

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
**EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE ZONOSI**

Ciclo XXIII

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza:**

Vet/05 Malattie infettive degli animali domestici

TITOLO TESI

**AGENTI DI ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI  
TRASMISSIBILI E ZONOSI: TIPIZZAZIONE  
MOLECOLARE**

Presentata da: **Dott.ssa Laura Pirisinu**

Coordinatore Dottorato

**Prof. Giovanni Poglayen**

Relatore

**Prof. Giovanni Poglayen**

Correlatore

**Dott. Romolo Nonno**

**Esame finale anno 2011**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
1.1. Introduzione alle EST	4
1.2. “Protein-only hypothesis” e meccanismo patogenetico	7
1.3. Ceppi di prioni	9
1.3.1. <i>Caratterizzazione biologica dei ceppi</i>	10
1.3.2. <i>Caratterizzazione biochimica dei ceppi</i>	11
1.3.3. <i>Variabilità dei ceppi negli animali e nell’uomo</i>	13
1.3.3.1. <i>Variabilità dei ceppi ovini</i>	13
1.3.3.2. <i>Variabilità dei ceppi caprini</i>	15
1.3.3.3. <i>Variabilità dei ceppi bovini</i>	15
1.3.3.4. <i>Variabilità dei ceppi nei cervidi</i>	16
1.3.3.5. <i>Variabilità dei ceppi umani</i>	17
1.4. Trasmissione e barriera di specie	18
1.4.1. <i>Parametri biologici che influenzano la trasmissione inter-specifica</i>	19
1.4.2. <i>Evoluzione dei ceppi dopo trasmissione inter-specifica</i>	20
1.4.3. <i>Determinismo molecolare della trasmissione inter-specifica</i>	21
1.5. Sanità pubblica e rischi per l’uomo	23
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>27</b>
3.1. Campioni	27
3.1.1. <i>Campioni di ceppi adattati in arvicola</i>	27
3.1.2. <i>Campioni ovini</i>	27
3.1.3. <i>Campioni umani</i>	27
3.2. Western blot ed epitope mapping	28
3.3. Saggio di stabilità conformazionale (CSSA, conformational stability and solubility assay)	29
3.3.1. <i>Separazione della PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup></i>	29
3.3.2. <i>Saggio di stabilità conformazionale (CSSA)</i>	29

3.4.	Digestione con proteinasi K dopo denaturazione con GdnHCl	30
3.5.	WB discriminatorio modificato	31
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>32</b>
4.1.	Sviluppo di una nuova tecnica per la caratterizzazione della stabilità conformazionale ceppo-specifica di PrP <sup>Sc</sup> proteasi -sensibile e -resistente (CSSA- Conformational stability and solubility assay)	32
4.1.1.	<i>Tipi di PrP in soggetti sani e malati</i>	32
4.1.2.	<i>Separazione della PrP<sup>C</sup> e della PrP<sup>Sc</sup></i>	35
4.1.3.	<i>Saggio di stabilità conformazionale: Conformational stability and solubility assay (CSSA)</i>	38
4.1.4.	<i>Stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> di arvicole con scrapie, sCJD e gCJD</i>	42
4.1.5.	<i>Stabilità conformazionale degli isolati umani e ovini</i>	45
4.1.6.	<i>Stabilità conformazionale di isolati ovini di scrapie classica e atipica (Nor98)</i>	47
4.2.	Discriminazione molecolare di BSE ovina da scrapie classica ed atipica	50
4.3.	Caratterizzazione molecolare di ceppi di EST adattati in arvicola rossastra ( <i>Myodes glareolus</i> )	55
4.4.	Confronto molecolare tra il Nor98 e le malattie umane (VPSPr e GSS)	60
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>68</b>
5.1.	Stabilità conformazionale con CSSA	68
5.2.	Discriminazione dei ceppi con il CSSA	71
5.3.	Sviluppo del WB discriminatorio	73
5.4.	Caratterizzazione molecolare di ceppi umani e animali adattati in arvicola	75
5.5.	Confronto molecolare di Nor98 con malattie da prioni umane	75
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>77</b>
	<b>PUBBLICAZIONI</b>	<b>79</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>
	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>95</b>

## RIASSUNTO

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie neurodegenerative causate dalla conversione della proteina cellulare dell'ospite (PrP<sup>C</sup>) in una isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>). L'agente responsabile delle malattie da prioni può presentarsi sotto forma di differenti ceppi con proprietà biologiche e biochimiche specifiche. In accordo con la teoria prionica, la variabilità dei ceppi risiederebbe nelle diverse conformazioni della PrP<sup>Sc</sup>. I metodi di tipizzazione molecolare dei ceppi si basano sulla mobilità elettroforetica del frammento di PrP<sup>Sc</sup> resistente alle proteasi, sulla suscettibilità alla digestione proteolitica, sul grado di glicosilazione e sulla stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup>.

In questo studio è stato sviluppato un nuovo saggio di stabilità conformazionale basato sulla solubilità differenziale di PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>, denominato Conformational Stability and Solubility Assay (CSSA). Sono state messe a punto le condizioni sperimentali in modo tale da ottenere la più vantaggiosa separazione della PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>, e successivamente è stato sviluppato il saggio di stabilità conformazionale misurando la solubilità della PrP<sup>Sc</sup> negli omogenati trattati con concentrazioni crescenti di GdnHCl in assenza di proteinasi K. Le curve dose-risposta ottenute hanno permesso di stimare la concentrazione di GdnHCl in grado di solubilizzare il 50% della PrP<sup>Sc</sup>. Oltre a ceppi adattati in arvicola rossastra il saggio è stato utilizzato per studiare isolati naturali di scrapie ovina e casi naturali umani. Il metodo ha dimostrato di essere un valido strumento per la tipizzazione biochimica dei ceppi sia adattati in arvicola rossastra che da isolati naturali.

Il potenziale discriminativo dimostrato dal CSSA con ceppi di scrapie classica, di scrapie atipica (Nor98 e CH1641-like) e BSE sia naturale che sperimentale, ha permesso di migliorare il WB discriminatorio dell'ISS integrando il grado di resistenza alla denaturazione al sito di taglio N-terminale della PrP<sup>Sc</sup>, per differenziare la BSE dalla scrapie classica e atipica nei piccoli ruminanti.

Nell'ultima parte del lavoro è stata effettuato uno studio comparativo delle proprietà biochimiche di alcune malattie umane (VPSPr e GSS) con caratteristiche simili alla scrapie atipica (Nor98). Tale studio si è basato sulle caratteristiche della PrP<sup>res</sup> (mobilità elettroforetica, resistenza alla PK ed epitope mapping) e sulla stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> (CSSA).

I risultati hanno mostrato una inaspettata variabilità tra le diverse malattie sia dei frammenti interni (peso molecolare e sito di taglio) che della stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup>. Unica interessante eccezione è mostrata da strette similitudini tra il Nor98 e un caso di GSS con la mutazione P102L. Il significato di questa importante analogia molecolare per le sue ricadute di sanità pubblica è comunque da approfondire attraverso l'analisi di un più ampio pannello di campioni e lo studio delle proprietà biologiche dei ceppi coinvolti.

**Parole chiave:** encefalopatie spongiformi trasmissibili, prione, ceppi, stabilità conformazionale, arvicola rossastra.

## ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative diseases caused by the conversion of the host-encoded cellular protein (PrP<sup>C</sup>) to a disease-associated isoform (PrP<sup>Sc</sup>). The agent responsible for prion diseases may exist as different strains with specific biological and biochemical properties. According to the protein-only hypothesis, prion strain diversity is enciphered in PrP<sup>Sc</sup> conformation. Molecular strain typing methods are based on the electrophoretic mobility of protease resistant core of PrP<sup>Sc</sup>, on the susceptibility to protease digestion, on the glycosylation profile of PrP<sup>res</sup> and on the conformational stability of PrP<sup>Sc</sup>.

In this study a new conformational stability assay was developed based on the differential solubility of PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup>: CSSA (conformational stability and solubility assay). The conformational stability assay was performed by measuring PrP<sup>Sc</sup> solubility in homogenates treated with increasing concentrations of GdnHCl, in the absence of proteinase K. Indeed, dose-response curves allowed estimation of the concentration of GdnHCl able to solubilise 50% of PrP<sup>Sc</sup>. The results showed that this method is valuable for the biochemical typing of strains in bank voles and it is also a promising tool for molecular analysis of natural prion isolates.

CSSA also revealed strain-specific PrP<sup>Sc</sup> conformational stabilities of ovine natural isolates so that this feature, combined with the N-terminal PrP<sup>Sc</sup> cleavage, allowed differentiation of classical scrapie, including CH1641-like, from natural goat BSE and experimental sheep BSE.

In view of the implications concerning strain similarity between animal and human TSEs, the physico-chemical properties of the Nor98 with two human prion diseases (VPSPr and GSS) were compared in order to investigate the extent of the similarity between animal and human prion strains. The results showed an unexpected heterogeneity of the molecular features among human and sheep TSEs associated with internal PrP<sup>res</sup> fragments with the possible exception of Nor98 and a case of GSS P102L. These similarities and differences need further investigation by N- and C-terminal sequencing and biological characterization.

**Key words:** Transmissible spongiform encephalopathies, prion, strains, conformational stability, bank vole.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.3. Introduzione alle EST

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST), o malattie da prioni, sono un gruppo di malattie neurodegenerative e trasmissibili ad esito inevitabilmente fatale, comuni all'uomo e a diverse specie animali domestiche e selvatiche (Tabella 1).

Le EST sono malattie neurologiche progressive caratterizzate da lunghi periodi di incubazione, disturbi neurologici e comportamentali con esordio spesso poco specifico e subdolo. Le lesioni a livello del sistema nervoso centrale (SNC) comprendono una degenerazione spongiosa a livello della sostanza grigia, vacuolizzazione, perdita neuronale e astrogliosi; sono sempre assenti reazioni infiammatorie/immunitarie. La caratteristica patologica fondamentale è rappresentata dall'accumulo di una isoforma patologica ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) della proteina prionica ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), una normale glicoproteina dell'ospite le cui funzioni fisiologiche sono ancora poco comprese.

Le malattie da prioni possono originare da contatto diretto o indiretto con soggetti infetti (origine acquisita), possono ritrovarsi come patologie familiari dovute a mutazioni del gene della PrP (origine ereditaria) oppure come forme idiopatiche (forme sporadiche di origine sconosciuta) (Tabella 1). Nonostante questa diversa eziologia, tutte le malattie da prioni sono trasmissibili in condizioni sperimentali, da cui la denominazione di encefalopatie trasmissibili. Inoculando infatti animali da laboratorio con materiale cerebrale proveniente da soggetti malati è possibile riprodurre sperimentalmente la malattia.

Nell'uomo le forme più frequenti sono quelle sporadiche, la cui origine è tuttora sconosciuta, che comprendono: la forma sporadica della malattia di Creutzfeldt-Jakob (sCJD), la forma sporadica dell'Insonnia Fatale (sFI) e la variably protease-sensitive prionopathy (VPSPr) (Gambetti et al., 2011; Zou et al., 2010). È stato ipotizzato che le malattie da prioni sporadiche possano essere disordini spontanei causati da mutazioni somatiche (insorte cioè in cellule somatiche e quindi non trasmissibili ereditariamente) del gene della PrP o da una variazione conformazionale spontanea (trans-conformazione) della  $\text{PrP}^{\text{C}}$  in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Prusiner, 1998). In passato è stato anche ipotizzato che le forme sporadiche siano forme acquisite da fonti alimentari o ambientali tutt'oggi non identificate. Le forme umane acquisite includono casi trasmessi accidentalmente per via iatrogena (iCJD), casi derivanti dall'esposizione a cadaveri umani durante rituali

cannibalistici come nel Kuru, o dall'esposizione presumibilmente per via alimentare a materiale derivante da animali colpiti da BSE, come nella variante di Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Prusiner, 1998). Le malattie da prioni ereditarie o familiari sono suddivise in base alle loro caratteristiche clinico-patologiche e sono la forma genetica della malattia di Creutzfeldt-Jakob (gCJD), la malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e l'insonnia familiare fatale (FFI) (Brown and Mastrianni, 2010; Capellari et al., 2011). Queste sono associate ad un ampio numero di mutazioni del gene della PrP (PRNP) e clinicamente e patologicamente sono indistinguibili dalle forme sporadiche (gCJD), oppure possono mostrare caratteristiche distintive quando associate a particolari mutazioni (come nel caso della GSS e della FFI).

Negli animali le più comuni forme acquisite sono la scrapie degli ovi-caprini, l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) e la Chronic Wasting Disease (CWD) dei cervi. La scrapie e la CWD sono forme contagiose e danno luogo a trasmissione orizzontale, indirettamente attraverso l'eliminazione dell'agente infettante nell'ambiente con i fluidi biologici, o direttamente tramite latte o saliva. Nella BSE non è mai stata descritta la trasmissione orizzontale o verticale e la larghissima diffusione in UK è stata causata principalmente dal consumo di mangimi contenenti farine di carne infette. Tra le EST animali ad occorrenza apparentemente sporadica si trovano la scrapie atipica o Nor98 negli ovi-caprini (Benestad et al., 2008) e le due forme recentemente descritte di BSE atipica nei bovini, BSE-H e BSE-L o BASE (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004).

**Tabella 1.** Encefalopatie spongiformi trasmissibili dell'uomo e degli animali

<b>Ospite naturale</b>	<b>Malattia</b>	<b>Origine</b>
Uomo	Variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD)	Infettiva (ingestione di cibo contaminato da BSE; trasfusione)
	Forma iatrogena della malattia di Creutzfeldt-Jakob (iCJD)	Infettiva (procedure chirurgiche)
	Kuru	Infettiva (ingestione, riti tribali)
	Forma sporadica della malattia di Creutzfeldt-Jakob (sCJD)	Sconosciuta
	Forma sporadica dell'insonnia familiare (sFI)	Sconosciuta
	Variably protease-sensitive prionopathy (VPSPr)	Sconosciuta
	Forma genetica della malattia di Creutzfeldt-Jakob (gCJD)	Genetica (mutazione del gene PRNP)
	Insonnia familiare fatale (FFI)	Genetica (mutazione del gene PRNP)
Ovini/capri	Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Genetica (mutazione del gene PRNP)
	Scrapie	Infettiva (trasmissione per contatto diretto/indiretto con soggetti infetti)
	Nor98 CH1641-like	Sconosciuta Sconosciuta
Bovini	Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE)	Acquisita
	BSE-L o BASE	Sconosciuta
	BSE-H	Sconosciuta
Cervidi	Malattia del deperimento cronico del cervo o Chronic Wasting Disease (CWD)	Infettiva (trasmissione per contatto diretto/indiretto con soggetti infetti)
Felini	Encefalopatia Spongiforme Felina (FSE)	Infettiva (ingestione di cibo contaminato da BSE)
Visone	Encefalopatia Spongiforme del visone (TME)	Infettiva (ingestione di cibo contaminato da BSE)

## 1.2. “Protein-only hypothesis” e meccanismo patogenetico

Una delle questioni ancora aperte delle malattie da prioni riguarda la natura eziologica dell'agente patogeno. Inizialmente fu definito come “virus lento non convenzionale” (Gajdusek, 1977) a causa delle sue dimensioni, delle sue proprietà biologiche (elevata resistenza all'inattivazione e apparente assenza di acido nucleico), trasmissibilità e lungo periodo di incubazione della malattia. Tuttavia, la mancanza dell'identificazione di acido nucleico specifico per le EST e la resistenza dell'agente infettante ai trattamenti solitamente utilizzati per inattivare i virus (calore, radiazioni, nucleasi) (Alper, 1993; Taylor, 2000) ha portato alla nascita della “protein-only hypothesis” o “teoria prionica” (Griffith, 1967). L'identificazione di una proteina insolubile e resistente alle proteasi nel cervello di animali malati (Oesch et al., 1985) ha ulteriormente corroborato tale ipotesi.

Nel 1982 Stanley Prusiner, riprendendo l'ipotesi proposta dal matematico J. Griffith introdusse il concetto di “prione” (acronimo di Proteinaceous Infectious Particle), cioè un agente infettante di natura esclusivamente proteica e parzialmente resistente alla digestione con enzimi proteolitici (proteasi K), privo di acidi nucleici (Prusiner, 1982).

L'evento patogenetico principale, che sottende tutte le malattie da prioni, è la conversione post-translazionale della proteina prionica cellulare ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in una isoforma patologica denominata  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , che si accumula nel SNC in aggregati proteici di varie dimensioni o, in alcuni casi, in forma di sostanza amiloide. Tale trans-conformazione dota la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  di proprietà biochimiche diverse dalla  $\text{PrP}^{\text{C}}$ : mentre la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  è solubile in detergenti non denaturanti, rapidamente digerita dalle proteasi e ricca di  $\alpha$ -eliche, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  è insolubile in detergenti, parzialmente resistente alla proteolisi e principalmente costituita da  $\beta$ -foglietti (Bolton et al., 1982; Meyer et al., 1986; Pan et al., 1993). Il rinvenimento di frammenti di PrP resistenti alle proteasi ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) in omogenati tissutali rappresenta ancora oggi l'unico ausilio diagnostico disponibile per la diagnosi molecolare delle malattie da prioni.

Come già detto, in condizioni sperimentali tutte le malattie da prioni sono trasmissibili. Tale proprietà non sembra però legata all'esistenza di un microrganismo convenzionale, quanto piuttosto a particelle di natura prevalentemente proteica e prive di acidi nucleici, con cui la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  co-purifica. La teoria del prione postula che la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sia il principale, se non l'unico, componente dell'agente infettante, denominato appunto

prione. La PrP<sup>Sc</sup> potrebbe formarsi spontaneamente in seguito a transconformazione della PrP<sup>C</sup>, e tale evento sarebbe fortemente favorito da alcune mutazioni del gene della PrP. Una volta formatosi un nucleo di PrP<sup>Sc</sup>, esso sarebbe in grado di indurre la variazione conformazionale di altre molecole di PrP<sup>C</sup>, in un processo autocatalitico di replicazione. Tale teoria permette di conciliare la natura spontanea e trasmissibile delle TSE ed ha trovato numerose conferme sperimentali, non ultima la descrizione dei prioni sintetici, ovvero la generazione di infettività a partire da PrP ricombinante purificata (Wang et al., 2010).

Sono stati proposti due diversi modelli di conversione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>: il “refolding model” e il “seeding model o nucleation”. Secondo il primo modello (“refolding model”) l’interazione della PrP<sup>Sc</sup> con la PrP<sup>C</sup> indurrebbe quest’ultima a trasformarsi nell’isoforma patologica. La PrP<sup>C</sup> in qualche modo si denaturerebbe (perderebbe la sua struttura terziaria) per poi rinaturarsi (refold) sotto l’influenza di una molecola di PrP<sup>Sc</sup>; i due stati sarebbero separati da una barriera costituita dalla energia di attivazione necessaria al cambiamento conformazionale, che in condizioni normali impedirebbe la conversione spontanea della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1991). Il “seeding model” (o “nucleation”) propone invece che la PrP<sup>C</sup> sia in equilibrio con la PrP<sup>Sc</sup> (o forse con un precursore), in un equilibrio fortemente a favore della PrP<sup>C</sup> e che la PrP<sup>Sc</sup> sia stabilizzata solo quando unita ad un “crystal-seed” (struttura ordinata simil-cristallina) o a un aggregato di PrP<sup>Sc</sup> formando quindi multimeri; la formazione dell’aggregato è rara ma, una volta presente, l’aggiunta del monomero avviene rapidamente (Jarrett and Lansbury, 1993). Per spiegare l’aumento esponenziale della PrP<sup>Sc</sup> e dei livelli di infettività durante l’infezione è stata anche postulata la possibile frammentazione degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> (Orgel, 1996), in un processo che porta quindi all’aumento del numero di aggregati (e quindi dei “seed” di nucleazione) e che potremmo vedere come equivalente alla replicazione dell’agente eziologico.

Accanto alla teoria prionica sono state formulate altre 2 ipotesi per spiegare l’eziologia dell’agente patogeno delle EST: quella virale e quella del virino.

Secondo l’ipotesi virale l’agente infettivo sarebbe costituito da un acido nucleico e da una o più proteine da esso codificate. Numerosi studi suggeriscono che l’infettività delle EST possa essere separata dalla PrP<sup>Sc</sup> (Barron et al., 2007; Lasmezas et al., 1997; Piccardo et al., 2007) e recenti osservazioni su small RNAs probabilmente associati

all'agente infettivo (Simoneau et al., 2009) hanno riportato un nuovo interesse verso l'ipotesi virale.

L'ipotesi del virino contempla la contestuale presenza di un acido nucleico "esogeno" e di una proteina codificata dall'ospite. Quest'ultima ipotesi, inoltre, al pari della teoria prionica giustificerebbe la mancanza di una risposta infiammatoria ed immunitaria specifica in corso di TSE sia umane che animali.

Nonostante la presenza di più ipotesi, quella prionica rimane tuttora il modello più attendibile per spiegare una serie di osservazioni come la correlazione tra le mutazioni del gene PRNP codificante la PrP e le EST genetiche (Gabizon et al., 1996), la stretta associazione tra infettività e PrP<sup>Sc</sup> (Gabizon et al., 1988), il fatto che topi knock-out per la PrP non sviluppano malattia (Bueler et al., 1993) e l'assenza di una risposta immunitaria specifica dell'ospite (Berg, 1994; Casaccia et al., 1989).

### **1.3. Ceppi di prioni**

Uno degli aspetti più controversi della teoria prionica è l'esistenza di diversi ceppi. I ceppi di prioni sono isolati infettivi che mostrano specifiche caratteristiche biologiche e biochimiche che persistono dopo trasmissioni seriali nella stessa specie.

La prima dimostrazione dell'esistenza di differenti ceppi di prioni è stata ad opera di Pattison e Millson nel 1961 (Pattison and Millson, 1961), quando trasmissioni successive di un caso di scrapie ovina in capra portarono alla comparsa di due distinti fenotipi clinici che si mantenevano costanti dopo trasmissione da capra a capra. Successivamente, passaggi seriali di omogenato cerebrale da diversi isolati di scrapie su topi inbred hanno portato all'isolamento di ceppi che differiscono tra loro e che mantengono costanti le loro caratteristiche quando re-inoculati nel topo (Bruce and Fraser, 1991). Bessen e Marsh, nel 1992, studiando due ceppi della TME, malattia da prioni del visone, fornirono importanti elementi a supporto del fatto che la specificità di ceppo fosse codificata dalla struttura conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> (Bessen and Marsh, 1992). Il trattamento con enzimi proteolitici determinava nei due ceppi una differente degradazione della PrP<sup>Sc</sup>, fatto che implicava l'esistenza di due diverse conformazioni della proteina, differentemente disponibili all'attacco degli enzimi.

