



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

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN MICROBIOLOGIA MEDICA ED  
IMMUNOLOGIA

XXI CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

**Studio delle basi genetiche e molecolari nella  
trasmissione interspecifica delle malattie da prioni.**

DR MICHELE ANGELO DI BARI

A.A. 2008/2009

Tutor: DR UMBERTO AGRIMI

Coordinatore: PROF ENRICO GARACI

## INDICE

**Definizioni**

**Abbreviazioni**

**Riassunto (italiano/inglese)**

### I - INTRODUZIONE

- 1.1 Introduzione alle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST).
- 1.2 Teorie eziologiche sulle EST.
- 1.3 La proteina prionica e il suo ruolo nella patogenesi delle EST.
  - 1.3.1 La proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>).
  - 1.3.2 La proteina prionica patologica (PrP<sup>Sc</sup>).
  - 1.3.3 Meccanismo di conversione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>.
- 1.4 Genetica delle EST.
- 1.5 I ceppi di EST.
  - 1.5.1 Caratterizzazione biologica dei ceppi.
  - 1.5.2 Caratterizzazione biochimica dei ceppi .
  - 1.5.3 Basi molecolari del fenomeno della variabilità di ceppo.
- 1.6 La barriera di specie.

### II - OBIETTIVI DELLA TESI

### III - MATERIALI E METODI

- 3.1 Materiali.
  - 3.1.1 Animali utilizzati per la sperimentazione.
    - Note introduttive al *Myodes glareolus*.
    - Note introduttive al *Microtus agrestis*
    - Note introduttive all'*Apodemus sylvaticus*
    - Note introduttive al *Peromyscus polionotus*
    - Note introduttive al *Meriones unguiculatus*
    - Allevamento e gestione delle colonie delle specie selvatiche
    - Note alle linee murine di laboratorio
    - Sequenza della PrP<sup>C</sup> delle diverse specie.
  - 3.1.2 Isolati utilizzati per la trasmissione.

- 3.2 Metodi.
  - 3.2.1 Procedure sperimentali impiegate e campionamenti.
  - 3.2.2 Analisi istologica e profilo delle lesioni.
  - 3.2.3 Analisi biochimica per la diagnosi e per la determinazione della PrP<sup>Sc</sup>.  
Determinazione qualitativa della PrP<sup>Sc</sup> mediante Western-immunoblotting.  
Determinazione della distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> nel cervello mediante PET- blot.

#### **IV - RISULTATI**

- 4.1 Studi di trasmissione in topi transgenici Tg407.
  - 4.1.1 Trasmissione primaria.
  - 4.1.2 Trasmissione dei ceppi adattati.
  - 4.1.3 Analisi del profilo delle lesioni.
  - 4.1.4 Analisi della distribuzione cerebrale della PrP<sup>Sc</sup>
  - 4.1.5 I dati di trasmissione in Tg407 suggeriscono che la PrP<sup>C</sup> della specie ricevente sia uno dei principali determinanti della suscettibilità ai prioni.
- 4.2 Trasmissione degli isolati di scrapie e BSE in diverse specie di roditori
  - 4.2.1 Trasmissione primaria dell'isolato di scrapie SS3
  - 4.2.2 Trasmissione primaria dell'isolato di BSE
  - 4.2.3 Trasmissione secondaria e successive
  - 4.2.4 L'analisi della sequenza suggerisce un ruolo rilevante delle sostituzioni Y154N e S169N nella trasmissione delle malattie da prioni.

#### **V - DISCUSSIONE**

- 5.1 La trasmissibilità delle malattie da prioni tra specie diverse è regolata dalla sequenza della PrP della specie ricevente
- 5.2 Ruolo delle sostituzioni 154 e 169 della sequenza della PrP nel modulare la trasmissione interspecifica delle malattie da prioni.
- 5.3 Conclusioni.

#### **BIBLIOGRAFIA**

##### **Ringraziamenti**

## **Definizioni:**

**Isolato:** in assenza di una definitiva caratterizzazione degli agenti delle EST si intende per isolato l'agente infettante presente nei tessuti infetti che, opportunamente omogenati, costituiscono l'inoculo. Si parla di isolato quando l'omogenato tissutale che si inocula proviene da un caso naturale di malattia non caratterizzato.

**Ceppo:** si usa parlare di ceppo quando l'agente infettante presente nel tessuto che funge da inoculo è stato caratterizzato attraverso passaggi seriali ed eventuale clonazione in una stessa specie animale da laboratorio.

**Trasmissione primaria:** si intende il passaggio di un isolato o di un ceppo di EST da una specie "donatrice" ad altra specie "ricevente".

**Trasmissione secondaria:** passaggio successivo alla trasmissione primaria in cui l'isolato o il ceppo contenuto nel tessuto cerebrale della nuova specie ospite viene trasmesso ad altro individuo della stessa specie.

## Abbreviazioni:

EST – Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili.

BSE – Encefalopatia Spongiforme Bovina.

FSE – Encefalopatia Spongiforme Felina.

CWD – Chronic Wasting Disease: Encefalopatie Spongiforme Trasmissibile dei cervidi.

MCJ – Malattia di Creutzfeldt-Jakob.

spMCJ – Malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica.

vMCJ – variante della Malattia di Creutzfeldt-Jakob.

fMCJ – Malattia di Creutzfeldt-Jakob familiare.

GSS – Malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker.

PrP<sup>C</sup> – proteina prionica cellulare.

PrP<sup>Sc</sup> - proteina prionica patologica riferita indistintamente alle EST (acronimo di “proteina prionica associata alla scrapie”).

PrP<sup>27-30</sup> o PrP<sup>res</sup> – frammento residuo ottenuto dopo parziale digestione della PrP<sup>Sc</sup> con proteinasi K.

C<sup>tm</sup>PrP – posizione C-terminale transmembrana della PrP.

SNC – Sistema Nervoso Centrale.

*PRNP* – gene che codifica per la PrP nell’uomo.

*Prnp*<sup>a,b</sup> – *Prnp*: gene che codifica per la PrP nel topo; *a,b*: le due varianti alleliche del gene murino.

*Prnp*<sup>0/0</sup> o *PrP*<sup>0/0</sup> – Genotipo murino nel quale entrambe le copie del gene della PrP sono inattivate o delete.

*Tg407* – Topo transgenico che esprime entrambe le copie del gene della PrP<sup>C</sup> di arvicola rossastra (*Myodes glareolus*).

## Riassunto

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST), o malattie da prioni, sono malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo e gli animali. Le più note tra le EST animali sono l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e la scrapie della pecora e della capra; le forme umane le più note sono la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ) e la variante della MCJ (vMCJ), legata all'epidemia di BSE.

Le EST sono caratterizzate da tempi di incubazione estremamente lunghi ed esito invariabilmente fatale. Da un punto di vista patologico le lesioni, confinate al sistema nervoso centrale (SNC), consistono in spongiosi del neuropilo, vacuolizzazione e perdita neuronale, iperplasia ed ipertrofia delle cellule gliali. Il momento patogenetico centrale comune a tutte le EST è rappresentato dalla modificazione conformazionale di una proteina cellulare denominata PrP<sup>C</sup> (proteina prionica cellulare) in una isoforma patologica denominata PrP<sup>Sc</sup>. La PrP<sup>Sc</sup>, insolubile e caratterizzata da una parziale resistenza alle proteasi, si forma in seguito ad alterazioni post-translazionali dell'isoforma cellulare e tende a depositarsi sotto forma di fibrille amiloidee nel SNC dei soggetti colpiti. Nonostante possiedano i caratteri delle malattie neurodegenerative, le EST mostrano la sorprendente proprietà di essere trasmissibili.

Obiettivo di questa tesi è stato quello di indagare i meccanismi che governano la trasmissione interspecifica delle malattie da prioni mediante l'utilizzo dell'arvicola rossastra o *Myodes glareolus*, un nuovo modello animale altamente suscettibile a diversi ceppi di EST.

In particolare, la ricerca si è posta l'obiettivo di indagare: 1) se tale suscettibilità fosse da attribuire alla sequenza della PrP dell'arvicola; 2) qualora così fosse, a quali specifici aminoacidi; 3) se tale suscettibilità si esprimesse nei confronti di tutte le malattie da prioni o fosse ceppo-dipendente. Al fine di studiare il ruolo della PrP dell'arvicola in modo indipendente rispetto ad altri possibili fattori cellulari, sono stati condotti studi di trasmissione di diversi ceppi di prione in topi transgenici esprimenti la PrP di arvicola su un background knock out. I tempi di sopravvivenza sono stati analizzati per definire le caratteristiche di trasmissione nel modello transgenico e i risultati messi a confronto con quelli ottenuti inoculando gruppi di controllo di topi wild-type e di arvicola rossastra. Lo studio ha dimostrato che i topi transgenici acquisiscono caratteristiche di suscettibilità simili a quelle dell'arvicola, suggerendo che è la sequenza della PrP il maggiore determinante di suscettibilità dell'arvicola e confermando l'assenza o l'azione minoritaria di fattori specie-specifici diversi dalla PrP.

Successivamente, al fine di verificare l'eventuale ruolo prevalente di specifici residui aminoacidici della PrP nel modulare la suscettibilità, sono state inoculate, con differenti ceppi di prione, sei diverse specie di roditori che mostrano diversi gradi di affinità filogenetica e specifici polimorfismi nella sequenza della PrP. L'analisi dei risultati suggerisce che alcuni siti polimorfici della PrP sono in grado di modulare la suscettibilità delle diverse specie ai prioni, facilitando o ostacolando la trasmissione e condizionando - nella trasmissione interspecifica - l'ampiezza della barriera di trasmissione. In particolare, le posizioni Y154N e S169N sembrano essere i principali determinanti della peculiare suscettibilità dell'arvicola e di altri roditori che condividono con essa le stesse caratteristiche nella sequenza della PrP.

Infine, i dati di trasmissione hanno indicato come una determinata sequenza della PrP non conferisce elevata o ridotta suscettibilità in termini generali. Alcuni ceppi infatti mostrano di essere trasmissibili in maniera più efficiente alla specie portatrice di una determinata sequenza della PrP piuttosto che ad un'altra, ma il contrario può accadere impiegando altri ceppi.

I risultati di questo studio hanno importanti implicazioni nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base della trasmissione delle malattie da prioni e dimostrano che la barriera di trasmissione è un fenomeno cui partecipano due componenti intimamente correlate tra loro: la sequenza della PrP della specie infettata (e, in particolare, alcune posizioni "critiche") ed il ceppo di agente.

Grazie alla elevata suscettibilità, l'arvicola rossastra (*Myodes glareolus*) si dimostra un modello di

grande interesse per lo studio delle basi molecolari della trasmissione interspecifica delle EST e per “modellare” il rischio di trasmissione dei prioni da una specie animale ad un'altra.

**Parole chiave: encefalopatie spongiformi trasmissibili, prioni, proteina prionica, barriera di trasmissione, arvicola rossastra, BSE, scrapie**

-----

## **Abstract**

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative diseases of humans and animals. They include bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and scrapie in sheep and goat. The most known human TSEs are Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and variant CJD (vCJD), that is linked to the BSE epidemic. TSEs are characterized by very long incubation periods and invariably fatal outcome. Neurodegenerative changes confined to the central nervous system (CNS) and consisting of neuronal loss, vacuolation of neurons and neuropil, and hyperplasia and hypertrophy of glial cells are the pathological characteristics of these diseases. The conformational modification of the cellular prion protein, named PrP<sub>C</sub>, into an abnormal protease-resistant isoform, named PrP<sup>Sc</sup> is the key event in TSEs pathogenesis. PrP<sup>Sc</sup> is insoluble, partially resistant to protease and it tends to aggregate into amyloid fibrils in the CNS of affected subjects. Although they have the characteristic of the neurodegenerative diseases, TSEs show the surprising property of being transmissible.

Main objective of the present thesis was to study the mechanisms of interspecies transmission of prion diseases in bank vole or *Myodes glareolus*, a new animal model highly susceptible to a variety of TSE strains from animals and humans.

The study had three different specific aims: 1) investigate whether the susceptibility of vole is imputable to its PrP sequence 2) if so, to identify amino acids residues of PrP which are potentially critical in influencing this susceptibility, 3) whether the susceptibility related to a given PrP sequence is applies to all prion diseases or it is strain-dependent.

In order to study the role of bank vole PrP amino acids sequence independently from other cellular factors, the transmission studies were conducted into transgenic mice expressing the PrP of bank vole in a PrP knock-out background.

The survival times observed in transgenic animals were compared with those obtained from control groups of voles and wild-type mice.

The results showed that transgenic mice have a similar susceptibility to voles and clearly different from wild-type mice, suggesting that the PrP sequence is the principal determinant of susceptibility of voles. This confirmed the minor or absent role of factors different from PrP.

Subsequently, with the aim to verify the role of specific amino acid variations on the PrP sequence in modulating the susceptibility of voles, we inoculated a panel of six rodent species showing various degrees of phylogenetic affinity and specific PrP sequence variations, with different TSEs. The results of this studies suggested that specific substitutions modulate the susceptibility of rodents to prion disease, also influencing the dimension of the barrier in interspecies transmission.

In comparison to mice, the susceptibility of voles is influenced by the Y154N and S169N variations on the PrP sequence..

Finally, overall results of transmission studies showed that a particular PrP sequence may confer high or reduced susceptibility depending on the prion strains involved. Some strains are transmitted more efficiently to the species with determinate PrP sequence of rather than another, but the opposite may happen using other strains. . In particular, we showed that the Y154N–S169N exchanges, which appeared to confer in vole species a high susceptibility to a given strain, had the opposite effect with another one.

These results improve the understanding of the molecular mechanisms underlying the transmission of prion diseases. Here we demonstrate that the transmission barrier is a phenomenon involving two component closely linked each other: the PrP sequence of the infected species (and, in particular, some amino acids residues) and the prion strain.

Due to its high susceptibility, the bank vole (*Myodes glareolus*) is a model of great interest for studying the molecular basis of interspecies transmission of TSEs and helpful for assessing the risk of transmission of prions from one species to another.

**Key words: Transmissible spongiform encephalopathies, prions, prion protein, transmission barrier, bank vole, BSE, scrapie**

# CAPITOLO I

## Introduzione

### 1.1 Introduzione alle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili.

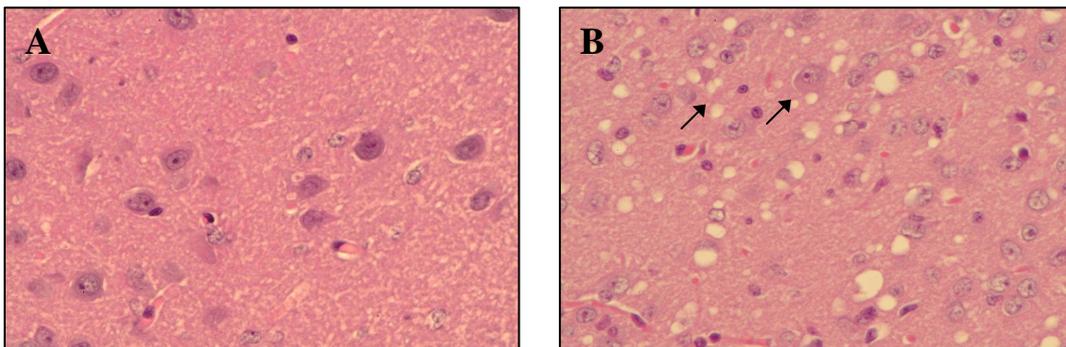
Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) o malattie da prioni, sono malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo e gli animali (Pocchiari, 1994; Agrimi *et al.*, 2003). Le più note tra le EST animali sono la BSE e la scrapie della pecora e della capra. Encefalopatie spongiformi trasmissibili sono state tuttavia descritte in numerose altre specie di mammiferi. La prima EST descritta nell'uomo è stata la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ). A queste si sono successivamente aggiunte il Kuru, patologia legata a pratiche rituali cannibaliche propria di alcune tribù della Papua Nuova Guinea ed oggi pressoché scomparsa, la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Sheinker (GSS), l'insonnia familiare fatale (IFF) ed infine, la variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) legata all'epidemia di BSE (Tabella 1).

Le EST sono caratterizzate da tempi di incubazione estremamente lunghi, da un esordio spesso subdolo e poco specifico e da un quadro clinico caratterizzato da una varietà di disturbi comportamentali e neurologici. L'esito è invariabilmente fatale. Da un punto di vista patologico, le lesioni, confinate a livello del sistema nervoso centrale (SNC) e apprezzabili solo istologicamente, consistono in spongiosi del neuropilo, vacuolizzazione e perdita neuronale, iperplasia ed ipertrofia delle cellule gliali (Fig. 1.1).

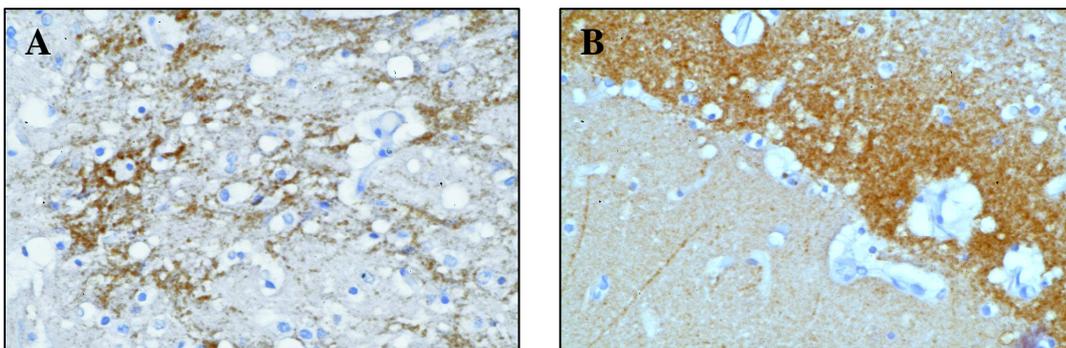
Il quadro patologico cerebrale, spesso devastante, rappresenta il risultato finale di un lungo e silenzioso processo durante il quale il resto dell'organismo sembra non attivare alcun tipo di risposta. Il momento patogenetico centrale è rappresentato dalla modificazione conformazionale di una proteina cellulare denominata PrP<sup>C</sup> (proteina prionica cellulare), in una isoforma patologica denominata PrP<sup>Sc</sup> (acronimo di “proteina prionica associata alla scrapie”) (Oesch *et al.*, 1985).

La PrP<sup>Sc</sup>, insolubile e caratterizzata da una parziale resistenza alle proteasi, si forma in seguito ad alterazioni post-translazionali dell'isoforma cellulare e tende a depositarsi sotto forma di fibrille amiloidee nel SNC dei soggetti colpiti. (Fig. 1.2)

Il quadro patologico e clinico è perciò di tipo prettamente degenerativo e non infiammatorio: non esistono manifestazioni febbrili, pleiocitosi, e non si apprezza alcun tipo di risposta immunitaria. Nonostante possiedano i caratteri delle malattie neurodegenerative, piuttosto che di quelle infettive, le EST mostrano la sorprendente proprietà di essere trasmissibili. L'inoculazione di animali da laboratorio con materiale cerebrale proveniente da soggetti malati, è infatti in grado di riprodurre sperimentalmente la malattia.



**Fig. 1.1** – Preparati istologici di cervello (nuclei del setto) di topo in cui è messa in evidenza rispetto ad un tessuto sano (A) la caratteristica degenerazione spongiforme (vedi frecce) determinata dalle EST (B).



**Fig. 1.2** – Depositi proteasi-resistenti di proteina prionica patologica (PrP<sup>EST</sup>) rilevati mediante immunisto chimica su sezioni di talamo (A) ed ippocampo (B) di topo sperimentalmente infettato con scrapie.

La trasmissibilità delle EST appare ancor più stupefacente quando si vanno ad indagare le loro basi genetiche: esistono infatti EST umane ed animali nelle quali fattori genetici, riconducibili in larga misura a polimorfismi o mutazioni del gene della PrP, si mostrano capaci di condizionare o modulare la comparsa della malattia. In campo umano alcune mutazioni sembrano presentare penetranza completa, i soggetti che ne sono portatori

sono cioè destinati, nel tempo, a sviluppare la malattia. Queste forme sembrerebbero quindi puramente genetiche; ciò nondimeno, il tessuto cerebrale dei soggetti malati, se inoculato in animali da esperimento, è in grado di trasmettere la malattia. Ci si trova perciò di fronte ad un gruppo di malattie caratterizzate dall'inedito connubio di essere genetiche e trasmissibili.

Fornire una chiave di lettura capace di dare un'interpretazione unitaria al complesso delle caratteristiche così originali e apparentemente contrastanti delle EST, ha rappresentato l'obiettivo degli studiosi per molti anni. Le ipotesi sull'origine di queste malattie e sulla natura degli agenti responsabili si sono susseguite nel tempo ed hanno dato vita ad un appassionante, e ancora non del tutto spento, dibattito scientifico.

## **1.2 Teorie eziologiche sulle EST.**

Sino agli anni '80 l'eziologia delle EST era attribuita a “virus lenti non convenzionali”, agenti dall'inusuale periodo di incubazione estremamente lungo e con una sorprendente resistenza ai trattamenti chimico-fisici adottati per l'inattivazione dell'agente eziologico.

Negli anni '90 l'ipotesi dell'esistenza di un virus quale agente infettivo aveva perduto sostegno per i ripetuti fallimenti nell'identificare un virus specifico, o anche un acido nucleico di dimensioni tali da poter codificare una piccola proteina virale (Reisner *et al.*, 1993). Parallelamente, diverse evidenze scientifiche tra cui l'esistenza di malattie da prioni umane legate a mutazioni del gene della PrP, avevano progressivamente avvalorato l'ipotesi “prionica” sviluppata da Stanley Prusiner in seguito alla scoperta delle particolari proprietà fisico-chimiche della PrP estratta da cervelli di animali affetti da EST.

Prusiner ipotizzò che la resistenza alle proteasi della PrP<sup>Sc</sup> fosse attribuibile a modificazioni della struttura tridimensionale della proteina e che tale modificazione conformazionale avesse la capacità di convertire la PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> attraverso un processo autocatalitico nel quale l'isoforma patologica fungeva da template per la PrP<sup>C</sup> inducendone la trasformazione (Prusiner, 1999). La PrP<sup>Sc</sup>, costituita da 253-257 aminoacidi a seconda della specie (Pocchiari, 1994), rappresenta perciò, secondo la teoria prionica, la molecola responsabile delle EST. Essendo una proteina dell'ospite, essa non stimola alcun tipo di risposta infiammatoria o immunitaria e la sua struttura tridimensionale, molto stabile, giustifica la resistenza a trattamenti chimico-fisici. I prioni si replicherebbero perciò

convertendo l'isoforma normale della PrP in patologica e questo semplicemente inducendo la proteina a modificare la propria conformazione (Prusiner, 1999).

La teoria prionica è avvalorata da un numero elevato di esperimenti tra cui, di particolare rilievo è la resistenza alle EST osservata in topi *knockout* per la PrP (PrP<sup>0/0</sup>) (Büeler *et al.*, 1993).

In campo umano Prusiner ipotizza che la comparsa della MCJ sporadica possa essere il risultato di mutazioni somatiche (insorte cioè in cellule somatiche e quindi non trasmissibili ereditariamente) del gene della PrP, ovvero della conversione spontanea della PrP<sup>C</sup> nella sua forma patologica (Prusiner, 1999).

