



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI.

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA MOLECOLARE

XXI CICLO DI DOTTORATO

Ruolo della chinasi PIM1 in risposta allo stress ribosomale

VALENTINA IADEVAIA

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. FABRIZIO LORENI
Coordinatore: Prof. GIOVANNI CESARENI

PIM1 oncoprotein is destabilized in response to ribosomal stress

Valentina Iadevaia, Sara Caldarola, Fabrizio Loreni*

Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma, Italy

ABSTRACT

PIM1 is an oncogenic serine/threonine kinase mainly expressed in hematopoietic cells. Expression of PIM1 is regulated by a variety of growth factors and cytokines from transcriptional to post-translational level. Together with the other two members of the family (PIM2 and PIM3), PIM1 plays a role in hematopoietic cell growth and survival. By studying the molecular mechanisms of Diamond-Blackfan Anemia (DBA) we have found out that PIM1 interacts with the ribosomal protein RPS19 and cosediments with ribosomes. RPS19 gene is mutated in roughly one fourth of DBA patients, causing a defect in hematopoiesis due to an excess of apoptosis of erythroid precursors. To investigate the possible implication of PIM1 in DBA pathogenesis we have here analyzed the expression of this kinase in cultured cell model systems. These include a stably transfected cell line, inducible for PIM1 overexpression (PIM-REx) and an hematopoietic cell line (K562C), inducible for RPS19 downregulation. We have found that the depletion of RPS19 causes a drastic destabilization of PIM1 partly dependent on proteasome. The rapid degradation of PIM1 could be responsible for some defects observed in cells from DBA patients.

Indice

Indice	pag. 3
Summary	pag. 5
Riassunto	pag. 7
Introduzione	pag. 9
Stress ribosomale	pag. 9
L'anemia di Diamond Blackfan Anemia (DBA)	pag.12
Trattamento	pag.13
Eritropoiesi e meccanismi molecolari della DBA	pag.14
Difetti nella maturazione dell'rRNA	pag.16
RPS19 e la DBA	pag.19
PIM1	pag.20
Caratteristiche strutturali	pag.20
Espressione, attivazione e stabilizzazione	pag.21
Funzioni biologiche	pag.23
-Controllo della trascrizione genica	pag.24
-Controllo del ciclo cellulare	pag.25
-Regolazione della sintesi proteica	pag.26
-Inibizione dell'apoptosi e stimolazione dell'autofagia	pag.28
Topo "knockout"	pag.29
Scopo della ricerca	pag.31
Risultati	pag.33
Analisi della sovraespressione di PIM1	pag.33
Analisi delle fosforilazione di importanti regolatori della sintesi proteica	pag.36
La chinasi PIM1 associa con il ribosoma attivo	pag.38
L'inibizione della sintesi della proteina RPS19 causa una diminuzione dei livelli proteici della chinasi PIM1	pag.45
Stimolazione dello stress ribosomale in seguito a trattamento con inibitori specifici	pag.50
Analisi dei livelli endogeni di PIM1 in linee linfoblastoidi derivate da pazienti DBA	pag.55
Trattamento con Desametasone	pag.57
Analisi della sovraespressione di PIM1 in cellule in cui l'espressione di per RPS19 è inibita	pag.61
Discussione	pag.64
Materiali e Metodi	pag.67
Colture cellulari	pag.67
Costrutti plasmidici	pag.67

Reagenti e anticorpi	pag.68
Western Blotting	pag.68
Estrazione dell'RNA e Northern Blotting	pag.69
Analisi dei pre-rRNA	pag.70
Trasfezione	pag.70
Analisi polisomale	pag.70
Analisi delle frazioni polisomali	pag.71
Ultracentrifugazione a 100.000g	pag.71
Cross-linking	pag.72
Saggio di immunoprecipitazione	pag.72
Immunofluorescenza	pag.72
Analisi di proliferazione	pag.73
Saggio di incorporazione della metionina S ³⁵	pag.73
Bibliografia	pag.75

Summary

Emerging evidence suggests that the perturbation of ribosomal biogenesis by inhibition of rRNA processing, synthesis of ribosomal proteins, and ribosome assembly (ribosomal stress) causes the activation of a specific control mechanism that leads to p53 activation. Many diseases, such as Discheratosi congenita (DC), Shwachman Diamond syndrome (SDS), Cartilage-Hair Hypoplasia Syndrome (CHH) and Diamond Blackfan Anemia (DBA), are associated to defective ribosome biogenesis. In the last few years we have focused our attention on the molecular mechanism of Diamond Blackfan Anemia (DBA). DBA is a congenital red cell aplasia characterized by severe normochromic-macrocytic anemia appearing in early infancy. Approximately 30% of affected children present a variety of associated physical anomalies which are predominantly craniofacial although thumb, heart and urogenital malformations are also observed . The 25% of DBA cases presents a mutation of the gene encoding for the structural ribosomal protein RPS19. The lack of correlation between the clinical phenotype and the genotype suggests that, in addition to the genetic defect, other factors may contribute to the symptoms. It is not clear how mutations in a ribosomal protein (RP) could affect hematopoiesis. The recent finding of other RPs mutations in DBA patients (supports the hypothesis of a defect in a ribosomal function. However other possibilities cannot be ruled out. Few years ago we have identified PIM1 as an interactor of RPS19 . The interaction, detected by two-hybrid assay, has been confirmed by coimmunoprecipitation experiments.

PIM1 belongs to a family of serine/threonine kinase that includes also PIM2 and PIM3, and it is known to protect hematopoietic cells from cell death . This kinase is highly expressed in various murine hematopoietic malignancies . Thymus, spleen, bone marrow and fetal liver, but also some non-hematopoietic tissues such as prostate and testis show high expression levels of PIM1 . The structure, function and regulation of PIM1 have been widely investigated in the last years . Many potential substrates have been identified and it has been proposed that PIM1 may play a role in transcriptional regulation, cell cycle and growth control . PIM1 can be observed both in the nucleus and in the cytoplasm. It has been recently shown that it colocalizes with c-Myc at the sites of active transcription, suggesting a contribution in the regulation of some c-Myc transcriptional targets .

It has been shown that PIM1 interacts with RPS19 and cosediments with ribosomal particles in sucrose gradient fractionation analysis (Chiocchetti et al. 2005).

To better define this interaction we have analyzed several cell lines in different culture conditions. We have found that: 1) the interaction occurs in all tested cell lines; 2) the interaction can be stabilized by in vivo treatment with the crosslinking agent DSP (Dithiobis[succinimidyl propionate]); the kinase activity of PIM1 is not necessary for the interaction. To study the possible role of this interaction in the response to ribosomal stress we have tested the effect of RPS19 depletion on PIM1 expression using a cell line inducible for RPS19 (Miyake et al. 2005). In this cell line the reduction of RPS19 induces a rapid decrease of PIM1 expression. A decrease of PIM1 level is also observed during treatment with inhibitors known to induce ribosomal stress such as actinomycin D, camptothecin and cisplatinum.

To investigate if the alteration of PIM1 levels is due to reduction of protein half-life we have treated the cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide to monitor protein stability. We observed downregulation of RPS19 induces rapid degradation of PIM1.

Since it has been described that PIM1 is degraded by the proteasome (Liang et al. 1996; Shay et al. 2005) we tested the effect of the proteasome inhibitor MG132 during RPS19 downregulation. The treatment has the effect to increase PIM1 amount indicating a role for the proteasome also in this case.

Finally we tested PIM1 levels in lymphoblastoid cells from DBA patients observing a lower level of PIM1 compared to controls.

The possible implications of our findings on DBA mechanism and in ribosomal stress are discussed.

Riassunto

Il controllo della biogenesi del ribosoma nel nucleolo e della traduzione del messaggero nel citoplasma, sono processi vitali per la sopravvivenza cellulare. Infatti crescita e proliferazione cellulare dipendono dall'attività traduzionale della cellula. Alcuni studi suggeriscono che alterazioni nella capacità di sintesi proteica della cellula determinerebbero l'attivazione di meccanismi di controllo che portano ad un blocco della proliferazione e stimolano l'apoptosi. Questo fenomeno viene chiamato stress nucleolare o ribosomale e coinvolge il fattore di trascrizione p53. Questa proteina infatti, secondo il modello , verrebbe attivata e sarebbe responsabile del blocco del ciclo cellulare e dell'induzione dell'apoptosi. Secondo alcuni studi l'attivazione di p53 è mediata da alcune proteine ribosomali che, in seguito a stress ribosomale, vanno a bloccare l'inibitore di p53 MDM2.

Esistono diverse malattie umane dove è compromessa la biogenesi del ribosoma. Per esempio ricordiamo la Discheratosi congenita (DC), la sindrome di Shwachman Diamond (SDS), l'ipoplasia dei capelli e della cartilagine (CHH) e l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA). Da diversi anni nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato si studiano vari aspetti del meccanismo molecolare della DBA. Questa malattia genetica è causata da mutazioni in geni codificanti per proteine ribosomali e, nel 25% dei casi, le mutazioni sono presenti nel gene codificante per la proteina ribosomale RPS19. E' stato osservato che, in diversi casi, le alterazioni nelle proteine ribosomali (RPS19 o altre) comportano un difetto nel processamento dell'rRNA 18S o 28S e un conseguente sbilanciamento nella produzione delle due subunità del ribosoma.

Nel corso di un progetto di ricerca sulla DBA, in collaborazione con il laboratorio della prof. Irma Dianzani dell'Università del Piemonte Orientale, abbiamo evidenziato l'interazione di RPS19 con la chinasi PIM1, tramite il saggio di doppio ibrido in lievito (Chiocchetti et al. 2005).

PIM1 appartiene alla famiglia delle serin-treonin chinasi, insieme a PIM2 e PIM3. E' stato dimostrato che questa chinasi ha un'azione proliferativa proteggendo le cellule ematopoietiche dall'apoptosi . PIM1 è una chinasi altamente espressa nel timo, milza, midollo osseo, fegato fetale ma anche in molti altri tessuti non ematopoietici come la prostata e testicoli . In letteratura vi è una gran mole di dati, accumulati negli ultimi anni, che hanno permesso di determinare la struttura, la funzione e la regolazione di questa chinasi. Infatti sono stati identificati molti substrati che hanno permesso di definire il coinvolgimento di PIM1 sia nella regolazione della trascrizione che nel controllo del ciclo cellulare e della

proliferazione . L'espressione di PIM1 viene finemente regolata a molti livelli: trascrizionale e post-trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale. La sovraespressione di questa chinasi predispone l'animale all'insorgenza di tumori. La sua mancanza, invece, causa pochi difetti sia nello sviluppo che nella crescita e un leggero fenotipo ematopoietico .

Utilizzando come punto di partenza i risultati ottenuti in collaborazione con la prof. Dianzani (Chiocchetti et al. 2005) abbiamo cercato di verificare se PIM1, grazie alla sua interazione con RPS19, potesse avere un ruolo attivo durante lo stress ribosomale. Come primo passo abbiamo ulteriormente caratterizzato l'interazione PIM1-ribosoma tramite ultracentrifugazioni dell'estratto proteico a 100.000g, in grado di separare i complessi ribosomali da proteine citoplasmatiche "libere". L'associazione di PIM1 al ribosoma è stata osservata in cellule di eritroleucemia (TF-1), in cellule di leucemia mieloide (K562), in cellule tumorali prostatiche (LNCaP- PC3), in cellule di cancro uterino (HeLa) e in cellule HEK293, in cui viene indotta l'espressione esogena di PIM1 (PIM-Rex). L'interazione è stata anche analizzata attraverso centrifugazione su gradiente di saccarosio, dimostrando che la chinasi è in grado di associare oltre che con i polisomi anche con la subunità piccola 40S. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'attività chinasi non è necessaria per interazione di PIM col ribosoma.

Per studiare più in dettaglio il possibile ruolo di PIM1 nello stress ribosomale abbiamo utilizzato come modello sperimentale varie linee cellulari: 1) linee linfoblastoidi provenienti da malati di DBA; 2) linee cellulari ematopoietiche nelle quali, mediante RNA interference, si può indurre una carenza di RPS19; 3) cellule HEK293 nelle quali si può indurre una sovraespressione di PIM1. Inoltre abbiamo analizzato i livelli totali di PIM1 anche durante il trattamento con le diverse droghe (camptotecina, il cisplatino e l'actinomicina D) in grado di indurre disgregazione del nucleolo e quindi stress ribosomale. I risultati dei vari esperimenti indicano che la stabilità della chinasi PIM1 diminuisce in seguito all'induzione dello stress ribosomale nella cellula. Quindi PIM1 potrebbe agire da sensore dello stress e generare una risposta di blocco proliferativo. In accordo con questo modello, in linee cellulari originate da pazienti di DBA abbiamo riscontrato un livello di PIM1 più basso rispetto ai controlli. Quest'ultimo risultato potrebbe indicare un ruolo della chinasi nella patologia della DBA.

Introduzione

Stress nucleolare/ribosomale

Il nucleolo è l'organulo cellulare dove avviene la biogenesi del ribosoma. Qui l'RNA ribosomale (rRNA) viene trascritto, processato e assemblato con le proteine ribosomali nelle due subunità del ribosoma, la 40S e la 60S. Dall'analisi di sistemi sperimentali modello di alcune malattie ribosomali conosciute, dove questo delicato processo viene compromesso, è stato proposto che l'integrità del nucleolo possa agire come sensore di "stress", in grado di attivare una risposta cellulare capace di bloccare la proliferazione e il ciclo cellulare e di stimolare l'apoptosi. Secondo questo modello, in seguito alla disgregazione del nucleolo, alcune proteine ribosomali, RPL11, RPL5 e RPL23 legano e inattivano il fattore HDM2 responsabile dell'ubiquitinazione di p53. Questo tipo di alterazione causerebbe un'attivazione di p53 con conseguente induzione del blocco del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi (fig. 1). In accordo col modello, l'analisi di sistemi *in vivo* come *Zebrafish* e topi con alterazioni in alcune proteine ribosomali, ha evidenziato che gli effetti fenotipici erano associati a sovraespressione e attivazione di p53. Inoltre l'inibizione di p53 con metodi biochimici o genetici è in grado di attenuare gli effetti delle alterazioni ribosomali. Ad esempio un topo con una copia di RPS20 mutata (Dsk4) mostra la un difetto ematopoietico e una iperpigmentazione delle zampe. L'incrocio tra il topo RPL20^{Dsk4/+} e un topo p53^{-/-} porta ad un recupero totale del numero degli eritrociti e del colore normale delle zampe.

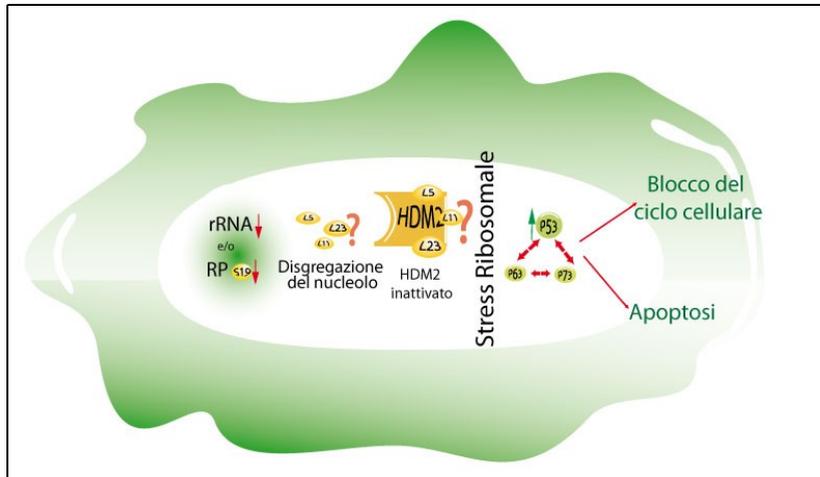


Fig. 1: Ipotesi dello stress ribosomale. La diminuzione della sintesi delle RPs e dei trascritti dell'rRNA causa la stabilizzazione e l'attivazione di p53. Secondo questo modello, in seguito alla disgregazione del nucleolo, alcune proteine ribosomali, RPL11, RPL5 e RPL23 legano e inattivano il fattore HDM2 responsabile dell'ubiquitinazione di p53. Questo tipo di alterazione causerebbe un'attivazione di p53 con conseguente induzione del blocco del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi.

Il modello dello stress ribosomale p53- dipendente è anche supportato da esperimenti in cellule in coltura trattate con inibitori noti per causare disgregazione del nucleolo. In seguito ai trattamenti, è stata dimostrata l'attivazione di p53 e la formazione del complesso HDM2-RPs.

Esistono diverse malattie genetiche dove la biogenesi del ribosoma è compromessa e nelle quali i meccanismi di risposta allo stress ribosomale potrebbero avere un ruolo nella patologia. Queste includono la Discheratosi congenita (DC), la sindrome di Shwachman Diamond (SDS), l'ipoplasia dei capelli e della cartilagine (CHH) e l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA). La DC, la CHH e la SDS sono causate da mutazioni a carico di geni codificanti per fattori richiesti nelle varie fasi della biogenesi del ribosoma (assemblaggio delle due subunità del ribosoma, processamento dell'rRNA trasporto delle subunità dal nucleo al citoplasma) Nel caso della DBA, le mutazioni sono a carico dei geni che codificano per i componenti strutturali del ribosoma, le proteine ribosomali. Poiché il laboratorio dove ho svolto il dottorato studia da molti anni la regolazione dell'espressione dei geni che codificano le

proteine ribosomali, sono stati avviati progetti sui meccanismi molecolari della DBA e del ruolo che lo stress ribosomale potrebbe avere nel fenotipo clinico.

L'anemia di Diamond-Blackfan (DBA)

L'anemia di Diamond-Blackfan, DBA, è un'anemia cronica classificata come "malattia genetica rara" che colpisce i bambini per lo più durante il primo anno di vita. Si presenta come una rara insufficienza midollare caratterizzata da grave anemia. La DBA è una malattia che conta circa cinque casi l'anno solo in Italia e colpisce 600-700 persone in tutto il mondo. Il principale segno clinico è un'anemia macrocitica con difetti nella maturazione dei progenitori eritroidi. Difetti nell'eritropoiesi sono rivelabili nel midollo osseo da un basso numero di precursori eritroidi e con una riduzione della funzionalità delle BFU-E (*burst forming unit erythroid* o cellula che forma grandi colonie eritroidi). Un terzo dei pazienti presenta malformazioni congenite che coinvolgono diversi distretti corporei (pollice trifalangeo, palatoschisi, malformazioni urogenitali e/o cardiovascolari).

Circa il 25-50% dei casi di DBA sono familiari e la malattia si trasmette in modo autosomico dominante. Colpisce ugualmente maschi e femmine e non sembrano esserci zone geografiche maggiormente colpite.

Questa patologia fu descritta per la prima volta nel 1938 da Diamond e Blackfan e in seguito, nel 1962, Diamond e collaboratori presentarono dei dati su 30 pazienti con delle gravi anomalie scheletriche. Nel 1997 fu individuata una mutazione sul cromosoma 19 che nel 1999 venne identificata nel gene rpS19. Ad oggi è noto che il 25% dei malati presenta mutazioni in eterozigosi nel gene rpS19, il 3% in rpL35a, il 2% in rpS24 e in piccole percentuali mutazioni in rpS17, rpL11 e rpL5.

Diverse malattie umane dovute ad alterazioni in fattori importanti nella biogenesi del ribosoma (SDS, DC, CHH) presentano una grave insufficienza midollare. Non è ancora chiaro perché difetti nella biogenesi del ribosoma causino disfunzione nel midollo osseo e quindi difetti nell'eritropoiesi. Si è ipotizzato che essendo questo un tessuto con un alto livello di *turnover* necessiti di una massiccia e costante sintesi proteica.

Malattia	Gene	Principali danni fisici	Altri fenotipi clinici
Anemia Diamond-Blackfan (DBA)	RPs	Anemia Ipoplastica	Anomalie fisiche
Discherotosi Congenita (DC)	DKC1 (Discherina)	Pigmentazione della pelle alterata, distrofia NAIL	Disordini nel midollo osseo
Ipoplasia dei capelli e della cartilagine (CHH)	RMRP (componente dell' MRP)	Bassa statura e ipoplasia dei capelli	Anemia ipoplastica
Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS)	SBDS (Proteina nucleolare)	Disordini nel midollo osseo, Insufficienza pancreatica	Difetti ossei
Sindrome di Treacher Collins (TSC)	TCOF1 (Proteina nucleolare)	Disordini nello sviluppo craniofacciale	Altre deformazioni

Tab. 1: Malattie ribosomali umane. Lista di alcune delle malattie ribosomali umane conosciute.

Trattamento

Purtroppo ancora oggi non esiste una cura per questa malattia, la principale terapia consiste nel trattamento con corticosteroidi e nelle trasfusioni a cadenza mensile. Fin dal 1951 (Gasser 1951) si è infatti osservato che la malattia può essere attenuata in seguito al trattamento con i corticosteroidi. Come riportato in letteratura, il 79% dei pazienti risponde inizialmente al trattamento con i corticosteroidi ma con il tempo questi perdono tale risposta nel 17% dei casi, mentre un 4% dei pazienti DBA non risponde mai a questo tipo di trattamento. Inizialmente in questo tipo di terapia si osserva un aumento dei globuli rossi del sangue dei malati ma questo causa molti effetti collaterali negativi come l'aumento della pressione sanguigna, diabete, rischi di glaucoma e osteopenia. I meccanismi terapeutici dei corticosteroidi non sono ancora del tutto noti: non modulano l'espressione o il livello di RPS19, ma aumentano la sensibilità all'eritropoietina (Epo) e causano un

cambiamento generale dell'espressione genica promuovendo il differenziamento eritroide (Ebert et al. 2005).

Anche le trasfusioni di sangue oltre a ridurre sensibilmente la qualità della vita dei pazienti mostrano problematiche come l'accumulo di ferro nel sangue e per questo sono spesso associate a trattamenti con deferoxamina che permettono di chelare il metallo in eccesso.

Il trapianto di midollo è l'unico trattamento radicale della malattia, ma può essere proposto solo in presenza di resistenza al cortisone.

La malattia regredisce spontaneamente nel 20% dei malati. Il motivo di questa elevata remissione dei sintomi resta da essere chiarito.