Attualmente i ceppi vengono caratterizzati sia sulle loro proprietà biologiche che biochimiche.

### **1.3.1. Caratterizzazione biologica dei ceppi**

I ceppi vengono tradizionalmente distinti sulla base del periodo di incubazione e del profilo neuropatologico e clinico dopo trasmissione in un ospite ricevente (generalmente topi di laboratorio), nonché sulle capacità di trasmissione in specie diverse (Bruce, 2003; Fraser and Dickinson, 1973).

Nonostante la lunghezza dell'intervallo tra l'esposizione all'infezione e la fase clinica della malattia (che può superare i 2 anni in animali da laboratorio ed i 10 anni nell'uomo), in condizioni sperimentali il periodo di incubazione è piuttosto prevedibile e costante. È inoltre altamente ripetibile quando diversi gruppi di topi, omogenei dal punto di vista genetico, vengono inoculati con dosi equivalenti dello stesso ceppo di EST. Tuttavia, differenti ceppi testati nella stessa linea di topi mostrano periodi di incubazione significativamente diversi. Il periodo di incubazione dipende dal ceppo ma è anche influenzato da fattori genetici. Nei topi di laboratorio ad esempio sono stati trovati due alleli del gene della PrP (designati *prnp-a* e *prnp-b*) che codificano proteine che differiscono per due aminoacidi ai codoni 108 e 109 (Westaway et al., 1989). Quando i topi vengono inoculati con lo stesso ceppo di EST, il genotipo della PrP può far modificare il tempo di incubazione anche di un centinaio di giorni. L'interazione tra le proprietà intrinseche del ceppo ed il genotipo del gene della PrP è piuttosto complessa. Prendendo ad esempio le linee murine, è stato ampiamente mostrato che ciascun ceppo produce un periodo di incubazione caratteristico ed altamente riproducibile nei 3 diversi genotipi della PrP di topo (due omozigoti ed uno eterozigote). Il genotipo che mostra il più breve tempo di incubazione è PrP-a per alcuni ceppi ma per altri è PrP-b (Bruce, 1993). Quindi, a causa della diversa efficacia di trasmissione osservata in entrambe le forme alleliche, per la caratterizzazione biologica si impiegano sia linee murine con omozigosi per l'allele *prnp-a* (come ad esempio le linee C57Bl/6 ed RIII) e *prnp-b* (come VM ed IlnJ) ed i rispettivi eterozigoti.

I ceppi di EST mostrano anche differenze radicali e riproducibili nel tipo, nella gravità e nella distribuzione delle modificazioni patologiche che producono nei cervelli dei topi infetti (Fraser, 1993). Quantificando il grado di vacuolizzazione di nove aree cerebrali di sostanza grigia e tre di sostanza bianca è possibile determinare per ciascun ceppo un caratteristico profilo delle lesioni ("lesion profile") (Bruce and Fraser, 1991; Fraser and Dickinson, 1968).

Diversi ceppi possono anche differire sulla base della diversa capacità di indurre aggregati morfologicamente diversi che vanno da piccoli depositi a grandi placche amiloidi e localizzati in aree cerebrali diverse.

Sebbene il tempo di incubazione e il profilo delle lesioni siano di grande utilità nel comprendere e discriminare i ceppi, la tipizzazione biologica dei ceppi pone diversi limiti: dalla variabilità della risposta individuale degli animali inoculati, ai fattori soggettivi legati all'esperienza dell'operatore che assegna il profilo delle lesioni, ai lunghi tempi di attesa ed i costi elevati necessari per la sperimentazione animale. Inoltre i topi di laboratorio si sono rivelati molto resistenti all'infezione con vari ceppi di EST, incluse le forme sporadiche e genetiche umane, la CWD e molti ceppi di scrapie, impedendo di fatto un confronto tra ceppi di EST isolati in specie diverse. Fa eccezione il caso della BSE e della vCJD: proprio grazie alla loro trasmissibilità in topo è stato infatti possibile identificare il legame tra le due patologie, evidenziando così per la prima volta il potenziale zoonotico delle EST animali (Bruce et al., 1997).

### ***1.3.2. Caratterizzazione biochimica dei ceppi***

Nel 1992 Bessen e Marsh (Bessen and Marsh, 1992) studiando due ceppi della TME (malattia da prione del visone) trasmessi in hamster, mostrarono che l'analisi elettroforetica della PrP<sup>Sc</sup> produceva due pattern molecolari distinguibili. Il trattamento con enzimi proteolitici determinava nei due ceppi una differente degradazione della PrP<sup>Sc</sup>, implicando che la PrP<sup>Sc</sup> potesse presentarsi in due diverse conformazioni differentemente disponibili all'attacco degli enzimi. Molti altri studi hanno dimostrato che i ceppi di prioni possono essere distinti sulle differenti proprietà biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> permettendo un approccio molecolare alla caratterizzazione delle EST sia umane che animali (Collinge et al., 1996; Hill et al., 2006; Parchi et al., 1996).

La PrP è una glicoproteina legata alla membrana cellulare tramite un'ancora GPI (glicosil-fosfatidilinositolo) e di peso molecolare di 33-35 kDa. Possedendo due siti di glicosilazione, ogni singola catena polipeptidica può presentarsi in forma di-glicosilata, mono-glicosilata ad uno dei due siti o non-glicosilata. La forma patologica della PrP (PrP<sup>Sc</sup>) ha la caratteristica di essere parzialmente resistente alla digestione proteolitica con proteinasi K (PK), quindi una parte viene clivata ed una parte rimane resistente (PrP<sup>res</sup>). L'analisi elettroforetica della PrP<sup>Sc</sup> dopo PK mette quindi in evidenza tre bande proteiche corrispondenti alle forme di-, mono- e non glicosilate della proteina.

La caratterizzazione biochimica dei ceppi si basa sull'analisi delle caratteristiche elettroforetiche del frammento resistente alla PK ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ), (Bessen and Marsh, 1994; Collinge et al., 1996; Parchi et al., 1996), sul rapporto quantitativo tra le sue forme glicosilate (“profilo di glicosilazione” o “glycoform pattern”) (Hill et al., 2006), sulla resistenza della  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  alla digestione proteolitica (Jacobs et al., 2007; Kascsak et al., 1985; Kuczius and Groschup, 1999) o sul comportamento fisico-chimico della  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  dopo denaturazione (Peretz et al., 2001; Safar et al., 1998).

Per conciliare la presenza di molteplici ceppi in assenza di acido nucleico (Safar et al., 2005b), gli aggregati di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  dovrebbero essere in grado di codificare e trasmettere le informazioni di distinti stati all'interno della stessa sequenza aminoacidica, e la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  dovrebbe essere in grado di acquisire fedelmente queste informazioni durante la sua conversione in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Bessen and Marsh, 1994; Telling et al., 1996). Quindi la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  agirebbe da template nella replicazione delle nascenti molecole di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . In accordo con tali presupposti i diversi ceppi devono mantenere diversi modelli di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e queste differenze a livello molecolare dovrebbero dettare le proprietà di ceppo (Nonno et al., 2006; Parchi et al., 1996; Telling et al., 1996). I prioni sembrano quindi codificare le loro proprietà ceppo-specifiche nella struttura terziaria e/o quaternaria della  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

Peretz e colleghi hanno mostrato che la stabilità conformazionale della  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  in presenza di agenti denaturanti caotropici, come la guanidina o l'urea, varia enormemente tra diversi ceppi (Peretz et al., 2001). Utilizzando questa metodica chiamata *conformational stability assay* (CSA), è stato possibile monitorare variazioni della stabilità proteica associata a cambiamenti del fenotipo del ceppo dopo trasmissione in modelli animali (Peretz et al., 2002).

Un'altra tecnica, *conformation-dependent immunoassay* (CDI), ha mostrato l'esistenza di diverse conformazioni di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  ceppo-specifiche, quantificando l'immunoreattività della  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nativa e denaturata di 8 isolati di hamster (Safar et al., 1998).

Questi e numerosi altri studi hanno quindi portato forti evidenze a sostegno dell'ipotesi che distinti ceppi di prioni presentino o siano definiti da differenti conformazioni di  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Legname et al., 2006; Peretz et al., 2001; Peretz et al., 2002; Safar et al., 1998; Tanaka et al., 2004; Telling et al., 1996; Thackray et al., 2007b).

### ***1.3.3. Variabilità dei ceppi negli animali e nell'uomo***

Il fenomeno dei ceppi è stato a lungo studiato in laboratorio grazie all'ausilio di ceppi sperimentali stabilmente adattati in linee di topi inbred. Non è chiaro però fino a che punto la variabilità osservata in laboratorio rappresenti la variabilità reale in condizioni di campo. Purtroppo la tipizzazione biologica degli isolati naturali di scrapie e di CWD, così come dei casi di CJD, è stata a lungo limitata dalla scarsa suscettibilità dei modelli disponibili a molti isolati naturali. Lo sviluppo di topi transgenici privi di PrP murina ed over-esprimenti la PrP della specie di interesse (Wadsworth et al., 2010), nonché nuovi modelli di roditori selvatici molto suscettibili, quali l'arvicola rossastra (Nonno et al., 2006), hanno dato un deciso impulso agli studi di tipizzazione biologica dei ceppi. I risultati di questi studi, che sono ancora per la gran parte preliminari o parziali, complessivamente dipingono un quadro in cui la presenza di ceppi sembra rappresentare la regola sia negli animali che nell'uomo (Beringue et al., 2008).

#### ***1.3.3.1. Variabilità dei ceppi ovini***

La scrapie è stata scoperta più di duecento anni fa in UK, ma il numero preciso dei ceppi rimane ancora poco chiaro. L'esistenza di 26 principali polimorfismi nel gene PRNP ovino è un fattore che probabilmente influisce molto sulla descrizione della variabilità dei ceppi ovini di scrapie. In condizioni sperimentali è stato possibile propagare almeno due distinti agenti di scrapie identificati negli ospiti naturali: SSBP/1 (Dickinson et al., 1968) e CH1641 (Foster and Dickinson, 1988b) che mostrano caratteristiche simili agli isolati naturali di scrapie (Simmons et al., 2007). Tuttavia numerosi studi suggeriscono l'esistenza ulteriori ceppi di scrapie naturale (Jeffrey and Gonzalez, 2007). Il fatto che più di un ceppo possa essere presente nello stesso animale (Mazza et al., 2010) aggiunge ulteriore complicazione alla comprensione della natura e della riconoscibilità dei ceppi di EST.

Storicamente il potenziale della variabilità della scrapie è stato studiato grazie a passaggi seriali di isolati naturali in un pannello di linee murine di topi inbred in modo da isolarli e ottenerne il fenotipo biologico (Bruce, 2003). L'elevata variabilità inizialmente descritta (più di 20 ceppi, Bruce and Dickinson, 1987) è stata successivamente ridotta a 3 distinti ceppi: ME7 e 87A nei topi con genotipo *prnp-a*, e 87V nei topi *prnp-b* (Bruce, 1993, 2003; Bruce et al., 2002). Non è ancora chiara la relazione tra i ceppi adattati in topo e quelli naturalmente presenti negli isolati di EST

trasmessi, soprattutto considerando la possibilità che possano emergere nuovi ceppi dopo il superamento della barriera di specie. Un'ulteriore limitazione risiede nel fatto che i topi wild-type sono refrattari a molti isolati provenienti da soggetti omozigoti per l'allele ARQ (Bruce, 2003; Bruce et al., 2002; Foster and Dickinson, 1988a) e alla scrapie atipica (Bruce et al., 2007; Griffiths et al., 2010; Le Dur et al., 2005).

L'assenza della standardizzazione della definizione dei ceppi in altri modelli porta limitazioni aggiuntive. Tuttavia l'utilizzo di ospiti particolarmente sensibili come le arvicole rossastre (Di Bari et al., 2008) o la combinazione di linee di topi transgenici che esprimono il gene della PrP ovino o caprino (Baron and Biacabe, 2007; Baron et al., 2004; Crozet et al., 2001) potrebbe permettere una visione generale della variabilità dei ceppi nei piccoli ruminanti a causa della minore barriera di specie.

Al momento la BSE naturale non è stata mai riportata in pecora, nonostante gli ovini siano altamente suscettibili alla trasmissione sperimentale della BSE (Foster et al., 1993). La BSE sperimentale in pecore presenta comunque caratteristiche distinte rispetto ai ceppi sperimentali precedentemente studiati (Jeffrey and Gonzalez, 2007).

In Europa è stata recentemente descritta una nuova forma atipica di scrapie, denominata Nor98, grazie ad un programma di sorveglianza attiva basato sulla rapida individuazione della PrP<sup>Sc</sup> nei tessuti cerebrali al momento della macellazione. Il Nor98, isolato per la prima volta in Norvegia (Benestad et al., 2003), è caratterizzato dall'accumulo di una PrP<sup>Sc</sup> con caratteristiche biochimiche del tutto diverse da quelle della scrapie classica. L'origine della scrapie atipica non è ancora del tutto chiara, ma questa presenta caratteristiche epidemiologiche diverse dalla scrapie classica. Il Nor98 è trasmissibile sperimentalmente sia alle pecore che in modelli murini (Le Dur et al., 2005; Simmons et al., 2010), ma numerosi studi convergono nel suggerire che la sua contagiosità sia bassissima o assente, tanto che l'ipotesi prevalente è che si tratti di una forma sporadica. In particolare, il Nor98 viene diagnosticato in pecore anziane, sembra avere una prevalenza simile in tutti i paesi europei e di solito non è accompagnato da casi secondari (Fediaevsky et al., 2010; Fediaevsky et al., 2008). Studi di genetica, infine, hanno mostrato una forte associazione dei casi di Nor98 ad alcuni rari alleli di PrP (Benestad et al., 2008). E' utile però qui sottolineare come lo studio di queste "nuove" forme di EST sia ancora agli albori, e le esperienze pregresse nello studio di queste sorprendenti malattie invitano ad una certa cautela interpretativa dei dati che si vanno accumulando. A tale proposito, due studi recentemente pubblicati (Andreoletti et

al., 2011; Simmons et al., 2011) suggeriscono che il Nor98 si accumuli e riproduca anche al di fuori del SNC, enfatizzando il potenziale rischio di salute pubblica derivante dall'esposizione dell'uomo attraverso la catena alimentare.

#### *1.3.3.2. Variabilità dei ceppi caprini*

Sulla base di osservazioni cliniche e patologiche la scrapie naturale caprina presenta più di un ceppo. Uno studio storico (Dickinson, 1976) ha mostrato la presenza di due ceppi dopo il passaggio di un pool di omogenato cerebrale ovino (SSBP/1) in capre. Si sono presentati due fenotipi differenti della malattia, "drowsy" e "scratching", che dopo successivi passaggi in topi hanno mostrato di essere due differenti ceppi (Dickinson, 1976).

La caratterizzazione dei ceppi di scrapie caprina è iniziata solo recentemente e i dati di caratterizzazione biologica per stimare l'effettivo numero e le caratteristiche dei ceppi non sono ancora disponibili. Per valutare la biodiversità presente sul territorio europeo dei ceppi di scrapie caprina è stato selezionato un elevato numero di isolati naturali provenienti da diversi paesi per testarli in topi transgenici con elevata suscettibilità alla scrapie dei piccoli ruminanti. Questi isolati sono stati pre-analizzati per le caratteristiche biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> e selezionati in modo tale da rappresentare il massimo numero di tipi di PrP<sup>Sc</sup>.

I programmi europei di sorveglianza attiva hanno permesso di identificare anche nelle capre la scrapie atipica o Nor98, che sembra avere caratteristiche biologiche del tutto simili alla scrapie atipica ovina (Le Dur et al., 2005). Inoltre sono stati recentemente individuati due casi di BSE naturale nelle capre (Eloit et al., 2005; Jeffrey et al., 2006), evidenziando così il rischio di un salto di specie della BSE.

#### *1.3.3.3. Variabilità dei ceppi bovini*

Ci sono forti evidenze che mostrano che un unico agente è stato responsabile dell'epidemia di BSE, sebbene dopo passaggio in laboratorio siano stati isolati due ceppi (Bruce et al., 1997).

In Europa, Giappone e Stati Uniti i tests su larga scala, effettuati per verificare la presenza di PrP<sup>Sc</sup> in tessuti nervosi, hanno portato al ritrovamento di due forme molecolari distinte dalla BSE riconducibili a possibili forme sporadiche di EST nei bovini (Biacabe et al., 2008).

Le forme atipiche di BSE sono state chiamate H-type Atypical BSE (H-BSE) e L-type Atypical BSE (L-BSE o BASE). Il peso molecolare della PrP<sup>Sc</sup> associata a queste forme differisce dalla BSE classica in termini di dimensioni del frammento resistente alle proteasi e al glicoprofilo (Biacabe et al., 2004; Buschmann et al., 2006; Casalone et al., 2004). Inoltre la BASE ha la tendenza peculiare di formare placche amiloidi nel cervello bovino e presenta una distribuzione cerebrale distinta dalla BSE classica (Casalone et al., 2004).

La trasmissione sperimentale dei casi di H-BSE a diverse linee di topi transgenici per la PrP bovina ha mostrato senza dubbio la sua natura infettiva. Le prime trasmissioni di H-BSE hanno prodotto un fenotipo diverso dalla BSE classica (Beringue et al., 2006; Buschmann et al., 2006; Capobianco et al., 2007; Casalone et al., 2004). Anche la BASE ha mostrato caratteristiche fenotipiche distinte rispetto alla BSE classica dopo trasmissione in topi transgenici (Beringue et al., 2007; Beringue et al., 2006; Buschmann et al., 2006; Capobianco et al., 2007).

#### *1.3.3.4. Variabilità dei ceppi nei cervidi*

La malattia del deperimento cronico dei cervidi (Chronic wasting disease, CWD) colpisce il cervo mulo o mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*), cervo della Virginia o dalla coda bianca o white mule deer (*Odocoileus virginianus*), il cervo delle Montagne Rocciose o elk (*Cervus elaphus nelsoni*) e l'alce (*Alces alces shirasi*) (Sigurdson, 2008). La descrizione della variabilità della CWD è complicata dalla molteplicità delle specie colpite. Dalla prima scoperta in Colorado nel 1967, la malattia è ormai stata trovata in 15 paesi degli Stati Uniti e 3 province canadesi. Nonostante la sua origine rimanga un enigma, molti aspetti della sua fisiopatologia ricordano la scrapie ovina. La CWD non si trasmette facilmente in topi wild-type ad eccezione dell'arvicola rossastra (Di Bari et al., poster Neuroprion 2008, Madrid) ma negli ultimi anni sono state sviluppate diverse linee murine transgeniche che esprimono la PrP di elk o deer (Browning et al., 2004; Kong et al., 2005; Tamguney et al., 2006).

Recentemente la prevalenza dei ceppi di CWD proveniente da cervidi in cattività e selvatici e da diverse regioni sono stati analizzati in topi transgenici (Angers et al., 2010). Lo studio ha evidenziato due ceppi prevalenti, CWD1 e CWD2, con diverse proprietà cliniche e neuropatologiche. Tuttavia gli studi sulla CWD sono relativamente

recenti e la diversità presente nelle EST dei cervidi non è ancora stata caratterizzata completamente.

#### *1.3.3.5. Variabilità dei ceppi umani*

La caratterizzazione dei ceppi delle EST umane è stata limitata dalla scarsa suscettibilità dei modelli disponibili a molti isolati naturali. Lo sviluppo di modelli murini transgenici esprimenti la PrP umana (Bishop et al., 2010) e l'utilizzo di modelli di roditori selvatici molto suscettibili, come l'arvicola rossastra (Nonno et al., 2006), hanno comunque permesso di evidenziare una certa variabilità anche nei ceppi di EST umane.

Lo spettro dei fenotipi delle malattie da prioni umane è piuttosto ampio e recentemente è stato classificato in sottotipi o varianti dove le modificazioni spongiformi e la deposizione della PrP<sup>Sc</sup>, con o senza placche amiloidi, sono associate in qualche modo ad una particolare distribuzione anatomica. Inoltre sono state descritte due principali forme di PrP<sup>Sc</sup> con distinte proprietà fisico-chimiche, ed è stato dimostrato che il polimorfismo del codone 129 del gene PRNP gioca un ruolo critico nella patogenesi delle EST umane. È divenuta sempre più chiara la correlazione tra i) le caratteristiche molecolari del tipo di PrP<sup>Sc</sup>, determinato attraverso il western blot e il genotipo al codone 129, ii) il fenotipo patologico definito dalla distribuzione regionale e la combinazione delle modificazioni spongiformi e deposizione di PrP<sup>Sc</sup>, iii) le caratteristiche cliniche come durata della malattia, età di insorgenza, segni clinici e sintomi (Cali et al., 2006; Capellari et al., 2011; Gambetti et al., 2011; Parchi et al., 2011).

Gli studi di tipizzazione biologica oggi disponibili confermano che diversi sottotipi di sCJD così definiti posseggono effettivamente proprietà biologiche distinte, in accordo con la classificazione clinico-patologica.

Inoltre, studi basati sulla caratterizzazione biologica e molecolare hanno evidenziato che nella vCJD umana e la BSE bovina è coinvolto lo stesso ceppo (Bruce et al., 1997; Collinge et al., 1996).

La malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker è un disordine dovuto a mutazioni nel gene della proteina prionica (PRNP). La forma più comune di GSS è causata dalla sostituzione della prolina (P) in leucina (L) al residuo 102 (GSS P102L) della PrP. Altre forme meno frequenti di GSS includono la P105L (prolina in leucina al residuo 105),

A117V (valina al posto di alanina al residuo 117), F198S (serina al posto della fenilalanina al residuo 198), Q217R (arginina al posto della glutammina al residuo 217), Q212P (prolina al posto della glutammina al residuo 212) e GSS D202N (asparagina al posto dell'acido aspartico al residuo 202). Le varie forme di GSS presentano una notevole variabilità fenotipica riguardo la durata della malattia, presentazione clinica, e presenza o assenza di degenerazione spongiforme. Anche dal punto di vista molecolare le isoforme di PrP<sup>res</sup> mostrano elevata eterogeneità: la GSS P102L con modificazioni spongiformi è spesso associata a grandi quantità di PrP<sup>res</sup> ad alto peso molecolare (21-30 kDa) simile a quella presente nella CJD. I peptidi a basso peso molecolare (7-15 kDa) osservati in aree con o senza degenerazione spongiforme si ritrovano in P102L, F198S, A117V, D202N, Q212P e Q217R (Parchi et al., 1998; Piccardo et al., 1998).

