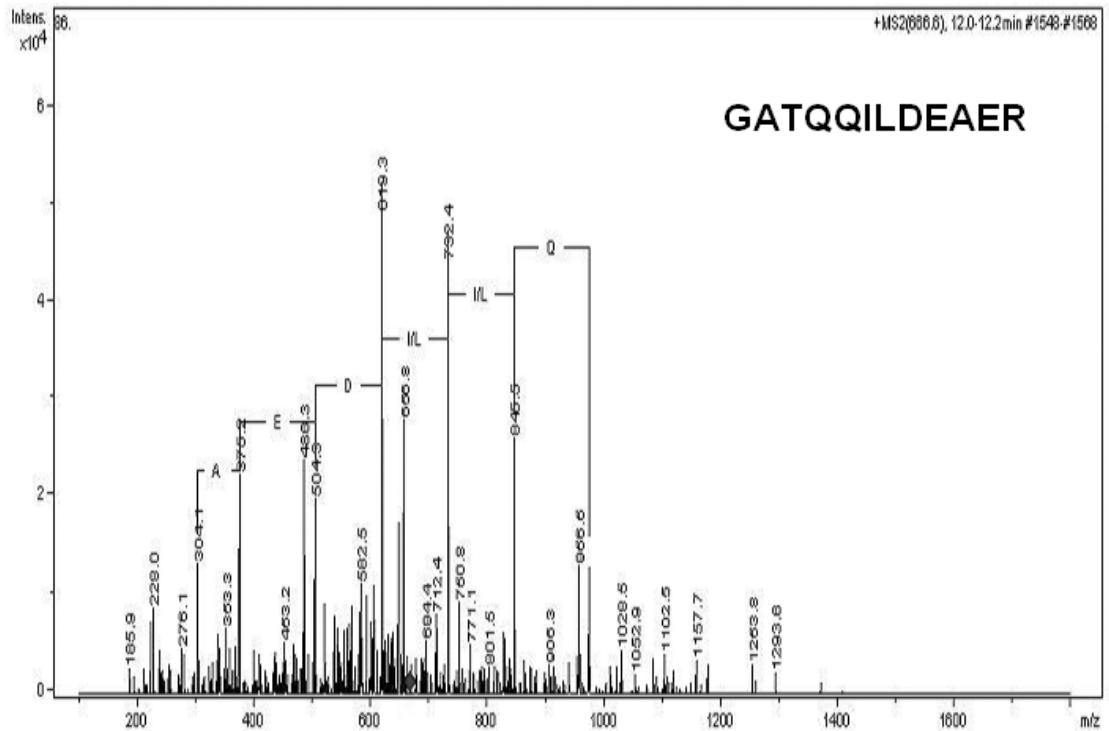
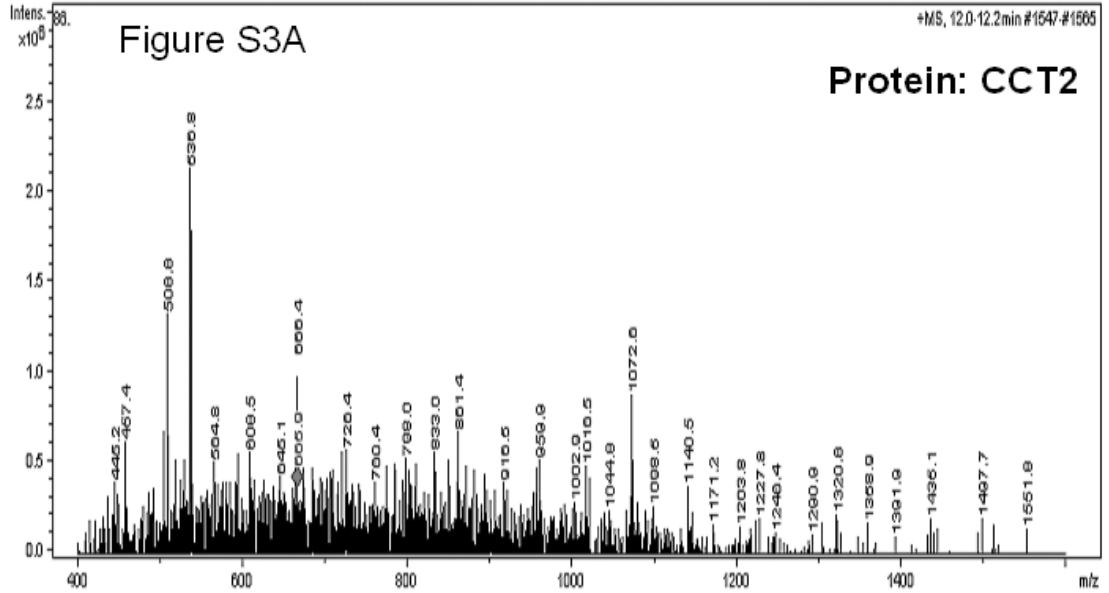


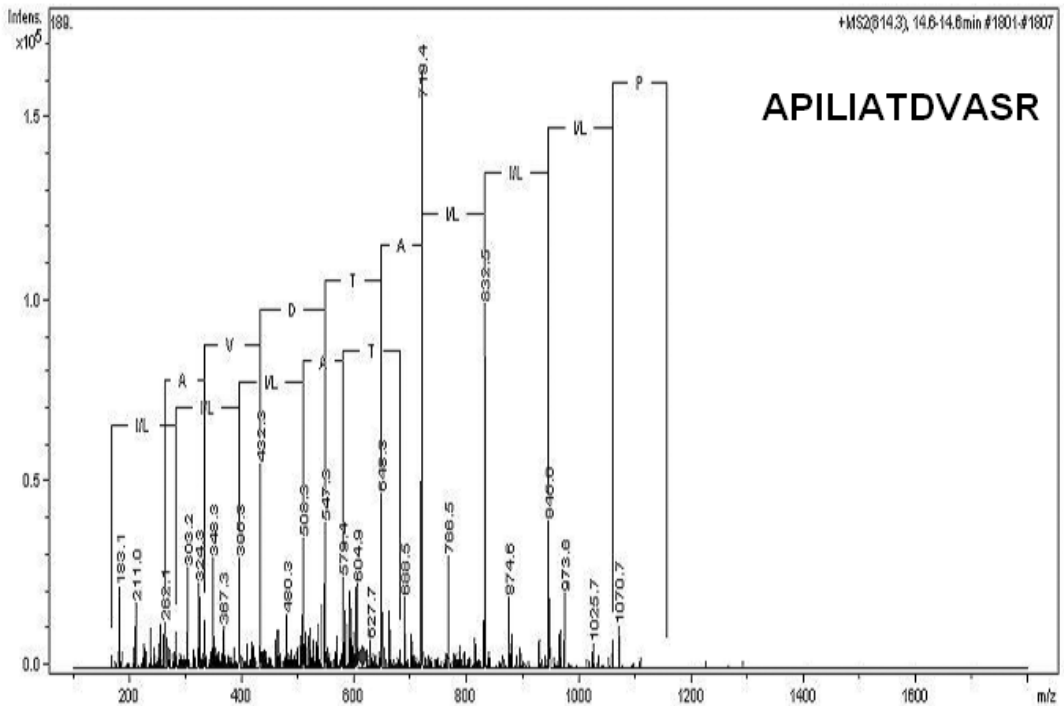
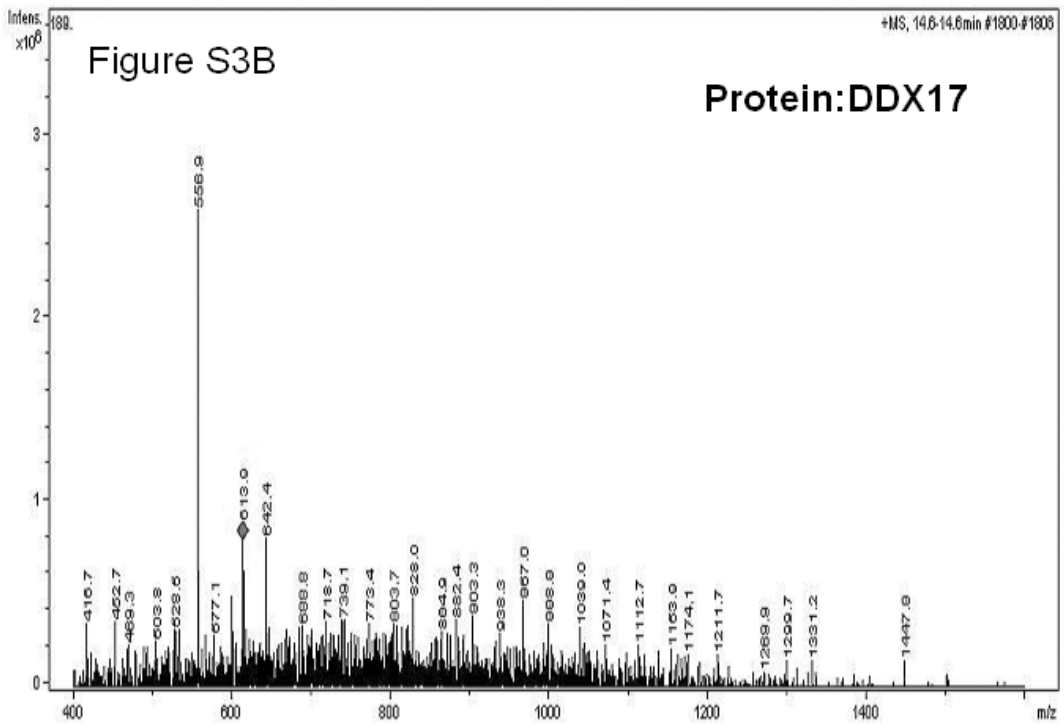
**Figure S2C**

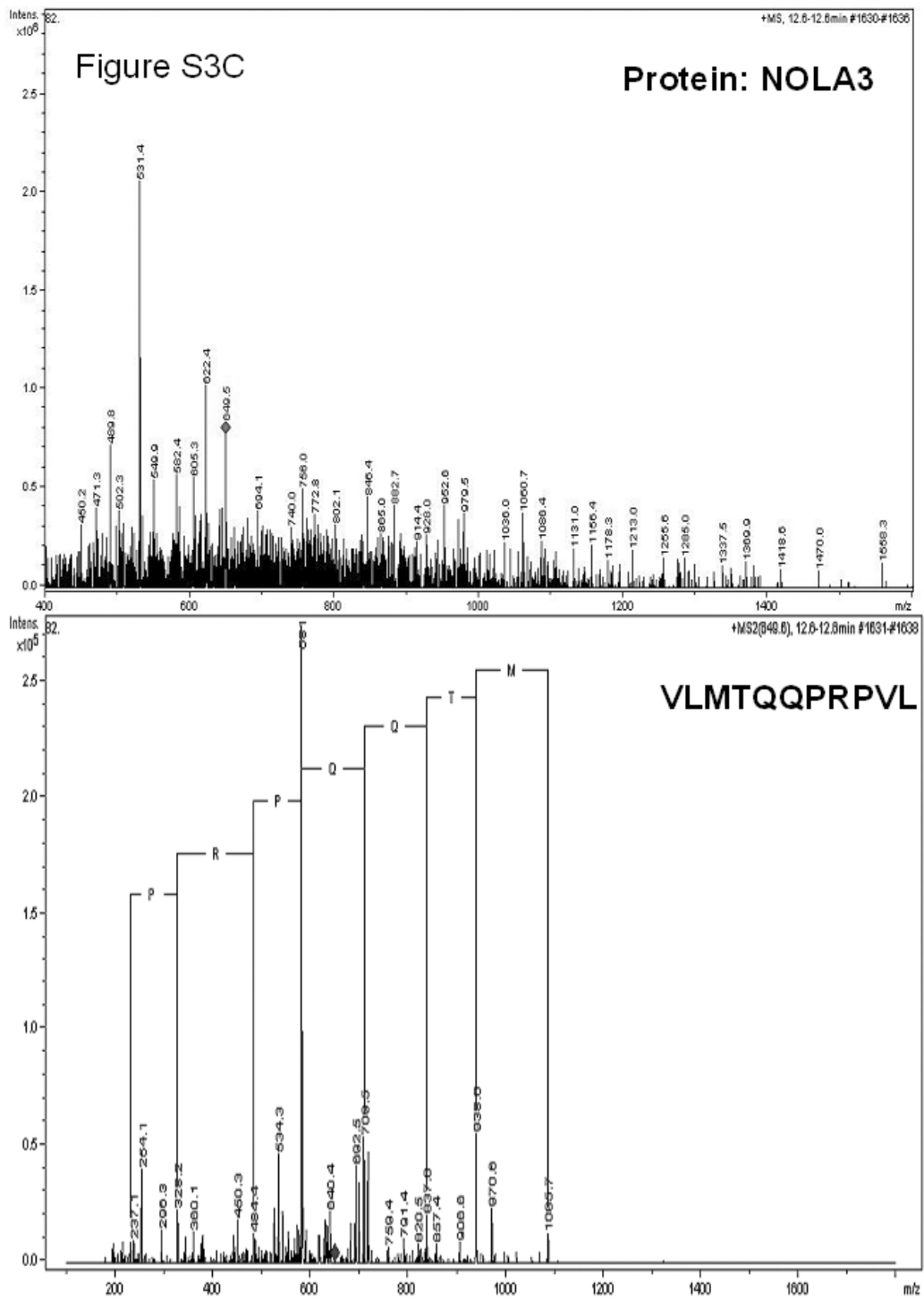


**Supplementary Figure S2.** Co-immunoprecipitation (whole images). Proteins from K562 cell lysates were immunoprecipitated with a monoclonal anti-RPS19 or an anti-HA antibody as negative control. Immunocomplexes were fractionated by SDS-PAGE and blotted on nitrocellulose. After the transfer, the nitrocellulose was cut (dotted lines) and incubated with the indicated antibodies. All blots were revealed by the chemiluminescence method except for NCL which was revealed by the alkaline phosphatase. Single or double asterisk indicate immunoglobulin heavy or light chains, respectively. The differences in intensity depend on the antibody concentrations (the anti-RPS19 is a hybridoma supernatant) and exposures.









**Supplementary Figure S3.** Protein identification by tandem mass spectrometry. MS full scan, MS/MS scan and amino acid sequence of CCT2 (A), DDX17 (B), and NOLA3 (C). Each MS/MS spectrum shows the predicted peptide sequence and the tryptic identified fragment. ♦ m/z signal fragmented

**Supplemental Table 1.** Analysis of GST control lane by tandem mass spectrometry.

GENE	IDENTIFIED PEPTIDE SEQUENCE	MASS ERROR (ppm)	MASCOT SCORE	SEQUENCE COVERAGE
ACTB	DLTDYLMK	4	38	14%
	QEYDESGPSIVHR	53	40	
	EITALAPSTMK	85	38	
	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	5	38	
BXDC2	ILIFSSR	132	48	15%
	FVLNLIK	121	50	
	LFVINEVCEMK	90	57	
	FLVQNIHTLAELK	105	38	
	NFQIIEEDAALVEIGPR	142	38	
DCD	ENAGEDPGLAR	35	40	20%
	DAVEDLESVGK	43	38	
DDB1	LFMLLLEK	114	50	1%
EEF1G	KLDPGSEETQTLVR	52	38	11%
	LDPGSEETQTLVR	21	38	
	ALIAAQYSGAQVR	14	38	
	QAFPNTNR	53	38	
EGFR	MLLVDELK	120	38	1%
	ILMVGLDAAGK	90	53	
HBZ	ISTQADTIGTETLER	67	88	10%
HEJ1	EQYSAVIAK	26	41	15%
HSPA6	TTPSYVAFTDTER	150	41	2%
HSPCB	DNSTMGYMMAK	116	75	1%
ITGAX	ESHVAMHR	110	45	2%
	IAPPASDFLAHIQK	80	40	
K-ALPHA-1	DVNAAIATIK	110	39	2%
KRT1	SLDLDSIIAEVK	150	52	4%
	WELLQQVDTSTR	150	51	
KRT14	QFTSSSSMK	85	94	8%

	VTMQNLNDR	63	73	
	MSVEADINGLR	142	80	
	CEMEQQNQEYK	120	47	
KRT19	VLDELTAR	104	54	2%
KRT9	MTLDDFR	150	38	8%
	TLLDIDNTR	104	40	
	QEYEQLIAK	141	43	
	QVLDNLTMEK	69	38	
	VQALEEANNDLENK	2	54	
KTR10	DAEAWFNEK	90	91	5%
	LENEIQTYR	123	46	
	ALEESNYELEGK	107	83	
KTR15	IMATTIDNSR	72	107	5%
	QGVEADINGLR	80	50	
RGD1307877	LALDIEIATYR	1	74	3%
SPATA	AVAPSIIFDELDAVER	72	89	7%
TSR1	QIDAPGDPFPLNPR	68	70	7%
	LLHIVGYGDFQMK	72	38	
	LEEMFPDEVDTPR	63	42	
	LLLLDTQQEAGMLLR	46	83	
TUBB4	LAVNMVPFPR	74	40	10%
	ISVYYNEATGGK	53	39	
	IMNTFSVVPSPK	89	38	
	AILVDLEPGTMDSVR	123	41	
ZNF561	SFTNFSQLYAPVK	110	130	3%