**Tabella 1.1** – Le malattie da prioni dell'uomo e degli animali.

Malattia	Ospite	Origine
<b>A</b> - MCJ sporadica	uomo	Ipoteticamente conseguente a mutazione somatica del gene della PrP o a spontanea conversione della PrP <sup>C</sup> in PrP <sup>Sc</sup>
- MCJ familiare	uomo	Da mutazione del gene della PrP
- MCJ iatrogena	uomo	Infezione in seguito a trattamenti farmacologici o trapianti con materiali infetti
- MCJ variante	uomo	Alimenti contaminati dall'agente della BSE
- Kuru	uomo	Infezione da cannibalismo rituale
- Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker	uomo	Da mutazione del gene della PrP
- Insonnia Familiare Fatale	uomo	Da mutazione del gene della PrP
<b>B</b> - Scrapie	pecora e capra	Trasmissione da animale ad animale per via orizzontale e materna
- Encefalopatia Spongiforme del bovino	bovino	Alimentare da farine di carne contaminate
- Encefalopatia Spongiforme del visone	visone	Sconosciuta, probabilmente alimentare
- Encefalopatia Spongiforme dei cervidi o Chronic Wasting Disease	cervidi	Sconosciuta, probabilmente per via orizzontale
- Encefalopatia Spongiforme Felina	gatto e felini selvatici	Infezione da alimenti contaminati dall'agente della BSE

Tabella estratta da Prusiner, *et al.*, 1998, con modifiche.

Un numero ridotto di casi è infine attribuibile a modalità di trasmissione accidentale attraverso pratiche medico-chirurgiche (MCJ iatrogena). Episodi di trasmissione iatrogena sono stati descritti in seguito a trattamento con ormone della crescita e gonadotropine ipofisarie di origine estrattiva da cadavere, trapianti di dura madre e cornea, o, a causa dell'impiego di elettrodi per la stereotassi precedentemente impiegati su pazienti affetti da MCJ e non adeguatamente decontaminati (Pocchiari, 1994).

Nell'interpretare lo spettro così vario delle EST umane, Prusiner suggerisce un modello nel quale i prioni sono responsabili di malattie capaci di essere alternativamente spontanee (o sporadiche), genetiche (o familiari) o trasmissibili (naturalmente o accidentalmente). La MCJ sporadica, secondo Prusiner (1999), sarebbe quindi dovuta alla conversione spontanea della PrP<sup>C</sup>; tale conversione sarebbe facilitata dalla presenza di residui aminoacidici mutati o polimorfici in posizioni critiche e in grado di destabilizzare l'assetto conformazionale della proteina (MCJ familiare). La prima molecola di PrP trasformata sarebbe in grado a quel punto di interagire con altre molecole di PrP<sup>C</sup> inducendone il cambio conformazionale in PrP<sup>Sc</sup> e innescando il processo patologico. Nelle forme trasmissibili, infine, la PrP<sup>Sc</sup> non avrebbe un'origine endogena, ma deriverebbe da fonti esogene di infezione (MCJ iatrogena, vMCJ).

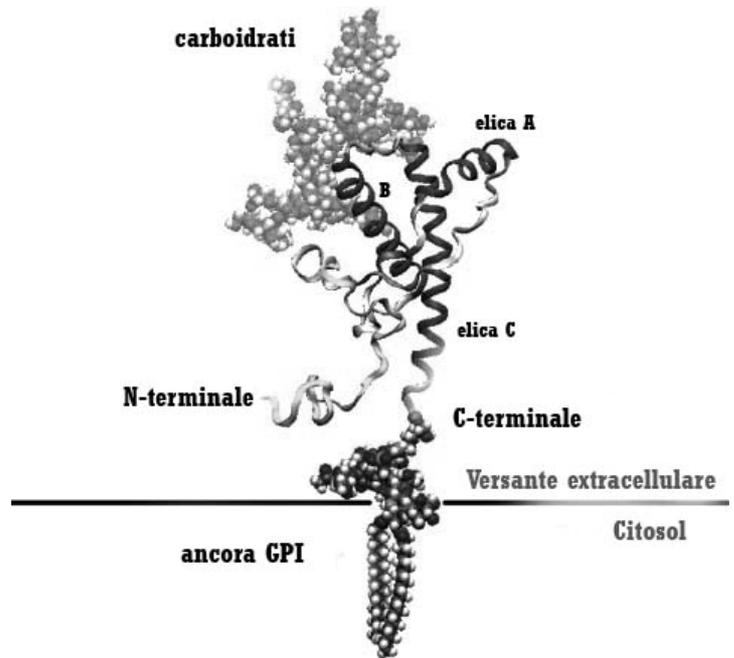
## **1.3 La proteina prionica e il suo ruolo nella patogenesi delle EST**

### **1.3.1 La proteina prionica cellulare.**

La proteina prionica cellulare, denominata anche PrP<sup>C</sup>, è una glicoproteina di membrana espressa in vari tipi cellulari inclusi neuroni, astrociti, microglia, oligodendroglia, leucociti e cellule muscolari (Hetz *et al.*, 2003). La sua espressione neuronale è predominante a livello sinaptico (Collinge *et al.* 1994; Hermes *et al.*, 1999), il che suggerisce una funzione importante nella trasmissione dell'impulso. Questa ipotesi è avvalorata dalla deficienza di alcuni parametri elettrofisiologici, soprattutto legati al potenziale al lungo termine, registrata in topi PrP<sup>0/0</sup> (*knockout* per la PrP) (Collinge *et al.*, 1994).

La PrP<sup>C</sup> è legata alla membrana da un'ancora di glicosil fosfatidilinositolo (ancora GPI) e sporge sul versante extracellulare dove può legare il rame attraverso una regione ottamerica ripetuta (Brown *et al.* 1997) (Fig. 1.3). Recenti lavori suggeriscono tra le possibili funzioni della PrP<sup>C</sup>: influenzare il sequestro del rame nel neurone, dove può essere utilizzato per i meccanismi di rilascio sinaptico (Hermes *et al.*, 1999) oppure per venire

incorporato nelle superossido dismutasi Cu/Zn. Altri dati suggeriscono che, una volta che il rame si sia legato alla PrP<sup>C</sup>, questa sia in grado di attivare le superossido dismutasi (Brown, 1999 a,b ). La struttura tridimensionale della PrP<sup>C</sup> in soluzione è stata determinata in diversi laboratori tramite tecniche di risonanza magnetica nucleare (NMR) (Gossert *et al.*, 2004 ). La molecola della PrP<sup>C</sup> possiede una porzione N-terminale (circa 100 residui) flessibile ed un dominio globulare C-terminale (circa 100 residui) (Haire *et al.*, 2004). La struttura del dominio globulare è ben conservata tra le diverse specie di mammifero analizzate, in accordo con l'alta omologia di sequenza tra le specie. La struttura del dominio C-terminale è stabilizzata da un ponte disolfuro ed è caratterizzata dalla presenza di due foglietti beta e tre alfa eliche. Alla proteina sono inoltre legati due oligosaccaridi, di cui uno all'elica B e l'altro al *loop* compreso tra la seconda e terza elica.



**Fig. 1.3** – Struttura della proteina prionica cellulare (denominata anche PrP<sup>C</sup>)

### 1.3.2 La proteina prionica patologica.

La proteina prionica patologica (PrP<sup>Sc</sup>) deriva dalla PrP<sup>C</sup> ed è identica ad essa per quanto riguarda la struttura primaria. In seguito a modificazioni post-traslazionali la PrP<sup>Sc</sup> acquisisce un più alto contenuto di foglietti beta ed un minor contenuto di alfa eliche, rispetto alla PrP<sup>C</sup>. Questa conformazione conferisce alla PrP<sup>Sc</sup> la capacità di aggregarsi in polimeri di varia misura, caratteristica che sembra essere determinante nel processo patogenetico delle EST. Accanto a queste modificazioni strutturali, la PrP<sup>Sc</sup> possiede caratteristiche biochimiche che la rendono facilmente differenziabile dalla PrP<sup>C</sup>, ed in particolare essa è insolubile in detergenti e parzialmente resistente alle proteasi. Purtroppo proprio la sua caratteristica insolubilità ha finora impedito di determinarne la struttura tridimensionale mediante NMR.

La citotossicità causata dalla PrP<sup>Sc</sup> è stata suggerita da studi recenti. Un primo esperimento effettuato su colture cellulari e topi transgenici esprimenti una forma di PrP residente nel citosol ha dimostrato la forte citotossicità di quest'ultima (Ma, Wollmann *et al.*, 2002). In un secondo esperimento è stato osservato che la PrP trasportata retrogradamente fuori del reticolo endoplasmatico produce aggregati amorfi di PrP che possiedono una parziale resistenza alle proteasi del citosol (Ma e Lindquist, 2002). L'inizio della conversione della PrP<sup>C</sup> nella forma patologica rappresenta l'accensione di una reazione autocatalitica. Ed è proprio questa la caratteristica alla base della trasmissibilità delle EST osservata in topi dopo inoculazione per diverse vie con omogenato cerebrale contenente PrP<sup>Sc</sup>.

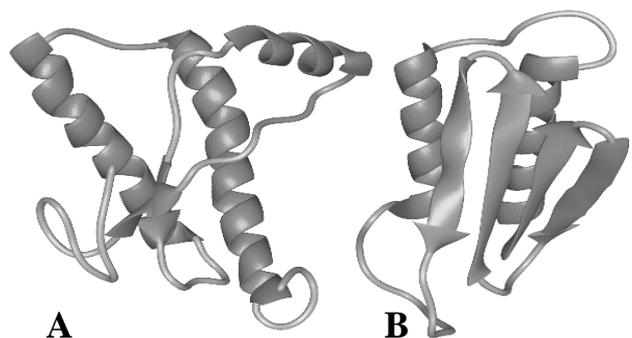
Allo stesso modo, il carattere neurotossico può essere esteso anche alla conformazione transmembrana che la PrP<sup>C</sup> può assumere in alcune malattie da prioni, in cui l'alta concentrazione di C-terminale transmembrana della PrP (C<sup>tm</sup>PrP) rappresenta la causa dell'elevata neurotossicità (Hegde *et al.*, 1998; Hegde *et al.*, 1999).

Sfortunatamente gli eventi biochimici associati alla neurotossicità indotti dall'accumulo citosolico di PrP<sup>Sc</sup> e dalla C<sup>tm</sup>PrP sono sconosciuti; certamente una maggiore comprensione di tali meccanismi potrebbe rappresentare un valido strumento per l'identificazione di procedure terapeutiche nelle malattie da prioni.

### 1.3.3 Meccanismo di conversione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>.

Per spiegare il meccanismo patogenetico delle malattie da prioni occorre ricordare che la proteina può esistere in due tipologie conformazionalmente distinte (Fig. 1.4), una che predilige la forma monomerica, la PrP<sup>C</sup>, e l'altra la forma oligomerica o multimerica, la PrP<sup>Sc</sup>. L'origine di questa distinzione può essere cinetica o termodinamica.

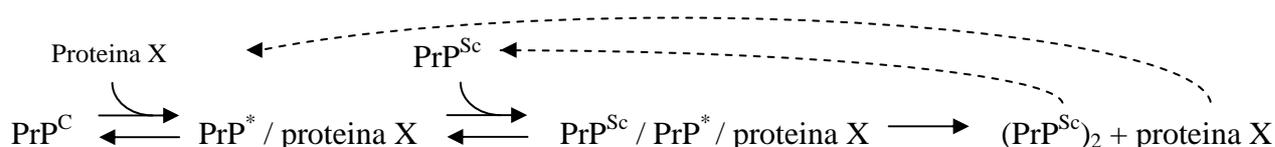
Studi di conversione *in vitro* di PrP dotata di ancora GPI rivelano che la conversione in PrP<sup>Sc</sup> è poco efficiente; tale quadro muta qualora la PrP si trovi nella forma dissociata dall'ancora-GPI (Baron *et al.*, 2002). Tale evidenza è stata confermata anche da esperimenti con PrP<sup>C</sup>



**Fig. 1.4** – Conformazione della PrP<sup>C</sup>(A) e della PrP<sup>Sc</sup>(B).

fissata a vescicole di membrana con modalità GPI-indipendente, che risulta suscettibile alla conversione della PrP<sup>Sc</sup> (Baron *et al.* 2003). Queste osservazioni non solo forniscono l'evidenza che per la conversione della PrP occorre il contesto intracellulare, ma suggeriscono anche che nel processo di infezione di nuove cellule la PrP<sup>Sc</sup> esogena deve in qualche modo essere inserita all'interno della membrana plasmatica della cellula in modo che sia consentito il contatto tra la PrP<sup>C</sup> e la PrP<sup>Sc</sup>.

E' stato ipotizzato che, in un semplice ciclo di replicazione, la PrP<sup>C</sup> esista in equilibrio con una seconda forma, la PrP\*, che rappresenta un intermedio transiente che partecipa alla formazione della PrP<sup>Sc</sup>. Il processo di infezione, che rappresentata l'ingresso della PrP<sup>Sc</sup> endogena, inizia con la formazione di un eteromultimero, PrP<sup>C</sup>/ PrP<sup>Sc</sup>, che si può convertire in omomultimero di PrP<sup>Sc</sup>. Benché alcune proteine sono conosciute come leganti la PrP, evidenze genetiche mostrano la possibilità che esista un fattore ausiliare, denominato proteina X, forse uno chaperon molecolare, necessario per catalizzare il cambiamento conformazionale della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997).



La proteina X sembra essere legata preferenzialmente alla PrP<sup>C</sup> e viene liberata solo dopo la conversione della PrP\* in PrP<sup>Sc</sup>, per essere così disponibile per formare un nuovo complesso eteromultimerico. L'omomultimero di PrP<sup>Sc</sup> che si viene poi a creare può dissociarsi per formare due nuovi eterodimeri, promuovendo in questo modo la drammatica crescita esponenziale della concentrazione di PrP<sup>Sc</sup> che si osserva nelle malattie da prioni.

## 1.4 Genetica delle EST.

L'esistenza di fattori genetici coinvolti nella modulazione della suscettibilità alle EST è nota già dagli anni sessanta. Parry agli inizi degli anni '60 considerava la scrapie come appartenente ad "una speciale categoria di disordini genetici in cui l'azione fisiologica di un gene è mediata da una particolare particella con caratteristiche proprie di auto-replicazione e patogenicità". Nei primi anni '80, l'identificazione della proteina prionica patologica come tratto costante delle EST (Diringer *et al.*, 1983, Prusiner *et al.*, 1983) e la scoperta che essa era

codificata da un gene dell'ospite (Oesch *et al.*, 1985) aprirono la strada alla comprensione della patogenesi delle malattie da prioni ed allo studio dei fattori genetici in causa. Vennero identificati polimorfismi specifici nella regione codificante del gene della PrP murina ed ovina che consentirono di spiegare la variabilità che gli studiosi avevano osservato già da tempo nella suscettibilità del topo e della pecora alla scrapie. Attualmente il ruolo determinante svolto da alcuni polimorfismi del gene della PrP nel condizionare la suscettibilità alla malattia e, in alcuni casi anche le manifestazioni clinico-patologiche, è ben dimostrata nel topo, nella pecora, nell'uomo e in alcune specie di cervidi nordamericani colpiti da un rara EST denominata encefalopatia spongiforme dei cervidi (CWD) (Prusiner, 1998).

Nel topo il gene della PrP è presente in due forme alleliche, una associata ad un tempo di incubazione breve (*prnp<sup>a</sup>*, con gli aminoacidi leucina e treonina rispettivamente ai codoni 108 e 189), l'altra ad un tempo d'incubazione lungo (*prnp<sup>b</sup>*, con gli aminoacidi fenilalanina e valina ai codoni 108 e 189) (Westaway *et al.*, 1987; Moore *et al.*, 1998; Brown *et al.* 2000).

Negli ovini alcune varianti polimorfiche del gene della PrP sono correlate ad una accentuata o ridotta suscettibilità nei confronti della scrapie (Goldmann *et al.*, 1991, Hunter *et al.*, 1994). I polimorfismi a livello dei codoni 136, 154 e 171 appaiono determinanti nel modulare la suscettibilità della specie ovina nei confronti della scrapie (Goldmann *et al.*, 1990, Goldmann *et al.*, 1991, Tranulis *et al.*, 1999; Vaccari *et al.*, 2001).

Nella specie bovina, al contrario, non sembra esistere una predisposizione genetica nei confronti della BSE legata al gene della PrP.

Il ruolo esercitato dal gene della PrP nelle EST umane appare invece particolarmente evidente ed aggiunge ulteriori elementi di riflessione. Una percentuale variabile tra il 10 ed il 15% dei casi di MCJ si verifica in forma familiare ed è legata a mutazioni del gene della PrP (indicato nell'uomo come *PRNP*). Sono numerose le mutazioni osservate nel gene *PRNP*, alcune delle quali sembrano avere penetranza pressoché completa, predisponendo il soggetto portatore a sviluppare la malattia nel corso della vita (Prusiner, 1998). Queste forme risulterebbero, perciò, puramente genetiche pur essendo, al pari delle altre, trasmissibili ad animali da laboratorio. Anche la MCJ sporadica (spMCJ), che compare con una incidenza analoga in tutto il mondo apparentemente non legata a nessun fattore di rischio, potrebbe avere un *primum movens* genetico. È stato infatti ipotizzato che possa essere causata da mutazioni somatiche del gene della PrP, ovvero dalla conversione spontanea della PrP<sup>C</sup> nella sua isoforma patologica PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1998).

La componente genetica delle EST non sembra tuttavia limitarsi al solo ruolo esercitato dal gene della PrP. Studi condotti sul topo, dimostrano come la variabilità del gene della PrP non sia in grado di spiegare completamente la diversa suscettibilità nei confronti di questa malattia. Inoculando differenti linee murine *inbred*, recanti lo stesso allele della PrP, ed i loro incroci, è stato possibile osservare un'ampia variabilità dei tempi di incubazione tra una linea e l'altra ed identificare nuove regioni genetiche ("quantitative traits loci" o QTL) localizzate su più cromosomi, coinvolte nella modulazione dei tempi di incubazione della scrapie (Lloyd *et al.*, 2001).

Il possibile coinvolgimento di altri geni nella patogenesi delle EST rappresenta un ambito di ricerca di particolare interesse e potrebbe fornire una base per spiegare, ad esempio, perché tra i tanti bovini che in un allevamento hanno condiviso gli stessi fattori di rischio alimentare solo alcuni si ammalano di BSE, ovvero perché nel Regno Unito, a fronte di una esposizione vastissima a materiale bovino contaminato, i casi segnalati di vMCJ siano al 2008, 209. (European Centre for disease Prevention and control - [http://ecdc.europa.eu/en/Health\\_Topics/vCJD/factsheet.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/Health_Topics/vCJD/factsheet.aspx)).

## **1.5 I ceppi di EST.**

Uno degli aspetti più controversi delle EST, e che meno si concilia con la supposta natura esclusivamente proteica degli agenti eziologici, è l'esistenza di ceppi diversi di agente. Sebbene la natura delle EST rimane, infatti, ancora controversa, esiste una chiara evidenza che essi siano portatori di un qualche tipo di informazione responsabile del fenotipo della malattia in un determinato ospite. L'esistenza dei ceppi è stata riconosciuta oltre 30 anni fa, quando un caso di scrapie ovina, in seguito a passaggi sperimentali ripetuti in capra, diede origine a due distinti fenotipi di malattia, l'uno nel quale prevalevano sintomi eccitativi e cutanei, l'altro nel quale prevalevano sintomi di tipo depressivo. Queste due sindromi si mantenevano costanti nei successivi passaggi su capra (Pattison e Millson, 1961). Da allora, passaggi seriali di omogenato cerebrale da casi differenti di scrapie naturale su topi *inbred* hanno portato all'isolamento di ceppi che differiscono gli uni dagli altri e mantengono costanti le loro caratteristiche quando inoculati nel topo (Bruce e Fraser, 1991).

Sino ad oggi sono stati caratterizzati nel topo oltre 20 ceppi di scrapie, ciascuno dei quali con le proprie caratteristiche cliniche e patologiche distinte e costanti (Bruce *et al.*, 1991). Il fenomeno della "variabilità di ceppo" è stato particolarmente studiato rispetto

all'agente della scrapie, ma esistono evidenze dell'esistenza di ceppi diversi dell'agente anche nel caso di altre EST, quali la MCJ (Kitamoto *et al.*, 1990) e l'encefalopatia trasmissibile del visone (Kimberlin *et al.*, 1986).

### 1.5.1 Caratterizzazione biologica dei ceppi.

Data l'apparente assenza di un genoma negli agenti delle EST, così come la mancanza di marcatori sierologici o biochimici, gli agenti delle EST vengono tradizionalmente tipizzati sulla base delle caratteristiche cliniche e patologiche della malattia indotta in topi sperimentalmente inoculati con l'isolato da caratterizzare (Fraser e Dickinson, 1968) secondo una metodologia detta di "caratterizzazione biologica". Nella caratterizzazione biologica gli isolati di EST che si intende caratterizzare sono inoculati per via intracerebrale in linee murine *inbred* e distinti mediante la misurazione del tempo di incubazione e lo studio del profilo istologico di nove aree di sostanza grigia cerebrale (Fraser e Dickinson, 1968).

Le caratteristiche fenotipiche della malattia sono condizionate sia da fattori genetici legati all'ospite, che da fattori propri dell'agente.

Inoculando il ceppo di scrapie denominato ME7 in topi con omozigoti per l'allele *prnp<sup>a</sup>* il periodo di incubazione è molto più breve rispetto a quello che si osserva in seguito all'inoculazione dello stesso ceppo in topi tipo omozigoti *prnp<sup>b</sup>*: l'allele indicato con la sigla *prnp<sup>a</sup>* è legato, quindi, a tempi di incubazione brevi. Questa non è tuttavia una regola generale, inoculando, infatti, nelle stesse linee murine il ceppo di scrapie 22A la situazione si inverte, ottenendo tempi brevi in topi omozigoti *prnp<sup>b</sup>* e lunghi in omozigoti *prnp<sup>a</sup>*.

Per la diversa efficacia di trasmissione osservata in entrambe le forme alleliche per la caratterizzazione biologica si impiegano contemporaneamente linee murine con omozigosi per l'allele *prnp<sup>a</sup>* (come ad esempio le linee C57Bl/6 ed RIII) e *prnp<sup>b</sup>* (come VM ed IInJ) ed i rispettivi eterozigoti (Di Bari *et al.*, 1999).

La caratterizzazione biologica su topo rappresenta l'unica metodica che goda di un riconoscimento da parte della comunità scientifica. Tale metodo ha tuttavia non pochi limiti. È una metodica biologica e in quanto tale soggetta alla variabilità di risposta individuale degli animali inoculati. La parte relativa allo studio del profilo delle lesioni è condizionata da fattori soggettivi legati all'esperienza e capacità dell'analista. Inoltre, le potenzialità del metodo nel discriminare differenze di ceppo, specialmente se sottili, non sono note. È una metodica indiretta e in quanto tale consente di rilevare un certo carattere solo attraverso i suoi effetti

sull'animale inoculato. I tempi lunghissimi (di superiori all'anno) necessari per la trasmissione sperimentale della malattia nel topo, ne impediscono un impiego *routinario* su vasta scala. Infine, la metodica non ha subito un processo di validazione tale da poterne definire "l'affidabilità" nell'ambito di una attività di sorveglianza.

Nonostante i limiti, la caratterizzazione biologica dei ceppi ha permesso comunque di ottenere informazioni fondamentali. Tra l'altro, ha consentito di definire l'unicità del ceppo responsabile della BSE, di distinguerlo dai numerosi responsabili delle scrapie e di attribuire all'agente della BSE la responsabilità di casi di variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (Bruce *et al.*, 1997, Hill *et al.*, 1997).

