INTRODUZIONE

La distrofia miotonica (DM), la forma più comune di distrofia muscolare nell'adulto, è un disordine autosomico dominante multisistemico, caratterizzato da progressiva debolezza della muscolatura scheletrica, miotonia, disturbi della conduzione cardiaca, cataratta ad esordio precoce, insulino-resistenza, calvizie, insufficienza testicolare e disturbi del sistema nervoso centrale (quali sonnolenza, deficit cognitivo) (Harper, 2001).

Descritta come entità clinica distinta per la prima volta nel 1909 da Steinert, Batten e Gibb, nel 1992 fu scoperto che la forma più comune, la Distrofia Miotonica tipo 1 (DM1, OMIM 160900), era causata da un'abnorme ripetizione di triplette CTG nella regione 3' non tradotta del gene per la proteinchinasi della distrofia miotonica (DMPK) sul cr. 19q13 (Brook et al, 1992; Fu et al, 1992).

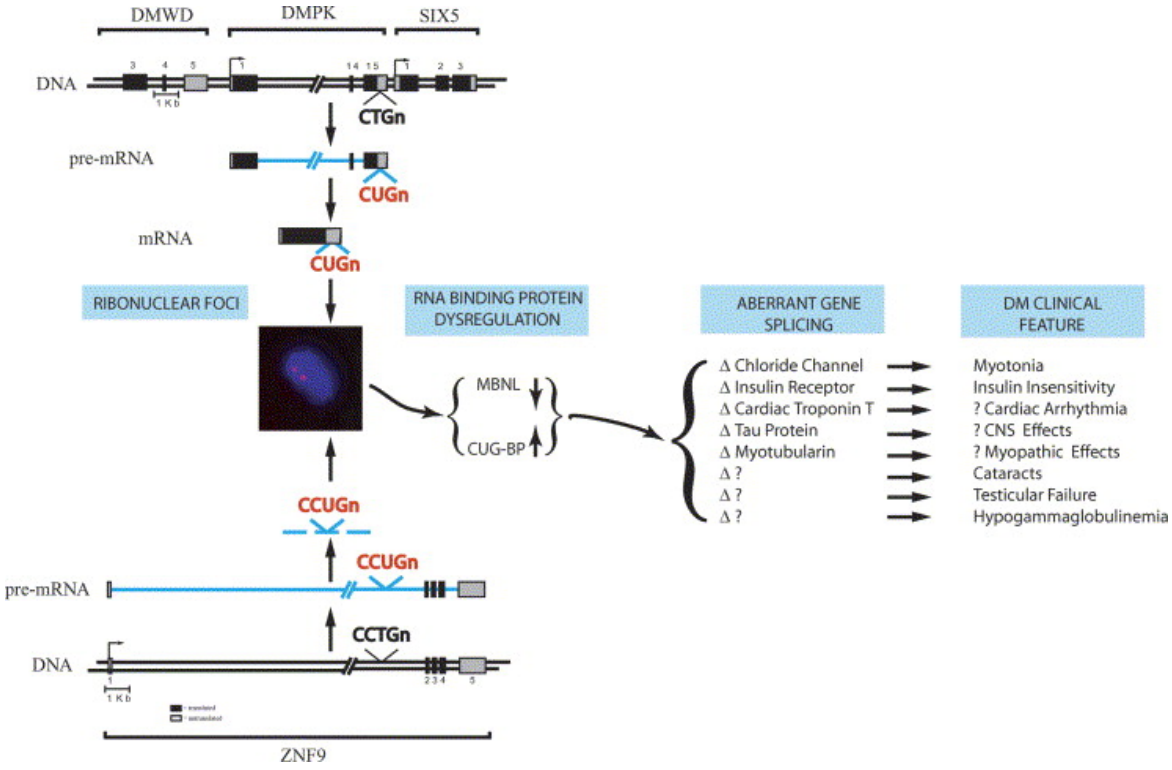
Numerosi sono i meccanismi patogenetici proposti ed al momento si pensa che ciascuno di essi possa spiegare differenti aspetti della distrofia miotonica (Day & Ranum, 2005).

La diminuzione dei livelli di RNAm e della proteina finale DMPK in cellule in coltura ed in cellule muscolari di pazienti (Fu et al, 1993; Novelli et al, 1993) unita al riscontro di una lieve cardiomiopatia in topi knockout per DMPK (Reddy et al, 1996; Jansen et al, 1996; Berul et al, 1996) fa supporre che l'aploinsufficienza di DMPK possa contribuire soprattutto allo sviluppo delle caratteristiche miopatiche della DM1.

D'altra parte, la miotonia e le alterazioni dei tessuti non muscolari non sono state descritte in questo modello, mentre sono state rinvenute in topi transgenici portatori dell'espansione CTG umana (Seznec et al, 2001).

Un'altra ipotesi permetterebbe di spiegare proprio gli aspetti multisistemici della DM1 nonché lo sviluppo della miotonia. In particolar modo, si suggerisce che l'accumulo delle ripetizioni CTG sia in grado di alterare la struttura della cromatina conducendo all'aploinsufficienza di geni *in cis* quali SIX5, collegato allo sviluppo di cataratta (Klesert et al, 2000; Sarkar et al, 2000), DMWD, che è espresso prevalentemente in cervello e testicolo (Alwazzan et al, 1999) ed FCGRT, recettore delle immunoglobuline (Junghans et al, 2001).

Una recente ipotesi patogenetica permetterebbe inoltre di spiegare altre manifestazioni cliniche della distrofia miotonica. Si tratta del cosiddetto meccanismo della "trans-dominant RNA toxicity". Evidenze provenienti sia da modelli animali che da studi in vitro dimostrano che gli RNAm mutati si accumulano in foci nucleari e determinano alterazione della localizzazione e funzione di proteine leganti l'RNA (Timchenko et al, 1996). In particolar modo, l'overespressione delle CUG-Binding Proteins (CUG-BP) e la ridotta espressione delle Muscleblind proteins (MBNL) producono un'alterazione dello splicing di proteine quali il canale per il cloro muscolare (ClC-1) (Mankodi et al, 2002), da cui la miotonia, il recettore per l'insulina (IR), collegato allo sviluppo della resistenza insulinica (Savkur et al, 2001; Seino et al, 1989), la troponina T cardiaca (cTNT) (Philips et al, 1998), probabilmente collegato allo sviluppo delle aritmie cardiache, la proteina tau (ritardo mentale) (Sergeant et al, 2001; Seznec et al, 2001) e la miotubularina, con possibili esiti in tratti miopatici (MTMR1) (Buj-Bello et al, 2002).