Eritropoiesi e meccanismi molecolari della DBA

Per spiegare il ruolo dell'insufficienza di RPS19 nella DBA è importante comprendere in quale momento dello sviluppo si verifica l'alterazione dell'eritropoiesi. Nel sangue dei malati di DBA sono stati riscontrati alti livelli di eADA (*erythrocyte adenosine deaminase*), di emoglobina fetale e di Epo. Inoltre si osserva un difetto selettivo a livello dei precursori eritroidi, causato presumibilmente dall'incapacità dei loro progenitori a differenziare, e questo comporta problemi nel compimento dell'eritropoiesi. Grazie all'eritropoiesi vengono prodotti ogni giorno circa $2,5 \times 10^{11}$ eritrociti. La produzione di un così elevato numero di cellule è resa possibile dall'esistenza di due tipi distinti di cellule progenitrici totipotenti derivanti dalle unità formanti colonie CFU-S. I progenitori della linea eritroide sono stati classificati e sono: CFU-GEMM (*granulocyte erythrocyte macrophage megakaryocyte colony forming units*), CFU-b/M/E (*basophil megakaryocyte erythroid colony forming units*), BFU-E (*burst forming units erythroid*), CFU-E (*colony forming units erythroid*). Il CFU-GEMM in coltura forma colonie molto larghe di centinaia di precursori eritroidi che mantengono ancora il nucleo. Il progenitore eritroide più differenziato è CFU-E che invece forma piccole colonie.

Il processo dell'eritropoiesi, che avviene nel midollo osseo, con la differenziazione della cellula staminale totipotente verso i primi progenitori eritroidi (cellule BFU-E e CFU-E), richiede la presenza di vari stimoli (IL-3, GM-CSF, vari fattori di trascrizione), di principi di natura vitaminica (vitamina B12 e acidi folici) ma soprattutto l'azione della eritropoietina. L'attività di quest'ultima si esplica soprattutto a livello dei progenitori eritroidi maggiormente ricchi di recettori dell'Epo (CFU-E) per proseguire sino allo stato di reticolocita. Le CFU-E

necessitano di una bassa concentrazione di Epo sia per sopravvivere sia per dare origine al primo elemento della serie eritrocitaria, il proeritroblasto (fig. 2). In condizioni fisiologiche questa prima cellula eritroide morfologicamente riconoscibile impiega circa 4-5 giorni per raggiungere lo stato maturo di reticolocita midollare; quest'ultimo, dopo un'ulteriore maturazione di 1-2 giorni nel midollo, passa nel circolo periferico dove mantiene i caratteristici residui nucleari per ancora un giorno prima di diventare eritrocita maturo. Nel corso di questa differenziazione il citoplasma delle cellule staminali, originariamente basofilo, diviene acidofilo parallelamente al comparire dell'emoglobina, mentre il nucleo progressivamente scompare.

Il principale regolatore terminale dell'eritropoiesi è come detto, l'Epo. Nei pazienti DBA lo sviluppo eritroide è seriamente compromesso, con difetti nella formazione delle colonie BFU-E, ma in nessuno dei pazienti analizzati sono state evidenziate mutazioni nel recettore dell'Epo (Epo-R) (Dianzani et al. 1996). L'Epo attiva prevalentemente i meccanismi di sopravvivenza cellulare (noti solo in parte), ma favorisce anche la divisione cellulare eritroide, la sintesi emoglobinica e l'espressione di altre proteine di membrana tra cui i recettori della transferrina. L'Epo viene secreta a livello renale in rapporto al grado di ipossia tissutale renale che, a sua volta, è dipendente dal grado di anemia.

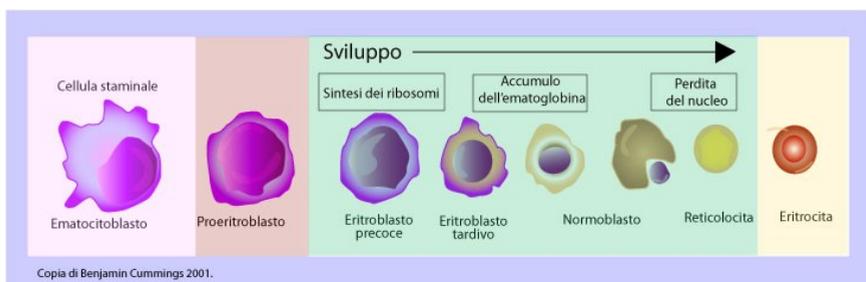


Fig. 2: Eritropoiesi. Schema semplificato del processo di differenziamento che avviene durante lo sviluppo degli eritrociti.

Nel lavoro di Ohene-Abuakwa è stato evidenziato che anche in seguito a trattamento con Epo, le colonie che si formano nel caso dei pazienti DBA sono molto più piccole, suggerendo così difetti nella maturazione eritroide dipendente dall'Epo. In questo studio sono state utilizzate cellule mononucleate del sangue periferico prelevate sia da pazienti DBA che da donatori sani. La crescita cellulare dipendente dall'Epo è stata analizzata durante due fasi, una iniziale e una invece più tardiva. Durante

la prima fase sia le cellule normali che quelle DBA diminuiscono di due volte. Quando l'Epo viene aggiunta nella seconda fase alla coltura è stata osservata la normale proliferazione eritroide nelle cellule sane mentre nelle cellule malate di DBA questo tipo di risposta è fallita. Le cellule sono state piastrate su terreno semi-solido contenente Epo, e si sono formate lo stesso numero di colonie ma nel caso delle cellule dei pazienti DBA queste sono notevolmente più piccole. Questa è stata un'osservazione molto importante perché suggerisce che il difetto è nella fase finale della maturazione dei progenitori eritroidi (Ohene-Abuakwa et al. 2005).

Inoltre la scoperta di alti livelli di mRNA per RPS19 nei proeritroblasti e la successiva loro diminuzione durante il differenziamento eritroide terminale è in accordo con la scoperta dell'arresto della maturazione negli stadi precoci del differenziamento eritroide nella DBA (Da Costa, 2003).

Difetti nella maturazione dell'rRNA

La biogenesi del ribosoma ha sede nel nucleolo ed è un processo molto complesso controllato da più di cento geni. La maggior parte di questi è essenziale ma la loro funzione ancora oggi è oscura. Nel nucleolo i pre-rRNA vengono sintetizzati, modificati e processati e l'rRNA maturo viene assemblato nei ribosomi. Le unità trascrizionali sono ripetute "in tandem" separate da spaziatori intergenici (NTS) e contengono la sequenza degli rRNA maturi (18S, 5.8S e 28S) separate da spaziatori intragenici (ITS1, ITS2, ETS1 e ETS2). Nelle cellule umane ci sono circa 400 unità trascrizionali per l'rRNA organizzate in decine di ripetizioni testa-coda. L'unità trascrizionale che codifica per il precursore dell'rRNA, intesa come sequenza degli rRNA maturi e sequenze intrageniche, è conservato in tutti gli eucarioti. La sequenza degli rRNA maturi è altamente conservata ma la loro lunghezza varia come conseguenza dell'inserzione di "regioni di espansione" (Rauè 1988; Clark CG 1987). Invece le regioni tra gli rRNA maturi non sono conservate né come sequenza né come lunghezza. Il processamento del pre-rRNA avviene in seguito a tagli eso- ed endo-nucleotidici (fig. 3). In alcune malattie ribosomali, come detto, vi sono difetti nel compimento di tale processo in vari passaggi.

Anche nella DBA sono stati evidenziati difetti nella maturazione dell'rRNA ribosomale. Il primo gene identificato come responsabile di questa patologia codifica per RPS19 ed è mutato nel 25% dei pazienti. In questo gene sono state identificate numerose mutazioni catalogate in due

classi. Nella prima l'espressione del gene è alterata da inserzioni, delezioni, mutazioni di siti di splicing che causano degradazione dell'mRNA mediante l'attivazione del meccanismo di controllo NMD (*non-sense mediate mRNA decay*). Nella seconda classe rientrano mutazioni di tipo *missense* che alterano la funzione della proteina (ad esempio l'assemblaggio delle proteine nella subunità 40S del ribosoma). In questo modo si osserva un forte impatto sull'attività traduzionale della cellula in quanto si hanno alterazioni nell'assemblaggio del ribosoma stesso. Inoltre sono stati osservati difetti nella maturazione dell'rRNA 18S a livello della maturazione dal 21S al 18S-E. Non bisogna comunque escludere una possibile funzione extraribosomale di RPS19 come responsabile della comparsa della malattia. Infatti RPS19 lega alcune proteine, come la chinasi PIM1 o il fattore 2 di crescita nei fibroblasti, che potrebbero essere rilevanti nella comparsa della patologia.

Nel 2% dei pazienti di DBA è mutato il gene RPS24 e anche in questo caso si riscontrano problemi nella maturazione del 18S ma questa volta a livello della maturazione dal 30S al 21S. La figura 3 mostra il processamento del pre-rRNA e l'intervento delle diverse proteine ribosomali note, nei diversi livelli di maturazione del rRNA.

Quindi l'aploinsufficienza di una proteina ribosomale causa un'alterazione nel processamento del pre-rRNA. Tuttavia soltanto alcune cellule, come quelle dei precursori eritroidi del sangue, sembrano particolarmente sensibili a questa alterazione forse perché necessitano di un alto livello di sintesi proteica e quindi di ribosomi.

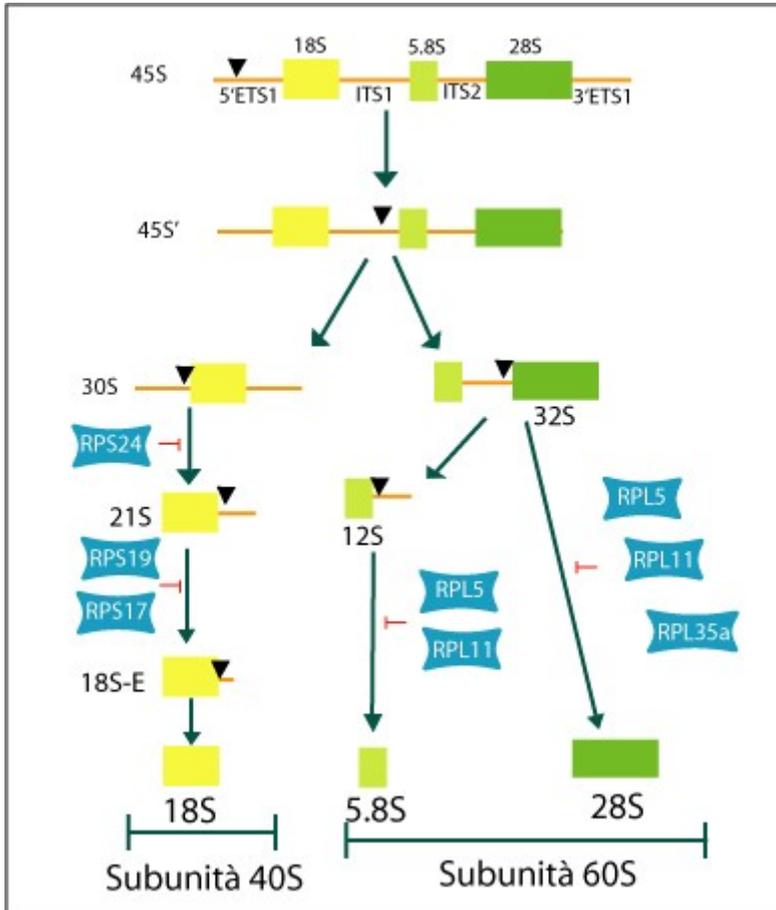


Fig. 3: Schema semplificato del processamento dell'rRNA in cellule umane. In figura è mostrata solo la via principale con i tagli eso- e endo-nucleolitici. Il principale sito di taglio è indicato con un triangolo nero. Sono inoltre mostrati i difetti del processamento riscontrati nei malati di DBA con mutazioni nelle diverse proteine ribosomiali (RPS24, RPS19, RPS17, RPL5, RPL11 e RPL35a).

RPS19 e la DBA

Come detto precedentemente, nel 25% dei malati di DBA sono state identificate mutazioni a carico del gene che codifica per la proteina ribosomale RPS19. In tutti questi pazienti la mutazione in RPS19 si presenta in eterozigosi, essi hanno cioè un allele normale e uno mutato. Ciò suggerisce che la mutazione in RPS19 in omozigosi è letale e che il fenotipo associato alle mutazioni in pazienti DBA può essere dovuto all'aploinsufficienza: un solo allele non sarebbe in grado di svolgere completamente le funzioni del gene. Per comprendere il meccanismo molecolare della patologia e di cercare terapie alternative a quelle esistenti è nata l'esigenza di un modello animale della DBA. Perciò il gruppo di Matsson (Matsson et al. 2004) ha generato un topo con la delezione di un allele del gene RPS19. Gli studi hanno evidenziato, come atteso, la letalità dell'embrione KO per il gene RPS19 in omozigosi che non raggiunge lo stato di blastocisti. Tuttavia in eterozigosi, (RPS19 ^{+/}), il topo è vitale e non sembra avere delle anomalie ematopoietiche. Recentemente risultati differenti sono stati ottenuti con un topo eterozigote per una mutazione in RPS19 (Y54N) prodotto nel gruppo di Barsh (McGowan et al. 2008). Questo topo mostra una crescita ridotta, la riduzione del peso del corpo alla nascita (10-15% di riduzione) e una lieve ipoplasia eritrocitica con una riduzione del numero di reticolociti nel sangue del 15%.

Per cercare di analizzare l'effetto di una diminuzione di RPS19 in un contesto cellulare più semplificato, sono stati condotti esperimenti di RNA interference sull'mRNA di RPS19 in colture cellulari. Sono state utilizzate sia linee di eritroleucemia umana, TF-1, che di leucemia mieloide umana, K562, che permettono il silenziamento di RPS19 tramite un sistema inducibile con la doxiciclina (Miyake et al. 2005). Quando viene inibita l'espressione di RPS19, si osserva una diminuzione della crescita cellulare e l'induzione dell'apoptosi.

PIM1

Per cercare di chiarire il meccanismo molecolare della DBA sono stati portati avanti degli esperimenti per identificare interattori di RPS19 che potessero avere un ruolo nella patologia. Nell'ambito di tali studi, in collaborazione con il laboratorio della prof. Irma Dianzani dell'Università del Piemonte Orientale, esperimenti di doppio ibrido in lievito, hanno evidenziato l'interazione di RPS19 con la chinasi PIM1 (Chiocchetti et al. 2005).

PIM1 appartiene alla famiglia delle calmoduline calcio dipendenti insieme a PIM2 e PIM3. Tutte e tre queste isoforme sono altamente conservate nei vertebrati e mostrano tra loro il 53% di omologia aminoacidica (Allen et al. 19997).

Il gene *Pim-1* (proviral integration site 1 for MuLV) fu originariamente identificato come un sito preferenziale d'inserzione provirale del virus della leucemia murina di Moloney (MoMuLV) (Cuypers et al., 1984) e mappa sul sito fragile del cromosoma 6p21. Dato che in seguito a inserzione virale sono stati riscontrati alti livelli dell'espressione di PIM1, ne è stato suggerito un ruolo nella trasformazione maligna riscontrata nella patologia. Infatti l'espressione esogena e costitutiva di PIM1 nelle cellule linfocitarie del topo transgenico, predispone l'animale allo sviluppo di linfomi. Questa trasformazione è particolarmente evidente in presenza dell'attivazione di un secondo oncogene come c-Myc (Van Lohuizen et al. 1989).

Caratteristiche strutturali

Il gene che codifica per PIM1 nell'uomo è composto da sei esoni e cinque introni. La sequenza del promotore è ricca in G+C e non contiene una TATA box, caratteristiche dei promotori "house-keeping" (Meeker et al. 1987). Il trascritto presenta, nelle regioni non tradotte al 3' UTR, delle sequenze ricche in A+U che causano una destabilizzazione dell'mRNA. Il messaggero di PIM1 codifica per 2 proteine di peso molecolare di 34 e 44 kDa grazie all'utilizzo di un sito d'inizio di traduzione alternativo CUG a monte del canonico codone AUG (Saris et al. 1995). Tuttavia rimane ancora da chiarire il ruolo dell'isoforma di 44 kDa, visto che è stata rilevata solo in alcuni tessuti e in percentuale ridotta rispetto all'altra isoforma. Il dominio catalitico della chinasi comprende la regione tra gli amminoacidi 38 e 290, al cui interno è conservata una glicina nel dominio ad ansa (45-50), il sito di legame del fosfato (44-52) e l'accettore del protone in posizione 167. La sostituzione della lisina 67 con metionina

rende inattiva l'attività chinasi di PIM1. La vita media della chinasi è molto breve: in leucociti del sangue periferico è di circa 10 minuti mentre può arrivare a 20 minuti in cellule K562 (cellule mieloidi di leucemia cronica).

Espressione, attivazione e stabilizzazione

PIM1 è espresso ad alti livelli nel timo, milza, midollo osseo ma anche in un gran numero di tumori di origine non ematopoietica come: tumore dell'epitelio orale, del pancreas, dei polmoni, della prostata e del colon. PIM1 è espresso in 38 linee cellulari mostrando alti livelli di espressione in linee mieloidi come le K562, U937, BV173, intermedi livelli di espressione in cellule B e livelli non rilevabili in cellule T (Meeker et al. 1987). Inoltre sono stati riscontrati alti livelli di questa chinasi in molte altre linee cellulari come le HeLa (cervice uterina), LNCaP, PC3 (prostata). L'espressione di PIM1 è stata rilevata anche nel sistema nervoso centrale (Eichmann et al. 2000) e nel cuore (Muraski et al. 2007) nella fase embrionale mentre i livelli della proteina scendono drasticamente dopo la nascita.

PIM1 si comporta come un gene a "risposta precoce": aumenta la sua trascrizione molto rapidamente in seguito alla stimolazione. In ogni caso l'espressione di PIM1 in cellule non cancerose è altamente regolata e vi sono molti meccanismi che controllano finemente la sua espressione. Questa chinasi, infatti può essere indotta dall'azione di molte citochine (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15), fattori di crescita e mitogeni come: LIF, GM-CSF, G-CSF, EGF, INF- α (interferone- α), PRL, Epo, PMA. Perciò differenti stimoli possono attivare l'espressione del gene PIM1 nei diversi tipi cellulari. La principale via di trasduzione responsabile dell'attivazione trascrizionale di PIM1 è quella che coinvolge la chinasi JAK (*Janus kinases*) e il fattore di trascrizione STAT. Dopo la stimolazione del recettore con il ligando si ha l'attivazione di JAK che fosforila STAT (STAT1-3-5) su residui di tirosina. STAT fosforilato dimerizza e trasloca nel nucleo, si lega all'elemento GAS-ISFR presente nel promotore di PIM1 e ne attiva la trascrizione (Miura et al. 1994). PIM1 stesso può regolare negativamente questa via fosforilando, e quindi attivando, un gruppo di regolatori negativi dell'attività di STAT, chiamate proteine SOCS (Losman et al. 1999) (fig. 4).

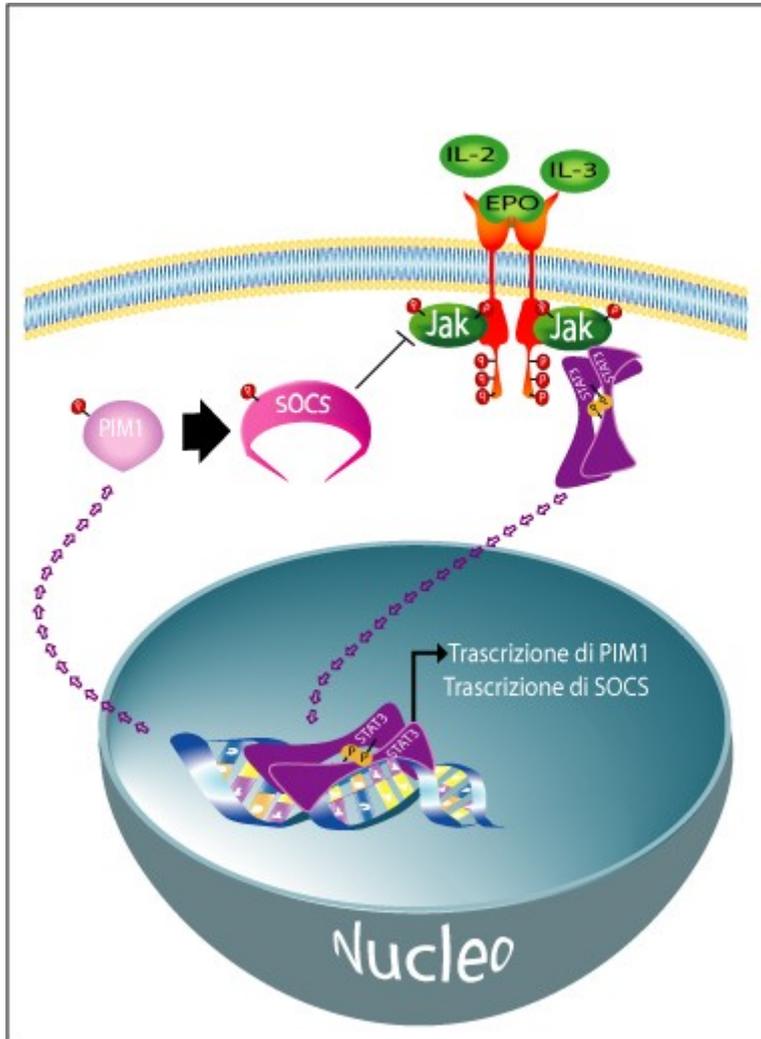


Fig. 4: Via Jak-STAT. Rappresentazione schematica delle principali proteine coinvolte nella regolazione della trascrizione del gene codificante per PIM1.

Il messaggero di PIM1, come quello di molti altri oncogeni, contiene come detto, delle sequenze ricche in A/U nel 3'UTR che destabilizzano il trascritto determinando un'emivita molto breve dell'mRNA. In letteratura sono descritti molti casi di stabilizzazione dei messaggeri di oncogeni, dovuta a eliminazione di queste sequenze dal 3'UTR, in associazione a trasformazione neoplastica (Reeves et al. 1990). Il messaggero di PIM1 viene inoltre stabilizzato in seguito a trattamento con mitogeni; infatti

Magnuson e collaboratori hanno dimostrato che nei linfociti, in seguito a trattamento con ConA o PMA più ionomycina, si ha un aumento dei livelli di mRNA di PIM1 dovuti in parte anche a un aumento di stabilità del trascritto (Wingett et al. 1995). Il 5'UTR dell'mRNA di PIM1 si presenta molto strutturato a causa di regioni ricche in G+C (76%) e come molti altri messaggeri, con il 5'UTR molto strutturato, la sua traduzione è dipendente dal fattore eIF4E con meccanismi ancora non ben noti.