### **1.5.2 Caratterizzazione biochimica dei ceppi.**

Negli ultimi anni sono emerse importanti evidenze che attribuiscono le caratteristiche dei ceppi alla struttura tridimensionale della PrP<sup>Sc</sup>. Tale ipotesi è originata dalla studio di due ceppi di EST del visone, denominati *hyper* (HY) e *drowsy* (DY) che possono essere riprodotti serialmente in criceti (Bessen e Marsh, 1992), ed è stata ulteriormente confermata da studi sulle EST ereditarie umane in topi transgenici (Telling *et al.*, 1996). La conversione dell'isoforma cellulare della PrP nell'isoforma patologica è un processo chiave della patogenesi delle EST e l'analisi della PrP<sup>Sc</sup> sta alla base della tipizzazione biochimica di queste malattie. Le differenze conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> possono essere direttamente evidenziate tramite lo studio, dopo parziale proteolisi, della dimensione del frammento proteasi-resistente ottenuto in seguito a separazione elettroforetica (SDS-PAGE) ed immunoblotting. Il ceppo DY, ad esempio, sembra possedere una maggiore sensibilità alla proteolisi del ceppo HY, che si traduce in un *pattern* elettroforetico distinto in Western-immunoblotting dopo trattamento con proteinasi K (Bessen e Marsh, 1994). Questo dipende da differenti punti di taglio della proteinasi K ed implica diverse conformazioni della PrP<sup>Sc</sup> di HY e di DY.

La PrP può avere due glicani in due siti di N-glicosilazione: ogni singola catena polipeptidica può quindi presentarsi in forma di-glicosilata, mono-glicosilata ad uno dei due siti o non-glicosilata. Le differenze di peso molecolare di queste forme possibili e la loro quantità relativa ("profilo di glicosilazione" o "*glycoform pattern*") sono quindi ulteriori caratteristiche molecolari della PrP<sup>Sc</sup> utili alla distinzione dei diversi ceppi. Differenti profili di glicosilazione della PrP<sup>Sc</sup> sono associati a specifici ceppi di scrapie sperimentale murina

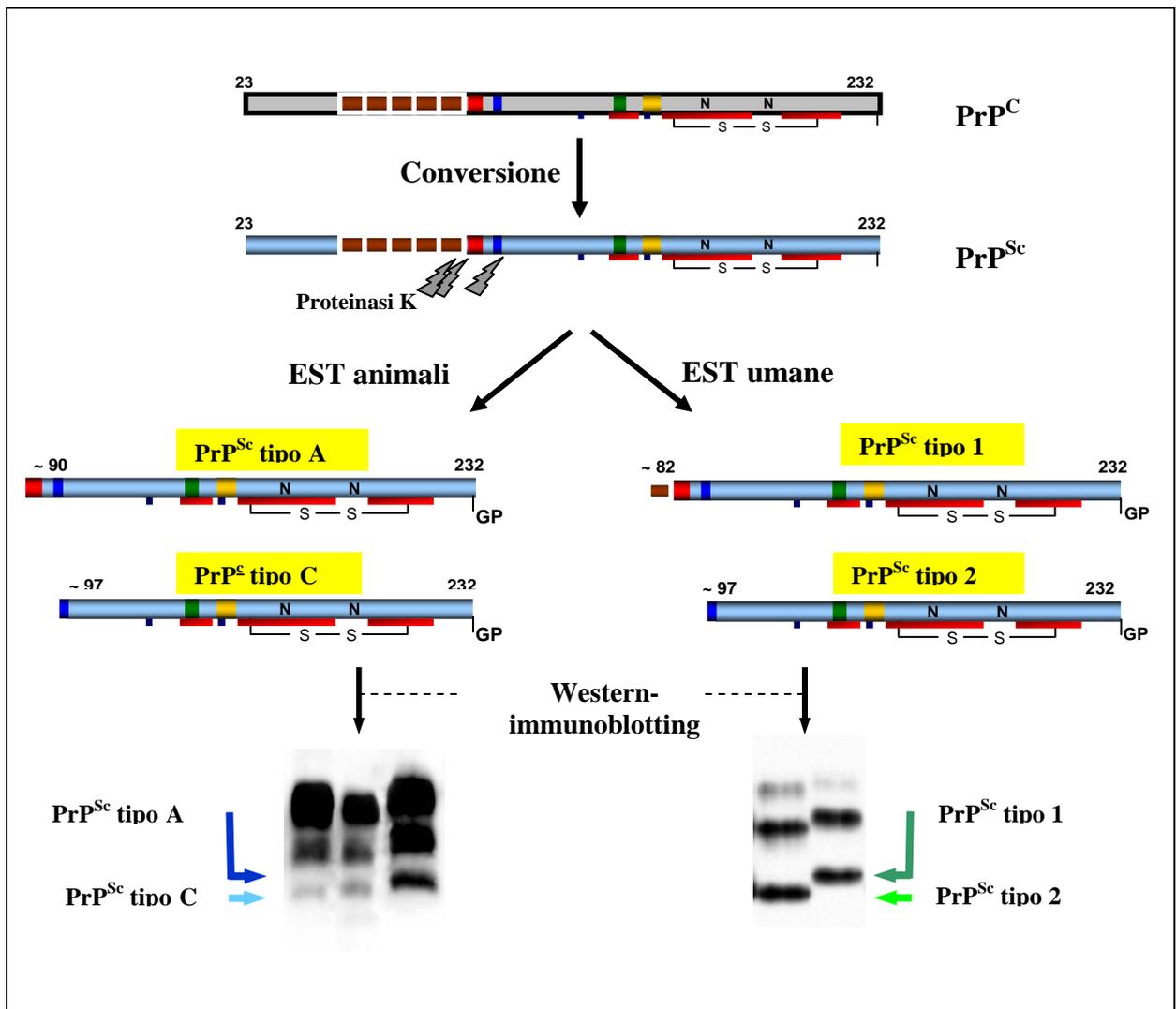
(Somerville *et al.*, 1997), così come il peso molecolare della banda non-glicosilata, assieme all'analisi delle glicoforme, permette di distinguere le differenti forme di MCJ (Collinge *et al.*, 1996) e di scrapie e BSE negli animali (Nonno *et al.*, 2003).

Le caratteristiche biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> di alcuni ceppi sembrano essere conservate anche dopo il passaggio in specie diverse, il che potrebbe permettere di utilizzare la tipizzazione biochimica per identificare l'origine di una particolare infezione (Collinge *et al.*, 1996). In particolare, la BSE sembra possedere un fenotipo ceppo-specifico molto costante in seguito a passaggio inter-specifico, tanto che le caratteristiche biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> della BSE isolata da tutte le specie sensibili, pecora compresa, sono del tutto sovrapponibili, se non identiche, tra loro (Collinge *et al.*, 1996, Hill *et al.*, 1998). I caratteri determinanti nella distinzione della PrP patologica nella BSE dalla PrP patologica nella scrapie tipica di altri ceppi sono rappresentati dal basso peso molecolare della banda non-glicosilata e dalla forte preponderanza della banda di-glicosilata rispetto alle altre. Tale fenotipo è anche caratteristico della PrP<sup>Sc</sup> nella nuova variante della MCJ, fatto che ha contribuito a sostanziare la provenienza della vMCJ dalla BSE.

In base al peso molecolare della banda non glicosilata ed al profilo di glicosilazione nel campo umano si classifica la MCJ (Parchi *et al.*, 1997; Cardone *et al.*, 1999; Gambetti *et al.*, 2003) in due fenotipi molecolari diversi: il tipo 1, in cui il dominio PK resistente ha mobilità elettroforetica di circa 21 kDa, con il dominio N-terminale che corrisponde principalmente al sito di clivaggio della PK al residuo in posizione 82; ed il fenotipo molecolare tipo 2 il cui dominio PK resistente ha mobilità elettroforetica di circa 19 kDa ed il sito di clivaggio è in posizione 97 (Fig. 1.5, in basso a destra) Le due diverse caratteristiche esprimono una differente conformazione della PrP<sup>Sc</sup> umana esprimibile come differenza di ceppo.

Per le EST animali recenti lavori (Hope *et al.*, 1999; Nonno *et al.*, 2003; Turing *et al.*, 2004) suggeriscono una classificazione dei ceppi di BSE e scrapie simile a quella impiegata per la MCJ. La nomenclatura adottata distingue due fenotipi molecolari della PrP<sup>Sc</sup>: tipo A, caratteristico della scrapie della pecora e della capra in cui il sito di clivaggio della proteasi K è stimato essere attorno al residuo in posizione 90, ed il tipo C caratteristico della BSE ed osservato in alcuni isolati di scrapie il cui sito di clivaggio è in posizione 97 (Fig. 1.5, in basso a sinistra).

Dopo la comparsa della BSE e la dimostrazione della sua patogenicità per l'uomo, diversi documenti dei comitati scientifici dell'UE hanno affrontato il problema della caratterizzazione dei ceppi delle EST animali sostenendo l'assoluta necessità di sviluppare sistemi più rapidi ed affidabili degli attuali. Già da oggi, tuttavia, le esigenze dei piani di sorveglianza stabilite dal Regolamento 999/2001/CE prevedono la necessità di effettuare studi di caratterizzazione dei ceppi di EST negli animali produttori di alimenti per l'uomo con l'obiettivo prioritario di identificare e controllare la circolazione dell'agente della BSE. Al momento attuale, perciò, l'approccio più corretto al problema è quello di integrare le informazioni ottenibili dalla caratterizzazione biologica con quelle derivanti dalla tipizzazione biochimica della PrP<sup>Sc</sup>.



**Fig. 1.5** – Rappresentazione schematizzata dei frammenti di PrP<sup>Res</sup> generati dopo trattamento della PrP<sup>Sc</sup> con proteinasi K. Nello schema viene rappresentato solo il frammento principale (al centro) e la relativa nomenclatura impiegata (in basso) (vedi testo).

### 1.5.3 Basi molecolari del fenomeno della variabilità di ceppo.

L'esistenza di ceppi diversi nelle malattie da prioni solleva la questione di come l'informazione biologica possa essere ereditata e decifrata in molecole diverse dagli acidi nucleici. L'ipotesi di una specificità conformazionale acquisita dalla PrP<sup>Sc</sup> per ogni singolo ceppo di EST sembra adeguarsi con il postulato dell'ipotesi prionica.

Vari tipi di ceppi di EST sono associati a differenze nel profilo di glicosilazione della PrP<sup>Sc</sup>, a differenze nella conformazione, al grado di proteasi-resistenza e allo stato di aggregazione (Horiuchi *et al.*, 1999). Il meccanismo mediante il quale queste caratteristiche ceppo-dipendenti della PrP<sup>Sc</sup> sono mantenute tra individui di specie ospite, in assenza di variazioni della sequenza della PrP, rimane un mistero. Comunque, reazioni di conversione *in vitro* di molecole di PrP purificate hanno dimostrato che differenti "ceppi di PrP<sup>Sc</sup>" possono imporre la loro conformazione differente ad una singola specie di PrP<sup>C</sup> non-glicosilata. Questo fornisce l'evidenza che conformazioni ceppo-specifiche di PrP<sup>Sc</sup> sono fedelmente propagate attraverso l'interazione PrP<sup>C</sup>- PrP<sup>Sc</sup>. Differenze di ceppo nella PrP<sup>Sc</sup> di topo sono anche state dimostrate *in vivo* attraverso la conversione di glicoforme differenti di PrP<sup>C</sup> a partire da pool complessi di molecole di PrP glicosilate prodotte da cellule (Vorberg e Priola, 2002). Queste osservazioni suggeriscono che la conversione in un ampio repertorio di prodotti a partire da pool di glicoforme di PrP<sup>C</sup> può essere modulata in vari siti di conversione cellulare e subcellulare di tipi diversi di cellule e compartimenti subcellulari. Appare quindi verosimile l'ipotesi secondo cui che la propagazione della forma di PrP<sup>Sc</sup> ceppo-dipendente è determinata dall'esistenza di multipli autopropaganti e forse mutuamente esclusivi in conformazione o stati di aggregazione che preferenzialmente selezionano glicoforme di PrP<sup>C</sup> derivanti da vari pool cellulari. E' possibile inoltre che alla base di questi eventi vi siano associazioni della PrP con ioni metallici o glicosamminoglicani solfatati in momenti diversi del meccanismo di selezione della PrP nei e dai diversi pool cellulari. Questa differente suscettibilità cellulare può anche determinare una diversa suscettibilità nell'effetto citotossico indotto dall'accumulo della PrP<sup>Sc</sup>, stabilendo così anche un *pattern* ceppo-dipendente riguardo le lesioni patologiche riscontrate a livello del sistema nervoso centrale (Bruce *et al.*, 1989; Caughey *et al.*, 1991; Di Bari *et al.*, 2002).

## 1.6 La barriera di specie.

I rapporti esistenti tra la PrP<sup>Sc</sup> endogena e la PrP<sup>C</sup> dell'ospite costituiscono il cardine nella trasmissione delle malattie da prioni, definendo la cosiddetta “barriera di specie” (Pattison, 1965), interpretabile come la facilitazione o l'opposizione incontrata dalla PrP<sup>Sc</sup> ad indurre un cambiamento di conformazione della PrP<sup>C</sup> nella trasmissione interspecifica. Quindi, una EST derivante da una particolare specie ospite sarebbe trasmessa con maggiore efficacia in animali di specie simile. Studi biochimici (Kocisko *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1995) dimostrano che la PrP<sup>Sc</sup> lega preferenzialmente sequenze simili della PrP<sup>C</sup>. Questi studi forniscono evidenze a supporto dell'ipotesi secondo cui le differenze tra la sequenza primaria di PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup> possono interrompere o attenuare la conversione, creando una barriera di specie.

Studi sperimentali hanno tuttavia evidenziato un'altra caratteristica determinate delle EST in cui, come la specificità di sequenza determina la barriera di specie, così una specificità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> potrebbe determinare una barriera detta “di ceppo”, estendendo l'ipotesi della differenza di sequenza alle proprietà conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> e alla possibilità di una particolare sequenza di PrP a “sagomarsi” su un determinato ceppo assumendone le proprietà conformazionali. Gli studi più significativi a supporto della barriera di ceppo hanno dimostrato l'efficiente trasmissione della BSE e della variante della Malattia di Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), a topi transgenici che esprimono la PrP bovina (Scott *et al.*, 1999) ed a topi transgenici che recano la PrP umana (Hill *et al.*, 1997). Sorprendentemente, la trasmissione delle due forme di EST risulta efficace nei transgenici con il gene bovino, indicando l'esistenza di una sorta di “predilezione” della sequenza della PrP bovina anche da parte della vMCJ che, nonostante sia originariamente umana, non si trasmette nei topi transgenici esprimenti la PrP umana.

# CAPITOLO II

## Obiettivi della tesi

Obiettivo della presente tesi è indagare i meccanismi che governano la trasmissione interspecifica delle malattie da prioni mediante l'utilizzo di un nuovo modello animale, l'arvicola rossastra (*Myodes glareolus*). Precedenti studi condotti da noi su questa specie hanno dimostrato una sua elevata suscettibilità nei confronti delle EST (Agrimi *et al.*, 1999, Nonno *et al.*, 2006; Cartoni *et al.*, 2005; Cartoni *et al.*, 2006; Zanusso *et al.*, 2007; Courageot *et al.*, 2008; Agrimi *et al.*, 2008; Di Bari *et al.*, 2008 ). L'arvicola, a differenza di tutti gli altri modelli animali disponibili, si è dimostrata infatti suscettibile alla quasi totalità dei ceppi di malattie da prioni provenienti da diverse specie animali. Tale suscettibilità si manifesta attraverso una significativa riduzione del tempo di sopravvivenza degli animali inoculati rispetto a quanto descritto nel topo da laboratorio, un intenso danno spongiotico ed un ingente accumulo dell'isoforma patologica della proteina prionica, PrP<sup>Sc</sup>. In particolare, la ricerca si è posta l'obiettivo di indagare se la straordinaria suscettibilità dell'arvicola fosse da attribuire alla sequenza della PrP<sup>C</sup> o a fattori diversi dalla PrP<sup>C</sup>. A tal fine, topi transgenici che esprimono la PrP<sup>C</sup> di arvicola su un background knock-out sono stati inoculati con diversi ceppi di EST in confronto con topi wild-type e arvicole.

Inoltre, per analizzare il potenziale ruolo di specifiche posizioni aminoacidiche della PrP<sup>C</sup> quali determinanti della suscettibilità dell'arvicola rispetto ad altre specie di roditori, è stata indagata la suscettibilità di quattro specie di roditori che mostrano diversi gradi di affinità filogenetica e specifiche variazioni nella sequenza della PrP<sup>C</sup>. Le quattro specie di roditori, topo comune (*Mus musculus*, linea C57Bl), topo selvatico (*Apodemus sylvaticus*), arvicola rossastra (*Myodes glareolus*) e arvicola agreste (*Microtus agrestis*), presentano un numero limitato di variazioni aminoacidiche nel dominio globulare della proteina e hanno consentito perciò di analizzare singolarmente il ruolo di tali variazioni nel condizionare la suscettibilità delle varie specie rispetto all'arvicola.

Tutti gli studi sono stati condotti impiegando ceppi di EST diversi. In tal modo si è inteso indagare se le conclusioni in merito al ruolo della sequenza della PrP ottenute inoculando

un determinato ceppo fossero applicabili a tutti i ceppi di EST, ovvero se i determinanti di suscettibilità dell'ospite avessero un ruolo o un effetto diverso in base al ceppo di EST in causa.

# CAPITOLO III

## Materiali e metodi

### 3.1 Materiali.

#### 3.1.1 Animali utilizzati per la sperimentazione.

Per il presente studio sono state utilizzate diverse specie derivanti da colonie generate da animali di cattura e/o acquistati presso ditte autorizzate:

- *Myodes glareolus* (Arvicola rossastra)
- *Microtus agrestis* (Arvicola agreste)
- *Apodemus sylvaticus* (Topo selvatico)
- *Meriones unguiculatus* (Gerbillo)
- *Peromyscus polionotus* (Topo costiero)
- *Mus musculus*, linea murina C57Bl/6
- Tg407: topo transgenico esprime la PrP<sup>c</sup> del *Myodes glareolus*

#### Note introduttive al *Myodes glareolus*.

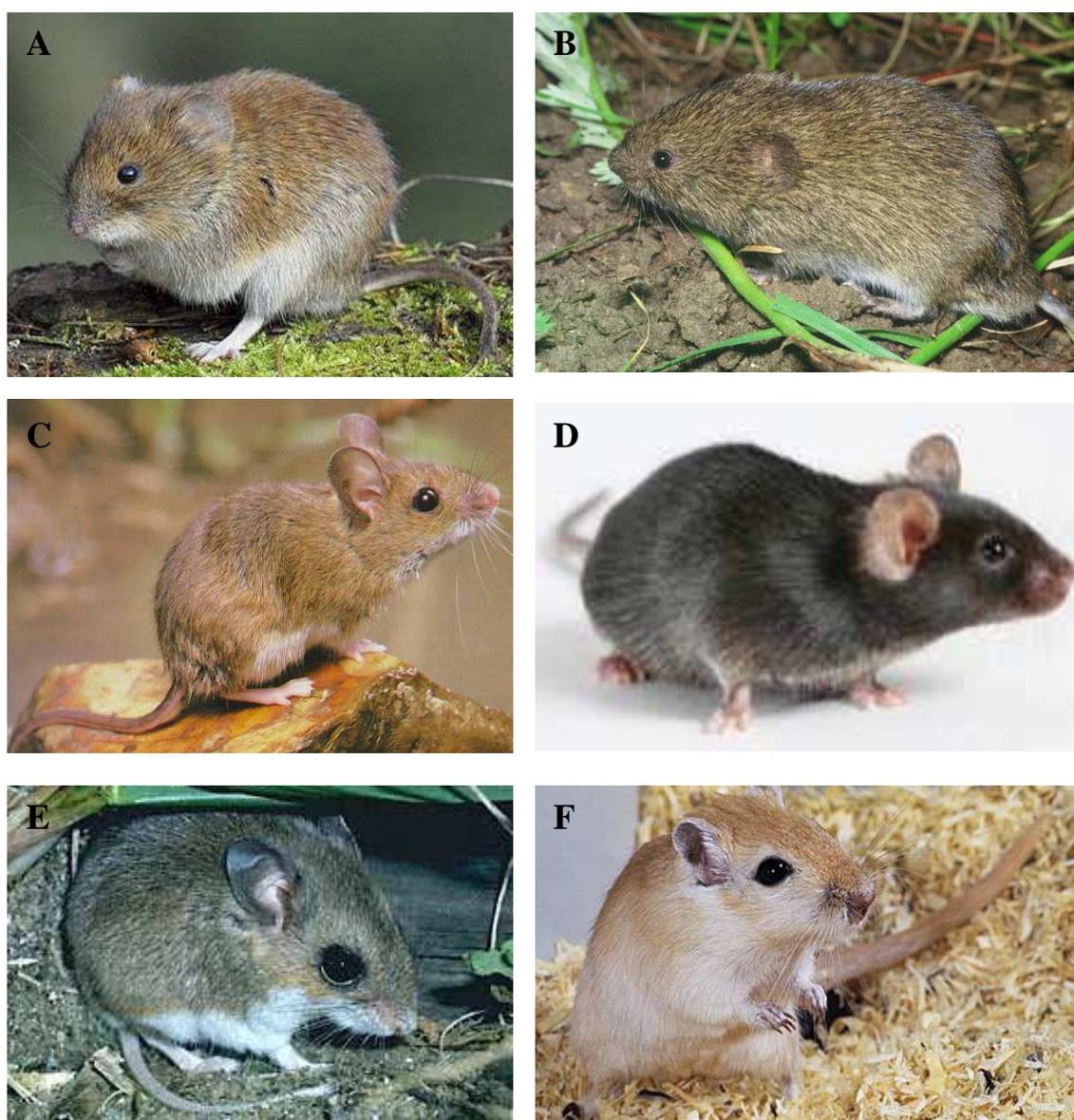
Il *Myodes glareolus* (arvicola rossastra) (Fig. 3.1.A) è un piccolo roditore della famiglia dei Cricetidae, sottofamiglia Arvicolinae (Martin *et al.* 2000) (Fig. 3.2), una specie longidiurna euroasiatica la cui distribuzione ecologica è legata agli ecosistemi forestali con fitto sottobosco e ad ecosistemi agroforestali ricchi di cespugli.

L'animale adulto raggiunge un peso di 14-25 g ed una lunghezza testa-corpo di 81-123 mm. In condizioni di laboratorio la vita media è compresa tra i due e i tre anni. Il periodo riproduttivo si colloca tra marzo ed ottobre con 3-5 nidiate per soggetto ciascuna composta mediamente da 3-6 piccoli.

### Note introduttive al *Microtus agrestis*.

Il *Microtus agrestis* (arvicola agreste) (Fig. 3.1.B) come il *M. glareolus* appartiene alla famiglia dei Cricetidae, sottofamiglia Arvicolinae (Fig. 3.2). E' una specie eurasiatica il cui areale si estende dal Portogallo sino alla Siberia ed alla Cina.

Predilige le aree erbose, con preferenza di suoli ad elevata umidità: prati, radure boschive, argini di fiumi e torbiere. L'animale adulto misura circa 8 cm di lunghezza, con peso approssimativo di circa 20 g. Gli animali adulti mostrano un caratteristico mantello bruno-arancio sul dorso; le zampe, il ventre e la gola e la parte inferiore della coda sono invece di colore biancastro.



**Fig 3.1** – Arvicola rossastra (A), arvicola agreste (B), topo selvatico (C), topo comune del ceppo murino C57Bl/6 (D), topo costiero (E) e gerbillo (F).

### **Note introduttive all'*Apodemus sylvaticus*.**

L'*Apodemus sylvaticus* (topo selvatico) (Fig. 3.1.C) è un mammifero roditore della famiglia dei Muridae (Fig. 3.2), specie molto comune ed ampiamente diffusa, nell'Europa occidentale.

Il topo selvatico ha una lunghezza totale di circa 18 cm, di cui circa la metà è rappresentata dalla coda. Il peso di un animale adulto è di circa 18-22 grammi.

La riproduzione ha inizio in marzo e prosegue fino ad ottobre, e anche durante l'inverno se questo è mite. Le punte massime si hanno in luglio ed agosto. Dopo un periodo di gestazione di 25-26 giorni, la femmina partorisce fino a 6 piccoli, ciechi, che dopo 16 giorni sono già pronti per lasciare il nido e a 21 giorni sono svezzati.