L'insonnia familiare fatale è causata dalla mutazione di GAC in AAC al codone 178 che causa la sostituzione dell'acido aspartico con asparagina (D178N): aplotipo 178N 129M. La stessa mutazione ma associata al polimorfismo 129V è classificata come CJD genetica e l'analisi elettroforetica della PrP<sup>res</sup> mostra che nel caso di CJD la PrP<sup>res</sup> è di tipo 1 (21 kDa) mentre nel caso dell'FFI è di tipo 2 (19 kDa) (Gambetti et al., 1995).

#### **1.4. Trasmissione e barriera di specie**

Generalmente la trasmissione inter-specifica, di solito in roditori da laboratorio, è meno efficiente di quella intra-specifica mostrando lunghi periodi di incubazione e un'efficienza di trasmissione incompleta. In generale, questa "barriera di specie" è eliminata dopo pochi sottopassaggi (di solito 2-3), a mostrare un adattamento del prione al suo nuovo ospite. Come descritto nel precedente paragrafo, lo sviluppo dei modelli animali ha permesso di ricapitolare la maggior parte delle caratteristiche fisiopatologiche osservate nelle malattie naturali, permettendone una caratterizzazione sulla base delle proprietà biologiche dopo trasmissione (tempi di incubazione, distribuzione e grado di vacuolizzazioni nel cervello). Poiché le differenze osservate in topi omozigoti per il gene della PrP non sono dovute a differenze nella sequenza di PrP, è evidente che le differenze risiedano nelle informazioni dettate dal ceppo. In accordo con la teoria prionica, i ceppi sarebbero associati a specie di PrP<sup>Sc</sup> che differiscono sulla base delle loro proprietà biochimiche, quindi queste informazioni risiederebbero nella conformazione della PrP<sup>Sc</sup>, in particolare nella struttura terziaria della proteina prionica.

### ***1.4.1. Parametri biologici che influenzano la trasmissione inter-specifica***

La sequenza della PrP è molto conservata tra le specie di mammiferi, ma anche minime divergenze possono avere un grande impatto sull'efficienza di trasmissione. Inoltre, anche all'interno della stessa specie la suscettibilità alle EST è influenzata da variazioni della sequenza della PrP, come ad esempio nel caso della scrapie in pecore con polimorfismi a livello dei codoni 136, 154 e 171 e nel caso dell'uomo con il polimorfismo a livello del codone 129. Poiché è stato mostrato da diversi studi che la barriera tra le specie risiederebbe essenzialmente nelle differenze tra la struttura primaria della PrP del donatore e del ricevente, cioè nella sequenza aminoacidica della PrP, lo sviluppo di topi transgenici esprimenti la PrP della specie donatrice ha permesso di ridurre questo ostacolo (Asante et al., 2002; Buschmann and Groschup, 2005; Crozet et al., 2001; Kong et al., 2005).

Oltre alla sequenza della PrP dell'ospite, il tipo di ceppo svolge un ruolo fondamentale nella trasmissione inter-specifica. Ad esempio, la BSE ha mostrato di avere una certa facilità a trasmettersi in altre specie come nei ruminanti esotici, nei felini e nell'uomo (Bruce et al., 1997; Collinge et al., 1996; Scott et al., 1999). Altro esempio dell'importanza del ceppo è mostrato dagli isolati umani di sCJD e gCJD facilmente trasmessi in arvicola rossastra nonostante le divergenze di sequenza della PrP (Nonno et al., 2006).

Alla luce di tutti questi studi è ormai evidente che sia il ceppo che la sequenza della PrP dell'ospite ricevente siano i principali determinanti della barriera di specie (Collinge, 2001). Sembrerebbe quindi più appropriato parlare di "barriera di ceppo" piuttosto che di barriera di specie (Scott et al., 2005).

Anche la via di infezione può influenzare l'entità della barriera di trasmissione. Spesso nelle infezioni sperimentali viene utilizzata la via intracerebrale perché le vie più naturali, principalmente quella orale, sono molto meno efficienti. Generalmente il coinvolgimento dei tessuti periferici ed i relativi livelli di infettività dipendono dal ceppo, ma può anche accadere che un ceppo possa diventare linfotropico dopo trasmissione in un'altra specie come nel caso della BSE trasmessa in ovini (Foster et al., 2001) o all'uomo (Wadsworth et al., 2001).

### ***1.4.2. Evoluzione dei ceppi dopo trasmissione inter-specifica***

La trasmissione inter-specifica degli agenti di EST può avere diversi esiti che possono variare, in modo imprevedibile, in base al ceppo coinvolto. Si può infatti avere un'assenza completa di malattia, una forma subclinica o con un decorso piuttosto lungo, così come una trasmissione relativamente efficace. Inoltre, nel nuovo ospite è possibile re-isolare lo stesso ceppo del donatore così come si può verificare la formazione di un nuovo ceppo con nuove proprietà specifiche (Kimberlin and Walker, 1978).

Quando un ospite risulta totalmente resistente all'infezione di prioni provenienti da un'altra specie si parla di "barriera di specie assoluta". Ad esempio il coniglio sembra essere resistente alla trasmissione intracerebrale di prioni provenienti da molte specie come ceppi murini di scrapie, CJD umana, kuru e BSE. Ciò suggerisce una vera e propria resistenza da parte dell'ospite piuttosto che un effetto derivante dal ceppo. Numerosi studi hanno comunque dimostrato che la resistenza del coniglio a diverse EST sia dovuta alla sequenza della PrP<sup>C</sup> piuttosto che ad altri fattori legati all'ospite (Vorberg et al., 2003).

Il successo di una trasmissione inter- ed intra-specifica è misurata sulla comparsa dei segni neurologici prima dell'esito fatale. Comunque l'assenza dei segni clinici non implica necessariamente una barriera di specie assoluta. Numerosi studi hanno infatti mostrato che materiale cerebrale proveniente da soggetti che non avevano mostrato alcun segno clinico è infettante se inoculato nella stessa specie o in altre specie (Nonno et al., 2006; Race and Chesebro, 1998). La barriera di trasmissione può presentarsi oltre che come malattia subclinica anche con periodi di incubazione molto lunghi oppure determinare malattia nella specie ricevente senza che sia poi trasmissibile (fondo cieco).

Generalmente il mantenimento del fenotipo è osservato dopo trasmissioni sperimentali in topi transgenici esprimenti la PrP del donatore. Spesso viene mantenuto non solo il pattern molecolare della PrP<sup>res</sup> ma anche alcuni segni clinici, lesioni patologiche come le placche o la presenza/assenza di linfotropismo (Collinge et al., 1996; Crozet et al., 2001; Sigurdson et al., 2006). Può anche verificarsi che la reinfezione della specie di origine (o di topi transgenici esprimenti la sequenza di PrP corrispondente), possa ristabilire il fenotipo originale, indicando quindi la conservazione delle proprietà del ceppo.

Il fenomeno della comparsa di nuovi ceppi dopo trasmissioni sperimentali è stato a lungo documentato. Il primo esempio è stato fornito dalla trasmissione di un pool di

omogenato cerebrale ovino con scrapie (SSBP/1) in capre che ha portato a due fenotipi diversi (nominati sindrome “scratching” e “drowsy”) mantenuti in successivi sottopassaggi (Dickinson, 1976). Ciò che rimane ancora poco chiaro e che genera interesse nella comunità scientifica è se le componenti di diversi ceppi pre-esistano nell’inoculo originario o se invece varianti di EST emergano durante la trasmissione in un’altra specie, verosimilmente a causa della replicazione della PrP<sup>Sc</sup> in un ospite con una diversa sequenza aminoacidica della PrP.

I numerosi studi di trasmissione portano quindi alla conclusione che i) l’entità della barriera di specie non dovrebbe basarsi esclusivamente sui segni clinici; ii) le malattie subcliniche dovrebbe essere distinte da quelle caratterizzate da un lungo periodo di incubazione; iii) potrebbe avvenire una interazione tra PrP<sup>Sc</sup> eterologhe che porta ad una conversione al di sotto dei limiti di rilevamento dei metodi tradizionali; iv) potrebbe emergere un nuovo ceppo con caratteristiche nuove; v) questi nuovi ceppi potrebbero non essere patogeni per l’ospite, ma potrebbero esserlo per una terza specie così come per quella del donatore. Risulta evidente come tutte queste evenienze presentino importanti ricadute di salute pubblica, laddove la possibile trasmissione di forme di EST in nuove specie animali potrebbe dare origine a forme silenti e potenzialmente patogene per un range di specie più ampio del ceppo originario, non escluso l’uomo.

### ***1.4.3. Determinismo molecolare della trasmissione inter-specifica***

Nonostante siano assenti precise informazioni strutturali riguardo la struttura tridimensionale della PrP<sup>Sc</sup>, molti studi suggeriscono che i ceppi di prioni sono associati a distinte conformazioni di PrP<sup>Sc</sup> (Peretz et al., 2001; Peretz et al., 2002; Safar et al., 1998).

Studi con PrP ricombinante hanno fornito un altro punto di vista del concetto di ceppo e barriera di specie. Questi studi si basano sulle proprietà della PrP ricombinante di polimerizzare in fibrille amiloidi sia spontaneamente che dopo aggiunta di piccole quantità di fibrille pre-formate (“seeding”). Questo effetto di innesco fornito dal “seed” è caratteristico del processo di polimerizzazione proposto dal “*seeding model*” o “*nucleation*” (vedi sopra).

Surewitz et al., hanno fornito un elegante modello per comprendere la diversità dei ceppi che consiste nella fibrillizzazione di varianti monomeriche e solubili della PrP (PrP23-144). Fibrille amiloidi generate da forme tronche di PrP di topo, uomo e criceto

sono risultate morfologicamente e spettroscopicamente differenti (Jones and Surewicz, 2005; Vanik et al., 2004). La capacità di queste fibrille di innescare la polimerizzazione della PrP di altre specie (“*cross-seeding*”) è inoltre risultato variabile. Le fibrille di topo, infatti, non convertono i monomeri di PrP di criceto mentre è possibile il contrario. Una volta innescate da quelle di criceto, le fibrille di topo sono però capaci di innescare a loro volta la polimerizzazione di quelle di criceto. Sembra inoltre che le fibrille di topo polimerizzate a partire da “seed” di criceto abbiano adottato la struttura secondaria e l’architettura fibrillare del seed amiloide di criceto (Jones and Surewicz, 2005). Gli autori hanno anche mostrato che i punti di mutazione specie-specifici influiscono profondamente sulla specificità dell’innescamento della PrP<sup>23-144</sup> (Vanik et al., 2004). Questo è accompagnato da un cambiamento di conformazione dell’amiloide, con le fibrille che adottano quella della PrP corrispondente alle diverse specie. In generale, questi studi suggeriscono che i) le proprietà del seeding sono codificate nella conformazione delle fibrille amiloidi; ii) alcuni tipi di seed potrebbero essere capaci di interagire con monomeri eterologhi nel caso siano all’interno dello spettro delle conformazioni permesse (ciò richiede che la proteina normale sia conformazionalmente adattabile alla conformazione del seed amiloide); iii) la varietà di conformazioni che il monomero può adottare in seguito a polimerizzazione è dettato dalla sequenza aminoacidica. Ciò che ne consegue quindi è che la conformazione delle fibrille e la sequenza di PrP sono intrinsecamente collegate.

Prendendo in esame gli studi portati avanti sui prioni dei lieviti e quelli dei mammiferi, è stato proposto un modello che integra il concetto di ceppo e la barriera di specie con la protein-only hypothesis (Collinge and Clarke, 2007). In questo modello (“*conformational selection hypothesis*”), sia i ceppi di prioni che la barriera di specie sono fondamentalmente le manifestazioni dello stesso fenomeno, cioè la capacità di una singola proteina di modificarsi in conformazioni multiple. Ciascuna specie avrebbe una varietà di possibili conformazioni di PrP<sup>Sc</sup>, determinate essenzialmente dalla conformazione della PrP<sup>Sc</sup> dell’inoculo infettante e dai limiti conformazionali imposti dalla struttura primaria della PrP dell’ospite. Quindi un cambiamento aminoacidico della PrP<sup>C</sup> può modulare questo spettro e un cambiamento della conformazione della PrP<sup>Sc</sup> associata alla trasmissione inter-specifica potrebbe modificare la gamma delle specie ospiti e/o i tratti fenotipici del ceppo. L’entità della barriera di specie sarà quindi determinata dal grado di sovrapposizione tra le conformazioni favorite dall’ospite e

dalla PrP<sup>Sc</sup> del donatore. In sintesi, la trasmissione eterologa nella quale la PrP<sup>Sc</sup> possiede una conformazione all'interno della gamma di conformazioni permessa dall'ospite esiterà in una bassa barriera di trasmissione. Se invece la conformazione è incompatibile, la barriera di trasmissione sarà alta e superabile solo nel caso in cui emerga una nuova variante con una migliore compatibilità strutturale.

Nonostante nell'inoculo infettante sia rilevata comunemente una conformazione dominante di PrP<sup>Sc</sup>, altre potrebbero essere presenti in proporzioni variabili. Questa diversità potrebbe dipendere dalla presenza di più di un ceppo nell'inoculo (Kimberlin and Walker, 1978; Mazza et al., 2010) o da una variabilità intrinseca degli stati fisico-chimici della PrP<sup>Sc</sup> presente nel materiale infettante. In quest'ultima ipotesi, stati conformazionali minori potrebbero essere continuamente generati durante la replicazione dei prioni, e questi potrebbero essere preferenzialmente amplificati durante la trasmissione in un ospite con diversa sequenza aminoacidica della PrP, portando quindi ad uno shift del ceppo. Queste considerazioni sottendono allo studio del potenziale evolutivo dei prioni (Li et al., 2010), che rappresenta una nuova frontiera dello studio delle EST e del loro potenziale zoonotico.

## **1.5. Sanità pubblica e rischi per l'uomo**

Diversi studi hanno ormai mostrato forti evidenze del legame tra la variante di Creutzfeldt-Jakob dell'uomo e la BSE dei bovini (Bruce et al., 1997; Collinge et al., 1996).

La scrapie è stata scoperta più di duecento anni fa e tutt'oggi non sono emerse evidenze epidemiologiche di trasmissione all'uomo. La BSE è stata diagnosticata nei bovini negli anni '80 (Wells et al., 1987) e successivamente ha acquisito le caratteristiche di una epidemia in molti paesi europei. Dieci anni dopo, nell'uomo è stata identificata una variante della malattia di Creutzfeldt-Jacob collegata al consumo di prodotti contaminati da BSE (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997). Durante l'epidemia di BSE anche la popolazione ovi-caprina è stata esposta ad alimenti contaminati da BSE, quindi è ipotizzabile che possa esserci stata trasmissione in queste specie (Baylis et al., 2002). Fino ad oggi non sono stati riportati casi di BSE in ovini, tuttavia sia pecore che capre sono suscettibili alla trasmissione sperimentale di BSE (Bellworthy et al., 2005; Foster et al., 1993; Stack et al., 2009) e sono stati riportati 2 casi di BSE naturale in capra (Eloit et al., 2005; Jeffrey et al., 2006). Come descritto

sopra, alcuni ceppi di prioni possono modificare le proprietà biologiche e biochimiche dopo trasmissione in un'altra specie. Nel caso della BSE, l'infezione nei bovini è ristretta al sistema nervoso centrale (Espinosa et al., 2007; Wells et al., 2005) mentre nelle pecore con BSE sperimentale la PrP<sup>Sc</sup> è distribuita nel tessuto linfoide (Bellworthy et al., 2005; Foster et al., 1996), suggerendo che gli ovini potrebbero essere una fonte secondaria di infezione di BSE più pericolosa per l'uomo.

Recentemente è stata investigata la suscettibilità dell'uomo alla BSE dopo passaggio nei piccoli ruminanti utilizzando come modelli sperimentali topi transgenici esprimenti PrP umana (Padilla et al., 2011; Plinston et al., 2011). In questi studi è stato mostrato che gli isolati di BSE ovini e caprini aumentano la suscettibilità dei topi umanizzati e rivelano una maggiore efficienza di trasmissione rispetto agli isolati di BSE bovina. Questi risultati suggeriscono che non possa essere esclusa la possibilità di collegamento tra la BSE nei piccoli ruminanti e la vCJD e che il rischio per l'uomo può essere amplificato dal passaggio di forme zoonotiche in altre specie.

Tali motivi hanno spinto la Commissione Europea ad incrementare i controlli sulla possibile circolazione della BSE nei piccoli ruminanti attraverso metodiche discriminative di tipo biologico e biochimico. Tuttavia le problematiche legate all'individuazione della BSE nei piccoli ruminanti sono complicate dalla presenza di numerosi ceppi dell'agente eziologico della scrapie (come ad esempio i casi degli isolati CH1641-like, che presentano caratteristiche molecolari non dissimili dalla BSE).

Grazie all'incremento della sorveglianza delle TSE e all'introduzione della sorveglianza attiva in Europa, sono state recentemente descritte nuove EST dei ruminanti come il Nor98 negli ovi-caprini e due nuove forme di BSE, denominate BSE-H e BASE (o BSE-L). L'origine di tali forme di EST rimane tuttora ignota, ma esse presentano caratteristiche epidemiologiche del tutto diverse dalla scrapie e dalla BSE. Il Nor98 è trasmissibile sperimentalmente sia alle pecore che in modelli murini, nonostante la sua contagiosità sia bassissima o assente e si ipotizza che sia una forma sporadica (Benestad et al., 2008). Per quanto riguarda la H-BSE e la BASE, la loro distribuzione non sembra suggerire alcun legame con l'epidemia di BSE. Entrambe sono forme sperimentalmente trasmissibili e, inoculate in bovini o in modelli transgenici, danno ceppi diversi dalla BSE. Anche queste forme colpiscono animali anziani, non sono linfotropiche, e sono molto rare. Per quanto l'origine di queste forme

sia ancora del tutto ipotetica, i dati disponibili suggeriscono che si possa trattare di forme sporadiche di EST.

Alla luce del potenziale zoonotico delle EST è opportuno chiedersi quale rischio pongano per l'uomo queste nuove forme di EST animali. Mentre da un lato il numero di casi di vCJD sembra in continua diminuzione, l'origine dei casi umani di sCJD resta tutt'oggi ignota. I casi di sCJD si presentano in modo casuale sia temporalmente che geograficamente. Non ci sono al momento evidenze di fonti di infezione nell'ambiente ma gli studi epidemiologici sulle forme sporadiche di CJD nell'uomo non possono considerarsi definitivi e tali da escludere che un piccolo numero di casi possa avere un'origine zoonotica.

Un possibile legame tra queste forme atipiche dei ruminanti e le TSE umane è suggerito da alcune somiglianze molecolari della PrP<sup>Sc</sup>, non osservate in precedenza tra forme umane ed animali se non nel caso della BSE e della vCJD. In particolare, la BASE è associata ad una PrP<sup>res</sup> molto simile a quella osservata nelle sCJD di tipo 2, mentre il Nor98 è caratterizzato dalla presenza di un frammento di PrP<sup>res</sup> a basso peso molecolare, simile a quello riscontrato in rare forme sporadiche e familiari umane (VPSPr e GSS).

Oltre agli studi di caratterizzazione molecolare, gli studi di trasmissione in modelli animali offrono evidenze a supporto della potenziale relazione tra forme sporadiche umane ed animali. Ad esempio studi sulla trasmissibilità della BASE all'uomo utilizzando primati o topi transgenici esprimenti PrP umana suggeriscono che la BASE possa essere trasmissibile all'uomo, ed inoltre studi di trasmissione in arvicola mostrano una possibile identità di ceppo tra la BASE ed alcune varianti clinico-patologiche di sCJD (Comoy et al., 2008; Kong et al., 2008; Agrimi et al., comunicazione a congresso, Venezia 2009).

Sebbene siano necessari ulteriori studi, di trasmissione ed epidemiologici, al fine di acquisire un quadro realistico del reale rischio per l'uomo posto dalle TSE animali, i risultati di alcuni studi sono compatibili con una possibile origine zoonotica di alcuni sottotipi di sCJD rappresentando una nuova sfida per le strategie di controllo di queste malattie. Ciò invita quindi a individuare le strategie di sorveglianza economicamente sostenibili che permettano di coniugare le necessità di raccogliere informazioni circa la prevalenza e l'identità dei prioni presenti nei ruminanti domestici e la protezione della salute pubblica.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Sin dai primi studi sulla scrapie ovina è stato evidente che le malattie da prioni presentano una notevole variabilità. Tale variabilità è da riferirsi all'esistenza di ceppi di prioni che presentano caratteristiche biologiche e biochimiche specifiche, in grado di mantenersi stabili dopo trasmissioni seriali nella stessa specie ospite.

Le strategie messe in atto per caratterizzare i ceppi di prioni si basano sull'analisi delle proprietà biologiche dopo trasmissione in modelli animali (tempi di incubazione, segni clinici, profilo delle lesioni, distribuzione e tipo di depositi di PrP<sup>Sc</sup>, ecc.) e sull'analisi delle proprietà biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> (studio del frammento resistente alla PK, resistenza alla digestione proteolitica, grado di glicosilazione, stabilità conformazionale, ecc). L'utilizzo di tali approcci ha permesso di poter identificare nella BSE la possibile causa della comparsa della nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob nell'uomo. Sino ad ora l'unica malattia da prioni riconosciuta come zoonotica rimane la BSE, ma la scoperta di nuove forme di EST animali ed umane di origine ancora sconosciuta spinge avanti la ricerca sull'individuazione dei potenziali rischi per l'uomo derivanti da ceppi di prioni animali trasmissibili all'uomo.

Lo scopo di questo lavoro di dottorato è stato lo studio delle caratteristiche biochimiche di ceppi di prioni animali ed umane al fine di investigare il potenziale zoonotico di alcune forme di EST. In particolare ci si è proposti di approfondire le tecniche di tipizzazione molecolare dei prioni al fine di incrementarne il potere discriminativo e di ovviare almeno in parte alle carenze dei metodi oggi in uso. A tale fine è stata sviluppata una tecnica in grado di discriminare i ceppi sulla base della loro stabilità conformazionale, con il vantaggio di includere nell'analisi sia le forme di PrP<sup>Sc</sup> proteasi resistenti che quelle sensibili, la cui caratterizzazione è stato fino ad oggi elusiva.

L'associazione di tecniche di tipizzazione molecolare già in uso con il saggio messo a punto, ha permesso di discriminare i ceppi di prioni adattati nel modello animale (arvicola rossastra) e discriminare quelli provenienti dall'ospite naturale. Inoltre è stato portato avanti uno studio comparativo tra alcuni ceppi di prioni animali e umani di recente scoperta e di origine ancora non del tutto nota.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. Campioni**

##### ***3.1.1. Campioni di ceppi adattati in arvicola***

Le arvicole rossastre sono state inoculate per via intracerebrale con isolati naturali di scrapie classica, BSE, BASE, sCJD (MM1, MV1, MM2, MV2, VV2), gCJD (E220K). Sono stati analizzati i ceppi adattati dopo trasmissione secondaria o terziaria.