Inoltre recentemente il gruppo di Ghoshal e collaboratori ha individuato un controllo traduzionale dell'mRNA di PIM1 dipendente dal micro RNA miR-1 (Nasser et al. 2008). I microRNA sono delle piccole sequenze di RNA che si appaiano (con uno o due *mismatch*) alla sequenza dell'RNA bersaglio e provocano un blocco della traduzione. Nel 3'UTR dell'mRNA di PIM1 è stato individuato un ipotetico sito di legame per il miR-1 e tramite saggi con il "reporter" luciferasi è stata osservata una significativa inibizione traduzionale in seguito all'espressione esogena del miR-1. Inoltre è stata osservata una buona correlazione tra espressione del miR-1 e la traduzione del messaggero di PIM1 in cellule A549 di tumore ai polmoni.

La chinasi PIM1 una volta sintetizzata si auto-fosforila e questo ne determina un aumento di stabilità. Infatti la sua defosforilazione da parte della fosfatasi PP2A (Losman et al. 2003), causa un drastico calo della sua emivita con successiva ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma 26S. In questa regolazione post-traduzionale di PIM1 interviene anche la proteina HSP90 che ne previene l'ubiquitinazione e quindi la sua degradazione (Shay et al. 2005).

Funzioni biologiche

In letteratura sono stati identificati molti substrati di PIM1 coinvolti nella regolazione della crescita e del ciclo cellulare (p21, p27, cdc25a, cdc25c), nell'apoptosi (BAD) e nella regolazione della sintesi proteica (S6K1, 4E-BP1) (fig. 5). Questo rende PIM1 un regolatore importante dello sviluppo e dell'omeostasi cellulare agendo direttamente sulla sopravvivenza e sviluppo della cellula.

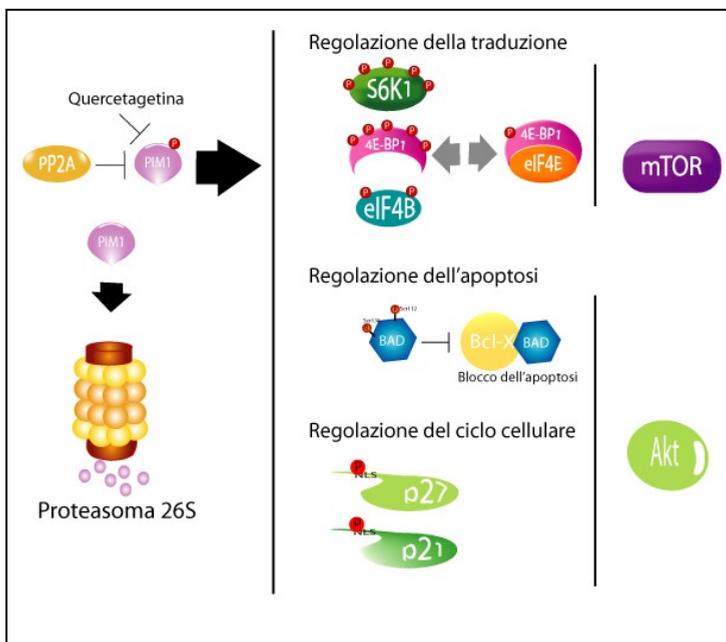


Fig. 5: Rappresentazione schematica delle funzioni biologiche di PIM1.

-Controllo della trascrizione genica

Uno dei primi substrati di PIM1 identificati fu la proteina adattatrice p100, la quale è un co-attivatore trascrizionale di c-Myc (Leverson et al. 1998). Più recentemente un lavoro di Zippo e collaboratori ha chiarito il ruolo di PIM1 nella regolazione trascrizionale dipendente da c-Myc. Nel nucleo PIM1, c-Myc e Max formano un complesso che fosforila l'istone H3 e determina attivazione genica (Zippo et al. 2007). Questi risultati potrebbero spiegare l'osservazione che PIM1 coopera in sinergia con c-Myc nella trasformazione tumorale. Infatti il topo doppio-transgenico per entrambi i geni (c-Myc e PIM1) (Moroy et al. 1991), sviluppa linfomi già nell'utero e non risulta vitale.

Tra i fattori di trascrizione fosforilati da PIM1 troviamo oltre a c-Myc (Zhang et al. 2008) anche il fattore di trascrizione ematopoietico RUNX2-3 (LT Aho et al. 2006).

-Controllo del ciclo cellulare

Tra i substrati di PIM1 vi sono anche proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare come per esempio le fosfatasi *cdc25a* e *cdc25c* (Mochizuki et al. 1999, Bachmann et al. 2005), la proteina *p21*, (Wang et al. 2002), *p27* (Morishita et al. 2008) e C-TAK1 (Bachmann et al. 2004). Quindi l'azione di PIM1 potrebbe determinare un'accelerazione del ciclo cellulare sia nel *checkpoint* G1/S fosforilando *cdc25a*, *p27* e la *cdk2* che in quello G2/M agendo su *cdc25c* e C-TAK1.

Per esempio la proteina *p27* ha un ruolo determinante nella regolazione della proliferazione cellulare. Quando *p27* viene fosforilata da PIM1, sui residui T157 e T198, subisce l'esporto dal nucleo e grazie all'intervento delle proteine 14-3-3 una volta nel citoplasma viene degradata nel proteasoma 26S. In accordo con questi dati la sovraespressione di PIM1 in cellule K562 è correlata con una diminuzione dell'emivita della proteina *p27* e un'accelerazione nella transizione G1/S (Fig. 6).

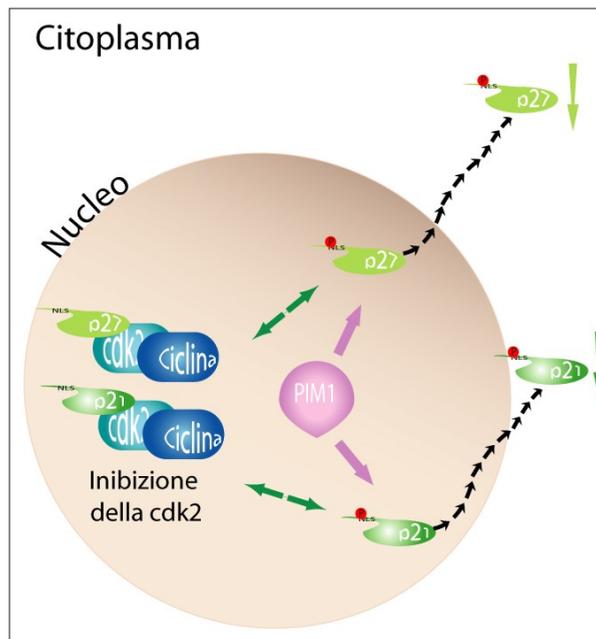


Fig. 6: Controllo del ciclo cellulare. Rappresentazione schematica del controllo del ciclo cellulare da parte di PIM1 su p27 e p21.

-Regolazione della sintesi proteica

Un elevato numero di pubblicazioni indica che la regolazione della sintesi proteica è sotto il controllo della via di trasduzione del segnale che, partendo dai nutrienti porta all'attivazione di PI3K, di AKT e mTOR e alla fosforilazione di S6K1 e 4E-BP1. L'attivazione di mTOR è necessaria affinché sia inibita l'interazione tra il fattore di inizio di traduzione eIF4E e il suo inibitore 4E-BP1. Nel gruppo di Kraft e collaboratori (Chen et al. 2005) è stato dimostrato come la sovraespressione di PIM2 determini la fosforilazione di 4E-BP1 anche in presenza di rapamicina, nota per causare l'inattivazione di mTOR. Perciò sembrerebbe che la sovraespressione di PIM renda le cellule insensibili all'azione di questa droga. D'altro canto un altro substrato noto di mTOR è la chinasi S6K1, necessaria per la fosforilazione del fattore di inizio di traduzione eIF4B e della proteina ribosomale RPS6. Anche questa chinasi viene fosforilata da PIM1 in seguito a sovraespressione e in presenza di rapamicina (Chen et al. 2005) dimostrando che PIM1 potrebbe avere un ruolo nel promuovere la sintesi proteica agendo a valle o in parallelo a mTOR. Inoltre nel lavoro di Wang (Peng et al. 2007) è stato dimostrato che PIM1 è in grado di fosforilare *in vitro* il fattore di inizio traduzione eIF4B, sulla serina 406.

Quindi, agendo su diversi substrati, la chinasi PIM sembrerebbe in grado di regolare e promuovere la sintesi proteica generale della cellula (fig. 7).

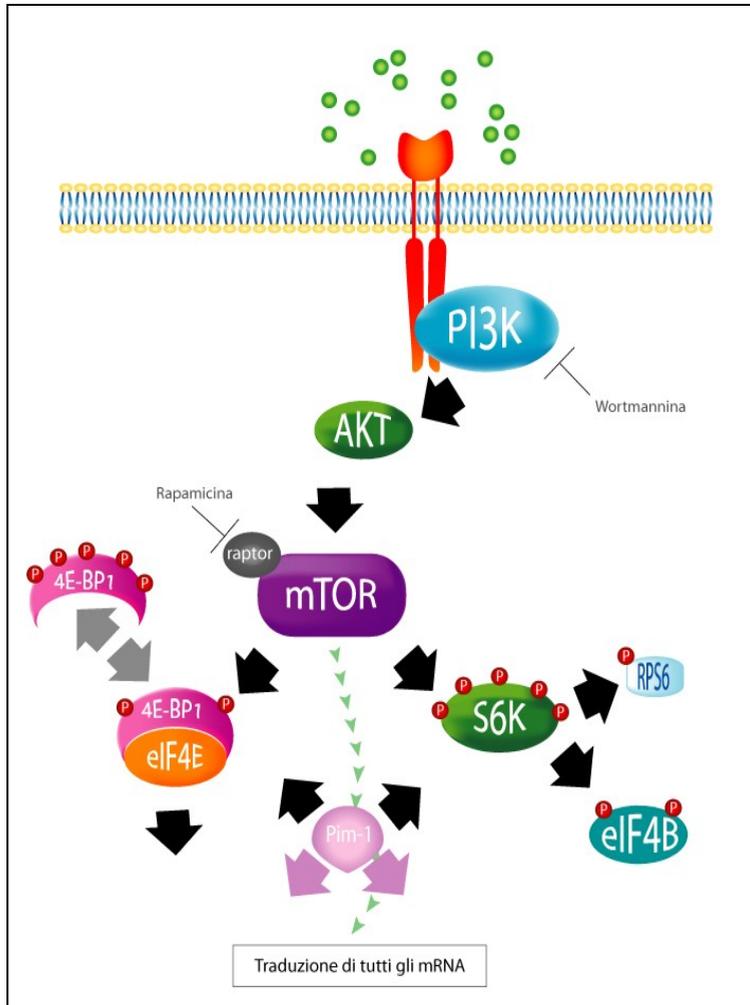


Fig. 7: Via PI3K-mTOR. Rappresentazione schematica delle principali proteine coinvolte nella regolazione della traduzione dei messaggeri cellulari.

-Inibizione dell'apoptosi e stimolazione dell'autofagia

PIM1 svolge la sua attività di oncogene determinando anche un blocco dell'apoptosi. Infatti è in grado di fosforilare il fattore pro-apoptotico BAD sulla serina 112 (Aho et al. 2004, Yan et al. 2003 e Fox et al. 2003). La proteina BAD, in seguito alla fosforilazione, viene legata dalle

proteine 14-3-3 che impediscono la formazione dell'eterodimero BAD-BCL-X_L e quindi bloccano l'attivazione della via caspatica mitocondriale.

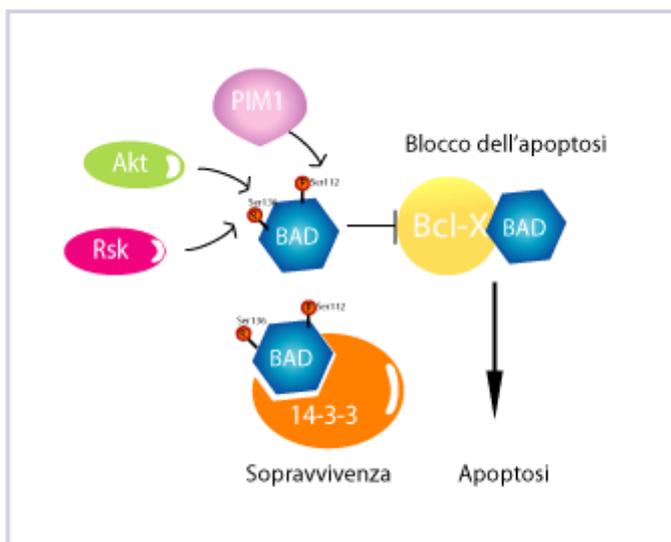


Fig. 8: Fosforilazione della proteina pro-apoptica BAD. Rappresentazione schematica delle principali chinasi in grado di fosforilare il fattore pro-apoptico BAD.

PIM1 è anche chiamata una “chinasi della sopravvivenza” perché stimola la crescita cellulare in risposta a droghe che causano invece la morte cellulare. Per esempio la sovraespressione di PIM1 attenua l'effetto inibitorio della rapamicina sulla proliferazione cellulare (Fox et al.2005). Accanto alla stimolazione della crescita cellulare e all'inibizione dell'apoptosi sembra anche che la chinasi PIM2, sia in grado di indurre l'autofagia. Questo fenomeno è stato recentemente osservato in condrociti umani in coltura. E' noto che l'autofagia è un meccanismo molecolare con il quale la cellula si “auto-digerisce” in parte per permettere il riciclo del materiale. L'autofagia regola il *turnover* fisiologico di svariati costituenti cellulari, inclusi organuli e proteine, solubili o aggregate, mediante un processo multifasico che coinvolge l'attività degradativa lisosomiale. L'autofagia viene bloccata dalla proteina mTOR, e perciò può essere indotta dalla somministrazione di rapamicina (inibitore specifico di mTOR), o dall'affamamento da siero e nutrienti o anche da stress ossidativo. In un lavoro di Srinivas e

collaboratori del 2007 è stato messo in luce il ruolo di PIM2 sia nel promuovere l'autofagia che nel bloccare l'apoptosi in condrociti N1511 in seguito a trattamento con rapamicina (Bohensky et al. 2007).

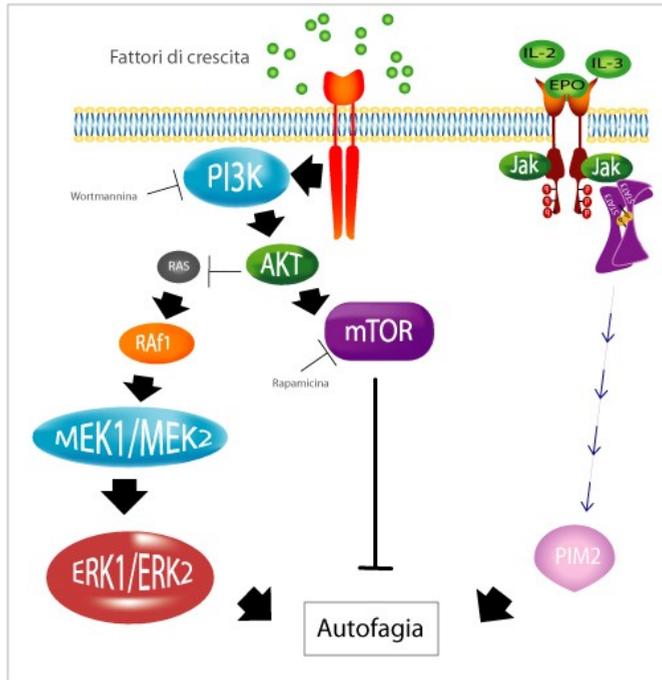


Fig. 9: Ruolo di PIM2 nel processo autofagico. Rappresentazione schematica delle principali proteine in grado di attivare la formazione dell'autofagosoma.

Tuttavia i bersagli molecolari di PIM coinvolti nella regolazione o nell'attivazione del processo autofagico non sono stati identificati.

Topo knockout

Dato il vasto numero di substrati, PIM1 risulta coinvolto in numerose vie di trasduzione del segnale, importanti nella proliferazione. La sua sovraespressione è stata riscontrata, come già detto, in molti tumori come quello prostatico, polmonare, in varie leucemie umane e eritro-leucemie (Dreyfus et al 1990). In più gli alti livelli di PIM1 nei tessuti ematopoietici hanno fatto supporre che PIM1 avesse un ruolo nello sviluppo ematopoietico. Per meglio definire il ruolo delle chinasi PIM in

questi processi, diversi gruppi di ricerca hanno cercato di evidenziare l'effetto della mancanza o inibizione di queste proteine. E' stato dapprima generato un topo *knockout* per l'espressione della sola isoforma PIM1 (Laird et al. 1993). Questo topo fertile e vitale, mostrava anche se lieve, un fenotipo ematopoietico. Infatti anche se non sono state trovate delle differenze tra il numero dei granulociti, monociti e "trombociti" e l'ematocrito non era alterato, gli eritrociti mostravano una diminuzione del volume cellulare e una leggera microcitemia associata ad eccessi di ferro nel sangue.

Nel 2004 nel gruppo di BERNS è stato generato il topo *knockout* per tutte e tre le isoforme di PIM (PIM1-PIM2-PIM3), che è risultato essere fertile e vitale come il precedente. Questo topo non mostra difetti nello sviluppo dei diversi tessuti dell'embrione (Mikkers et al. 2004). Comunque la mancanza delle tre chinasi PIM, causa una notevole riduzione (30%) delle dimensioni del corpo dell'animale, riscontrabile già alla nascita (fig. 10). Questa diminuzione è causata da una riduzione del numero piuttosto che della grandezza delle cellule.

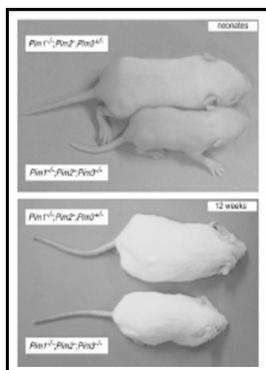


Fig. 10: Topo *knockout* per tutte e tre le isoforme di PIM (PIM1-PIM2-PIM3). Immagine presa dal lavoro di Berns (Mikkers et al. 2004).

Inoltre sono stati osservati alterazioni nella risposta all'insulina (IGF) e questo tipo di difetto potrebbe causare la riduzione della massa corporea dell'animale. E' stato anche analizzato l'effetto della mancanza di PIM sulla proliferazione delle cellule del midollo osseo, in risposta a fattori di crescita come IL-3 e IL-7. Il risultato è stato che nelle pre-cellule B è stata notata una riduzione della risposta proliferativa dipendente da IL-7.

Questo potrebbe dipendere dalla diminuzione dei livelli di IL7R che è stata osservata durante il differenziamento delle cellule B. Il topo mancante delle tre chinasi PIM non mostra altri fenotipi ematopoietici che forse sono compensate da altri fattori.

Scopo della ricerca

Il preciso controllo della biogenesi del ribosoma nel nucleolo e della traduzione del messaggero nel citoplasma, è vitale per la sopravvivenza cellulare. Infatti la crescita e proliferazione cellulare sono dipendenti dell'attività traduzionale della cellula. Alterazione delle funzioni del nucleolo determinano una risposta della cellula con blocco della proliferazione e stimolo apoptotico. Questo fenomeno viene chiamato stress nucleolare o ribosomale. Esistono molte malattie umane dove è compromessa la biogenesi del ribosoma. Per esempio ricordiamo la Discherotosi Congenita (DC), la sindrome di Shwachman Diamond (SDS), l'ipoplasia dei capelli e cartilagine (CHH) e l'anemia di Diamond-Blackfan (DBA). Quest'ultima, come visto, è determinata nel 25% dei casi, da mutazioni presenti nel gene codificante per la proteina ribosomale RPS19. L'effetto delle mutazioni è un processamento difettivo dell'rRNA 18S con un conseguente sbilanciamento nella sintesi delle due subunità del ribosoma. E' quindi probabile che queste alterazioni causino stress nucleolare o ribosomale determinando arresto della crescita o aumento di apoptosi. Per comprendere il meccanismo della DBA abbiamo deciso di individuare dei possibili interattori di RPS19 che potrebbero essere coinvolti in questa patologia. Nell'ambito di questo progetto, in collaborazione con il laboratorio della prof. Irma Dianzani dell'Università del Piemonte Orientale, abbiamo evidenziato l'interazione di RPS19 con la chinasi PIM1, tramite il saggio di doppio ibrido in lievito.

Partendo da questo risultato, il mio progetto di ricerca di Dottorato si propone di studiare la funzione di PIM1 nella sua interazione col ribosoma e d'individuare un possibile ruolo di questa chinasi nello stress ribosomale e quindi nella patogenesi della DBA. La ricerca si può suddividere in 4 parti principali:

1. Analisi dell'effetto della sovraespressione di PIM1 sulla crescita cellulare.
2. Caratterizzazione dell'interazione tra RPS19 e PIM1. Per quest'analisi sono state usate diverse tecniche:
 - Coimmunoprecipitazione delle due proteine;
 - Cosedimentazione della chinasi con il ribosoma tramite analisi del profilo polisomale e tramite ultracentrifugazione a 100.000g; quest'ultima analisi è stata condotta in diverse condizioni di crescita per poter evidenziare il ruolo di PIM1 sul ribosoma;

3. Analisi degli effetti dello stress ribosomale sull'espressione di PIM1. Sono stati usati i seguenti approcci sperimentali:
 - Induzione dello stress ribosomale in linee ematopoietiche (K562) sia attraverso il silenziamento, con la tecnica dell'RNAi, del messaggero di RPS19 e sia con il trattamento con diverse droghe note per stimolare stress nucleolare.
 - Analisi del livello di PIM1 in linee linfoblastoidi derivate dai pazienti DBA, con mutazione a carico del gene RPS19 e RPS24.
 - Analisi dei livelli endogeni di PIM1 durante il trattamento con desametasone, largamente utilizzato come cura nei pazienti DBA.

