

CURRICULUM DI FABRIZIO LORENI

Dati anagrafici

Nato a Roma, 20 ottobre 1959
Nazionalità italiana
Stato civile coniugato
Residenza via Casilina 446, 00177 Roma
Posizione professore associato nel Dipartimento di Biologia, Università "Tor Vergata" di Roma, settore BIO/11

Carriera

1978 Immatricolato al corso di laurea in Chimica dell'Università di Roma "La Sapienza".
1983-85 Lavora alla tesi sperimentale presso il Centro Acidi Nucleici del C.N.R. nel laboratorio del Prof. Francesco Amaldi, occupandosi dello studio della regolazione dell'espressione dei geni delle proteine ribosomali di *Xenopus laevis*.
1985 Consegue il diploma di laurea in Chimica con votazione 110/110 con lode discutendo la tesi "Sequenza nucleotidica e analisi strutturale del gene per la proteina ribosomale L1 in *Xenopus laevis*" relatori Prof. Francesco Amaldi e Prof. Alessandro Ballio.
1986-88 "Post-doctoral fellow" per due anni nel laboratorio della Prof.ssa Diane Robins alla "Columbia University" di New York.
1989 Ricercatore di Biologia Molecolare (gruppo E05B) presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
1995-96 "Visiting scientist" per sei mesi nel laboratorio del Dr. George Thomas al Friedrich Miescher Institute a Basilea
2000-oggi Professore Associato di Biologia Molecolare (settore BIO/11) presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Titoli e borse di studio

1986 Borsa di studio per l'estero dell' "Istituto Pasteur - Fondazione Cenci-Bolognetti" (presso il laboratorio della Prof.ssa Diane Robins alla "Columbia University" di New York).
1987 Rinnovo della borsa di studio per l'estero dell' "Istituto Pasteur - Fondazione Cenci-Bolognetti"
1990 Socio della Società Italiana di Biofisica e Biologia Molecolare
1995 Borsa di studio "EMBO - Short Term" per un periodo di tre mesi (presso il

laboratorio del Dr. George Thomas al Friedrich Miescher Institute a Basilea)

1996 Borsa di studio "HSFPO - Short Term" per un periodo di tre mesi (presso il laboratorio del Dr. George Thomas al Friedrich Miescher Institute a Basilea)

Finanziamenti

1999-2001 TELETHON (E.818): Characterization of the genomic structure of the human SSADH gene £ 70 000 000

2000-2002 MURST-PRIN (MM06C81552_002): Sintesi di componenti ribosomali e funzionamento del ribosoma in colture primarie da pazienti con anemia Diamond-Blackfan e discheratosi £ 60 000 000

2000 CNR Agenzia (CNRC00DFDE_004): Analisi dei meccanismi di regolazione traduzionale durante la mitosi £ 20 000 000

2001-2003 MIUR-FIRB 2001 (RBAU01Y44A_002): Patologia ribosomiale: il modello dell'anemia di Diamond-Blackfan. Analisi molecolare dei meccanismi patogenetici. € 31 000

2002-2004 TELETHON (GGP02434): Molecular Basis of Diamond-Blackfan Anemia. € 68 000

2003-2005 MIUR-PRIN 2003: Meccanismi molecolari, analisi genetica e fenotipi clinici delle distrofie miotoniche (**coordinatore nazionale**) € 40 000

2005-2007 MIUR-PRIN 2005 (2005068409_002): Regolazione della sintesi di componenti ribosomali. € 40 000

2007-2008 DBA Foundation Grant - Molecular alterations caused by RPS19 mutations and their role in DBA. €35 000

2007-2010 TELETHON (GGP07232): Molecular Basis of Diamond-Blackfan Anemia. € 125 400

2007-2009 MIUR-PRIN 2007 (2007LJHMEJ): Crescita cellulare e funzione dell'apparato traduzionale (**coordinatore nazionale**) € 25 000

2010-2013 AIRC (IG 10653): PIM1 and ribosomal stress in prostate cancer cells € 135 000

Attività didattica

1986 Docente al corso "Ingegneria genetica applicata allo studio degli eucarioti", 15-23 settembre, Istituto di Fisiologia Generale, Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

1990-93 Lezioni di Biologia Molecolare nel corso di laurea in Scienze Biologiche dell'Università di Roma "Tor Vergata".