**Supplemental table 2.** Identification of RPS19 interacting proteins by tandem mass spectrometry.

<b>GENE</b>	<b>IDENTIFIED PEPTIDE SEQUENCE</b>	<b>MASS ERROR (ppm)</b>	<b>MASCOT SCORE</b>	<b>SEQUENCE COVERAGE</b>
<b><u>NTPase activity</u></b>				
GTPBP4	LPTIDPNTR	107	38	12%
	LALGQINIAK	125	38	
	QSLEYLEQVR	138	38	
	TLLLCGYPNVGK	147	50	
	ADVVDVQPYAFTTK	149	40	
PSMC5	GVCTEAGMYALR	89	38	20%
	VDPLVSLMMVEK	123	71	
	GVCTEAGMYALR	150	65	
	VPDSTYEMIGGLDK	110	50	
	VHVTQEDFEMAVAK	100	40	
	TMLELLNQLDGFEEK	125	38	
PSMC6	EMFNRYR	91	38	1%
RAB11B	DHADSNIVIMLVGNK	112	42	7%
XAB1	SMSLVLDEFYSSLR	120	83	4%
<b><u>Hydrolase/helicase activity</u></b>				
DDX5	QVSDLISVLR	107	40	10%
	APILIATDVASR	88	45	
	TTYLVLDEADR	96	50	
	RLMEEIMSEKENK	140	39	
	TGTAYTFFTPNNIK	110	46	
DDX17	APILIATDVASR	98	38	2%
DDX18	NGTGVLLISPTR	12	53	9%
	EPLYVGVDDDK	150	44	
	LGNGINIIVATPGR	50	78	
	SAEAQKLGNGINIIVATPGR	144	38	
DDX21	DFSDITKK	112	38	42%
	LHGELQDR	140	38	
	TIIFCETK	150	38	
	IGVPSATEIHK	150	38	
	EQLGEEIDSK	150	39	
	APQVLVLAPTR	133	40	

	TAITVEHLAIK	106	38	
	NGIDILVGTGPR	147	48	
	GVTFLEPIQAK	150	38	
	STYEQVDLIGK	122	38	
	TFSFAIPLIEK	110	38	
	RIGVPSATEIIK	128	38	
	EAQELSQNSAIK	136	45	
	EQLGEEIDSKVK	139	39	
	GRAPQVLVLAPTR	140	48	
	STYEQVDLIGKK	142	40	
	EEYQLVQVEQK	150	38	
	NGSFGVLVATNVAAR	147	40	
	LLDSVPPTAISHFK	109	38	
	EGAFSNFPISEETIK	138	49	
	NEEPSEEEIDAPKPK	127	40	
	WQLSVATEQPELEGPR	111	40	
	TFHHVYSGKDLIAQAR	105	38	
	LLDSVPPTAISHFKQSAEK	148	38	
	GLDIPEVDLVIQSSPPKDVESY			
	IHR	109	40	
DDX24	DKLDILGAAETGSGK	95	76	2%
DDX3X	VGSTSENIQK	146	38	4%
	VRPCVVYGGADIGQQIR	147		40
DDX41	SGNTGIATTFINK	150	44	2%
DDX50	VLVLAPTR	111	44	5%
	VLVATNVAAR	145	38	
	LSSNAVSQITR	107	50	
	TFSFAIPLIER	57	48	
DDX54	LLVEFAR	147	41	27%
	TSFFLVR	141	48	
	ELALQTLK	144	39	
	TIPVILDGK	129	48	
	AGLTEPVLIR	146	39	
	ATIFEINASSR	124	74	
	LVHVAVEMSLK	117	47	
	SGGFQSMGLSYPVFK	74	40	
	LPGGHQTVLFSATLPK	144	38	
	LQSVEYVVFDEADR	78	45	
	TIPVILDGKDVVAMAR	106	38	
	EMDLVGLGLHPLFSSR	150	38	
	LFEMGFAEQLQEIIAR	84	69	

	AKEMDLVGLGLHPLFSSR	96	38	
	GLDIPLLDNVINYSFPAK	112	38	
	MEDQFAALHENPDIIIATPGR	5	54	
	VPQSVVDEEDSGLQSTLEASL			
	ELR	85	49	
DHX9	LGGIGQFLAK	119	40	21%
	MLNMIR	105	43	
	LNMATLR	113	38	
	MGGEEAEIR	115	38	
	MTPSYEIR	106	38	
	LSMSQLNEK	96	40	
	DFVNYLVR	146	38	
	VFDVPVGVTK	138	38	
	DVVQAYPEVR	59	40	
	TPLHEIALSIK	122	38	
	AAMEALVVEVTK	133	38	
	KVFDVPVGVTK	93	39	
	LAAQSCALSLVR	146	40	
	YSPFFVFGEK	127	38	
	SFIAEMTIYIK	120	38	
	ETPFELIEALLK	135	39	
	YQILPLHSQIPR	143	38	
	GISHVIVDEIHER	106	38	
	QPAISQLDPVNER	150	40	
	VQSDGQIVLVDDWIK	111	38	
	ELDALDANDELTPGR	52	38	
	GMTLVTPQLLLFASK	109	38	
	QLYHLGVVEAYSGLTK	96	42	
	AIEPPPLDAVIEAHTLR	30	38	
	KFESEILEAISQNSVVIIR	3	40	
	NELMYQLEQDHDLDLQAILQER	7	38	
	LGGIGQFLAKAIEPPPLDAVIE			
	AHTLR	150	38	
	DINTDFLLVLR	142	38	
DHX15	EVDDLGPVGDIAK	148	54	2%
DHX36	ELDILLQEK	146	38	3%
	NLQSDVLMTVVK	108	63	
	ASLLDDYQLPEILR	110	69	
MCM2	VAVGELTDEDVK	149	38	6%
	QLVAEQVTYQR	147	49	
	DTVDPVQDEMLAR	112	53	
	YDPSLTFSENVDLTEPIISR	148	81	



MCM6	YLQLAEELIRPER	147	46	7%
	EIESEIDSEEELINK	17	76	
	LFLDFLEEFQSSDGEIK	143	45	
MCM7	AGILTTLNAR	150	38	4%
	SITVLVEGENTR	147	47	
RUVBL2	TTEMETIYDLGTK	20	70	3%
SKIV2L2	ALFATETFAMGINMPAR	110	38	2%
SMARCA5	FEYLLK	147	48	14%
	EILFYR	139	43	
	FDWFLK	116	39	
	DIDILNSAGK	147	44	
	YLVIDEAHR	117	52	
	LDSIVIQQGR	106	61	
	FITDNTVEER	33	64	
	KANYAVDAYFR	83	62	
	TLQTISLLGYMK	130	45	
	LRLDSIVIQQGR	122	38	
	LGFDKENVYDELK	150	38	
	ESEITDEDIDGILER	121	70	
	TPEEVIEYSAVFWER	43	62	
	NFTMDTESSVYNFEGEDYR	34	61	
XRN2	TGGYLTESGYVNLQR	88	38	6%
	ELTMASLPFTFDVER	115	38	
	AALEEVYDPLTPEETR	102	38	
	VQMIMLAVGEVEDSIFK	105	35	
<b><u>Isomerase activity</u></b>				
DKC1	LHNAIEGGTQLSR	140	41	6%
	ALETLTGALFQRPLIAAVK	150	38	
PPIH	IIDGLLVMR	105	61	10%
	IELFADVVPK	115	69	
<b><u>Kinase activity</u></b>				
CSNK2A1	ALDYCHSMGIMHR	112	55	4%
SRP72	LTNAEGVEFK	144	43	10%
	VLANNLSFEK	147	38	
	GTQGATAGASSELDASK	135	63	
	TVSSPPTSPRPGSAATVSAST	146	38	

SNIIPPR				
PRKCQ	AKGQSLQDPFLNALR	6	41	2%
<b><u>Splicing factor activity</u></b>				
SF3B1	TEILPPFFK	76	43	8%
	QLVDTTVELANK	145	42	
	LLVDVDESTLSPEEQK	122	38	
	ILVVIEPLLEDYAR	113	40	
	MVMETIEKIMGNLGAADIDH			
	K	107	38	
	AAGLATMISTMRPDIDNMD			
	EYVR	109	55	
SF3B2	YGPPPSYPNLK	150	40	3%
	GIEKPPFELPDFIK	150	38	
SF3B3	SVAGGFVYTYK	126	55	11%
	LTISSPLEAHK	147	39	
	IVPGQFLAVDPK	93	38	
	FLAVGLVDNTR	123	53	
	ILELLRPDPNTGK	150	38	
	TVLDPVTGDLSDTR	107	67	
	ITLETDEDMVTEIR	42	90	
	NENQLIIFADDTYPR	83	46	
	ELAAEMAAAFLNENLPESIFG			
	APK	114	60	
SFRS9	HGLVPFAFVR	144	44	10%
	IYVGNLPTDVR	24	38	
SFRS10	VDFSITK	150	38	12%
	YGPIADVSIVYDQQR	133	7	
<b><u>Structural constituent of Ribosome</u></b>				
RPL10A	DTLYEAVR	20	46	10%
	KYDAFLASESLIK	74	50	
RPL14	GTAAAAAAAAAAAAAK	60	96	18%
	VAYVSFGPHAGK	113	50	
	LVAIVDVIDQNR	15	68	
RPL24	VFQFLNAK	148	52	13%
	TAMAAAAPTK	97	70	
RPL27A	TGAAPIIDVVR	99	71	7%

RPL3	HGSLGFLPR	20	38	2%
RPL4	NIPGITLLNVSK	142	44	3%
RPL6	YYPTEDVPR	147	51	3%
RPL7	ASINMLR	145	38	31%
	KVLQLLR	138	38	
	SVNELIYK	145	38	
	EVPAVPETLK	129	38	
	SVNELIYKR	71	38	
	IALTDNALIAR	76	47	
	AGNFYVPAEPK	92	38	
	KAGNFYVPAEPK	5	42	
	RPL7A	AGVNTVTTLVENK	148	
RPL8	AVVGWVAGGGR	85	61	5%
RPL9	TILSNQTVDIPENV DITLK	90	49	10%
RPLP0	EDLTEIR	131	38	2%
RPLP1	AAGVNVPEFPWGLFAK	117	41	14%
RPLP2	LASVPAGGAVAVSAA	50	38	31%
RPS10	IAIYELLFK	135	64	5%
RPS14	IEDVTPIPSDSTR	14	46	9%
RPS16	DILIQYDR	122	38	40%
	ALVAYYQK	90	38	
	TATAVAHCK	84	38	
	GPLQSVQVFR	75	38	
	VNGRPLEMIEPR	150	38	
	GGGHVAQIYAIR	95	38	
	RPS2	GTGIVSAPVPK	68	
RPS23	VANVSLALYK	67	87	8%
RPS24	QMVIDVLHPGK	54	69	22%
	TTGFGMIYDSL DYAK	60	70	

RPS26	GHVQPIR	100	70	17%
	LHYCVSCAIHSK	98	49	
RPS3	ELTAVVQK	34	38	30%
	KFVADGIFK	68	42	
	TEIIILATR	150	57	
	AELNEFLTR	54	49	
	ELAEDGYSGVEVR	56	57	
	KPLPDHVSIVEPK	144	43	
	DEILPTTPISEQK	41	38	
RPS4X	LSNIFVIGK	131	51	18%
	YALTGDEVK	90	38	
	TIRYPDPLIK	150	38	
	TDITYPAGFMDVISIDK	5	50	
RPS5	QAVDV SPLR	10	44	4%
RPS6	LIEVDDER	20	56	8%
	DIPGLTDTTVPR	39	61	
RPS7	AIIIFVVPQLK	60	41	6%
RPS8	LTPEEEILNK	8	47	5%
RPSA	LLVVT DPR	150	50	25%
	SDGIYIINLK	70	52	
	FAAATGATPIAGR	33	51	
	AIVAIENPADVSVISS	46	70	
	FLAAGTHLGGTNLDFQMEQ			
	YIYK	15	38	
RSL1D1	FFTTPSK	72	38	33%
	SPNPSTPR	128	40	
	LLFVKTEK	41	38	
	QLDKEQVR	10	38	
	RLLPSLIGR	19	38	
	VPVSVNLLSK	5	42	
	AVDALLTHCK	18	38	
	KVPVSVNLLSK	84	44	
	TVSQIISLQTLK	37	38	
	DDVAPESGDTTVK	8	43	
	TVSQIISLQTLKK	41	38	
	LLSSFDFFLTDAR	26	100	
	EINDCIGGTVLNISK	110	50	
	ATNESEDEIPQLVPIGK	54	38	

	DEPNSTPEKTEQFYR	5	39	
<b><u>Transcription factor</u></b>				
BAZ1B	GGLGYVEETSEFEAR	150	75	1%
HNRPD	IFVGGSPDTPEEK	74	78	12%
	EYFGGFGEVESIELPMDNK	9	74	
ILF2	VLQSALAAIR	67	90	25%
	KLDPELHLDIK	150	38	
	ILPTLEAVAALGNK	70	77	
	VKPAPDETSFSEALLK	23	69	
	INNVIDNLIVAPGTFEVQIEEV			
	R	150	38	
	AQDPSEVLTMLTNETGFEISS			
SDATVK	150	51		
ILF3	AYAALAALEK	118	63	14%
	LFPDTPLALDANK	127	83	
	VADNLAIQLAAVTEDEK	36	63	
	EPPLSLTIHLTSPVVR	78	52	
	VLGETLSVNDPPDVLDR	89	55	
	VADNLAIQLAAVTEDEKYEILQ			
	SVDDAAIVIK	57	46	
NKRF	DIEQIIR	131	44	13%
	EIPPADIPK	150	42	
	INYYTMLTR	92	43	
	LLTDGYACEVR	131	52	
	TNPEYIYAPLK	84	54	
	VILESEVIAEAVGVK	130	64	
PURA	FFFDVGSNK	94	65	11%
	LIDDYGVVEEPAELPEGTSLTV			
	DNK	33	59	
TAF15	GEATVSFDDPPSAK	150	44	2%
TRIM28	LSPPYSSPQEFAQDVGR	139	46	2%
UBTF	DYEVELLR	122	39	13%
	KKDYEVELLR	148	38	
	HPELNISEEGITK	82	40	
	ITLTELILDAQEHVK	143	38	
XPO5	DPLLLAIIPK	145	45	3%
	LFSSVTFETVEESK	62	61	

	QGETQTELVMFILLR	62	70	
YBX1	GAEAAVNTGPGGVPVQGSK	53	57	10%
	SVG DGETVEFDVVEGEK	5	105	
<b><u>Transferase activity</u></b>				
FDFT1	ALDTLEDDMTISVEK	86	71	6%
	AIYQYMEEIYHR	140	94	
FTSJ3 <sup>29,47</sup>	FQFLQK	150	38	13%
	EVEVQAK	102	54	
	TSVTDFLR	150	48	
	AANPVDFLSK	141	42	
	DLIDNSFNR	128	38	
	AEAVVNTVDISER	150	53	
	ILDPEGLALGAVIASSK	78	79	
	SDDDGFEIVPIEDPAK	51	38	
	LTEVQDDKEEEEEENPLLPL EEK	138	38	
NAT10	SMDLSEYIIR	150	38	4%
	LDYLGVS YGLTPR		41	
	LGQAELVVIDEAAAIPPLVK		41	
NOL1	GVNLDPLGK	119	39	14%
	DLAQALINR	137	60	
	IQDIVGILR	145	51	
	GADSELSTVPSVTK	137	38	
	VLLDAPCSGTGVIK	46	44	
	LGVTNTIISHYDGR	131	50	
	ELLSAIDSVNATSK	30	78	
	LVPTGLDFGQEGFTR	72	53	
	SPEAKPLPGKLPKGAVQTAG K	137	47	
ZC3HAV1	ASLEDAPVDDLTR	150	44	2%
<b><u>Transporter activity</u></b>				
COPA	MHSLLIK	63	38	13%
	VWDISGLR	105	38	
	TALNLFFK	147	44	
	GFFEGTIASK	150	47	
	VLTIDPTEFK	106	51	
	TLDLPIYVTR	126	56	
	NLSPGAVESDVR	105	55	
	EYIVGLSVETER	86	55	
	DADSITLFDVQQK	54	65	