Ogni femmina può avere cinque nidiate l'anno ed i piccoli cominciano a riprodursi a cinque mesi

### **Note introduttive al *Peromyscus polionotus*.**

Il *Peromyscus polionotus* (*topo costiero*) (Fig. 3.1.E) è un roditore della famiglia dei Muridi (Fig. 3.2), che vive lungo le coste dell'Alabama, tra Ono Island e Fort Morgan.

L'habitat naturale di questo roditore è all'interno delle dune di sabbia presenti lungo la costa, si nutre di insetti e semi.

### **Note introduttive al *Meriones unguiculatus*.**

Il *Meriones unguiculatus* (Gerbillo della Mongolia) (Fig. 3.1.F) è un piccolo roditore della famiglia dei Muridae, sottofamiglia dei Gerbillinae (Fig. 3.2),.

Il gerbillo della Mongolia è originario dei territori che delimitano a nord e ad est il Deserto del Gobi, fra Mongolia e Cina. L'habitat caratteristico è caratterizzato da luoghi incolti e/o steppe. Si alimenta preferenzialmente di erbe, radici, semi e qualche insetto.

Il gerbillo è lungo 10-12 cm, con una coda altrettanto lunga e pesa circa 100 g; i maschi sono poco più grandi delle femmine.

Dagli anni 60 gli animali di questa specie vengono allevati in cattività e vengono frequentemente utilizzati nell'ambito della sperimentazione animale.

## **Allevamento e gestione delle colonie delle specie selvatiche.**

La presente sperimentazione è stata condotta su soggetti di *Myodes glareolus*, *Microtus agrestis*, *Apodemus sylvaticus* e *Peromyscus polionotus* ottenuti da allevamenti derivanti da linee inizialmente stabilite con animali di cattura. Gli animali sono stati stabulati secondo quanto suggerito dal DL 116/92 (Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116 - Attuazione della direttiva CEE n. 609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici). Alle condizioni standard sono stati aggiunti arricchimenti ambientali ed alimentari.

## **Note alle linee murine di laboratorio.**

Per il presente lavoro sono stati impiegati soggetti delle specie *M. musculus* della linea murina C57Bl/6 ed i gerbilli, acquistati presso la ditta Charles River.

Inoltre sono stati impiegati topi transgenici (Tg407) che esprimono la PrP<sup>C</sup> dell'arvicola rossastra (*Myodes glareolus*) su un background knock-out PrP<sup>0/0</sup> (Castilla *et al.*, 2003; Barron *et al.*, 2003) i cui fondatori sono stati generati nell'ambito di una collaborazione con il Dr Juan Maria Torres dell'Istituto Nacional de Investigacion Agraria di Madrid. La colonia è stata mantenuta presso l'Istituto Superiore di Sanità secondo quanto previsto dal DL 116/92 e successive integrazioni.

## **Sequenza della PrP<sup>C</sup> delle diverse specie.**

Alla PrP viene attribuito un ruolo centrale nella patogenesi delle malattie da prioni per questo motivo la sua sequenza aminoacidica può rappresentare una chiave interpretativa del processo patogenetico di conversione della PrP<sup>C</sup> nell'isoforma patologica. Le differenze nell'omologia di sequenza tra la PrP del donatore con la PrP dell'ospite sono state a lungo considerate la base della barriera di specie.

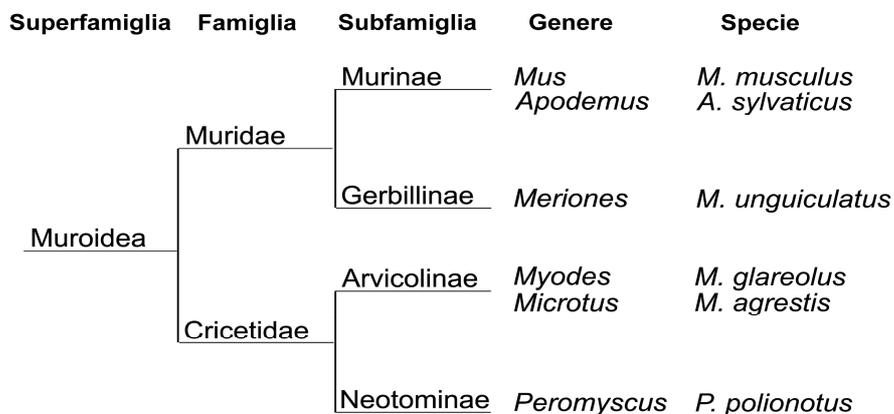
Nel presente lavoro allo scopo di verificare il contributo della sequenza nel condizionare la barriera di trasmissione abbiamo confrontato la diversa suscettibilità di specie riceventi, a seguito di inoculazione con EST animali ed umane, in correlazione con il relativo background genetico della PrP.

Nel presente lavoro sono utilizzate come riferimento le sequenze della proteina prionica depositate in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) e identificate con i seguenti numeri di accesso: topo C57Bl/6 (M18070), *Apodemus sylvaticus* (AF367623), *Myodes*

*glareolus* (AF367624) e *Microtus agrestis* (AF367625), *Peromyscus polionotus* (ABR23642) e *Meriones unguiculatus* (AAD19985).

L'analisi filogenetica (Fig. 3.2, in basso) basata sulla sequenza aminoacidica della PrP, è stata realizzata con l'ausilio del programma DNASTAR.

		20		40		
Mus musculus	MANLGYWLLA	LFVTMWTDVG	LCKKRPKPGG	WNTGGSRYPG	QGSPGGNRYP	PQ - GG 54
Apodemus sylvaticus	MANLGYWLLA	LFVTTWTDVG	LCKKRPKPGG	WNTGGSRYPG	QGSPGGNRYP	PQSGG 55
Meriones unguiculatus	MANLGYWLLA	LFVTMWTDVG	LCKKRPKPGG	WNTGGSRYPG	QGSPGGNRYP	PQGGG 55
Myodes glareolus	MANLSYWLLA	FFVTTWTDVG	LCKKRPKPGG	WNTGGSRYPG	QGSPGGNRYP	PQGGG 55
Microtus agrestis	- - - - - LLA	LFVATWTDVG	LCKKRPKPGG	WNTGGSRYPG	QGSPGGNRYP	PQGGG 48
Peromyscus polionotus	MANLGYWLLA	LFVATWTDVG	LCKKRPKPGG	WNTGGSRYPG	QGSPGGNRYP	PQGGG 55
	60		80		100	
Mus musculus	TWGQPHGGGW	GQPHGGSWGQ	PHGGSWGQPH	GGGWGQGGGT	HNQWNKPSKP	KTNLK 109
Apodemus sylvaticus	TWGQPHGGGW	GQPHGGSWGQ	PHGGSWGQPH	GGGWGQGGGT	HNQWNKPSKP	KTNLK 110
Meriones unguiculatus	-WGQPHGGGW	GQPHGGSWGQ	PHGGSWGQPH	GGGWGQGGGT	HSQWNKPSKP	KTNMK 109
Myodes glareolus	TWGQPHGGGW	GQPHGGSWGQ	PHGGSWGQPH	GGGWGQGGGT	HNQWNKPSKP	KTNMK 110
Microtus agrestis	-WGQPHGGGW	GQPHGGSWGQ	PHGGSWGQPH	GGGWSQGGGT	HNQWNKPSKP	KTNMK 102
Peromyscus polionotus	TWGQPHGGGW	GQPHGGSWGQ	PHGGSWGQPH	GGGWGQGGGT	HNQWNKPSKP	KTNMK 110
	120		140		160	
Mus musculus	HVAGAAAAGA	VVGGLGGYML	GSAMSRPMIH	FGNDWEDRY	RENMYRYPNQ	VYYRP 164
Apodemus sylvaticus	HVAGAAAAGA	VVGGLGGYML	GSAMSRPMIH	FGNDWEDRY	RENMYRYPNQ	VYYRP 165
Meriones unguiculatus	HVAGAAAAGA	VVGGLGGYML	GSAMSRPMIH	FGNDWEDRY	RENMYRYPNQ	VYYRP 164
Myodes glareolus	HVAGAAAAGA	VVGGLGGYML	GSAMSRPMIH	FGNDWEDRY	RENMYRYPNQ	VYYRP 165
Microtus agrestis	HVAGAAAAGA	VVGGLGGYML	GSAMSRPMIH	FGNDWEDRY	RENMYRYPNQ	VYYRP 157
Peromyscus polionotus	HVAGAAAAGA	VVGGLGGYML	GSAMSRPMIH	FGNDWEDRY	RENMYRYPNQ	VYYRP 165
	180		200		220	
Mus musculus	VDQYSNQNNF	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMCV	TQYQK 219
Apodemus sylvaticus	VDQYSNQNNF	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMCV	TQYQK 220
Meriones unguiculatus	VDQYSNQNNF	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMCV	TQYQK 219
Myodes glareolus	VDQYNNQNNF	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMCV	TQYQK 220
Microtus agrestis	VDQYNNQNNF	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMCV	TQYQK 212
Peromyscus polionotus	VDQYNNQNNF	VHDCVNITIK	QHTVTTTTKG	ENFTETDVKM	MERVVEQMCV	TQYQK 220
		240				
Mus musculus	ESQAYYDGRR	SSSTVLFSSP	PVILLISFLI	FLIVG		254
Apodemus sylvaticus	ESQAYYDGRR	SSA - VLFSSP	PVILLISFLI	FLIVG		254
Meriones unguiculatus	ESQAYYDGRR	SSA - VLFSSP	PVILLISFLI	FLIVG		253
Myodes glareolus	ESQAYYEGRS	SRAVLLFSSP	PVILLISF - -	- - - - -		248
Microtus agrestis	ESQAYYEGRH	SHAVVFFSSP	PVILLISF - -	- - - - -		240
Peromyscus polionotus	ESQAYYDGRR	SSA - VLFSSP	PVILL - - - - -	- - - - -		244



**Fig. 3.2** – Sequenza della PrP<sup>C</sup> delle specie di roditori utilizzate nel presente lavoro (in alto). Albero tassonomico della superfamiglia dei Muroidea in cui sono riportati i roditori inclusi nel presente studio (in basso).

### **3.1.2 Isolati utilizzati per la trasmissione.**

Per la trasmissione primaria è stato utilizzato tessuto cerebrale infetto proveniente da forme EST di pecora, bovino e uomo. Le EST animali consistevano in due casi di scrapie naturale di pecora denominati SS10 ed SS3, un caso di BSE bovina ed uno di BSE sperimentalmente trasmessa alla pecora. L'isolato umano consisteva in un caso di malattia di Creutzfeldt-Jacob sporadica (Nonno *et al* 2006). Era inoltre utilizzato un ceppo di scrapie adattato al topo C57Bl/6, denominato 139A (Dickinson, 1976)

Per gli studi di comparazione tra la linea transgenica Tg407 ed il *M. glareolus* sono stati inoltre utilizzati ceppi adattati in arvicola rossastra di scrapie naturale SS7 (Di Bari *et al.*, 2008) e BSE bovina, rispettivamente da terzo e quarto passaggio intraspecifico in arvicola.

I diversi tessuti sono stati ottenuti nell'ambito di collaborazioni esistenti tra l'Istituto Superiore di Sanità di Roma ed altri centri di ricerca europei partecipanti al progetto europeo EuroVolTe (*QLRI-CT-2002-81333*).

## **3.2 Metodi.**

### **3.2.1 Procedure sperimentali impiegate e campionamenti.**

#### Preparazione dell'inoculo

Il tessuto cerebrale infetto utilizzato per la preparazione degli inoculi è stato conservato in congelatore a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'omogenato è stato preparato al 10% p/v in tampone fosfato a pH 7,2 servendosi di provette-potter sterili monouso. Aliquote di 500  $\mu\text{l}$  dell'omogenato sono state opportunamente identificate, protocollate e conservate.

#### Anestesia degli animali da sottoporre all'inoculazione

Per ciascun isolato sono stati inoculati soggetti di età compresa tra i due ed i tre mesi. L'inoculazione è stata realizzata su animali anestetizzati per via intraperitoneale con una soluzione di Ketamina-Xilazina (10  $\mu\text{l}$  per grammo di peso vivo). Il raggiungimento di un livello sufficiente di anestesia (piano chirurgico) è stato valutato verificando la perdita dei riflessi di raddrizzamento e dei riflessi podali. Nel primo caso si osserva se l'animale posto in decubito dorsale mostra segni di ripristinare la posizione quadrupedale; il riflesso podale si valuta tramite la retrazione dell'arto dopo leggero pinzamento di un dito o dell'area interdigitale. Il raggiungimento delle condizioni di anestesia venivano ottenute mantenendo

gli animali nella propria gabbia per ridurre lo stress indotto dal succedersi delle procedure sperimentali.

#### Procedura di inoculazione

Ogni gruppo di inoculo era composto da circa 10-20 animali per le trasmissioni primarie e da circa 10-15 per le trasmissioni secondarie. Ciascun animale veniva inoculato con 20 µl di inoculo (Morton *et al.*, 2001).

L'inoculazione era eseguita con strumento stereotassico munito di siringa tipo Hamilton. Il punto di inoculo era localizzato a due millimetri dal bregma in direzione caudale lungo la scissura longitudinale, e a due millimetri da essa verso l'emisfero sinistro per procedere all'inoculazione nel caudato-putamen (Paxinos G. e Franklin K.B.J., 2001).

Il risveglio degli animali dall'anestesia era atteso collocandoli su piastra termica termostata regolata a 40°C, per evitare fenomeni di ipotermia. Secondo le procedure utilizzate presso l'ISS e secondo le disposizioni del D.L. 116/92 gli animali erano identificati con un numero di esperimento assegnato dal Servizio Qualità Sicurezza e Sperimentazione Animale (SQSSA). Il protocollo di sperimentazione era sottoposto alla valutazione del SQSSA e ad approvazione da parte del Ministero della Sanità.

Ogni animale veniva dotato di microchip elettronico sottocutaneo per l'identificazione individuale.

#### Trasmissione secondaria

Sebbene alcune importanti informazioni sulle caratteristiche biologiche dei ceppi e della barriera di specie possano essere ottenute già nel corso della trasmissione primaria, è stato effettuato il secondo passaggio per gli isolati trasmessi per far sì che il ceppo si stabilizzasse e potesse essere così adeguatamente caratterizzato. Le modalità tecniche per la realizzazione del secondo passaggio erano identiche a quelle impiegate per la trasmissione primaria, in cui però l'inoculo era preparato a partire dal tessuto cerebrale del primo soggetto del gruppo di inoculo ammalatosi nella trasmissione primaria.

#### Monitoraggio clinico degli animali inoculati

Gli animali erano controllati quotidianamente per verificarne lo stato di salute.

L'osservazione clinica era effettuata due volte a settimana, e per ogni soggetto era verificato il comportamento, la reattività agli stimoli e le funzioni motorie (Di Bari *et al.*, 2002).

### Periodo di incubazione e di sopravvivenza

Al raggiungimento dei sintomi della malattia, dopo 4 sedute consecutive di osservazioni cliniche era calcolata la durata del periodo di incubazione (l'intervallo in giorni tra l'inoculazione e un definito stadio clinico).

L'animale era sacrificato in camera a CO<sub>2</sub> al sopraggiungere dello stadio terminale della malattia o quando sopraggiungevano condizioni capaci di compromettere il benessere degli animali e tali da richiederne la soppressione. La durata del periodo di sopravvivenza era calcolata misurando l'intervallo in giorni tra l'inoculazione e la morte o il sacrificio dell'animale.

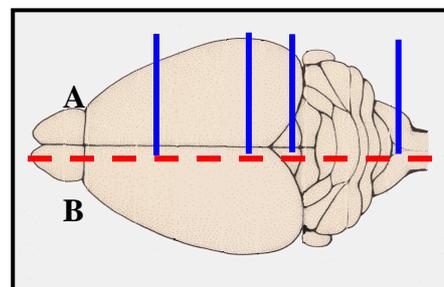
### Successo di trasmissione.

Il successo di trasmissione era calcolato su tutti gli animali risultati positivi alla diagnosi con tecnica di

Western-blot indipendentemente dalla sintomatologia osservata. Per cui erano compresi animali tutti gli animali infetti e non solo quelli risultati malati

### Prelievo dei campioni

Da ogni soggetto venuto a morte o sacrificato veniva prelevato il cervello; questo veniva quindi tagliato in due porzioni lungo un piano parasagittale distante circa 1 mm dal piano sagittale mediano (Fig 3.2, linea tratteggiata). La porzione maggiore (emiencefalo destro) era fissato in formalina tamponata, la minore veniva conservato a -80 °C per le indagini diagnostiche e per la preparazione di nuovi inoculi.



**Fig. 3.2** – Procedura di sezionamento del cervello (la linea tratteggiata indica il piano di taglio parasagittale). A) emiencefalo destro utilizzato per l'analisi istologica; B) emiencefalo sinistro utilizzato per l'analisi biochimica.

## **3.2.2 Analisi istologica e profilo delle lesioni.**

### Sezionamento del cervello dopo fissazione

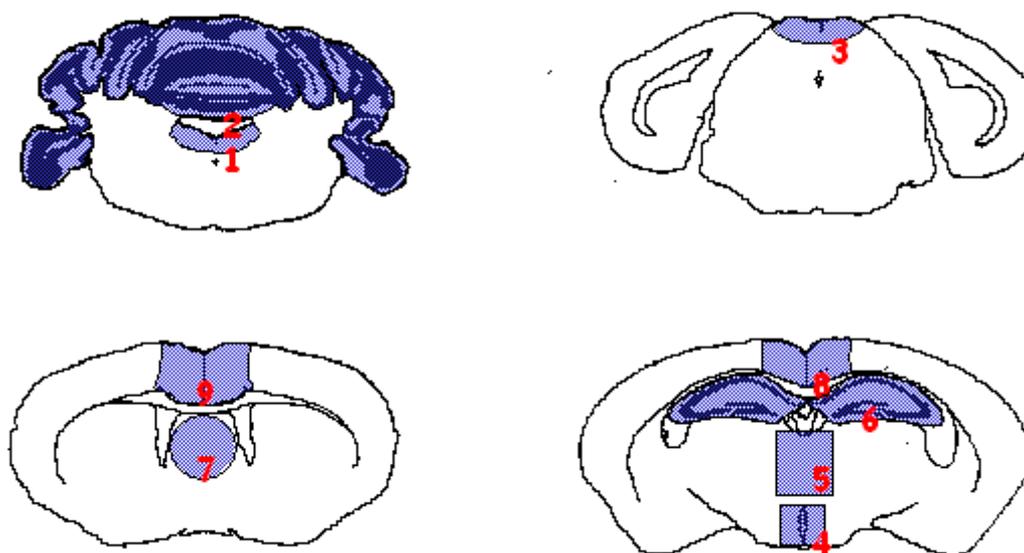
Dopo 4-5 giorni di fissazione, il cervello era sezionato su 4 piani diversi di taglio coronari a livello di specifiche aree cerebrali (figg. 3.2 e 3.3) per ottenere i livelli di sezione appropriati.

Prima dell'inclusione, i campioni erano immersi per 1 ora in una soluzione di acido formico al 98-100% al fine di abbattere l'infettività presente (Taylor, 2000; Di Bari *et al.*, 1997)

Dal tessuto incluso in paraffina erano ottenute al microtomo rotativo sezioni cerebrali di 6 µm che venivano raccolte su vetrino portaoggetti e colorate con Ematossilina di Mayer ed Eosina bluastra secondo le procedure standard adottate nei laboratori di istopatologia.

Osservazione dei preparati istologici al microscopio ottico

L'osservazione al microscopio ottico veniva effettuata su ciascuna delle 4 sezioni ottenute dal cervello di ogni singolo soggetto utilizzando un obiettivo 2x, per consentire la contemporanea visione dell'intero preparato. Ciascuna sezione era quindi analizzata utilizzando ingrandimenti superiori, 10x, 20x e 40x..



**Fig. 3.3** – Sezioni di cervello selezionate per la lettura del profilo delle lesioni con relative aree di sostanza grigia (vedi testo).

Per ciascun animale era dapprima diagnosticata l'avvenuta trasmissione della malattia verificando la presenza delle caratteristiche lesioni rappresentate da degenerazione vacuolare del neuropilo e comparsa di vacuoli otticamente vuoti nei corpi neuronali (spongiosi).

Le aree cerebrali analizzate per il profilo istolesivo erano rappresentate per 9 regioni di sostanza grigia: corteccia cingolata anteriore e adiacente corteccia motoria, corteccia retrospleniale e adiacente corteccia motoria, setto, ippocampo, talamo, ipotalamo, collicolo anteriore, midollo allungato, corteccia cerebellare. A ciascuna area cerebrale di sostanza grigia veniva attribuito un punteggio crescente da 0 a 5, in funzione della gravità della spongiosi osservata: 0, assenza di lesioni; 1, pochi vacuoli, ampiamente e irregolarmente

sparsi; 2, alcuni vacuoli uniformemente distribuiti; 3, moderato numero di vacuoli uniformemente distribuiti; 4, molti vacuoli, alcuni confluenti; 5, vacuolizzazione densa con molti vacuoli confluenti (Fraser e Dickinson, 1968).

#### Rappresentazione grafica dei risultati (profilo lesivo)

Per ciascun gruppo di inoculo era calcolata la media relativa al punteggio di ognuna delle nove aree cerebrali esaminate riportando graficamente sull'asse delle ascisse il numero corrispondente dell'area cerebrale (secondo l'ordine sopra indicato) e sull'asse delle ordinate la media del punteggio ottenuto per ciascuna di esse; la linea spezzata che ne derivava era indicata con il termine di "profilo lesivo". I profili lesivi relativi a ciascun gruppo di inoculo forniscono, nel loro complesso, una indicazione indiretta delle caratteristiche biologiche del ceppo di agente responsabile del caso di EST in questione.

Sebbene come nel caso della BSE le caratteristiche biologiche del ceppo siano spesso tali da consentire la distinzione ed identificazione del ceppo già in trasmissione primaria (Bruce *et al.*, 1997), generalmente si effettua un secondo passaggio intraspecifico per far sì che il ceppo si stabilizzi nel nuovo ospite e possa essere adeguatamente caratterizzato.

### **3.2.3 Analisi biochimica per la diagnosi e per la determinazione della PrP<sup>Sc</sup>.**

#### **Determinazione qualitativa della PrP<sup>Sc</sup> mediante Western-blotting.**

Il tessuto cerebrale di ciascun animale inoculato a seguito del sacrificio o della morte è stato esaminato mediante tecnica di Western-blotting per la determinazione quantitativa e qualitativa della PrP<sup>Sc</sup>.

#### Preparazione del tessuto

Ciascun campione di tessuto cerebrale era pesato ed omogenato al 10% (peso/volume) in soluzione tampone contenente il 2% di sarcosyl. L'omogenato era incubato per 20 minuti a temperatura ambiente e quindi centrifugato. Per eseguire la digestione di residui proteici indesiderati e avvalendosi della parziale resistenza alla protelisi caratteristica della PrP<sup>Sc</sup>, all'omogenato era addizionata una soluzione di proteinasi K fino ad una concentrazione finale di 50 µg/ml e quindi incubato per un'ora a 37°C. Il trattamento proteolitico veniva arrestato con fenilmetilsulfonil fluorato (PMSF), ed il campione veniva denaturato in tampone per l'elettroforesi (NU-PAGE: 125mM di Tris-HCl, 10% glicerolo, 2% litio dodecil solfato, 0,5 mM EDTA).

### Deglicosilazione

Tre  $\mu\text{l}$  di campione denaturato erano diluiti in 30  $\mu\text{l}$  di tampone fosfato salino contenente 0,8% di Nonidet P40 e 40 U di N-glicosidasi F per ml, e incubato per 2 ore a 37°C. Aliquote della soluzione erano diluite in tampone denaturante e scaldate a 95°C per 10 minuti e analizzate con Western-blotting.