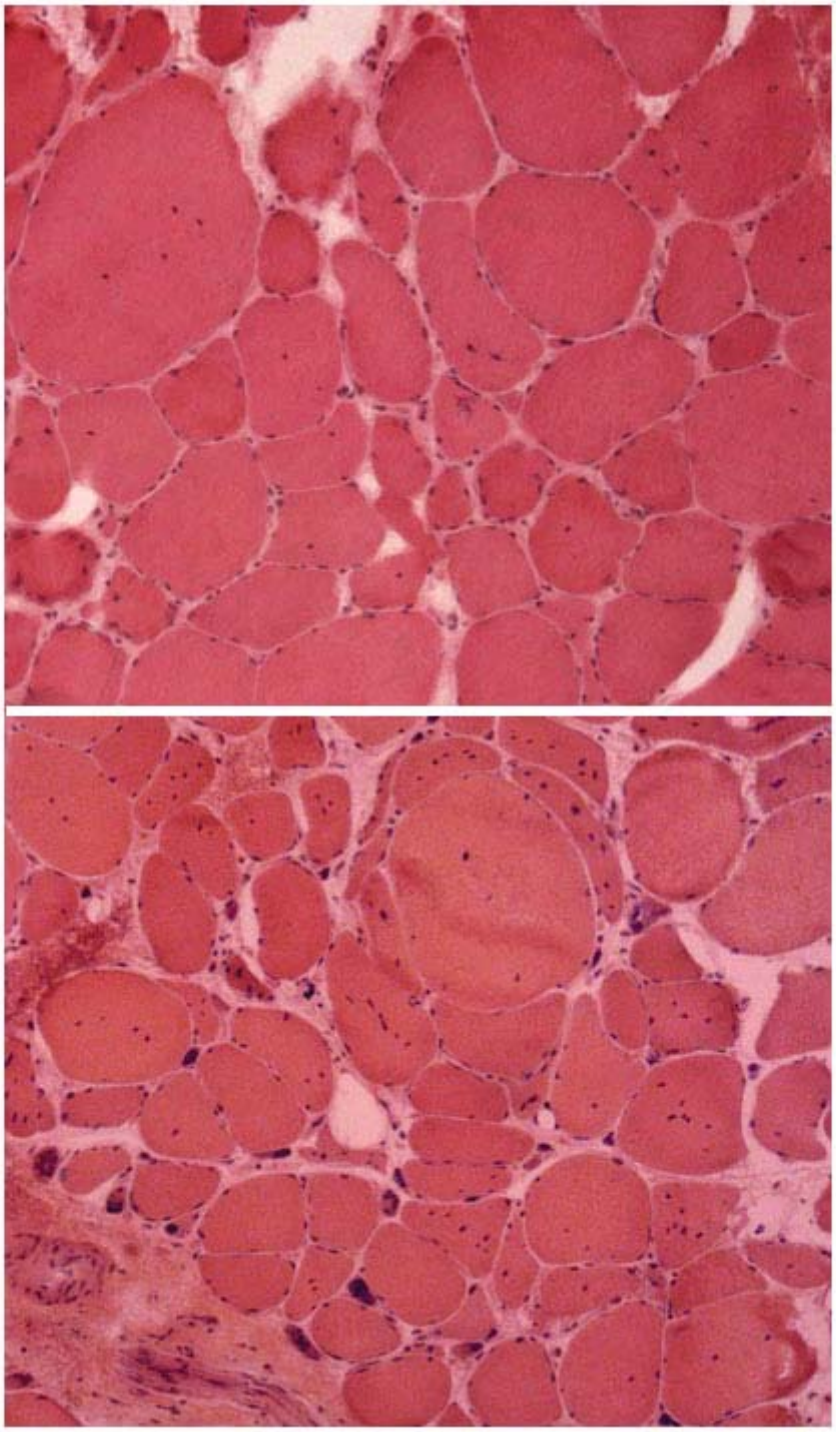
Day J.W. and Ranum L.P., Neuromuscul Disord. 2005 Jan;15(1):5-16.

Tuttavia, alcuni pazienti con segni e sintomi compatibili con distrofia miotonica non presentano la tipica espansione CTG sul cromosoma 19. Una nuova entità clinica venne creata inizialmente per distinguerli dai pazienti con DM1, ovvero la PROMM, Miopatia Miotonica Prossimale (Ricker et al. 1994; Meola et al, 2000), ma successivamente è stata dimostrata una maggiore sovrapposizione tra PROMM e DM1 e si è giunti ad indicare questa condizione clinica come Distrofia miotonica di tipo 2 (DM2, OMIM 602668). Nel 1998 Ranum e colleghi identificarono l'alterazione genetica alla base della PROMM nel locus 3q21.3 (Ranum et al, 1998). Nel 2001 Liquori et al descrissero la mutazione associata alla DM2, ovvero un'espansione CCTG localizzata nell'introne 1 del gene per la Zinc Finger Protein 9 (ZNF9, chiamata anche CNBP, cellular nucleic acid binding protein).

Il fatto che entrambe le patologie, DM1 e DM2, aventi un fenotipo sorprendentemente simile, siano dovute ad espansioni in regioni trascritte ma non tradotte di due geni apparentemente non correlati, induce a pensare che l'accumulo di RNA mutati nel nucleo sia *di per sé* patogenetico.

In accordo con questa ipotesi si colloca la recente descrizione che un gruppo di proteine che interagiscono con le sequenze ripetute CUG sono sequestrate all'interno di foci nucleari di RNA aberrante sia nella DM1 che nella DM2 (Mankodi et al, 2001).