##### ***3.1.2. Campioni ovini***

Sono stati analizzati isolati naturali di ovini con scrapie classica e atipica (Nor98) provenienti dalla sorveglianza italiana attiva e passiva e già caratterizzati tramite western blot (WB) discriminatorio per la tipizzazione molecolare dei ceppi e sequenziamento completo del gene PRNP in accordo con protocolli pubblicati (Mazza et al., 2010; Vaccari et al., 2007). I dettagli di questi casi sono riportati in Tabella 3, 4 e 5.

Sono stati inoltre analizzati isolati naturali ovini di CH1641-like e un caso naturale di BSE in capra provenienti dalla sorveglianza francese.

Il caso sperimentale di CH1641 è stato fornito gentilmente da N. Hunter (Institute for Animal Health, Edinburgh, Scotland), mentre i casi di BSE sperimentale trasmessi per via intracerebrale o orale in ovini con differenti genotipi provengono da uno studio già pubblicato da Vaccari et al., 2007.

##### ***3.1.3. Campioni umani***

Sono stati analizzati casi di CJD sporadica MM1 e MM2 utilizzati come inoculi per la trasmissione in arvicola (Nonno et al., 2006) e casi di VPSPr e GSS con mutazione F198S, A117V e P120L (con diversi polimorfismi al codone 129: MM, MV, VV), messi gentilmente a disposizione dal Prof. Pierluigi Gambetti durante il mio periodo di permanenza presso il National Prion Disease Pathology Surveillance Center, Case Western Reserve University, Cleveland, OH USA.

### 3.2. Western blot ed epitope mapping

L'elettroforesi e il western blot sono stati eseguiti come descritto precedentemente (Nonno et al., 2006).

I campioni sono stati denaturati aggiungendo NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) e NuPage Sample Reducing Agent (Invitrogen), e sono stati scaldati a 90°C per 10 min. Dopo centrifugazione a 10000g per 5 min, ciascun campione è stato caricato in gel di Bis-Tris poliacrilammide al 12% (Invitrogen). Dopo l'elettroforesi e trasferimento delle proteine su membrane in PVDF (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA), i blot sono stati processati con SNAP i.d.<sup>TM</sup> Protein Detection System (Millipore) secondo le istruzioni del produttore.

Per l'epitope mapping gli omogenati cerebrali (20% w/v) sono stati trattati con proteinasi K: 250 µg/ml per i campioni di arvicola e 100 µg/ml per gli isolati naturali ovini ed umani. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (gli epitopi fanno riferimento alla sequenza di PrP ovina): SAF84 (aa 167-173), 1.2 µg/ml; SAF60 (157-161), 0.4 µg/ml; 12F10 (aa 144-152), 1µg/ml; L42 (aa 148-153), 0.28 µg/ml; F89 (140-147), 3.3 µg/ml; 8G8 (100-107), 1µg/ml ; 6D11 (101-104), 0.2 µg/ml; 9A2 (102-104), 0.4 µg/ml; 6C2 (114-119); P4 (93-99), 1.2 µg/ml; 12B2 (93-97), 2.4 µg/ml, SAF32 (octarepeat), 2.4 µg/ml. Come anticorpo secondario è stato usato un anti-mouse coniugato con l'enzima HRP (Horseradish peroxidase) della Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, United States ed usato alla diluizione di 1:13000.

Le membrane sono state sviluppate con metodo chemiluminescente (SuperSignal Femto, Pierce). Il segnale ottenuto dalla chemiluminescenza è stato rilevato con il sistema per le immagini VersaDoc (Bio-Rad) ed è stato quantificato con il software QuantityOne (Bio-Rad).

La deglicosilazione è stata eseguita aggiungendo a 5 µl di ciascun campione denaturato 18 µl di buffer sodio fosfato allo 0.2 M (pH 7.4) contenente 0.8% di Nonidet P40 (Roche) e 2 µl (80 U/ml) di N-Glycosidase F (Roche) e incubando overnight a 37°C in agitazione. I campioni sono stati poi analizzati in WB come descritto sopra.

### **3.3. Saggio di stabilità conformazionale (CSSA, conformational stability an solubilità assay)**

#### ***3.3.1. Separazione della PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup>***

Gli omogenati cerebrali (20% w/v) sono stati preparati in TrisHCl 100 mM con inibitori delle proteasi (Complete protease inhibitor cocktail, Roche) a pH 7.4. Gli omogenati sono stati utilizzati direttamente o conservati a -20°C.

Le condizioni sperimentali per la separazione della PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup> sono state messe a punto con omogenati cerebrali di arvicola studiando l'effetto di diversi detergenti, forze centrifughe e tempi di centrifugazione. Gli omogenati cerebrali (dal 3% al 12% w/v) sono stati aggiunti ad uguali volumi di differenti buffer (TrisHCl 100 mM a pH 7.4 contenente sarcosyl al 4% o al 2%, TrisHCl 100 mM a pH 7.4 contenente NaDoc all'1% e NP40 all'1%; TrisHCl 100mM a pH 7.4 contenente Triton X-100 al 2%) e incubati per 1 h a 37°C in agitazione. Successivamente i campioni sono stati centrifugati da 10000 a 20000g per 1 h o 2 h. I pellet ottenuti sono stati risospesi con TrisHCl 100 mM (pH 7.4) contenente il detergente corrispondente. Le condizioni sperimentali poi scelte in tutte le prove di questo studio includono la solubilizzazione in TrisHCl 100 mM a pH 7.4 contenente sarcosyl al 2% e centrifuga a 20000g per 1 h. Per ciascuna delle diverse condizioni sperimentali testate, sono state analizzate in WB aliquote equivalenti di omogenato cerebrale prima della centrifuga, insieme al supernatante e pellet, con o senza digestione con PK.

#### ***3.3.2. Saggio di stabilità conformazionale (CSSA)***

Aliquote di omogenato cerebrale (dal 3% al 6% w/v) sono state aggiunte a un uguale volume di TrisHCl 100 mM (pH 7.4) con sarcosyl 4% e incubati per un'ora a 37°C in agitazione. Aliquote di 100 µl sono state poi trattate con 100 µl di soluzione di guanidina idrocloruro (GdnHCl) con una concentrazione finale da 0 a 4.0 M. Le soluzioni di GdnHCl sono state preparate da una soluzione di partenza di 8 M (Pierce) diluita in acqua. Dopo trattamento con GdnHCl per 1 h a 37°C in agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 20000g per 1h a 22°C. I pellet sono stati risospesi in 90 µl di NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) e 10 µl NuPage Sample Reducing Agent (Invitrogen). Le aliquote di supernatante sono state precipitate in metanolo (4 volte il volume del campione) per 30 min a -20°C, centrifugate a 15000g per 30 min a 4°C e poi

risospese in 90  $\mu$ l di NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) e 10  $\mu$ l di NuPage Sample Reducing Agent (Invitrogen). I supernatanti e pellet sono stati analizzati con il WB.

Per ogni campione, le curve di denaturazione individuali sono state analizzate con equazione logistica a 4 parametri (GraphPad Prism), ottenendo la migliore corrispondenza ad i punti rappresentanti dalla frazione di PrP<sup>Sc</sup> rimasta nel pellet in funzione della concentrazione di GdnHCl.

Per ottenere le curve di denaturazione di ciascun ceppo, è stata calcolata la frazione media di PrP<sup>Sc</sup> rimasta nel pellet  $\pm$  la deviazione standard ottenuta dai campioni dello stesso ceppo. Il confronto statistico dei valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  è stato effettuato comparando il valore che meglio approssima la distribuzione di punti (best-fit) per ciascun gruppo di dati con GraphPad Prism. Questo è stato eseguito analizzando sia ciascun data set in maniera indipendente sia computandoli globalmente con lo stesso valore condiviso di  $[GdnHCl]_{1/2}$ , e successivamente i risultati sono stati confrontati con un test F. Il modello più semplice è stato selezionato a meno che il test F non avesse un valore di  $P < 0.05$ .

### **3.4. Digestione con proteinasi K dopo denaturazione con GdnHCl**

Aliquote dello stesso omogenato cerebrale sono state trattate in parallelo secondo i protocolli di CSSA e CSA (conformational stability assay). Il CSA è stato eseguito come descritto precedentemente (Peretz et al., 2001), con piccole modifiche.

Aliquote di omogenato cerebrale (6% w/v) sono state aggiunte ad un eguale volume di TrisHCl 100 mM (pH 7.4) contenente sarcosyl al 4% e incubate in agitazione per 1 h a 37°C. Aliquote di 50  $\mu$ l di campione sono state aggiunte a 50  $\mu$ l di GdnHCl con una concentrazione finale da 0 a 4.0 M. Dopo 1 h di incubazione a 37°C tutti campioni sono stati diluiti ad una concentrazione finale di 0.4 M di GdnHCl. Ai campioni è stata aggiunta la proteinasi K (50  $\mu$ g/ml) e sono stati successivamente incubati per 1 h a 37°C in lieve agitazione. La reazione è stata bloccata aggiungendo PMSF (Sigma) ad una concentrazione di 3 mM finale. Alle aliquote dei campioni è stato aggiunto un eguale volume di una soluzione contenente isopropanolo e butanolo (1:1 v/v) e centrifugati a 20000g per 5 min. I pellet sono stati risospesi in NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) e sono stati analizzati in WB.

### **3.5. WB discriminatorio modificato**

Tutti i campioni sono stati pretrattati o non trattati con 3.5 M di GdnHCl per 1 h a 37°C e successivamente diluiti ad una concentrazione finale di 0.35 M di GdnHCl prima della digestione con PK, in accordo al protocollo dell'Istituto Superiore di Sanità (Istituto Superiore di Sanità discriminatory Western blot; Community Reference Laboratory of the European Union: TSE strain characterization in small ruminants—a technical handbook for national reference laboratories in the EU. 174 Version 4, January 2010.

[http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci\\_tse\\_rl\\_handbookv4jan10.pdf](http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_tse_rl_handbookv4jan10.pdf)).

Il rapporto di anticorpi (antibody ratio) è il rapporto del segnale ottenuto in chemiluminescenza, prodotto da un dato campione quando viene calcolato separatamente con gli anticorpi monoclonali SAF84 e P4, relativo al rapporto SAF84/P4 del controllo di scrapie. Questo rapporto misura il taglio N-terminale della PrP<sup>Sc</sup> a livello dell'epitopo del P4, che avviene nella BSE ovina ma non nella maggior parte dei casi di scrapie. Per ottenere il rapporto relativo SAF84/P4, è stato calcolato il rapporto assoluto SAF84/P4 per ciascun campione e per il controllo di scrapie e poi è stato diviso il rapporto assoluto di ciascun campione per il rapporto assoluto del controllo di scrapie.

Il rapporto di denaturazione (denaturation ratio), ottenuto dai blot con SAF84, è il rapporto tra il segnale di chemiluminescenza calcolato nel campione trattato con 3.5 M di GdnHCl e quello dello stesso campione non trattato.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Sviluppo di una nuova tecnica per la caratterizzazione della stabilità conformazionale ceppo-specifica di PrP<sup>Sc</sup> proteasi-sensibile e -resistente (CSSA-Conformational stability and solubility assay)

Sulla base della diversa solubilità della PrP<sup>C</sup> e della PrP<sup>Sc</sup> (Caughey et al., 1991; McKinley et al., 1991) è stato sviluppato un nuovo saggio di stabilità conformazionale, denominato CSSA (conformational stability and solubility assay).

Inizialmente sono state ottimizzate le condizioni sperimentali per ottenere una vantaggiosa separazione della PrP<sup>C</sup> dalla PrP<sup>Sc</sup> e successivamente è stato messo a punto il saggio di stabilità conformazionale su ceppi di prioni adattati in arvicola per testare il potenziale discriminativo del CSSA.

Misurando la solubilità della PrP<sup>Sc</sup> negli omogenati cerebrali trattati con concentrazioni crescenti di GdnHCl in assenza di PK, è stato trovato che la PrP insolubile è inversamente proporzionale alla concentrazione di GdnHCl e le curve dose-risposta hanno permesso di stimare la concentrazione di GdnHCl capace di solubilizzare il 50% della PrP<sup>Sc</sup>.

Inoltre lo studio è stato esteso agli isolati umani ed ovini per investigare il potenziale discriminativo del CSSA dei ceppi in ospite naturale.

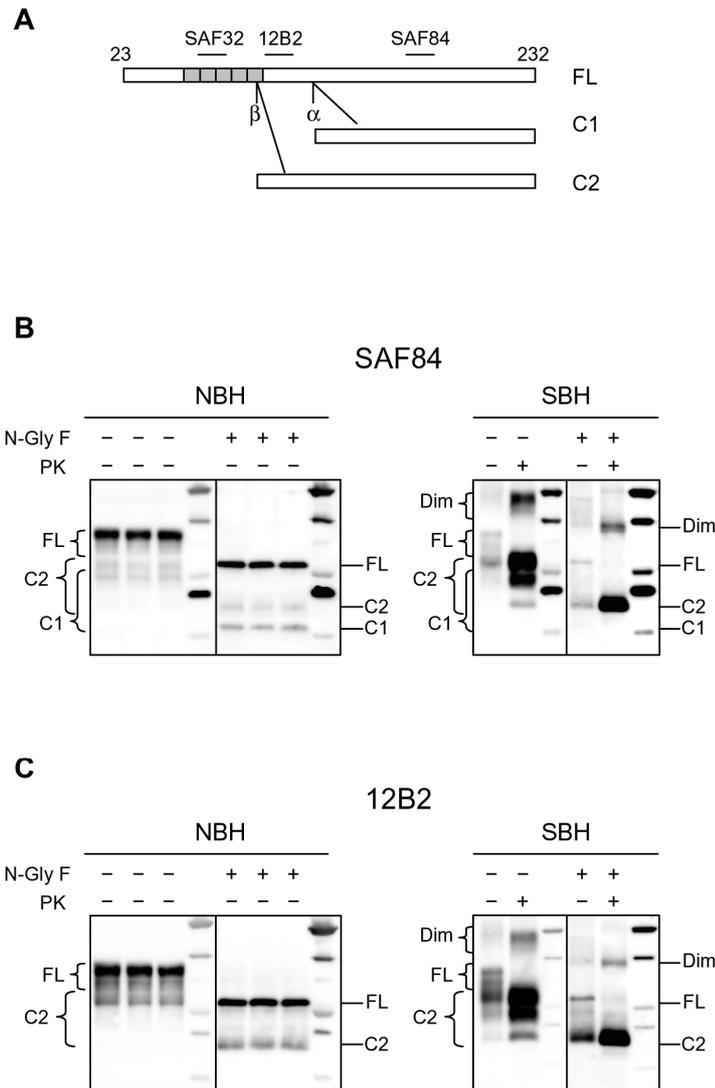
#### 4.1.1. Tipi di PrP in soggetti sani e malati

La PrP fisiologica si presenta con un frammento completo nominato “full-length PrP” (FL-PrP) e due frammenti C-terminali nominati C1 e C2. Tali frammenti derivano dal taglio fisiologico della PrP a livello del sito  $\alpha$  in posizione aminoacidica 111/112 (frammento C1) e dal taglio denominato  $\beta$  a livello della regione dell’octarepeat (frammento C2) (Mange et al., 2004).

Si ritiene che il sito di taglio  $\alpha$  distrugga la regione neurotossica e amiloidogena compresa tra i residui 106-126 della PrP, prevenendo la formazione della PrP<sup>Sc</sup>, mentre il sito di taglio  $\beta$  si trova prima della regione conservata. In accordo con questa

osservazione il frammento C2 è presente in grandi quantità nei cervelli affetti da EST ed è insolubile in detergenti non denaturanti come la PrP<sup>res</sup> (Chen et al., 1995).

Allo scopo di verificare se i frammenti C1 e C2 fossero presenti anche in arvicola, sono stati analizzati omogenati cerebrali di soggetti normali e malati in western blot, sia prima che dopo deglicosilazione, utilizzando come anticorpi monoclonali il SAF84 che riconosce entrambi i frammenti ed il 12B2 che riconosce l'epitopo presente solo sul frammento C2 (Fig. 1A). Nell'omogenato cerebrale normale (normal brain homogenate, NBH), il frammento completo della PrP (FL-PrP) è accompagnato principalmente dal frammento C1 con un livello molto basso del frammento C2. Al contrario, nelle arvicole inoculate con l'isolato italiano di scrapie SS7 (scrapie brain homogenate, SBH) (Di Bari et al., 2008), il frammento C2 è presente in grandi quantità mentre il frammento C1 non è facilmente rilevabile (Fig. 1B e C). Inoltre il frammento di PrP<sup>res</sup> generato dopo digestione con proteinasi K (PK) presente nell'omogenato cerebrale di arvicola con scrapie è simile al frammento C2 (Fig. 1B e C).



**Figura 1. Tipi di PrP in arvicole sane e affette da scrapie**

**A:** rappresentazione schematica del frammento completo di PrP (full length PrP, FL-PrP) e dei frammenti di PrP generati dai siti di taglio  $\alpha$  e  $\beta$  (C1 e C2). È indicata la posizione degli epitopi dei mAbs SAF84, 12B2 e SAF32 utilizzati. **B e C:** omogenati cerebrali normali (NBH) e di arvicole affette da scrapie (SBH) sono stati analizzati in WB utilizzando SAF84 (B) e 12B2 (C). I campioni sono stati analizzati sia prima che dopo deglicosilazione (N-Gly + o -). Le parentesi graffe sulla sinistra indicano la posizione delle bande glicosilate e non glicosilate di FL-PrP, C2 e C1: da 35 kDa a 27 kDa per FL-PrP, da 26 kDa a 18 kDa per C2 e da 24 a 16 kDa per C1. Queste forme di PrP sono ridotte a singole bande non glicosilate dopo deglicosilazione e sono indicate da trattini sulla destra dei blots. In SBH sono indicati anche i dimeri (Dim). In NBH è presente sia il frammento C1 che C2 anche se C2 è poco rappresentato; al contrario in SBH il frammento C2 è il frammento più abbondante mentre C1 è difficilmente rilevabile. La quantità di tessuto equivalente di campione caricato per lane prima e dopo digestione con PK è 0.15 mg e 0.5 rispettivamente. Il marker dei pesi molecolari è caricato nell'ultima lane di ciascun blot. Le posizioni dei pesi molecolari sono 15, 20, 25, 37 e 50 kDa. (Pirisinu et al., 2010)

#### ***4.1.2. Separazione della PrP<sup>C</sup> e della PrP<sup>Sc</sup>***

Allo scopo di sviluppare un saggio di stabilità conformazionale basato sulla solubilità differenziale della PrP<sup>C</sup> e della PrP<sup>Sc</sup>, inizialmente sono state messe a punto le condizioni sperimentali per ottenere la loro separazione. Questo è stato ottenuto attraverso una procedura convenzionale basata su centrifugazione in presenza di detergenti. Variando le concentrazioni di diversi detergenti, tempi di centrifuga e forza centrifuga (Materiali e Metodi), è stato trovato che il trattamento di 1 h in presenza di sarcosyl al 2% seguito da centrifuga a 20000g per 1h ha permesso un'ottimale separazione della PrP<sup>C</sup> dalla PrP<sup>Sc</sup>.

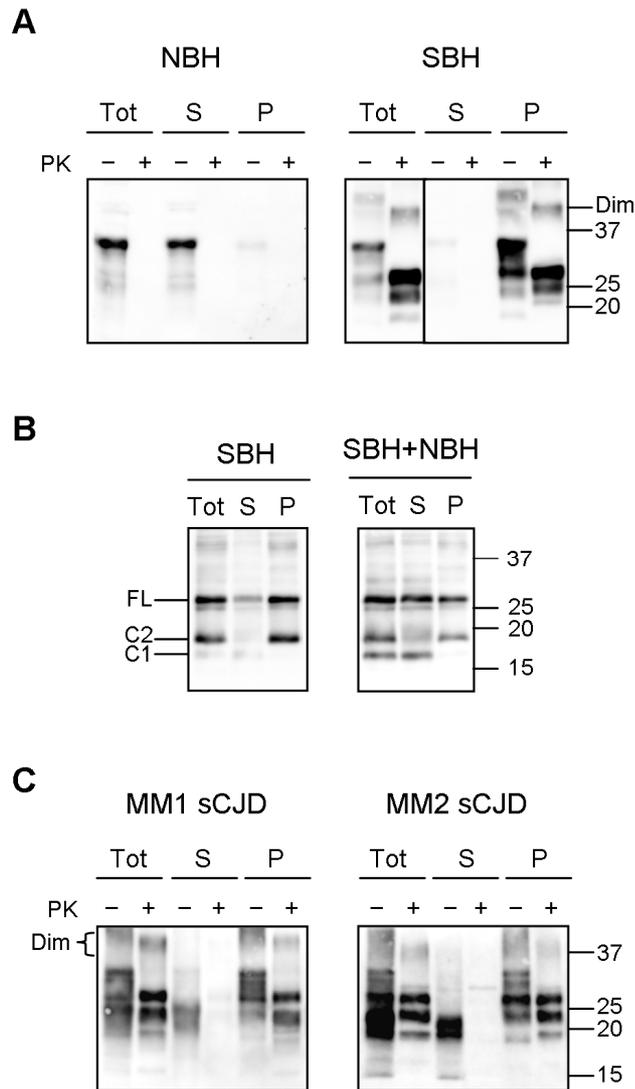
In queste condizioni, più del 95% della PrP<sup>C</sup> totale presente nell'omogenato cerebrale normale (NBH) è solubile e viene ritrovata nella frazione del supernatante (Fig. 2A, pannello sinistro) mentre nell'omogenato cerebrale di scrapie (SBH) la maggior parte della PrP si ritrova nel pellet (Fig. 2A, pannello destro). L'SBH prima della separazione presenta elevate quantità di PrP<sup>res</sup> che sedimenta esclusivamente nel pellet (Fig. 2A). La PrP insolubile da SBH è quindi quasi completamente resistente alla PK (circa il 90% della PrP insolubile), mentre la PrP solubile è sensibile alla PK. Tutte le frazioni di NBH non presentano PrP<sup>res</sup> (Fig. 2A). Inoltre la frazione solubile ed insolubile di SBH mostra un pattern molecolare leggermente diverso, suggerendo che il frammento C2 è principalmente insolubile mentre la PrP solubile contiene la FL-PrP ed il frammento C1 (Fig. 2A).