4. Analisi degli effetti della sovraespressione di PIM1 durante l'interferenza per RPS19 in cellule K562C.

Risultati

Analisi della sovraespressione di PIM1

Dati di letteratura confermano il ruolo di PIM1 nella sopravvivenza cellulare, infatti questa chinasi è in grado di promuovere la proliferazione, la crescita cellulare e la sintesi proteica generale della cellula. Allo scopo di investigare sulla funzione dell'interazione tra PIM1 e RPS19 abbiamo creato delle linee cellulari che sovraesprimessero la chinasi PIM1 in modo inducibile dalla somministrazione di doxiciolina. A questo scopo, abbiamo utilizzato cellule HEK293 (T-REx) per la trasfezione con un vettore d'espressione contenente il cDNA di PIM1 murino e sono stati ottenuti diversi cloni cellulari. I cloni inducibili così ottenuti sono stati analizzati per l'espressione inducibile di PIM1 (PIM-REx) con somministrazione di doxiciolina. In figura 11 è mostrata la cinetica d'espressione di PIM1 dove si può notare che già a 3 ore di trattamento con doxiciolina si osserva un incremento dell'espressione della chinasi che poi si mantiene più o meno costante. Da notare che il livello di PIM1 endogeno nelle cellule T-REx non è rilevabile nella prima corsia della figura 11.

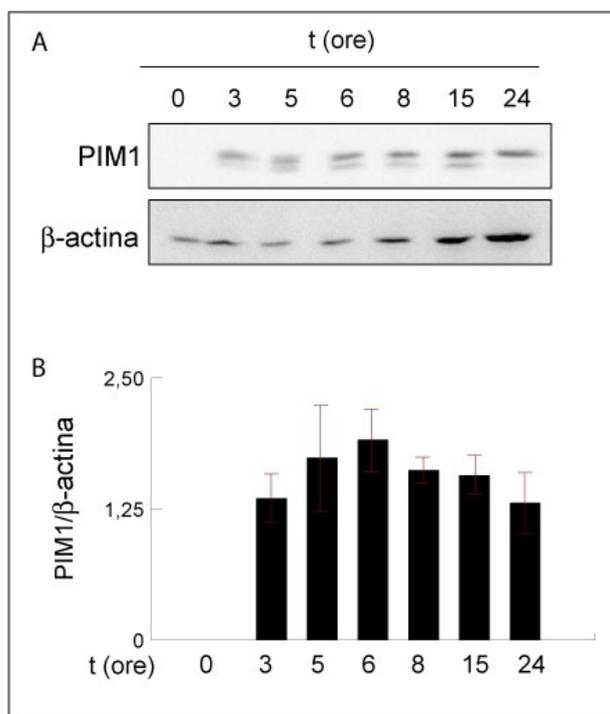


Fig. 11: Analisi della sovraespressione di PIM1 in cellule PIM-REx. A) Esempio di analisi Western di estratti proteici totali di cellule PIM1-Rex trattate con doxiciiclina (2 μ g/ml) per 3, 5, 6, 8, 15 ore; B) Grafico a barre del rapporto tra le quantizzazioni dei segnali di PIM1 e β -actina.. I valori del grafico si riferiscono alla media di tre esperimenti indipendenti con indicato l'errore standard.

Al fine di valutare l'effetto dell'espressione di PIM1 murino esogeno, abbiamo analizzato la proliferazione in cellule indotte con doxiciiclina sia in presenza che in assenza di rapamicina, che è un inibitore della crescita. I risultati mostrano che la sovraespressione di PIM1 causa un aumento della proliferazione cellulare (fig. 12). Inoltre questo aumento si osserva anche in presenza di rapamicina.

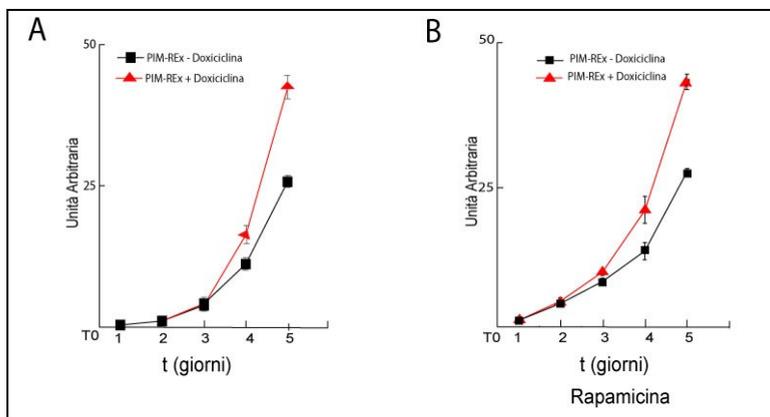


Fig. 12: Analisi della crescita cellulare. Le cellule PIM-REx trattate e non trattate con doxyciclina (2 μ g/ml), sono state contate tramite camera di Neubauer ogni 24 ore per 120 ore. Al numero di cellule iniziale è stato assegnato il valore di 1. I risultati sono stati ottenuti dall'analisi di tre esperimenti indipendenti.

Al fine di verificare se la proteina esogena fosse in grado di fosforilare i suoi bersagli molecolari, abbiamo utilizzato il fattore pro-apoptotico BAD, in quanto è il più noto e caratterizzato bersaglio della chinasi. Abbiamo trasfettato il cDNA di BAD-FLAG, clonato nel vettore d'espressione eucariotico pcDNA3 (pcDNA3BAD-FLAG), in cellule PIM1-Rex e poi è stata indotta la sovraespressione di PIM1 con la doxyciclina (fig. 13). Grazie all'utilizzo di anticorpi fosfo-specifici è stato possibile analizzare lo stato di fosforilazione di BAD durante l'induzione della sovraespressione di PIM1. Come si può vedere dalla figura 13 la sovraespressione di PIM1 causa un significativo aumento della fosforilazione della proteina BAD sulla serina 112. Parallelamente abbiamo sovraespresso in cellule TReX anche la forma cataliticamente inattiva di PIM1, PIM1KD (PIM1 *Kinase Dead*). In questo caso non è stato riscontrato nessun aumento di fosforilazione del fattore proapoptotico BAD, in seguito ad induzione con la doxyciclina (fig.13).

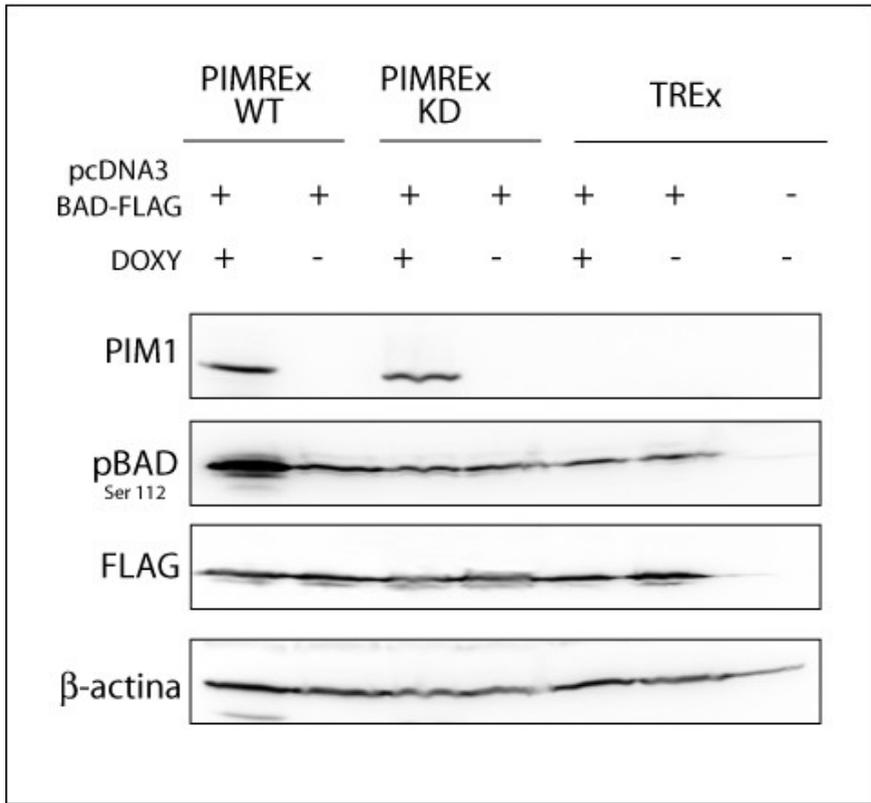


Fig. 13: Western Blotting di proteine totali estratte da cellule TREx e PIMREx (WT-KD) trasfettate transientemente con pcDNA3BAD-FLAG e trattate con doxiciclina. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-pBAD(Ser112), anti-FLAG, anti-PIM1 e anti- β -actina.

I risultati di questa prima analisi sono quindi che la sovraespressione di PIM1 è in grado di stimolare la proliferazione cellulare (fig. 12) e aumentare la fosforilazione di BAD (fig. 13).

Analisi delle fosforilazioni di importanti regolatori della sintesi proteica

Dati di letteratura indicano che la chinasi PIM2 è in grado di fosforilare il regolatore positivo della traduzione S6K1 e quello negativo 4E-BP1. Abbiamo voluto perciò analizzare se anche la sovraespressione di PIM1

potesse promuovere la fosforilazione di questi due importanti regolatori della sintesi proteica. Abbiamo utilizzato cellule PIM-REx indotte con doxiciclina per la sovraespressione di PIM1 e abbiamo analizzato tramite Western Blotting i livelli di fosforilazione di S6K1 e 4E-BP1 (fig. 14).

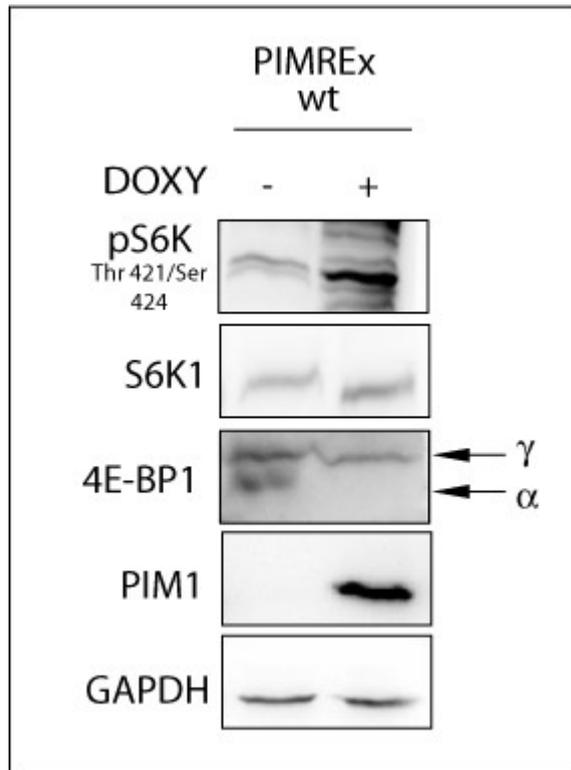


Fig. 14: Western Blotting di estratti citoplasmatici di cellule PIM-REx indotte per 24 ore con doxiciclina. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti- GAPDH, anti-4E-BP1, anti-PIM1, anti-S6K1 e anti-pS6K (Thr 421 e Ser 424).

I dati ottenuti indicano che la sovraespressione di PIM1 determina un aumento di fosforilazione della chinasi S6K1, sui residui 421 e 424, e del fattore 4E-BP1. L'analisi di quest'ultimo è stata condotta osservando la diversa migrazione della proteina in base al grado di fosforilazione (γ = iperfosforilata e α = ipofosforilata) (fig.14).

Inoltre dati non mostrati in questa tesi indicano che la sovraespressione di PIM1 causa un aumento della traduzione dei messaggeri cellulari.

La chinasi PIM1 associa con il ribosoma attivo

Per analizzare più in dettaglio l'interazione tra PIM1 e RPS19 abbiamo utilizzato sia la linea stabile inducibile per l'espressione di PIM1 (PIM1-Rex), descritta nel primo paragrafo, sia cellule trasfettate transientemente con il cDNA di PIM1WT (fig. 15).

Per le trasfezioni transienti in cellule HEK293 è stato utilizzato PIM1 "taggato" con l'epitopo molecolare HA (PIM1-HA). La presenza dell'epitopo HA ci ha permesso di identificare specificamente la proteina PIM1 esogena tramite l'utilizzo di un anticorpo specifico anti-HA. Dopo 24 ore dalla trasfezione, è stata condotta un'immunoprecipitazione dall'estratto citoplasmatico, utilizzando l'anticorpo anti-HA.

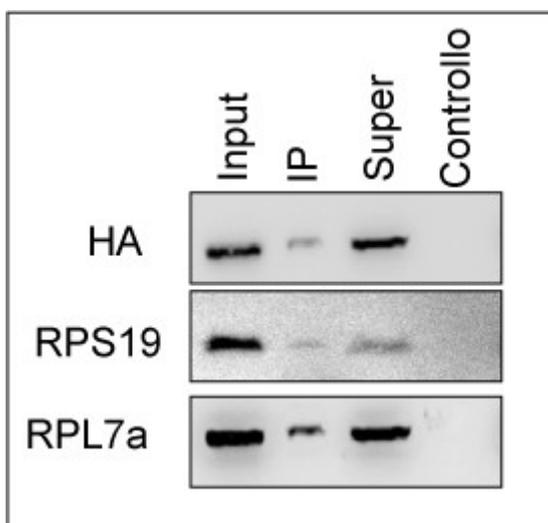


Fig. 15: Immunoprecipitazione della proteina PIM1-HA. Estratti citoplasmatici di cellule HEK 293 trasfettate transientemente con PIM1-HA sono stati incubati con l'anticorpo anti-HA. I complessi antigene-anticorpo sono stati isolati, separati su gel e analizzati tramite Western Blotting utilizzando anticorpi anti-RPS19, anti-RPL7a e anti-HA.

L'immunocomplesso è stato analizzato tramite Western Blotting mostrato in fig. 15. L'analisi indica che PIM-HA è in grado di coprecipitare sia con proteine della subunità piccola del ribosoma (RPS19) che della grande (RPL7a), dimostrando che PIM1 interagisce non solo RPS19 ma, probabilmente, con l'intero ribosoma (fig. 15). Come controllo negativo dell'esperimento, l'estratto è stato trattato in assenza dell'anticorpo anti-HA. Per vedere se l'interazione tra PIM1 e RPS19 potesse avvenire anche

nel nucleo, abbiamo ripetuto l'esperimento d'immunoprecipitazione direttamente da un estratto nucleare. L'estratto ottenuto da cellule PIM-Rex indotte per 24 ore, è stato separato mediante lisi controllata e centrifugazione in nucleo e citoplasma. L'immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-PIM1 è stata effettuata dall'estratto nucleare. In questo caso non è stata osservata nessuna interazione tra le due proteine (fig. 16).

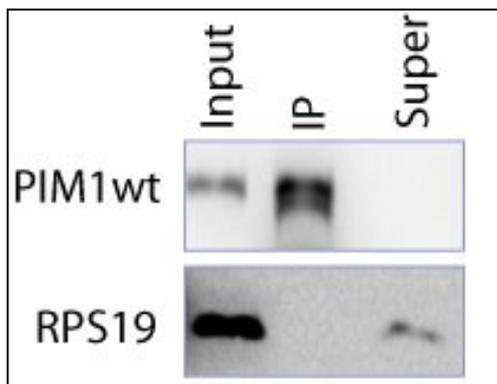


Fig. 16: Immunoprecipitazione della proteina PIM1-HA. Estratti nucleari di cellule PIM1-REx, indotte con doxiciplina per 24 ore, sono stati incubati con l'anticorpo anti-HA. I complessi antigene-anticorpo sono stati isolati, separati su gel e analizzati tramite Western Blotting utilizzando anticorpi anti-RPS19 e anti-PIM1.

L'interazione tra PIM1 e RPS19 è stata analizzata attraverso centrifugazione su gradiente di saccarosio. Tramite tale tecnica è possibile separare i polisomi e le subunità ribosomiali, da tutte le altre proteine cellulari. Viene utilizzato un gradiente di saccarosio dal 10% al 30% su cui si carica l'estratto citoplasmatico. Durante ultracentrifugazione (4 ore a 37.000 rpm) l'estratto si separerà in base al coefficiente di sedimentazione. Monitorando l'assorbanza a 260 nm è possibile ottenere un profilo dove sono riconoscibili le due subunità del ribosoma (40S e 60S) e il monomero (80S), mentre i polisomi, in queste condizioni, formano un pellet e vengono inclusi nella prima frazione. Nella parte più alta del gradiente ritroviamo invece tutte le restanti proteine citoplasmatiche (frazioni 8-11). Il gradiente è stato suddiviso in 11 frazioni e da ogni frazione sono state isolate le proteine mediante precipitazione con TCA. Le proteine isolate dalle frazioni del gradiente sono state analizzate tramite Western Blotting. I risultati mostrano che, nelle cellule TF-1 utilizzate in quest'analisi, PIM1 cosedimenta sia con i

polisomi che con la subunità piccola del ribosoma 40S (fig.17). Come controllo dell'esperimento abbiamo usato anticorpi contro la chinasi AKT e la β -Tubulina, che ritroviamo nella parte non ribosomale del gradiente e le proteine ribosomali RPS19 e RPL7a che invece sono visibili nelle frazioni contenenti ribosomi.

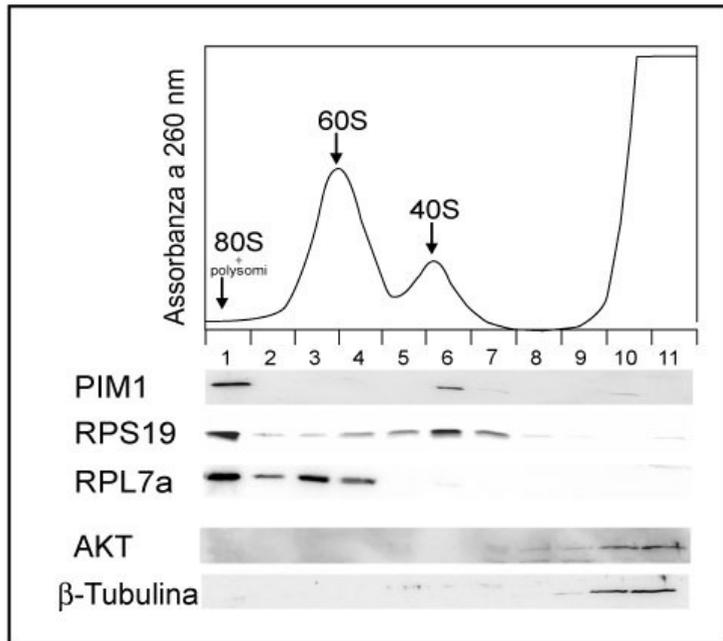


Fig. 17: Associazione della proteina PIM1 con il ribosoma. Estratti citoplasmatici di cellule TF-1 sono stati separati su gradiente di saccarosio 10-30%. Nella parte superiore è riportato il profilo di assorbanza a 260 nm. Da ogni frazione sono state isolate le proteine sottoposte ad analisi Western utilizzando anticorpi, anti-PIM1, anti-RPS19, anti-RPL7a, anti-AKT e anti- β -Tubulina.

Per valutare l'associazione della chinasi PIM1 con il ribosoma in varie linee cellulari, abbiamo effettuato esperimenti di ultracentrifugazione a 100.000 g su un cuscinetto di saccarosio al 15%. Dopo 3 ore di centrifugazione si ottiene la separazione dell'estratto in un pellet (P), contenente polisomi e subunità ribosomali, e un supernatante (S) contenente proteine citoplasmatiche libere. Le frazioni P e S vengono quindi analizzate mediante Western con vari anticorpi. Come controllo sono stati utilizzati anticorpi contro RPS19, presente nella frazione P e contro la β -actina e GAPDH, presenti invece nella frazione S. Con questa

tecnica abbiamo analizzato varie linee cellulari: LNCaP e PC3, linee tumorali di prostata note per avere alti livelli della chinasi, HeLa, cellule epiteliali di adenocarcinoma della cervice, TF-1, cellule ematopoietiche eritroleucemiche e K562, cellule di leucemia cronica mieloide umana. I risultati, riportati in figura 18, indicano che PIM1 è in grado di cosedimentare con i ribosomi in tutte le linee cellulari analizzate.

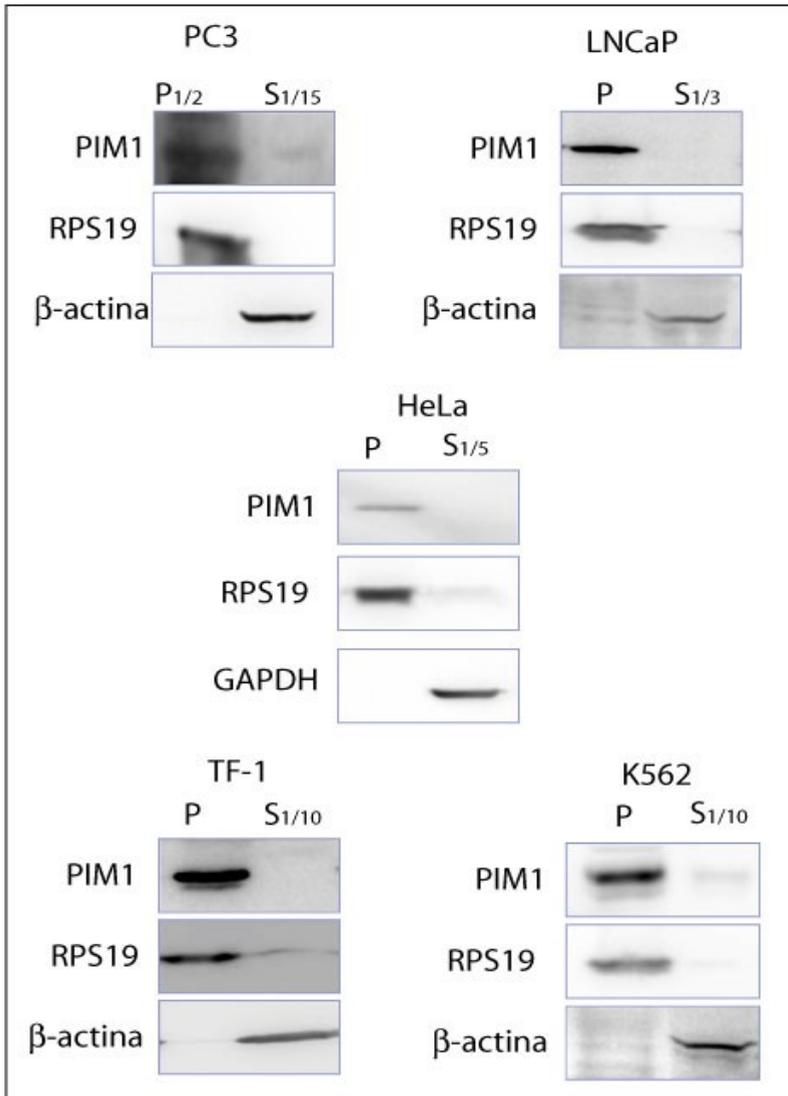


Fig. 18: Associazione della proteina PIM1 con i ribosomi in cellule LNCaP, PC3, HeLa, TF-1 e K562. Estratti citoplasmatici sono stati centrifugati a 100.000g su un cuscinetto di saccarosio al 15%. Le due frazioni ottenute in seguito alla centrifugazione, Pellet e Super (in diverse quantità 1/3, 1/5 e 1/10) sono state caricate su gel e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Tramite Western Blotting sono state analizzate le seguenti proteine: RPS19, PIM1, GAPDH e β -actina.