Tuttavia, sebbene simili, la DM1 e la DM2 presentano alcune differenze fenotipiche. Per esempio, il prevalente interessamento prossimale, il quadro istopatologico meno severo e l'assenza della forma congenita sono peculiari della DM2.

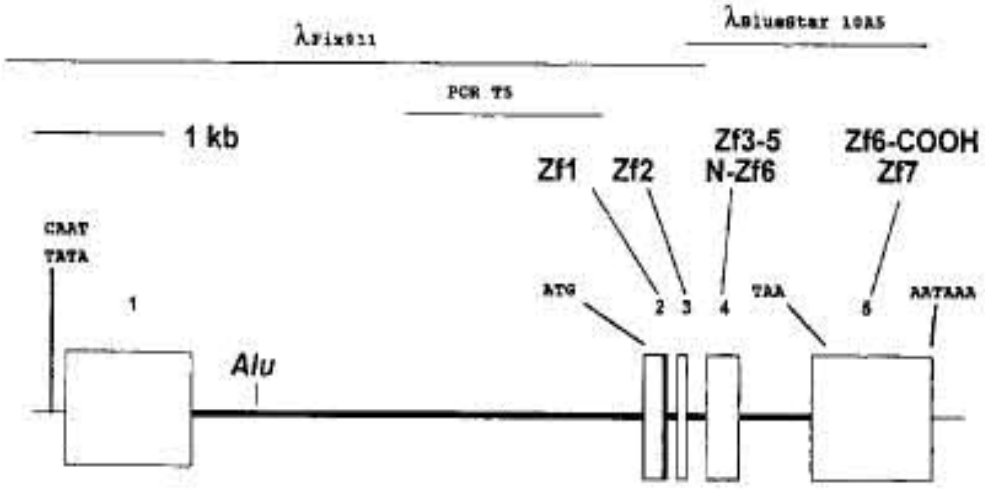


Sezioni di muscolo scheletrico di pazienti con DM2

(nell'ordine pt 1 e pt 2, Ematossilina Eosina, 10x)

Le differenti funzioni dei prodotti proteici dei geni DMPK e ZNF9 e le interazioni di questi due geni con i geni ad essi circostanti nelle regioni DM1 e DM2 potrebbero spiegare le differenze fenotipiche.

In particolar modo, dal punto di vista istologico, la proteina DMPK è stata localizzata nei dischi intercalati, nelle fibre di Purkinje, nel cuore e nelle giunzioni neuromuscolari a livello del muscolo scheletrico ove la sua espressione risulta, secondo alcuni lavori, essere ridotta, ma i dati a tale proposito risultano ancora contrastanti (Wansink et al, 2003; Pham et al, 1998). Inoltre i topi knock-out per il gene DMPK (Dmpk -/-) sviluppano una miopatia progressiva ad esordio tardivo che condivide alcune delle caratteristiche della DM1 (Reddy et al, 1996) e sviluppano anche disturbi della conduzione cardiaca simili a quelli osservabili nei pazienti affetti da DM1 (Berul et al, 2000). E' pertanto possibile che alcune delle alterazioni cardiache e muscolari della DM1 siano dovute ad una diminuita presenza o ad una funzione deficitaria della DMPK. Un meccanismo simile potrebbe essere supposto per la DM2 qualora fosse dimostrata una riduzione dell'espressione della ZNF9.



Struttura del gene ZNF9

ZNF9 (Rajavanishisth et al, 1989) è una piccola proteina di 19kDa che contiene sette domini zinc-finger del tipo CCHC e presenta somiglianze sorprendenti con la sequenza della CNBP, una proteina retrovirale che lega gli acidi nucleici (Berg et al, 1986). E' altamente conservata a livello aminoacidico e nucleotidico nell'uomo, nel topo, nel ratto, nel pollo e nello *Xenopus* ed è espressa in numerosi tessuti (De Dominicis et al, 2000; Flink & Morkin, 1995; Ruble & Foster, 1998; Warden et al, 1994). Sebbene sia stato supposto il coinvolgimento della proteina ZNF9 in numerosi processi (Flink & Morkin, 1995; Liu et al, 1998; Michelotti et al, 1995; Rajavashisth et al, 1989), la sua localizzazione cellulare e la sua funzione sono tuttora sconosciute (Warden et al, 1994).

Al fine di chiarire in quali meccanismi cellulari ZNF9 sia funzionalmente coinvolta e se questi meccanismi giochino un ruolo specifico e significativo nelle miofibrille è necessario determinare la precisa localizzazione subcellulare di questa proteina.

Pertanto, lo scopo del nostro studio è stato quello di stabilire:

1) il livello di espressione della proteina ZNF9 in diversi tessuti;

2) la localizzazione subcellulare della proteina ZNF9 nel muscolo scheletrico normale ed in quello dei pazienti con DM2;

3) una eventuale differenza nell'espressione di ZNF9 in diversi sottotipi di fibre muscolari (lente/ossidative versus rapide/glicolitiche).

Nel complesso, questi dati potranno fornire informazioni sulla funzione di ZNF9 nelle fibre muscolari e, quindi, sul suo eventuale ruolo nella patogenesi della DM2.

MATERIALI E METODI

Animali e preparazione dell'anticorpo

Ratti adulti di sesso maschile Wistar sono stati mantenuti in condizioni standard e nutriti con una dieta ordinaria. I ratti sono stati sacrificati con una overdose di tiopentale sodico somministrata per via intraperitoneale, ed i muscoli gastrocnemio, soleo e tibiale anteriore sono stati prelevati da entrambi gli arti inferiori ed immediatamente congelati in isopentano raffreddato in azoto liquido per studi immunocitochimici e biochimici.

Anticorpi policlonali anti-ZNF9 (K20) sono stati ottenuti previa immunizzazione di un coniglio con un peptide di 20 residui aminoacidici ottenuto dall'estremità C-terminale della proteina ZNF9 (CYRCGESGHLARECTIEATA) e che includeva il settimo zinc finger. Dall'antisiero così ottenuto, è stato prodotto un anticorpo policlonale purificato tramite cromatografia o per affinità (System, Nimes France). Dal momento che in esperimenti preliminari entrambi gli anticorpi hanno mostrato una completa specificità per l'antigene, negli esperimenti successivi è stato usato l'anticorpo HPLC-purified perchè mostrava una maggiore sensibilità.