La solubilità differenziale dei frammenti C1 e C2 in SBH è confermato dall'analisi delle specie di PrP deglicosilate (Fig. 2B), la quale mostra che C1 è quasi completamente solubile mentre C2 è principalmente sedimentato nel pellet (lanes "S" e "P" in Fig. 2B, pannello sinistro). Allo scopo di mimare un situazione paragonabile ad una fase pre-clinica della malattia, è stata studiata la solubilità differenziale di C1 e C2 dopo aver unito una uguale quantità di NBH e SBH (Fig. 2B). Quindi in queste condizioni la quantità di PrP<sup>C</sup> è aumentata rispetto al SBH, come può essere notato dalla più alta proporzione di C1 in NBH+SBH rispetto a SBH solo (comparare lane "Tot" nei due pannelli della Fig. 2B). Anche in queste condizioni il frammento C1 è quasi completamente solubile e il pellet è arricchito in C2 (confrontare le lanes "S" e "P" in Fig. 2B, pannello destro).

Infine è stata investigata l'efficacia del saggio di solubilità per separare la PrP<sup>C</sup> e la PrP<sup>Sc</sup> in arvicole inoculate con altri ceppi di prioni (Fig. 2C). Per questi esperimenti

sono state utilizzate arvicole infettate con le forme sporadiche della malattia di Creutzfeldt-Jakob MM1 e MM2 (MM1 sCJD e MM2 sCJD) (Nonno et al., 2006). In entrambi i ceppi una quantità considerevole di PrP si ritrova nella frazione insolubile dopo trattamento con detergente e centrifugazione. Come già osservato in SBH, il pattern molecolare della PrP insolubile e solubile è differente, suggerendo una precipitazione specifica delle specie di PrP associate a malattia, in particolare C2 ed i dimeri di PrP (confrontare le lanes “S” e “P” in Fig. 2C). Inoltre, dopo digestione con PK, la PrP<sup>res</sup> è fortemente arricchita nei pellets e apparentemente assente nei supernatanti.

Questi risultati suggeriscono che, nelle condizioni sperimentali descritte sopra, è stato possibile precipitare in maniera specifica la PrP<sup>Sc</sup> in omogenati cerebrali di arvicole infettate con differenti ceppi di prioni.



**Fig. 2. Separazione di PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup> in omogenati cerebrali di arvicola.**

**A:** WB della frazione solubile e insolubile di PrP da omogenato cerebrale di arvicola normale (NBH) e affetta da scrapie (SBH). I pellet (P) e i supernatanti (S) sono stati analizzati prima (-) e dopo (+) trattamento con PK. Sono state analizzate anche aliquote dei campioni prima della centrifugazione (Tot). Il tessuto equivalente per lane è 0.2 mg per "Tot" e "S", e 0.4 per "P". I dimeri di PrP<sup>Sc</sup> sono indicati sulla destra del blot di SBH. **B:** WB della PrP solubile e insolubile di SBH e un campione unito artificialmente (SBH+NBH). I campioni sono stati centrifugati come descritto e il totale (Tot), il supernatante (S) e il pellet (P) sono stati deglicosilati. La PrP completa (FL), e i frammenti di PrP C1 e C2 sono indicati sulla sinistra. In ciascuna lane sono stati caricati 0.02 mg di tessuto equivalente. **C:** western blot della frazione solubile e insolubile di PrP da omogenato cerebrale di arvicola infettata con MM1 sCJD e MM2 sCJD. I campioni sono stati trattati come nel pannello A e il totale (Tot), supernatante (S) e pellet (P) sono stati analizzati con o senza digestione con PK. In ciascuna lane sono stati caricati 0.3 mg di tessuto equivalente. Le parentesi graffe sulla sinistra indicano la posizione di FL, C1 e C2. i dimeri di PrP<sup>Sc</sup> sono indicati sulla sinistra. **A-C:** le membrane sono state rivelate son SAF84. I pesi molecolari sono mostrati in kilodaltons sulla destra di ogni pannello. (Pirisinu et al., 2010)

### ***4.1.3. Saggio di stabilità conformazionale: Conformational stability and solubility assay (CSSA)***

La separazione della PrP<sup>C</sup> dalla PrP<sup>Sc</sup> ha permesso di sviluppare una procedura per la tipizzazione molecolare dei ceppi basata sulla stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> dopo esposizione alla guanidina-HCl (GdnHCl). Il saggio di stabilità conformazionale è stato messo a punto misurando la solubilità della PrP<sup>Sc</sup> in omogenati cerebrali positivi trattati per 1 h con concentrazioni crescenti di GdnHCl.

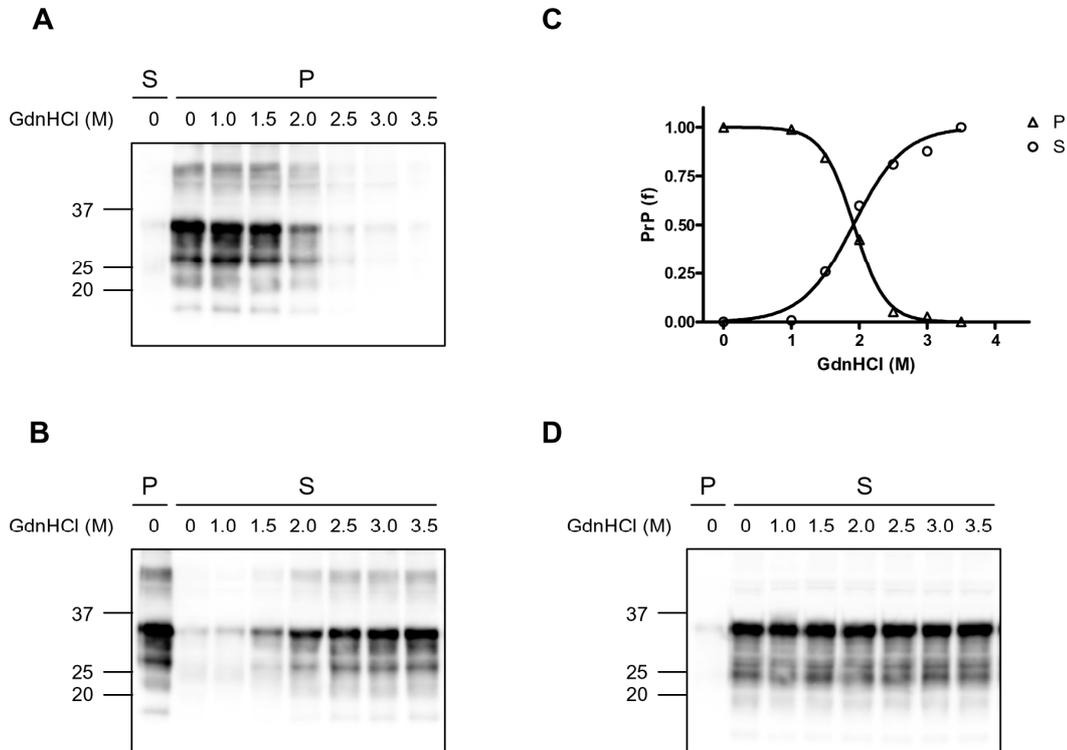
Come previsto, in SBH (scrapie brain homogenate) la PrP<sup>Sc</sup> viene solubilizzata da concentrazioni crescenti di GdnHCl (Fig. 3A e B). Quindi, con concentrazioni di GdnHCl uguali o maggiori di 1.5 M, la PrP<sup>Sc</sup> è parzialmente solubilizzata e viene progressivamente trovata nel supernatante e non nel pellet (confrontare Fig. 3A e B). In presenza di 3.5 M di GdnHCl, apparentemente tutta la PrP dell'omogenato cerebrale positivo (SBH) si ritrova nella frazione solubile (Fig. 3A e B). La solubilizzazione della PrP<sup>Sc</sup> è guanidina-dipendente e le curve dose-risposta permettono di stimare la concentrazione di GdnHCl capace di solubilizzare il 50% della PrP<sup>Sc</sup> ( $[GdnHCl]_{1/2}$ ). Il valore di  $[GdnHCl]_{1/2}$  è simile quando calcolato nella frazione del pellet o del supernatante (Fig. 3C). Al contrario, la PrP da omogenato cerebrale negativo (NBH) rimane solubile con tutte le concentrazioni di GdnHCl utilizzate (Fig. 3D).

La denaturazione della PrP<sup>Sc</sup> dopo l'incubazione di 1 h con la GdnHCl è completa ed è molto simile alle curve di denaturazione ottenute quando il trattamento viene esteso fino a 4 h (Fig. 4).

Quando le curve di denaturazione sono calcolate su blot rivelati con anticorpi monoclonali che riconoscono diverse specie di PrP, in particolare SAF32 e SAF84 (Fig. 1), si ottengono valori simili di  $[GdnHCl]_{1/2}$ , suggerendo che il frammento C2 e la full-length PrP<sup>Sc</sup> mostrano la stessa stabilità conformazionale (Fig. 5).

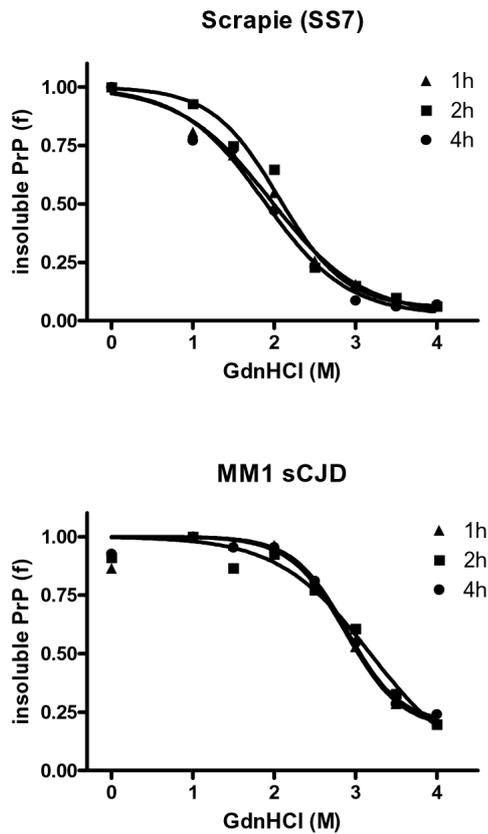
È stata inoltre indagata la relazione tra insolubilità e resistenza alla PK della PrP<sup>Sc</sup> durante la denaturazione. Per investigare se la denaturazione influenza allo stesso modo l'insolubilità e la resistenza alla PK, sono state confrontate le curve derivate dallo stesso omogenato cerebrale di arvicola affetta da scrapie sia ottenute dalla PrP<sup>Sc</sup> insolubile (CSSA) che dalla PrP<sup>Sc</sup> resistente alla PK (CSA). Come mostrato in Fig. 6, le curve di PrP<sup>Sc</sup> insolubile (Fig. 6A) e di PrP<sup>res</sup> (Fig. 6B) non hanno mostrato differenze (Fig. 6C), suggerendo che l'insolubilità e la resistenza alla PK sono ugualmente suscettibili alla denaturazione con GdnHCl. Questa conclusione è stata ulteriormente confermata da

esperimenti effettuati allo scopo di investigare se, dopo denaturazione, la PrP<sup>Sc</sup> solubilizzata potesse parzialmente preservare la sua resistenza alla proteinasi K. Quindi, dopo denaturazione con 3 M di GdnHCl, la PrP solubile è completamente suscettibile alla digestione proteolitica (Fig. 6D).



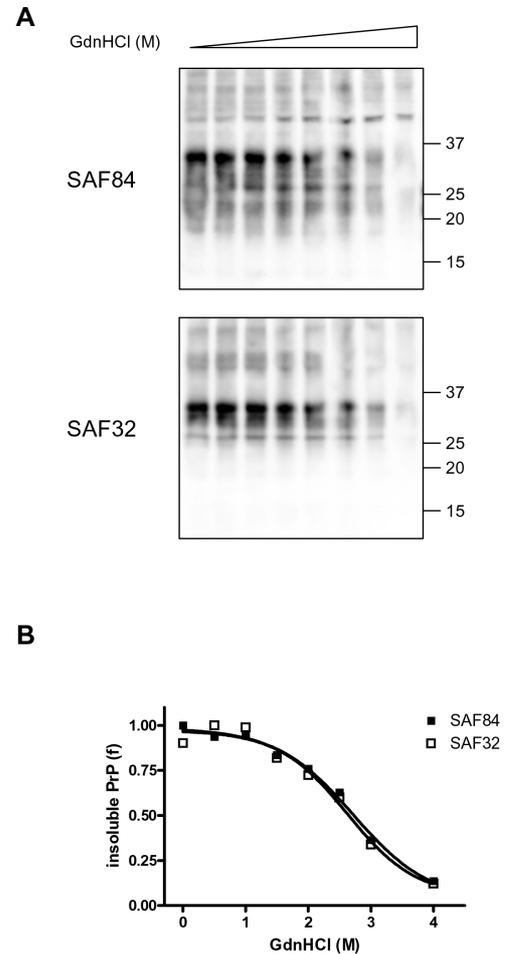
**Fig. 3. CSSA in arvicole sane e affette da malattie da prioni**

**A e B:** WB di omogenato cerebrale di arvicola con scrapie (SBH) dopo denaturazione con diverse concentrazioni di GdnHCl e separazione delle frazioni insolubili (A) e solubili (B) dopo centrifugazione. **A:** WB dei pellet (P) a diverse concentrazioni di GdnHCl. Nello stesso blot è stato caricato anche il supernatante non trattato con GdnHCl (S). Nei pellets, la PrP insolubile diminuisce all'aumentare delle concentrazioni di GdnHCl (M). In ciascuna lane sono stati caricati 0.4 mg di tessuto equivalente. **B:** WB dei supernatanti a diverse concentrazioni di GdnHCl. Nella prima lane è stato caricato anche il pellet (P) a 0 M di GdnHCl. Nel supernatante la PrP aumenta all'aumentare della GdnHCl. In ciascuna lane sono stati caricati 0.4 mg di tessuto equivalente.. **C:** la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> in SBH è analizzata attraverso curve di denaturazione che rappresentano la frazione di PrP<sup>Sc</sup> nel pellet (P) e nel supernatante (S), mostrati nel pannello A e B rispettivamente, in funzione della concentrazione di GdnHCl. I valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  sono stati 1.92 M nel pellet e 1.91 M nel supernatante. **D:** WB dei supernatanti a differenti concentrazioni di GdnHCl da omogenato cerebrale negativo (NBH). Nella prima lane è stato caricato il pellet (P) a 0 M di GdnHCl. In NBH, la PrP<sup>C</sup> si ritrova principalmente nel supernatante e rimane solubile a tutte le concentrazioni di GdnHCl testata. In ciascuna lane sono stati caricati 0.4 mg di tessuto equivalente. **A, B, D:** le membrane sono state rivelate con il SAF84. Sulla sinistra di ogni pannello sono indicati i pesi molecolari espressi in kDa. (Pirisinu et al., 2010)



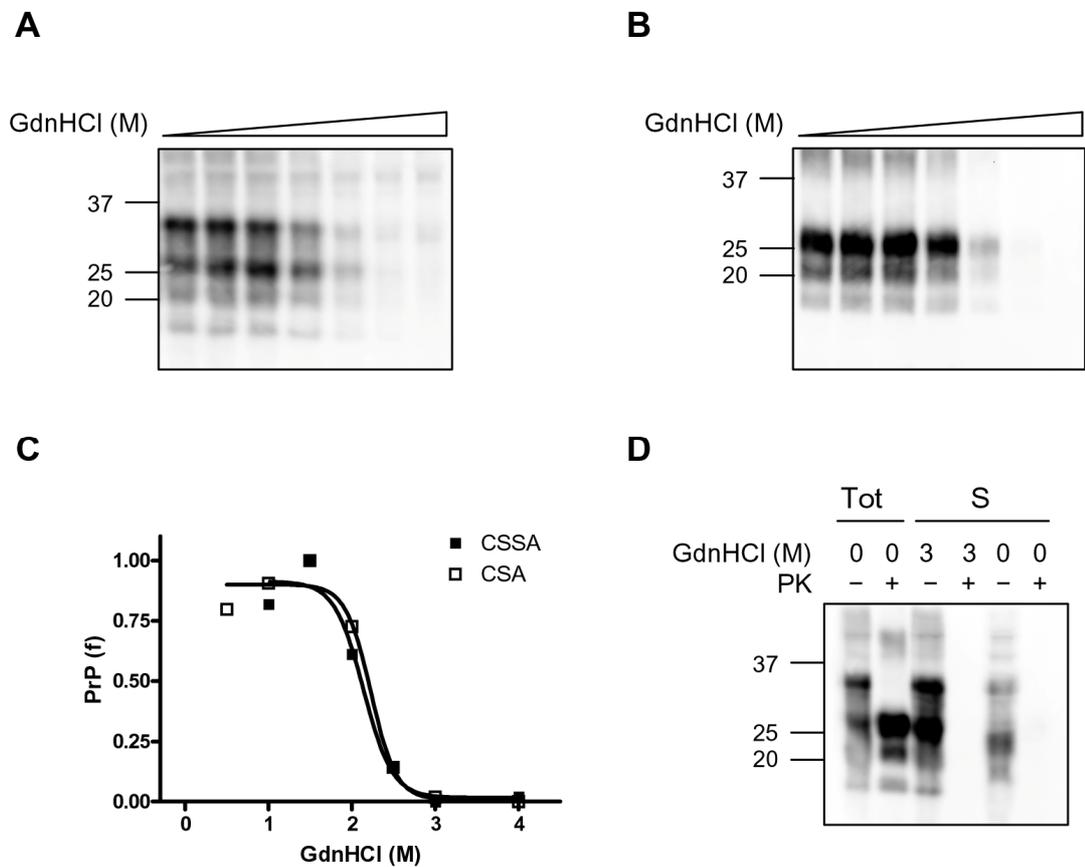
**Fig. 4. Effetto del tempo di denaturazione sul saggio di stabilità conformazionale**

Le curve dose-risposta della PrP insolubile da omogenati cerebrali di arvicole infettate con scrapie SS7 (in alto) e con MM1 sCJD (in basso) dopo trattamento con dosi crescenti di GdnHCl per 1, 2 o 4 ore. Le curve di denaturazione rappresentano la frazione di PrP rimasta nel pellet in funzione della concentrazione della GdnHCl. Sia SS7 che MM1 sCJD non hanno mostrato differenze nel tempo di trattamento e mostrano gli stessi valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  a 1, 2 e 4 h (2.1 M per SS7 e 3 M per MM1 sCJD). (Pirisinu et al., 2010)



**Fig. 5. CSSA con diversi mAbs**

**A:** western blots rappresentativi della PrP insolubile da arvicole infettate con E200K gCJD dopo denaturazione con concentrazioni crescenti di GdnHCl. I blots sono stati rivelati con SAF84 (in alto) e SAF32 (in basso), come indicato sulla sinistra del blot. Le concentrazioni di GdnHCl sono: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 4.0 M. In ciascuna lane sono caricati 0.2 mg di tessuto equivalente. **B:** le curve dose-risposta derivate dai blot del pannello A, rappresentano la frazione di PrP rimasta nel pellet in funzione della concentrazione di GdnHCl. (Pirisinu et al., 2010)



**Fig. 6. Relazione tra l'insolubilità e la resistenza alla PK della PrP<sup>Sc</sup>**

Lo stesso omogenato cerebrale di arvicola con scrapie è stato analizzato in parallelo con il CSSA (A) e con il CSA (B) e sono state confrontate le curve di denaturazione ottenute (C). **A e B:** WB della PrP<sup>Sc</sup> insolubile (A) e della PrP<sup>Sc</sup> resistente alla PK (B) dopo denaturazione con concentrazioni crescenti di GdnHCl. In ciascuna lane sono stati caricati 0.2 mg di tessuto equivalente. Le concentrazioni di GdnHCl sono: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 e 4.0 M. **C:** il grafico mostra le curve di denaturazione ottenute dal CSSA (A) e dal CSA (B). I valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  ottenuti sono 2.14 M e 2.23 per CSSA e CSA, rispettivamente. **D:** WB che mostra la perdita di resistenza alla PK della PrP<sup>Sc</sup> dopo solubilizzazione. In assenza di GdnHCl (0), la PrP totale (Tot) da SBH è resistente alla digestione con PK (confrontare le lanes PK- e PK+). Dopo il trattamento con 3 M di GdnHCl (3) e centrifugazione, la maggior parte della PrP<sup>Sc</sup> si ritrova nel supernatante (S) ed è anche suscettibile alla PK. Il supernatante (S), in assenza di GdnHCl (0), la PrP normale è suscettibile alla PK. Da notare il diverso pattern molecolare nel supernatante con la PrP<sup>C</sup> (0) e la PrP<sup>Sc</sup> solubilizzata (3). **A, B, D:** le membrane sono state rivelate con SAF84. I pesi molecolari sono espressi in kDa sulla sinistra di ogni pannello. (Pirisinu et al., 2010)

#### ***4.1.4. Stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> di arvicole con scrapie, sCJD e gCJD***

Dopo aver messo a punto le condizioni sperimentali descritte sopra, è stato investigato il potenziale del CSSA per discriminare i ceppi di prioni.

Come riportato nel presente lavoro e da precedenti studi (Di Bari et al., 2008; Nonno et al., 2006) la scrapie, la CJD sporadica e la CJD genetica presentano distinti e specifici patterns dopo trasmissione in arvicola, in base ai tempi di incubazione, profilo delle lesioni, deposizione della PrP<sup>Sc</sup> e delle proprietà biochimiche della PrP<sup>res</sup>. Arvicole infettate con gli isolati umani MM1/MV1 sCJD e E200K gCJD mostrano un frammento di PrP<sup>res</sup> di circa 19 kDa mentre con MM2 sCJD presentano un frammento di PrP<sup>res</sup> di circa 17 kDa. Gli isolati naturali di scrapie e la scrapie murina ME7 mostrano un frammento di PrP<sup>res</sup> di circa 18 kDa, intermedio tra i tipi 1 e 2 di sCJD.

Poiché i tipi di PrP<sup>Sc</sup> mostrano specifiche caratteristiche dopo digestione con PK, è stata studiata anche la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> di arvicole inoculate con MM1 (n=4), MV1 (n=3) e MM2 (n=5) sCJD, E200K gCJD (n=3) e scrapie SS7 (n=4).

L'analisi della stabilità conformazionale con il CSSA ha rivelato distinti profili di denaturazione (Fig. 7), con valori di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> da 1.5 M a 3 M (Tabella 2).

Le arvicole infettate con MM1 sCJD, MV1 sCJD e E200K gCJD hanno mostrato la più alta resistenza alla denaturazione, con valori medi di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> di 2.77 M, 2.88 M and 2.88 M, rispettivamente. Al contrario, la PrP<sup>Sc</sup> di arvicole inoculate con MM2 sCJD ha mostrato la maggiore suscettibilità (valore medio di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> di 1.63 M), mentre la scrapie ha avuto valori intermedi di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> (2.10 M).