	SILLSVPLLVDNK	126	61	
	GITGVDLFGTTDAVVK	113	51	
	VTTVTEIGKDVIGLR	69	59	
	LLELGPKPEVAQQTR	71	56	
	ASNLENSTYDLYTIK	8	43	
COPB2	GSNNVALGYDEGSIIVK	121	75	3%
CSE1L	TGNIPALVR	128	50	14%
	VIVPNMEFR	149	62	
	SANVNEFPVLK	144	58	
	DAAIYLVTSLASK	126	49	
	ALTLPGSSENEYIMK	60	52	
	LVLDAFALPLTNLFK	66	38	
	YGALALQEIFDGIQPK	68	53	
	AADEEAFEDNSEEYIR	42	66	
	LLQTDDEEEAGLLELLK	98	86	
IPO4	QGCTVAEK	121	67	2%
	LLMASPTR	90	65	
IPO7	ETENDDLTNVIQK	110	64	3%
	ENIVEAIIHSPILIR	117	68	
NPEPL1	YHAAVLNTSAEWEAACVK	58	44	3%
STAU1	VSVGEFVGELEGK	38	43	3%
SSR4	FFDEESYSLLR	112	69	6%
XPO1	YVVGIIK	121	38	7%
	IYLDMLNVYK	148	45	
	EFAGEDTSDLFLEER	40	84	
	LLSEEVDFSSGQITQVK	46	62	
	MAKPEEVLVVENDQGEVVR	14	40	
<b><u>DNA/RNA/protein binding capacity</u></b>				
AATF	DKGGPEFSSALK	150	41	2%
ACTR1B	DWNDMER	120	67	2%
C1orf77	LGRPIGALAR	91	69	10%
CCT2	GATQQILDEAER	112	58	2%
CCT8	DIDEVSSLLR	118	46	2%

CEBPZ	ALLVQVVNK	133	40	10%
	EQIDTLFK	127	39	
	QTLRLRPGGK	122	38	
	MLSALLTGVNR	148	38	
	QAMFLNLVYK	65	39	
	LYQHEINLFK	150	38	
	ELLITDLLPDNR	136	40	
	DKQNIFEFFER	109	40	
	EESQIPVDEVFFHR	69	38	
	KLETEETVPETDVETK	59	40	
	CENPC1	VSDEEDK	58	
QMPPVGSK		89	55	
ILATDVSSK		95	95	
COPG	SIATLAITLLK	148	69	5%
	SLEELPVDIILASVG	32	51	
	LLLLDTVMTMQVTAR	126	95	
DHX30	IPQLLER	100	51	17%
	ALTQFPLPK	120	39	
	VPGFMYPVK	123	38	
	EYLTTLGQR	92	50	
	AVAGWEEVLR	148	76	
	LQSDDILPLGK	146	48	
	AIFQQPPVGVNR	99	38	
	TPLENLVLQAK	98	47	
	EHYLEDILAK	130	38	
	ATISLSDSDLLR	77	53	
	MVPFQVPEILR	89	40	
	DVNTDFLLILLK	128	72	
	GVL MAGLYPNLIQVR	90	44	
	AVDEAVILLQEIGVLDQR	121	55	
	DSGPLSDPITGKPYVPLLEAEE			
	VR	23	38	
	WQDRSSRENYLEENLLYAPSL			
R	132	38		
DNAJC9	ELGLDEGVDSLK	150	41	8%
	ISLEDIQAFEK	150	43	
FBL	TNIIPVIEDAR	120	62	11%
	NLVPGESVYGEK	150	38	
	VSISEGDDKIEYR	150	52	
FUSIP1	DAEDALHNLDR	8	57	6%



GNB2L1	DVLSVAFSSDNR	99	66	4%
HIST1H1C	ALAAAGYDVEK	63	42	12%
	SETAPAAPAAPAPAEK	40	40	
HIST1H1D	ALAAAGYDVEK	72	46	10%
	ASGPPVSELITK	125	57	
HIST1H2AK	NDEELNK	110	38	5%
HIST1H2BL	LLPGELAK	112	38	7%
HIST1H2BO	QVHPDTGISSK	123	50	17%
	AMGIMNSFVNDIFER	90	53	
HIST2H4	ISGLIYEETR	93	65	36%
	DNIQGITKPAIR	136	48	
	TVTAMDVVYALK	141	80	
	TVTAMDVVYALKR	142	38	
HNRPA2B1	DYFEEYGK	28	38	8%
	TLETVPLER	75	40	
	IDTIEITDR	76	47	
HNRPA3	LFIGGLSFETTDDSLR	45	94	5%
HNRPC	VPPPPPIAR	22	58	9%
	SDVEAIFSK	70	51	
	KSDVEAIFSK	62	61	
HNRPDL	DLTEYLSR	70	46	3%
HNRPF	SSQEEVR	70	85	13%
	TEMDWVLK	98	90	
	VHIEIGPDGR	110	56	
	DLSYCLSGMYDHR	123	48	
	QSGEAFVELGSEDDVK	57	54	
HNRPR	LFVGSIPK	150	43	8%
	ENILEEFSK	150	46	
	TGYTLDVTTGQR	30	57	
	NLATTVTEEILEK	116	79	
	DLYEDELVPLFEK	12	48	
HNRPU	FIEIAAR	89	38	5%

	GYFEYIEENK	100	41	
	YNILGTNTIMDK	141	38	
	NFILDQTNVSAQAQR	78	97	
HNRPUL2	EEAYHSR	112	46	2%
	ANFSLPEK	109	38	
HP1BP3	SGASVVAIRK	101	40	9%
	GASGSFVVVQK	65	40	
	YIIHKYPSLELER	147	47	
	SSAVDPEPQVK	112	38	
IGF2BP1	MVIITGPPEAQFK	150	39	10%
	LLVPTQYVGAIIK	149	50	
	TVNELQNLTAEEVVVPR	10	54	
	LYIGNLNESVTPADLEK	21	50	
IGF2BP3	ALQSGPPQSR	10	38	
	IPVSGPFLVK	5	38	
	QKPCDLPLR	9	51	
	DQTPDENDQVVVK	9	43	
	SITILSTPEGTSAACK	6	66	
IMP3	LYALGLVPTR	140	52	5%
ITGB4BP	ETEEILADVVK	31	63	4%
LYAR	FQNWMLK	150	78	3%
	QQAWIIK	95	48	
NCL	ALELTGLK	145	38	17%
	TGISDVFAK	124	42	
	GIAYIEFK	131	41	
	NDLAVVDVR	110	68	
	EVFEDAAEIR	150	73	
	GFGFVDFNSEEDAK	147	38	
	FGYVDFESAEDLEK	73	75	
	GLSEDTTEETLKESFDGSVR	91	43	
	TLVLSNLSYSATEETLQEVFEK	28	67	
NIP7 <sup>29</sup>	LHVTALDYLPYAK	142	62	10%
NOLA1	FYIDPYK	105	38	13%
	VDEIFGQLR	18	38	
	VPYFNAPVYLENK	6	49	
NOL5A	VVSLSEYR	148	40	1%

PABPC3	IVATKPLYVALAQR	150	56	2%
PAK1IP1	GEQYVVIIQNK	142	61	12%
	FLSESVLAVAGDEEVIR	103	77	
	IDIQQLDTASISGTITNEK	14	83	
PNN	LLALSGPGGGGR	140	38	5%
	IEFAEQINK	120	42	
	LTEVPVEPVLTVHPESK	117	42	
PPP2R1A	LSTIALALGVER	120	50	2%
RAB1B	QWLQEIDR	98	49	4%
RAP1B	LVVLGSGGVGK	85	40	6%
RBM19	NLPYTSTEEDLEK	117	38	5%
	ILGENEEEEDLAESGR	146	92	
	VLLPEGGITAIVEFLEPLEAR	127	64	
RBMX	ALEAVFGK	72	50	13%
	IVEVLLMK	137	59	
	LFIGGLNTETNEK	91	57	
	GFAFVTFESPADAK	60	61	
RNPC2	IESIQLMMDSETGR	116	36	8%
	TDASSASSFLDSELER	16	94	
SART3	IQLIFER	150	38	4%
	SALQALEMDR	148	44	
	EFESAIVEAAR	133	85	
	LAEQYAYIDFEMK	12	60	
SNRPA1	SLTYLSILR	94	46	4%
SNRPG	HVQGILR	80	42	9%
SNRPN	VLGLVLLR	104	48	10%
	GENLVSMTEGPPPK	19	52	
SRP68	ALLQQQPEDDSKR	133	39	2%
SURF6	LLQEALK	65	48	2%
SYNCRIP	LFVGSIPK	120	44	2%

	TGYTLDVTTGQR	30	57	
<b><u>Other function</u></b>				
<b><i>Dehydrogenase activity</i></b>				
DPYD	VKEALSPIK	120	43	1%
<b><i>Ligase activity</i></b>				
MARS	ITQDIFQQLK	148	37	5%
	GFVLQDTVEQLR	145	62	
	FFGGYVPEMVLTPDDQR	5	40	
<b><i>Peptidase activity</i></b>				
SEC11L1	VGEIVVFR	107	70	4%
<b><i>Receptor activity</i></b>				
REEP6	NVKPSQTPQPK	150	77	6%
<b><i>Translation elongation factor activity</i></b>				
EEF1B2	SPAGLQVLNDYLADK	12	82	15%
	YGPADVEDTTGSGATDSK	28	74	
<b><u>Unknown function</u></b>				
EBNA1BP2 <sup>25,28,29</sup>	DLEWVER	95	38	14%
	QAQAAVLAVLPR	150	40	
	LDVTLGPVPEIGGSEAPAPQN			
	K	120	39	
GPIAP1	QILGVIDKK	150	38	1%
HDCMA18P	MGEEVIPLR	149	39	4%
	SSAVVELDLEGTR	147	38	
LOC389217	LSQMKNK	110	62	1%
MGC3731	DPLLSQR	120	72	3%
NOC2L	QLAIHLR	60	45	4%
	EIQLEISGK	106	38	
	LEDLNFPEIK	105	46	
NOC3L	LGQASLGVIK	142	76	8%
	SPLLPVLEGLAK	137	54	
	FYLENLEQMVK	77	38	
	YSSEVATESPLDFTK	84	40	
	SMLMEQDPDVAVTVR	6	47	

NOL10	QLTFTLKR	150	40	2%
	LLEQQELR	146	38	
NOLA3	VLMTQQPRPVL	139	45	17%
PES1	GSATNYITR	20	56	1%
RBM12B	YAFVMFK	145	38	16%
	GVGLGEALVK	149	44	
	NFPFDVTK	144	38	
	NLSLSIDER	124	44	
	FLGTEVLLR	150	67	
	AENPYLFLR	142	41	
	DSSVELFLSSK	148	77	
	GLPYLVNEDDVR	145	56	
	LLGLPFIAGPVDIR	108	42	
	DPPIYSVGAFENFR	67	42	
	FFADFLAEDDIYLLYDDK	90	40	
	FLYKDENRTR	43	40	
	RP13-36C9.1	VAVDPETVFK	144	
IFEMLEGVQGPTAVR		12	58	
SYNGR2	AGGSFDLR	90	42	4%

**Supplemental Table 3.** Nucleolar Interactors of RPS19.

<b>GENE</b>	<b>PROTEIN</b>	<b>YEAST GENE</b>
CM2	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin ( <i>S. cerevisiae</i> )	MCM2
MCM6	p105MCM (MCM6 minichromosome maintenance deficient 6)	MCM6
MCM7	p85MCM protein (MCM7 minichromosome maintenance deficient 7)	CDC47
GTPBP4	GTP/binding protein NGB (G protein binding CRFG)	NOG1
DDX5	growth regulated nuclear 68 protein (DEAD box polypeptide 5)	DBP2
DDX17 <sup>28</sup>	DDX17 protein	
DDX18	RNA helicase (DEAD box polypeptide 18)	HAS1
DDX21	RNA helicase II / Gu protein (DEAD box polypeptide 21)	
DDX24 <sup>29</sup>	DEAD box polypeptide 24	MAK5
DDX3X	dead box , X isoform (DEAD box polypeptide 3)	
DDX41	DEAD box protein abstrakt	
DDX50	DEAD box polypeptide 50 (Nucleolar protein GU2)	
DDX54	ATP/dependent RNA helicase (DEAD box polypeptide 54)	DBP10
DHX9	RNA helicase A (DEAH box polypep. 9)	
DHX15	DEAH box polypeptide 15	PRP43
RUVBL2 <sup>25</sup>	RuvB-like 2	RVB2
SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	ISW2
XRN2	Dhm1-like protein (5'-3' exoribonuclease 2)	RAT1
DKC1	Cbf5p homolog (dyskerin)	
PPIH	peptidyl prolyl isomerase H	
CSNK2A1 <sup>25</sup>	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	
SRP72	signal recognition particle 72	SRP72
SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145 kDa	CUS1
SFRS10	splicing factor arg/ser rich 10	
RPL10A <sup>25,28,29</sup>	60S ribosomal protein L10a	RPL1B
RPL14	60S ribosomal protein L14	RPL4B
RPL24	60S ribosomal protein L24	RPL24A
RPL27A <sup>25,28,29</sup>	60S ribosomal protein L27a	RPL28
RPL3 <sup>25,28,29</sup>	60S ribosomal protein L3	RPL3
RPL4 <sup>25,28,29</sup>	60S ribosomal protein L4	RPL4B

RPL6 <sup>25,28,29,32</sup>	60S ribosomal protein L6	RPL6B
RPL7 <sup>25,29</sup>	60S ribosomal protein L7	
RPL7A <sup>25,28,29,31</sup>	60S ribosomal protein L7a	RPL8B
RPL8 <sup>25,28</sup>	60S ribosomal protein L8	RPL2A
RPL9 <sup>25,28</sup>	60S ribosomal protein L9	RPL9B
RPLP2 <sup>25</sup>	60S acidic ribosomal protein P2	RPP2B
RPS10 <sup>25</sup>	40S ribosomal protein S10	RPS10A
RPS14 <sup>25,29</sup>	40S ribosomal protein S14	RPS14B
RPS16 <sup>25</sup>	40S ribosomal protein S16	RPS16A
RPS2 <sup>25,31</sup>	40S ribosomal protein S2	RPS2
RPS23 <sup>25</sup>	40S ribosomal protein S23	RPS23A
RPS24 <sup>25</sup>	40S ribosomal protein S24	RPS24B
RPS4X <sup>25</sup>	40S ribosomal protein S4, X-linked	RPS4A
RPS5 <sup>25,28,29</sup>	40S ribosomal protein S5	RPS5
RPS6	40S ribosomal protein S6	RPS6B
RPS7 <sup>25</sup>	40S ribosomal protein S7	RPS7A
RPS8 <sup>25,28,31</sup>	40S ribosomal protein S8	RPS8B
RPSA	ribosomal protein SA	RPS0A
RSL1D1	PBK1 protein	
BAZ1B <sup>25</sup>	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	
HNRPD <sup>25</sup>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D2	
ILF2 <sup>30</sup>	interleukin enhancer binding factor 2	
ILF3 <sup>30</sup>	nuclear factor associated with dsRNA NFAR-2	
TAF15 <sup>25</sup>	TLS protein (TBP-associated factor 15)	NPL3
TRIM28 <sup>25</sup>	tripartite motif-containing 28	
UBTF	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	
FTSJ3	FtsJ homolog 3 ( <i>E. coli</i> )	SPB1
NOL1	proliferating cell nuclear protein p120 (NOL protein 1)	NOP2
XPO1	exportin 1 (CRM1 homolog yeast)	CRM1
AATF <sup>25,28,29</sup>	Ded protein (Apoptosis antagonizing transcription factor )	BFR2
CCT2 <sup>25,29</sup>	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	CCT2
CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein zeta	MAK21
COPG	coatamer protein complex, subunit gamma 1	SEC21
FBL	fibrillarin, U3 small nucleolar interacting protein 1	NOP1

GNB2L1 <sup>25</sup>	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	
HIST1H1C <sup>25</sup>	Histone H1b	
HIST1H1D <sup>25</sup>	Histone H1 member 3	
HIST1H2AK <sup>25</sup>	Histone 1 H2Ak	
HIST1H2BL <sup>25</sup>	H2B histone family, member C	
HIST1H2BO <sup>25</sup>	Histone 1, H2bo	
HNRPA2B1 <sup>25,28,29</sup>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	
HNRPC <sup>25,30</sup>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	
HNRPDL <sup>25</sup>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (A+U-rich element RNA binding factor)	
HNRPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	
HNRPR <sup>25</sup>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	
HNRPU <sup>25,30</sup>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	
HP1BP3	HP1-BP74	
IMP3 <sup>28</sup>	U3 snoRNP protein 3 homolog	IMP3
ITGB4BP <sup>25,28,29</sup>	integrin beta 4 binding protein	TIF6
NCL	Nucleolin	
NIP7 <sup>29</sup>	60S ribosome subunit biogenesis	NIP7
NOLA1 <sup>25</sup>		GAR1
NOL5A <sup>25,28</sup>	hNop56	
PAK1IP1 <sup>25</sup>		MAK11
RBM19		MRD1
RBMX <sup>28</sup>	RNA binding motif protein, X-linked (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G)	
RNPC2	RNA-binding region containing protein 2	
SART3	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells 3	
SNRPA1 <sup>25,28</sup>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' (U2 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A')	
SNRPG <sup>25</sup>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	SMX2
SURF6 <sup>25,28</sup>	surfeit protein 6	RRP14
SYNCRIP	NS1 associated protein	
EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	
IPO4	importin 4	KAP123
EBNA1BP2 <sup>25,28,29</sup>	EBNA1 binding protein 2	
MGC3731	hypothetical protein LOC79159	
NOC2L <sup>28,29</sup>	nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae; hypothetical protein)	NOC2



NOC3L	nucleolar complex associated 3 homolog (S. cerevisiae)	NOC3
NOL10 <sup>29</sup>	nucleolar protein 10 (hypothetical protein FLJ14075)	ENP2
NOLA3 <sup>25</sup>	nucleolar protein family A, member 3	NOP10
PES1 <sup>25,28</sup>	Pescadillo homolog 1 containing BRCT domain	NOP7