Elettroforesi su gel e Western Blot

I tessuti di ratto sono stati omogeneizzati usando un omogeneizzatore Polytron in un medium contenente: NaCl 40mM, EGTA 2mM, $MgCl_2$ 2mM, ATP 2mM, TES 10 mM, a pH 7.4, contenente anche inibitori delle proteasi (PMSF 1mM, leupeptina 20μg/ml, aprotinina 20μg/ml, inibitore della tripsina di soia 20μg/ml). La concentrazione delle proteine è stata determinata usando il kit colorimetrico BCA di Pierce e gli estratti totali sono stati preparati per SDS-PAGE attraverso una diluizione 1:1 con buffer denaturante (glicerolo al 20%, 2-mercaptoetanolo al 3%, SDS al 4%, Tris-Cl 25 mM, pH 7.4) ed attraverso bollitura per 5 minuti. Gli omogenati (10μg/pozzetto) sono stati separati su un gel di poliacrilamide al 10% e trasferiti su nitrocellulosa (Hybond-C super, Amersham). Le analisi di Western Blot sono state eseguite secondo quando descritto in precedenza (Botta et al, 2006), usando l'anticorpo K20. Il legame dell'anticorpo primario è stato evidenziato utilizzando un anticorpo di capra anti coniglio coniugato con perossidasi di rafano (Biorad) e con il sistema di rilevazione di chemiluminescenza ECL (Pierce).

Immunocitochimica

Per il nostro studio abbiamo utilizzato biopsie di pazienti (eseguite a scopo diagnostico) che non presentavano alterazioni istologiche e/o istochimiche (n=3) e biopsie di due pazienti con diagnosi molecolare di DM2. Abbiamo altresì utilizzato sezioni di muscoli di ratto prelevate subito dopo anestesia letale.

Sezioni longitudinali e trasversali di 8 μm di spessore sono state utilizzate per studi di immunofluorescenza indiretta (IF) secondo la metodica descritta in Massa et al, 1994. In breve, dopo fissazione in acetone a 4°C per 10 minuti, le sezioni sono state incubate con anticorpo K20 (1:80), lavate in PBS ed incubate per 30 minuti con anticorpo di capra anti coniglio coniugato con FITC (Sigma, 1:50).

Al fine di confrontare la localizzazione di ZNF9 con quella di markers specifici di organelli cellulari o di componenti del citoscheletro, sono stati condotti esperimenti di doppia marcatura.

Per visualizzare l'eventuale presenza di ZNF9 nel reticolo sarcoplasmatico (SR), è stata eseguita una doppia immunofluorescenza con anticorpo anti ZNF9 ed anti calcio ATP-asi del reticolo sarcoplasmatico (SERCA1) (Biomol, 1:200). Essendo inoltre SERCA1 un marcatore specifico delle fibre rapide, abbiamo analizzato la distribuzione di ZNF9 in fibre positive e negative per SERCA1 per chiarire la diversa distribuzione di ZNF9 nei vari tipi di fibre muscolari. A tal fine, abbiamo altresì comparato sezioni seriate marcate con ZNF9 e sottoposte a reazione istoenzimatica per l'ATP-asi miofibrillare a ph 4.3.

Inoltre, per valutare la relazione esistente tra ZNF9 e le strutture sarcomeriche, sezioni longitudinali sono state marcate con anti-ZNF9 e due anticorpi che riconoscevano

l'epitopo T11 e T12 della titina (Sigma, 1:20), che sono localizzati rispettivamente a livello della giunzione A-I ed I-Z (Furst et al, 1988).

Infine, una eventuale colocalizzazione di ZNF9 con i filamenti della rete intermiofibrillare è stata studiata con esperimenti di doppia immunofluorescenza con anti-ZNF9 ed anti-desmina (Sigma, 1:200). Per evidenziare le guaine mieliniche è stato usato il colorante lipofilico $DiOC_6$ (Molecular Probes) ad una concentrazione di 1 μg/ml per 5 secondi (osservazioni personali). Una possibile localizzazione ribosomiale a livello delle fibre nervose è stata valutata mediante doppia marcatura con anti ZNF9 ed anticorpo anti proteina ribosomale S6 (Cell Signaling, 1:100).

Al fine di investigare la localizzazione di ZNF9 nel cervello, due ratti adulti Wistar, dopo anestesia profonda, sono stati perfusi per via transcardiaca utilizzando 60 ml di una soluzione salina contenente 0.05 ml di eparina, seguiti da 200 ml di paraformaldeide al 4% in soluzione salina. I cervelli sono stati rimossi e postfissati per tutta la notte a 4°C, crioprotetti in saccarosio al 10% e glicerolo al 20% in tampone fostato 0.1 M (PB) contenente sodio azide allo 0.02% per 48 ore a 4 °C (Fusco et al, 1999). I cervelli congelati sono stati tagliati con un microtomo in sezioni di 40 μm di spessore, incubate per tutta la notte con K20 (1:200), lavate in PBS e poi incubate per 90 minuti con anticorpo di capra anti coniglio coniugato con FITC (Sigma, 1:50).

Tutte le sezioni sono state montate utilizzando un montaggio anti-decadimento della fluorescenza ed esaminate e fotografate con un microscopio a fluorescenza Olympus BX51. E' stato altresì utilizzato un microscopio confocale Zeiss LSM 500 system, equipaggiato con obiettivi 40x1.00-0.5 e 100x1.3-0.6 (da immersione). Scansioni ottiche seriate, distanziate di 0.5 μm, dei campioni con doppia marcatura sono state registrate con simultanea eccitazione e rilevazione di entrambe le bande di emissione in modo da assicurare un corretto allineamento. Inoltre, è stato utilizzato un filtro ottico-

acustico per misurare e correggere un’eventuale interferenza prodotta dalla sovrapposizione dei diversi fluorofori.