- 1990-2001 Lezioni nel corso Laboratorio di Biologia Sperimentale nel corso di laurea in Scienze Biologiche dell'Università di Roma "Tor Vergata".
- 1992-95 Docente dell'insegnamento Complementi di Biologia e Genetica Molecolari nella Scuola di Specializzazione in Applicazioni Biotecnologiche dell'Università di Roma "Tor Vergata"
- 1993-2003 Docente dell'insegnamento Biologia Molecolare II (fondamentale d'indirizzo) nel corso di laurea in Scienze Biologiche dell'Università di Roma "Tor Vergata".
- 1995-2001 Docente dell'insegnamento "Tecniche per la determinazione di sequenza di acidi nucleici" nella Scuola di Specializzazione in Applicazioni Biotecnologiche dell'Università di Roma "Tor Vergata"
- 2000-oggi Relatore di tesi di Laurea Quinquennale, Triennale, e Specialistica nei vari corsi di Laurea associati al Dipartimento di Biologia dell'Università Tor Vergata
- 2000-oggi Docente della Scuola di Dottorato in Biologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Roma "Tor Vergata" e Docente guida per lo svolgimento delle tesi di dottorato
- 2001-oggi Docente dell'insegnamento **Metodologie di Biochimica e Biologia Molecolare** (2 CFU) nel corso di Laurea Triennale Biologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Roma "Tor Vergata"
- 2002-oggi Docente dell'insegnamento **Biologia Molecolare (5 CFU)** nel corso di Laurea Triennale in Biotecnologie dell'Università di Roma "Tor Vergata"
- 2002-2006 Docente dell'insegnamento Laboratorio Integrato II anno (2 CFU) nel corso di Laurea Triennale in Biotecnologie dell'Università di Roma "Tor Vergata"
- 2003-oggi Docente dell'insegnamento **Espressione Genica (4 CFU)** nel corso di Laurea Specialistica in Biologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Roma "Tor Vergata".

Seminari e presentazioni orali a congressi

- 1995 *Translational regulation of ribosomal protein synthesis in vertebrates*. Nel corso "Translational control" del Biozentrum, University of Basel. 22 giugno, Basel (Svizzera).
- 1997 *Regulation of 5' TOP mRNA translation*. Nel corso "Translational control" del Biozentrum, University of Basel. 19 giugno, Basel (Svizzera).
- 1999 *RNA/protein interaction in the control of ribosomal protein synthesis*. Nella conferenza "New insights into the mechanism of mRNA translation". 22-26 marzo, Assois (Francia).

- Regulation of 5' TOP mRNA translation.* Nel corso "Translational control" del Biozentrum, University of Basel. 1 luglio, Basel (Svizzera)
- Evoluzione del gene: dall'RNA al DNA.* Nel corso "Biofisica del DNA". Scuola Nazionale di Biofisica 1999, Bressanone 13-15 settembre.
- Regolazione della traduzione dipendente dalle condizioni di crescita cellulare: gli mRNA TOP.* Centro Genetica Evoluzionistica C.N.R, Roma 13 dicembre.
- 2000 *Sintesi del ribosoma e patologia ribosomiale.* Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara 6 novembre 2000.
- 2001 *Cis- and trans-acting elements in the translational control of 5' terminal oligopyrimidine mRNAs.* Nella conferenza "2001: Translation UK", University of Sussex, Brighton, UK 3-4 settembre
- 2002 *Serum and amino acid deprivations have an additive effect on TOP mRNA translational control.* Nella conferenza "2002 Translation, the IX UK protein synthesis meeting". Manchester 4-5 luglio
- 2003 *Regolazione traduzionale dell'espressione genica: micro RNA e sintesi dei ribosomi.* Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara 18 giugno.
- 2005 *Growth signaling to the translational apparatus: regulation of TOP mRNAs.* Department of Molecular Medicine and Biotechnology, School of Medicine University of Rijeka, Rijeka, Croatia, 30 maggio.
- 2006 *Alterations of RPS19 function caused by DBA mutations.* The 7th Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference. New York N. Y. March 11-13.
- Translational regulation in the synthesis of the translational apparatus.* FISV-VIII Annual Meeting, Riva del Garda, 28 Sept.-1 Oct
- 2007 *Missense mutations in RPS19 affect protein stability, nucleolar localization and ribosome assembly.* The 8th Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference. New York N. Y. March 17-19.
- 2008 *Role of the rps19-pim1 interaction in the regulation of cell metabolism.* The 9th Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference. New York N. Y. March 11-13.
- 2009 *PIM1 kinase plays a role in the response to ribosomal stress of dba cells.* The 10th Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference. New York N. Y. March 14-16.
- PIM1 oncoprotein is destabilized by ribosomal stress and inhibits cell cycle progression.* 8th International Conference on Ribosome Synthesis. Regensburg,