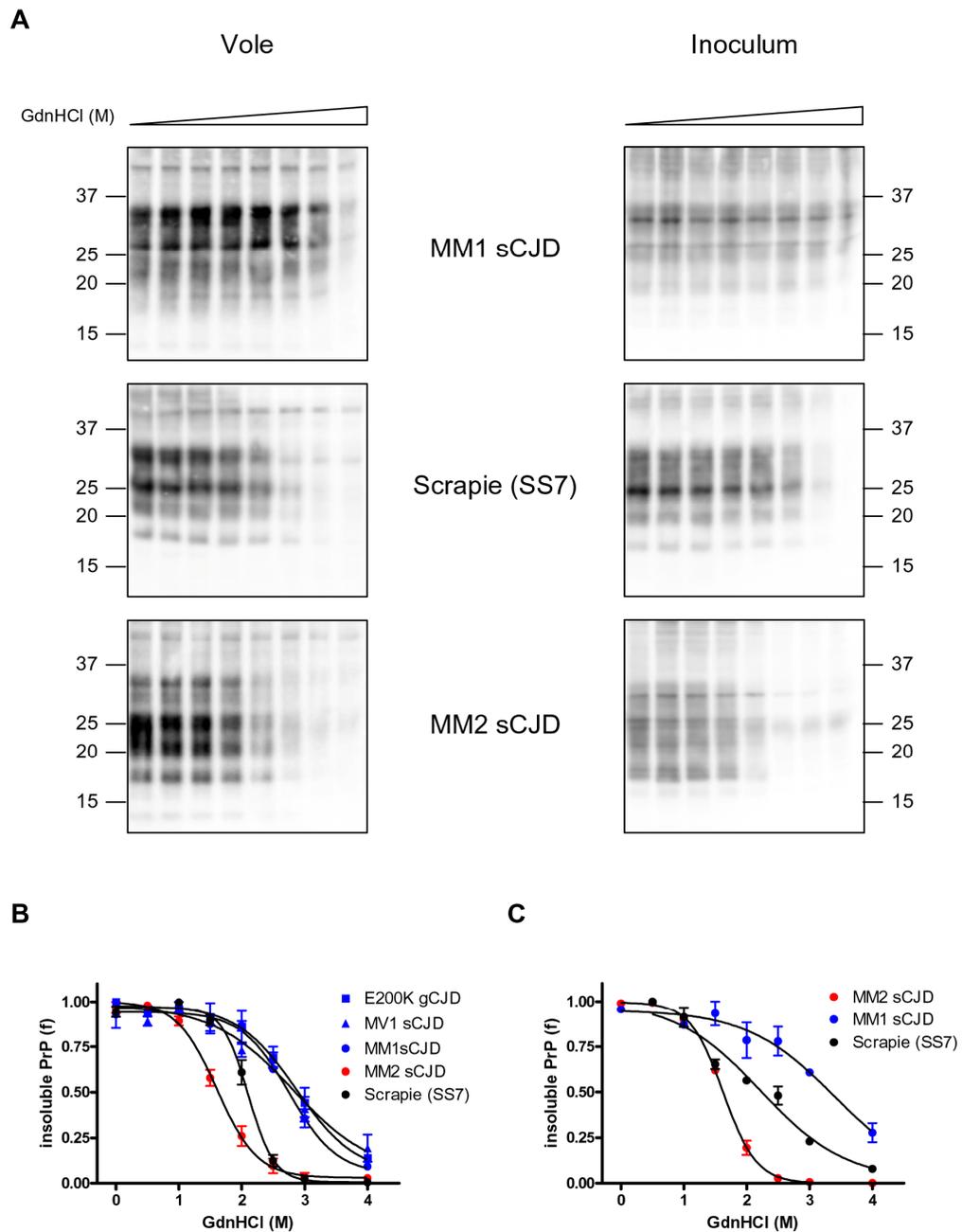
Successivamente sono state unite le curve individuali all'interno di ogni gruppo per confrontare i profili di denaturazione dei 5 gruppi (Fig. 7). La scrapie SS7 (valore di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> di 2.10 ± 0.02) e MM2 sCJD (valore di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> di 1.61 ± 0.03) hanno mostrato profili di denaturazione ceppo-specifici, essendo significativamente differenti da tutti gli altri gruppi (SS7 vs MV1, P = 0.0037; SS7 vs MM1, P < 0.0001; SS7 vs E200K, P < 0.0001; SS7 vs MM2, P < 0.0001; MM2 vs MV1, P = 0.0022; MM2 vs MM1, P < 0.0001; MM2 vs E200K, P < 0.0001).

Al contrario, MM1 sCJD, MV1 sCJD e E200K gCJD non sono significativamente diversi tra di loro (valore di [GdnHCl]<sub>1/2</sub> condiviso di 2.79 ± 0.06, P = 0.52). Rappresentano probabilmente un unico ceppo, in accordo con precedenti studi che

hanno mostrato che le arvicole infettate con i 3 isolati hanno fenotipi della malattia paragonabili (Nonno et al., 2006).

**Tabella 2.** Stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> di scrapie, sCJD e gCJD adattati in arvicola

<b>Inoculo</b>	<b>ID</b>	<b>[GdnHCl]<sub>1/2</sub> (M) ± SEM</b>	<b>[GdnHCl]<sub>1/2</sub> (M) (media ± Dev. S)</b>
MM1 sCJD	304/2	2.73 ± 0.17	2.77 ± 0.13
	304/4	2.63 ± 0.12	
	304/8	2.76 ± 0.11	
	304/14	2.94 ± 0.19	
MV1 sCJD	272/1	3.05 ± 0.29	2.88 ± 0.17
	272/4	2.87 ± 0.36	
	272/8	2.72 ± 0.11	
MM2 sCJD	270/6	1.45 ± 0.01	1.63 ± 0.11
	270/7	1.71 ± 0.07	
	350/3	1.60 ± 0.09	
	350/5	1.69 ± 0.04	
	350/14	1.69 ± 0.06	
E200K gCJD	271/4	2.73 ± 0.15	2.88 ± 0.13
	271/5	2.99 ± 0.25	
	271/6	2.91 ± 0.18	
scrapie SS7	388/7	2.22 ± 0.04	2.10 ± 0.13
	388/9	2.16 ± 0.03	
	388/10	1.92 ± 0.02	
	388/11	2.08 ± 0.03	



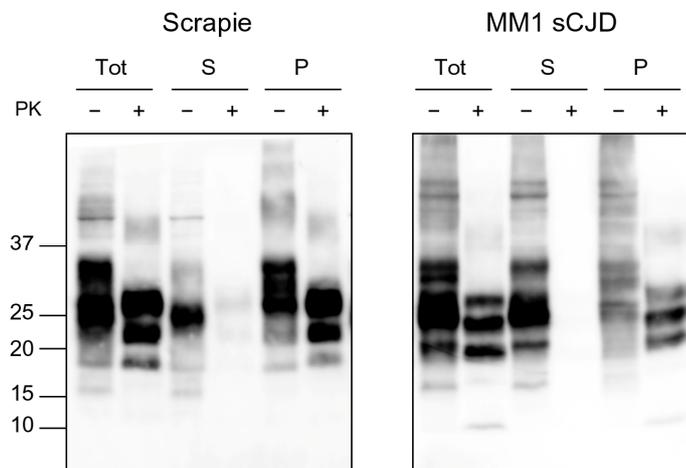
**Fig. 7. Stabilità conformazionale (CSSA) di differenti ceppi in arvicole e ospiti naturali**

**A e B:** stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> da arvicole infettate con MM1 sCJD, scrapie e MM2 sCJD e dai rispettivi isolati umani ed ovini. **A:** WB rappresentativi della PrP<sup>Sc</sup> insolubile da arvicole (sinistra) e ospiti naturali (destra) dopo trattamento degli omogenati cerebrali con concentrazioni crescenti di GdnHCl. Le concentrazioni di GdnHCl sono: 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 4,0 M. Sono stati caricati 0,2 mg di tessuto equivalente per le arvicole, 0,34 mg per gli isolati umani e 0,125 mg per gli isolati ovini. Le membrane sono state rivelate con SAF84 (campioni di arvicola e scrapie ovina) o con L42 (isolati umani). **B e C:** curve dose-risposta ottenute misurando la frazione di PrP rimasta nel pellet in funzione della concentrazione di GdnHCl. **B:** curve dose-risposta nei ceppi di arvicola. Le curve individuali sono state unite in ciascun gruppo (Scrapie, E200K gCJD, MV1, MM1 and MM2 sCJD). **C:** curve dose-risposta degli isolati ovini e umani. (Pirisinu et al., 2010)

#### 4.1.5. Stabilità conformazionale degli isolati umani e ovini

Allo scopo di poter sfruttare il saggio di stabilità conformazionale (CSSA) per la discriminazione dei ceppi di prioni in malattie naturali, sono stati analizzati gli isolati utilizzati come inoculi per la trasmissione in arvicola, cioè MM1 e MM2 sCJD e la scrapie SS7.

Inizialmente è stata testata l'efficacia di separazione della PrP<sup>Sc</sup> dalla PrP<sup>C</sup> in omogenati cerebrali umani e ovini, alle stesse condizioni sperimentali usate per gli omogenati cerebrali di arvicola. In tutti i campioni la PrP<sup>Sc</sup> è stata ritrovata nel pellet, come mostrato dalla presenza della PrP<sup>res</sup> nella frazione insolubile e dal diverso pattern di bande mostrato dalla PrP solubile ed insolubile (Fig. 8).



**Fig. 8. Separazione delle frazioni di PrP solubili e insolubili da isolati umani ed ovini**

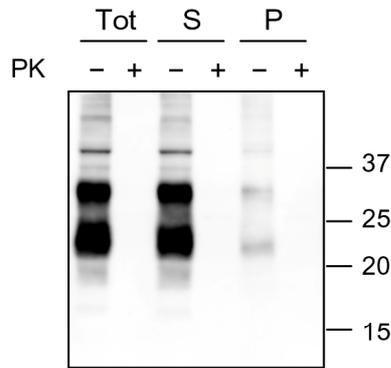
Western blot della PrP solubile e insolubile da omogenati cerebrali di ovino con scrapie e uomo con MM1 sCJD. I campioni sono stati centrifugati a 20000g per 1h in presenza di 2% sarcosyl ed i supernatanti (S) e i pellets (P) sono stati analizzati con (+) o senza (-) trattamento con PK. È stata analizzata anche un'aliquota di ogni campione prima della centrifugazione (Tot). Sono stati caricati 0.2 mg di tessuto equivalente di scrapie e 0.15 mg di MM1 sCJD. Le membrane con la scrapie sono state rivelate con SAF84 e le membrane con MM1sCJD con L42. (Pirisinu et al., 2010)

Negli omogenati cerebrali negativi ovini la frazione di PrP che precipita nel pellet è in qualche modo più alta di quella che precipita in arvicola (>10% in qualche esperimento). Comunque, la PrP<sup>C</sup> precipitata ha mostrato insensibilità al trattamento con GdnHCl e quindi non interferisce con il saggio di stabilità conformazionale (Fig. 9).

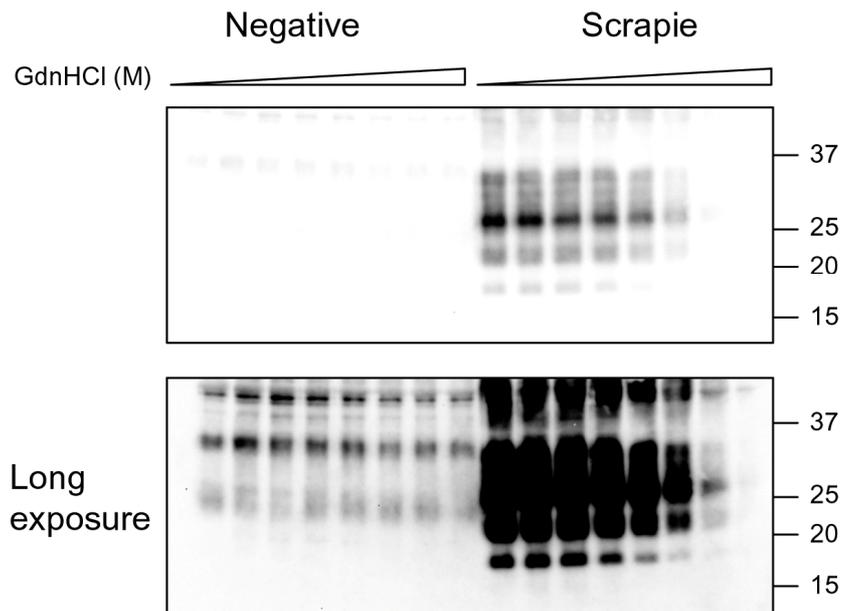
Quando testati con il CSSA, MM1 sCJD, MM2 sCJD e la scrapie SS7 hanno mostrato differenti suscettibilità alla denaturazione (Fig. 7A e C). È interessante notare che i valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  osservati corrispondono a quelli trovati nelle rispettive

arvicole, essendo MM1 sCJD il più resistente (valori di  $[GdnHCl]_{1/2} = 3.31 \text{ M}$ ), seguito dalla scrapie SS7 ( $[GdnHCl]_{1/2} = 2.23 \text{ M}$ ) e MM2 sCJD ( $[GdnHCl]_{1/2} = 1.63 \text{ M}$ ).

**A**



**B**



**Fig. 9. Separazione delle frazioni solubili e insolubili della PrP da omogenati cerebrali ovini negativi**

**A:** Western blot delle frazioni di PrP solubili e insolubili da un omogenato cerebrale negativo di ovino. La PrP totale (Tot) e la PrP dal supernatante (S) e dal pellet (P) sono stati analizzati con (+) o senza (-) trattamento con PK. Sono stati caricati 0.2 mg di tessuto equivalente per ogni lane. **B:** Western blot della PrP insolubile di omogenato cerebrale ovino negativo e con scrapie dopo denaturazione con concentrazioni crescenti di GdnHCl, sia dopo tempo di esposizione normale (in alto) e lungo (basso). Le concentrazioni di GdnHCl sono: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 e 4.0 M. Sono stati caricati 0.12 mg di tessuto equivalente per ogni lane. **A e B:** le membrane sono state rivelate con SAF84. (Pirisinu et al., 2010)

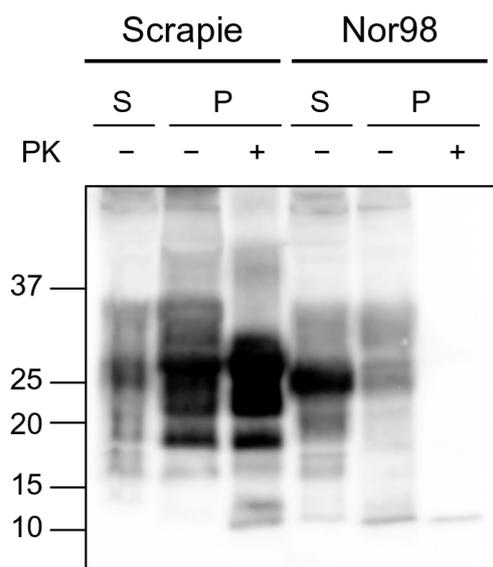
#### ***4.1.6. Stabilità conformazionale di isolati ovis di scrapie classica e atipica (Nor98)***

Al fine di testare la capacità del CSSA di studiare la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> sensibile alle proteasi, è stato preso in considerazione un ceppo di scrapie atipica recentemente descritto, il Nor98 (Benestad et al., 2003), che induce l'accumulo di PrP<sup>Sc</sup> relativamente sensibile alle proteasi (sPrP<sup>Sc</sup>) (Buschmann et al., 2004).

Come osservato in precedenza con tutti gli altri ceppi, la PrP<sup>Sc</sup> insolubile e solubile del Nor98 ha mostrato una diversa separazione delle specie di PrP (Fig. 10). Da notare che il frammento a basso peso molecolare, caratteristico della PrP<sup>res</sup> del Nor98 (Benestad et al., 2003; Bruce et al., 2007), si osserva prima della digestione con PK e si separa con la PrP insolubile, in modo simile a ciò che si osserva con il frammento C2 in tutti gli altri ceppi. Comunque, nel Nor98 solo una minima frazione di PrP insolubile è resistente alle proteasi, mentre nella scrapie classica la PrP<sup>res</sup> rappresenta più del 90% della PrP insolubile (Fig. 10). Queste osservazioni confermano che nei campioni di Nor98 la PrP associata a malattia è principalmente sensibile alla PK, nonostante sia accompagnato da una piccola quantità di PrP<sup>Sc</sup> resistente alla PK.

Dopo aver testato l'efficienza della separazione è stata quindi studiata la stabilità conformazionale di isolati italiani naturali di Nor98 (n=5) e di scrapie classica (n=4) di differenti genotipi (Tabella 3).

I campioni di scrapie classica hanno dato curve di denaturazione molto simili a quelle di SS7, con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  da 1.96 a 2.31 (Fig. 11 e Tabella 3). I campioni di Nor98 hanno dato profili di denaturazione simili tra loro, indipendentemente dal genotipo, ed hanno mostrato una elevata suscettibilità alla denaturazione con GdnHCl (Fig. 11), con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  da 1.26 a 1.43 (Tabella 3). Confrontando ogni gruppo, non sono presenti differenze significative tra le scrapie classiche (valore di  $[GdnHCl]_{1/2}$  condiviso di  $2.09 \pm 0.11$ ,  $P = 0.52$ ) e i Nor98 (valore di  $[GdnHCl]_{1/2}$  condiviso di  $1.36 \pm 0.04$ ,  $P = 0.50$ ). Il confronto dei profili di denaturazione combinati di scrapie e Nor98 (Fig. 11B) danno valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  statisticamente differenti ( $P < 0.0001$ ).



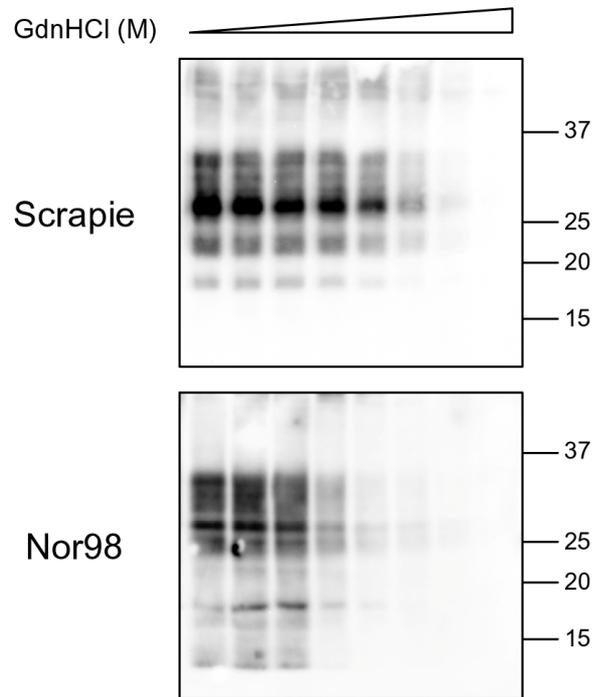
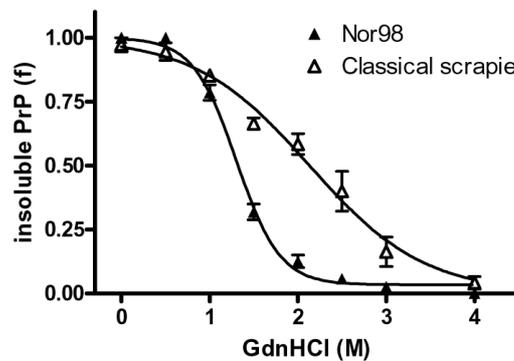
**Fig. 10. Separazione delle frazioni di PrP solubili e insolubili nella scrapie classica e nel Nor98**

Western blot degli isolati ovini di scrapie classica e Nor98. Il supernatante (S) e il pellet (P) sono stati analizzati con (+) o senza (-) trattamento con PK. In ciascuna lane sono stati caricati 0.8 mg di tessuto equivalente. I pesi molecolari sono mostrati sulla sinistra del blot e sono espressi in kilodaltons. Le membrane sono state rivelate con L42. (Pirisinu et al., 2010)

**Tabella 3. Stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> di isolati ovini naturali**

Ceppo	ID	Età (a)	Genotipo della PrP *	[GdnHCl] <sub>1/2</sub> (M)	[GdnHCl] <sub>1/2</sub> (M) (media±Dev.St)
Scrapie classica	ES8/09/3	2	ALRQ/ALRQ	2.27	2.20 ± 0.16
	ES8/09/1	6	ALRQ/ALHQ	1.96	
	241/105	3	ALRQ/ALRQ	2.27	
	211/26	3	ALRQ/ALRQ	2.31	
Nor98	ES36/08/4	12	ALHQ/ALRR	1.26	1.32 ± 0.07
	ES35/07/2	9	ALRQ/ALHQ	1.26	
	ES10/07/7	12	AFRQ/AFRQ	1.35	
	ES18/07/2	5	ALRQ/ALHQ	1.31	
	ES19/07/23	7	ALRR/ALRR	1.43	

\* amino acidi ai codoni 136, 141, 154 e 171

**A****B**

**Figura 11. CSSA di isolati di scrapie classica e Nor98**

**A:** western blot rappresentativo della PrP insolubile dopo denaturazione con concentrazioni crescenti di GdnHCl di isolati di scrapie classica (ARQ/AHQ) e Nor98 (ARR/AHQ). Le concentrazioni di GdnHCl sono: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 e 4.0 M. Sono stati caricati 0.125 mg di tessuto equivalente per il campione di scrapie classica e 0.3 mg di Nor98. Le membrane sono state rivelate con L42. le dimensioni dei pesi molecolari sono espressi in kilodalton e sono mostrati sulla destra di ogni blot.

**B:** curve dose-risposta dei Nor98 e scrapie classica, ottenute misurando la frazione di PrP<sup>Sc</sup> rimasta nel pellet in funzione della concentrazione di GdnHCl. Le curve individuali sono state unite per ogni gruppo (scrapie e Nor98) per confrontare i profili di denaturazione dei due gruppi. I valori medi individuali sono mostrati in Tabella 3. (Pirisinu et al., 2010)

## 4.2 Discriminazione molecolare di BSE ovina da scrapie classica ed atipica

Come descritto precedentemente, il CSSA ha rivelato stabilità conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> ceppo-specifiche negli isolati ovini permettendo la discriminazione degli isolati di Nor98 da quelli di scrapie classica (Tabella 3). Sfruttando quindi le capacità discriminatorie di ceppi da isolati naturali, è stata analizzata la stabilità conformazionale degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> derivanti anche dai ceppi di CH1641 e BSE (Tabella 4), incluso uno dei pochi isolati naturali di CH1641-like (TR316211) già descritto in letteratura (Baron et al., 2008; Lezmi et al., 2004). Gli altri due isolati di CH1641-like (99-454 e 99-321) sono stati trovati in una analisi retrospettiva di scrapie ovina in Francia.