**Supplemental Table 4.** Interactors found in the Pre-Ribosome Database.

GENE	PROTEIN	YEAST GENE	FOUND IN
AATF	Ded protein (Apoptosis antagonizing transcription factor )	BFR2	90S*, Pre 40S
COPG	Coatomer protein complex, subunit gamma 1	SEC21	Late 40S
DDX18	RNA helicase (DEAD box polypeptide 18)	HAS1	90S, Pre 60S, Late 60S
DDX24	DEAD box polypeptide 24	MAK5	90S, Pre 60S
DDX5	Growth regulated nuclear 68 protein (DEAD box polypeptide 5)	DBP2	90S, Late 40S, Late 60S
DDX54	ATP/dependent RNA helicase (DEAD box polypeptide 54)	DBP10	90S, Pre 60S
DHX15	DEAH box polypeptide 15	PRP43	90S, Pre 60S, Pre 40S
EBNA1BP2	EBNA1 binding protein 2	EBP2	90S, Pre 60S
FBL	Fibrillarin, U3 small nucleolar interacting protein 1	NOP1	90S, Pre 40S
FTSJ3	FtsJ homolog 3 ( <i>E. coli</i> )	SPB1	90S, Pre 60S
GTPBP4	GTP/binding protein NGB (G protein binding CRFG)	NOG1	90S, Pre 60S, Late 60S
IMP3	U3 snoRNP protein 3 homolog	IMP3	90S, Pre 40S
IPO4	Importin 4	KAP123	Late 60S
ITGB4BP	Integrin beta 4 binding protein	TIF6	90S, Pre 60S, Late 60S
MCM2	Minichromosome maintenance MCM2 deficient 2, mitotin ( <i>S. cerevisiae</i> )	MCM2	90S
MCM6	p105MCM (MCM6 minichromosome maintenance deficient 6)	MCM6	Pre 60S
NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein Nip7 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	NIP7	90S, Pre 60S, Late 60S
NOC2L	Nucleolar complex associated 2 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ; hypothetical protein DKFZp564C186.1)	NOC2	90S, Pre 60S, Late 60S
NOC3L	Nucleolar complex associated 3 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	NOC3	90S, Pre 60S
NOL1	Proliferating cell nuclear protein p120 (NOL protein 1)	NOP2	90S, Pre 60S, Late 60S
NOL5A	Nucleolar protein family A member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)	SIK1	90S, Pre 40S
NOLA1	hNop56	GAR1	90S
PAK1IP1	PAK/PLC-interacting protein 1	MAK11	Late 60S
PES1	Pescadillo homolog 1 containing BRCT domain	NOP7	90S, Pre 60S, Late 60S
RBM19	RNA binding motif 19	MRD1	Pre 40S
RPL8	60S ribosomal protein L8	RPL2A	Late 60S
RPLP2	60S acidic ribosomal protein P2	RPP2B	90S, Pre 40S

RPS23	40S ribosomal protein S23	RPS23A	Late 60S
TAF15	TLS protein (TBP-associated factor 15)	NPL3	90S
XAB1	XPA binding protein 1, GTPase	NPA3	90S, Late 60S, Late 40S
XRN2	Dhm1-like protein (5'-3' exoribonuclease 2)	RAT1	Late 60S

\*genes classified as “found in 90S” in the present table include those classified as “early-pre40S” and “early pre-60S” in the Database.

## **CAPITOLO 4**

# **PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA**

#### 4.1 SCOPO DEL LAVORO

Dal 2006 ad oggi, nei pazienti DBA sono state identificate mutazioni in *RPS24* (Gazda *et al.*, 2006a) e *RPS17* (Cmejla *et al.*, 2007), componenti della subunità minore del ribosoma, così come in *RPL35a* (Farrar *et al.*, 2008), *RPL5* e *RPL11* (Gazda *et al.*, 2008), facenti parte della subunità maggiore. Tali dati, in aggiunta alle già note mutazioni in *RPS19* (Draptchinskaia *et al.*, 1999), hanno permesso di classificare definitivamente la DBA tra le ribosomopatie.

Si è reso necessario quindi disporre di un modello che mimasse ciò che accade in una linea cellulare eritroide in condizioni di aploinsufficienza per una RP.

Il nostro piano sperimentale ha previsto quindi di analizzare le variazioni globali dell'espressione genica, sia a livello del trascrittoma sia del proteoma, in una linea cellulare in cui i livelli proteici di una RP fossero ridotti del 50% circa. Per fare questo, abbiamo scelto di utilizzare cellule TF-1 trasdotte con siRNA che aboliscono l'espressione di *RPS19* o con un siRNA *scramble*, utilizzato come controllo negativo. Ci siamo serviti di tale modello sperimentale perché sembra ben ricapitolare la condizione dei pazienti DBA (Miyake *et al.*, 2005), riservandoci di confermare i risultati ottenuti in linee cellulari downregolate anche per altre RP coinvolte nell'insorgenza della patologia.

Le differenze di espressione tra le cellule trasdotte con i siRNA contro *RPS19* rispetto a quelle con il siRNA *scramble* sono state valutate utilizzando tecniche ad alta resa: i *microarray* (piattaforma Affimetrix) hanno permesso di analizzare le variazioni a livello del trascrittoma, mentre la 2D-DIGE (2D *Differential In Gel Electrophoresis*) ha potuto evidenziare le proteine differenzialmente espresse.

Quello che ci siamo proposti di ottenere dall'utilizzo simultaneo di queste due tecniche è un quadro completo dei processi biologici maggiormente colpiti in cellule sottoposte a stress causato dalla ridotta quantità di una proteina ribosomale. La scelta di una linea cellulare eritroleucemica umana permette, inoltre, di sottolineare alterazioni patologiche tessuto-specifiche e questo potrebbe indicare la strada da seguire per capire come mutazioni in geni codificanti per proteine ubiquitariamente espresse possano provocare un fenotipo prevalentemente a livello del midollo osseo.

E' inoltre opportuno ricordare che tutte le malattie facenti parte del gruppo

IBMFS sono causate da mutazioni in proteine legate al ribosoma, quindi questo tipo di approccio potrebbe fornire dati di interesse non solo per quanto riguarda l'anemia di Diamond-Blackfan, ma anche per altre patologie simili.

## **4.2 MATERIALI E METODI**

### **4.2.1 LINEA CELLULARE**

Per questo lavoro sono state utilizzate cellule TF-1 trasdotte con due diversi siRNA (denominati in seguito siRNA 1 e siRNA 2) in grado di abolire l'espressione di RPS19 e con un siRNA *scramble* (SCR), utilizzato come controllo negativo. Le linee cellulari sono state ottenute mediante una collaborazione con il Prof. Stefan Karlsson (Università di Lund, Svezia; Miyake *et al.*, 2005).

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) al 10% di siero fetale bovino (Invitrogen Gibco), addizionato di antibiotici (100 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomina) e di 5 ng/ml di GM-CSF (R&D Systems), in un incubatore a 37 °C con atmosfera satura di vapore acqueo e al 5% di CO<sub>2</sub>.

Per indurre l'attivazione trascrizionale dei siRNA, le cellule sono state trattate con 0,5 µg/ml di doxiciclina (Sigma-Aldrich).

### **4.2.2 CURVE DI DOWNREGOLAZIONE**

Per la nostra indagine, abbiamo deciso di utilizzare condizioni sperimentali in cui i livelli proteici di RPS19 fossero ridotti del 50% circa. Per scegliere le condizioni ottimali, le cellule TF-1 siRNA 1, 2 e SCR sono state trattate con doxiciclina per sei giorni. Dal giorno 0 al giorno 6, 10<sup>5</sup> cellule sono state raccolte e lisate in *sample buffer* (750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5% SDS, 40% glicerolo, 10% β-mercaptoetanol). Questo lisato è stato successivamente caricato su un gel SDS-PAGE al 12,5% di acrilammide e trasferito su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad). Per determinare l'entità della diminuzione di RPS19, la proteina è stata rilevata con un anticorpo monoclonale specifico fornito dal Prof. Fabrizio Loreni (Università "Tor Vergata", Roma). Il controllo della quantità di proteine caricate sul gel è stato effettuato mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-β-actina (Sigma-Aldrich) seguendo le specifiche tecniche suggerite dal produttore. I risultati sono stati quantificati mediante il *software* informatico

Quantity One (Bio-Rad), che ha permesso la normalizzazione dei dati.

#### 4.2.3 ESTRAZIONE DELL'RNA, MICROARRAY ED ANALISI DEI DATI

Questo lavoro è stato effettuato in collaborazione con il Prof. Stefano Gustincich (SISSA, Trieste).

Dopo aver somministrato la doxiciclina per 3 giorni alle TF-1 siRNA 2 e per 4 giorni alle TF-1 siRNA 1 e SCR, per tutte e tre le linee cellulari sono state raccolte  $5 \times 10^6$  cellule, da cui è stato estratto l'RNA totale utilizzando il TRIzol® Reagent (Invitrogen) secondo le istruzioni fornite dal produttore; l'RNA è stato successivamente purificato con il RNeasy Mini Kit (QIAGEN), sottoposto al controllo qualità mediante l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) e quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Per ogni linea cellulare sono stati preparati due replicati biologici. 6 µg di ogni campione sono stati marcati e amplificati secondo il protocollo standard sviluppato da Affymetrix. L'RNA marcato è stato ibridato su un Affymetrix GeneChip Human Genome U133A 2.0 Array contenente oltre 18.000 trascritti. Gli *array* ibridati sono stati colorati, lavati (GeneChip Fluidics Station 450) e successivamente analizzati (GeneChip Scanner 3000 7G). Il rilevamento delle sonde ed i valori di intensità sono stati calcolati dai dati grezzi utilizzando l'Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS). Ulteriori processamenti dei dati sono stati effettuati in ambiente R (<http://www.r-project.org/>) utilizzando pacchetti dal progetto BioConductor software (<http://www.bioconductor.org/>). E' stata inoltre applicata la normalizzazione Robust Multi-Array Average (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003). I dati normalizzati sono stati filtrati in base al rilevamento delle sonde, in modo che solo le sonde che danno il segnale "*Present*" in almeno un *array* vengano incluse nell'analisi (McClintick e Edenberg, 2006). Sonde con valori di intensità inferiori a 100 in tutti gli *array* sono state escluse dall'analisi statistica. I dati sono quindi stati importati nel *software* MultiExperiment Viewer (MeV) (Saeed *et al.*, 2003) e l'analisi statistica è stata effettuata mediante il modulo SAM (Significance Analysis of Microarrays; Tusher *et al.*, 2001), implementato come descritto sul sito web <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>. E' stato applicato un False Discovery Rate (FDR)

del 10% per identificare i geni differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa nelle cellule trasdotte con i siRNA contro RPS19 rispetto a quelle con il siRNA SCR. L'analisi funzionale dei geni differenzialmente espressi è stata effettuata mediante l'uso del *software* Ingenuity Pathways Analysis (<http://www.ingenuity.com/>).

#### 4.2.4 REAL-TIME RT-PCR

I risultati ottenuti dal *microarray* sono stati validati mediante qRT-PCR, analizzando indipendentemente le linee cellulari TF-1 siRNA 1 e 2. Sono stati scelti 7 geni (*CCND2*, *EIF4B*, *EPOR*, *FTH1*, *GARS*, *LTA4H*, *MYC*) rappresentativi di un ampio *range* di variazione di espressione tra le cellule con il siRNA SCR e quelle con i siRNA contro RPS19.

500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA mediante il High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) e utilizzando dei *random primers*. Alla Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) sono stati aggiunti 1 µl di cDNA e *primer* specifici elencati in tabella 4.1, ottenendo una miscela di reazione dal volume finale di 25 µl; la qPCR è stata effettuata mediante lo strumento AbiPrism®7000 (Applied Biosystems). Per tutti gli esperimenti, ogni campione di cDNA è stato analizzato in triplicato. I valori di Ct sperimentali sono stati normalizzati sul gene della β-actina, che è stato utilizzato come controllo endogeno in quanto l'analisi mediante *microarray* non ha evidenziato variazioni di espressione. I valori dell'espressione genica sono stati calcolati utilizzando come calibratore le cellule TF-1 siRNA SCR, con la formula  $2^{-ddCt}$ , dove  $dCt$  è  $Ct_{gene} - Ct_{endo}$  e  $ddCt$  è  $dCt_{TF-1(1-2)} - dCt_{TF-1(SCR)}$ . Le differenze nell'espressione genica nelle cellule contenenti il siRNA SCR rispetto a quelle con i siRNA contro RPS19 sono state analizzate mediante il *t* test per campioni indipendenti.



**Tabella 4.1** Primer utilizzati nella Real-Time PCR.

GENE	PRIMER	SEQUENZA
<i>EPOR</i>	Forward	ATCCTCGTGGTCATCCTG
	Reverse	CCTTCAAACCTCGCTCTCTG
<i>FTH1</i>	Forward	GAACTACCACCAGGACTCAG
	Reverse	TGAGATTGGTGAAGAAAGTATTTGG
<i>MYC</i>	Forward	TTCGGGTAGTGAAAACCAG
	Reverse	CTGCTGCTGGTAGAAGTTC
<i>EIF4B</i>	Forward	CTCTTCCCTCTCCCAACAT
	Reverse	CATAGGTGCTTCTCCACC
<i>GARS</i>	Forward	GATGTCTGATAAGAAGTGTCTGTC
	Reverse	AGACTGGAGGGGATAGAT
<i>LTA4H</i>	Forward	CTC ACG GTC CAG TCT CAG
	Reverse	TCCCTTGTAACCTTGTCTTTCTCC
<i>CCND2</i>	Forward	TTGTGATGCC CTGACTGAGC
	Reverse	GTTGGTCCTGACGGTACGG

#### 4.2.5 ESTRATTO PROTEICO, 2D-DIGE ED ANALISI DEI DATI

Questa parte del lavoro è stata effettuata in collaborazione con la Prof.<sup>SSA</sup> Margherita Ruoppolo (Università “Federico II”, Napoli).

Dopo 4 giorni di trattamento con doxiciclina,  $10^7$  cellule sono state raccolte e lisate nel tampone di lisi (7 M urea, 2 M tiourea, 30 mM Tris-HCl pH 8.5, 4% CHAPS (w/v), 1x Complete EDTA free (Roche Applied Science)). I *debris* cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a freddo a 14.000 rpm per 30 minuti; le proteine contenute nel sovrantante sono state poi precipitate con il 2D Clean Up Kit (GE Healthcare) e risospese in 100  $\mu$ l di Resuspension Buffer (7 M urea, 2 M tiourea, 30 mM Tris-HCl pH 8.5, 4% CHAPS (w/v)).

Per evitare di avere artefatti dovuti all’eterogeneità dei campioni, sono stati preparati quattro replicati biologici per ogni linea cellulare. Gli otto campioni sono quindi stati marcati con Cy2, Cy3 e Cy5 seguendo il protocollo del Ettan DIGE User Manual (18-1173-17, GE Healthcare). Per dare significatività statistica alla nostra analisi sono stati quindi fatti quattro gel indipendenti.

50  $\mu$ g di lisato di TF-1 siRNA 1 e TF-1 siRNA SCR sono stati marcati con 400 pmol di Cy3 o Cy5. Per evitare che i risultati venissero alterati da artefatti causati dalla marcatura, il Cy3 e Cy5 sono stati randomizzati tra i lisati. Ogni coppia di campioni marcata con Cy3/Cy5 è stata poi unita ad uno standard (ottenuto

dalla miscela in parti eguali di tutti gli otto campioni analizzati) marcato con Cy2. I campioni marcati sono stati quindi preparati per l'analisi mediante 2D-DIGE e fatti correre insieme sullo stesso gel, utilizzando un *range* di pH tra 4 e 7. Le *strip* IPG sono state reidratate, in assenza del campione proteico, con 350  $\mu$ l di tampone di reidratazione (350  $\mu$ l DeStreak Rehydration Solution, 0.5% Pharmalyte, 0.5% tampone IPG) per 16 ore a temperatura ambiente e successivamente trasferite nel sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) per l'*isoelectric focusing*. In seguito, le proteine sono state ridotte con l'Equilibration Buffer (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 30% glicerolo (v/v), 2% SDS, 0.5% DTT) per 15 minuti. Infine, sono state alchilate per 15 minuti in un tampone contenente 4,5% di iodoacetammide (IAA) e separate nella seconda dimensione. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato acquisito in uno scanner Typhoon 9400 (GE Healthcare). L'immagine è stata analizzata con il Decyder software, versione 5.2 (GE Healthcare). Il rilevamento e la quantificazione degli *spot* sono stati effettuati mediante il modulo Differential In-Gel (DIA), mentre l'associazione proteina/*spot* in gel diversi è stata fatta mediante il modulo Biological Variation Analysis (BVA). L'intensità degli *spot* è stata comparata tra i due tipi cellulari e l'analisi con il *t* test di Student ha permesso di evidenziare le differenze statisticamente significative. Solo quegli *spot* la cui differenza di intensità, dopo la normalizzazione, risultava maggiore di 1,20 volte (*t* test:  $p < 0.05$ ) sono stati considerati statisticamente significativi. L'identificazione mediante spettrometria di massa è stata effettuata come indicato in Orrù *et al.*, 2007.