Germany, August 26-30

2010 *Regulatory mechanisms in the synthesis of ribosomal components in response to ribosomal stress.* The 11th Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference. New York N. Y. March 13-15.

PIM1 oncoprotein is destabilized by ribosomal stress and inhibits cell cycle progression. Protein Translation and Cancer. Coronado, CA. February 3-6.

2012 *Analysis of the signaling pathways activated in response to ribosomal stress.* The 12th Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference. New York N. Y. March 17-19.

Presentazioni a congressi (poster)

1989-oggi Ha presentato lavori in numerose edizioni dei seguenti congressi internazionali:

"Translational control", Cold Spring Harbor, New York, USA (ogni due anni)

"International Conference on Ribosome Synthesis" (ogni tre anni localita' variabile)

"EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control" Heidelberg (ogni due anni)

"Translation UK" (annuale, localita' variabile)

"Diamond Blackfan Anemia International Consensus conference". New York, USA (annuale)

Ha presentato lavori in numerosi altri congressi internazionali

Ha presentato lavori in numerose edizioni dei seguenti congressi nazionali:

Convegno SIBBM

Seminario SIBBM

Convegno FISV

Collaborazioni relative a pubblicazioni (indicati i group leader)

1994 Oded Meyuhas, *The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel*

2000 George Thomas, *Department of Growth Control, Friedrich Miescher Institut, Basel, Switzerland*

2004 Christopher Proud, *University of Dundee, United Kingdom;*

Gil Tchernia, Faculte' de Medecine Paris-sud, Hopital Bicetre, France;

Irma Dianzani, Università del Piemonte Orientale, Novara

Irene Bozzoni, Università La Sapienza, Roma

- 2005 Stefano Biffo, *Istituto San Raffaele, Milano*
 Irma Dianzani, *Università del Piemonte Orientale, Novara*
 Niklas Dahl, *Uppsala University, Sweden*
- 2006 Giuseppe Novelli, *Università Tor Vergata, Roma*
 Alessandro Quattrone, *Università di Firenze*
- 2007 Irma Dianzani, *Università del Piemonte Orientale, Novara*
- 2008 Claudio Sette, *Università Tor Vergata, Roma*
 Irma Dianzani, *Università del Piemonte Orientale, Novara*
- 2009 Ugo Ramenghi, *Università di Torino, Torino*

Publicazioni e attività di valutazione (Peer-review)

- 1985-oggi E' autore o co-autore di 42 pubblicazioni di cui 39 con indice di valutazione "Impact factor" maggiore di 2.
- 2000-oggi E' stato valutatore (referee) di pubblicazioni per le riviste: *EMBO journal, Nucleic Acids Research, Human Mutation, Cell Death and Differentiation, FEBS letters, Gene,*
- 2005 E' stato valutatore di 9 prodotti per il CIVR - Comitato di Indirizzo per la Valutazione della Ricerca
- 2009 E' stato valutatore dei PRIN 2008