Ci siamo poi chiesti se l'associazione PIM1-ribosoma fosse dipendente dall'attività chinastica della proteina. Perciò abbiamo ripetuto l'esperimento con estratti di cellule trasfettate transientemente i costrutti pcDNA3PIM1WT-HA e pcDNA3PIM1KD-HA che esprimono, rispettivamente, PIM1 e una forma mutata della chinasi PIM1KD priva dell'attività chinastica. In figura 19 è mostrato il Western Blotting decorato con gli anticorpi contro l'HA, per identificare PIM1 esogeno e contro RPS19 e β -actina, come controlli. La proteina PIM1 è in grado di cosedimentare con i ribosomi sia nella forma WT che in quella mutata, KD, dimostrando perciò che l'attività chinastica non è necessaria all'interazione di PIM1 con il ribosoma.

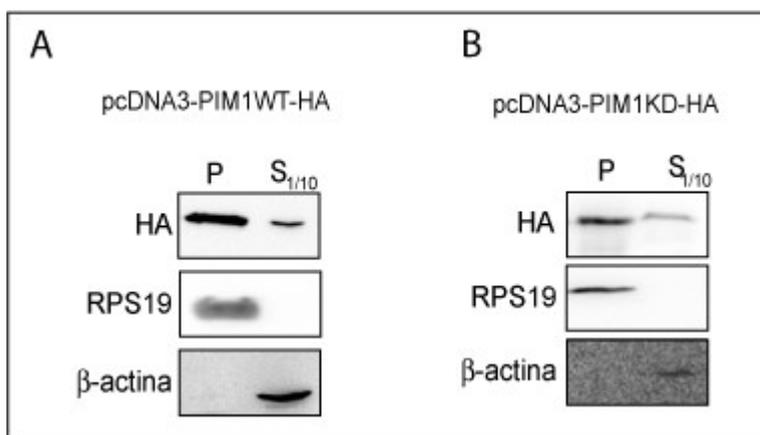


Fig. 19: Associazione della proteina PIM1 con i ribosomi. Estratti citoplasmatici di cellule HEK293 trasfettate transientemente con pcDNA3PIM1WT-HA (pannello A) e pcDNA3PIM1KD-HA (pannello B) sono stati centrifugati a 100.000g su un cuscinetto di saccarosio al 15%. Le due frazioni ottenute in seguito alla centrifugazione, P e S (1/10), sono state separate su gel e trasferite su membrana di nitrocellulosa. Tramite Western Blotting sono state analizzate le seguenti proteine: RPS19, PIM1 e β -actina.

Al fine di dimostrare che l'interazione tra PIM1 e il ribosoma avvenisse *in vivo* e che non si trattasse di un'interazione non fisiologica che si determina in seguito alla lisi cellulare, abbiamo utilizzato il Dithiobis[succinimidyl propionate] (DSP) che stabilizza le interazioni proteina-proteina formando dei ponti disolfuro tra le proteine che interagiscono. Cellule PIM-Rex sono state trattate con DSP e

successivamente lisate in un tampone con un'alta concentrazione di sale (0,5M di KCl). Esperimenti preliminari avevano mostrato che queste condizioni sono in grado di provocare la dissociazione di PIM1 dal ribosoma. Gli estratti di cellule trattate con DSP e di cellule di controllo (non trattate) sono stati centrifugati a 100.000g per 3 ore, separati nelle due frazioni P e S e analizzati tramite Western Blotting. I risultati riportati in fig. 20 mostrano che, in cellule di controllo, in condizioni di alta forza ionica PIM1 perde l'interazione con il ribosoma e non sedimenta nella frazione P. Il trattamento delle cellule con DSP è in grado di stabilizzare l'interazione rendendola insensibile all'alta forza ionica (PIM1 è nella frazione P). Questo indica che l'interazione tra PIM1 e il ribosoma era presente nella cellula al momento del trattamento. Come controllo dell'esperimento sono state analizzate il fattore di traduzione eIF4E, che si comporta come PIM1 (stabilizzazione del legame indotta da DSP) e la proteina ZNF9 che non interagisce mai col ribosoma e rimane nella frazione S anche in cellule trattate con DSP.

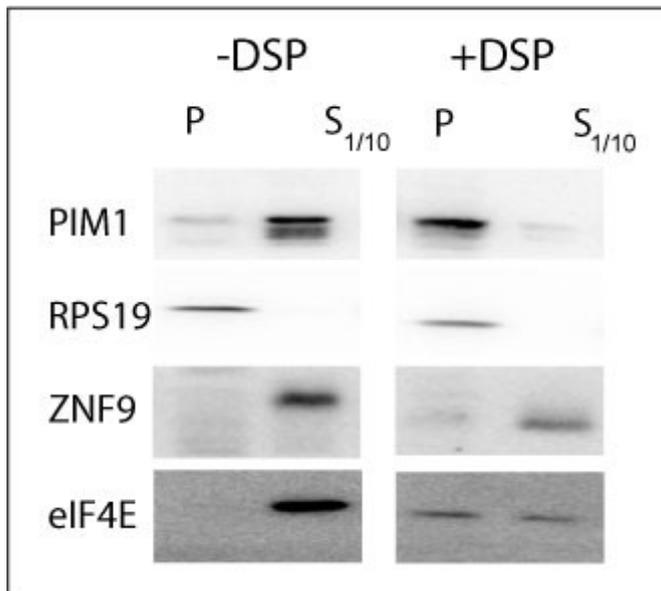


Fig. 20: Associazione della proteina PIM1 con i ribosomi in condizioni di alta forza ionica. Cellule PIM1REx indotte con doxiciclina per 24 ore, sono state incubate per 1 ora, *in vivo* a 37°C, con il DSP (*Dithiobis[succinimidyl propionate* 2,5mM) e lisate in condizioni di alto sale (0,5M di KCL). Gli estratti citoplasmatici di cellule trattate (+DSP) e non trattate (-DSP) sono stati centrifugati a 100.000g su un cuscinetto di saccarosio al 15%. Le due frazioni ottenute in seguito alla centrifugazione, P e S (1/10) sono state caricate su gel e trasferite su membrana di

nitrocellulosa. Tramite Western Blotting sono state analizzate le seguenti proteine:
RPS19, PIM1, ZNF9 e eIF4E.

L'inibizione della sintesi della proteina RPS19 causa una diminuzione dei livelli proteici della chinasi PIM1

Per monitorare l'effetto dell'alterazione dei livelli di RPS19 sull'espressione di PIM1 abbiamo utilizzato la linea K562C. In questa linea è possibile indurre con somministrazione di doxicielina l'espressione di un "siRNA" che causa una diminuzione di RPS19. Questa linea è stata creata nel laboratorio di Karlsson in Svezia nell'ambito di uno studio sui meccanismi della DBA, per caratterizzare gli effetti causati dalla mancanza di RPS19, come controllo. Per determinare i livelli proteici di PIM1 in condizioni di carenza di RPS19, abbiamo analizzato tramite Western Blotting, cellule K562C indotte e non indotte e come ulteriore controllo, una linea inducibile per l'espressione di un siRNA non specifico (K562Sc). I risultati, riportati in figura 21 mostrano che in seguito al trattamento con la doxicielina il livello di RPS19 diminuisce del 70% in quattro giorni e con esso anche quello di PIM1.

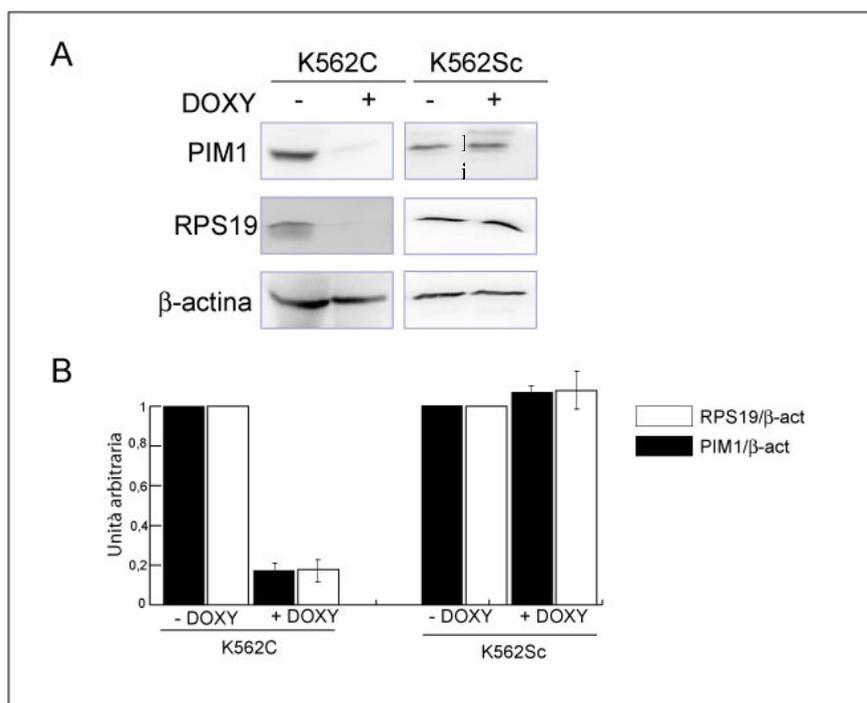


Fig. 21: Cellule K562C e K562Sc indotte e non indotte con doxiciclina (2µg/ml). A) Analisi Western di estratti proteici totali. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-PIM1, anti-RPS19 e anti-β-actina. B) Grafico a barre delle quantizzazioni dei relativi segnali di PIM1, RPS19 e β-actina utilizzando il programma Image Quant 5.1 (Molecular Dynamics). L'errore riportato è stato ottenuto dall'analisi di tre esperimenti indipendenti.

I livelli proteici di PIM1 sono stati analizzati anche tramite la tecnica dell'immunofluorescenza. Le cellule K562C trattate con doxiciclina per 5 giorni sono state incubate con gli anticorpi anti PIM1, RPS19 e ZNF9. Quest'ultima proteina è stata utilizzata come controllo essendo una proteina la cui espressione non è influenzata dai livelli di RPS19. I dati ottenuti indicano che il segnale di PIM1 diminuisce nelle cellule parallelamente a RPS19 come mostrato nella figura 22 dalle frecce gialle.

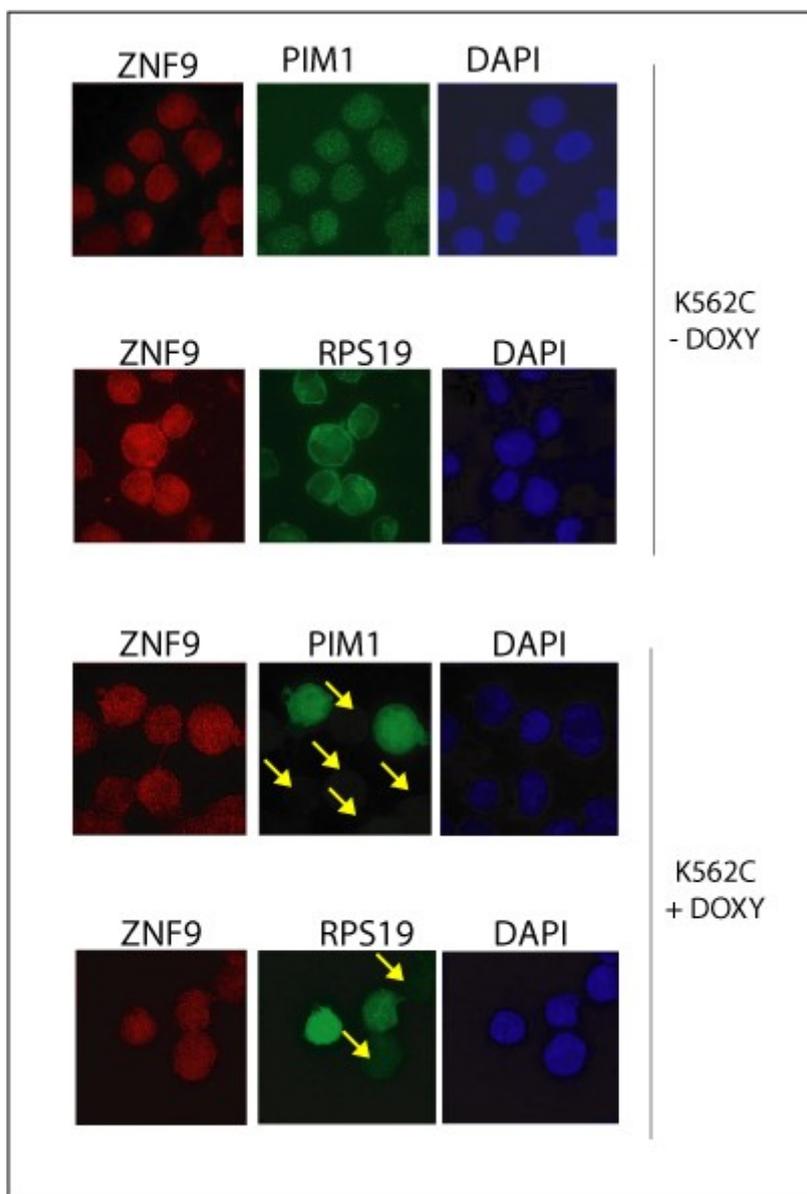


Fig. 22: Immunofluorescenza di cellule K562C indotte con doxiciiclina 2 μ g/ml per 5 giorni. Le cellule sono state incubate con anticorpi anti-RPS19, anti-PIM1, anti-ZNF9 e DAPI.

Per investigare se la diminuzione di PIM1 correlata con la diminuzione di RPS19, dipendesse da alterazioni a livello del messaggero, abbiamo

condotto degli esperimenti di Northern Blotting, utilizzando RNA totale estratto da cellule K562C e K562Sc indotte e non indotte con doxiciclina. Utilizzando sonde specifiche abbiamo analizzato i messaggeri di PIM1, PIM2, PIM3, RPS19 e GAPDH. Il Northern in fig. 23 mostra come, in seguito alla diminuzione di RPS19, i livelli dei messaggeri della famiglia delle chinasi PIM non vengano alterati, ma rimangono comparabili ai controlli.

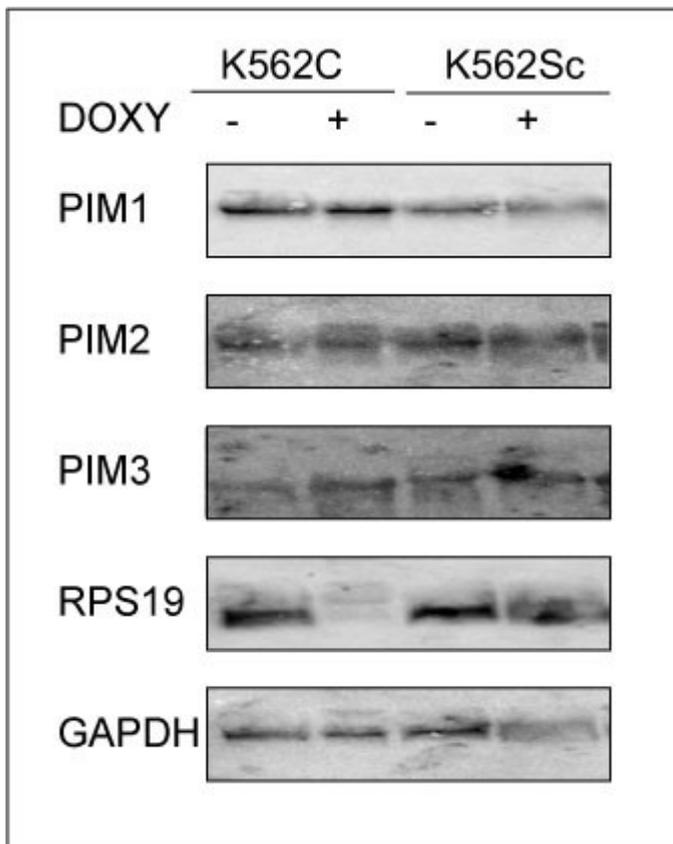


Fig. 23: Analisi per Northern Blotting della linea K562C e K562Sc. L'RNA totale estratto da cellule indotte e non indotte con doxiciclina è stato sottoposto ad analisi Northern Blotting e ibridato con le seguenti sonde radioattive: RPS19, PIM1, PIM2, PIM3 e GAPDH.

Successivamente ci siamo chiesti se questa diminuzione di PIM1 potesse essere dovuta a un aumento della sua degradazione. Per rispondere a

questa domanda abbiamo trattato le cellule con un inibitore della sintesi proteica, la cicloesimmide (50µg/ml) e abbiamo osservato la stabilità della proteina a diversi intervalli di tempo: 7-15-30-60 minuti. L'esperimento è stato eseguito nelle cellule K562C indotte e non indotte.

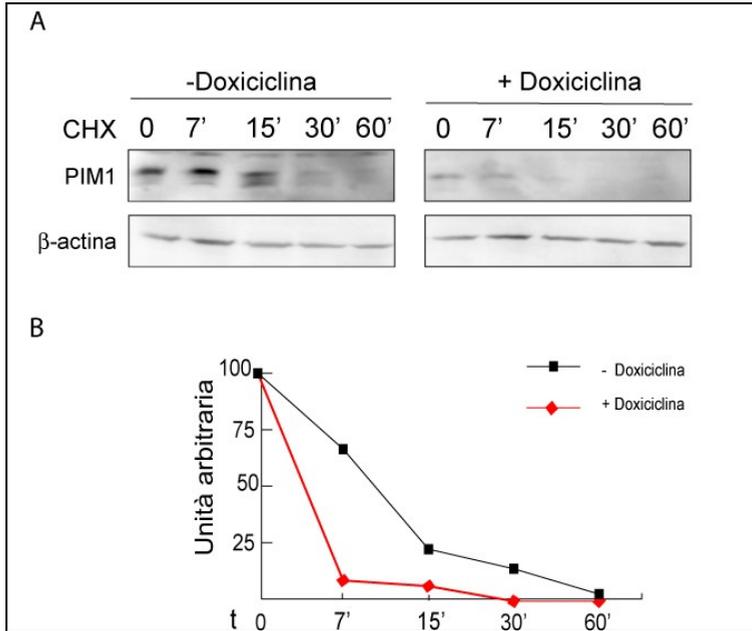


Fig. 24: Western Blotting di estratti ottenuti da cellule K562C indotte e non indotte con doxiciclina e trattate con cicloesimmide per 7-15-30-60 minuti. A)- Gli Estratti proteici totali sono stati analizzati tramite Western Blotting. Il filtro ottenuto è stato ibridato con i seguenti anticorpi: anti-PIM1 e anti-β-actina. B)- Grafico lineare dei segnali di ibridazione quantificati tramite Image Quant 5.1.

Dall'analisi condotta tramite Western Blotting mostrata in figura 24, possiamo affermare che la carenza di RPS19 causa una diminuzione dell'emivita di PIM1.

Al fine di chiarire se tale diminuzione della stabilità fosse dovuto ad un aumento della degradazione proteica proteosoma-dipendente, abbiamo trattato le cellule K562C con MG132 (20µM), inibitore del proteasoma 26S. Anche in questo caso sono state trattate con l'MG132 sia cellule indotte che non indotte. Abbiamo osservato un accumulo di PIM1 già dopo 1 ora di trattamento con l'inibitore in entrambe le condizioni. Dopo 3 ore di trattamento con l'MG132 abbiamo osservato un quasi totale

recupero dei livelli proteici di PIM1, diminuiti durante l'interferenza per RPS19 (fig. 25).

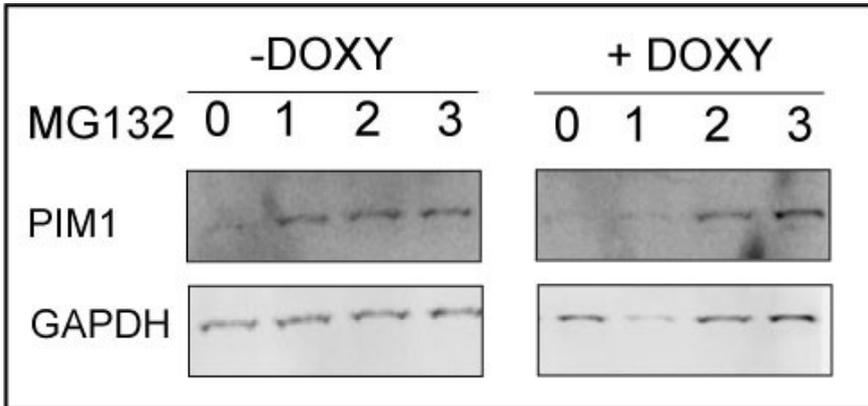


Fig. 25: Western Blotting di estratti ottenuti da cellule K562C indotte e non indotte con doxicielina e trattate MG132 (20 μ M). Gli Estratti proteici totali sono stati analizzati tramite dopo 1, 2 e 3 ore di trattamento. Il filtro ottenuto è stato incubato con i seguenti anticorpi: anti-PIM1 e anti-GAPDH.

Quindi, questi risultati indicano che la diminuzione di RPS19 causa un aumento della degradazione di PIM1 mediata dal proteasoma 26S .