### Western- immunoblotting

I campioni disciolti in tampone NU-PAGE erano centrifugati in microcentrifuga a 12,000 rpm per 5 minuti. Dieci  $\mu\text{l}$  di supernatante erano caricati in gel al 12% di bis-tris poliacrilamide. Su ogni gel veniva inoltre caricato un controllo positivo ed uno negativo. Il primo era rappresentato dal cervello di *M. glareolus* infettati con il ceppo di scrapie sperimentale murina denominato ME7; il secondo da cervello di *M. glareolus* sano. L'elettroforesi era impostata a 200V per 40 minuti ed il Western-blotting era eseguito su membrana di polyvinylidene difluoride a 100 mA per 40 minuti in apparato semidry blotting (Trans Blot).

I blot erano poi bloccati in tampone fosfato contenente 0,1% di Tween 20 e il 5% di latte parzialmente scremato in polvere per un'ora. La presenza della PrP<sup>Sc</sup> era determinata con l'anticorpo monoclonale SAF84 che lega l'epitopo 163-173 della PrP<sup>C</sup> ovina (incubazione per un'ora a temperatura ambiente). Le membrane erano poi incubate con l'anticorpo secondario anti-IgG murina (1:80,000) per un'ora a temperatura ambiente. Le membrane erano infine sviluppate con metodo in chemiluminescenza ECL. Il segnale veniva visualizzato mediante un rivelatore di chemiluminescenza digitale (VersaDoc, BioRad).

## **Determinazione della distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> nel cervello mediante PET-blot.**

Mediante la tecnica del Paraffin Embedded Tissue Blot (PET-Blot) (Schulz-Schaeffer *et al.* 2000) è possibile evidenziare su sezioni ottenute da tessuti inclusi in paraffina, la presenza di depositi di PrP<sup>Sc</sup>. In particolare l'applicazione della tecnica su sezioni di cervello permette di evidenziare le aree neuro anatomiche di accumulo dell'isoforma patologica e il suo pattern di deposizione.

Sezioni di cervello incluso in paraffina erano tagliate a 7  $\mu\text{m}$  e raccolte su membrane alla nitrocellulosa con pori di 0,45  $\mu\text{m}$  e quindi lasciate asciugare per almeno 48 ore a 37°C.

Le membrane erano sparaffinate con xilolo e di seguito erano idratate tramite immersione in una catena discendente di alcool isoprilico. Erano poi immerse in soluzione tampone Tris-HCl addizionata di tween 20 in concentrazione dello 0,1 %. Per la digestione della PrP<sup>C</sup> e al fine di effettuare lo smascheramento dei siti antigenici della PrP<sup>Sc</sup>, le membrane erano immerse in una soluzione di proteinasi K 50 µg/ml e quindi incubate per tutta la notte a 55°C. (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8; 100 mmol/L NaCl; 0.1% Tween 20). Con questo step le proteine venivano fissate alla membrana. Dopo lavaggio della membrana con TBST le proteine sulla membrana venivano denaturate con guanidina isotiocianato 3 mol/L in TBST per 10 min. La guanidina era lavata via e l'immuno-rivelazione era effettuata dopo preincubazione con soluzione di bloccaggio (latte in polvere 2% in TBST) per 30 min. La presenza di PrP<sup>Sc</sup> era evidenziata con anticorpo primario SAF84 (vedi sopra) per un'ora e di seguito le membrane erano trattate con soluzione contenente anticorpo secondario anti-topo coniugato con fosfatasi alcalina per un'ora. Dopo cinque sciacqui con TBST le membrane erano portate a pH alcalino con incubazione in due tempi da 5 min. in NTM (100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5; 100 mmol/L NaCl; 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>). La visualizzazione dell'avvenuta reazione dell'anticorpo era effettuata con NBT/BCIP. I blot così ottenuti erano valutati con microscopio stereoscopico da dissezione.

# CAPITOLO IV

## Risultati

### 4.1 Studi di trasmissione in topi transgenici Tg407

Al fine di indagare se l'alta suscettibilità dell'arvicola alle EST potesse essere attribuita alla sequenza della PrP<sup>C</sup> sono stati inoculati, con diversi isolati di prioni, topi transgenici (Tg407) che esprimono la PrP<sup>C</sup> dell'arvicola rossastra su un background knock-out PrP<sup>0/0</sup>. I livelli di espressione della PrP<sup>C</sup> di tale linea murina sono sovrapponibili a quelli dell'arvicola o delle linee murine wild-type, consentendo perciò un diretto confronto tra i vari modelli.

I topi Tg407 sono stati inoculati con un isolato di scrapie naturale ovina, uno di BSE ovina sperimentale e con un caso di MCJ sporadica. Inoltre, i Tg407 sono stati inoculati con ceppi di scrapie e BSE già adattati all'arvicola a seguito, rispettivamente, di tre e quattro passaggi intraspecifici. In questo modo si è inteso valutare la suscettibilità dei Tg407 sia nei confronti di isolati di prioni provenienti da specie diverse (nel caso specifico, pecora e uomo), sia provenienti dall'arvicola (ceppi di scrapie e BSE adattati). Le trasmissioni sono state perciò realizzate sia in condizioni di diversità di sequenza della PrP, sia in condizione di piena omologia. Per ogni EST sono stati inoculati per confronto gruppi di topi wild-type e di arvicola rossastra.

#### 4.1.1 Trasmissione primaria

I topi Tg407 hanno mostrato un'elevata suscettibilità alla scrapie ovina, con tempi di sopravvivenza di 169±45 giorni, del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti inoculando l'arvicola con il medesimo isolato (172±16) (Tab.4.1). In entrambe le specie il successo di trasmissione è stato del 100%. Sintomi comuni osservabili in tutti gli animali malati erano: incoordinazione motoria, soprattutto a carico del treno posteriore, lentezza dei movimenti e cifosi dorsale. Le arvicole mostravano inoltre una tendenza ad alzare ripetutamente il muso

Isolato	Specie “donatrice“	Tg407			Arvicola rossastra			Topo wild-type		
		Tempo di sopravv. (giorni±dev.st.)	Clinici positivi / totale	Efficienza di trasm. (%)	Tempo di sopravv. (giorni±dev.st.)	Clinici positivi / totale	Efficienza di trasm. (%).	Tempo di sopravv. (giorni±dev.st.)	Clinici positivi / totale	Efficienza di trasm. (%).
Scrapie naturale (SS10)	Pecora	169±45	12/12	100	172±16	11/11	100	632	0/11	9
BSE ovina sperimentale	Pecora	415±95	3/13	48	571±171	4/14	43	285±38	12/12	100
MCJ (M129M)	Uomo	272±51	8/8	100	188±22	16/16	100	561±146	0/13	43
Scrapie SS7 adattata ad arvicola	Arvicola rossastra	98±14	7/7	100	94±3	8/8	100			
BSE adattata ad arvicola	Arvicola rossastra	108±4	7/7	100	74±3	10/10	100			

**Tab. 4.1.** Tempi di sopravvivenza ed efficienza di trasmissione (n. positivi/n. inoculati) osservati in topo Tg407, arvicola rossastra e topo *wild-type* inoculati con scrapie, BSE, MCJ e con due isolati di prione (scrapie e BSE) adattati all’arvicola.

° Il tempo di sopravvivenza e l’efficienza di trasmissione erano calcolati solo per gli animali che mostravano accumulo di PrP<sup>Sc</sup>.

iperestendendo il collo, come “a fiutare l’aria”, un sintomo probabilmente causato da cecità indotta dalla malattia. Infatti, lesioni alle vie visive erano state successivamente confermate dall’esame istopatologico che mostrava una grave spongiosi e perdita neuronale a livello dei collicoli superiori, dei nuclei genicolati laterali e delle cortecce visive primaria e secondaria.

I Tg407 e le arvicole inoculate con la BSE ovina sperimentale hanno mostrato tempi di sopravvivenza particolarmente lunghi e variabili, compresi tra 400 e 600 giorni, con un successo di trasmissione rispettivamente del 48 e del 43% (Tab. 4.1). Clinicamente, pochi animali, tra i gruppi di arvicola e di Tg407, hanno mostrato segni neurologici evidenti, rappresentati da lieve atassia a carico del treno posteriore e cifosi.. La maggior parte degli animali sono stati sacrificati dopo comparsa di una sintomatologia subdola per lo più rappresentata da lieve deficienza motoria e dimagrimento.

La trasmissione della MCJ sporadica è stata pienamente efficiente (100%) sia nell’arvicola che nei Tg407, sebbene con tempi di sopravvivenza diversi tra le due specie (Tab.4.1). La sintomatologia era caratterizzata nelle due specie da letargia accompagnata da cifosi e atassia. Caratteristica comune ai due gruppi era una progressivo dimagrimento.

Il confronto di questi risultati con quelli ottenuti inoculando i topi wild-type con gli stessi isolati di scrapie, BSE ovina e MCJ, hanno mostrato una analogia molto più marcata tra arvicola e Tg407 piuttosto che tra Tg407 e topi wild-type, sia in termini di tempi di sopravvivenza che di efficienza di trasmissione (Tab. 4.1). Anche la trasmissione della MCJ, sebbene abbia fornito tempi di sopravvivenza diversi tra arvicola e Tg407 ha evidenziato come le differenze fossero ancora più marcate tra Tg407 e topi wild-type.

### **4.1.2 Trasmissione dei ceppi adattati.**

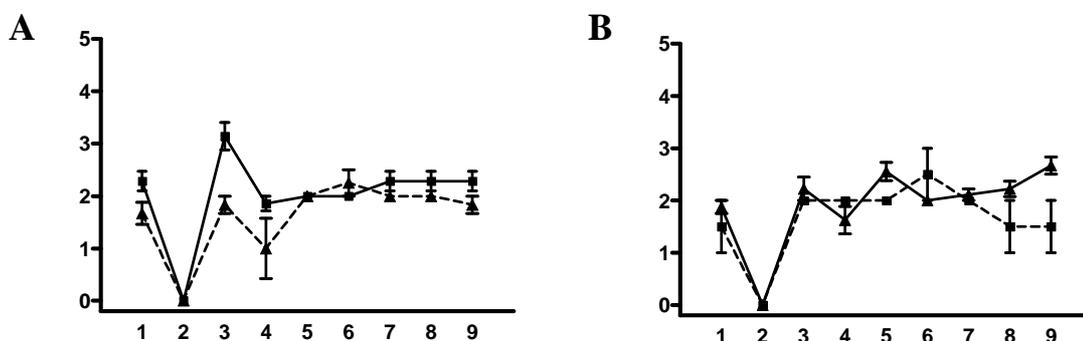
L’inoculazione della scrapie adattata all’arvicola in Tg407 ha mostrato tempi di sopravvivenza ed efficienza di trasmissione identici a quanto osservato nel gruppo di arvicole di controllo (Tab. 4.1). Anche la sintomatologia appariva analoga tra le due specie e simile a quanto osservato in seguito alla trasmissione primaria della scrapie ovina SS10 (vedi sopra).

Anche la trasmissione della BSE adattata all’arvicola si è rivelata nei Tg407 pienamente efficiente sebbene i tempi di sopravvivenza mostravano una certa differenza tra il modello transgenico ed il gruppo di controllo (Tab.4.1).

### 4.1.3 Analisi del profilo delle lesioni.

Nelle malattie da prioni, l'analisi della distribuzione ed entità della degenerazione spongiforme cerebrale costituisce uno dei parametri utili a caratterizzare il fenotipo della malattia. Il profilo neurolesivo, sviluppato nel 1968 dai ricercatori dell'Institute for Animal Health di Edinburgo (Fraser e Dickinson, 1968), è una rappresentazione grafica semplificata e standardizzata del danno spongiotico in 9 aree cerebrali rappresentative (vedi Materiali e Metodi).

Il fenotipo neuropatologico dei ceppi adattati di scrapie e BSE trasmessi al Tg407 e al *M. glareolus*, è stato analizzato impiegando tale metodologia.

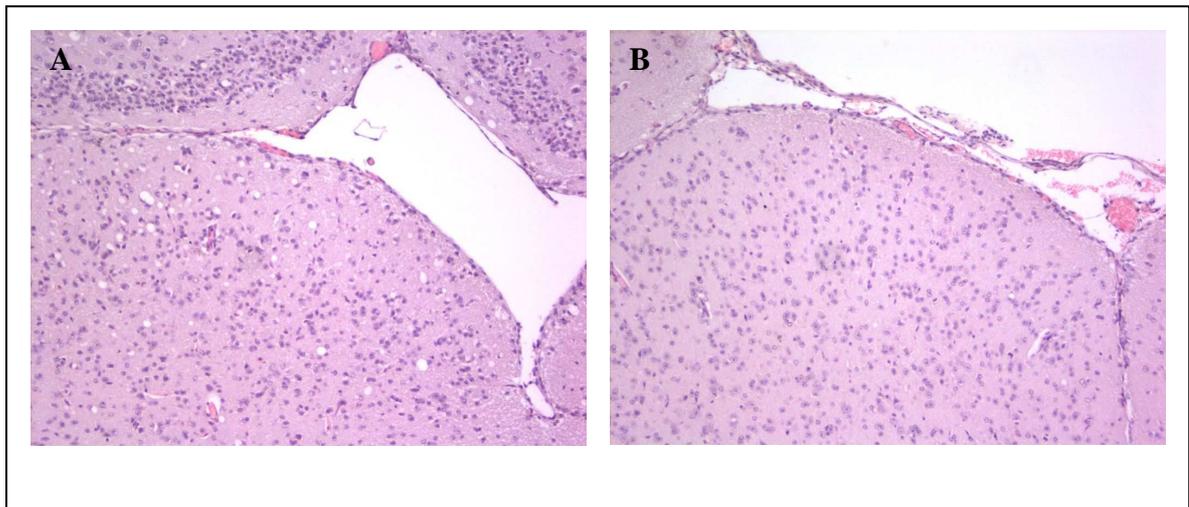


**Tab. 4.1.** - Profilo delle lesioni in Tg407 (linea tratteggiata) in confronto con *M. glareolus* (linea continua) ottenuti da trasmissioni primaria di: A) scrapie SS7; B) BSE sperimentale in pecora.

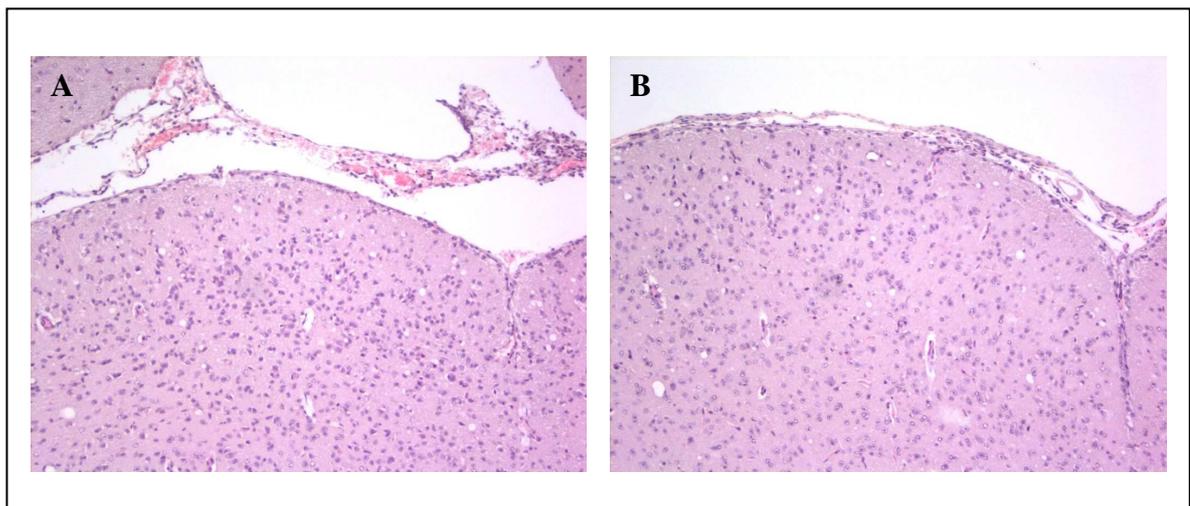
(In ascissa viene riportato il numero di ciascuna delle nove aree di sostanza grigia esaminata: 1, midollo allungato; 2, corteccia cerebellare; 3, collicolo superiore; 4, ipotalamo; 5, talamo; 6, ippocampo; 7, nuclei del setto; 8, corteccia cingolata posteriore ed adiacente corteccia motoria; 9, corteccia cingolata anteriore. Mentre in ordinata viene indicata la media del punteggio ottenuto per ciascuna area esaminata secondo una scala da 0 a 5 che esprime la gravità della lesione).

Il profilo delle lesioni ottenuto nelle arvicole inoculate con il ceppo sperimentale di scrapie (fig. 4.1.A – linea continua) mostrava un coinvolgimento omogeneo delle aree corticali e sottocorticali anteriori (ipotalamo, talamo, ippocampo e setto) con particolare e grave compromissione del collicolo superiore. La corteccia cerebellare risultava invece conservata. Il profilo delle lesioni dei topi Tg407 inoculati con la scrapie (fig. 4.1.A – linea tratteggiata) mostrava un andamento simile a quello dell'arvicola, ma con una riduzione dell'entità delle lesioni spongiotiche a livello del collicolo superiore (fig. 4.2) ed un interessamento variabile dell'ipotalamo.

Il danno spongiotico osservato nei Tg407 (fig. 4.1.B - linea tratteggiata) inoculati con il ceppo di BSE era simile a quello osservato nell'arvicola (fig. 4.1.B - linea continua). Il



**Fig. 4.2** - Particolare del collicolo superiore in arvicola rossastra inoculata con il ceppo di scrapie SS7 (A) in comparazione con il Tg407 (B). La gravità delle lesioni è descritta in figura 4.1.A area 3.



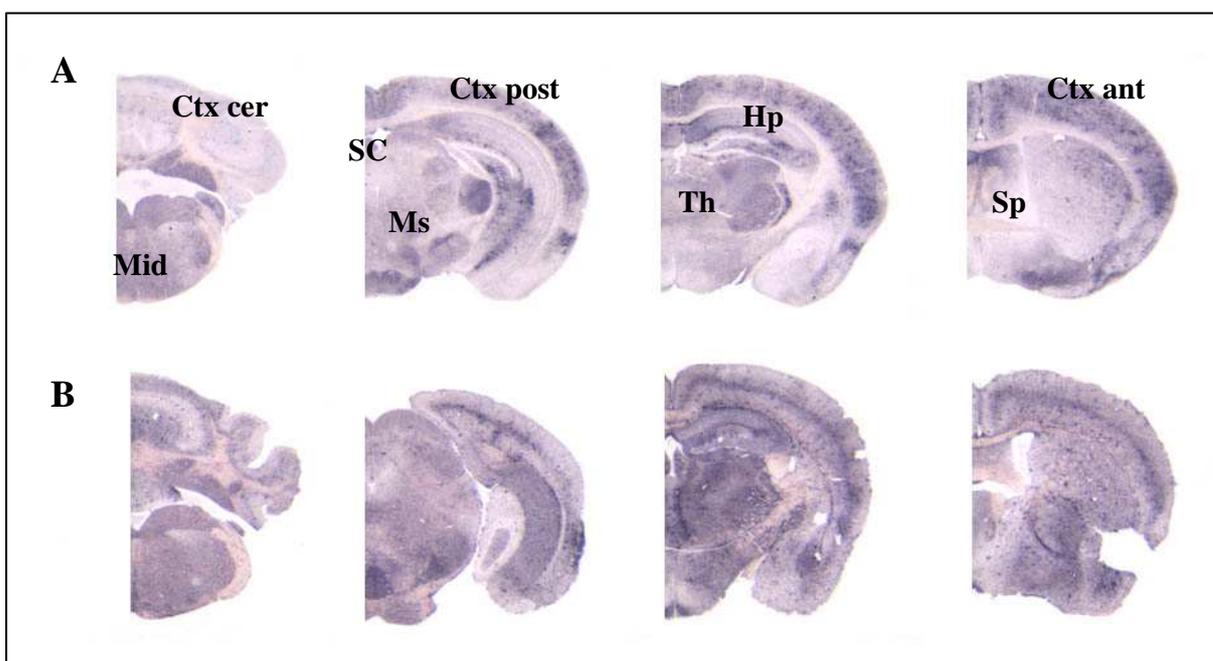
**Fig. 4.3** – Particolare del collicolo superiore in arvicola rossastra inoculata con il ceppo di BSE sperimentale (A) in comparazione con il Tg407 (B). La gravità delle lesioni è descritta in figura 4.1.B area 3.

profilo delle lesioni evidenziava differenze a livello delle aree corticali, mentre in entrambe le specie le aree sottocorticali erano coinvolte in modo simile (fig. 4.3). La corteccia cerebellare risultava pressoché integra,.

#### 4.1.4 Analisi della distribuzione cerebrale della PrP<sup>Sc</sup>.

L'analisi della distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> nel cervello è stata eseguita sui Tg407 e le arvicole inoculate con i ceppi adattati di scrapie e BSE. La tecnica del PET-Blot permette di evidenziare l'accumulo della PrP<sup>Sc</sup> a livello delle diverse aree cerebrali consentendo di mapparne la distribuzione. Questa tecnica, analogamente al profilo delle lesioni, rappresenta un ulteriore sistema di caratterizzazione del fenotipo della malattia indotta nel modello sperimentale.

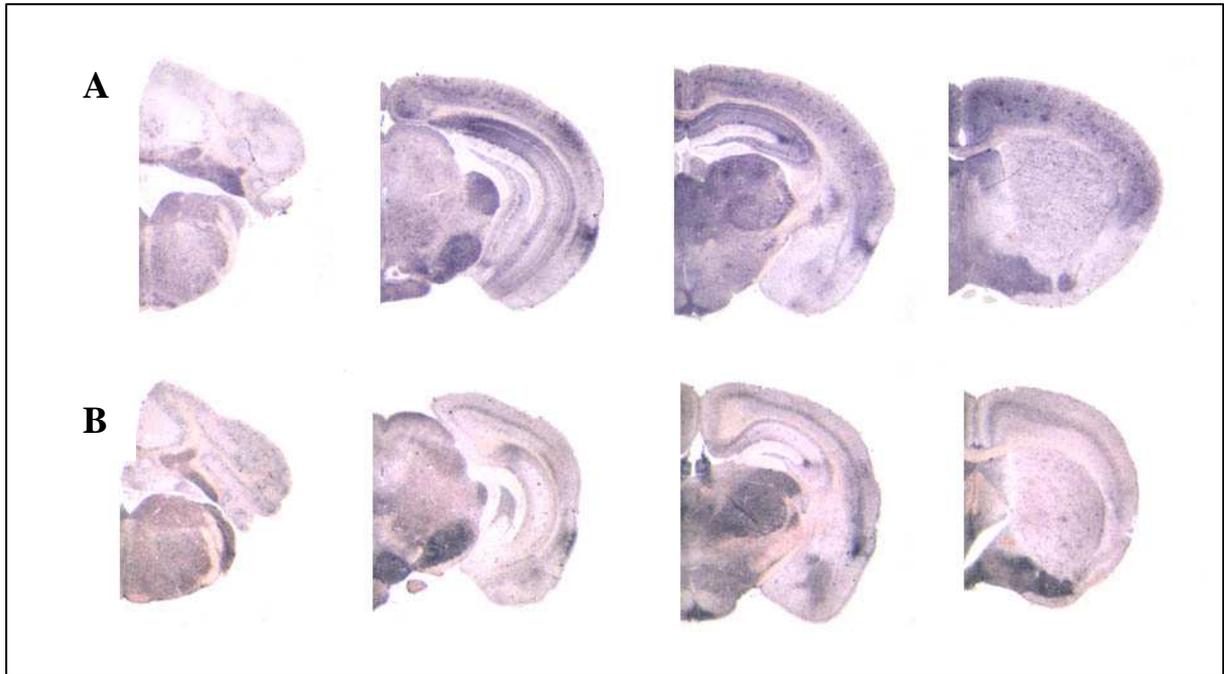
La distribuzione della PrP patologica proteinasi-resistente osservata su sezioni coronali di cervello di arvicole inoculate con il ceppo adattato di scrapie SS7 mostrava un coinvolgimento di diverse popolazioni cellulari (Fig.4.4.A). Caudo-rostralmente si osservava una intensa colorazione del midollo allungato, dei nuclei vestibolari e del nucleo ovale a livello della sostanza bianca cerebellare nonché una lieve colorazione a carico dello strato dei granuli, del nucleo genicolato laterale, della sostanza nigra, del nucleo talamico laterale, del CA1 e CA2 dell'ippocampo ed infine del setto. Caratteristiche peculiari di questo ceppo di scrapie erano: il coinvolgimento a livello corticale di gruppi definiti di neuroni che interessavano anche tutti e sei gli strati corticali e di accumuli densi di PrP<sup>Sc</sup> sullo strato lacunoso molecolare dell'ippocampo (Di Bari *et al.*, 2008). Nei Tg407 (Fig.4.4.B), diversamente dalle arvicole, si osservava una generale ed omogenea compromissione di tutte le aree cerebrali. Erano evidenti grandi accumuli di PrP<sup>Sc</sup> a livello dello strato lacunoso molecolare come segnalato nelle arvicole. Corticalmente si osservava



**Fig. 4.4** – PET-Blot su sezioni coronali rappresentative del cervello di arvicola (A) e Tg407 (B) inoculati con il ceppo di scrapie SS7 adattato in arvicola.