#### 4.2.6 VALIDAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI DALLA 2D-DIGE

Per validare i risultati ottenuti dall'analisi 2D-DIGE abbiamo downregolato nuovamente le cellule, che sono state lisate in *sample buffer*.

Dopo separazione mediante SDS-PAGE e trasferimento su una membrana di nitrocellulosa, le proteine annessina VII,  $\beta$ -actina, lamina B1, nucleolina e vinculina sono state rilevate con specifici anticorpi (Sigma-Aldrich per la  $\beta$ -actina, Santa Cruz Biotechnologies per tutte le altre) utilizzati seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

I dati sono stati normalizzati sul GAPDH, rilevato con un anticorpo specifico (Sigma-Aldrich) utilizzato come suggerito dalla ditta produttrice.

### 4.3 RISULTATI

Le curve di downregolazione da noi disegnate ci hanno permesso di individuare, per ogni linea cellulare, la durata ottimale del trattamento con doxiciclina per poter avere una riduzione del 50% circa dei livelli proteici di RPS19 (dato non mostrato). Gli esperimenti descritti in seguito sono stati quindi effettuati downregolando le cellule TF-1 siRNA 1 e SCR per 4 giorni, mentre per le cellule TF-1 siRNA 2 la durata del trattamento è stata di soli 3 giorni.

#### 4.3.1. PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA – ANALISI DEL TRASCRITTOMA

Per identificare i geni la cui espressione viene modificata dalla downregolazione di RPS19, è stato effettuato uno studio di espressione su tutto il genoma, utilizzando gli *array* Affymetrix GeneChip Human Genome U133A 2.0, che hanno permesso di analizzare 18.400 trascritti, tra cui 14.500 geni ben caratterizzati. L'analisi è stata eseguita su due linee cellulari TF-1 trasdotte con un siRNA in grado di ridurre i livelli intracellulari di RPS19 (TF-1 siRNA 1 e 2); le due linee cellulari sono state considerate come replicati biologici. Il controllo negativo è invece costituito da cellule TF-1 trasdotte con un siRNA SCR (TF-1 siRNA SCR). Sono state incluse nell'analisi statistica soltanto quelle sonde che hanno dato un segnale "Present" e intensità superiore a 100 in tutti gli *array*. È stata così generata una lista di 192 sonde differenzialmente espresse in maniera statisticamente significativa, delle quali 121 risultano upregolate e 71 downregolate nelle cellule TF-1 siRNA 1 e 2 rispetto al controllo; i risultati sono mostrati in tabella 4.2. Tali sonde corrispondono a 165 geni, dei quali 104 sono upregolati e 61 downregolati nelle cellule TF-1 siRNA 1 e 2 rispetto a quelle di controllo.

Per individuare le funzioni molecolari ed i processi biologici alterati nelle cellule TF-1 trasdotte con i siRNA 1 e 2 rispetto a quelle trasdotte con il siRNA SCR, abbiamo analizzato i dati ottenuti mediante il *software* Ingenuity Pathways Analysis. Tale elaborazione ha identificato un arricchimento statisticamente

significativo dei geni appartenenti alle seguenti vie metaboliche (tabella 4.3): metabolismo dell'azoto (*ASNS, CA2, CCDC92, CTH, GLS*), metabolismo di glicina, serina e treonina (*CTH, GARS, PSAT1, PHGDH, SHMT2*), trasduzione del segnale degli eicosanoidi (*LTA4H, LTC4S, PTGS1, TBXA2R, TBXAS1*), metabolismo del glutammato (*CCDC92, EPRS, GLS*), metabolismo degli amminozuccheri (*CYB5R4, HK1, GM2A*).

Inoltre, l'analisi delle funzioni molecolari dei geni annotati ha rivelato, come mostrato in tabella 4.4, un arricchimento in geni implicati nelle seguenti funzioni biologiche: morte cellulare (58 geni), malattie genetiche (76 geni), morfologia tissutale (32 geni), crescita e proliferazione cellulare (60 geni), malattie ematologiche (32 geni).

Per validare i dati ottenuti dall'analisi mediante *microarray*, abbiamo selezionato sette geni scelti tra quelli differenzialmente espressi nelle cellule TF-1 siRNA 1 e 2 rispetto alle cellule di controllo, per i quali sono stati effettuati degli esperimenti di *Real-Time* RT-PCR sugli stessi campioni utilizzati per l'analisi mediante *microarray*. E' stata quindi confermata l'espressione di *CCND2, EPOR* e *FTH1*, upregolati nelle cellule trasdotte con i siRNA 1 e 2 rispetto alle cellule TF-1 siRNA SCR, e di *EIF4B, GARS, LTAH4* e *MYC*, che invece risultano downregolati. Tutti i geni sono risultati differenzialmente espressi in maniera statisticamente significativa nelle cellule interferite rispetto a quelle di controllo. La figura 4.1 mostra il confronto tra le variazioni ottenute con qRT-PCR ed i risultati del *microarray*; i dati presentano una variazione nella stessa direzione per tutti i geni esaminati, indipendentemente dalla tecnica utilizzata.

**Tabella 4.2** Risultati dell'ibridazione dell'RNA estratto da cellule TF-1 trasdotte con i siRNA 1, 2 e SCR sul *microarray* Affimetrix.

GENE NAME	GENE SYMBOL	FC
ribosomal protein S19	RPS19	0,11
ribosomal protein S19	RPS19	0,13
asparagine synthetase	ASNS	0,23
phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	0,29
phosphoserine aminotransferase 1	PSAT1	0,29
cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	CTH	0,30
carbonic anhydrase II	CA2	0,31
cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	CTH	0,33
solute carrier family 38, member 1	SLC38A1	0,38
leucine rich repeat neuronal 3	LRRN3	0,39
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	HMGCS1	0,41
inhibin, beta E	INHBE	0,42
leucine rich repeat neuronal 3	LRRN3	0,43
ring finger protein 144	RNF144	0,43
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	DNAJC12	0,46
leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	0,47
neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, Watson disease)	NF1	0,48
acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	ACACA	0,49
Abelson helper integration site 1	AHI1	0,49
chromatin licensing and DNA replication factor 1	CDT1	0,50
MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 ( <i>S. cerevisiae</i> )	MCM4	0,50
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	HMGCS1	0,50
chromosome 7 open reading frame 23	C7orf23	0,51
eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	0,52
lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	LPGAT1	0,52
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, $\gamma^+$ system), member 5	SLC7A5	0,54
monocyte to macrophage differentiation-associated	MMD	0,54
polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa	POLR1D	0,55
thyroglobulin	TG	0,55
glioma tumor suppressor candidate region gene 2	GLTSCR2	0,55
ubiquitin protein ligase E3B	UBE3B	0,56
target of myb1 (chicken)-like 1	TOM1L1	0,56
dUTP pyrophosphatase	DUT	0,56
pleckstrin and Sec7 domain containing 3	PSD3	0,57
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BCL2L11	0,57
phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	PDE4DIP	0,57
glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	EPRS	0,58
pantothenate kinase 3	PANK3	0,59
c-myc binding protein	MYCBP	0,59

ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)	ELOVL5	0,59
minichromosome maintenance deficient 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	MCM6	0,60
serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	SHMT2	0,60
ring finger protein 10	RNF10	0,60
transmembrane protein 97	TMEM97	0,60
kinesin 2	KNS2	0,60
cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	ARPP-19	0,60
glycyl-tRNA synthetase	GARS	0,60
ribosomal protein L22	RPL22	0,61
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2	0,61
exonuclease NEF-sp	LOC81691	0,61
ribosomal protein L13a	RPL13A	0,62
NA	NA	0,62
dermatan sulfate epimerase	DSE	0,62
EH domain binding protein 1	EHBP1	0,62
histone cluster 3, H2a	HIST3H2A	0,62
protein phosphatase 4, regulatory subunit 2	PPP4R2	0,63
cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1	CYP2R1	0,63
ribosomal protein L3	RPL3	0,63
nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	NPAT	0,64
kinesin family member 1B	KIF1B	0,64
tetratricopeptide repeat domain 17	TTC17	0,65
transmembrane protein 97	TMEM97	0,65
24-dehydrocholesterol reductase	DHCR24	0,66
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	SLC25A6	0,67
ribosomal protein L3	RPL3	0,68
v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	0,69
ankyrin repeat and KH domain containing 1	ANKHD1	0,69
pituitary tumor-transforming 1	PTTG1	0,69
ribosomal protein L3	RPL3	0,71
ribosomal protein L3	RPL3	0,71
ribosomal protein L3	RPL3	0,71
FOS-like antigen 1	FOSL1	1,41
E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	ELF4	1,41
transmembrane protein 39B	TMEM39B	1,42
solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1 (antiporter, Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> , amiloride sensitive)	SLC9A1	1,43
thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)	TBXAS1	1,43
G protein pathway suppressor 2	GPS2	1,44
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	CYP26A1	1,44
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type	PIP5K1B	1,45

I, beta		
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFIT3	1,46
protein arginine methyltransferase 2	PRMT2	1,46
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	PRPS1	1,48
paraspeckle component 1	PSPC1	1,48
microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	MAPRE1	1,48
NA	NA	1,49
caspace 2, apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	CASP2	1,51
thromboxane A2 receptor	TBXA2R	1,51
inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	INPP5A	1,52
chromosome 19 open reading frame 28	C19orf28	1,52
SLC2A4 regulator	SLC2A4RG	1,54
dachshund homolog 1 (Drosophila)	DACH1	1,55
dual specificity phosphatase 6	DUSP6	1,55
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	SH3BGRL3	1,55
zinc finger protein 395	ZNF395	1,55
integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	ITGA4	1,56
NA	NA	1,56
linker for activation of T cells	LAT	1,56
dedicator of cytokinesis 4	DOCK4	1,56
differentially expressed in FDCP 6 homolog (mouse)	DEF6	1,56
coiled-coil domain containing 69	CCDC69	1,57
copine I	CPNE1	1,58
adipose differentiation-related protein	ADFP	1,59
methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)	MECP2	1,59
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	1,59
neurocalcin delta	NCALD	1,60
chromosome 9 open reading frame 95	C9orf95	1,60
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	1,61
carbohydrate (chondroitin) synthase 1	CHSY1	1,61
prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	PTGS1	1,61
GM2 ganglioside activator	GM2A	1,61
tropomyosin 1 (alpha)	TPM1	1,61
lysine-rich coiled-coil 1	KRCC1	1,61
cut-like 1, CCAAT displacement protein (Drosophila)	CUTL1	1,62
ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	1,63
IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)	IKZF1	1,64
interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	1,64
lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	LGALS1	1,64
hexokinase 1	HK1	1,64
maternally expressed 3	MEG3	1,65
PYD and CARD domain containing	PYCARD	1,65

dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	1,65
GM2 ganglioside activator	GM2A	1,66
zinc finger protein 467	ZNF467	1,66
EMI domain containing 1	EMID1	1,67
methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome)	MECP2	1,67
cytochrome b5 reductase 4	CYB5R4	1,68
coiled-coil domain containing 92	CCDC92	1,69
plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	1,69
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	1,69
hypothetical protein MGC14376	MGC14376	1,69
PDZ and LIM domain 7 (enigma)	PDLIM7	1,69
centaurin, delta 3	CENTD3	1,70
tribbles homolog 2 (Drosophila)	TRIB2	1,70
hypothetical protein FLJ11286	FLJ11286	1,70
filamin A interacting protein 1-like	FILIP1L	1,71
mitochondrial ribosomal protein S10	MRPS10	1,72
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F	PIGF	1,73
Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 1, p53 binding protein (mouse)	MDM1	1,73
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	EIF2S1	1,73
erythropoietin receptor	EPOR	1,76
cyclin D2	CCND2	1,77
myeloid differentiation primary response gene (88)	MYD88	1,77
coiled-coil domain containing 47	CCDC47	1,77
potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3	KCNMB3	1,77
hypothetical protein FLJ10357	FLJ10357	1,78
vav 1 oncogene	VAV1	1,79
leukotriene C4 synthase	LTC4S	1,80
peter pan homolog (Drosophila)	PPAN	1,80
RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	RASGRP2	1,81
brain abundant, membrane attached signal protein 1	BASP1	1,81
leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	LAIR1	1,82
integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	ITGAM	1,82
Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	FCER1A	1,82
homeobox A1	HOXA1	1,84
interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	ISGF3G	1,85
plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	1,85
early growth response 1	EGR1	1,85
glutaminase	GLS	1,86
interleukin 15 receptor, alpha	IL15RA	1,86
protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	PTPRD	1,89



pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	1,92
ferritin, heavy polypeptide pseudogene 1	FTHP1	1,93
transmembrane protein 158	TMEM158	1,95
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	NR1H3	1,95
insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	1,96
natural killer cell group 7 sequence	NKG7	1,96
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	1,97
dual specificity phosphatase 6	DUSP6	1,98
glutaminase	GLS	2,00
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F	PIGF	2,00
thromboxane A2 receptor	TBXA2R	2,00
dual specificity phosphatase 6	DUSP6	2,00
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	2,01
cyclin D1	CCND1	2,01
KIAA0125	KIAA0125	2,01
chromosome X open reading frame 9	CXorf9	2,06
myeloproliferative leukemia virus oncogene	MPL	2,08
angiopoietin 1	ANGPT1	2,11
wingless-type MMTV integration site family, member 11	WNT11	2,12
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K	PIGK	2,12
TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	2,19
cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	CDH2	2,23
plasmalemma vesicle associated protein	PLVAP	2,23
Src-like-adaptor	SLA	2,23
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	2,29
ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	2,30
angiopoietin 1	ANGPT1	2,38
deiodinase, iodothyronine, type II	DIO2	2,39
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	SEMA3C	2,50
G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	GPR37	2,54
neuropilin 1	NRP1	2,75
NA	NA	3,00

**Tabella 4.3** Analisi mediante il *software* Ingenuity Pathway Analysis dei risultati ottenuti dal *microarray*; *canonical pathways*.

<b>Ingenuity Canonical Pathways</b>	<b>-Log(P- value)</b>	<b>Ratio</b>	<b>Molecules</b>
Nitrogen Metabolism	3,88E+00	3,76E-02	CA2, GLS, CCDC92, CTH, ASNS
Glycine, Serine and Threonine Metabolism	3,24E+00	3,47E-02	PSAT1, PHGDH, GARS, CTH, SHMT2
Eicosanoid Signaling	3,24E+00	5,95E-02	LTA4H, LTC4S, TBXA2R, PTGS1, TBXAS1
Glutamate Metabolism	2,11E+00	3,85E-02	GLS, CCDC92, EPRS
Aminosugars Metabolism	1,68E+00	2,88E-02	HK1, CYB5R4, GM2A

**Tabella 4.4** Analisi mediante il *software* Ingenuity Pathway Analysis dei risultati ottenuti dal *microarray*; *top biological functions*.