Stimolazione dello stress ribosomale in seguito a trattamento con inibitori specifici

Per vedere se le alterazioni dei livelli proteici di PIM1 potessero essere indotte anche da altre alterazioni nella sintesi del ribosoma, abbiamo utilizzato diverse droghe note per interferire con le funzioni nucleolari. In particolare abbiamo utilizzato la camptotecina, l'actinomicina D e il cisplatino. La camptotecina interferisce con la sintesi dell'RNA e causa una rilocalizzazione della Topoisomerasi I al di fuori dal nucleolo (Buckwalter, et al. 1996) mentre l'actinomicina D a basse dosi (50ng/ml) è in grado di inibire specificatamente la RNA Polimerasi I e quindi la trascrizione dell'RNA ribosomale (Haaf and Ward 1996). Infine il cisplatino blocca l'azione del fattore di trascrizione UBF che promuove la trascrizione dell'RNA ribosomale (Jordan e Carmo-Fonseca, 1998). Come controllo abbiamo utilizzato due inibitori della proliferazione che

non interferiscono con la funzionalità nucleolare, l'idrossiurea e il nocodazolo.

Come analisi preliminari abbiamo verificato l'effetto degli inibitori su varie attività cellulari: sintesi proteica, trascrizione dell'RNA ribosomale e proliferazione. La sintesi proteica è stata misurata valutando l'incorporazione di metionina radioattiva in seguito al trattamento con le diverse droghe per 15 ore (fig. 26). I vari inibitori alle dosi usate, hanno un effetto variabile sulla sintesi proteica: nocodazolo e camptotecina inibiscono quasi totalmente, cisplatino in modo intermedio e actinomicina a idrossiurea non hanno praticamente effetto.

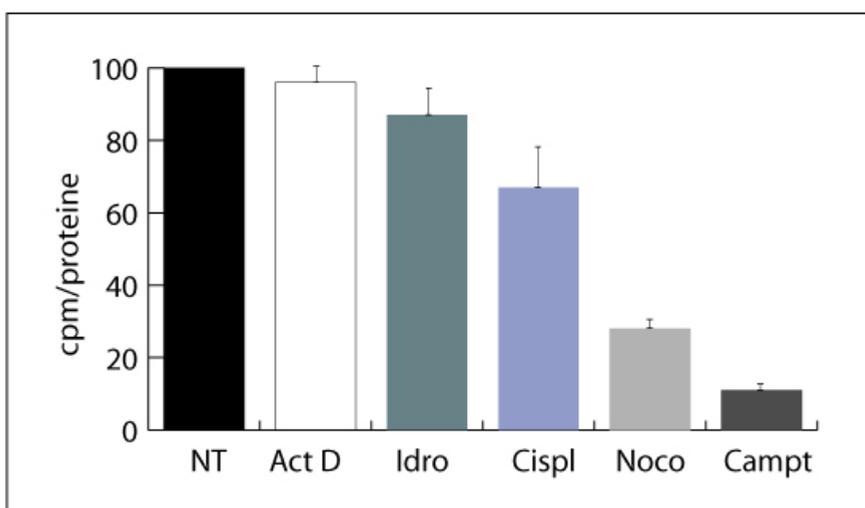


Fig. 26: Incorporazione di metionina radioattiva (Met S^{35}). Cellule K562 trattate con actinomicina D (Act D), idrossiurea (Idro), cisplatino (Cispl), nocodazolo (Noco) e camptotecina (Campt) per 15 ore sono state incubate con Met S^{35} per 30 minuti. La quantità di S^{35} incorporata è stata misurata e riportata su grafico.

L'effetto sulla trascrizione dell'RNA ribosomale è stata valutata per actinomicina e idrossiurea. A tal fine abbiamo analizzato tramite Northern blot i livelli del precursore dell'rRNA 47S in seguito ai trattamenti. Infatti questo precursore ha una emivita brevissima e il suo livello può essere considerato approssimativamente proporzionale all'attività trascrizionale dei geni per l'rRNA.

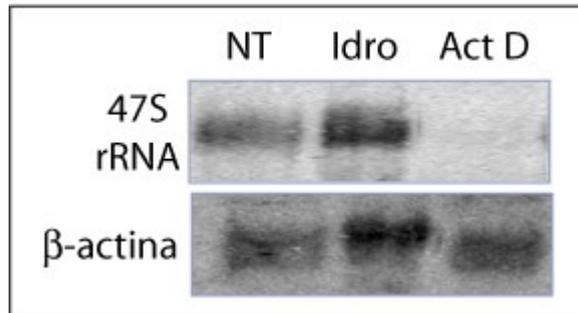


Fig. 27: Northern Blotting di RNA totale estratto da cellule K562 trattate con idrossiurea (Idro) e actinomicina D (Act D) per 15 ore. Le sonde utilizzate per l'analisi sono: oligonucleotide complementare all'rRNA 47S, e un frammento radioattivo contro il messaggero della β -actina.

Come si può notare dall'analisi Northern in figura 27 mentre l'idrossiurea non sembra influenzare la trascrizione dell'rRNA, l'actinomicina ha un netto effetto inibitorio.

Infine abbiamo valutato l'effetto dei trattamenti con nocodazolo e idrossiurea sul ciclo cellulare misurando l'attività metabolica delle cellule con il saggio MTT. Questa tecnica misura la quantità di un metabolita prodotto in modo costante dalle cellule. La quantità del metabolita è quindi proporzionale al numero di cellule e può essere considerato una misura dell'attività proliferativa. In figura 28 sono riportati i valori ottenuti dopo il trattamento con gli inibitori. Dato il tempo relativamente ridotto del trattamento, l'effetto sulla proliferazione cellulare è limitato ma misurabile per entrambi gli inibitori.

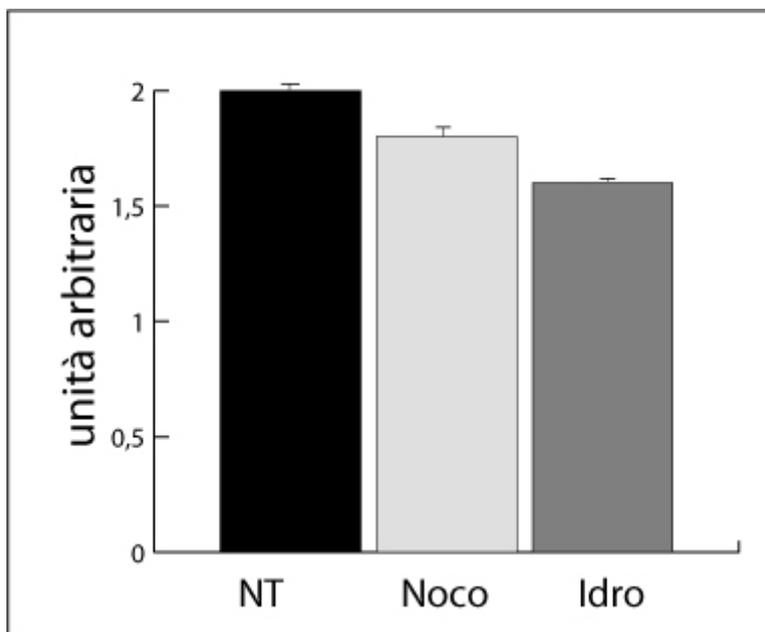


Fig. 28: Saggio MTT. Cellule K562 trattate con nocodazolo (Noco) e idrossiurea (Idro) per 15 ore e sottoposte al saggio MTT. L'errore riportato risulta dall'analisi di tre esperimenti indipendenti.

A questo punto abbiamo analizzato i livelli proteici di PIM1 in cellule incubate per 15 ore con ciascuna di queste droghe. I risultati mostrano che PIM1 diminuisce in seguito al trattamento con camptotecina, cisplatino e actinomicina D, mentre l'idrossiurea e il nocodazolo non influenzano i livelli della chinasi (fig. 29).

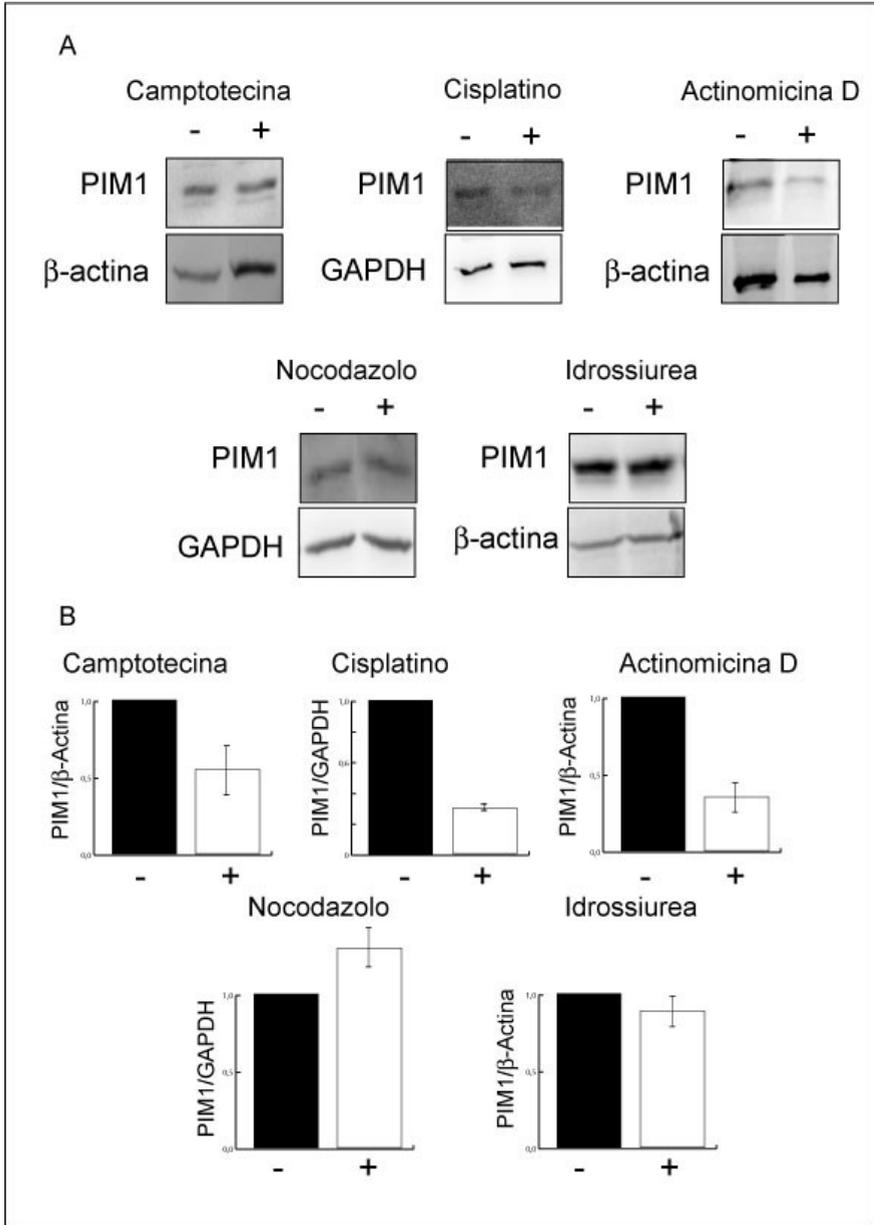


Fig. 29: Cellule K562 trattate con camptotecina ($5\mu\text{M}$), cisplatino ($20\mu\text{M}$), actinomicina D (50ng/ml), nocodazolo (100ng/ml) e idrossiurea ($300\mu\text{M}$) per 15 ore. A) Western Blotting di estratti proteici totali. B) Grafico a barre delle quantizzazioni dei relativi segnali di PIM1, β -actina e GAPDH utilizzando il programma Image Quant 5.1 (Molecular Dynamics). L'errore riportato è stato ottenuto dall'analisi di tre esperimenti indipendenti.

Quindi tutti gli inibitori che agiscono sulla sintesi del ribosoma sono in grado di causare una diminuzione dei livelli di PIM1

Analisi dei livelli di PIM1 endogeno in linee linfoblastoidi derivanti dai pazienti DBA

Abbiamo finora osservato che la diminuzione di RPS19 o il trattamento con inibitori della sintesi del ribosoma causano la riduzione di PIM1 in cellule in coltura K562. Poiché la DBA è una patologia causata dalla carenza di RPS19 o di altre RP abbiamo voluto analizzare i livelli di PIM1 in cellule derivate da pazienti DBA a nostra disposizione. A tale scopo sono state analizzate diverse linee linfoblastoidi derivanti da pazienti con diverse mutazioni in RPS19 e RPS24 mediante analisi Western degli estratti proteici totali.

Pazienti	Gene
DBA1	RP?
DBA2	RP?
DBA3	RP?
DBA4	RPS19
DBA5	RPS24

Tab. 2 - Lista dei linfoblasti DBA immortalizzati con il virus di Epstein Barr utilizzati nelle analisi dei livelli endogeni di PIM1. DBA: 1-2-3 non sono stati ancora identificati i geni coinvolti nella patologia; DBA: 4-5 presentano rispettivamente mutazioni nel gene codificante per la proteina ribosomale RPS19 e RPS24.

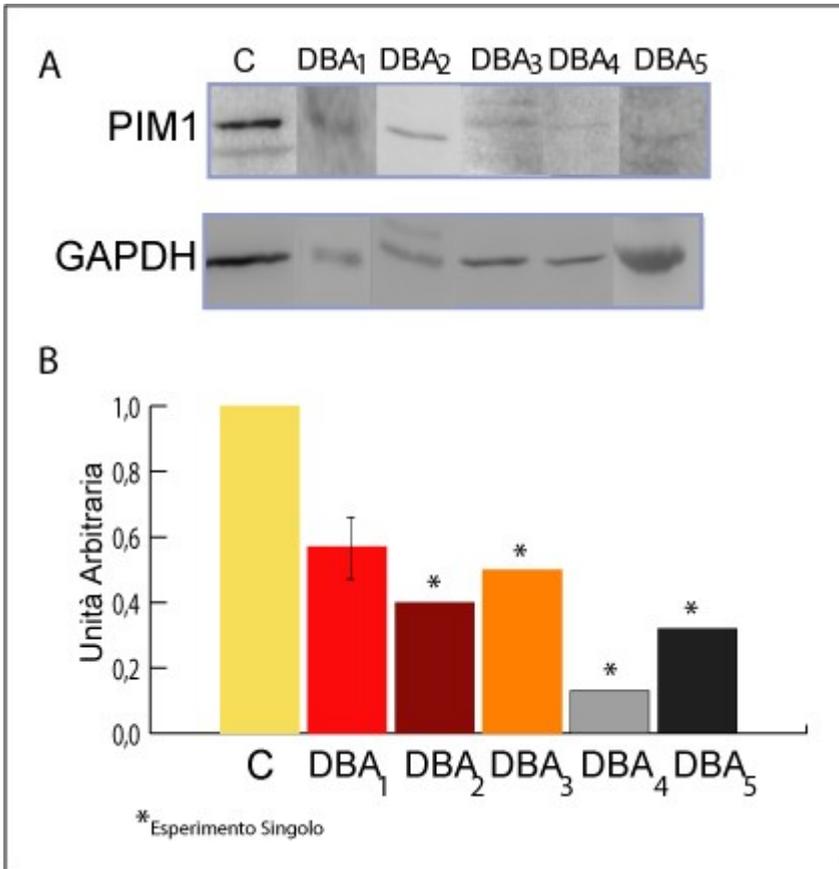


Fig. 30: Western Blotting di estratti proteici totali di linee linfoblastoidi derivate da pazienti di DBA. Sono state analizzate le cinque linee linfoblastoidi riportate nella tabella 2. A) Western Blotting utilizzando i seguenti anticorpi: anti-PIM1 e anti-GAPDH. B) Grafico a barre relativo al rapporto PIM1/GAPDH derivato dalle quantizzazioni utilizzando il programma Image Quant 5.1.

Il risultato dell'analisi, mostrato in figura 30, indica che nelle cellule derivanti dai pazienti DBA il livello della chinasi PIM1 è più basso rispetto ai controlli

Trattamento con Desametasone

Come indicato nell'introduzione la principale terapia per la DBA consiste nel trattamento con corticosteroidi. Nel 2005 Ebert e collaboratori hanno dimostrato come il trattamento con desametasone (DEX) sia in grado di

ristabilire un corretto differenziamento eritroide in cellule CD34+ umane silenziate per RPS19. Utilizzando la tecnica del *microarray* hanno osservato la stimolazione dell'espressione di molti geni e hanno escluso che il desametasone agisse direttamente sull'attivazione trascrizionale di RPS19. Poiché come illustrato nel paragrafo precedente i livelli di PIM1 sono più bassi nelle cellule derivate da pazienti DBA, abbiamo voluto controllare se il trattamento con corticosteroidi avesse un effetto sui livelli di PIM1. Per questo esperimento abbiamo utilizzato sia le cellule K562 carenti di RPS19 che alcune linee linfoblastoidi di pazienti DBA trattate con il corticosteroide sintetico desametasone (DEX). Come analisi preliminare abbiamo verificato l'effetto del desametasone sulla proliferazione cellulare e sulla sintesi proteica. A tale scopo le cellule K562 sono state incubate per 15 ore con DEX 1 μ M ed è stato condotto il saggio MTT per determinare la vitalità cellulare. Inoltre è stata analizzato l'effetto dello stesso trattamento sull'incorporazione di metionina S³⁵.

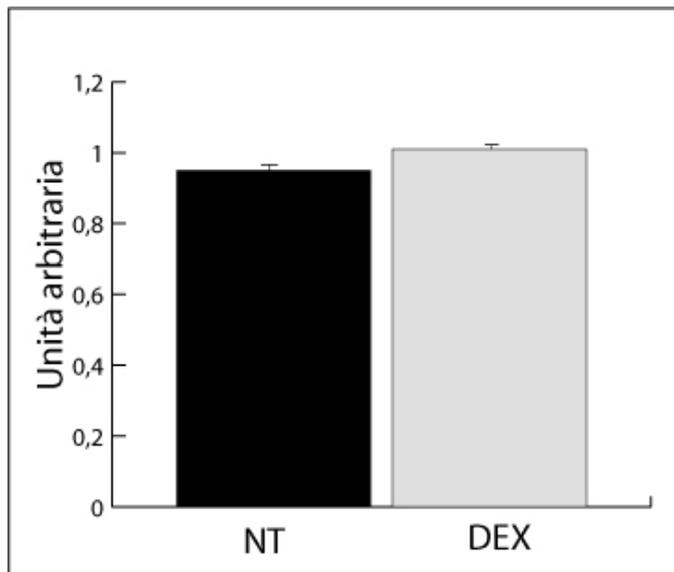


Fig. 31: Saggio MTT. Cellule K562 trattate con DEX 1 μ M per 15 ore.

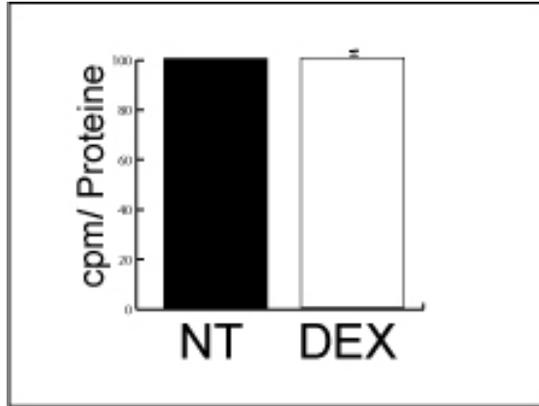


Fig. 32: Saggio di incorporazione di metionina, S³⁵, in cellule K562 trattate con DEX 1 μ M per 15 ore.

I risultati, mostrati in figura 31 e 32, indicano che il trattamento con desametasone non influenza il metabolismo cellulare. A questo punto abbiamo analizzato i livelli proteici di PIM1 durante il trattamento. A tale scopo le cellule K562C sono state trattate con doxiciclina per indurre la diminuzione di RPS19 e quindi di PIM1 e poi sono state cresciute per 15 ore in presenza di DEX a diverse concentrazioni (10nM, 100nM, 1 μ M). L'analisi Western, riportata in figura 33, mostra che il trattamento con DEX causa un significativo recupero dei livelli di PIM1 anche con dosi molte basse di DEX, 10nM (fig. 33).

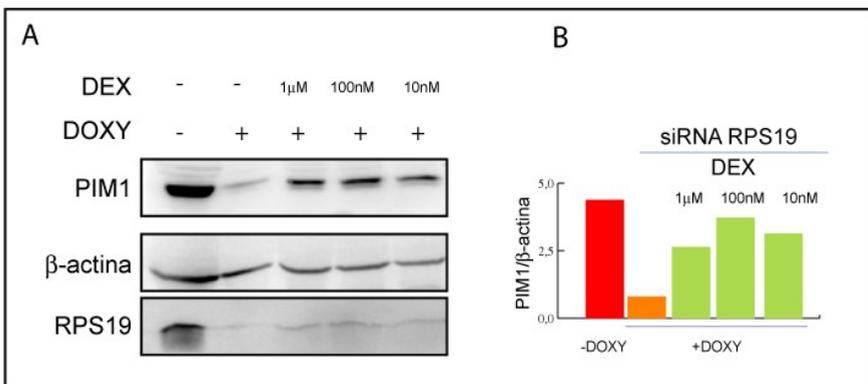


Fig. 33: Western Blotting di estratti totali di K562C indotte con Doxiciclina (DOXY) e trattate con DEX (1 μ M, 100nM, 10nM). A) Western Blotting utilizzando i seguenti anticorpi: anti PIM1, anti- β -actina e anti-RPS19 B) Grafico a

barre relativo al rapporto PIM1/ β -actina, derivato dalle quantizzazioni utilizzando il programma Image Quant 5.1.

Abbiamo ripetuto lo stesso esperimento in una linea di linfoblasti di pazienti DBA (DBA₄) e anche in questo caso abbiamo osservato un aumento dei livelli endogeni di PIM1, trattando le cellule con DEX per 15 ore (fig. 34).