Ctx ant, corteccia anteriore; Ctx post, corteccia posteriore; Ctx cer, corteccia cerebellare; Mid, midollo allungato; Ms, mesencefalo; Sp, setto; Hp, ippocampo; Th, talamo; SC, collicolo superiore

una deposizione laminare della PrP<sup>Sc</sup> lungo il terzo strato; questo tipo di pattern, differente da quello osservato nelle arvicole, sembra rappresentare una caratteristica specie-specifica che con regolarità si presentava nei Tg407 inoculati con i diversi ceppi (vedi oltre).



**Fig. 4.5** – PET-Blot su sezioni coronali rappresentative del cervello di arvicola (A) e Tg407 (B) inoculati con il ceppo di BSE adattato in arvicola.

I Tg407 e le arvicole inoculati con la BSE adattata mostravano un pattern simile di deposizione della PrP<sup>Sc</sup>. In particolare negli animali si osservava uno specifico ed intenso coinvolgimento di alcune aree sottocorticali quali: midollo allungato, nucleo ovale, collicolo superiore, corpi genicolati laterali, sostanza nigra, nuclei talamici, Corno d'Ammonio dell'ippocampo, nuclei del setto e area del Broca. Risultavano, invece, debolmente colorati la corteccia cerebellare, il mesencefalo, il giro dentato dell'ippocampo, il corpo calloso ed in generale la sostanza bianca. Corticalmente nelle arvicole si evidenziava un pattern di deposizione misto caratterizzato da laminazione del terzo strato ed accumuli sparsi, vagamente simili al coinvolgimento dei gruppi neuronali evidenziati nella scrapie. I Tg407 mostravano, invece, a livello corticale una chiara laminazione del terzo strato ed una debole colorazione degli strati corticali più esterni, inoltre era evidenziato un minore coinvolgimento dello strato piramidale dell'ippocampo rispetto a quanto osservato nell'arvicola.

### **4.1.5 I dati di trasmissione in Tg407 suggeriscono che la PrP<sup>C</sup> della specie ricevente sia uno dei principali determinanti della suscettibilità ai prioni.**

La trasmissione degli isolati di scrapie, BSE ovina e MCJ ha indicato che l'inserimento del gene della proteina prionica dell'arvicola nel topo attribuisce a questa specie caratteristiche di suscettibilità ai prioni simili a quelle dell'arvicola. Infatti dopo inoculazione degli isolati di scrapie e MCJ i Tg407 e le arvicole mostravano tempi di sopravvivenza simili tra loro e più brevi rispetto a quelli osservati nei topi wild-type. Questa distinzione era osservabile anche tra gli animali inoculati con l'isolato di BSE ovina; in questo caso i topi wild-type mostravano tempi di sopravvivenza brevi ed una efficienza di trasmissione del 100%; mentre la trasmissione in topi transgenici ed arvicole era caratterizzata da tempi lunghi e bassa efficienza.

La somiglianza tra il modello transgenico e l'arvicola era avvalorata anche dai dati ottenuti inoculando i ceppi adattati di scrapie e BSE. Nel modello transgenico le caratteristiche di trasmissione erano simili a quelle osservate in arvicola. Anche l'analisi del profilo delle lesioni e della distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> con PET-Blot evidenziavano somiglianze nell'espressione fenotipica delle malattie avvalorando quanto già osservato in merito ai tempi di sopravvivenza e all'efficienza di trasmissione.

Le caratteristiche di trasmissione osservate nei Tg407 suggeriscono perciò che sia la sequenza della PrP dell'arvicola a determinarne la straordinaria suscettibilità.

I dati ottenuti inoculando il modello transgenico suggeriscono, inoltre, l'assenza o il ruolo minoritario di determinanti di suscettibilità diversi dalla proteina prionica, ribadendo così il ruolo centrale della proteina prionica nella patogenesi delle EST.

## **4.2 Trasmissione degli isolati di scrapie e BSE in diverse specie di roditori.**

Con l'obiettivo di analizzare quali delle diverse variazioni aminoacidiche della sequenza della PrP fossero responsabili della diversa suscettibilità tra topo e arvicola, sono stati condotti studi di trasmissione su quattro diverse specie di roditori, due appartenenti alla sotto-famiglia Arvicolinae (*Myodes glareolus* e *Microtus agrestis*) e due alla sotto-famiglia Murinae (*Mus musculus* e *Apodemus sylvaticus*). Queste specie presentano variazioni della sequenza della PrP utili a indagare il ruolo specifico di singole variazioni aminoacidiche.

### 4.2.1 Trasmissione primaria dell'isolato di scrapie SS3

In seguito ad inoculazione dell'isolato di scrapie naturale SS3, il 100% delle due specie di arvicola ha sviluppato segni clinici evidenti (Tab.4.2). I primi segni della malattia nelle due specie di arvicola erano iperattività/reattività seguiti dalla progressiva comparsa di alterazioni comportamentali. Segni neurologici manifesti apparivano successivamente e consistevano di un incessante movimento lungo la gabbia e caratteristici movimenti a scatti della testa accompagnati da severa e progressiva atassia. Cifosi dorsale, apatia e pronunciata ipoattività/reattività precedevano il sacrificio o la morte che avveniva a distanza di circa 10-20 giorni dall'esordio della malattia.

	Trasmissione primaria		Secondo passaggio	
	Tempo di sopravvivenza (giorni±dev.st.)	Efficienza di trasmissione (%)	Tempo di sopravvivenza (giorni±dev.st.)	Efficienza di trasmissione
<i>Arvicola rossastra</i>	199±28	100	92±14	100
<i>Arvicola agreste</i>	259±53	100		
C57Bl/6	567±149°	33	233±9	100
<i>Topo selvatico</i>	>1341*	0		

**Tab. 4.2.** Tempi di sopravvivenza ed efficienza di trasmissione osservati nell'arvicola rossastra, nell'arvicola campestre, nel topo selvatico e nel topo da laboratorio inoculati con l'isolato di scrapie SS3.

\* quando nel gruppo non venivano trovati animali positivi alla PrP<sup>Sc</sup> il tempo di sopravvivenza era indicato come superiore al tempo di sopravvivenza dell'ultimo animale morto o sacrificato.

° il tempo di sopravvivenza e l'efficienza di trasmissione erano calcolati solo per gli animali che mostravano accumulo di PrP<sup>Sc</sup>.

Al contrario, l'inoculazione dell'isolato di scrapie nei topi C57Bl/6 e nel topo selvatico determinava tempi di sopravvivenza molto lunghi senza la comparsa di sintomi clinici evidenti. I C57Bl/6 mostravano in genere segni clinici subdoli ed equivoci, in parte confondibili con quelli attribuibili all'avanzata età degli animali e rappresentati perlopiù da nervosismo ed iperreattività, seguiti da ipomotilità.

La diagnosi effettuata su cervello con la tecnica del Western-Blot per la ricerca della PrP<sup>Sc</sup> mostrava il 100% di efficienza di trasmissione nelle due specie di Arvicolinae, mentre risultava negativa nel topo selvatico e positiva solo in tre dei nove C57Bl/6 inoculati.

La durata dei tempi di sopravvivenza e l'efficienza di trasmissione osservata nella trasmissione primaria dell'isolato di scrapie indicava perciò una coerenza dei risultati all'interno delle sub-famiglie Arvicolinae e Murinae.

## 4.2.2 Trasmissione primaria dell'isolato di BSE

In seguito ad inoculazione con la BSE bovina i risultati ottenuti apparivano invertiti rispetto a quanto osservato con la scrapie, conservando l'apparente distinzione in sub-famiglie. Nessuna delle Arvicolinae inoculate mostrava segni clinici o accumulo di PrP<sup>Sc</sup> durante il lungo tempo di incubazione. Questo era in contrasto con quanto osservato nei Murinae i quali mostravano chiari segni clinici caratterizzati da iperattività/reattività seguita da incoordinazione motoria, apatia e cifosi dorsale. I tempi di sopravvivenza erano piuttosto lunghi sia nel topo selvatico che nel C57Bl/6, ma l'efficienza di trasmissione era alta in entrambi (Tab. 4.3).

	Trasmissione primaria		Secondo passaggio	
	Tempo di sopravvivenza (giorni±dev.st.)	Efficienza di trasmissione (%)	Tempo di sopravvivenza (giorni±dev.st.)	Efficienza di trasmissione
<i>Arvicola rossastra</i>	>1044*	0	483±25	100
<i>Arvicola agreste</i>	>707*	0		
C57Bl/6	631±25°	86	194±2	100
<i>Topo selvatico</i>	720±38	100		

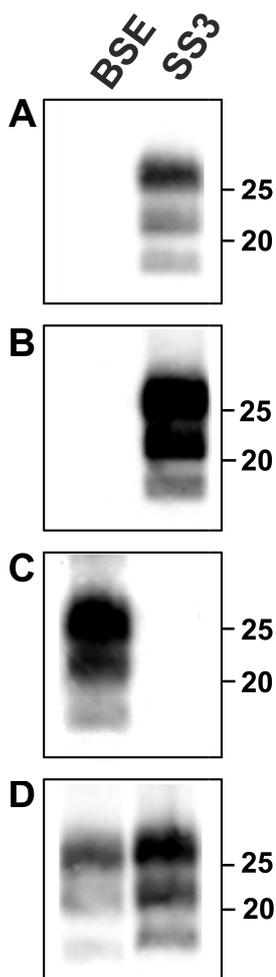
**Tab. 4.3.** Tempi di sopravvivenza ed efficienza di trasmissione osservati nell'arvicola rossastra, nell'arvicola campestre, nel topo selvatico e nel topo da laboratorio inoculati con l'isolato di BSE bovina.

\* quando nel gruppo non venivano trovati animali positivi alla PrP<sup>EST</sup> il tempo di sopravvivenza era mostrato come più lungo del tempo di sopravvivenza dell'ultimo animale morto o sacrificato.

° il tempo di sopravvivenza e l'efficienza di trasmissione erano calcolati solo per gli animali che mostravano accumulo di PrP<sup>Sc</sup>.

L'analisi mediante Western-Blot del frammento Proteinasi K resistente della PrP<sup>Sc</sup> ottenuta dal cervello degli animali positivi, mostrava le caratteristiche differenze di peso molecolare (MW) tra scrapie e BSE. Infatti l'isoforma non glicosilata della PrP<sup>Sc</sup> osservata nella BSE era circa 1 KDa più bassa della scrapie. L'analisi delle glicoforme mostrava tre tipiche bande la cui disposizione per densità era diglicosilata>monoglicosilata>nonglicosilata in tutte le specie e con entrambi gli isolati di EST. Il glicoprofilo della BSE in C57Bl/6 e topo selvatico era caratterizzato da una intensità particolarmente elevata dell'isoforma diglicosilata. (Fig. 4.6).

### 4.2.3 Trasmissione secondaria e successiva.



**Fig 4.6** – Analisi mediante Western-blot della PrP<sup>Sc</sup> pK-resistente ottenuta da cervello di arvicola rossastra (A), arvicola agreste (B), topo selvatico (C) e topo C57Bl/6 (D) inoculati con scrapie e BSE.

Il secondo passaggio di scrapie e BSE è stato effettuato su topi C57Bl/6 e arvicola rossastra (Tab. 4.3 e Fig. 4.7), considerati come rappresentativi delle due sotto-famiglie di roditori.

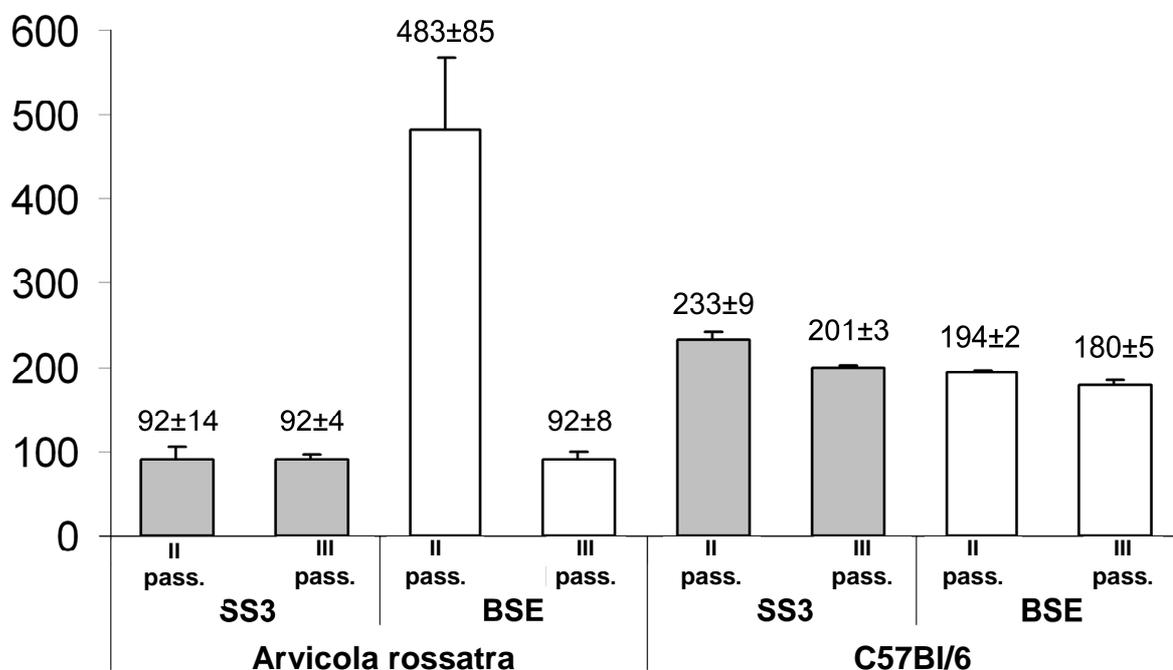
In trasmissione intraspecifica, l'efficienza di trasmissione osservata è stata sempre del 100%, con una evidente riduzione del tempo di sopravvivenza e della variabilità all'interno di ciascun gruppo di inoculo, dimostrando l'esistenza - nella precedente trasmissione primaria - di una chiara barriera di trasmissione. Dal punto di vista clinico si osservava un'acutizzazione dei segni neurologici già descritti in trasmissione primaria.

Nonostante non si fosse avuta evidenza di avvenuta trasmissione della BSE all'arvicola nel primo passaggio, è stato eseguito un passaggio secondario intraspecifico "in cieco" utilizzando per la preparazione dell'inoculo il cervello di un animale che aveva mostrato un tempo di sopravvivenza in trasmissione primaria di 1.044 giorni. Questo animale, sebbene fosse risultato negativo ai successivi accertamenti diagnostici, aveva manifestato eccitabilità e lievi sintomi atassici. Sorprendentemente, le arvicole inoculate in trasmissione secondaria mostrarono

evidenti segni clinici, un tempo di sopravvivenza di  $483 \pm 85$  giorni post-inoculo, una efficienza di trasmissione del 100%, spongiosi, e accumulo di PrP<sup>Sc</sup> con un pattern molecolare in Western-blot tipico della BSE. Tale risultato dimostra che, nonostante la mancanza di evidenze di trasmissione, la BSE bovina aveva indotto nell'arvicola una infezione subclinica che si è poi resa pienamente manifesta nel successivo passaggio intraspecifico (arvicola-arvicola).

Il terzo passaggio di SS3 e BSE è stato successivamente realizzato per indagare l'avvenuto adattamento dei due isolati in arvicola rossastra e C57Bl/6 (Fig.4.7). Riguardo la scrapie SS3, i tempi di sopravvivenza risultavano immutati rispetto al secondo passaggio, in entrambe le specie. Al contrario, il terzo passaggio della BSE nell'arvicola mostrava una ulteriore riduzione dei tempi di sopravvivenza, che invece non si osservava nei C57Bl/6. Questo fenomeno era probabilmente conseguenza del basso livello di replicazione di infettività dopo la trasmissione secondaria.

In arvicola, i ceppi di scrapie e BSE hanno mostrato la capacità di adattarsi determinando tempi di sopravvivenza estremamente brevi. Al contrario i tempi di sopravvivenza osservati in seguito ad adattamento nei topi C57Bl/6 erano significativamente più lunghi (Fig. 4.7).

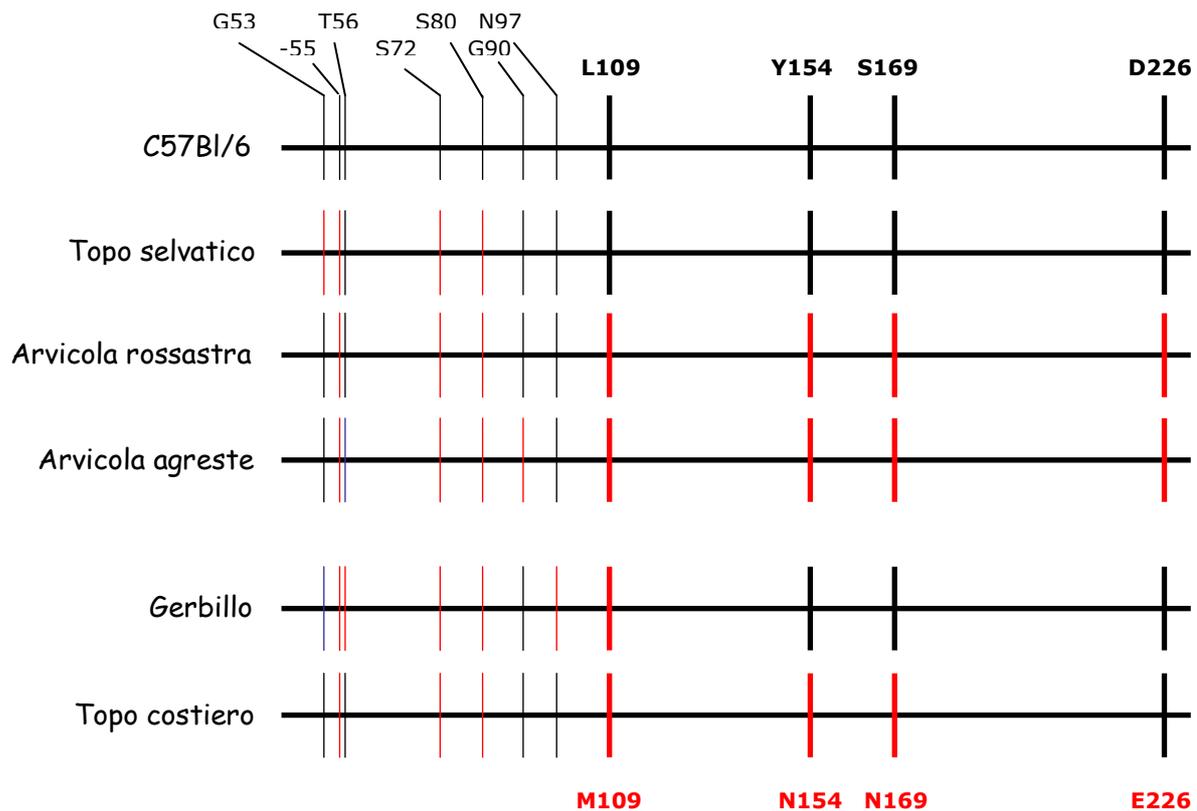


**Fig. 4.7** - Secondo e terzo passaggio intraspecifico di scrapie naturale (SS3) e BSE in arvicola rossastra e C57Bl/6. Sulla sommità di ciascuna barra è riportata la media dei tempi di sopravvivenza ± deviazione standard.

#### **4.2.4 L'analisi della sequenza suggerisce un ruolo rilevante delle sostituzioni Y154N e S169N nella trasmissione delle malattie da prioni.**

Il confronto delle sequenze della PrP<sup>C</sup> tra i le specie di roditori studiate ha mostrato un elevato grado di omologia. Infatti, benché un significativo numero di sostituzioni fossero

presenti nel segmento del peptide segnale sull’N-terminale e sulla sequenza segnale del C-terminale (entrambe sottoposte a clivaggio durante la maturazione della proteina), il confronto delle sequenze della proteina matura ha mostrato sostituzioni aminoacidiche significative in sole 5 posizioni (G89S, L109I, Y154N, S169N e D226E) (fig. 4.8). Allo scopo di facilitare la lettura, la numerazione utilizzata per l’individuazione delle posizioni aminoacidiche nel testo è riferita al numero dei residui della sequenza della PrP<sup>C</sup> di topo C57Bl/6.



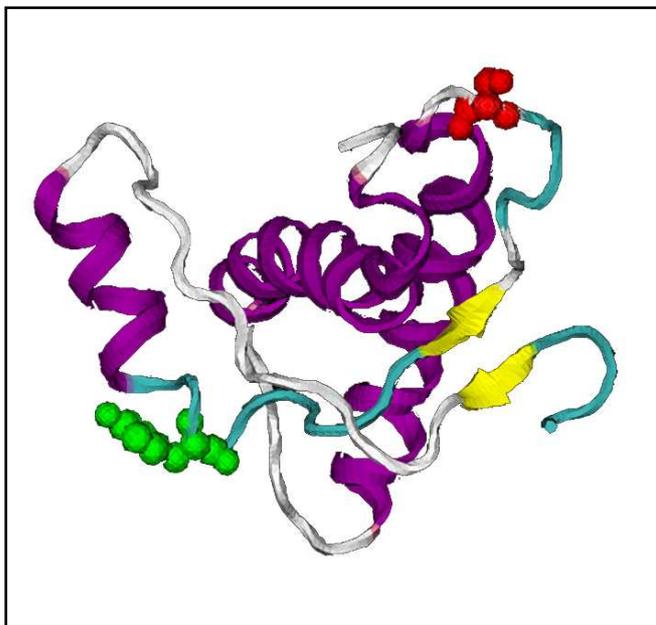
**Fig.4.8** – Schema semplificato delle sequenze della PrP<sup>C</sup> delle specie di roditori analizzate (il numero dei residui della sequenza fa riferimento alla PrP di topo C7Bl/6).