Immunoelettromicroscopia

Frammenti di soleo di ratto sono stati distesi su cera e fissati in paraformaldeide al 2% in tampone sodio fosfato (PB) 0.1 M per un'ora a 4°C. Dopo numerosi lavaggi con PB 0.15 M, i campioni sono stati immersi per tutta la notte in saccarosio 2.3 M per crioprotezione, congelati in azoto liquido e sezionati con un sistema per crioultramicrotomia FC4. Sezioni ultrasottili trasversali e longitudinali sono state lavate in PB 0.1 M contenente BSA allo 0.5% (SIGMA) e glicina allo 0.15%, poi lavate ancora in PBS-BSA ed incubate con siero di capra al 5% per 30 minuti a temperatura ambiente. Quindi, i campioni sono stati incubati con anticorpo policlonale anti-ZNF9 (diluizione 1:10) per un'ora a temperatura ambiente; dopo un lavaggio con PBS-BSA, si procedeva ad incubazione con anticorpo secondario coniugato con particelle di oro colloidale di 10nm di diametro. Campioni di controllo sono stati incubati con PBS-BSA al posto dell'anticorpo primario. Dopo immunomarcatura, le sezioni sono state fissate in gluteraldeide al 2.5% in PB 0.1 M, impregnate in Epon 1/10, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo ed osservate al microscopio elettronico (Philips EM400) a 100 kV.

RISULTATI

Western blot

L'analisi degli omogenati muscolari provenienti da diversi tessuti di ratto e da muscoli umani normali ha mostrato livelli rilevabili di ZNF9 in tutti i tessuti studiati. Le figure 1 e 2 mostrano analisi di Western Blot eseguite con l'anticorpo K20, usato anche per gli esperimenti di immunofluorescenza, che riconosce in maniera specifica la porzione C-terminale di ZNF9 (Botta et al, 2006). In tutti i tessuti esaminati si può apprezzare una banda di peso molecolare di circa 19kDa, che è in accordo con il peso molecolare di ZNF9 riportato da studi di estrazione della stessa proteina da diversi tessuti (Armas et al, 2001). ZNF9 risultava espresso in maniera più elevata nel fegato, nella milza e nel cervello, ed ad un livello inferiore nel muscolo e nel cuore.

Immunocitochimica

L'immunolocalizzazione di ZNF9 era simile nel muscolo scheletrico umano e di ratto. Nelle sezioni longitudinali, si poteva osservare una bandeggiatura trasversale che con un pattern regolare si estendeva per tutta la lunghezza della fibra. Gli elementi trasversali avevano uno spessore compreso tra 0.9-1.1 μm e talora sembravano avere una struttura "a corona di rosario" (Fig. 3). Si documentava anche una disomogenea e lieve marcatura del sarcolemma. In sezioni trasversali, gli esperimenti di IF mostravano un pattern di distribuzione miofibrillare e nessuna localizzazione nucleare. L'intensità del segnale per ZNF9 risultava identica sia in fibre lente sia in fibre rapide come dimostrato da esperimenti di doppia marcatura con anticorpo anti SERCA1 (fast) o dall'analisi comparativa di sezioni seriate colorate per ATPasi miofibrillare (PH 4.3) (dati non mostrati).

Al microscopio confocale, sezioni longitudinali marcate sia con anticorpo anti ZNF9 sia con anticorpo anti SERCA1 documentavano l'esistenza di un pattern trasversale "a corona di rosario" per entrambe le proteine all'interno della stessa banda (Fig. 4). Comunque, i due antigeni mostravano una localizzazione mutuamente esclusiva o complementare all'interno della singola banda, come confermato dall'assenza di sovrapposizione del segnale nelle due immagini computerizzate sovrapposte.

In esperimenti di doppia marcatura con anticorpi anti-ZNF9 ed anti-desmina, K20 marcava chiaramente solo strutture intrinseche o strettamente associate ai sarcomeri. Se in sezioni longitudinali gli anticorpi presentavano un pattern trasversale regolare che sembrava quasi coincidere nelle immagini sovrapposte, in sezioni trasversali invece i due segnali erano ben distinti (Fig. 5).

Infine, esperimenti di doppia IF con K20 ed anticorpi anti-epitopo T11 e T12 della titina hanno dato risultati molto differenti. L'anticorpo anti T11 della titina riconosce un epitopo localizzato 0.05 μm lateralmente alla giunzione tra la banda A e la banda I, lungo i filamenti sottili (Furst et al, 1988). Nelle sezioni longitudinali, questo anticorpo mostrava un pattern composto da elementi fluorescenti trasversali che, a maggior ingrandimento, risultavano essere due bande fluorescenti con al centro una banda non colorata. Questa banda non colorata rappresenta la banda I, mentre l'intervallo tra le doppiette era occupato dalla banda A, come dimostrato da immagini che comparano IF ed immagini a contrasto di fase in miofibrille isolate (Furst et al, 1988). Quando sezioni incubate sia con anticorpo anti-ZNF9 sia con anticorpo anti-T11 sono state esaminate al microscopio confocale, le immagini sovrapposte per i due fluorocromi hanno mostrato una completa separazione della marcatura, con ZNF9 localizzato esattamente nella banda non colorata tra le "doppiette" di T11 e cioè nella banda I (Fig. 6).

Quando simili esperimenti di doppia IF venivano eseguiti utilizzando K20 ed anticorpo anti-T12, le immagini sovrapposte documentavano una colocalizzazione di ZNF9 e T12, che è un epitopo della titina che mostra una localizzazione nella banda I più vicina alla linea Z (Figura 7).

Nei muscoli dei pazienti con DM2 la localizzazione di ZNF9 era simile a quella osservata con esperimenti di IF sia nel muscolo umano normale che nel muscolo di ratto (Fig. 8).

Nelle fibre nervose intramuscolari e nelle giunzioni neuromuscolari, gli assoni e le terminazioni nervose era marcati in maniera molto intensa con l'anticorpo anti ZNF9, e l'intensità dell'immunoreazione era molto più forte rispetto a quella osservata nelle miofibrille (Fig. 9 e 10). D'altra parte, le guaine mieliniche e le cellule di Schwann non erano marcate.