La scrapie classica, inclusa come controllo, ha mostrato un valore di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 2.2 M, nel range degli isolati analizzati in precedenza (Tabella 4). Il caso sperimentale di CH1641 (fornito da N. Hunter, Institute for Animal Health, Edinburgh, Scotland) e gli isolati di CH1641-like hanno mostrato valori di stabilità conformazionale simili alla scrapie classica con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 2.0-2.8 M. Al contrario la PrP<sup>Sc</sup> da BSE sperimentale ovina (Vaccari et al., 2007) ha chiaramente mostrato di avere una elevata stabilità conformazionale, con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  superiori a 3.8 M (Tabella 4).

Questi risultati suggeriscono che la BSE sperimentale ovina potrebbe avere una maggiore resistenza alla denaturazione rispetto alla maggior parte degli isolati di scrapie ovina.

Poiché i metodi discriminatori che si basano sul diverso taglio N-terminale della PrP<sup>Sc</sup> da parte della PK (Discriminatory testing handbook, 2010) non permettono una chiara discriminazione degli isolati CH1641 dalla BSE (Stack et al., 2006), è stato investigato il potenziale della denaturazione come ulteriore strategia discriminatoria da inserire all'interno del sistema di western blot discriminatorio dell'Istituto Superiore di Sanità (Discriminatory testing handbook, 2010).

A questo scopo i campioni sono stati trattati con 3.5 M di GdnHCl prima della digestione con PK e analizzati in WB con gli anticorpi monoclonali SAF84 e P4 (Fig. 12).

Questo metodo è stato messo a punto analizzando campioni rappresentativi di scrapie, BSE e CH1641 (Fig. 12). Come previsto, la BSE e il CH1641 sono poco riconosciuti dal P4 a differenza della scrapie classica. Comunque il trattamento con 3.5

M di GdnHCl abolisce quasi del tutto la resistenza della PrP<sup>Sc</sup> alla PK della scrapie classica e del CH1641, ma non della BSE ovina, permettendo quindi la discriminazione del CH1641 dalla BSE.

È stato successivamente analizzato un ampio numero di campioni (Tabella 5), incluso un caso di BSE naturale in capra (Fig. 12). Questi esperimenti hanno confermato la più alta resistenza alla denaturazione dei campioni di BSE, indipendentemente dalla specie, genotipo della PrP e via di inoculazione, rispetto a tutti gli altri campioni (Fig. 12).

Quando il rapporto tra anticorpi (SAF84/P4) e il rapporto di denaturazione (campione trattato a 3.5 M/campione non trattato) sono stati misurati ed inseriti in un grafico, gli isolati di scrapie classica, il CH1641 e la BSE sono stati divisi in 3 gruppi (Fig. 13, pannello A):

- i. Gli isolati di scrapie hanno mostrato un rapporto di anticorpi <2 e il rapporto di denaturazione è stato di 0.02-0.13
- ii. I campioni di CH1641 hanno avuto un rapporto di anticorpi >2 e un rapporto di denaturazione di 0.06-0.29
- iii. I campioni di BSE hanno dato un rapporto di anticorpi >2 ma il rapporto di denaturazione è stato >0.51.

I profili di glicosilazione, cioè la proporzione relativa dei frammenti di PrP<sup>res</sup> diglicosilata, monoglicosilata e non glicosilata, sono stati riportati come criterio discriminatorio per l'identificazione della BSE negli ovini (Lezmi et al., 2004; Stack et al., 2002; Thuring et al., 2004) così come del CH1641 (Lezmi et al., 2004; Stack et al., 2002).

Con il metodo dell'Istituto Superiore di Sanità (Fig. 13, pannello B) gli isolati naturali di scrapie, compresi i CH1641-like, sono caratterizzati da un basso rapporto di glicofoma diglicosilata/monoglicosilata (0.48:0.35 – 0.58:0.25) rispetto alla BSE ovina (0.65:0.25 – 0.75:0.19) e alla BSE naturale in capra (0.70:0.22).

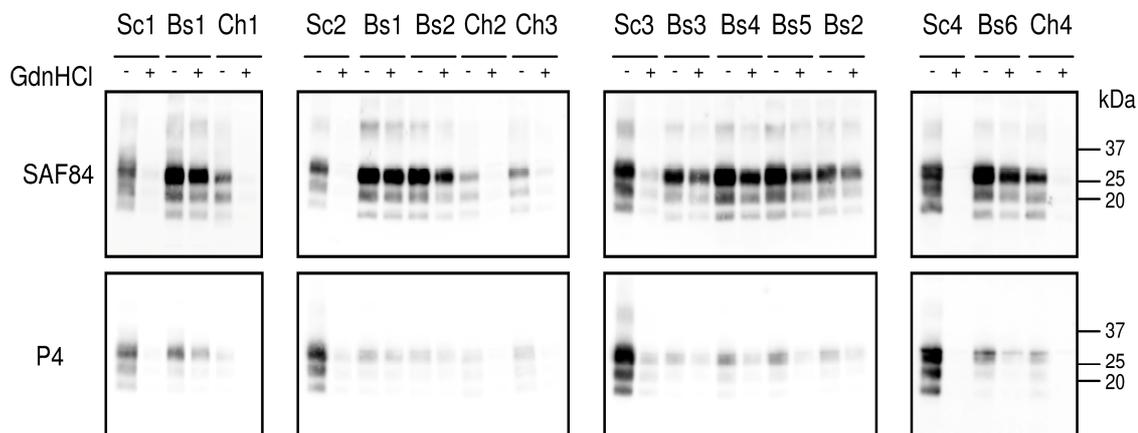
**Tabella 4.** Campioni ovini analizzati con il CSSA. (Pirisinu et al., 2011)

Campione ovino	ID	Genotipo della PrP*	[GdnHCl] <sub>1/2</sub> (M) media ± Dev.St‡
<b>Isolati naturali</b>			
Scrapie	ES/8/10/2	ARQ/ARQ	2,19 ± 0,18
CH1641-like	99-454	VRQ/VRQ	2,00 ± 0,06
	99-321	VRQ/VRQ	2,41 ± 0,49
	TR316211	ARQ/ARQ	2,82 ± 0,08
<b>Campioni sperimentali</b>			
CH1641	241/74	AxQ/AxQ	2,07 ± 0,05
BSE ovina sperimentale	301/16 (ic) †	ARQ/ARQ	>4
	301/44 (ic)	ARQ/ARQ	>4
	302/90 (os)	ARQ/ARQ	3,8; >4; >4

\*amino acidi ai codoni 136, 154 e 171.

†via di trasmissione: intracerebrale (ic) o orale (os).

‡ogni campione è stato analizzato almeno 3 volte.



**Fig. 12.** Western blot rappresentativi che mostrano il diverso sito di taglio N-terminale (SAF84 vs P4) e la suscettibilità alla denaturazione dei diversi isolati di EST. I campioni sono indicati in accordo alla Tabella 5: isolati di scrapie classica (Sc1, Sc2, Sc3, Sc4); CH1641 sperimentale (Ch1); isolati di CH1641-like (Ch2, Ch3, Ch4); BSE ovina sperimentale dopo trasmissione intracerebrale (Bs1) e orale (Bs2, Bs3, Bs4, Bs5); BSE naturale caprina (Bs6). Tutti i campioni sono stati pre-trattati (+) e non (-) con 3.5 M di GdnHCl per 1 h a 37°C e poi diluiti ad una concentrazione finale di 0.35 M GdnHCl prima della digestione con PK in accordo al metodo discriminatorio dell'ISS. I blot sono stati rivelati con SAF84 (in alto) e con P4 (in basso). Il peso molecolare dei markers è indicato sulla destra dei blots. (Pirisinu et al., 2011)

**Tabella 5.** Campioni analizzati con il WB discriminatorio. (Pirisinu et al., 2011)

<b>Campione</b>	<b>ID</b>	<b>Genotipo della PrP*</b>	<b>ID lane WB</b>
<b>Isolati naturali</b>			
Scrapie	ES16/10/10	ARQ/ARQ	Sc1
	ES16/10/11	ARQ/ARQ	Sc2
	ES16/10/12	ARQ/ARQ	Sc3
	ES12/10/1	ARQ/ARQ	
	ES12/10/2	ARQ/ARQ	
	ES12/10/3	ARQ/ARQ	Sc4
	CH1641-like	99-454	VRQ/VRQ
99-321		VRQ/VRQ	Ch4
TR316211		ARQ/ARQ	Ch3
Goat BSE	CH636		Bs6
<b>Campioni sperimentali</b>			
CH1641	241/74	AxQ/AxQ	Ch1
BSE sperimentale ovina	301/16 (ic)†	ARQ/ARQ	Bs1
	301/44 (ic)	ARQ/ARQ	
	302/87 (os)	ARQ/ARQ	Bs3
	302/130 (os)	ARQ/ARQ	Bs4
	302/64 (os)	ARQ/AHQ	Bs5
	302/90 (os)	ARQ/ARQ	Bs2

\*amino acidi ai codoni 136, 154 e 171.

† BSE sperimentale ovina: trasmissione intracerebrale (ic) o trasmissione orale (os).



### **4.3. Caratterizzazione molecolare di ceppi di EST animali ed umani adattati in arvicola rossastra (*Myodes glareolus*)**

La prima parte del lavoro è stata svolta perfezionando tecniche già in uso per la caratterizzazione molecolare dei ceppi. Traendo vantaggio dall'utilizzo di un modello sperimentale di infezione, l'arvicola rossastra (*Myodes glareolus*), in cui sono stati trasmessi numerosi ceppi di EST animali ed umane (Di Bari et al., 2008; Nonno et al., 2006), sono state individuate caratteristiche molecolari specifiche di ciascun ceppo.

È stata quindi studiata la PrP<sup>Sc</sup> accumulata nel SNC di arvicole infettate con diversi ceppi di EST (scrapie, BSE, BASE, sCJD) attraverso l'analisi biochimica dei frammenti di PrP<sup>Sc</sup> resistenti alla proteinasi K (PrP<sup>res</sup>). I frammenti di PrP<sup>res</sup> sono stati individuati utilizzando anticorpi monoclonali diretti verso differenti epitopi ("epitope mapping"): ciò ha consentito di determinare i siti di taglio della proteinasi K lungo la PrP<sup>Sc</sup>, le dimensioni dei frammenti e, grazie anche all'ausilio della deglicosilazione, è stato possibile differenziare i frammenti non glicosilati da quelli glicosilati.

L'epitope mapping della PrP<sup>res</sup>, prima (Fig. 14) e dopo (Fig. 15) deglicosilazione, ha permesso di individuare diversi frammenti (Fig. 16) sulla base della presenza o assenza degli epitopi presi in esame. Questa analisi ha permesso di riconoscere 5 tipi molecolari diversi, ognuno caratterizzato dalla presenza di uno o più frammenti di PrP<sup>res</sup> (Tabella 6):

- tipo molecolare A, rappresentato da BASE, VV2 e MM1/MV1 sCJD presenta tre frammenti di 19, 14 e 11 kDa: il frammento di 19 kDa e quello di 14 kDa sono C-terminali e presentano entrambi i siti di glicosilazione. I due frammenti si distinguono per un diverso sito di taglio della PK: con anticorpi più N-terminali si perde il frammento di 14 kDa e scompare l'evidente sovrapposizione delle bande mono- e di-glicosilate presente con SAF84 (Fig. 14 e Fig. 15). Il frammento di 11 kDa presenta il medesimo sito di taglio N-terminale del frammento di 19 kDa ed un ulteriore sito di taglio C-terminale, portando alla perdita dei siti di glicosilazione (il frammento non è visibile con SAF84) (Fig. 15);
- tipo molecolare B, distintivo della scrapie classica è caratterizzato da un singolo frammento C-terminale di 18 kDa;
- tipo molecolare C, caratteristico di MV2 sCJD, mostra un doppietto di 17-18 kDa;

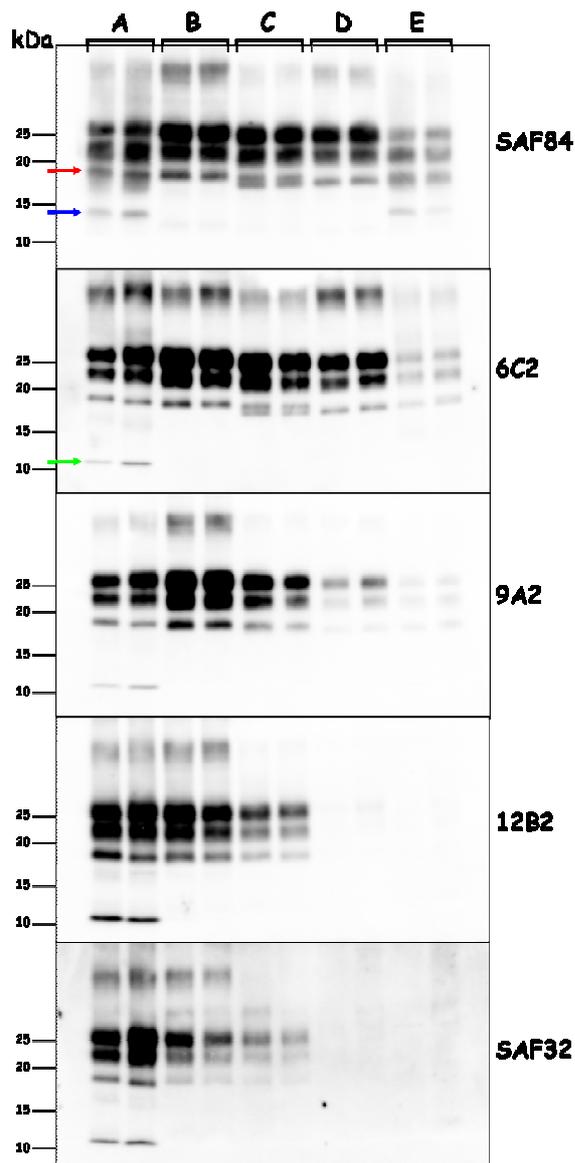
- tipo D, caratteristico della BSE, mostra un singolo frammento C-terminale di 17 kDa;
- tipo E, rappresentato da MM2 sCJD, è contraddistinto da due frammenti C-terminali di 17 e 14 kDa che si differenziano per un diverso sito di taglio N-terminale: il frammento di 17 kDa è riconosciuto da anticorpi più N-terminali (6C2, 9A2) mentre il frammento di 14 kDa presenta esclusivamente l'epitopo per il SAF84.

I risultati mostrano che tutti gli isolati di scrapie ovina possiedono un simile pattern molecolare in arvicola, ben distinguibile da quelli osservati nelle diverse forme di sCJD, BSE e BASE. Le forme di sCJD si differenziano tra loro e dalla BSE per numero di frammenti, glicotipo e peso molecolare. Un solo tipo di sCJD, denominato VV2 sCJD, mostra convergenze con la BASE, ed entrambi sono caratterizzati dalla presenza di tre diversi frammenti di PrP<sup>res</sup>.

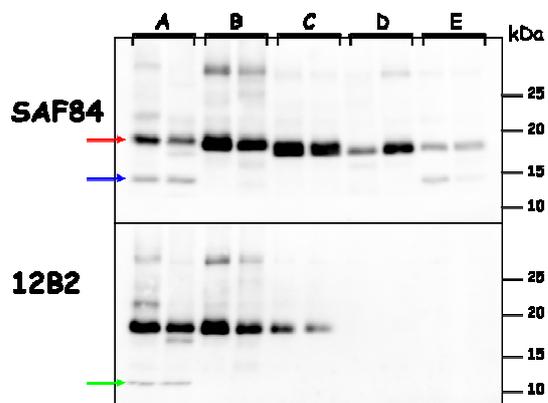
Oltre all'analisi della PrP<sup>res</sup> dei vari ceppi adattati in arvicola, è stata investigata la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> con il CSSA.

I diversi ceppi analizzati hanno mostrato variazioni sostanziali di stabilità conformazionale con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  da 1.6 M a 2.9 M (Fig. 17 e Tabella 7). La PrP<sup>Sc</sup> da arvicole infettate con MM1/MV1, VV2 sCJD e BASE ha mostrato la più elevata stabilità conformazionale, mentre la PrP<sup>Sc</sup> da arvicole infettate con MM2 sCJD è stata la più suscettibile alla denaturazione (Tabella 7). La scrapie, la BSE e MV2 sCJD hanno mostrato valori intermedi di  $[GdnHCl]_{1/2}$ , tuttavia la scrapie è stata chiaramente più suscettibile alla denaturazione della BSE e di MV2 sCJD. Le arvicole infettate con MV2 sCJD hanno mostrato la più elevata variabilità inter-individuale rispetto ad altri isolati.

I dati ottenuti con l'analisi della stabilità conformazionale hanno confermato la categorizzazione ottenuta dall'epitope mapping effettuato sulla PrP<sup>res</sup> (Tabella 7) e non ha identificato ulteriori sottotipi all'interno dei tipi molecolari di PrP<sup>res</sup>.



**Fig. 14.** Western Blot rappresentativo di ceppi di EST analizzati con diversi anticorpi monoclonali. Tipo A (lane 1-2): MM1 e VV2 sCJD; tipo B (lane 3-4): scrapie classica; tipo C (lane 5-6): MV2 sCJD; tipo D (lane 7-8): BSE; tipo E (lane 9-10): MM2 sCJD. Freccia rossa: frammento di 19 kDa; freccia blu: frammento di 14 kDa; freccia verde: frammento di 11 kDa.



**Fig. 15.** Campioni di Fig. 14 dopo deglicosilazione.

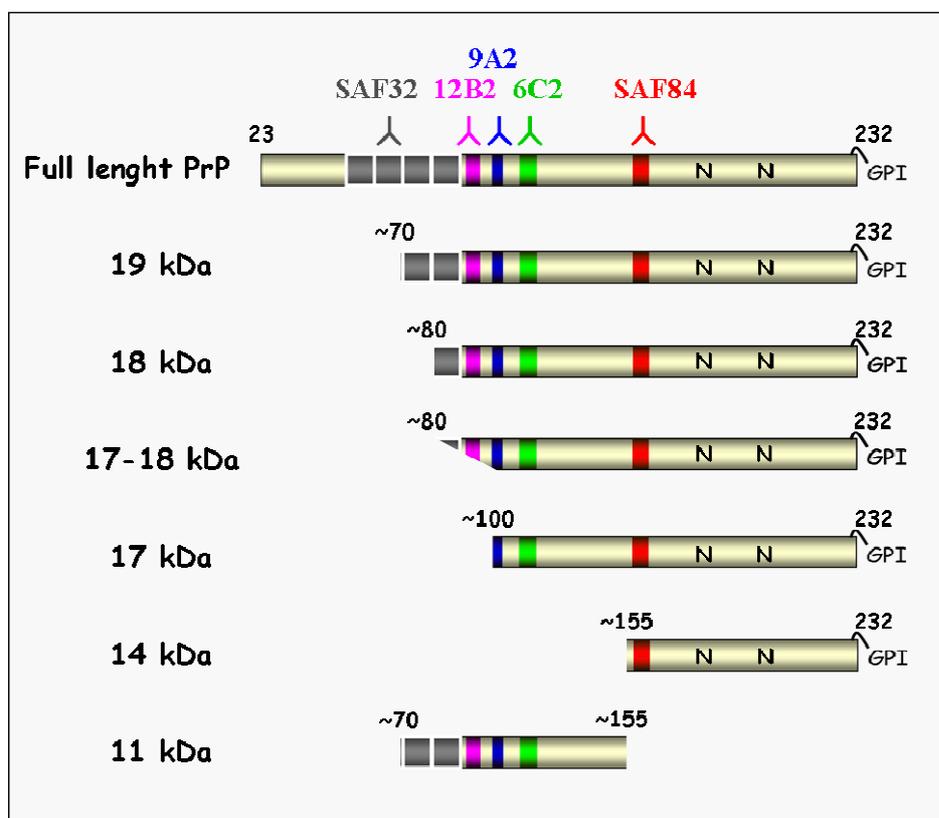
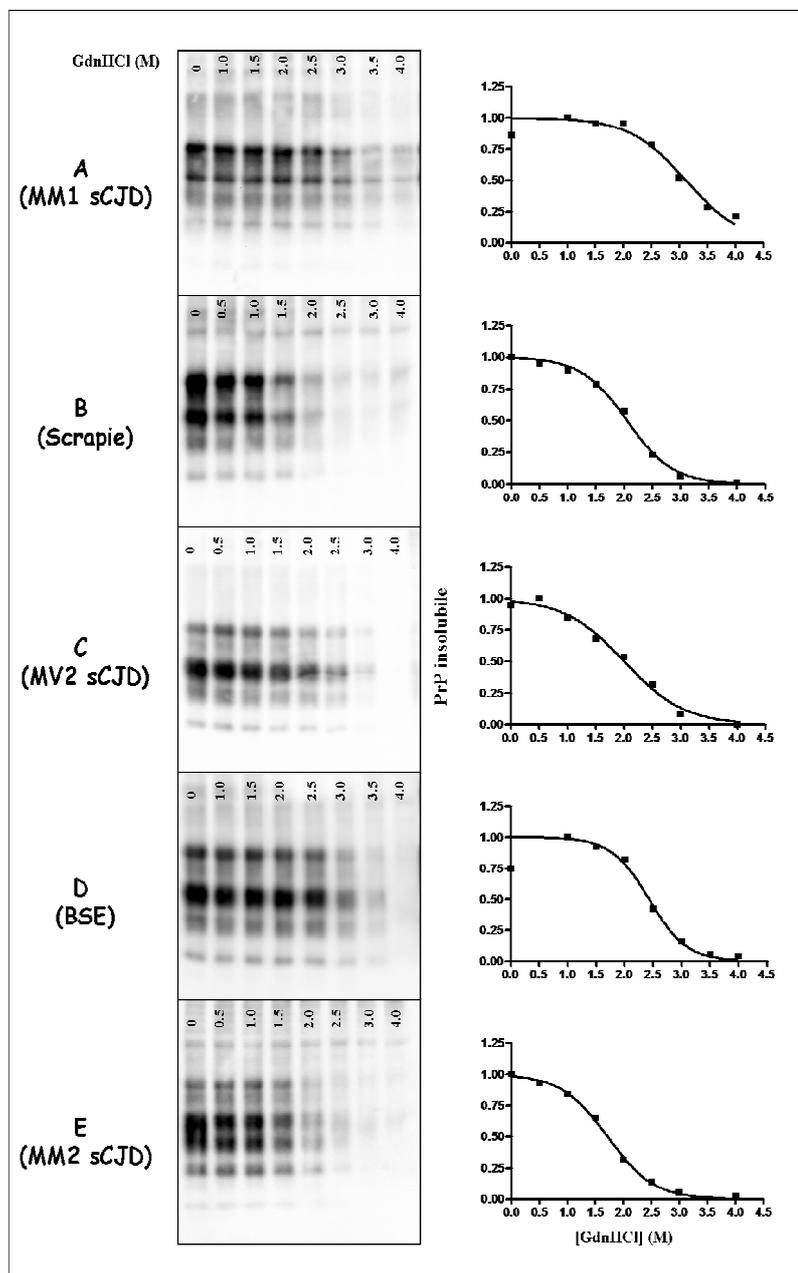


Fig. 16. Schema rappresentativo dei frammenti di PrP<sup>res</sup>

Tabella 6. Tabella riassuntiva dei frammenti osservati nei diversi ceppi di EST

Tipo molecolare	Inoculo	Frammenti di PrP <sup>res</sup>		
	MM1/MV1 sCJD			
A	VV2 sCJD	19kDa	14kDa	11kDa
	BASE			
B	Scrapie	18kDa	/	/
C	MV2 sCJD	17- 18kDa	/	/
D	BSE	17kDa	/	/
E	MM2 sCJD	17kDa	14kDa	/



**Fig. 17.** Stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> di ciascun tipo molecolare individuato in ceppi adattati in arvicola. WB rappresentativi di PrP<sup>Sc</sup> trattata con crescenti concentrazioni di GdnHCl (M) e relative curve dose-risposta.