La prima sostituzione, G89S, è situata sull’N-terminale, sulla coda non strutturata della PrP ed è presente solo nell’arvicola agreste. La seconda sostituzione, L109M, anch’essa sulla coda N-terminale, è conosciuta perché variazioni in tale posizione sono note influenzare la suscettibilità alle malattie da prioni nell’arvicola rossastra (Cartoni *et al.* 2005) e nel topo (Westaway *et al.*, 1987).

Due sostituzioni sono presenti nel dominio strutturato del C-terminale. La sostituzione Y154N è localizzata nell’ansa tra la prima  $\alpha$ -elica ed il secondo foglietto  $\beta$ , mentre la sostituzione

S169N è localizzata nell'ansa tra il secondo foglietto  $\beta$  e la seconda  $\alpha$ -elica (Fig. 4.9). Entrambe queste variazioni sono distintive dei due diversi gruppi di roditori.

Infine, la sostituzione D226E, anch'essa differenziante la sequenza della PrP dei Muridae dagli Arvicolinae, è presente nella regione C-terminale.



**Fig.4.9** – Posizione dei residui aminoacidici Y154 (in verde) e S169 (in rosso) nel dominio globulare della PrP<sup>C</sup> di topo (ottenuti con RNM). Gli elementi delle strutture secondarie sono disegnati con differenti colori (porpora:  $\alpha$ -elica).

In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle due variazioni Y154N e S169N. Queste sono localizzate nella regione del dominio strutturato C-terminale della PrP che sembra contribuire a influenzare la barriera di trasmissione in quanto ipoteticamente sito di interazione proteina-proteina o coinvolto in specifiche interazioni intermolecolari (Billeter *et al.* 1997). D'altra parte, le variazioni Y154N e S169N sono state identificate come i principali determinanti della efficienza di

conversione in vitro della PrP di arvicola (Piening *et al.*, 2006).

conversione in vitro della PrP di arvicola (Piening *et al.*, 2006).

Al fine di confermare il ruolo delle sostituzioni in posizione Y154N e S169N nell'influencare la trasmissione dei prioni nei roditori, abbiamo analizzato la sequenza della PrP di altri roditori e quindi selezionato per gli studi di trasmissione altre due specie: il topo costiero (*Peromyscus polionotus*) ed il gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*). Queste specie sono state scelte perché possiedono diversi livelli di relazione filogenetica con le specie di roditori precedentemente inoculate (Fig. 3.2) (Wilson & Reeder, 2005) e perché la sequenza della loro PrP consente di discriminare il ruolo delle sostituzioni Y154N e S169N rispetto a quello delle variazioni L109M e D226E. Infatti, il topo costiero, in analogia alle Arvicolinae, presenta le variazioni 154N e 169N mentre il gerbillo, come i Murinae, risulta 154Y e 169S. Entrambe le specie tuttavia - diversamente dalle 4 precedentemente saggiate - presentano le variazioni in posizione 154 e 169 in associazione con 109M e 226D (Fig. 4.8).

Il topo costiero ed il gerbillo sono stati inoculati con lo stesso isolato di scrapie naturale (SS3) impiegato nelle precedenti trasmissioni e con il ceppo di scrapie adattato al

topo, denominato 139A. Gruppi di arvicola rossastra e di topi C57Bl sono stati anch'essi inoculati con il ceppo 139A, per confronto.

Specie ricevente	Inoculo	Tempo di sopravv. (giorni $\pm$ dev.st.)	Clinici positivi / totale	Efficienza di trasm. (%)
Topo costiero	139A	151 $\pm$ 8	10/10	100
	Scrapie naturale SS3	206 $\pm$ 23	12/12	100
Gerbillo	139A	238 $\pm$ 12	5/5	100
	Scrapie naturale SS3	1032; >1300*	1/5	20°

**Tab. 4.4.** Tempi di sopravvivenza ed efficienza di trasmissione osservati nel topo costiero e nel gerbillo laboratorio inoculati con il ceppo di scrapie murina 139A e l'isolato scrapie ovina SS3.

\* quando nel gruppo non venivano trovati animali positivi alla PrP<sup>EST</sup> il tempo di sopravvivenza era mostrato come più lungo del tempo di sopravvivenza dell'ultimo animale morto o sacrificato.

° il tempo di sopravvivenza e l'efficienza di trasmissione erano calcolati solo per gli animali che mostravano accumulo di PrP<sup>Sc</sup>.

Dopo l'inoculazione, i topi costieri hanno sviluppato la malattia mostrando tempi di sopravvivenza brevi, paragonabili a quelli osservati nell'arvicola rossastra, mentre i gerbilli hanno mostrato una trasmissione inefficiente dell'isolato di scrapie naturale ed un tempo di sopravvivenza più lungo e simile al C57Bl, dopo l'inoculazione con il ceppo 139A (Tab. 4.4). I risultati confermano perciò che le posizioni Y154N e S169N sono le sole a correlare con i differenti pattern di trasmissione osservati (Fig. 4.8).

# CAPITOLO V

## Discussione

Uno degli aspetti più complessi e controversi delle malattie da prioni è la loro proprietà di essere trasmissibili, a dispetto del possedere i caratteri delle malattie neurodegenerative piuttosto che di quelle infettive. Le autorità sanitarie e i comitati scientifici degli organismi internazionali quali l'Unione Europea mostrano oggi un grande interesse rispetto al rischio delle malattie da prioni degli animali per l'uomo e la ricerca sta investendo significative energie per comprendere le basi molecolari che regolano la trasmissione di tali agenti tra specie animali diverse. Le ragioni risiedono in buona parte nell'epidemia di BSE. L'improvvisa comparsa del nuovo agente, responsabile di oltre 200.000 casi di malattia nella specie bovina ha ricordato al mondo scientifico e alle autorità sanitarie internazionali che esistono prioni capaci di modificarsi e dotati di differente patogenicità e spettro di ospite. Ed ha anche dimostrato per la prima volta che alcuni di questi – come la BSE – sono in grado di trasmettersi dagli animali all'uomo.

**Il lavoro sperimentale condotto nell'ambito di questa tesi di dottorato ha avuto come obiettivo quello di indagare alcuni dei meccanismi molecolari alla base della trasmissione interspecifica delle malattie da prioni. In particolare, impiegando come principale modello sperimentale l'arvicola rossastra, caratterizzato dal possedere una straordinaria suscettibilità ai prioni, è stato indagato: 1) se tale suscettibilità fosse da attribuire alla sequenza della PrP dell'arvicola; 2) qualora così fosse, a quali specifici aminoacidi; 3) se tale suscettibilità si esprimesse nei confronti di tutti i ceppi di prioni o fosse ceppo-dipendente.**

### **5.1 La trasmissibilità delle malattie da prioni tra specie diverse è regolata dalla sequenza della PrP della specie ricevente.**

La prima parte della ricerca si è posta l'obiettivo di indagare se la suscettibilità del modello arvicola sia da attribuire alla sequenza della PrP<sup>C</sup> o ad altri fattori e - diversi dalla

PrP - propri di quella specie.

Con l'obiettivo di studiare il ruolo della sequenza della PrP dell'arvicola in modo indipendente rispetto ad altri possibili fattori di specie sono stati utilizzati topi transgenici esprimenti la PrP<sup>C</sup> di arvicola su un background knock-out PrP<sup>0/0</sup> (linea Tg407). Tale modello è stato inoculato con un isolato di scrapie, uno di BSE ovina, uno di MCJ e con due ceppi (uno di scrapie e l'altro di BSE) adattati all'arvicola attraverso passaggi ripetuti in questa specie. Per confronto, sono stati inoculati gruppi di arvicole e di topi wild-type con gli stessi isolati di scrapie ovina, BSE ovina e MCJ.

Il complesso dei risultati di questi studi indica come l'inserimento del gene della PrP dell'arvicola nel topo modifichi la suscettibilità di questa specie rendendola estremamente simile a quella dell'arvicola, sia in termini di durata dei tempi di sopravvivenza, che di successo di trasmissione. In particolare, la scrapie naturale ovina, che nel topo wild-type non determina malattia clinicamente manifesta e si trasmette in modo estremamente inefficiente, causa malattia nel 100% dei Tg407, con tempi di sopravvivenza brevi e del tutto simili a quelli osservati nell'arvicola. Anche la MCJ, che nel topo wild-type si trasmette in modo inefficiente, con tempi lunghi e senza determinare malattia clinicamente evidente, porta a malattia il 100% dei Tg407, sia pure con tempi di sopravvivenza superiori a quelli dell'arvicola. Parallelamente, la BSE ovina sperimentale, che mostrava di trasmettersi efficientemente e con tempi di sopravvivenza inferiori nel topo wild-type che nell'arvicola, si trasmette in modo inefficiente, sebbene con tempi più brevi, nei topi esprimenti la PrP dell'arvicola.

L'elevata efficienza di trasmissione ottenuta inoculando il medesimo modello con prioni provenienti da specie differenti (pecora e uomo) mette inoltre in evidenza che la suscettibilità è indipendente dalla sequenza della PrP della specie "donatrice" ma legato a quella della specie "ricevente".

I dati di trasmissione della BSE sperimentale ovina dimostravano inoltre come una determinata sequenza della PrP non può essere considerata come capace di conferire elevata o ridotta suscettibilità in termini generali. Il ceppo della BSE, infatti dimostra di essere trasmissibile in maniera più efficiente al topo wild-type piuttosto che all'arvicola o al topo transgenico esprime la PrP di questa specie.

Risultati analoghi sono stati ottenuti, inoltre, inoculando i Tg407 con ceppi di scrapie e BSE adattati all'arvicola. L'efficienza di trasmissione, i tempi di sopravvivenza, il profilo neuropatologico e il pattern di accumulo della PrP<sup>Sc</sup> hanno dimostrato che Tg407 e arvicole

svilupparono la malattia con un fenotipo di trasmissione del tutto simile, suggerendo che la sostituzione del gene della PrP murina con quello dell'arvicola determina nel topo transgenico, oltre che la suscettibilità, anche un fenotipo di malattia simile all'arvicola.

Complessivamente i dati suggeriscono che gran parte della suscettibilità dell'arvicola è riconducibile alla sequenza della PrP e avvalorano l'ipotesi a favore dell'assenza o di un'azione minoritaria di determinanti specie-specifici diversi dalla PrP nel regolare la suscettibilità alle malattie da prioni.

## **5.2 Ruolo delle sostituzioni 154 e 169 della sequenza della PrP nel modulare la trasmissione interspecifica delle malattie da prioni.**

Definito il ruolo cruciale della sequenza della PrP nel determinare la differente suscettibilità tra arvicola e topo, la seconda parte della ricerca è stata indirizzata a identificare eventuali specifici residui aminoacidici della PrP potenzialmente in causa nel determinare tali differenze. L'analisi dei risultati ottenuti permette di suddividere i roditori studiati in due gruppi. La prima include le due specie di arvicola (*M. glareolus* e *M. agrestis*) ed è caratterizzata da i) alta suscettibilità alla scrapie, ii) bassa suscettibilità alla BSE, iii) tempi di sopravvivenza estremamente brevi in seguito ad inoculazione dei ceppi adattati. Il secondo gruppo comprende il topo selvatico (*A. sylvaticus*) ed i C57Bl. Questi mostrano: i) ridotta suscettibilità alla scrapie, ii) relativamente alta suscettibilità alla BSE, iii) lunghi tempi di sopravvivenza con i ceppi adattati. Queste evidenze erano consistenti con la trasmissione inefficiente della scrapie a topi riportata da diversi Autori (Vilotte *et al.*, 2001; Bruce *et al.*, 2002) ma era anche confermato dalle passate osservazioni di Chandler e Turfrey in merito all'elevata suscettibilità dell'arvicola (Chandler & Turfrey, 1972). Il confronto delle sequenze indica che i differenti *pattern* di trasmissione osservati correlano con le variazioni aminoacidiche in posizione 154 e 169. Complessivamente, le specie con Y154-S169, (topi selvatici ed C57Bl/6), si mostravano resistenti alla scrapie e suscettibili alla BSE, mentre le due specie di arvicola, portatrici delle sostituzioni 154N-169N manifestavano caratteristiche sostanzialmente opposte. L'inversa suscettibilità dei roditori alla scrapie e alla BSE sottolinea il ruolo dei ceppi nella barriera di trasmissione: il cambio di aminoacidi può sia aumentare che ridurre l'efficienza di trasmissione, in modo dipendente dal ceppo di prioni. In particolare,

è evidente come il cambiamento di Y154N–S169N sembri conferire alle Arvicolinae un’alta suscettibilità alla scrapie, mentre determina l’effetto opposto con la BSE.

Il ruolo preminente delle variazioni Y154N–S169N trova ulteriore conferma nei risultati degli studi di trasmissione nel topo costiero e nel gerbillo.

Piening *et al.* (2006) avevano analizzato il ruolo della sequenza PrP mediante test di conversione *in vitro*, allo scopo di indagare le basi dell’elevata suscettibilità dell’arvicola rossastra alla scrapie naturale rispetto al topo.

		20		40	
Mus musculus	M - - ANLGYWL	LALFVTMWTD	VGLCKKRPKP	GG - WNTGGSR	YPGQGSPPGN 47
Myodes glareolus	M - - ANLSYWL	LAFFVTTWTD	VGLCKKRPKP	GG - WNTGGSR	YPGQGSPPGN 47
Ovis aries	MVKSHIGSWI	LVLFFVAMWSD	VGLCKKRPKP	GGGWNTGGSR	YPGQGSPPGN 50
Bos taurus	MVKSHIGSWI	LVLFFVAMWSD	VGLCKKRPKP	GGGWNTGGSR	YPGQGSPPGN 50
Homo sapiens	M - - ANLGCWM	LVLFFVATWSD	LGLCKKRPKP	GG - WNTGGSR	YPGQGSPPGN 47
		60		80	
Mus musculus	RYPQGG - TW	GQPHGGGWGQ	PHGGSWGQPH	GGSWGQPHGG	GW - - - - - G 89
Myodes glareolus	RYPQGGGTW	GQPHGGGWGQ	PHGGSWGQPH	GGSWGQPHGG	GW - - - - - G 90
Ovis aries	RYPQGG - - -	- - - - - GGWGQ	PHGGSWGQPH	GGSWGQPHGG	GWGQPHGGGG 92
Bos taurus	RYPQGGGGW	GQPHGGGWGQ	PHGGSWGQPH	GGSWGQPHGG	GWGQPHGGGG 100
Homo sapiens	RYPQGGGGW	GQPHGGGWGQ	PHGGSWGQPH	GGSWGQPHGG	GW - - - - - G 90
		120		140	
Mus musculus	QG - GGTHNQW	NKPSKPKTNL	KHVAGAAAAG	AVVGGLGGYM	LGSAMSRPMI 138
Myodes glareolus	QG - GGTHNQW	NKPSKPKTNM	KHVAGAAAAG	AVVGGLGGYM	LGSAMSRPMI 139
Ovis aries	WGQGGSHSQW	NKPSKPKTNM	KHVAGAAAAG	AVVGGLGGYM	LGSAMSRPLI 142
Bos taurus	WGQGGTHGQW	NKPSKPKTNM	KHVAGAAAAG	AVVGGLGGYM	LGSAMSRPLI 150
Homo sapiens	QG - GGTHSQW	NKPSKPKTNM	KHMAGAAAAG	AVVGGLGGYV	LGSAMSRPII 139
		160	180	200	
Mus musculus	HFGNDWEDRY	YRENMYRYPN	QVYYRPVDQY	SNQNNFVHDC	VNITIKQHTV 188
Myodes glareolus	HFGNDWEDRY	YRENMYRYPN	QVYYRPVDQY	NNQNNFVHDC	VNITIKQHTV 189
Ovis aries	HFGNDYEDRY	YRENMYRYPN	QVYYRPVDQY	SNQNNFVHDC	VNITVKQHTV 192
Bos taurus	HFGSDYEDRY	YRENMYRYPN	QVYYRPVDQY	SNQNNFVHDC	VNITVKEHTV 200
Homo sapiens	HFGSDYEDRY	YRENMYRYPN	QVYYRPMDEY	SNQNNFVHDC	VNITIKQHTV 189
		220		240	
Mus musculus	TTTTKGENFT	ETDVKMMERV	VEQMCVTQYQ	KESQAYYDGR	RSSSTVLFSS 238
Myodes glareolus	TTTTKGENFT	ETDVKMMERV	VEQMCVTQYQ	KESQAYYEGR	SSRAVLLFSS 239
Ovis aries	TTTTKGENFT	ETDIKIMERV	VEQMCITQYQ	RESQAYYQ - -	RGASVILFSS 240
Bos taurus	TTTTKGENFT	ETDIKMMKRV	VEQMCITQYQ	RESQAYYQ - -	RGASVILFSS 248
Homo sapiens	TTTTKGENFT	ETDVKMMERV	VEQMCITQYE	RESQAYYQ - -	RGSSMVL FSS 237
		260			
Mus musculus	PPVILLISFL	IFLIVG			254
Myodes glareolus	PPVILLISF -	- - - - -			248
Ovis aries	PPVILLISFL	IFLIVG			256
Bos taurus	PPVILLISFL	IFLIVG			264
Homo sapiens	PPVILLISFL	IFLIVG			253

**Fig. 6.1** – Sequenza aminoacidica della proteina prionica del *Myodes glareolus* (arvicola rossastra), rispetto al *Mus musculus* (topo), *Ovis aries* (pecora), *Homo sapiens* (uomo) e *Bos taurus* (bovino).

In accordo con i nostri risultati *in vivo*, gli studi *in vitro* hanno identificato le sostituzioni S169N ed Y154N come responsabili della diversa efficienza di conversione ottenuta con la PrP<sup>C</sup> di topo e di arvicola. I nostri studi concordano con quelli di conversione

*in vitro* anche in merito all'alterazione ceppo-dipendente dell'efficienza di conversione indotta dalle variazioni Y154N-S169N, con un effetto di incremento o decremento della suscettibilità a seconda del ceppo inoculato (Peining *et al.*, 2006).

Occorre sottolineare che le sequenze della PrP murina ed ovina hanno gli stessi aminoacidi nelle posizioni 154 e 169, mentre la PrP bovina differisce solo al codone 154, presentando H invece di Y (Fig. 6.1). In accordo con tali differenze, i test *in vitro* hanno dimostrato che la PrP<sup>C</sup> di arvicola veniva convertita in modo meno efficiente rispetto a quella del topo sia dalla scrapie che dalla BSE (Peining *et al.*, 2006). Tuttavia, l'introduzione della doppia mutazione murina 154N-169N nella sequenza dell'arvicola incrementava l'efficienza di conversione fino ad un livello paragonabile a quello ottenuto con la PrP<sup>C</sup> di topo, a prescindere dai rimanenti residui in posizione 108 e 226.

Questi risultati suggeriscono che la somiglianza nelle posizioni 154 e 169 rappresentata un importante determinante nella barriera di trasmissione tra le specie di roditori studiate. Tuttavia, la più elevata efficienza di conversione della PrP<sup>C</sup> di topo rispetto a quella di arvicola indotta dalla scrapie ovina contrasta con la maggiore suscettibilità alla scrapie dimostrata dall'arvicola rispetto al topo negli studi *in vivo*. Assumendo che la conversione della PrP<sup>C</sup> sia il risultato di una interazione diretta con la PrP<sup>Sc</sup> (Caughey, 2003), gli studi *in vitro* implicano che il riconoscimento e la conversione della PrP<sup>C</sup> di topo ad opera della PrP<sup>Sc</sup> di pecora siano più efficienti di quelli osservati con PrP<sup>C</sup> di arvicola. Tuttavia, i nostri risultati *in vivo* suggeriscono che altri fattori successivi a tale interazione potrebbero influenzare la patogenesi, guidando lo sviluppo della malattia più facilmente che nel topo.

Questo suggerisce che l'arvicola sia in grado di modulare una particolare efficienza di adattamento e/o replicazione dei prioni, come suggerito anche dalla sorprendente brevità dei tempi di incubazione dei ceppi adattati. Quest'ultima è una caratteristica dell'arvicola, dato che quasi tutti i ceppi adattati in questa specie determinano tempi di sopravvivenza che vanno da 35 a 130 giorni post-inoculo, indipendentemente dal fatto che essi derivino da bovino, ovino, cervo, topo, criceto o uomo (Dell'Omo *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 1999; Agrimi *et al.*, 1999, Nonno *et al.*, 2006; Cartoni *et al.*, 2005; Cartoni *et al.*, 2006; Zanusso *et al.*, 2007; Courageot *et al.*, 2008; Agrimi *et al.*, 2008 e Di Bari *et al.*, 2008).

Nel presente lavoro abbiamo dimostrato che questa caratteristica si applica anche all'arvicola agreste. In questi roditori il secondo passaggio di SS3 produce tempi di sopravvivenza comparabili con l'arvicola rossastra.

Il modello di scrapie nel criceto siriano ha rappresentato un importante passo avanti nella ricerca sui prioni a causa del breve periodo di incubazione osservato con il ceppo 263K (Kimberlin & Walker, 1977). Sia i criceti che le arvicole possiedono le sostituzioni 154N-169N. Tuttavia, il confronto della loro suscettibilità porta ad osservazioni contrastanti.

È noto che i criceti sono resistenti alla BSE (Raymond *et al.*, 1997). Analogamente, nel presente lavoro, è stata dimostrata una parziale resistenza dell'arvicola a tale ceppo. Tuttavia anche il nostro tentativo di trasmettere al criceto la scrapie SS3 – facilmente trasmissibile all'arvicola - ha dato risultati negativi (Peining *et al.*, 2006). La presenza di aminoacidi che sono unici della sequenza della PrP del criceto (V111M, I138M, V202I, M204I, V214T) offre una potenziale spiegazione di tali discrepanze. In effetti, almeno nel caso della variazione 138M, Priola e Chesebro (1995) hanno dimostrato *in vitro* che questo specifico residuo potrebbe influenzare la barriera di trasmissione tra topo e criceto bloccando la conversione della PrP.

Le basi molecolari della trasmissione interspecifica e dell'adattamento della malattie da prioni ad una certa specie è sconosciuta. Tuttavia, le evidenze suggeriscono che la sequenza della PrP della specie ricevente agisce condizionando il *range* delle possibili conformazioni compatibili e quindi condizionando la suscettibilità ai differenti ceppi di prioni (Collinge, 2001). In accordo con questo modello, la sequenza dell'arvicola rossastra potrebbe essere particolarmente incline ad adottare un ampio *range* di conformazioni. Questo dovrebbe spiegare l'alta suscettibilità dell'arvicola rossastra ad un'ampia varietà di EST in trasmissione primaria, benché con importanti eccezioni come per la BSE. In accordo con la bassa efficienza di trasmissione della BSE, anche la vCJD, che deriva nell'uomo dall'infezione con l'agente della BSE, ha mostrato in arvicola rossastra un basso grado di trasmissione ed un tempo di sopravvivenza estremamente lungo (dati non mostrati). Questo supporta l'idea che l'agente della BSE si trasmette scarsamente alle specie portatrici delle sostituzioni Y154N-S169N, indipendentemente dalla sequenza della PrP della specie donatrice.

Le posizioni 154 e 169 sono poco variabili nella PrP dei mammiferi (Fig. 6.1). I residui aminoacidici nell'uomo e nel bovino sono 154H-169S, nella pecora e nella capra 154Y-169S e nei cervidi 154Y-169N. Considerando l'effetto ceppo-dipendente delle variazioni in tali posizioni, si potrebbe ipotizzare che tali differenze possono spiegare l'apparente limitazione esistente nella trasmissione interspecifica dei prioni tra uomo, piccoli ruminanti e cervidi. A conferma di ciò, la sola EST animale che ad oggi ha superato la barriera di trasmissione con l'uomo è la BSE. Questo agente si è dimostrato capace di

trasmettersi da bovino a uomo; due specie che presentano gli stessi residui aminoacidici nelle posizioni 154 e 169.