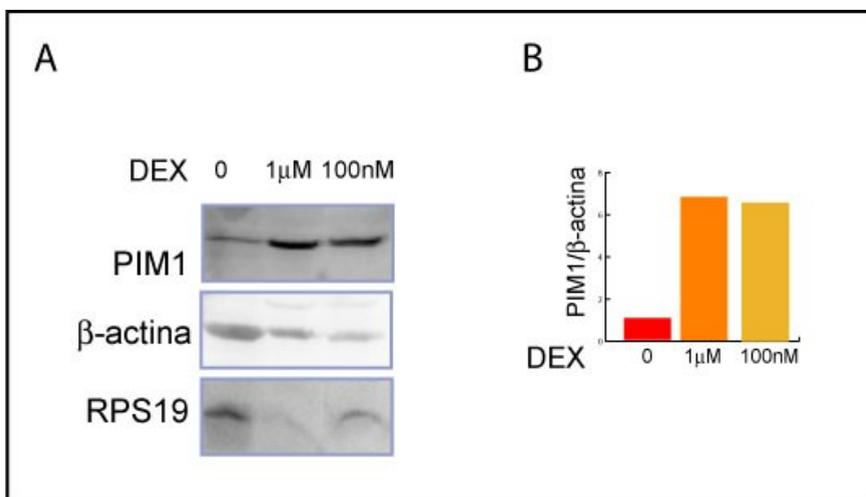


Fig. 34: Western Blotting di estratti totali di linfoblasti DBA (DBA₄) trattati con DEX (1 μ M, 100nM) per 15 ore. A) Western Blotting utilizzando i seguenti anticorpi: anti-PIM1, anti- β -actina e anti-RPS19 B) Grafico a barre relativo al rapporto PIM1/ β -actina, derivato dalle quantizzazioni utilizzando il programma Image Quant 5.1.

Quindi il desamentasone causa un aumento dei livelli endogeni di PIM1 sia in cellule K562C silenziate per RPS19 che in linee linfoblastoidi derivate da pazienti DBA.

Analisi della sovraespressione di PIM1 in cellule in cui l'espressione di RPS19 è inibita

In cellule K562C, in seguito all'induzione di RNA interference verso il messaggero di RPS19, si osserva una diminuzione della proliferazione causata probabilmente da un meccanismo di controllo (lo stress ribosomale), in grado di attivarsi in risposta alla deplezione di una proteina ribosomale (fig. 35).

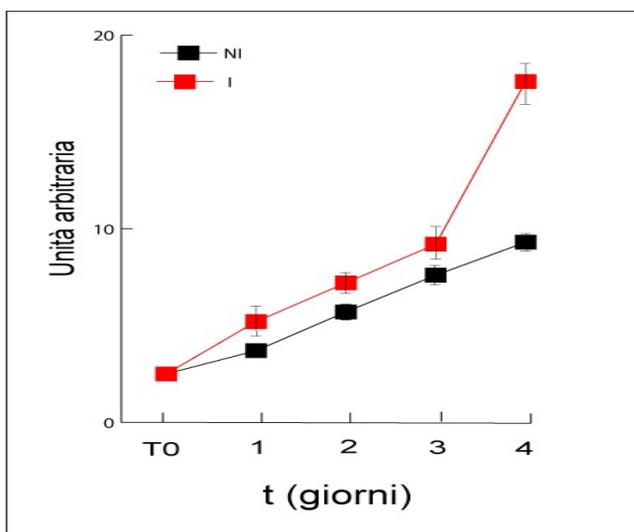


Fig. 35: Analisi della crescita cellulare. Le cellule K562C indotte e non indotte con la doxiciplina, sono state contate tramite camera di Neubauer ogni 24 ore per 96 ore. Al numero di cellule iniziale è stato assegnato il valore di 1. L'errore mostrato è stato ottenuto dall'analisi di tre esperimenti indipendenti.

In queste stesse condizioni, esperimenti condotti in questo lavoro, hanno mostrato che c'è una diminuzione dei livelli di PIM1. Per indagare se questa diminuzione PIM1 potesse essere (o contribuire a) la causa della diminuzione della proliferazione, abbiamo analizzato i livelli di noti bersagli molecolari di PIM1 che hanno un ruolo nell'indurre il blocco del ciclo cellulare, come per esempio p27 e p21. Infatti, dati di letteratura indicano che entrambi questi inibitori del ciclo cellulare sono regolati negativamente da PIM1.

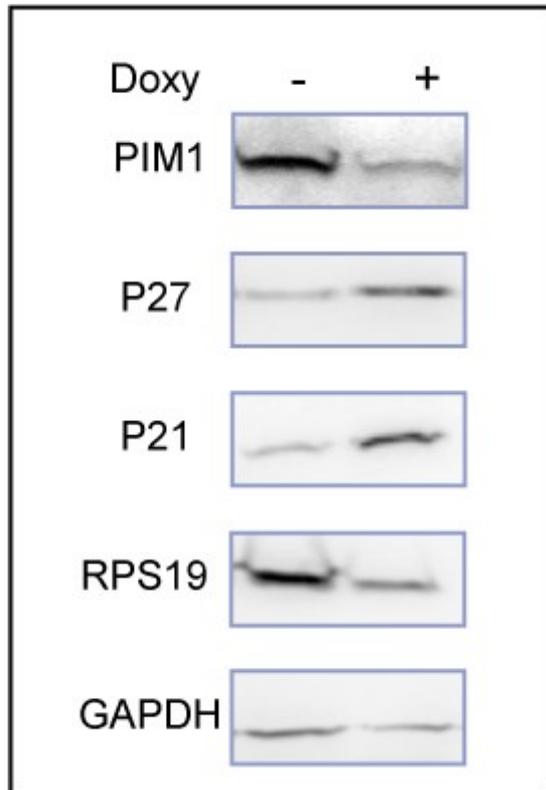


Fig. 36: Analisi condotta tramite Western Blotting dei bersagli molecolari noti di PIM1. Le cellule K562C indotte con la doxiciolina 2 μ g/ml per cinque giorni. Utilizzati i seguenti anticorpi: anti-PIM1, anti-GAPDH, anti-RPS19, anti-p21 e anti-p27.

Dall'analisi Western (fig. 36) di cellule K562C abbiamo osservato che in seguito all'induzione dell'interference e alla diminuzione dei livelli di PIM1 si ha un aumento dei livelli di p21 e p27. Quindi si potrebbe ipotizzare che la diminuzione di PIM1 fa aumentare i livelli di p21 e p27 causando il blocco del ciclo cellulare.

Per verificare questa ipotesi abbiamo indotto un aumento del livello di PIM1 in cellule K562C mediante trasfezione e abbiamo valutato l'effetto della trasfezione sulla proliferazione cellulare. A tal fine abbiamo introdotto il costrutto pcDNA3PIM1-HA in cellule K562C indotte già da

tre giorni con doxiciclina. In seguito a trasfezione abbiamo osservato un evidente recupero della proliferazione cellulare (fig.37). Lo stesso effetto si può osservare introducendo RPS19 (che compensa la diminuzione generata dall'RNA interference) ma non con il vettore vuoto.

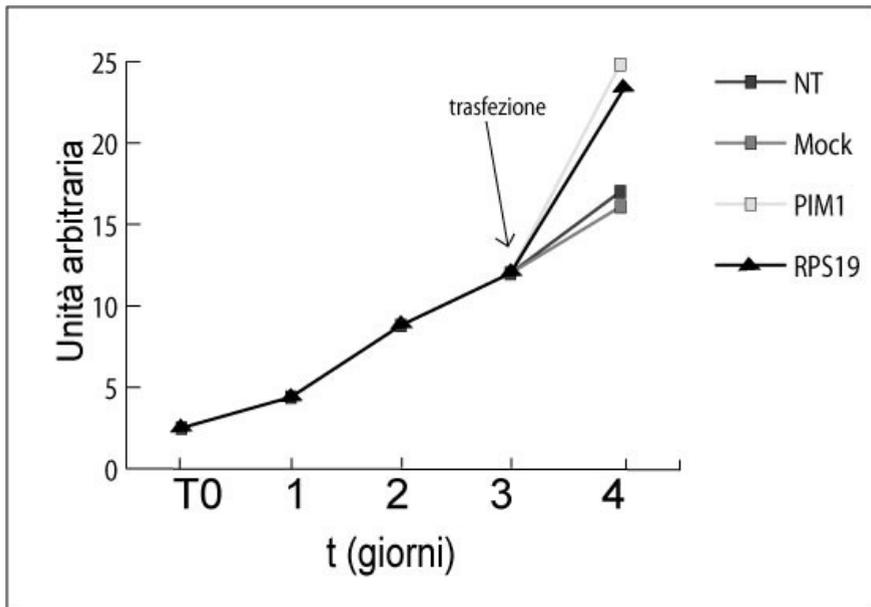


Fig. 37: Analisi della crescita cellulare. Le cellule K562C indotte con la doxiciclina per tre giorni e poi trasfettate con pcDNA3PIM1-HA, pcDNA3RPS19-FLAG, pcDNA3 (Mock). Le cellule sono state contate tramite camera di Neubauer ogni 24 ore per 120 ore. Al numero di cellule iniziale è stato assegnato il valore di 1.

Discussione

L'oncogene PIM1 appartiene alla famiglia delle serin-treonin chinasi ed è altamente espresso in molti tessuti ematopoietici (timo, milza, midollo osseo) e non ematopoietici (la prostata, testicoli, la ghiandola mammaria e il cervello). In letteratura sono stati caratterizzati molti bersagli molecolari di questa chinasi coinvolti in differenti processi cellulari. Perciò PIM1 è stato implicato nella regolazione della trascrizione, del ciclo cellulare, della proliferazione, ecc. .

Esperimenti di doppio ibrido condotti nell'ambito di un progetto sul meccanismo molecolare della DBA, hanno identificato PIM1 come interattore di RPS19 (Chiocchetti et al. 2005). Partendo da questa evidenza sperimentale abbiamo dimostrato che in diverse linee cellulari la chinasi è in grado di interagire con tutto il ribosoma nel citoplasma. Inoltre attraverso esperimenti di separazione su gradiente di saccarosio abbiamo osservato che PIM1 interagisce sia con polisomi tradizionalmente attivi che con la subunità ribosomale 40S libera. Grazie a diverse tecniche sperimentali come l'uso di un reagente che induce *crosslinking*, il DSP, condotte in vari sistemi di colture cellulari è stato possibile trarre le seguenti conclusioni:

- 1- PIM1 interagisce con il ribosoma e questa interazione avviene *in vivo*;
- 2- L'attività chinasi non è necessaria per tale interazione;
- 3- L'interazione è stata confermata in molte linee cellulari diverse e avviene a livello della subunità piccola del ribosoma, la 40S.

A questo punto ci siamo chiesti quale fosse il ruolo dell'associazione di PIM1 con il ribosoma e per quale motivo una chinasi dovesse associare con esso. A riguardo possiamo formulare tre ipotesi: i) PIM1 potrebbe fosforilare delle proteine appena sintetizzate dal ribosoma che necessitano per questo una modificazione post-traduzionale immediata; ii) PIM1 potrebbe fosforilare dei fattori necessari alla sintesi proteica, come per esempio il fattore eIF4B, la cui fosforilazione è dimostrata ancora solo *in vitro*, o componenti strutturali del ribosoma stesso, come le proteine ribosomali; iii) PIM1 potrebbe avere un ruolo regolativo sulla funzionalità qualitativa e/o quantitativa del ribosoma. Inoltre queste tre ipotesi potrebbero non essere alternative.

Alcuni dati di letteratura sembrano indicare la seconda ipotesi. Infatti PIM1 è in grado di fosforilare alcuni bersagli come S6K e 4EBP-1, che sono regolatori della sintesi proteica generale della cellula (vedi introduzione). In accordo con questi dati abbiamo osservato che in seguito a sovraespressione di PIM1 nelle cellule PIM-REx i livelli di

fosforilazione di questi fattori aumentano. Questo potrebbe spiegare l'aumento dell'attività traduzionale della cellula osservata durante la sovraespressione di PIM1 (dati di laboratorio non mostrati). Inoltre queste osservazioni sono in accordo con il noto ruolo proliferativo svolto da PIM1 nella cellula. Ad esempio la sovraespressione di PIM1 è accompagnata da un aumento della proliferazione cellulare anche in presenza di inibitori come la rapamicina.

Tuttavia gli altri dati qui riportati suggeriscono un ruolo di PIM1 nel controllo dell'attività o del funzionamento del ribosoma. Infatti, in seguito ad alterazioni nella sintesi di proteine ribosomali o a trattamenti che alterano il funzionamento delle diverse componenti del nucleolo, abbiamo osservato una drastica diminuzione dei livelli proteici di PIM1. Questa riduzione è stata osservata in diversi modelli sperimentali:

1. Nella linea K562C durante l'induzione dell'interference verso RPS19;
2. Nella linea parentale K562 trattata con diversi inibitori in grado di causare disfunzioni nella biogenesi del ribosoma;
3. In alcune linee linfoblastoidi derivanti dai pazienti DBA.

Nel primo caso grazie all'espressione inducibile di un siRNA contro RPS19 abbiamo ottenuto la diminuzione di questa e in parallelo la riduzione dei livelli di PIM1. La diminuzione di PIM1 osservata è causata da una diminuzione della stabilità della proteina in quanto i livelli di messaggero rimangono invariati. Inoltre l'aumento di degradazione dipende dal proteasoma 26S poiché l'inibitore MG132 è in grado di ripristinare i livelli iniziali di PIM1. Molto probabilmente la chinasi viene maggiormente degradata nel proteasoma anche grazie all'intervento della fosfatasi PP2A, questa infatti è in grado di defosforilarla e promuoverne l'ubiquitinazione e quindi la sua degradazione.

Nel secondo caso abbiamo indotto farmacologicamente uno "stress nucleolare" somministrando inibitori in grado di compromettere il corretto funzionamento di diverse componenti nucleolari. Anche in questo caso abbiamo constatato che i livelli di PIM1 vengono influenzati dai trattamenti.

Infine nell'ultimo caso abbiamo osservato ridotti livelli di PIM1 nelle linee linfoblastoidi derivate da pazienti di DBA. Un dato molto interessante, anche se preliminare, è stato ottenuto in queste cellule come pure nella linea K562C carente di RPS19. In entrambi i casi il trattamento con desametasone è in grado d'influenzare positivamente i livelli di PIM1. Poiché il trattamento con corticosteroidi viene utilizzato come cura per i pazienti DBA, una possibilità è che sia proprio l'incremento dei

livelli di PIM1, con conseguente ripristino della proliferazione, a causare l'attenuazione dei sintomi clinici delle DBA.

Parallelamente alla diminuzione di PIM1, nelle K562C mancanti di RPS19, abbiamo osservato una riduzione della proliferazione e un incremento dei livelli degli inibitori del ciclo cellulare, p21 e p27. Dati di letteratura indicano che queste proteine vengono fosforilate da PIM1 e la fosforilazione causa la loro degradazione nel citoplasma. Quindi la diminuzione di PIM1 potrebbe determinare una stabilizzazione di p21 e p27. Inoltre i dati raccolti indicano che la diminuzione di PIM1 sembra essere la causa del difetto proliferativo. Infatti l'incremento dei livelli di PIM1 nelle cellule K562C carenti di RPS19, è in grado di ripristinare la proliferazione cellulare.

Quest'ultima serie di esperimenti ci ha permesso di formulare la seguente ipotesi: in risposta ad alterazioni della sintesi o funzione del ribosoma, PIM1 è destabilizzato e diminuisce il suo livello. Questo porta all'aumento di p21 e p27 e quindi al blocco della proliferazione cellulare. E' possibile poi che l'azione di PIM1 nel controllo del ciclo cellulare sia anche svolta tramite l'azione di altre proteine regolatrici bersagli di PIM1 come cdc25c, cdc25a, CDK2 o C-TAK1.

I dati presentati, quindi, evidenziano un ruolo di PIM1 nella risposta allo stress ribosomale. E' interessante notare che avendo condotto gran parte degli esperimenti nelle cellule K562, prive del fattore p53, non è chiara la relazione tra le funzioni di PIM1 e p53, fin'ora indicato come effettore principale della risposta allo stress ribosomale. I due meccanismi (PIM1-dipendente e p53-dipendente) potrebbero agire in parallelo o influenzarsi in vario modo. Quindi almeno in questo contesto, l'effetto di PIM1 nella proliferazione sembrerebbe indipendente da p53. Sarà comunque di primaria importanza indagare sulla relazione tra PIM1 e p53, come pure tra gli altri componenti della famiglia di PIM (PIM2 e PIM3) e della famiglia di p53 (p63 e p73).

Materiali e Metodi

Colture cellulari

Le linee linfoblastoidi umane sono state ottenute in seguito ad infezione con il virus di Epstein-Barr su linfociti estratti dal sangue di pazienti DBA e di individui sani. Le cellule sono state mantenute in coltura in sospensione in terreno RPMI-1640 complementato con glutammina 2mM, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, penicillina 50 unità/ml e streptomicina 50µg/ml e mantenute a 37°C e 5% di CO₂.

Le cellule HeLa, HEK 293 e T-REx sono state cresciute in adesione in terreno D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complementato con glutammina 2mM, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, penicillina 50 unità/ml e streptomicina 50µg/ml e mantenute a 37°C e 5% di CO₂. Le cellule T-REx sono mantenute in crescita in presenza di blasticidina (15µg/ml) e zeocina (100µg/ml), mentre le cellule PIM-REx, trasfettate stabilmente con il costrutto pcDNA5-PIM1 (WT-KD), sono cresciute in presenza di igomicina B (70µg/ml) e blasticidina (15µg/ml).

Le cellule TF-1 e K562 sono state cresciute in sospensione in terreno RPMI-1640 complementato con glutammina 2mM, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, penicillina 50 unità/ml e streptomicina 50µg/ml e mantenute a 37°C e 5% di CO₂. Per l'induzione dell'interferenza è stata aggiunta doxiciclina nel mezzo, 2µg/ml.

Le cellule LNCaP, cellule di cancro della prostata androgeno-sensibili, sono state cresciute in terreno RPMI-1640 complementato con glutammina 2mM, FBS (Fetal Bovine Serum) 10%, penicillina 50 unità/ml e streptomicina 50µg/ml, 4,5 g/L di glucosio e mantenute a 37°C e 5% di CO₂.

Costrutti plasmidici

I costrutti pcDNA3PIM1WT-HA, pcDNA3PIM1KD-HA, pcDNA3PIM2-HA sono stati gentilmente donati dal laboratorio della professoressa Irma Dianzani dell'Università del Piemonte Orientale. Invece i costrutti pcDNA5/FRT/TO-PIM1WT e pcDNA5/FRT/TO-PIM1-KD sono una gentile concessione del laboratorio del professore Salvatore Oliviero dell'Università di Siena.

Il costrutto pcDNA3PIM3WT-HA è stato ottenuto per RT-PCR con i seguenti oligo:

PIM3 up

(GTCAAGCTTATGTACCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCCTGCTCCAAGTTCGGCTCCCTGGCGCA),

PIM3 down

(TGGCTCGAGCCTCACAAAGCTCTCGCTGCTGGACGTG).

Reagenti e anticorpi

Per inibire la traduzione le cellule K562C, alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml, sono state incubate in presenza di cicloesimide alla concentrazione di $50 \mu\text{g/ml}$. È stato dimostrato che a questa concentrazione la cicloesimide inibisce il 93% della traduzione dopo 4 ore (Rajavel KS, 2001). Per indurre l'interferenza di RPS19 le cellule K562C sono state trattate con doxiciclina $2 \mu\text{g/ml}$ per 4 giorni, mentre per bloccare il proteasoma è stato utilizzato l'MG132 (SIGMA) $20 \mu\text{M}$.

Per indurre lo stress ribosomale sono state usate i seguenti inibitori: camptotecina ($5 \mu\text{M}$), cisplatino ($20 \mu\text{M}$), actinomicina D (40ng/ml) mentre per indurre il blocco del ciclo cellulare sono state utilizzate il nocodazolo (100ng/ml) e l'idrossiurea ($300 \mu\text{M}$), per 15 ore di trattamento. Il Desametasone, (SIGMA) è stato utilizzato per 15 ore alla concentrazione di: $1 \mu\text{M}$, 100nM e 10nM .

Gli anticorpi utilizzati sono stati i seguenti: il monoclonale anti-PIM1 (Santa-Cruz), anti-GAPDH (Chemicon), anti-RPS19 (prodotto nel nostro laboratorio), anti-AKT (Santa-Cruz) e anti-p27 (BD Biosciences); mentre gli anticorpi policlonali utilizzati sono stati: anti- β -actina (SIGMA), anti- β -tubulina (Santa-Cruz), anti-ZNF9, anti-eIF-4E (Cell-Signaling), anti-4E-BP1 (Santa-Cruz), anti-S6K (Cell-Signaling), anti-S6K-Thr421-Ser424 (Santa-Cruz), anti-RPL7a (gentile concessione della dottoressa Russo G.), anti-RPL11 (gentile concessione del dottore Volarevic S.) e anti-p21 (Santa-Cruz).

Western Blotting

Per l'analisi condotta attraverso Western Blotting sono stati utilizzati estratti totali ottenuti tramite lisi cellulare con il seguente tampone: 250 mM NaCl , $50 \text{ mM Tris-HCl pH } 7.5$, 50 mM EDTA , 0.5 mM EGTA , 10% glicerolo, 1% NP-40, aprotinina $1 \mu\text{g/ml}$, leupeptina $1 \mu\text{g/ml}$ pepstatina A

1µg/ml, PMSF 100µg/ml. L'estratto è stato mantenuto in ghiaccio per 20 minuti e centrifugato 10 minuti a 12.000 rpm a 4°C. La concentrazione delle proteine nel supernatante è stata valutata tramite saggio colorimetrico (BIO-Rad Protein Assay). La stessa quantità di estratto proteico (50µg) di ogni linea cellulare è stata caricata su gel di SDS-poliacrilamide al 12-15% e successivamente trasferita mediante elettroblotting su membrana Nitrocellulosa (Polaron-Roche). Per una migliore quantificazione del Western il segnale è stato rilevato tramite il sistema ECL con il reagente SuperSignal (Pierce) e quantificato tramite il programma Image Quant 5.1.

Estrazione dell'RNA e Northern Blotting

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule attraverso il metodo della proteinasi K (Sambrook J, 1989). Per l'analisi Northern l'RNA è stato sottoposto a elettroforesi su gel di agarosio-formaldeide 1%, trasferito su membrana Gene Screen Plus (NEN) e ibridato con sonde radioattive anti β -actina, RPS19, PIM1, PIM2, PIM3. Le sonde sono state preparate attraverso la tecnica "random priming" (Sambrook J, 1989) utilizzando come stampo frammenti generati attraverso l'RT-PCR condotta con i seguenti primers:

RPS19 up (AAGGATCCATGCCTGGAGTTACTGTAAAAGA),

RPS19 down (TTCTCGAGCTAATGCTTCTTGTTGGCAGCTG),

β -actina up (AGCAAGAGAGCTATCCTGACC),

β -actina down (GCCAATAGTGATGACCTGGCC),

oppure ottenuti per digestione enzimatica e isolamento da gel, dai seguenti plasmidi: pcDNA3PIM1-HA-wt, pcDNA3PIM2-HA e pcDNA3PIM3-HA. I frammenti di DNA (100-200 ng) sono stati marcati con la polimerasi Klenow (PROMEGA) e 25 µCi di α P³²dCTP concentrato. La reazione è avvenuta a 37°C per 30' e successivamente tramite cromatografia ad esclusione su resina sephadex G50, i prodotti marcati sono stati separati dai nucleotidi non incorporati. Prima di far avvenire l'ibridazione per una notte, la sonda è stata denaturata a 100°C per 2 minuti.