Abbiamo inoltre documentato un’intensa immunopositività per ZNF9 in sezioni coronali di cervello di ratto, in particolar modo nella sostanza bianca (localizzazione assonale) e nel citoplasma di neuroni piramidali nella corteccia telencefalica. Invece, altre popolazioni neuronali, come piccoli neuroni corticali e striatali, risultavano non marcate (Fig. 11).

Immunoelettromicroscopia

La marcatura con immunogold di sezioni ultrafini di muscolo scheletrico mostrava una chiara associazione di ZNF9 con i filamenti sottili nella banda I, mentre la banda A non era marcata con le particelle di oro colloidale. Non si documentava, inoltre, nessuna marcatura dei mitocondri o di altri organelli intracellulari (Fig. 12).

DISCUSSIONE

ZNF9, in precedenza nota come proteina cellulare legante gli acidi nucleici (CNBP), presenta sette domini “zinc finger” di 14 aminoacidi. I motivi zinc finger sono presenti in numerose proteine che legano DNA o RNA (Klug & Rhodes, 1987). La funzione di molte proteine con domini zinc finger è in effetti ancora ignota, sebbene molte di esse si comportino come fattori di trascrizione oppure attivatori.

Il fatto che la sequenza aminoacidica di ZNF9 presenti un così elevato tasso di conservazione, che raggiunge il 99% quando si considera la regione codificante del cDNA del pollo, del topo, del ratto e dell’uomo, suggerisce che essa svolga un ruolo fisiologico molto importante (van Heumen et al, 1997). Dal punto di vista tessutale, l’espressione di ZNF9 risulta ubiquitaria il che indica che questa proteina potrebbe svolgere un ruolo in numerosi processi cellulari di base (Ruble & Foster, 1998). Studi di frazionamento subcellulare del fegato di ratto adulto hanno dimostrato che la proteina ZNF9 è presente nelle frazioni corrispondenti al citoplasma ed al reticolo endoplasmatico, ma non in quelle nucleari (Warden et al, 1994). Questi dati, insieme con la significativa preferenza mostrata da ZNF9 per gli acidi nucleici a catena singola rispetto a quelli a catena doppia (Rajavashisth et al, 1989), sembrano indicare una sua possibile interazione con l’RNA. Questa ipotesi è ulteriormente supportata dai dati esistenti in favore del ruolo svolto da ZNF9 nel controllo della traduzione dell’RNAm che codifica per le proteine ribosomiali (Pellizzoni et al, 1997; 1998).

I risultati della nostra analisi con Western Blot mostrano che K20 riconosce una singola banda elettroforetica di circa 19 kDa di peso molecolare in tutti i tessuti, corrispondente al peso molecolare di ZNF9. Inoltre, come già precedentemente osservato, anche nei

nostri campioni ZNF9 è espressa in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti di mammiferi, ad un livello più alto nel cervello, nel fegato e nella milza ed ad un livello più basso nel muscolo scheletrico e nel cuore.

Il nostro studio non concorda completamente con un recente studio sull'RNA che suggerisce che i livelli più alti dell'RNAm di ZNF9 siano riscontrabili nel muscolo (Chen et al, 2007). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alle differenze tessuto-specifiche nel turnover della proteina ZNF9 e nella regolazione dei processi trascrizionali.

I dati provenienti dai nostri esperimenti di immunofluorescenza sono utili nel definire la localizzazione subcellulare di ZNF9 a livello miofibrillare. Infatti, la combinazione di un pattern di distribuzione miofibrillare in sezioni trasversali e la localizzazione in bande trasversali di spessore di circa 1 μm, corrispondente a quello della banda I in condizione di semirilassamento, suggeriscono che ZNF9 sia all'interno o associata a strutture sarcomeriche. Ciò è ulteriormente confermato dagli esperimenti di doppia IF. Infatti, nel comparare la distribuzione di ZNF9 con quella di due epitopi non ripetitivi localizzati in due siti tra loro distanti nella molecola della titina, abbiamo potuto osservare due patterns molto ben distinti. La titina è una proteina sarcomerica gigante organizzata in filamenti che attraversano metà sarcomero, legando la linea M alla linea Z e rappresentando così un supporto per l'assemblaggio miofibrillare e l'allineamento dei filamenti spessi.

In microscopia elettronica, con gli anticorpi anti T11 e T12 della titina si ottiene un paio di sottili linee per sarcomero, localizzate nella banda I, a 0.05 μm di distanza dalla fine della banda A e 0.1 μm prima della linea Z, rispettivamente (Furst et al, 1998). Attraverso esperimenti di IF su miofibrille isolate si può osservare che T11 identifica doppiette che sono ai lati della banda A, mentre le linee di marcatura di T12 sono di

solito fuse in una sola banda, che è due o tre volte più spessa della α–actinina, e che, pertanto, include la linea Z (Furst et al, 1998).

L'osservazione al microscopio confocale di immagini sovrapposte di sezioni muscolari longitudinali colorate con anticorpi anti ZNF9 ed anti T11 ci ha permesso di apprezzare una netta separazione dei due segnali, con ZNF9 che si situa esattamente nell'intervallo tra le doppiette e cioè nella banda I. Invece, l'esame di immagini relative a sezioni marcate con doppia IF per ZNF9 e T12 mostrava una chiara sovrapposizione dei due segnali confermando la presenza di ZNF9 nella banda I. A supporto di questi dati di microscopia ottica giungono quelli forniti dagli esperimenti di microscopia elettronica. Le immunoparticelle di oro colloidale, infatti, si dispongono in maniera selettiva, sebbene non con alta densità, a livello dei filamenti sottili.