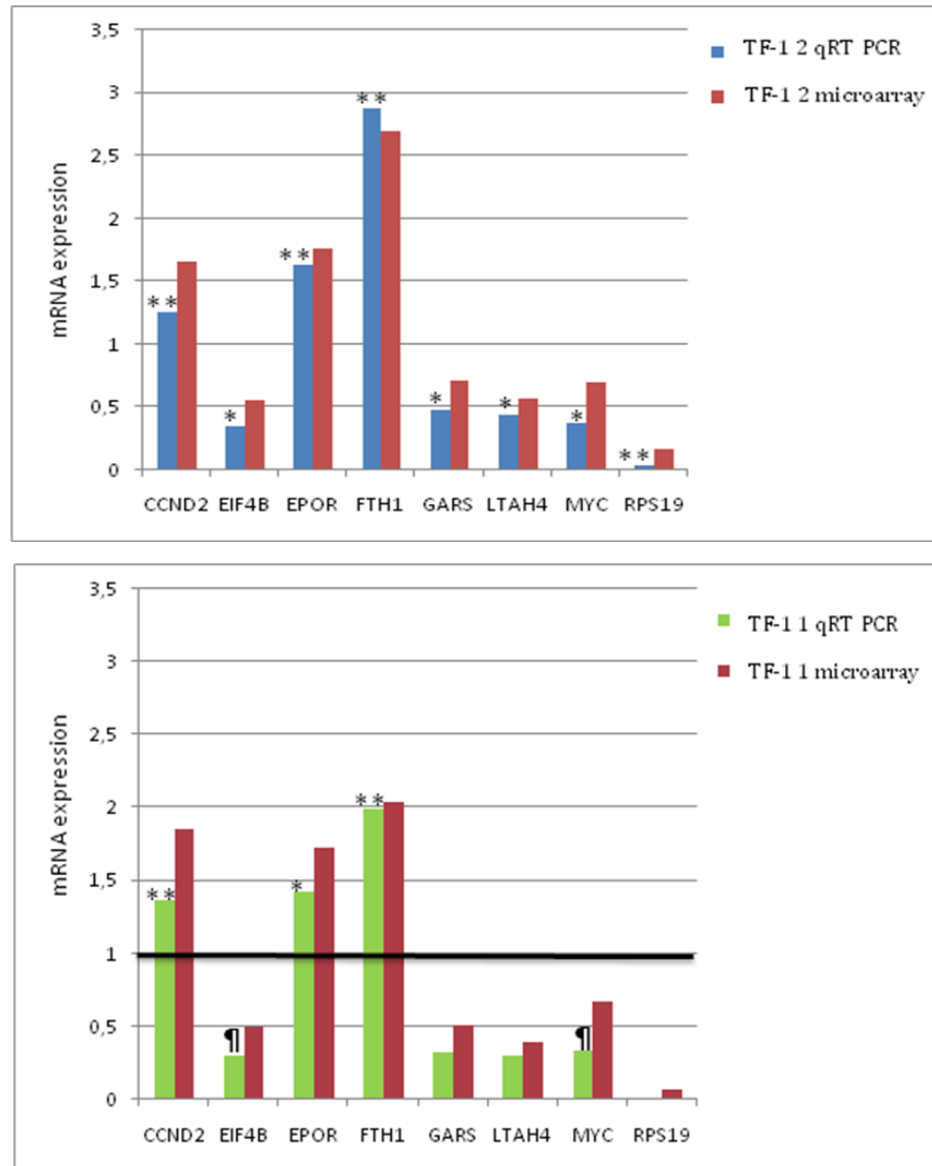
Category	P-value	Molecules
Cell Death	8,76E-07-1,28E-02	IL15RA, KIF1B, PTTG1, SH3BGRL3, FCER1A, CCND1, SLC9A1, MYC, SLC25A6, GPR37, TRIB2, FOSL1, ITGA4, LAIR1, GPS2, EPOR, IRF9, CDH2, CCND2, ITGAM, CASP2, DACH1, VAV1, ACACA, TMEM158, HOXA1, NRP1, FTH1, TPM1, CA2, PYCARD, DUSP6, TBXA2R, IKZF1, ARAP3, IGFBP7, INPP5A, EIF2S1, ASNS, DEF6, IRAK1, ELF4, HK1, MPL, DUT, PRMT2, ANGPT1, TYROBP, MYD88, EGR1, PTGS1, PLAUR, NF1, DHCR24, CTH, BCL2L11, WNT11, LGALS1
Genetic Disorder	4,25E-06-1,28E-02	KLC1, MCM6, IL15RA, KIF1B, CYP26A1, UBE3B, PTTG1, GARS, FCER1A, PIP5K1B, SLC9A1, CCND1, MYC, ZNF395, PRPS1, SLC25A6, GPR37, SLC7A5, FOSL1, NKG7, TMEM97, ITGA4, RPL3, GPS2, EPOR, GM2A, BASP1, NR1H3, EPRS, CDH2, PDLIM7, CCND2, ITGAM, AHI1, LTC4S, VAV1, TBXAS1, RPL13A, HOXA1, FTH1, TG, RNF10, CA2, TPM1, DUSP6, TBXA2R, IKZF1, IGFBP7, INPP5A, EIF2S1, MCM4, MPL, ARPP-19, PHGDH, CYP2R1, PSAT1, PDE4DIP, ANGPT1, MECP2, MYD88, TYROBP, MAPRE1, EGR1, PTGS1, RPS19, PLAUR, GDAP1, MMD, CUX1, NF1, DHCR24, CTH, WNT11, BCL2L11, EHP1, LGALS1
Cellular Growth and Proliferation	7,46E-06-1,28E-02	IL15RA, PTTG1, PBX1, DOCK4, CCND1, MYC, SLC25A6, TCEB3, SLC7A5, FOSL1, EIF4B, RASGRP2, IFIT3, LAIR1, EPOR, PIGF, NR1H3, CDH2, ITGAM, CCND2, CASP2, DACH1, VAV1, ACACA, HOXA1, FTH1, TG, NRP1, TPM1, CDT1, DUSP6, TBXA2R, IKZF1, IGFBP7, TOM1L1, IRAK1, DEF6, SASH3, HK1, ELF4, GLTSCR2, MPL, ADFP, MEG3, MYCBP, ANGPT1, MECP2, MYD88, MAPRE1, EGR1, PTGS1, RPS19,

Hematological  
Disease

1,11E-05-1,28E-02

PLAUR, CUX1, DHCR24, NF1, CTH,  
BCL2L11, WNT11, LGALS1

IL15RA, PYCARD, PTTG1, TBXA2R,  
FCER1A, PBX1, IKZF1, CCND1, DEF6,  
MYC, MPL, RASGRP2, ITGA4, LAIR1,  
ANGPT1, TYROBP, EPOR, NPAT,  
MYD88, EGR1, PTGS1, RPS19,  
PLAUR, ITGAM, CCND2, NF1, CASP2,  
VAV1, BCL2L11, FTH1, LGALS1,  
NRP1



**Figura 4.1** Confronto tra le variazioni ottenute mediante qRT-PCR e *microarray*. Un *t* test a due code per campioni indipendenti è stato calcolato sui valori di Ct ottenuti mediante qRT-PCR delle TF-1 siRNA 1 e TF-1 siRNA 2 confrontati con quelli delle TF-1 siRNA SCR (n=6). Sono riportati i livelli di variazione dell'espressione degli mRNA relativamente al controllo (posto pari a 1). I dati sono stati normalizzati utilizzando la  $\beta$ -actina come controllo endogeno. ¶  $p < 0.05$ ; \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$

#### 4.3.2. PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA – ANALISI DEL PROTEOMA

Per le analisi di espressione genica a livello del proteoma è stato scelto di utilizzare solo due linee cellulari: le TF-1 siRNA 1 e le TF-1 siRNA SCR trattate per 4 giorni con doxyciclina. Per effettuare questa analisi,  $10^7$  cellule TF-1 siRNA 1 e una pari quantità di cellule TF-1 siRNA SCR sono state downregolate per RPS19 come sopra descritto e sono successivamente state lisate come indicato in §4.2.5. I campioni sono stati poi separati mediante un gel bidimensionale, che ha fornito il *pattern* di *spot* rappresentato in figura 4.2. In totale, sono stati ottenuti 94 *spot* differenzialmente espressi nelle cellule TF-1 siRNA 1 rispetto alle TF-1 siRNA SCR. Ognuno di questi è stato analizzato tramite spettrometria di massa e, mediante un opportuno *software* informatico, sono state identificate 80 proteine. Dato che alcuni *spot* corrispondevano ad un'identificazione proteica multipla (tabella 4.5), solo a 77 di loro (corrispondenti a 53 proteine) è stato possibile assegnare una variazione di *fold-change* (tabella 4.6).

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante il programma bioinformatico Ingenuity Pathway Analysis, che ha permesso di clusterizzare tali risultati come indicato in tabella 4.7. Tale analisi ha evidenziato che i *pathway* maggiormente colpiti dall'aploinsufficienza di RPS19 riguardano le vie di trasduzione del segnale che regolano le funzioni di seguito descritte: la diapedesi leucocitaria (*ACTB*, *ACTG1*, *ACTN4*, *MSN*, *RAP1A*, *RAP1B*, *VCL*), le integrine (*ACTB*, *ACTG1*, *ACTN4*, *RAP1A*, *RAP1B*, *TLN1*, *VCL*), il citoscheletro actinico (*ACTB*, *ACTG1*, *ACTN4*, *MSN*, *MYH9*, *VCL*), le giunzioni occludenti (*ACTB*, *ACTG1*, *MYH9*, *SPTAN1*, *VCL*) ed i fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (*ACTB*, *ACTG1*, *ACTN4*, *VCL*).

Inoltre, l'analisi delle funzioni molecolari dei geni annotati ha rivelato, come mostrato in tabella 4.8, un arricchimento in geni implicati nel cancro (40 geni), nelle malattie gastrointestinali (17 geni), nella modificazione post-traduzionale (8 geni), nel *fold*ing delle proteine (6 geni), nelle malattie genetiche (35 geni).

Per validare i dati ottenuti dall'analisi mediante 2D-DIGE, abbiamo selezionato cinque proteine (annexina VII,  $\beta$ -actina, lamina B1, nucleolina e vinculina) scelte tra quelle che risultavano differenzialmente espresse nelle cellule TF-1

siRNA 1 rispetto alle TF-1 siRNA SCR. Queste sono state analizzate mediante western-blot utilizzando anticorpi specifici (figura 4.3).

L'annessina VII è stata identificata in uno *spot* ad identificazione multipla, insieme alla ornitina aminotransferasi (gene *OAT*). Il *fold-change* assegnato allo *spot* è pari a -1,61, ma da questo dato non possiamo risalire all'entità della variazione di ciascuna delle due proteine. Dall'analisi mediante western-blot riscontriamo una diminuzione dell'annessina VII e, per il futuro, ci proponiamo di verificare con questo metodo anche la variazione dell'espressione dell'ornitina aminotransferasi.

Per quanto riguarda la  $\beta$ -actina, non è stato invece possibile evidenziare, mediante il western-blot, le variazioni proteiche osservate con la 2D-DIGE.

Recentemente è stato pubblicato un articolo scientifico (Petra $\acute{c}$  *et al.*, 2008) in cui gli autori si sono occupati di verificare quali proteine risultino essere differenzialmente espresse più di frequente negli esperimenti di 2D-DIGE. Tra queste si trova la  $\beta$ -actina. È importante osservare che le proteine citate in Petra $\acute{c}$  *et al.* sono molto abbondanti nella cellula, quindi ci si attende che le loro variazioni siano più facilmente identificabili rispetto a variazioni di proteine meno espresse. Proprio il fatto che questa proteina sia così abbondante nella cellula rende però difficile la visualizzazione delle sue variazioni mediante western-blot, perché si rischia di avere un segnale a saturazione. L'utilizzo di un gel bidimensionale potrebbe essere, anche in questo caso, una buona soluzione. Infatti la  $\beta$ -actina è stata identificata in più *spot*, che però nel nostro gel SDS-PAGE confluiscono in una sola banda. La separazione su un gel 2D delle diverse forme della proteina, unitamente all'utilizzo di un anticorpo policlonale, potrà permettere di osservare le differenze evidenziate dalla 2D-DIGE anche mediante western-blot.

La lamina B1, nell'analisi mediante 2D-DIGE, è stata identificata in diversi *spot*, con *fold-change* sia positivo sia negativo. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza, nel nostro estratto cellulare, di diverse forme della proteina, probabilmente interessate da differenti modificazioni post-traduzionali. Mediante western-blot tali differenze di espressione non hanno potuto essere visualizzate in quanto questa tecnica sperimentale è più sensibile della 2D-DIGE

a livello quantitativo, ma l'utilizzo di un gel monodimensionale SDS-PAGE non ci permette di discriminare tra le diverse forme di una proteina. Ci proponiamo quindi di effettuare un'analisi su un gel bidimensionale.

Anche la vinculina nella 2D-DIGE è identificata in due *spot* diversi, che presentano valori di *fold-change* non in accordo tra loro. Dato che lo *spot* a più alto peso molecolare corrisponde ad una diminuzione di quantità della proteina nelle cellule TF-1 siRNA 1 rispetto al controllo, mentre quello a più basso peso molecolare indica livelli proteici più elevati, possiamo ipotizzare un aumento della degradazione di questa proteina. Dall'analisi mediante western-blot siamo in grado di evidenziare soltanto una diminuzione della vinculina, probabilmente perché l'anticorpo utilizzato è monoclonale. In futuro intendiamo quindi procurarci un anticorpo policlonale, che possa identificare varie forme della proteina, ed effettuare un gel bidimensionale.

Per quanto riguarda la nucleolina, l'anticorpo di cui disponiamo rileva elevati livelli di segnale aspecifico, probabilmente da ascrivere al fatto che si tratta di un anticorpo policlonale. Tali segnali aspecifici rendono imprecisa la quantificazione e quindi la valutazione della differenza di espressione. Dato che questa proteina, nell'esperimento di 2D-DIGE, è stata identificata in un unico *spot*, ripeteremo l'esperimento con un anticorpo monoclonale, che permetterà una quantificazione più precisa delle differenze di espressione nelle cellule TF-1 siRNA 1 rispetto alle TF-1 siRNA SCR.

**Tabella 4.5** Risultati dell'analisi 2D-DIGE. *Spot* ad identificazione proteica multipla.

SPOT	GENE	GENE ID	MW	T-test	RATIO	SCORE/ n pep
1546	ASMTL	8623	69	0,099	1,55	160/3
	ACTG1	71	42	0,099	1,55	101/2
988	MSH2	4436	105	0,013	1,54	458/8
	UBA1	7317	118	0,013	1,54	164/3
	MYH9	4627	226	0,019	1,53	190/4
2113	SNX1	6642	59	0,019	1,53	124/2
	SYNCRIP	10492	70	0,019	1,53	100/2
1866	FKBP4	2288	52	0,025	1,51	162/3
	LCP1	3936	70	0,025	1,51	93/2
941	AARS	16	106,8	0,0028	-1,38	1009/16
	UBA1	7317	117,8	0,0028	-1,38	325/6
	HSPA8	3312	71	0,0028	-1,38	218/3
946	AARS	16	106,8	0,069	-1,38	440/7
	CASP14	23581	27,7	0,069	-1,38	193/3
1416	ACTB	60	41,7	0,069	-1,38	103/2
	GARS	2617	83,1	0,045	-1,38	329/6
	MSN	4478	67,8	0,045	-1,38	203/4
1927	VIM	7431	54	0,029	-1,4	401/7
	TUBA1C	84790	50	0,029	-1,4	356/5
	VAT1	10493	42	0,016	-1,4	161/3
2201	DNAJA2	10294	46	0,016	-1,4	149/3
	PA2G4	5036	44	0,016	-1,4	152/3
	SERPINB1	1992	43	0,016	-1,4	93/2
1631	LTA4H	4048	69	0,064	-1,41	506/8
	ILF3	3609	95	0,064	-1,41	110/2
891	TRIM28	10155	88	0,014	-1,43	97/2
	AARS	16	106	0,014	-1,43	181/3
	TUBA1B	10376	50	0,0031	-1,45	422/6
1184	RNH1	6050	50	0,0031	-1,45	172/3
	TUBB2B	347733	50	0,0031	-1,45	115/2
1905	WARS	7453	53	0,0025	-1,48	399/7
	TUBA1A	7846	50	0,0025	-1,48	122/2
2219	ANXA7	310	53	0,039	-1,61	298/5
	OAT	4942	48	0,039	-1,61	236/4
1545	LMNB1	4001	66	0,011	-1,68	365/7
	HSP90AA1	3320	85	0,011	-1,68	121/2
	VIM	7431	54	0,046	-2,09	213/4
2167	HSP90AB1	3326	83	0,046	-2,09	154/3
	IKIP	121457	39	0,046	-2,09	120/2
	WARS	7453	53	0,016	-2,19	184/3
2362	HNRNPH1	3187	49	0,016	-2,19	109/2
	SEPT2	4735	41	0,016	-2,19	100/2



**Tabella 4.6** Risultati dell'analisi 2D-DIGE. *Spot* univocamente identificati.

GENE	GENE ID	MW	T-test	RATIO	SCORE/n pep
ACLY	47	120,8	0,048	1,26	118/2
ACTB	60	42	0,13	1,91	143/3
ACTB	60	42	0,0048	1,89	154/3
ACTB	60	42	0,074	1,67	269/5
ACTB	60	42	0,012	1,48	269/5
ACTB	60	42	0,027	1,46	135/3
ACTG1	71	42	0,088	1,59	378/7
ACTN4	81	104,8	0,00096	-1,36	183/4
ANXA1	301	39	0,0048	-1,7	482/7
ASMTL	8623	68,8	0,039	1,27	250/4
C20orf3	57136	46,5	0,018	1,26	173/3
CDKN2A	1029	16,5	0,033	1,47	100/2
CLIC1	1192	27	2,30E-05	1,15	428/6
CTPS	1503	67	0,049	-1,25	121/2
DDAH2	23564	29,6	0,0031	1,29	409/6
EEF1	1937	50,1	0,018	1,26	251/4
EEF1D	1936	31	0,0052	1,36	229/3
EEF2	1938	95	0,0017	1,93	372/6
EEF2	1938	95	3,80E-05	1,74	195/3
EFTUD2	9343	109	0,087	1,54	284/5
EFTUD2	9343	109,4	0,0063	1,34	117/2
EIF3K	27335	25	0,026	1,36	92/2
EIF4A1	1973	46	0,11	1,52	280/4
EIF4A1	1973	46	0,099	1,4	418/6
ENO1	2023	47,2	0,048	1,26	215/3
FKBP4	2288	52	0,12	-1,26	144/3
FLNA	2316	280	0,12	1,26	121/3
GANAB	23193	107	0,12	1,34	336/6
GANAB	23193	107	0,0063	1,34	310/5
HBB	3043	16	0,038	1,45	136/2
HNRNPH1	3187	49	0,013	2,39	127/2
HNRNPH1	3187	49	0,05	-1,29	98/2
HSPA8	3312	71	0,19	1,36	307/5
HSPA9	3313	74	0,19	1,36	980/15
ILF2	3608	43	0,099	1,4	124/2
ILF3	3609	95	0,0027	1,55	264/4
IMMT	10989	84	0,12	1,26	490/9
LCP1	3936	70	0,027	1,46	327/5
LCP1	3936	70	0,0061	1,46	104/2
LDHB	3945	37	0,021	1,42	373/7
LMNB1	4001	66	0,0061	1,46	714/11
LMNB1	4001	66,4	0,044	1,37	554/8
LMNB1	4001	66	0,048	-1,49	464/9
MCM7	4176	118	0,05	-1,41	526/9
MCM7	4176	81	0,004	-1,56	122/2
NCL	4691	77	0,027	1,46	111/2