Attività scientifica

- 1983-85 *Sequenziamento del gene per la proteina ribosomale L1 di Xenopus*
 Durante il periodo di lavorazione alla tesi sperimentale nel laboratorio del Prof. Amaldi, dove si studia la regolazione dell'espressione dei geni per le proteine ribosomali in *Xenopus laevis*, è stato affrontato prevalentemente l'aspetto strutturale. Utilizzando le tecniche di clonaggio fondamentali è stata determinata la sequenza nucleotidica completa del gene per la proteina ribosomale L1, precedentemente isolato e delle due copie di mRNA presenti nello *Xenopus laevis*, che erano state isolate (come cloni di cDNA) e caratterizzate. Utilizzando i dati di sequenza nucleotidica raccolti sono state messe in evidenza, mediante l'uso di programmi specifici al computer, delle regioni che, per le loro caratteristiche di ripetizione (anche in una specie diversa di *Xenopus*) e di complementarità, potrebbero avere un ruolo nella regolazione dell'espressione del gene.
- 1986-88 *Regolazione dell'espressione genica da parte degli ormoni steroidei*
 Allo scopo di approfondire lo studio dei meccanismi della regolazione dell'espressione dei geni negli organismi eucariotici, è iniziato, nel febbraio '86, il

lavoro nel laboratorio della Prof.ssa Diane Robins alla "Columbia University" di New York. In questo laboratorio, dove si studiava la regolazione dell'espressione dei geni da parte degli ormoni steroidei, è stato portato avanti un progetto sulla regolazione del gene Slp (Sex limited protein) di topo da parte degli ormoni androgeni. Il gene Slp di topo pur essendo altamente omologo all'adiacente gene C4 (componente del complemento) presenta, differentemente da quest'ultimo, una regolazione dell'espressione mediata dal testosterone. Il progetto si proponeva di caratterizzare, attraverso esperimenti di trasfezione in linee cellulari di costruzioni geniche, gli elementi responsabili di tale regolazione. Il lavoro svolto nei due anni di permanenza nel laboratorio ha permesso l'identificazione, nella regione a monte del gene Slp, di un elemento "enhancer" dipendente dal testosterone responsabile dell'attivazione trascrizionale del gene da parte dell'ormone.

1989-92 *Regolazione dell'espressione dei geni per le proteine ribosomali*

Nel febbraio '89 è iniziato ufficialmente il lavoro come ricercatore nel laboratorio del Prof. Amaldi nell'Università "Tor Vergata" di Roma. Riacciandosi in parte al lavoro compiuto durante la tesi di laurea e' stato proseguito lo studio della regolazione dell'espressione dei geni negli eucarioti, ed in particolare della regolazione traduzionale della sintesi delle proteine ribosomali in *Xenopus laevis*. Utilizzando un sistema di selezione differenziale di una banca di cDNA sono stati isolati cloni corrispondenti a sette nuove proteine ribosomali. Il metodo di selezione era stato ideato con lo scopo di isolare cDNA di proteine controllate traduzionalmente durante l'embriogenesi di *Xenopus*. Dopo aver ottenuto dati di sequenza nucleotidica i cloni sono stati identificati tramite ricerca di omologia su banche dati mediante computer.

Per quanto riguarda la regolazione della trascrizione e' stato portato avanti un lavoro in collaborazione con il Centro Acidi Nucleici del C.N.R. contribuendo con esperimenti di trasfezione di costruzioni geniche in cellule HeLa, alla caratterizzazione del controllo trascrizionale del gene L14 di *Xenopus* e della conservazione evolutiva di tale controllo.

1992-94 *Controllo traduzionale degli mRNA per le proteine ribosomali*

Utilizzando le tecniche acquisite nei due anni di permanenza alla "Columbia University" è iniziato un progetto sul controllo traduzionale in colture cellulari. Lavorando sulla linea cellulare di *Xenopus* B 3.2 sono state messe a punto condizioni che evidenziano la variazione di utilizzazione degli mRNA per le proteine ribosomali da parte delle cellule in diverse condizioni di crescita. In tale sistema sperimentale si è potuto seguire la cinetica del cambiamento di localizzazione degli mRNA per le proteine ribosomali (da polisomi a mRNP e viceversa). I risultati hanno dimostrato che tale cambiamento e' molto rapido, reversibile e che avviene senza modificazione della stabilità degli mRNA.