D'altra parte, non ci sono evidenze sperimentali in favore di una colocalizzazione di ZNF9 con organelli cellulari secondo quanto emerso dai nostri esperimenti di doppia IF con specifici marcatori. In particolar modo, il pattern di marcatura di ZNF9 nelle sezioni trasversali era chiaramente miofibrillare e non si osservava nessuna differenza tra fibre rapide (comarcate con SERCA1) e fibre lente. Nelle sezioni longitudinali, se ad un piccolo ingrandimento sembrava esistere una corrispondenza tra il pattern trasversale di ZNF9 e di SERCA1 nelle fibre rapide, ad un maggior ingrandimento i due segnali apparivano nettamente distinti.

Segnaliamo anche la presenza di una modesta e disomogenea marcatura della membrana sarcolemmale con K20, il cui significato al momento rimane ancora da chiarire.

Nel sistema nervoso centrale e periferico ZNF9 risultava presente con una elevata intensità di segnale solo nelle cellule nervose, concordando con l'alto grado di espressione della proteina mostrato dal Western Blot. Una più precisa localizzazione di

ZNF9 all'interno dei neuroni andava al di là degli scopi del nostro studio e viene, pertanto, destinata a studi futuri. Ricordiamo soltanto che è stato postulato un coinvolgimento di ZNF9 nella formazione del cervello di topo attraverso esperimenti condotti su topi knockout, ma il ruolo della proteina nell'adulto è ancora ignoto (Chen et al, 2003).

L'insieme di questi dati oltre che confermare l'espressione ubiquitaria della proteina ZNF9 consente di ipotizzare la sua associazione con altre proteine strutturali, probabilmente componenti del citoscheletro come evidenziato dalla localizzazione sarcomerica ed assonale. Un eventuale coinvolgimento di ZNF9 nei processi di interazione con l'RNA a livello di queste sedi necessita di ulteriori approfondimenti sperimentali.

Dal momento che una delle ipotesi avanzate per spiegare alcune delle differenze fenotipiche tra DM1 e DM2 è l'aploinsufficienza di ZNF9, abbiamo studiato la immunolocalizzazione di ZNF9 in campioni di muscolo provenienti da pazienti con DM2. Non abbiamo documentato alcuna differenza nella localizzazione subcellulare della proteina nei muscoli dei pazienti quando confrontati con quelli di individui sani. I nostri dati forniscono una significativa conferma della presenza di una normale espressione di ZNF9 nei muscoli dei pazienti con DM2, come già dimostrato dall'analisi quantitativa dell'espressione dell'RNAm e della proteina (dati preliminari) in tessuti e linee cellulari provenienti da pazienti (Margolis et al, 2006; Botta et al, 2006).

In conclusione, questi dati non supportano l'ipotesi di una ridotta espressione o alterata localizzazione di ZNF9 nei muscoli dei pazienti con DM2 al contrario di quanto dimostrato per l'espressione di DMPK nei muscoli dei pazienti con DM1 (Salvatori et al, 2005). Pertanto, non sembra che il meccanismo dell'aploinsufficienza possa svolgere

un ruolo patogenetico nella DM2 anche se uno studio recente condotto su topi con marcata riduzione dell'espressione dell'RNAm di ZNF9 descrive la presenza di alcune caratteristiche fenotipiche compatibili con distrofia miotonica (Chen et al, 2007).

Ulteriori studi saranno necessari per chiarire la funzione della proteina ZNF9 nel normale funzionamento della fibra muscolare scheletrica, del neurone e delle fibre nervose periferiche.

BIBLIOGRAFIA

- Alwazzan M, Newman E, Hamshere MG, Brook JD. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. Hum Mol Genet. 1999 Aug;8(8):1491-7.

- Armas P, Cabada MO, Calcaterra NB. Primary structure and developmental expression of Bufo arenarum cellular nucleic acid-binding protein: changes in subcellular localization during early embryogenesis. Dev Growth Differ. 2001 Feb;43(1):13-23.

- Berg JM. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. Science. 1986 Apr 25;232(4749):485-7.

- Berul CI, Maguire CT, Gehrmann J, Reddy S. Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. J Interv Card Electrophysiol. 2000 Jun;4(2):351-8.

- Botta A, Caldarola S, Vallo L, Bonifazi E, Fruci D, Gullotta F, Massa R, Novelli G, Loreni F. Effect of the [CCTG]n repeat expansion on ZNF9 expression in myotonic dystrophy type II (DM2). Biochim Biophys Acta. 2006 Mar;1762(3):329-34.

- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. Cell. 1992 Apr 17;69(2):385. Erratum for: Cell. 1992 Feb 21;68(4):799-808.

- Buj-Bello A, Furling D, Tronchere H, Laporte J, Lerouge T, Butler-Browne GS, Mandel JL. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. Hum Mol Genet. 2002 Sep 15;11(19):2297-307.

- Chen W, Liang Y, Deng W, Shimizu K, Ashique AM, Li E, Li YP. The zinc-finger protein CNBP is required for forebrain formation in the mouse. Development. 2003 Apr;130(7):1367-79.

- Chen W, Wang Y, Abe Y, Cheney L, Udd B, Li YP. Haploinsuffciency for Znf9 in Znf9+/- mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy. J Mol Biol. 2007 Apr 20;368(1):8-17.

- Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. Neuromuscul Disord. 2005 Jan;15(1):5-16.

- De Dominicis A, Lotti F, Pierandrei-Amaldi P, Cardinali B. cDNA cloning and developmental expression of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) gene in Xenopus laevis. Gene. 2000 Jan 4;241(1):35-43.

- Flink IL, Morkin E. Alternatively processed isoforms of cellular nucleic acid-binding protein interact with a suppressor region of the human beta-myosin heavy chain gene. J Biol Chem. 1995 Mar 24;270(12):6959-65.

- Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. Science. 1992 6;255(5049):1256-8.

- Fu YH, Friedman DL, Richards S, Pearlman JA, Gibbs RA, Pizzuti A, Ashizawa T, Perryman MB, Scarlato G, Fenwick RG Jr, et al. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. Science. 1993 Apr 9;260(5105):235-8.

- Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. J Cell Biol. 1988 May;106(5):1563-72.

- Fusco FR, Chen Q, Lamoreaux WJ, Figueredo-Cardenas G, Jiao Y, Coffman JA, Surmeier DJ, Honig MG, Carlock LR, Reiner A. Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats:lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. J Neurosci. 1999 Feb 15;19(4):1189-202.