La quantificazione del Northern Blotting è stata effettuata tramite PhosphorImager utilizzando il programma Image Quant 5.1 (Amersham Biosciences).

Analisi dei pre-rRNA

Un oligonucleotide (10 picomoli) (gtgagcacgacgtcacca catcgatcgaagatc) complementare ad un tratto di sequenza del pre-rRNA 47S, e' stato marcato con 25 μ Ci di γ P³²ATP a 37°C per 30', con l'enzima Kinasi T4 (Fermentas). L'oligonucleotide è stato poi purificato con una estrazione fenolo-cloroformio e precipitato in etanolo con l'aggiunta di 1 μ l di glicogeno (20mg/ml) e KAc 0,3M. L'incorporazione ottenuta è stata misurata con un analizzatore di scintillazione.

L'ibridazione è stata condotta a 42°C per 15 ore in una soluzione contenente: Denhart 5x, SSDNA 0,25mg/ml, SDS 1%, SSPE 6X.

Sono stati ripetuti due lavaggi del filtro con SSPE 2x e SDS 1%, uno a temperatura ambiente e l'altro a 37°C per 15'.

Trasfezione

Cellule HEK 293 (10x10⁶ cellule) sono state trasfettate transientemente con il reagente LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) secondo le indicazioni fornite dal manuale. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate e utilizzate per i differenti studi.

Le cellule TReX (200.000 cellule) (Invitrogen) sono state trasfettate stabilmente con i costrutti pcDNA5/FRT/TO-PIM1 (10 μ g) e POG44 (20 μ g) (Flp recombinasi), utilizzando il metodo del fosfato di calcio. I cloni sono stati isolati dopo un periodo di quattro settimane in presenza di 125 μ g/ml di igromicina B. Le proteine totali sono state estratte dalle cellule non indotte o indotte per 24 ore (in presenza nel terreno di 2 μ g/ml di doxiciclina) ed analizzate tramite Western Blotting per valutare il livello di espressione della proteina PIM1.

Le cellule K562 (5x10⁶ cellule) sono state trasfettate transientemente con il reagente Jet-Pei (Polyplus) secondo le indicazioni del manuale.

Analisi polisomale

Le cellule (10x10⁶ cellule) PIMRE-x, TF-1, HeLa sono state lavate con PBS (phosphate buffered saline: 150mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄) e lisate con 300 μ l di buffer di lisi (10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5% NP-40, 0.2 unità/ μ l di inibitore della RNAsi (Promega)). Al buffer di lisi sono stati aggiunti inibitori di proteasi (aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml pepstatina A

1µg/ml, PMSF 100µg/ml). Gli estratti sono stati centrifugati 5 minuti a 13.000 rpm a 4°C e il supernatante è stato congelato in azoto liquido e conservato a -70°C oppure caricato direttamente su un gradiente lineare di saccarosio 10-30% contenente 30 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl e 10 mM MgCl₂ e centrifugato nel rotore Beckman SW41 per 4 ore a 37.000 rpm. Il gradiente è stato successivamente separato in 11 frazioni monitorandone l'assorbanza a 260 nm.

Analisi delle frazioni polisomiali

Da ogni frazione (11) sono state precipitate le proteine tramite TCA 10%. Il pellet ottenuto è stato lavato con TCA al 5%, successivamente con acetone 100% e, dopo essere stato asciugato, è stato risospeso nella soluzione di caricamento per l'SDS-PAGE (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerolo, 1% SDS, 2.5% β-mercapto etanolo e blu di bromofenolo). Il pellet dei polisomi è stato risospeso interamente nella prima frazione. Le proteine estratte da ogni frazione sono state caricate su gel di acrilamide al 15%. Le frazioni 8 e 10 e 11 sono state caricate, in percentuale rispetto alle altre 30%, 25%, e 20%. Il Western è stato condotto come descritto precedentemente

Ultracentrifugazione a 100.000g

Le cellule K562, TF-1, HeLa, PIM-REx, LNCaP sono state lisate con tampone TNM (10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 7.5), 0,5% NP-40, e inibitori di proteasi (descritti sopra). L'estratto è stato caricato su un cuscinetto (1ml) di saccarosio al 15% e centrifugati per 2 ore a 40.000 rpm con il rotore Beckman Ti 70.1. Rimosso il supernatante, sono stati aggiunti 2ml di tampone TNM ed è stata ripetuta una seconda centrifugazione di 30 minuti, a 40.000 rpm necessaria per il lavaggio del pellet. Dal supernatante sono state precipitate le proteine con il TCA al 10% e il pellet ottenuto è stato lavato con TCA al 5% e successivamente con acetone 100%. Dopo essere stato asciugato il pellet è stato risospeso nella soluzione di caricamento per l'SDS-PAGE (63mM Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerolo, 1% SDS, 2.5% β-mercaptoetanolo e blu di bromofenolo). Mentre il pellet di polisomi, ottenuto in seguito all'ultracentrifugazione, è stato risospeso direttamente nel tampone di caricamento L.B.(63mM Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerolo, 1% SDS, 2.5% β-mercapto etanolo e blu di bromofenolo).

Cross-linking

Le cellule sono state incubate a 37°C, 5%CO₂ con DSP (Dithiobis[succinimidyl propionate]) 2,5 mM e dopo 30 minuti è stata bloccata la reazione aggiungendo direttamente al terreno di crescita Tris-HCl (pH 8.0) alla concentrazione finale di 100mM. Dopo 10 min di incubazione a 37°C, 5% CO₂, le cellule sono state lisate con il tampone di lisi (10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,5%NP-40, aprotinina 1mg/mL, leupeptina 1mg/mL, pepstatina A 1mg/mL, PMSF 100mg/mL). Successivamente gli estratti sono stati incubati con KCl (0,5 M) per 30 min in ghiaccio.

Saggio di immunoprecipitazione

Cellule HEK 293 trasfettate transientemente con il costrutto pcDNA3-PIM1-HA-WT sono state lisate in buffer TNM (10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 7.5), 0,5% NP-40, e inibitori di proteasi. Successivamente 1 mg di estratto citoplasmatico è stato incubato per 4 ore con l'anti-HA (ABGENT 12CA5 (0,75µg)) a 4°C in agitazione. Successivamente l'estratto più l'anticorpo sono stati incubati per 1 ora a 4°C, con la resina Protein A sepharose CL-4B (GE Healthcare), pretrattata con la BSA (10mg/ml) per 1 ora a RT.

Immunofluorescenza

Cellule K562C, indotte da 4 giorni con doxiciiclina 2µg/ml, sono state lavate due volte con PBS e fissate in paraformaldeide 4% per 30 minuti su vetrini trattati con poli-lisina. Dopo il lavaggio le cellule sono state permeabilizzate con Triton X-100 0,1% per 5 minuti, lavate con PBS ed incubate in soluzione saturante di 10% siero di cavallo per 1 ora. Successivamente le cellule sono state incubate per 1 ora con anticorpo primario specifico. Dopo essere state lavate in PBS le cellule sono state incubate per un'ora con anticorpi secondari anti mouse o rabbit coniugati con il fluoroforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probe) e anti rabbit coniugato con Rhodamin Red-X (Jackson Immuno Research). I nuclei sono stati colorati con DAPI (SIGMA). I vetrini sono stati montati con Pro Loung Antifade (Molecular Probe) e le immagini sono state osservate al microscopio a fluorescenza Leica DMR.

Analisi di proliferazione

L'analisi della proliferazione delle cellule è stata condotta sia con il metodo MTT che contando direttamente le cellule utilizzando la camera di Neubauer. Il primo saggio misura la vitalità delle cellule e consiste nell'aggiungere direttamente alle cellule in coltura, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) al 10%, per 4 ore a 37°C. Il saggio MTT è basato sulla riduzione dei sali di tetrazolio, questo sale giallo, è ridotto dalla succinato deidrogenasi, nelle cellule attive metabolicamente per formare cristalli insolubili purpurei di formazano. Successivamente si blocca la reazione aggiungendo un volume di *MTT-solvent* (0,1 N HCL in isopropanolo anidro) e si agita bene. La soluzione contenente le cellule viene agitata vigorosamente e analizzata allo spettrofotometro, entro 1 ora dall'aggiunta del *MTT-solvent*, alla lunghezza d'onda di: 570 nm (valore da considerare) e a 690 nm (valore da sottrarre come *background*). La camera Neubauer permette di determinare, invece, direttamente il numero delle cellule e quindi la proliferazione. Essa è formata da quattro quadrati grandi delimitati da linee triple, ognuno dei quali formato da ulteriori 16 quadrati più piccoli. Le cellule contenute nei quattro quadrati grandi più quelle presenti su due lati contigui di ogni quadrato vengono contate e viene fatta una media del numero totale. Per ottenere il numero di cellule per ml e quindi la concentrazione si moltiplica tutto per il coefficiente della camera $\times 10^4$.

Saggio di incorporazione della metionina S³⁵

Un uguale numero di cellule K562 (5×10^5) non trattate o trattate con droghe specifiche sono state cresciute in triplicato in piastre da 60-mm in DMEM completo. Dopo 18 ore le cellule sono state marcate per 30 minuti con $10\mu\text{Ci}$ /piastra di metionina S³⁵ (Perkin-Elmer). Le cellule sono state lavate tre volte con PBS 1X, staccate dalle piastre e centrifugate a 5000g in PBS 1X. Le cellule sono state lisate in 1ml di SDS 0,1% in PBS 1X e 1/10 dell'estratto ottenuto è stato utilizzato per analizzare la quantità di proteine allo spettrofotometro. La restante parte è stata precipitata in TCA 10% (acido tricloroacetico) e incubata in

ghiaccio per 15 minuti. I precipitati proteici sono stati poi filtrati su filtri di vetro (filtri GC-Whartmann) nella pompa da vuoto. I filtri sono stati successivamente lavati tre volte con TCA al 5% e con etanolo al 100% e immersi in 3 ml di liquido di scintillazione. L'incorporazione è stata misurata come conte per minuto (cpm) relative alla quantità di proteine di ogni singolo campione.

Bibliografia

- Aho T. L., Sandholm J., Peltola K. J., Mankonem H. P., Lilly M. and Koskinen P. J. (2004). Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad Protein by phosphorylating it on the Ser 112 gatekeeper site. *FEBS Letters*, 571, 43-49.
- Allen JV., Verhoeven E., Domen J., van d V., Berns A., (1997). Pim2 transgene induced lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc. *Oncogene* 15, 1133-1141.
- Amson R., Sigaux F., Przedborski S., Flandrin G., Givol D., Telerman A. (1989). The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci*, 86(22), 8857-61.
- Bachmann M., Kosan C., Xiang Xing P., Montenarh M., Hoffmann I. and Moroy T. (2005). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *IJBCB*, 38, 430-443.
- Bachmann M., Hennemann H., Xiang Xing P., Hoffmann I. and Moroy T. (2005). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J. Bio. Chem.* 279 (46), 48319-28
- Bachmann M., Moroy T. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(4), 726-30.
- Ball S.E., McGuckin C.P., Jenkins G., Gordon-Smith E.C. (1996). Diamond-Blackfan anaemia in the U.K.: analysis of 80 cases from a 20- year birth cohort. *British Journal of Haematology*, 94(4), 645-53.
- Bohensky J., Shapiro I.M., Leshinsky S., Watanabe H. and Srinivas V. (2007). PIM-2 is an Independent Regulator of

Chondrocyte Survival and Autophagy in the Epiphyseal Growth Plate. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 246–251

- Buckwalter C.A., Lin, A.H., Tanizawa A., Pommier Y.G., Yung-Chi Cheng, and Kaufmann, S. H. (1996). RNA Synthesis Inhibitors Alter the Subnuclear Distribution of DNA Topoisomerase. *Cancer Research*. 56, 1674-1681.
- Chen W., Chan D.C., Donald C., Lilly M. B. and Kraft A.S. (2005). Pim Family Kinases Enhance Tumor Growth of Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res*, 3(8), 433-451.
- 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). RPS19, mutated in diamond-blackfan anemia, interacts with the PIM-1 oncogene. *Haematologica*. 90, 1453-62.
- Clark CG. (1987). On the evolution of ribosomal RNA. *J Mol Evol*, 25, 343-50.
- Cuypers H. T., Selten G., Quint W., Zijlstra M., Maandag E. R., Boelens W., van Wezenbeek P., Melief C., and Berns A. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell*. 37, 141-150.
- Da Costa L., Narla G., Willig T.N., Peters L.L., Parra M., Fixler J., Tchernia G., and Mohandas N. (2003). Ribosomal protein S19 expression during erythroid differentiation. *Blood*. 101, 318-24.
- Dianzani I., Garelli E., Dompe C., Crescenzo N., Locatelli F., Schiliro G., Castaman G., Bagnara G.P., Olivieri N.F., Gabutti V., Ramenghi U. (1996). Mutations in the erythropoietin receptor gene are not a common cause of Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 15, 87(6), 2568-72.
- Dreyfus F., Sola B., Fichelson S., Varlet P., Charon M., Tambourin P., Wendling F. and Gisselbrecht S. (1990).

Rearrangements of the Pim-1, c-myc, and p53 genes in Friend helper virus-induced mouse erythroleukemias. *Leukemia* 1990, 4(8), 590-594.

- Ebert B. L., Lee MM., Pretz J.L. (2005). An RNA interference model of RPS19 deficiency in Diamond-Blackfan anemia recapitulates defective hematopoiesis and rescue by dexamethasone: identification of dexamethasone-responsive genes by microarray. *Blood*, 105, 4620-4626.
- Eichmann A., Yuan L., Breant C., Alitalo K., Koskinen P.J. (2000). Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene* 19(9), 1215-24.
- Fox C.J., Hammerman P.S., Cinalli R.M., Master S.R., Chodosh L.A. and Thompson C.B. (2003). The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes & Development*, 17, 1841–1854
- Fox C.J., Hammerman P.S. and Thompson C.B. (2005). The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *JEM*, 201 (2), 259–266
- Gasser (1951). Aplastic anemia (chronic erythroblastopenia) and cortisone. *Schweiz Med Wochenschr.* 81, 1241-2.
- Haaf T., Ward DC. (1996). Inhibition of RNA polymerase II transcription causes chromatin decondensation, loss of nucleolar structure, and dispersion of chromosomal domains. *Exp Cell Res*, 224(1), 163-73
- Halperin D.S., Freedman M.H. (1989). Diamond-blackfan anemia: etiology, pathophysiology, and treatment. *American Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 11(4), 380-94.
- Hamaguchi I., Flygare J., Nishiura H. (2003). Proliferation deficiency of multipotent hematopoietic progenitors

in ribosomal protein S19 (RPS19)-deficient Diamond-Blackfan anemia improves following RPS19 gene transfer. *Mol Ther.*7, 613-622.

- Hammerman P.S., Fox C.J., Birnbaum M.J., Thompson C.B. (2005). Pim and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood* 105(11), 4477-83.
- Jordan P., Carmo-Fonseca M. (1998). Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. *Nucleic Acids Res.* 26 (12), 2831-6.
- Laird P.W., van der Lugt N.M., Clarke A., Domen J., Linders, K., McWhir J., Berns A, Hooper M. (1993). In vivo analysis of Pim-1 deficiency. *Nucleic Acids Res.*, 21(20), 4750-5.
- Levenson J., Koskinen P., Orrico F. C., Rainio E. M., Jalkanen K. J., Dash A. B., et al (1998). Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Mib activity. *Molecules and Cells*, 2, 417-425.
- Losman J., Chen X., Jiang H., Pan P. Y., Kashiwada M., Giallourakis C. (1999). IL-4 signaling regulated through the recruitment of phosphatases, kinases, and SOCS protein to the receptor complex. *Cold spring Harbour Symposia on Quantitative Biology.* 64, 405-416.
- LT Aho, T., Sandholm, J., Peltola, K.J., Ito, Y. And Koskinen, P. (2006). Pim-1 kinase phosphorylates RUNX family transcription factors and enhances their activity. *BMC Cell Biology*, 7:21,
- Matsson H, Davey EJ, Draptchinskaia N, et al. (2004). Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol Cell Biol.*, 24, 4032-4037.
- McGowan1, K., Li1, J., Park, C., Beaudry, V., Tabor, H., Sabnis, A., Zhang, W., Fuchs, H., Hrabe' de Angelis, M., Myers, R., Attardi, L., Barsh, G. (2008). Ribosomal mutations cause p53-

mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nature Genetics*, 40 (8), 963-970.

- Meerker T., Nagarajan L., ar-Rushdi A. and Croce C. (1987). Cloning and characterization of the human PIM-1 gene: a putative oncogene related to the protein kinases. *J. Cell Biochem.* 35, 105-112.
- Meerker T., Nagarajan L., ar-Rushdi A. Rovera G., Huebner K. and Croce C. (1987). Characterization of the human PIM-1 gene: a putative oncogene coding for a tissue specific member of the protein family. *Oncogene Res.* 1, 87-101.
- Mikkers H., Nawijn M., Allen J., Brouwers C., Verhoeven Jonkers E. J. and Berns A. (2004). Mice Deficient for All PIM Kinases Display Reduced Body Size and Impaired Responses to Hematopoietic Growth Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (13), 6104–6115
- 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(4), 627-37.
- Miyake K., Utsugisawa T., Flygare J., Kiefer T., Hamaguchi I., Richter J., Karlsson S. (2008). Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells.* 26(2), 323-9.
- Miura O., Miura Y., Nakamura N., Quelle F., Witthuhn B. A., Ihle J. N. and Aoki N. (1994). Induction of tyrosine phosphorylation of Van and expression of Pim-1 correlated with Jak2-mediated growth signalling from the erythropoietin receptor. *Blood.* 84, 4135-4141.

- Miyake K, Flygare J, Kiefer T, et al. (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.
- Mochizuki T., Kitanaka C., Noguchi K., Muramatsu T., Asai A. and Kuchino Y. (1999). Physical and functional interaction between Pim-1 kinase and CDC25A phosphatase: implication for the PIM-1-mediated activation of c-myc signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 18659-18666.
- Moroy T., Grzeschiczek A., Petzold S., Hartmann K.U. (1993). Expression of a Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90(22), 10734-8.
- Moroy T., Verbeek S., Ma A., Achacoso P., Bern A. and Alt F. (1991). E mu N- and E mu L-myc cooperate with E mu pim-1 to generate lymphoid tumors at high frequency in double-transgenic mice. *Oncogene.* 1941-1948.
- Muraski J., Rota, M., Misao Y., Fransioli J., Cottage C., Gude N., Esposito G., Delucchi F., Arcarese M., Alvarez R., Siddiqi S., Emmanuel G., Wu W., Fischer K., Martindale J., Glembotski C., Leri A., Kajstura J., Magnuson N., Berns A., Beretta R., Houser S., Schaefer E., Anversa P. & Sussman M. (2007). Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine.* 13 (12), 1467-1475.
- Nasser M., Datta J., Nuovo G., Kutay H., Motiwala T., Majumder S., Wang B., Suster S., Jacob S. and Ghoshal K. (2008). Downregulation of microRNA-1 (miR-1) in lung cancer: Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 283 (48), 33394-405.
- Ohene-Abuakwa Y., Orfali K.A., Marius C., Ball S.E. (2005). Two-phase culture in Diamond Blackfan anemia: localization of erythroid defect. *Blood.* 105, 838-846.

- Peng C., Knebel A., Morrice N.A., Li X., Barringer K., Li J., Jakes S., Werneburg B. and Wang L. (2007). Pim Kinase Substrate Identification and Specificity. *J. Biochem.* 141, 353–362
- Pircher T.J., Zhao S., Geiger J.N., Joneja B., Wojchowski DM. (2000). Pim-1 kinase protects hematopoietic FDC cells from genotoxin-induced death. *Oncogene.* 19(32), 3684-92
- Rajavel KS, Neufeld EF. (2001). Nonsense-mediated decay of human HEXA mRNA. *Mol Cell Biol.* 21(16), 5512-9.
- Rauè HA, Klootwijk, J., Musters, W., (1988) Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA. *Prog Biophys Mol Biol.* 51, 77-129.
- Reeves, R. and Magnuson, N. S. (1990). Mechanism regulating transient expression of mammalian cytokine genes and cellular oncogenes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38, 241-282.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 6-9, 22-24
- Saris C.J., Domen J., Berns A. (1991). The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *EMBO J.* 10, 655-664
- Shay K.P., Wang Z., Xing P., McKenzie I.F.C., and Magnuson, N. (2005). Pim-1 Kinase Stability Is Regulated by Heat Shock Proteins and the Ubiquitin-Proteasome Pathway *Mol Cancer Res.* 3(3), 170-181.
- Sorrentino V., McKinney M.D., Giorgi M., Geremia R., Fleissner E. (1988). Expression of cellular protooncogenes in the mouse male germ line: a distinctive 2.4-kilobase pim-1 transcript is expressed in haploid postmeiotic cells. *Proc Natl Acad Sci.* 85(7), 2191-5.

- Van Lohuizen M., Verbeek S., Krimpenford P., Domen J., Saris, C., Radaszkiewicz T., (1989). Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic: Cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell*. 56, 673-682.
- Wang Z., Bhattacharya N., Weaver M., Petersen K., Meyer M., Gapter L., Magnuson N.S. (2001). Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci* . 2(3), 167-79.
- White E. (2003). The pims and outs of survival signaling: role for the Pim-2 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines. *Genes and Development*. 17(15), 1813-6.
- Wingett D., Stone D., Davis W. C. and Magnuson N. S. (1995). Expression of the pim-1 proto-oncogene: differential inducibility between alpha/beta and gamma/delta T cells. *Cell Immunol*. 162, 123-130.
- Yan B., Zemsikova M., Holde S., Chin V., Kraft A., Koskinen, P. J., and Lilly M. (2003). The PIM-2 kinase Phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*. 278, 45358–45367
- Zippo A., De Robertis A., Serafini R. and Oliviero S. (2007). PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nature Cell Biology*. 9, 932-944