In collaborazione con il Dr. O. Meyuhas dell'Università di Gerusalemme è stata approfondita la caratterizzazione del controllo traduzionale degli mRNA per le proteine ribosomali nei vertebrati. In particolare e' stata dimostrata la conservazione

dei meccanismi di regolazione tra anfibi e mammiferi. Infatti un gene di proteina ribosomale di topo (rpL32) introdotto in cellule di *Xenopus* e' soggetto alla regolazione traduzionale come un gene di proteina ribosomale endogeno e viceversa.

1995-96 *Analisi in vitro del controllo traduzionale*

Lavori in diversi laboratori hanno dimostrato che gli elementi *cis*-agenti necessari al controllo traduzionale degli mRNA per le proteine ribosomali sono localizzati nella regione al 5' non tradotta (5' UTR) ed in particolare nel tratto di pirimidine presente all'estremita' 5' di tutti gli rp-mRNA dei vertebrati. Per quanto riguarda gli elementi *trans*-agenti, dati della letteratura suggeriscono il coinvolgimento della proteina ribosomale S6 che cambia stato di fosforilazione in relazione alla crescita cellulare. Allo scopo di verificare il ruolo della rpS6 nel controllo traduzionale è iniziato un progetto sulla messa a punto di un sistema di traduzione *in vitro*. Il progetto per il quale sono state ottenute due borse di studio, prima EMBO e poi HSFPO, è stato svolto nel laboratorio del Dr. George Thomas al Friedrich Miescher Institute di Basilea, nel quale la fosforilazione della rpS6 è studiata da diversi anni. Il sistema messo a punto è costituito da estratti di cellule HeLa in diverse condizioni di crescita. Infatti le cellule HeLa, come altre linee cellulari di vertebrati, possono essere indotte in due diversi stati di crescita aggiungendo e togliendo siero dal terreno di coltura: 1) crescita rapida (cellule stimulate con siero), con gli rp-mRNA attivamente tradotti e localizzati sui polisomi; 2) quiescenza (cellule private del siero), con gli rp-mRNA tradizionalmente repressi localizzati nelle mRNP. Gli estratti di traduzione preparati dalle cellule nelle diverse condizioni conservano, per periodi d'incubazione di 10-15 minuti, il comportamento traduzionale delle cellule. Infatti in seguito all'aggiunta di mRNA totale agli estratti, si osserva che gli rp-mRNA sono caricati sui polisomi solo nell'estratto preparato da cellule stimulate mentre dei controlli come l'mRNA per l'actina lo sono in entrambi gli estratti. A questo punto l'aggiunta di molecole specifiche agli estratti (proteine, anticorpi ecc.) permetterà la caratterizzazione degli elementi coinvolti nel controllo traduzionale.

1997-2000 *Studio dei fattori trans-agenti coinvolti nel controllo traduzionale dei geni per le proteine ribosomali (geni TOP).*

Allo scopo di evidenziare fattori *trans*-agenti responsabili del controllo traduzionale dei geni TOP, nel laboratorio della dott.ssa Pierandrei-Amaldi del CNR erano state identificate due proteine in grado di legare *in vitro* il 5' UTR degli mRNA TOP: la proteina La, e la proteina CNBP (Cellulare Nucleic acid Binding Protein). I risultati ottenuti dimostravano che entrambi questi fattori potevano avere un ruolo nel controllo traduzionale. In particolare la proteina La aveva un effetto positivo sulla traduzione degli mRNA TOP mentre la proteina CNBP era un repressore. Tuttavia poiché tali studi si basavano esclusivamente su esperimenti *in vitro* mancava l'evidenza che tali fattori avessero un ruolo *in vivo* nel controllo traduzionale. Per ottenere tali evidenze nel nostro laboratorio sono stati portati avanti esperimenti di trasfezione stabile in cellule in coltura di *Xenopus* nei quali il cDNA codificante per la proteina La e dei mutanti per delezione di esso, vennero espressi in maniera