- Harper PS. Myotonic dystrophy. London: W.B. Saunders (2001).

- Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, Jap PH, Coerwinkel M, Oerlemans F, van den Broek W, Gohlsch B, Pette D, Plomp JJ, Molenaar PC, Nederhoff MG, van Echteld CJ, Dekker M, Berns A, Hameister H, Wieringa B. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. Nat Genet. 1996 Jul;13(3):316-24.

- Junghans RP, Ebralidze A, Tiwari B. Does (CUG)n repeat in DMPK mRNA 'paint' chromosome 19 to suppress distant genes to create the diverse phenotype of myotonic dystrophy?: A new hypothesis of long-range cis autosomal inactivation. Neurogenetics. 2001 Mar;3(2):59-67.

- Klesert TR, Cho DH, Clark JI, Maylie J, Adelman J, Snider L, Yuen EC, Soriano P, Tapscott SJ. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. Nat Genet. 2000 May;25(1):105-9.

- Klug A, Rhodes D. Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1987;52:473-82.

- Liu M, Kumar KU, Pater MM, Pater A. Identification and characterization of a JC virus pentanucleotide repeat element binding protein: cellular nucleic acid binding protein. Virus Res. 1998 Nov;58(1-2):73-82.

- Mankodi A, Urbinati CR, Yuan QP, Moxley RT, Sansone V, Krym M, Henderson D,Schalling M, Swanson MS, Thornton CA. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. Hum Mol Genet. 2001 Sep 15;10(19):2165-70.

- Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. Mol Cell. 2002 Jul;10(1):35-44.

- Margolis JM, Schoser BG, Moseley ML, Day JW, Ranum LP. DM2 intronic expansions: evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression. Hum Mol Genet. 2006 Jun 1;15(11):1808-15.

- Massa R, Castellani L, Silvestri G, Sancesario G, Bernardi G. Dystrophin is not essential for the integrity of the cytoskeleton. Acta Neuropathol (Berl). 1994;87(4):377-84.

- Meola G. Myotonic dystrophies. Curr Opin Neurol. 2000 Oct;13(5):519-25.

- Michelotti EF, Tomonaga T, Krutzsch H, Levens D. Cellular nucleic acid binding protein regulates the CT element of the human c-myc protooncogene. J Biol Chem. 1995 Apr 21;270(16):9494-9.

- Novelli G, Gennarelli M, Zelano G, Pizzuti A, Fattorini C, Caskey CT, Dallapiccola B. Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle. Biochem Mol Biol Int. 1993 Feb;29(2):291-7.

- Pellizzoni L, Lotti F, Maras B, Pierandrei-Amaldi P. Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of Xenopus laevis ribosomal protein mRNAs. J Mol Biol. 1997 Mar 28;267(2):264-75.

- Pellizzoni L, Lotti F, Rutjes SA, Pierandrei-Amaldi P. Involvement of the Xenopus laevis Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. J Mol Biol. 1998 Aug 28;281(4):593-608.

- Pham YC, Man N, Lam LT, Morris GE. Localization of myotonic dystrophy protein kinase in human and rabbit tissues using a new panel of monoclonal antibodies. Hum Mol Genet. 1998 Nov;7(12):1957-65.

- Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. Science. 1998 May 1;280(5364):737-41.

- Rajavashisth TB, Taylor AK, Andalibi A, Svenson KL, Lusis AJ. Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element. Science. 1989 Aug 11;245(4918):640-3.

- Ranum LP, Rasmussen PF, Benzow KA, Koob MD, Day JW. Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. Nat Genet. 1998 Jun;19(2):196-8.

- Reddy S, Smith DB, Rich MM, Leferovich JM, Reilly P, Davis BM, Tran K, Rayburn H, Bronson R, Cros D, Balice-Gordon RJ, Housman D. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. Nat Genet. 1996 Jul;13(3):325-35.

- Ricker K, Koch MC, Lehmann-Horn F, Pongratz D, Otto M, Heine R, Moxley RT 3rd. Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. Neurology. 1994 Aug;44(8):1448-52.

- Ruble DM, Foster DN. Molecular cloning and characterization of a highly conserved chicken cellular nucleic acid binding protein cDNA. Gene. 1998 Sep 18;218(1-2):95-101.

- Salvatori S, Fanin M, Trevisan CP, Furlan S, Reddy S, Nagy JI, Angelini C. Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1. Neurol Sci. 2005 Oct;26(4):235-42.

- Sarkar PS, Appukuttan B, Han J, Ito Y, Ai C, Tsai W, Chai Y, Stout JT, Reddy S. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. Nat Genet. 2000 May;25(1):110-4.

- Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. Nat Genet. 2001 Sep;29(1):40-7.

- Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Feb 28;159(1):312-6.

- Sergeant N, Sablonniere B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Wattez A, Vermersch P, Delacourte A. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. Hum Mol Genet. 2001 Sep 15;10(19):2143-55.

- Seznec H, Agbulut O, Sergeant N, Savouret C, Ghestem A, Tabti N, Willer JC, Ourth L, Duros C, Brisson E, Fouquet C, Butler-Browne G, Delacourte A, Junien C, Gourdon G. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. Hum Mol Genet. 2001 Nov 1;10(23):2717-26.

- Timchenko LT, Timchenko NA, Caskey CT, Roberts R. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. Hum Mol Genet. 1996 Jan;5(1):115-21.

- van Heumen WR, Claxton C, Pickles JO. Sequence and tissue distribution of chicken cellular nucleic acid binding protein cDNA. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1997 Nov;118(3):659-65.

- Wansink DG, van Herpen RE, Coerwinkel-Driessen MM, Groenen PJ, Hemmings BA, Wieringa B. Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization. Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(16):5489-501.

- Warden CH, Krisans SK, Purcell-Huynh D, Leete LM, Daluiski A, Diep A, Taylor BA, Lusis AJ. Mouse cellular nucleic acid binding proteins: a highly conserved family identified by genetic mapping and sequencing. Genomics. 1994 Nov 1;24(1):14-9.