Nella rappresentazione tridimensionale della PrP<sup>C</sup> di topo i residui 154Y e 169S, corrispondenti a 154N e 169N della proteina prionica dell'arvicola rossastra, sono esposti sulla superficie della proteina (Fig. 4.9) e sono quindi accessibili ad una potenziale interazione con la PrP<sup>Sc</sup> esogena. È stato dimostrato che anche in un modello di PrP<sup>Sc</sup> basato su analisi cristallografica (Govaerts *et al.*, 2004), i residui 154Y-169S sono situati sulle superfici accessibili della struttura del core  $\beta$ -elicoidale potenzialmente importante per la formazione di fibrille di PrP<sup>Sc</sup> (Peining *et al.*, 2006).

È interessante notare, che la posizione 169 si trova nel loop che collega il secondo foglietto  $\beta$  con la seconda  $\alpha$ -elica ( $\beta 2$ - $\alpha 2$ ) (Fig. 4.9), una regione che risulta critica nel condizionare la struttura tridimensionale della PrP<sup>C</sup> (Gossert *et al.*, 2005), la formazione di fibrille (Sawaya *et al.*, 2007), la suscettibilità alla scrapie degli ovini (Hunter *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2006; Vaccari *et al.*, 2007), la replicazione dei prioni (Kaneko *et al.*, 1997) e la barriera di trasmissione (Billeter *et al.*, 1997; Caughey, 2003). Recentemente, inoltre, il residuo 169N è stato identificato come determinante della plasticità conformazionale del loop  $\beta 2$ - $\alpha 2$  (Gorfe AA & Caflisch A, 2007).

Nel complesso, questi dati evidenziano la rilevanza di queste posizioni nel modellare la barriera interspecifica nelle malattie da prioni. Questo potrebbe avere implicazioni significative nella valutazione del rischio di trasmissione di prioni per l'uomo in modelli di primati, i quali mostrano una notevole variabilità nella posizione 154 e nel loop  $\beta 2$ - $\alpha 2$ , che comprende la posizione 169.

La distinzione tra i due gruppi di roditori derivante dagli studi di trasmissione è corrispondente con la loro tassonomia la quale classifica l'arvicola rossastra ed agreste nella famiglia dei Cricetidae, mentre il topo selvatico e il topo domestico (C57Bl/6) in quella dei Muridae (Wilson & Reeder, 2005) (Fig. 3.2). Nonostante il convincente ruolo svolto dalla PrP, questa osservazione indica la necessità di non rinunciare ad indagare la possibile esistenza di ulteriori fattori di ospite differenti dalla PrP in grado di modulare la suscettibilità alle malattie da prioni diversamente nelle famiglie Murinae e Cricetinae.

### **5.3 Conclusioni.**

I risultati di questo studio hanno importanti implicazioni nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base della trasmissione interspecifica delle malattie da prioni e

dimostrano che la barriera di trasmissione è un fenomeno cui partecipano due componenti intimamente correlate tra loro: la sequenza della PrP della specie infettata ed il ceppo di agente.

Il gene della PrP è altamente conservato nei mammiferi. E' stato suggerito che un limitato, ma significativo, numero di conformazioni della PrP<sup>Sc</sup> siano possibili dal punto di vista termodinamico; queste costituirebbero il “*range*” di ceppi di prioni compatibile con una determinata sequenza “ricevente” di PrP. Nell’ambito di una singola specie di mammifero, solo una parte di queste conformazioni sarebbe quindi possibile (Collinge, 2001). I risultati del presente lavoro dimostrano come, nella trasmissione interspecifica, specifiche posizioni della PrP della specie “ricevente” influenzano la suscettibilità di quella specie e confermano come la sequenza della PrP della specie “ricevente” detti anche il “*range*” di ceppi cui quella specie si mostra suscettibile, ma che tale suscettibilità è indipendente dall’omologia di sequenza esistente tra la PrP della specie “donatrice” e quella della specie “ricevente”.

Grazie alla elevata suscettibilità mostrata nei confronti di numerose e differenti EST umane ed animali, l’arvicola rossastra (*Myodes glareolus*) si dimostra un modello di grande interesse per lo studio delle basi molecolari della trasmissione interspecifica delle EST e per “modellare” il rischio di trasmissione dei prioni da una specie animale ad un’altra.

## Riferimenti bibliografici

- Agrimi U., Conte M., Morelli L., **Di Bari M.A.**, Di Guardo G., Ligios C., Antonucci G., Aufiero G.M., Pozzato N., Mutinelli F., Nonno R., Vaccari G.. 2003. Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. *Veterinary Research Communications* 27: 31-38.
- Agrimi U., Dell’Omo G., **Di Bari M.A.**, Busani L., Marcon S., Windl O., Kretschmar H.A., Vaccari G., Di Guardo G., Ligios C., Pocchiari M. and H.P. Lipp.1999. High susceptibility of bank vole (*Clethrionomis glareolus*) to natural and mouse-adapted scrapie. *Characterization and Diagnosis of Prion Disease in Animal and Man*. Tübingen, 23-25 september
- Agrimi, U., Nonno, R., Dell’Omo, G., **Di Bari, M.A.**, Conte, M., Chiappini, B., Esposito, E., Di Guardo, G., Windl, O., Vaccari, G., Lipp, HP. Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathogens*. 2008 Jul 25;4(7).
- Baron G.S., Wehrly K., Dorward D.W., Chesebro B., Caughey B., 2002. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP<sup>Sc</sup> into contiguous membranes. *EMBO Journal* 21: 1031–40.
- Barron RM, Thomson V, King D, Shaw J, Melton DW, Manson JC. 2003. Transmission of murine scrapie to P101L transgenic mice. *J Gen Virol*. Nov;84(Pt 11):3165-72
- Bessen R.A. e Marsh R.F., 1992. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink ecephalopathy. *J. Gen. Virol.* 73; 239-334.
- Bessen R.A. e Marsh R.F., 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* 68: 7859-7868.
- Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, *et al.* (1997) Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7281–7285.
- Baron G.S., Caughey B., 2003. Effect of glycoposphatidyl inositol anchor-dependent and –independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform. *J. Biol. Chem.* 278: 14883-92.

- Brown D.R., Qin K., Herms J.W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P.E., Kruck T.A., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D. & Kretzschmar H.A., 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687.
- Brown D.R., 1999 (a). Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. *J. Neurosci. Res.* 58. 717-725.
- Brown D.R., 1999 (b). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. Journal* 344: 1-5.
- Brown D.R., Iordanova I.K., Wong B.S., Vèniën-Bryan C., Hafiz F., Glasssmith L.L., Sy M.S., Gambetti P., Jones I.M., Clive C., Haswell S.J., 2000. *Eur. J. Biochem.* 267: 2452-2459.
- Bruce M.E., McBride P.A., Farquhar C.F., 1989. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci. Lett.* 102: 1–6.
- Bruce M.E., Fraser H. 1991. Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172:125-38. Review.
- Bruce M.E., McConnell I., Fraser H., Dickinson A.G. 1991. The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 72: 595-603.
- Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J., 1997. Transmission to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 2 October: 498-501.
- Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, *et al.* (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol* 83: 695–704.
- Bruce M.E. (2003). TSE strain variation. *Brit. Med. Bull.* 66:99-108.
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*; 73: 1339–47
- Cardone F., Liu Q.G., Petraroli R., Ladogana A., D'Alessandro M., Arpino C., **Di Bari M.**, Macchi G. and Pocchiari M.. 1999 - Prion protein glycotype analysis in familial

and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Brain Research Bulletin* vol.49, n°6: pp 429-433, 1999

- Cartoni, C., Schininà, M.E., Maras, B., Nonno, R., Vaccari, G., **Di Bari, M.A.**, Conte, M., Liu, Q.G., Lu, M., Cardone, F., Windl, O., Pocchiari, M., Agrimi U. (2005). Identification of the pathological prion protein allotypes in scrapie-infected heterozygous bank voles (*Clethrionomys glareolus*) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081; 122-126.
- Cartoni, C., Schininà, M.E., Maras, B., Nonno, R., Vaccari, G., **Di Bari M.A.**, Conte, M., De Pascalis, A., Principe, S., Cardone, F., Pocchiari, M., Agrimi, U. (2006) Quantitative profiling of the pathological prion protein allotypes in bank voles by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Sep 26.
- Castilla, J, Gutiérrez Adán A, Brun A, Pintado B, Ramírez MA, Parra B, Doyle D, Rogers M, Salguero FJ, Sánchez C, Sánchez-Vizcaíno JM, Torres JM. 2003. Early detection of PrP<sup>res</sup> in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol.* Apr;148(4):677-91.
- Caughey B., 1991. Cellular metabolism of normal and scrapie-associated forms of PrP. *Semin. Virol.* 2: 189–96.
- Caughey B (2003) Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Br Med Bull* 66: 109–120.
- Chandler RL, Turfrey BA (1972) Inoculation of voles, chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Res Vet Sci* 13: 219–224.
- Collinge, J., Whittington M.A., Sidle K.C.L., Smith C.J., Palmer M.S., Clarke A.R. & Jefferys J.G.R., 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297.
- Collinge J., Sidle K.C.L., Meads J., Ironside J., Hill A.F., 1996. Molecular analysis of prion strainvariation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* 383: 685-690.
- Collinge J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:519-550.
- Courageot, M.P., Daude, N., Nonno, R., Parquet, S., **Di Bari, M.A.**, Le Dur, A., Chapuis, J., Hill, A.F., Agrimi, U., Laude, H., Vilette, D. (2008). A cell line infectible

by prion strains from different species. *Journal of General Virology* Jan;89(Pt 1):341-7.

- Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116 (in Suppl. ordinario alla *Gazz. Uff.* n. 40, del 18 febbraio). -- Attuazione della direttiva (CEE) n. 609/86 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.
- Dell'Omo G., Agrimi U., **Di Bari M. A.**, Marcon S. , Wolfer D.P., Lipp H.P. 1999. New ecologically oriented rodents models of Scrapie. *1<sup>st</sup> Report Meeting of the Swiss National Foundation*. Bern, CH, 5.02.1999.
- Dickinson, A. G. (1976). In *Slow Virus Diseases of Animals and Man*. Frontiers of Biology series, vol. 44, chapter 10, pp. 209-241. Edited by R. H. Kimberlin. Amsterdam and New York: North Holland.
- Diringer H., Kimberlin R.H. 1983. Infectious scrapie agent is apparently not as small as recent claims suggest. *Biosci. Rep.* 3: 563-568.
- **Di Bari M.A.**, Agrimi U., Di Guardo G., Eleni C., Fazzi P., Marcon S., Busani L., Kennedy S., Caramelli M., Pocchiari M. 1997. Comparison of different pretreatment techniques in enhancing PrP<sub>sc</sub> immunoreactivity in formalin-fixed brain from animal and human transmissible spongiform encephalopathies. *15<sup>th</sup> meeting of the European Society of Veterinary Pathology*,. Alghero (SA) 16-19.september.
- **Di Bari M.A.**, Busani L., Ingrosso L., Di Guardo G., Marcon S., Eleni C., Ligios C., Pocchiari M. and Agrimi U. 1999. Transmission of natural sheep scrapie to mice with different *Sinc* genotype. *Characterization and Diagnosis of Prion Disease in Animal and Man*. Tübingen, 23-25 september.
- **Di Bari M.**, Vetrugno V, Canese R, Carpinelli G, Agrimi U, Podo F, Pocchiari M. 2002. In vivo diagnosis of scrapie by Diffusion-Weighted MRI. *International Conference on Transmissible Spongiform Encephalopathies, Edimburgh*, 15-18 september.
- **Di Bari M.**, Vannoni E, Dell'Omo G, Nonno R, Vyssotski A, Lipp H, Agrimi U. 2002. Preclinical diagnosis and differentiation between different strains of scrapie and BSE in mice by automated activity monitoring. *International Conference on Transmissible Spongiform Encephalopathies, Edimburgh*, 15-18 september.
- **Di Bari, M.A.**, Chianini, F., Vaccari, G., Esposito, E., Conte, M., Eaton, S.L., Hamilton, S., Finlayson, J., Steele, P.J., Dagleish, M.P., Reid, H.W., Bruce, M.,

- Jeffrey, M., Agrimi, U., Nonno, R. (2008). The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *Journal of General Virology* Dec;89(Pt 12):2975-85
- Fraser H., Dickinson A.G. 1968. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Pathol.* 1968 Jul;78(3):301-11.
  - Gambetti P., Kong Q., Zou W., Parchi P., Chen S.G., 2003. Sporadic and familial CJD: classification and characterization. *British Medical Bulletin* 66: 213-239.
  - Goldmann W., Hunter N., Foster J.D., Salbaum J.M., Beyreuther K., Hope J., 1990. Two alleles of neuronal protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2476-2480.
  - Goldmann W., Hunter N., Benson G., Foster J.D., Hope J., 1991. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the *Sip* gene. *J. Gen. Virol.* 72: 2411-2417.
  - Goldmann W, Houston F, Stewart P, Perucchini M, Foster J, *et al.* (2006) Ovine prion protein variant A(136)R(154)L(168)Q(171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *J Gen Virol* 87: 3741–3745.
  - Gorfe AA, Caflisch A (2007) Ser170 controls the conformational multiplicity of the loop 166–175 in prion proteins: implication for conversion and species barrier. *FASEB J.* doi:10.1096/fj.07-8292com.
  - Gossert A.D., Bonjour S., Lysek D.A., Fiorito F., Wuthrich K. 2005. Prion protein NMR structures of elk and mouse / elk hybrids. *PNSA* 102: 646-650.
  - Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8342–8347.
  - Horiuchi M., Caughey B., 1999. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure Fold. Des.* 7 : R231-40.
  - Hope J., Wood S.C.E.R., Birkett C.R., Chong A., Bruce M.E., Cairns D., Goldmann W., Hunter N., Bostock C.J., 1999. Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *Journal of General Virology* 80: 1-4.
  - Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C., Gowland I., Collinge J., Doey L.J., Lantos P. 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450.

- Hegde R.S., Mastrianni J.A., Scott M.R., DeFea K.A., Tremblay P., Torchia M., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Lingappa V.R. 1998. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-834.
- Hegde R.S., Tremblay P., Groth D., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Lingappa V.R. 1999. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402: 822-6
- Hill A.F., Sidle K.C., Joiner S., Keyes P., Martin T.C., Dawson M., Collinge J. 1998. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci Lett.* 255: 159-62.
- Hunter N., Goldmann W., Smith G., Hope J. 1994. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol.* 137:171-7.
- Hunter N, Goldmann W, Marshall E, O'Neill G (2000) Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease. *Arch Virol Suppl* 16: 181–188.
- Hetz C., Maundrell K., Soto C. 2003. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders?. *TRENDS in Molecular Medicine* 6, 9: 237-243.
- Hermes J., Tngs T., Gall S., Madlung A., Giese A., Siebert H., Schurmann P., Windl O., Brose N., Kretzschmar H. 1999. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *The Journal of Neuroscience* 19 (20): 8866-8875.
- Haire L.F., Whyte S.M., Vasisht N., Gill A.C., Verma C., Dodson E.J., Dodson G.G., Bayley P.M. 2004. The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J. Mol. Biol.* 336: 1175-1183.
- Kaneko K., Peretz D., Pan K-M., Blochberger T.C., Wille H., Gabizon R., Griffith O.H., Cohen F.E., Baldiwin M.A., Prusiner S.B., 1995. Prion proreïn (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92; 11160-11164.
- Kaneko K., Zulianello L., Scott M., Cooper C.M., Wallace A.C., James T.L., Cohen F.E., Prusiner S.B., 1997. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 94; 10069-10074.
- Kocisko D., Priola S.A., Raymond G.J., Chesebro B., Lansbury P.T., Caughey B., 1995. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-

- resistant forms: A model for scrapie species barrier. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92; 3923-3927.
- Kimberlin RH, Walker CA (1977). Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol* 34: 295-304.
  - Kimberlin R.H., Cole S., Walker C.A. 1986. Transmissible mink encephalopathy (TME) in Chinese hamsters: identification of two strains of TME and comparisons with scrapie. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* 12: 197-206.
  - Kitamoto T., Yi R., Mohri S., Tateishi J. 1990. Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob disease is influenced by the strain of the infectious agent. *Brain Res.* 508: 165-7.
  - Lloyd S.E., Onwuazor O.N., Beck J.A., Mallinson G., Farrall M., Targonski P., Collinge J., Fisher E.M., 2001. Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *PNAS* 98; 11; 6279-6283.
  - Lipp H.P., Dell’Omo G., Windl O., **Di Bari M.A.**, Marcon S., Vaccari G., Butani L., Wolfer D.P., Agrimi U. 1999. Nearly missing species barrier in wild voles inoculated with scrapie. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25: 1854.
  - Martin Y., Gerlach G., Schlotterer C., Meyer A., 2000. Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete Cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 37-47.
  - Morton D.B, Jennings M., Buckwell A., Ewbank R., Godfrey C., Holgate B., Inglis I., James R., Page C., Sharman I., Verschoyle R., Westall L., Wilson., 2001. Refining procedures for the administration of substances – Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* 35; 1-41.
  - Moore R.C., Hope J., McBride P.A., McConnell I., Selfridge J., Melton D.W., Manson J.C. 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that *Prn-p*, *Sinc* and *Prni* are congruent. *Nat. Genet.* 18: 1118-125.
  - Ma J., Wollmann R., Lindquist S. 2002. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science.* 298: 1781-5.
  - Ma J., Lindquist S. 2002. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science.* 298: 1785-8.

- Nonno R., Esposito E., Vaccari G., Conte M., Marcon S., **Di Bari M.**, Ligios C., Di Guardo G., Agrimi U., 2003. Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in Sheep. *Journal of Clinical Microbiology* September: 4127-4133.
- Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M.P., Kent S.B.H., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E., Prusiner S.B., Weissmann C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746.
- Prusiner S.B., Scott M.R., DeArmond S.J., Cohen F.E., 1998. Prion protein biology. *Cell* 93: 337-348.
- Paxinos G. e Franklin K.B.J, 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Pattison I.H., Millson G.C. 1961. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Pathol.* 71: 101-108.
- Pattison I.H. 1965. Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In *Slow, latent and temperate virus infections* (ed. D.C. Gajdusek *et al.*), NINDB Monogr. 2, pp. 249-257. U.S.Government Printing Office, Washington, D.C.
- Piening, N., Nonno, R., **Di Bari, M.A.**, Walter, S., Windl, O., Agrimi, U., Kretzschmar, H.A. and Bertsch, U. (2006) .Conversion efficiency of bank vole prion protein in vitro is determined by residues 155 and 170, but does not correlate with the high susceptibility of bank voles to sheep scrapie in vivo. *J. Biol. Chem* 2006 Feb 2.
- Prusiner S.B., McKinley M.P., Bowman K.A., Bolton D.C., Bendheim P.E., Groth D.F., Glenner G.G. 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349-358.
- Parchi P., Capellari S., Chen S.G., Petersen R.B. Gambetti P., Kopp P., Brown P., Kitamoto T., Tateishi J., Giese A., Kretzschmar H. 1997. Typing prion isoform (letter). *Nature* 386: 232-233.
- Peretz D., Williamson R.A., Legname G., Matsunaga Y., Vergara J., Burton D.R., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Scott M.R. 2002. A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron*. 34: 921-32.
- Pocchiari M. 1994. Prions and related neurological diseases. *Mol. Aspects Med.* 15:195-291. Review.

- Pocchiari M., Salvatore M., Cutruzzola F., Genuardi M., Alloatelli C.T., Masullo C., Macchi G., Alema G., Galgani S., Xi Y.G. 1993. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 34: 802-7.
- Priola SA, Chesebro B (1995) A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J Virol* 69: 7754–7758.
- Prusiner S.B. 1999. In: *Prion biology and disease* (Ed. Stanley B. Prusiner). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Race R., Meade-White K., Raines A., Raymond G.J., Caughey B., Chesebro B. (2002). Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication and adaptation of infectivity during four passages. *J. Infect. Dis.* 186:S166-S170.
- Raymond GJ, Hope J, Kocisko DA, Priola SA, Raymond LD, *et al.* (1997). Molecular assessment of the transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388: 285–288.
- Reisner *et al.*, 1993 – Prions and nucleic acids: search for “residual” nucleic acids and screening for mutations in the PrP gene. *Dev. Biol. Standard.* 80: 173-180.
- Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, *et al.* (2007). Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447: 453–457.
- Scott M.R., Will R., Ironside J., Nguyen H-O.A., Tremblay P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., 1999. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *PNAS* 96; 26; 15137-15142.
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, Dröse W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA. The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases, 2000. *Am J Pathol.* Jan;156(1):51-6.
- Sommerville R.A., Chong A., Mulqeen O.u., Birkett C.R., Wood S.C.E.R., Hope J. 1997. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature* 386: 564.
- Thuring C.M.A., Erknes J.H.F., Jacobs J.G., Bossers A., Van Keulen L.J.M., Van Zijderveld F.G., Ryder S.J., Groschup M.H., Sweeney T., Langeveld J.P.M., 2004. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in cheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *Journal of Clinical Microbiology* Mar.; 972-980.

- Telling G.C., Haga T., Torchia M., Tremblay P., DeArmond S.J., Prusiner S.P. 1996. Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev.* 10: 1736-1750.
- Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B. 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90.
- Tranulis M.A., Osland A., Bratberg B., Ulvund M.J. 1999. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J. Gen. Virol.* 80: 1073-7.
- Taylor D.M., Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A reviews. *Vet. J.* 159: 7-10.
- Vaccari G., Petraroli R., Agrimi U., Eleni C., Perfetti M.G., **Di Bari M.A.**, Morelli L., Ligios C., Busani L., Nonno R. and Di Guardo G. 2001. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. *Archives of Virology* 146: 2029-2037
- Vaccari, G., D'Agostino, C., Nonno, R., Rosone, F., Conte, M., **Di Bari, M.A.**, Chiappini, B., Esposito, E., De Grossi, L., Giordani, F., Marcon, S., Morelli, L., Borroni, R., Agrimi, U. (2007). Prion protein alleles showing protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and BSE. *Journal of Virology* Apr 18.
- Vilotte J-L, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre M-G, Vaiman D, *et al.* (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J Virol* 75: 5977–5984.
- Vorberg I., Priola S.A., 2002. Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J. Biol. Chem.* 277: 36775–81.
- Westaway D., Cooper C., Turner S., Da Costa M., Carlson G., Prusiner S.B., 1994. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91; 6418-6422.
- Westaway D., Goodman P.A., Mirenda C.A., McKinley M.P., Carlson G.A., Prusiner S.B. 1987. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51: 651-662.

- Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, McKinley MP, Carlson GA, *et al.* (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51: 651–662.
- Wilson DE, Reeder DM (2005). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2142 p.
- Zanusso, G., Polo, A., Farinazzo, A., Nonno, R., Cardone, F., **Di Bari M.A.**, Ferrari, S., Principe, S., Gelati, M., Fasoli, E., Fiorini, M., Prelli, F., Frangine, B., Tridente, G., Bentivoglio, M., Giorni, A., Schininà, M.E., Maras, B., Agrimi, U., Rizzato, N., Pocchiari, M., Monaco, S. (2007) Novel Prion Protein Conformation and Glycotype in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Archives of Neurology*, Apr;64(4):595-9.

## **Ringraziamenti**

Ringrazio *in primis* il Dr Umberto Agrimi per la sua straordinaria, efficace ed instancabile attenzione. Lo ringrazio inoltre per avermi a tempo debito spronato a seguire gli studi e per avermi sostenuto lungo un percorso professionale stimolante e ricco di soddisfazioni.

Si ringraziano, inoltre, per la collaborazione il Dr Juan Maria Torres dell'Istituto Nacional de Investigacion Agraria, Madrid ed i colleghi dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma:

Dr. Romolo Nonno

Dr. Gabriele Vaccari

Dr Claudia D'Agostino

Sig.ra Nadia Palazzini

Sig.na Geraldina Riccardi

Sig. Paolo Frassanito

Sig. Shimon Simson