inducibile. I risultati hanno dimostrato che la sovraespressione di La completo ma non dei suoi mutanti ha un ruolo positivo sulla traduzione degli mRNA TOP (A20). Inoltre allo scopo di comprendere il ruolo di CNBP e di approfondire la funzione di La nel controllo traduzionale abbiamo preparato dei costrutti chimerici contenenti il promotore e il 5' UTR di vari geni TOP e la sequenza codificante della Green Fluorescence Protein. Mutazioni nei siti di legame di La e CNBP verranno introdotte nei costrutti che saranno poi usati come reporter nell'analisi della funzione di La e CNBP. Analisi preliminari hanno mostrato che costrutti contenenti almeno un introne nella porzione 5' sono tradotti più efficientemente. Per questa ragione introni di diversa origine verranno introdotti nei costrutti. I plasmidi "reporter" verranno usati in esperimenti di cotrasfezione insieme a costrutti codificanti per La e CNBP in modo da valutare l'effetto di mutazioni nelle due proteine sul controllo traduzionale.

2000-2003 *Trasduzione del segnale nella regolazione traduzionale degli mRNA TOP.*

Numerose evidenze indicano un coinvolgimento della via di trasduzione del segnale di S6K1 e mTOR nella regolazione traduzionale dei messaggeri TOP indotta da mitogeni. Più recentemente il pathway mTOR/S6K sembra essere coinvolto anche nella risposta alla presenza di aminoacidi ma il suo ruolo nella regolazione degli mRNA TOP non è ancora ben definito. Abbiamo analizzato la relazione esistente tra la regolazione traduzionale degli mRNA TOP indotta da mancanza di siero e quella indotta da mancanza di aminoacidi. Utilizzando cellule HeLa come sistema sperimentale, abbiamo osservato l'effetto del siero e/o degli aminoacidi sull'associazione ai polisomi di messaggeri TOP e non-TOP. I nostri risultati indicano che l'assenza di siero e aminoacidi hanno un effetto additivo sull'inibizione traduzionale degli mRNA TOP. La risposta alla mancanza di aminoacidi è più forte e influenza, sebbene in modo variabile, anche i messaggeri non-TOP. Inoltre, la stimolazione da aminoacidi sembra agire attraverso un via rapamicina-sensibile simile alla stimolazione indotta dal siero, ma anche attraverso una via aggiuntiva rapamicina-resistente wortmannina sensibile. Questa via interessa anche gli mRNA non-TOP e probabilmente coinvolge la fosforilazione della subunità alfa del fattore eIF2.

2000-oggi *Regolazione della sintesi di componenti ribosomali nell'anemia di Diamond-Blackfan.*

La DBA è un'eritroblastopenia caratterizzata da precursori eritroidi diminuiti o assenti. Circa il 30% dei bambini affetti presenta una varietà di anomalie fisiche associate, tra cui malformazioni craniofacciali, del pollice, cardiache e dell'apparato urogenitale. In seguito alla scoperta del coinvolgimento della proteina ribosomale (RP)S19, l'analisi di 190 pazienti di DBA ha evidenziato alterazioni nella sequenza di RPS19 comprendenti nonsense, missenso, splicing, frameshift e perdita di un allele, in circa il 24% dei casi. Le mutazioni di RPS19 nella DBA rappresentano il primo caso di alterazione in una RP nei vertebrati. Studi precedenti sulla malattia hanno analizzato il tipo di mutazioni nel gene e alcuni aspetti del metabolismo dei tessuti interessati, mentre l'analisi dell'espressione di RPS19 e delle altre componenti

ribosomali nelle cellule dei malati di DBA non è stata ancora riportata. Allo scopo di analizzare le alterazioni molecolari causate dalle mutazioni, abbiamo utilizzato diverse linee cellulari, linfoblasti immortalizzati con EBV e fibroblasti, di pazienti DBA che presentano o meno la mutazione nel gene RPS19. L'analisi del livello dell'mRNA di RPS19 ha evidenziato: 1) una diminuzione fino al 50% di tale messaggero nelle linee linfoblastoidi mutate in RPS19, 2) nessuna variazione nel livello dell'mRNA RPS19 nelle linee fibroblastoidi senza mutazione e nelle linee di fibroblasti a nostra disposizione che presentano però solamente mutazioni missense. Nelle linee linfoblastoidi mutate la diminuzione del messaggero di RPS19 è probabilmente dovuta all'effetto del Non-sense Mediated Decay (NMD) e del Non-Stop Decay. Tali meccanismi degradano rispettivamente messaggeri che presentano codoni di Stop prematuri (PTC) o mancanti di tale segnale, attraverso una via dipendente dalla traduzione. Gli mRNA RPS19 delle linee mutate presentano queste caratteristiche, quindi al fine di verificare tale ipotesi, abbiamo trattato le linee cellulari con inibitori della traduzione e analizzato l'RNA estratto attraverso RT-PCR e Northern. Gli esperimenti mostrano un aumento del messaggero RPS19 nelle linee trattate, dimostrando che la degradazione dipende dalla traduzione.