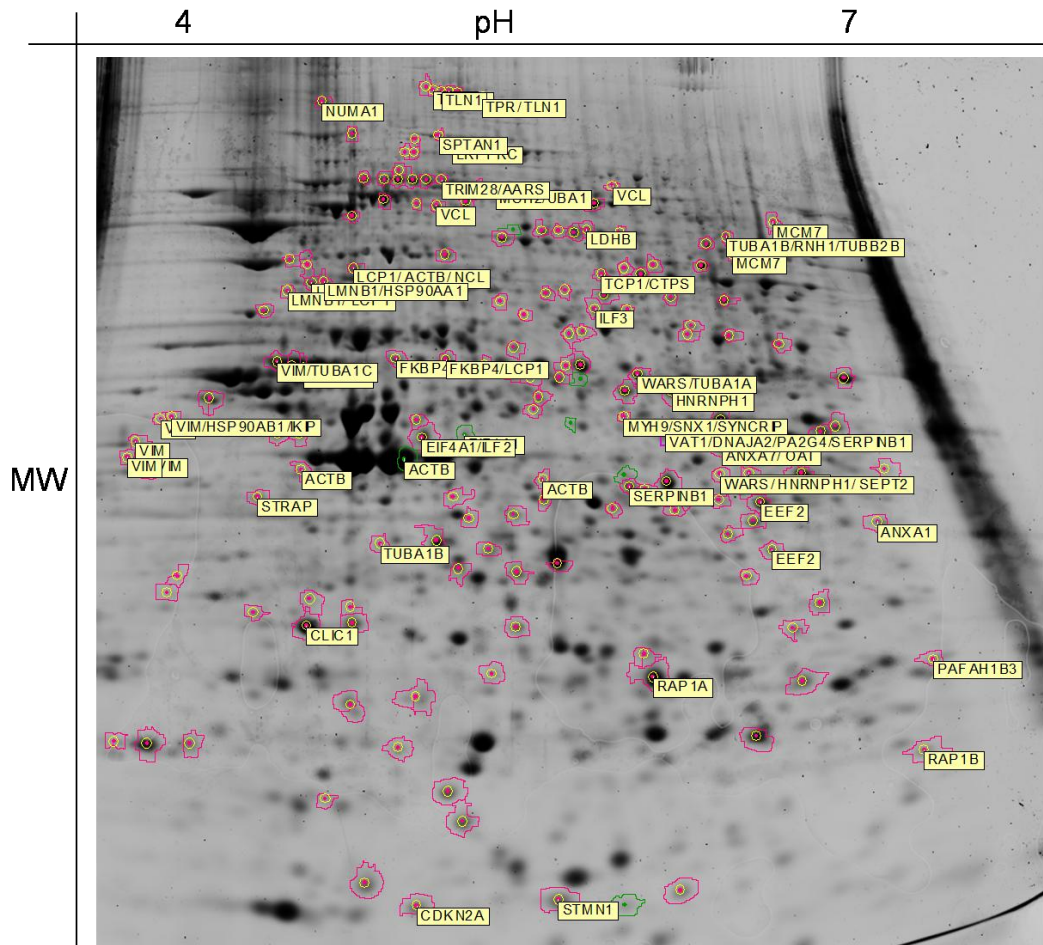
NUMA1	4926	238	0,00011	2,19	1112/19
P4HA1	5033	61	0,086	-1,35	101/2
PAFAH1B3	5050	26	0,026	-1,53	116/2
PSMD	5717	47,5	0,048	1,26	266/4
RAP1A	5906	21	0,00096	-1,74	139/3
RAP1B	5908	20,8	0,053	1,87	126/3
RCN2	5955	37	0,011	2,23	150/2
RPSA	3921	33	0,099	-1,55	92/2
SERPINB1	1992	43	0,057	1,8	387/7
SERPINB1	1992	43	0,21	1,41	497/8
SPTAN1	6709	284	0,0025	1,56	586/10
STMN1	3925	17,3	0,0079	-1,8	195/4
STRAP	11171	38	0,041	-1,8	216/3
TCP1	6950	60,3	0,039	1,27	504/7
TCP1	6950	60	0,049	-1,25	373/6
TLN1	7094	270	0,0093	2,17	1029/16
TLN1	7094	270	0,0031	1,75	1055/16
TLN1	7094	270	0,041	1,4	1176/19
TLN1	7094	270	0,044	1,4	108/2
TPR	7175	266	0,044	1,4	1170/19
TPR	7175	267	0,0063	1,36	257/5
TUBA1A	22142	50,1	0,018	1,26	241/3
TUBA1B	10376	50	0,046	1,41	242/3
TUBA1C	84790	50	0,0011	-1,61	314/4
VCL	7414	124	0,000056	2,09	1127/18
VCL	7414	124	0,00094	-1,51	1043/19
VIM	7431	54	0,0019	2,81	388/7
VIM	7431	54	0,00097	2,52	549/11
VIM	7431	54	0,00042	1,98	614/11
VIM	7431	54	0,028	1,49	739/12
VIM	7431	54	0,016	-2,28	439/8

**Tabella 4.7** Analisi mediante il *software* Ingenuity Pathway Analysis dei risultati ottenuti dalla DIGE: *canonical pathways*.

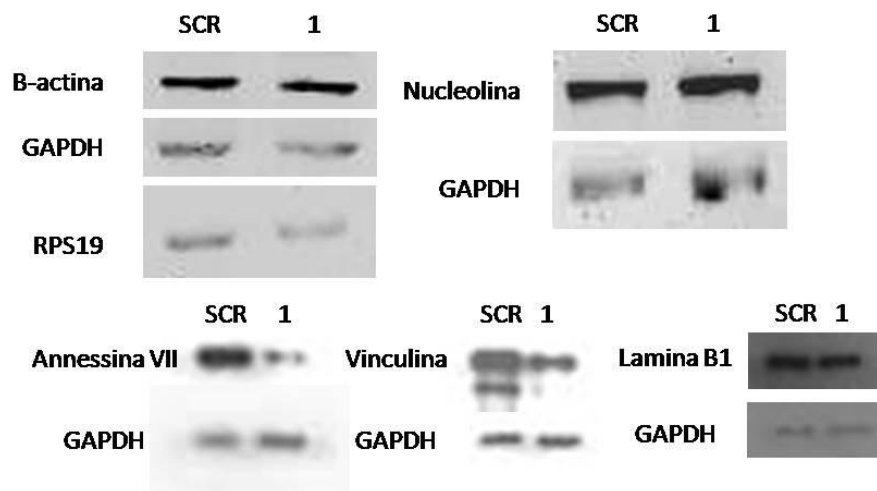
Ingenuity Canonical Pathways		-Log(P-value)	Ratio	Molecules
Leukocyte Signaling	Extravasation	4,24E+00	3,63E-02	RAP1B, ACTB, ACTN4, VCL, RAP1A, ACTG1, MSN
Integrin Signaling		4,12E+00	3,54E-02	RAP1B, ACTB, TLN1, VCL, ACTN4, RAP1A, ACTG1
Actin Cytoskeleton Signaling		3,04E+00	2,64E-02	ACTB, MYH9, ACTN4, VCL, ACTG1, MSN
Tight Junction Signaling		2,95E+00	3,05E-02	ACTB, MYH9, SPTAN1, VCL, ACTG1
VEGF Signaling		2,78E+00	4,21E-02	ACTB, ACTN4, VCL, ACTG1

**Tabella 4.8** Analisi mediante il *software* Ingenuity Pathway Analysis dei risultati ottenuti dalla DIGE: *top biological functions*.

Category	P-value	Molecules
Cancer	1,27E-06-4,86E-02	CDKN2A, ILF2, HNRNPH1, SERPINB1, PA2G4, TPR, LMNB1, EEF1D, NCL, STMN1, VCL, FLNA, HSP90AB1, ANXA1, TCP1, ANXA7, TUBA1C, LCP1, EEF2, VIM, TRIM28, ACLY, ACTG1, RAP1A, STRAP, HSPA8, P4HA1, TUBA1A, IMMT, MSH2, ENO1, EIF4A1, MSN, SNX1, MYH9, HSP90AA1, ACTN4, UBA1, RPSA, MCM7
Gastrointestinal Disease	1,27E-06-4,64E-02	CDKN2A, HNRNPH1, ILF2, PA2G4, VIM, ACLY, ACTG1, HSPA8, P4HA1, TUBA1A, HSP90AB1, MSH2, ANXA1, TCP1, HSP90AA1, TUBA1C, UBA1
Post-Translational Modification	4,08E-06-1,7E-02	HSPA8, P4HA1, HSP90AB1, OAT, FKBP4, TCP1, HSP90AA1, DNAJA2
Protein Folding	4,08E-06-5,7E-03	HSPA8, HSP90AB1, FKBP4, TCP1, HSP90AA1, DNAJA2
Genetic Disorder	2,32E-05-4,8E-02	CDKN2A, SERPINB1, ILF2, GARS, LMNB1, LDHB, EEF1G, TUBB2B, STMN1, HBB, HSP90AB1, FLNA, TCP1, TUBA1C, VCL, LCP1, EEF2, ACTB, VIM, ACLY, TUBA1B, ACTG1, HSPA8, P4HA1, TUBA1A, MSH2, ENO1, EIF4A1, FKBP4, HSP90AA1, MYH9, ACTN4, UBA1, RPSA, EIF3K



**Figura 4.2** Gel bidimensionale preparativo effettuato utilizzando un gradiente di pH tra 4 e 7 per la prima dimensione ed un SDS-PAGE al 10% per la seconda. I cerchi rossi indicano gli *spot* differenzialmente espressi, che sono poi stati escisi dal gel ed utilizzati per l'identificazione proteica mediante spettrometria di massa. Ogni proteina è indicata, nell'immagine, con il nome del gene.



**Figura 4.3** Western-blot con anticorpi specifici per annessina VII,  $\beta$ -actina, lamina B1, nucleolina, vinculina, GAPDH e RPS19. I risultati sono discussi nel testo.

#### 4.4 DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato effettuato uno studio di espressione genica globale, che tiene conto sia delle variazioni a livello del trascrittoma sia di quelle delle proteine, per caratterizzare i processi biologici e le funzioni molecolari alterate in una linea cellulare eritropoietica umana in cui i livelli proteici di RPS19 sono stati ridotti del 50%. E' stato scelto questo modello sperimentale in quanto ben ricapitola la condizione dei pazienti DBA (Miyake *et al.*, 2005).

E' interessante sottolineare che, incrociando le due analisi, è possibile trovare soltanto tre geni in comune, la cui espressione varia nella stessa direzione sia nel *microarray* sia nella 2D-DIGE. Tali geni sono: *DDAH2* (upregolato), *GARS* (downregolato) e *LTA4H* (downregolato). Occorre ricordare che i livelli di una proteina sono sottoposti a differenti sistemi di regolazione, quindi non stupisce il rinvenimento di grandi differenze tra il profilo di espressione del trascrittoma e quello del proteoma.

Nell'esperimento di proteomica differenziale si osservano variazioni dei livelli di espressione di molte proteine del citoscheletro facenti parte del complesso actinico. La riorganizzazione del citoscheletro è un evento critico per la progressione del ciclo cellulare e la sua alterazione potrebbe essere alla base del difetto proliferativo osservato nella DBA. E' noto dalla letteratura che topi KO per GSN (gelsolina, un regolatore della polimerizzazione dei filamenti actinici) presentano un difetto a livello della maturazione eritroide e del meccanismo di enucleazione (Silacci *et al.*, 2004).

In letteratura esistono due studi di espressione effettuati su cellule di pazienti DBA. Nel lavoro di Gazda *et al.* hanno eseguito un'analisi dei profili di espressione genica nelle cellule CD34<sup>+</sup> (multipotenti, eritroidi e mieloidi) isolate dal midollo osseo di tre pazienti DBA portatori di mutazioni in *RPS19* ed in remissione completa (ovvero pazienti che non abbiano seguito alcun trattamento terapeutico per almeno 10 anni), confrontati con controlli sani (Gazda *et al.*, 2006b). Koga *et al.* hanno invece studiato cellule mononucleate CD4<sup>+</sup> ottenute da sangue periferico di due pazienti DBA con mutazioni non note confrontati con due soggetti affetti da anemia aplastica acquisita (Koga *et al.*, 2006). Paragonando i dati di Gazda *et al.* con quelli ottenuti dal nostro studio, è

possibile identificare 12 geni (*CA2, CDH2, ELOVL5, FTH1, HK1, IGFBP7, ITGA4, LGALS1, PHGDH, PTPRD, RBMS1, TBXA2R*) che variano nel nostro esperimento ed in almeno un tipo cellulare analizzato da Gazda *et al.*. Tra questi, cinque (*FTH1, PHGDH, HK1, RBMS1, ELOVL5*) variano nella stessa direzione in entrambi i lavori. Dalla nostra analisi emerge inoltre la downregolazione, nelle cellule con difetto di *RPS19* rispetto a quelle di controllo, di tre geni codificanti per proteine ribosomali (*RPL3, RPL13a* e *RPL22*). Lo stesso *pattern* è stato osservato nei due studi precedenti (Gazda *et al.*, 2006b; Koga *et al.*, 2006).

L'analisi di proteomica differenziale ha evidenziato l'overespressione di vari fattori d'inizio (*EIF3K* e *EIF4A1*) e di allungamento (*EEF1, EEF2, EEF1D* e *EFTUD2*) della traduzione. Di recente nel nostro laboratorio è stata fatta un'analisi di espressione genica su fibroblasti di pazienti portatori di mutazioni in *RPS19* confrontati con fibroblasti di soggetti sani (Avondo F, Roncaglia P, Krmac H, Crescenzo N, Garelli E, Armiraglio M, Castagnoli C, Campagnoli MF, Ramenghi U, Gustincich S, Santoro C, Dianzani I. Fibroblasts from patients with Diamond-Blackfan anaemia show abnormal expression of genes involved in protein synthesis, amino acid metabolism and cancer. 2009. *BMC Genomics*, submitted). Anche per questa analisi sono risultate variazioni di espressione di fattori d'inizio della traduzione (*EIF3, EIF2, EIF4E*), nonché di interattori di *EIF2* e di *EIF4* (*EIF3S6IP* e *EIF4EBP1*) e di un fattore di allungamento della sintesi proteica (*EEF1D*). In questo secondo studio, gli mRNA sopra citati risultano invece downregolati. Il fatto che questi dati non siano in accordo tra loro fa supporre che tali geni siano sottoposti ad un controllo a livello sia trascrizionale sia traduzionale. Occorre comunque sottolineare che nei due lavori sono state utilizzate linee cellulari diverse.

E' poi interessante sottolineare che nell'indagine mediante *microarray*, così come in quella di proteomica differenziale, è stata evidenziata una downregolazione di diverse aminoacil-tRNA sintetasi. E' stato infatti dimostrato che, nel nostro modello sperimentale, si osservano sia una riduzione dell'espressione degli mRNA di *EPRS* e *GARS*, sia diminuiti livelli proteici di AARS, GARS, WARS. Inoltre, anche nello studio di espressione su fibroblasti di pazienti DBA precedentemente citato, è stata osservata una downregolazione

di un ampio gruppo di aminoacil-tRNA sintetasi (*QARS*, *SARS*, *GARS*, *LARS* e *WARS*). I dati ottenuti da queste tre analisi indipendenti ed effettuate su linee cellulari diverse risultano quindi in accordo tra loro.

Le aminoacil-tRNA sintetasi (ARS) catalizzano l'aminoacilazione dei tRNA e sono quindi enzimi fondamentali per il mantenimento della fedeltà della sintesi proteica. Inoltre, le ARS contribuiscono alla regolazione del metabolismo aminoacidico, processo strettamente regolato nonché essenziale per la biogenesi e la funzione del ribosoma. La triptofanil-tRNA sintetasi (*WARS*) viene upregolata in seguito a trattamento con IFN $\gamma$ , così come l'indolamina 2,3-diossigenasi (*IDO*), enzima responsabile della degradazione del triptofano. Quindi l'azione sinergica di questi due meccanismi permette alla cellula di disporre sia di un *pool* di Trp-tRNA, sia di triptofano libero da utilizzare per la sintesi proteica (Boasso *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 1999; Yasui *et al.*, 1986). Nei pazienti DBA, è stato ipotizzato un ridotto catabolismo dell'eme (Rey *et al.*, 2008); è interessante notare che questa molecola è in grado di stimolare il catabolismo del triptofano, aumentando l'attività enzimatica sia di *IDO* sia di *WARS* (Thomas *et al.*, 2001; Wakasugi, 2007).