2003-2006 *Analisi molecolare della distrofia miotonica: ruolo di ZNF9 nella DM2*

La distrofia miotonica è una malattia autosomica dominante che colpisce, oltre al muscolo scheletrico, molti altri tessuti inclusi gli occhi, il cuore, lo stomaco, il sistema endocrino e il sistema nervoso centrale e periferico. Nel 1992 è stata osservata una espansione instabile di trinucleotidi ripetuti sul cromosoma 19 nella maggior parte dei casi di DM diagnosticati. L'espansione è localizzata nella regione 3'UTR del gene DMPK e nella regione del promotore del gene omeotico adiacente SIX5. Rimane ancora da chiarire come l'espansione CTG in una regione non codificante di un gene possa causare il complesso fenotipo DM. Più recentemente è stata identificata da Ranum e collaboratori la causa genetica di una seconda forma di DM. La mutazione nella DM2 consiste nell'espansione di una ripetizione tetranucleotidica (CCTG) nel primo introne del gene CNBP/ZNF9. In collaborazione con diversi centri di ricerca italiani abbiamo ottenuto biopsie muscolari e campioni di sangue da pazienti DM2. Il sangue è stato poi utilizzato per ottenere linee linfoblastoidi immortalizzate con EBV. Sia i tessuti che le colture cellulari sono state utilizzate in esperimenti di Western blot con antisieri contro ZNF9 e actina come controllo. Inoltre in parallelo sono stati analizzati anche vari tessuti di ratto. I risultati preliminari indicano che: 1) ZNF9 è espresso in tutti i tessuti analizzati; 2) il livello di ZNF9 nei tessuti e nelle linee DM2 è più basso che nei controlli.

2004-oggi *Ruolo della chinasi PIM1 nella risposta allo "stress ribosomale".*

Nel corso di una ricerca di interattori della RPS19 in collaborazione con la prof.ssa Irma Dianzani dell'Università del Piemonte Orientale, abbiamo identificato la proteina PIM1. Questa protein chinasi, in grado di fosforilare residui di serina e treonina, e' espressa ad alti livelli in cellule dei tessuti ematopoietici e in collaborazione con Myc puo' indurre tumori. Allo scopo di studiare il rapporto tra

PIM1 e la funzione e regolazione del ribosoma, abbiamo preparato una linea cellulare trasfettata stabilmente inducibile per la sovraespressione di PIM1. Abbiamo analizzato i parametri di crescita cellulare in seguito ad induzione dell'espressione di PIM1 ed abbiamo osservato sia aumento della proliferazione che dell'attività di sintesi proteica. Inoltre gli effetti osservati sembrano insensibili alla rapamicina, indicando che gli effetti di PIM1 probabilmente non dipendono da mTOR. L'analisi quantitativa dell'interazione PIM1-ribosomi indica che solo una parte dei ribosomi coinvolti nella sintesi proteica interagisce con PIM1 (circa 10-20%). La percentuale di ribosomi che interagisce con PIM1 sembra inoltre variare nelle diverse condizioni di crescita della cellula e nelle diverse linee cellulari analizzate. Sempre allo scopo di studiare il rapporto PIM1-ribosoma abbiamo analizzato una linea cellulare inducibile per RNA interference contro la RPS19. Abbiamo osservato che la diminuzione della sintesi di RPS19 è correlata ad una confrontabile diminuzione di PIM1. La diminuzione di PIM1 sembra dovuto a destabilizzazione della proteina. Quindi PIM1 potrebbe essere coinvolto nella risposta della cellula a difetti nella sintesi e/o funzione del ribosoma.