Inoltre, sono state proposte funzioni non canoniche per la glutamil-prolil-tRNA sintetasi (*EPRS*), che risulterebbe coinvolta nella regolazione traduzionale di specifici geni contenenti un elemento GAIT nella regione 3' UTR (Sampath *et al.*, 2004). Il gene *EPRS* risulta essere downregolato a livello trascrizionale nelle cellule deprivate di RPS19 rispetto alle cellule di controllo e lo stesso risultato è stato ottenuto nel nostro studio di espressione sui fibroblasti dei pazienti DBA. La ridotta espressione di questo gene suggerisce quindi la possibilità che la regolazione traduzionale di specifici trascritti possa avere un ruolo nell'insorgenza della malattia.

Infine, analizzando le funzioni molecolari maggiormente colpite dalla riduzione dei livelli di RPS19, riscontriamo un'importante alterazione a livello dei geni coinvolti nella morte cellulare programmata: la maggioranza dei geni identificati risulta essere overespresso. Nei pazienti DBA i progenitori eritroidi, nel midollo osseo, vanno infatti incontro ad apoptosi perché incapaci di differenziare (Perdahl *et al.*, 1994).

Mediante l'analisi di proteomica differenziale sono state inoltre evidenziate alterazioni dei livelli proteici di fattori coinvolti nell'insorgenza del cancro, quali *CDKN2A*; è noto che i pazienti DBA presentano un aumentato rischio di sviluppare tumori (Campagnoli *et al.*, 2004).

Concludendo, lo studio dei profili di espressione genica da noi effettuato ha evidenziato una deregolazione di geni coinvolti nella biogenesi del ribosoma e nella sintesi proteica, ma ha sottolineato anche, per la prima volta, il coinvolgimento di enzimi responsabili del metabolismo aminoacidico.

Riteniamo quindi interessante approfondire l'ipotesi secondo cui la patogenesi dell'anemia di Diamond-Blackfan possa dipendere dalla alterata regolazione della traduzione di specifici trascritti.



## **CAPITOLO 5**

## **CONCLUSIONI**

## 5 CONCLUSIONI

Il ribosoma è il complesso ribonucleoproteico responsabile della sintesi proteica. Negli eucarioti, presenta un coefficiente di sedimentazione di 80S, è composto da quattro molecole di rRNA e circa 80 proteine. La biogenesi del ribosoma è un processo molto complesso, coinvolge infatti oltre 200 proteine non ribosomali, che ha inizio nel nucleolo e si conclude nel citoplasma. Proprio per l'elevato numero dei fattori coinvolti, il meccanismo è finemente regolato a livello sia trascrizionale sia traduzionale (Fromont-Racine *et al.*, 2003).

Benché i ribosomi siano presenti in tutti i tipi di cellule, mutazioni in proteine ribosomali o in fattori coinvolti nella biogenesi di questo complesso conducono ad un gruppo di malattie, le IBMFS, dal fenotipo simile, caratterizzato principalmente da insufficienza midollare, presenza di malformazioni ed alta incidenza di tumori. Sono classificate tra le IBMFS la discheratosi congenita, la sindrome di Shwachman-Diamond, l'ipoplasia cartilagine-capillizio e l'anemia di Diamond-Blackfan (Liu e Ellis, 2006).

La DBA è una rara aplasia eritroide pura congenita, caratterizzata da anemia normocromica e macrocitica. Il midollo osseo si presenta normocellulare, ma con un difetto selettivo a livello dei precursori eritroidi. Il 30% dei pazienti è affetto da malformazioni congenite, in particolare dismorfismi cranio-facciali e all'arto superiore. Nei pazienti affetti da anemia di Diamond-Blackfan si riscontra, inoltre, un aumentato rischio di sviluppare tumori. La terapia di prima scelta è il trattamento con steroidi e la principale alternativa terapeutica è rappresentata dalle trasfusioni croniche, le quali però hanno pesanti effetti collaterali (Campagnoli *et al.*, 2004).

Oggi, è nota la causa molecolare della malattia nella metà circa dei pazienti: sono state trovate infatti mutazioni in *RPS19* (Draptchinskaia *et al.*, 1999), *RPS24* (Gazda *et al.*, 2006a), *RPS17* (Cmejla *et al.*, 2007; Gazda *et al.*, 2008), *RPL35a* (Farrar *et al.*, 2008), *RPL5* e *RPL11* (Gazda *et al.*, 2008), tutti geni che codificano per proteine ribosomali.

Lo scopo del mio lavoro di dottorato è stato quello di gettare luce sul meccanismo patogenetico alla base della DBA, in particolare sul nesso tra il difetto in una RP e l'aplasia midollare.

Per fare questo, abbiamo utilizzato due strategie. Da un lato abbiamo identificato l'interattoma completo di RPS19, dall'altro abbiamo valutato i profili di espressione genica, a livello sia del trascrittoma sia del proteoma, in una linea cellulare in cui i livelli proteici di RPS19 erano ridotti del 50% circa.

E' stata utilizzata come modello sperimentale una linea cellulare eritroide. Ciò ha permesso di valutare sia le interazioni proteiche sia le variazioni dell'espressione genica in maniera tessuto-specifica. Il fatto di esserci serviti di tecnologie ad alta resa ha inoltre consentito di analizzare i complessi molecolari a cui RPS19 prende parte ed i processi cellulari alterati dall'aploinsufficienza di questa RP in modo sistematico.

L'interattoma di RPS19 comprende svariate proteine nucleolari coinvolte nel processo biogenetico del ribosoma, nonché diverse RP. Tali risultati sono perciò in accordo con i dati che dimostrano un difetto nella biogenesi del ribosoma in presenza di bassi livelli di una RP (Robledo *et al.*, 2008).

Inoltre, il 20% degli interattori da noi identificati sono coinvolti nel metabolismo delle proteine. Tra questi troviamo anche la metionina-tRNA sintetasi (MARS) ed un fattore di allungamento della sintesi proteica (EEF1B2). L'espressione di geni facenti parte di queste due categorie risulta essere deregolata a livello sia del trascrittoma sia del proteoma in una linea cellulare downregolata per RPS19, nonché nei fibroblasti dei pazienti DBA. Ciò suggerisce un nesso tra mutazioni in una RP e alterazione della sintesi proteica, generale o specifica.

In conclusione, la nostra indagine sperimentale ha chiarito alcuni aspetti del meccanismo patogenetico alla base della DBA. Infatti, dai dati ottenuti si può supporre che tali risultati siano validi anche per le altre RP trovate mutate nella DBA.

Per indagare se le funzioni in cui è coinvolta RPS19 siano condivise anche dalle altre RP mutate nei pazienti DBA, vogliamo verificare, mediante western-blot, che anche queste RP siano presenti nell'interattoma di RPS19.

Inoltre, verranno preparate delle linee cellulari trasdotte con siRNA in grado di abolire l'espressione anche delle altre RP coinvolte nell'insorgenza della DBA. Tale sistema sarà ideale per confermare la compromissione dei processi biologici già osservati alterati nelle cellule downregolate per RPS19.

Inoltre, vorremmo effettuare un'analisi mediante *microarray* per valutare la differenza di espressione dei micro-RNA (miRNA) nel sistema cellulare utilizzato per gli esperimenti sopra descritti. Questo potrebbe permettere di verificare se le variazioni osservate nell'esperimento di proteomica differenziale siano dovute ad una regolazione a livello traduzionale.

# **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**:1720-1727.
- Avondo F, Roncaglia P, Krmac H, Crescenzo N, Garelli E, Armiraglio M, Castagnoli C, Campagnoli MF, Ramenghi U, Gustincich S, Santoro C, Dianzani I. Fibroblasts from patients with Diamond-Blackfan anaemia show abnormal expression of genes involved in protein synthesis, amino acid metabolism and cancer. 2009. *BMC Genomics.* (submitted)
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. 2000. : The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* **289**:905-920.
- Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Winkler C, Shearer GM. 2005. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood.* **105**:1574-1581.
- Bortoluzzi S, d'Alessi F, Romualdi C, Danieli GA. 2001. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. *Bioinformatics.* **17**:1152-1157.
- Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, Longoni D, Pecile V, Zecca M, Dufour C, Ramenghi U, Dianzani I. 2004. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica.* **89**:480-489.
- Chiocchetti A, Gibello L, Carando A, Aspesi A, Secco P, Garelli E, Loreni F, angelici 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.
- Choesmel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH, Pinaud N, Legrand P, Gazda HT, Gleizes PE. 2008. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet.* **17**:1253-1263.
- Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. 2007. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* **28**:1178-1182.
- Crétien A, Hurtaud C, Moniz H, Proust A, Marie I, Wagner-Ballon O, Choesmel V, Gleizes PE, Leblanc T, Delaunay J, Tchernia G, Mohandas N, Da Costa L. 2008. Study of the effects of proteasome inhibitors on ribosomal protein S19 (RPS19) mutants, identified in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica.* **93**:1627-1634.
- Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE. 2007. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.* **128**:853-864.
- 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.

Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. 2008. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood*. **112**:5228-5237.

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

Dianzani I, Loreni F. 2008. Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle. *Haematologica*. **93**:1601-1604.

Dokal I, Vulliamy T. 2003. Dyskeratosis congenita: its link to telomerase and aplastic anaemia. *Blood Rev*. **17**:217-225.

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.

Dresios J, Panopoulos P, Synetos D. 2006. Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart, important players in ribosomal function. *Mol. Microbiol*. **59**:1651-1663.

Ellis SR, Massey AT. 2006. Diamond Blackfan anemia, a paradigm for a ribosome-based disease. *Med. Hypotheses*. **66**:643-648.

Farrar JE, Nater M, Caywood E, McDevitt MA, Kowalski J, Takemoto CM, Talbot CC Jr, Meltzer P, Esposito D, Beggs AH, Schneider HE, Grabowska A, Ball SE, Niewiadomska E, Sieff CA, Vlachos A, Atsidaftos E, Ellis SR, Lipton JM, Gazda HT, Arceci RJ. 2008. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. **112**:1582-1592.

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

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

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

Ganapathi KA, Shimamura A. 2008. Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure. *Br J Haematol*. **141**:376-387.

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 HT, Kho AT, Sanoudou D, Zaucha JM, Kohane IS, Sieff CA, Beggs AH. 2006. Defective ribosomal protein gene expression alters transcription, translation, apoptosis, and oncogenic pathways in Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells*. **24**:2034-2044.
- Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Zaucha JM, Glader B, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH. 2008. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet*. **83**:769-780.
- 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, 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.
- Harms J, Schluenzen F, Zarivach R, Bashan A, Gat S, Agmon I, Bartels H, Franceschi F, Yonath A. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*. **107**:679-688.
- Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem*. **231**:241-257.
- 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.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. **31**:e15.
- Jabr FI, Taher A. 2006. Diamond-Blackfan anemia in remission for 2 years on valproic acid. *Haematologica*. **91**:ELT05.
- Kirwan M, Dokal I. 2008. Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. *Clin Genet*. **73**:103-112.
- Koga Y, Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. 2006. Reduced gene expression of clustered ribosomal proteins in Diamond-Blackfan anemia patients without RPS19 gene mutations. *J Pediatr Hematol Oncol*. **28**:355-361.
- Komar AA, Hatzoglou M. 2005. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem*. **280**:23425-23428.
- 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, 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.
- Luz JS, Georg RC, Gomes CH, Machado-Santelli GM, Oliveira CC. 2009. Sdo1p, the yeast orthologue of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein, binds RNA and interacts with nuclear rRNA-processing factors. *Yeast.* 2009 Apr 6. [Epub ahead of print]
- 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.
- Maguire BA, Zimmermann RA. 2001. The ribosome in focus. *Cell.* **104**:813-816.
- Mäkitie O, Sulisalo T, de la Chapelle A, Kaitila I. 1995. Cartilage-hair hypoplasia. *J Med Genet.* **32**:39-43.
- 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, Davey EJ, Fröjmark AS, Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Zahou E, Byman I, Landin B, Ronquist G, Karlsson S, Dahl N. 2006. Erythropoiesis in the Rps19 disrupted mouse: Analysis of erythropoietin response and biochemical markers for Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis.* **36**:259-264.
- Mazumder B, Sampath P, Seshadri V, Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL. 2003. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell.* **115**:187-198.
- McClintick JN, Edenberg HJ. 2006. Effects of filtering by Present call on analysis of microarray experiments. *BMC Bioinformatics.* **7**:49.
- McGowan KA, Li JZ, Park CY, Beaudry V, Tabor HK, Sabnis AJ, Zhang W, Fuchs H, de Angelis MH, Myers RM, Attardi LD, Barsh GS. 2008. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet.* **40**:963-970.
- McKusick VA, Eldridge R, Hostetler JA, Ruangwit U, Egeland JA. 1965. Dwarfism in the Amish. II. Cartilage-Hair Hypoplasia. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **116**:285-326.
- Menne TF, Goyenechea B, Sánchez-Puig N, Wong CC, Tonkin LM, Ancliff PJ, Brost RL, Costanzo M, Boone C, Warren AJ. 2007. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet.* **39**:486-495.
- Miyake K, Flygare J, Kiefer T, Utsugisawa T, Richter J, Ma Z, Wiznerowicz M, Trono D, Karlsson S. 2005. Development of cellular models for ribosomal protein S19 (RPS19)-deficient diamond-blackfan anemia using inducible expression of siRNA against RPS19. *Mol Ther.* **11**:627-637.

- Nierhaus KH. 1991. The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie*. **73**:739-55.
- 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.
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. **289**:920-930.
- Noller HF, Hoffarth V, Zimniak L. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*. **256**:1416-1419.
- Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM Jr, Tarry MJ, Carter AP, Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. **292**:897-902.
- 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*. **6**:382-393.
- Perdahl EB, Naprstek BL, Wallace WC, Lipton JM. 1994. Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood* **83**:645-650.
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD. 2008. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*. **8**:1744-1749.
- Perry RP. 2007. Balanced production of ribosomal proteins. *Gene*. **401**:1-3.
- 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.
- Ramenghi U, Garelli E, Valtolina S, Campagnoli MF, Timeus F, Crescenzo N, Mair M, Varotto S, D'Avanzo M, Nobili B, Massolo F, Mori PG, Locatelli F, Gustavsson P, Dahl N, Dianzani I. 1999. Diamond-Blackfan anaemia in the Italian population. *Br J Haematol*. **104**:841-8.
- Rey MA, Duffy SP, Brown JK, Kennedy JA, Dick JE, Dror Y, Taylor CS. 2008. Enhanced alternative splicing of the FLVCR1 gene in Diamond Blackfan anemia disrupts FLVCR1 expression and function that are critical for erythropoiesis. *Haematologica*. **93**:1617-1626.
- Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M. 2008. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA*. **14**:1918-1929.
- Ruvinsky I, Meyuhas O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*. **31**:342-348.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. **34**:374-378.

- Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Gerber CA, Chavatte L, Kinter M, Ting SM, Dignam JD, Kim S, Driscoll DM, Fox PL. 2004. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell*. **119**:195-208.
- Schmitt ME, Clayton DA. 1993. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **13**:7935-7941.
- 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.
- Shaw AC, Larsen MR, Roepstorff P, Justese J, Christiansen G, Birkelund S. 1999. Mapping and identification of interferon  $\gamma$ -regulates Hela cell proteins separated by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. **20**:984-993
- Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D. 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*. **61**:2614-2623.
- 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.
- Sulisalo T, Sistonen P, Hastbacka J, Wadelius C, Makitie O, de la Chapelle A, Kaitila I. 1993. Cartilage-hair hypoplasia gene assigned to chromosome 9 by linkage analysis. *Nature Genet*. **3**:338-341.
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. 2005. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*. **123**:49-63.
- Takyar S, Hickerson RP, Noller HF. 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell*. **120**:49-58.
- Thomas SR, Salahifar H, Mashima R, Hunt NH, Richardson DR, Stocker R. 2001. Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN- $\gamma$ -activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J Immunol*. **166**:6332-6340.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**:5116-5121.
- Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N. 2008. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet*. **17**:3204-3211.
- Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Marrone A, Digweed M, Walne A, Dokal I. 2008. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**:8073-8078.
- Wakasugi K. 2007. Human tryptophanyl-tRNA synthetase binds with heme to enhance its aminoacylation activity. *Biochemistry*. **46**:11291-11298.

- Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, Beswick R, Kirwan M, Masunari Y, Al-Qurashi FH, Aljurf M, Dokal I. 2007. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet.* **16**:1619-1629.
- Yasui H, Takai K, Yoshida R, Hayaishi O. 1986. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: Its possible occurrence in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:6622-6626.
- Yonath A. 2005. Ribosomal crystallography: peptide bond formation, chaperone assistance and antibiotics activity. *Mol Cells.* **20**:1-16.
- Yoon A, Peng G, Brandenburg Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggiero D. 2006. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked Dyskeratosis Congenita. *Science.* **312**:902-906.
- Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee SH, Yang X, Xie R, Javed A, Underwood JM, Furcinitti P, Imbalzano AN, Penman S, Nickerson JA, Montecino MA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. 2007. Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature.* **445**:442-446.
- Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhardt WA, Xiong Y. 2003. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol.* **23**:8902-8912.