**Tabella 7.** Valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  dei ceppi di EST adattati in arvicola

<b>Inoculo</b>	<b><math>[GdnHCl]_{1/2}</math> Media<math>\pm</math>dev.st</b>	<b>Tipi di PrP<sup>res</sup></b>
MM1 sCJD	2.77 $\pm$ 0.13	<b>A</b>
MV1 sCJD	2.88 $\pm$ 0.17	<b>A</b>
VV2 sCJD	2,69 $\pm$ 0,10	<b>A</b>
BASE	2,95 $\pm$ 0,08	<b>A</b>
Scrapie	2.10 $\pm$ 0.13	<b>B</b>
MV2 sCJD	2,41 $\pm$ 0,37	<b>C</b>
BSE	2,55 $\pm$ 0,10	<b>D</b>
MM2 sCJD	1.63 $\pm$ 0.11	<b>E</b>

n°: numero di casi analizzati

#### **4.4 Confronto molecolare tra il Nor98 e le malattie umane (VPSPr e GSS)**

Come descritto precedentemente, il Nor98 presenta caratteristiche molecolari peculiari e ben distinguibili dalla scrapie classica: presenza di un frammento di PrP<sup>res</sup> a basso peso molecolare (~8 kDa) prodotto da un sito di taglio N- e C- terminale ed una maggiore sensibilità alla PK.

Frammenti tagliati sia a livello N- che C-terminale a livello della regione intermedia della PrP sono stati osservati anche in malattie da prioni umane come la Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) e nella Variably Protease-Sensitive Prionopathy (VPSPr). La GSS con le mutazioni A117V e F198S è caratterizzata dall'accumulo di frammenti di PrP<sup>res</sup> di ~7 and 8 kDa rispettivamente (Parchi et al., 1998; Piccardo et al., 1998; Piccardo et al., 2001). L'analisi molecolare della GSS con la mutazione P102L mostra due diversi pattern di frammenti di proteina prionica di ~21 and 8 kDa associati a differenti fenotipi clinico patologici (Parchi et al., 1998). Recentemente è stata riportata una nuova malattia da prioni con un pattern molecolare con sensibilità alla PK variabile (Gambetti et al., 2008; Gambetti et al., 1995; Zou et al., 2010). Nonostante l'eterogenea resistenza alla PK dei frammenti di PrP che vanno dai 17 kDa ai 26 kDa, il frammento di 7 kDa mostra una elevata resistenza alla PK in tutti e 3 i genotipi (polimorfismo M/V al codone 129 della proteina prionica).

In base a queste analogie e alle potenziali implicazioni derivanti dalle similitudini tra ceppi di prioni animali ed umani, ho deciso di utilizzare l'ultima parte del mio periodo di dottorato, 5 mesi, presso il centro di referenza per le malattie da prioni umane degli Stati Uniti (National Prion Disease Pathology Surveillance Center, Case Western Reserve University, Cleveland, OH) sotto la guida del prof. P. Gambetti e del dott. W. Zou. Presso il centro di referenza è conservata una banca di tessuti che include tutte le tipologie note di EST umane, incluse le forme genetiche di GSS e le forme sporadiche di VPSPr, descritte per la prima volta dal prof. Gambetti stesso nel 2008 (Gambetti et al., 2008). Nello studio collaborativo intrapreso sono state confrontate le proprietà fisico-chimiche della PrP<sup>Sc</sup> di Nor98, VPSPr e GSS attraverso lo studio dei siti di taglio N- e C-terminali dopo trattamento con la PK (epitope mapping) e con lo studio della stabilità conformazione della PrP<sup>Sc</sup> (CSSA).

Inizialmente sono stati analizzati i campioni di ciascuna malattia attraverso curve di PK per confrontare la suscettibilità alla digestione proteolitica, per studiare i frammenti di PrP<sup>res</sup> e individuare la migliore concentrazione di PK da utilizzare nell'epitope mapping (Fig. 18).

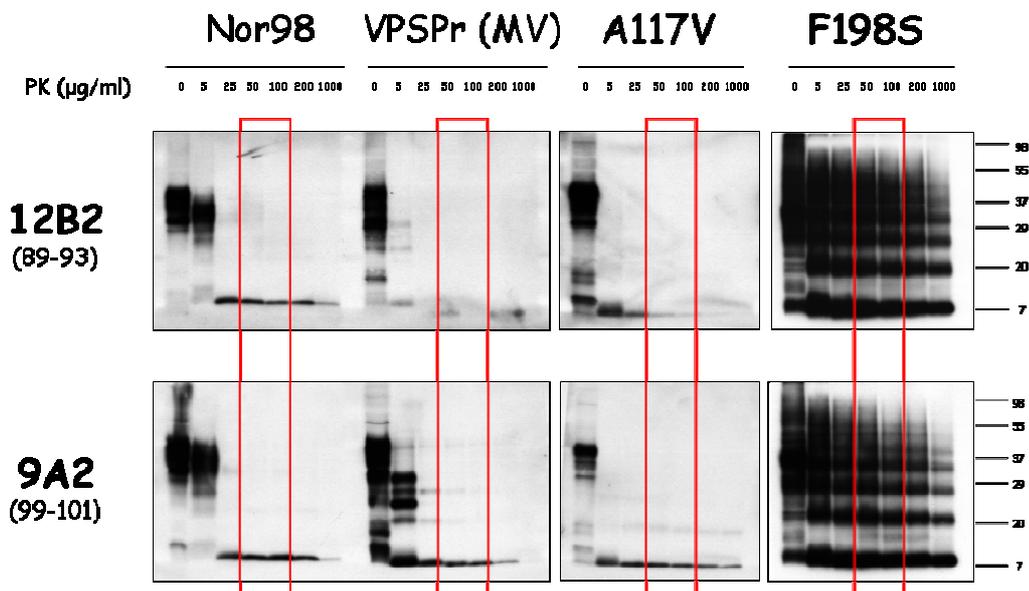
In seguito a trattamento con 0.1 mg/ml di PK, la mobilità del frammento interno del Nor98 è stata più lenta (~8 kDa) dei rispettivi frammenti associati a VPSPr e GSS A117V (8 vs 7 kDa), mentre è simile a quello di GSS F198S e GSS P102L (Fig. 19).

Come mostrato in Tabella 8, il dettagliato epitope mapping ha rivelato che i diversi pesi molecolari dei frammenti di PrP<sup>res</sup> osservati sono in accordo con i loro diversi siti di taglio N- e C- terminali. Inoltre questa analisi suggerisce che i frammenti interni di PrP<sup>res</sup> hanno siti di taglio specifici per ogni malattia (Tabella 8 e Fig. 20).

È interessante notare che nonostante VPSPr e GSS A117V abbiano il frammento interno di PrP<sup>res</sup> di peso molecolare simile (Fig. 19), i siti di taglio N- e C-terminali sono differenti (Tabella 8 e Fig. 20). Infatti, sulla base della diversa reattività con 12B2, 9A2, L42 e 12F10, il frammento di VPSPr è spostato più C-terminalmente rispetto a GSS A117V (aa 97-152 e 91-142 rispettivamente). Allo stesso modo, sulla base della reattività con SAF32 e L42, il frammento di Nor98 è spostato C-terminalmente rispetto alla GSS F198S. Il confronto tra Nor98 e GSS P102L ha mostrato che i rispettivi frammenti di PrP<sup>res</sup> differiscono esclusivamente nel legame con il SAF32.

Poichè GSS F198S ha mostrato una più debole reattività con L42 e un peso molecolare leggermente più alto rispetto a GSS P102L (Fig. 19), è probabile che il

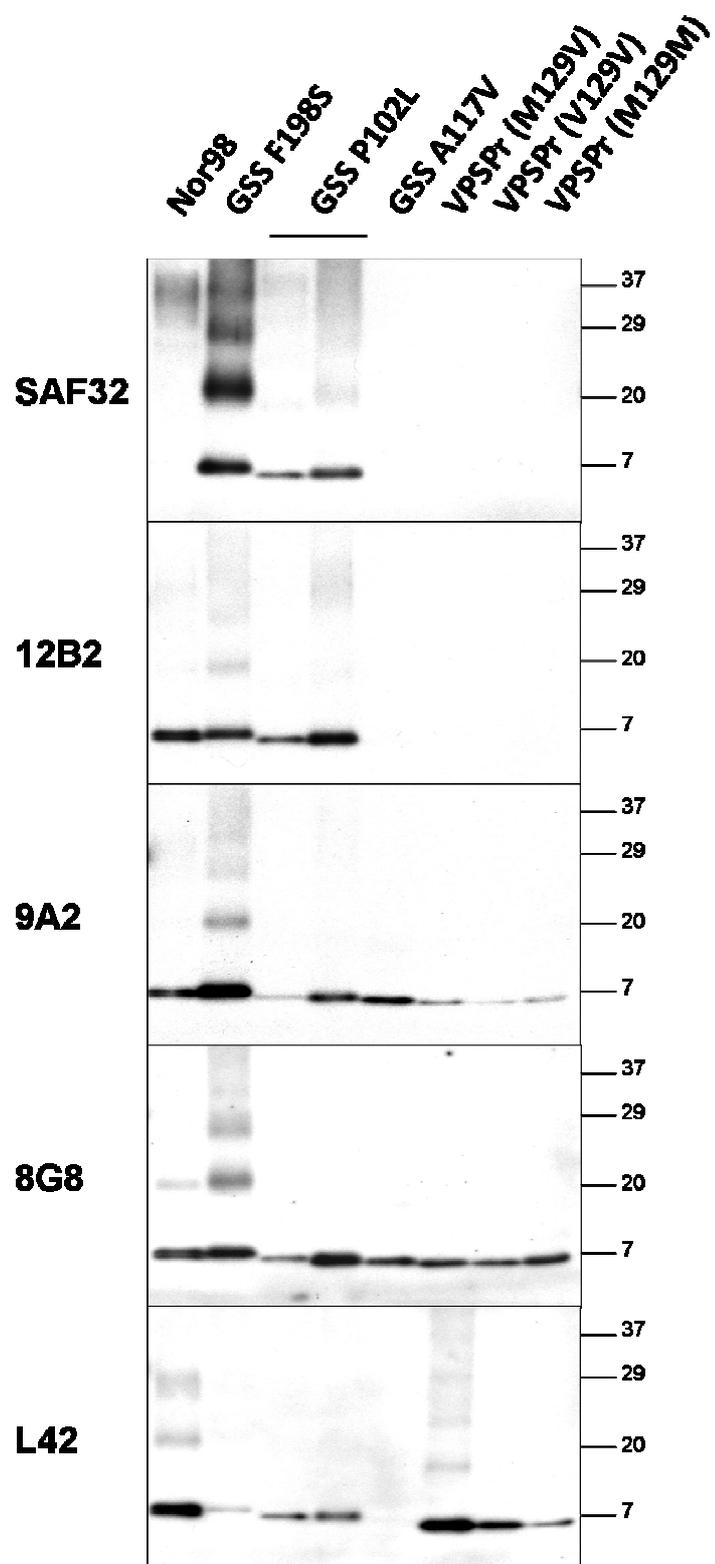
frammento di PrP<sup>res</sup> della mutazione F198S abbia la regione dell'octarepeat maggiormente conservata.



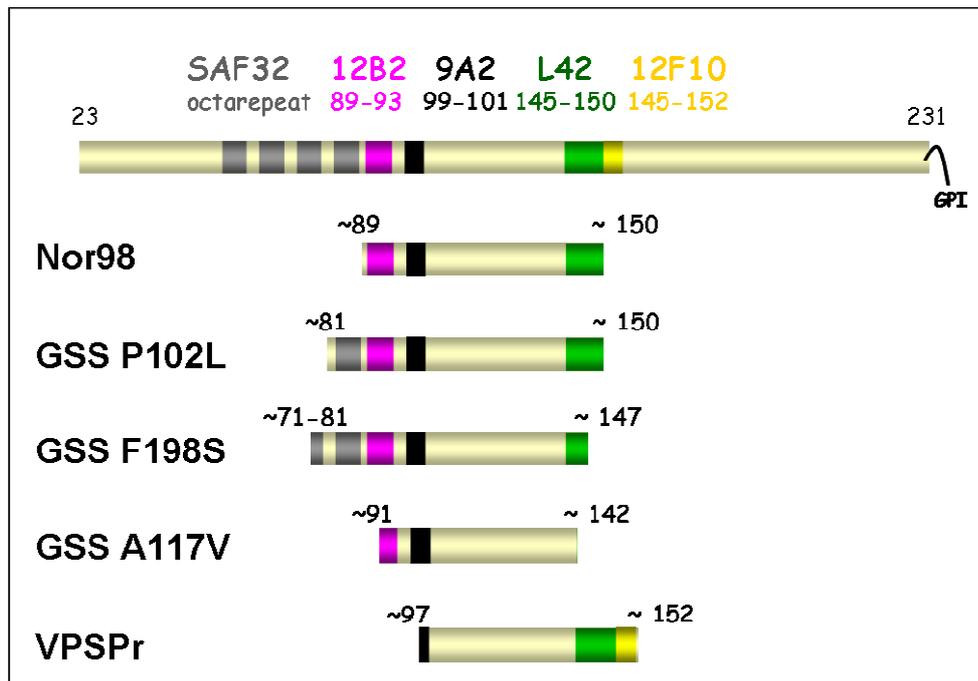
**Fig. 18. Curve di PK di Nor98, VPSPr e GSS.** Western blot rappresentativi di campioni di Nor98, VPSPr (M129V), GSS A117V e GSS F198S dopo trattamento con dosi crescenti di proteasi K (PK). Le dosi di PK utilizzate sono indicate sopra i blots ed espresse in µg/ml. I riquadri di colore rosso indicano le dosi PK (50-100 µg/ml) che permettono di analizzare i frammenti PK-resistenti a basso peso molecolare. Le membrane sono state processate con 12B2 (in alto) e 9A2 (in basso). Sulla destra dei blots sono indicati i pesi molecolari in kDa.

**Tabella 8.** Schema dei risultati dell'epitope mapping dei frammenti interni di Nor98, VPSPr and GSS ottenuti con diversi anticorpi monoclonali. -, nessun segnale ; +/- segnale debole ; + segnale forte.

mAbs	Epitopo PrP umana	Uomo				Pecora Nor98
		VPSPr	GSS A117V	GSS F198S	GSS P102L	
SAF32	octarepeat	-	-	+	+	-
12B2	89-93	-	+/-	+	+	+
9A2	99-101	+/-	+	+	+	+
6D11	98-101	+	+	+	+	+
8G8	97-104	+	+	+	+	+
F89	139-142	+	+	+	+	+
L42	145-150	+	-	+/-	+	+
12F10	143-152	+	-	-	-	-
SAF60	157-161	-	-	-	-	-



**Fig. 19.** Blot rappresentativi di epitope mapping della PrP<sup>res</sup> di Nor98, GSS and VPSPr con 5 diversi anticorpi anti-PrP.



**Fig. 20.** Schema rappresentativo dei frammenti di 7-8 kDa sulla base dell'epitope mapping. La numerazione degli aminoacidi fa riferimento alla sequenza di PrP umana.

Successivamente i campioni sono stati analizzati con il CSSA per studiare la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> sia sensibile che resistente alla PK associata ad ogni malattia.

Il CSSA ha mostrato stabilità conformazionali della PrP<sup>Sc</sup> specifiche per ciascuna malattia ad eccezione dei casi di P102L. La PrP<sup>Sc</sup> del Nor98 ha mostrato valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 1.5 M come mostrato precedentemente.

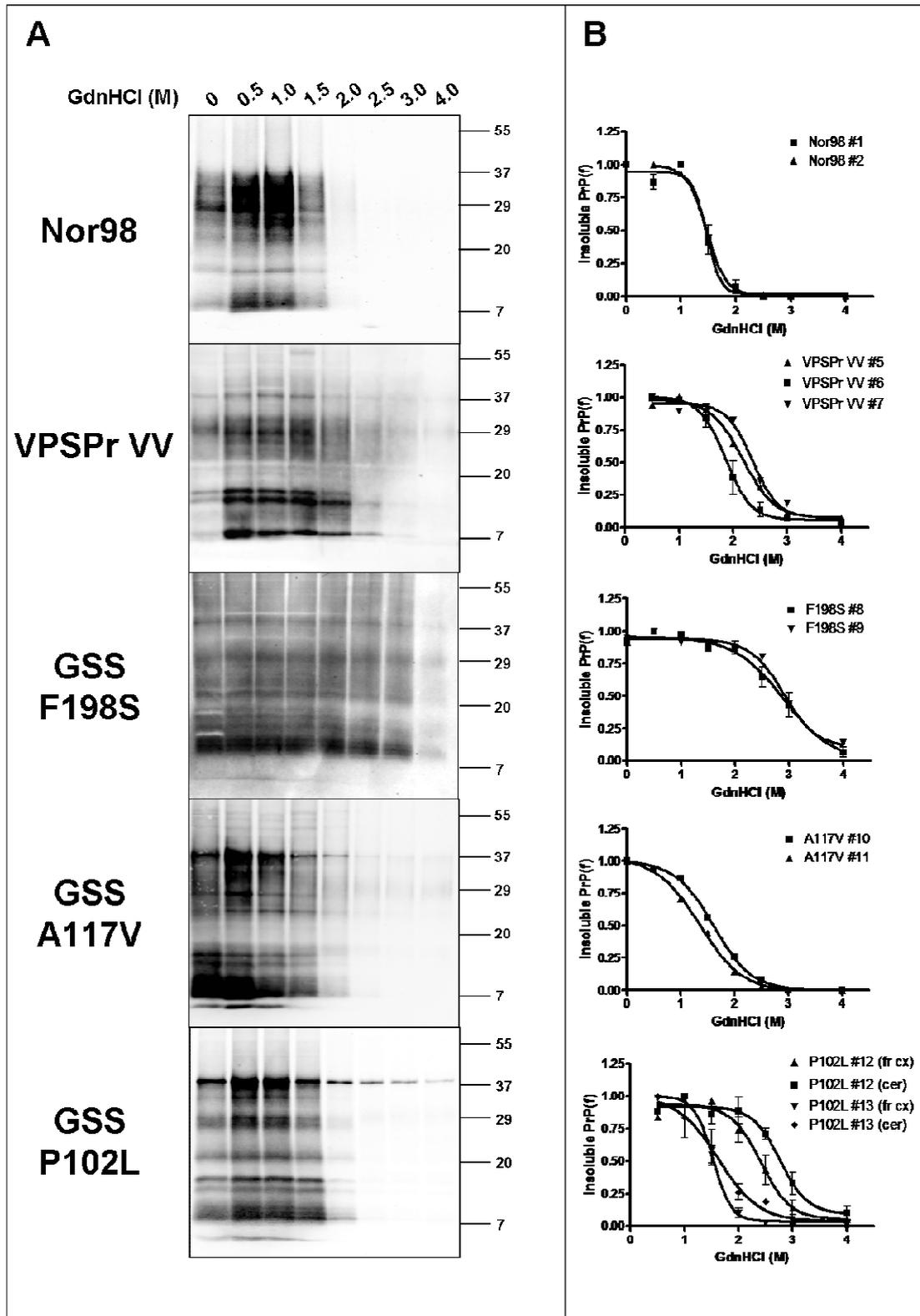
La PrP<sup>Sc</sup> di VPSPR ha mostrato una maggiore stabilità rispetto al Nor98 con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 2.2-2.4 M (Fig. 21; Tabella 9). L'analisi dei casi di GSS indica stabilità conformazionali mutazione-specifiche. La PrP<sup>Sc</sup> di GSS F198S è più resistente alla denaturazione rispetto a GSS A117V (valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 2.9 M vs 1.4-1.6 M rispettivamente). La stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> del caso GSS P102L (#12 con M/M al residuo 129) contenente sia la PrPres 27-30 che il frammento di 8 kDa (Fig. 22) è stata più alta del caso GSS P102L (#13 con M/V al residuo 129) caratterizzata dal solo frammento interno di 8 kDa (Fig. 22). Comunque nel caso #12 il cervelletto accumula solo il frammento di 8 kDa quindi dei casi di GSS P102L sono stati analizzati

anche i cervelletti contenenti entrambi i frammenti di 8 kDa. Le analisi hanno mostrato ancora una maggiore stabilità conformazionale del caso #12 rispetto al caso #13 (Fig.21 e Tabella 9).

**Tabella 9. Valori di  $GdnHCl_{1/2}$  della PrP<sup>Sc</sup> di umana e ovina**

Specie	Malattia	ID	Genotipo¶	Area cerebrale	[GdnHCl] <sub>1/2</sub> media ± SEM	PrP <sup>res</sup> *	
Ovina	Nor98	#1	AFRQ/AFRQ	Cervelletto	1.48 ± 0.04	89 - 150	
		#2	ALRR/ALHQ	Cervelletto	1.44 ± 0.01		
Umana	VPSPr	#5	VV	Corteccia frontale	2.18 ± 0.04	97 - 152	
		#6	VV	Corteccia frontale	2.00 ± 0.04		
		#7	VV	Corteccia frontale	2.36 ± 0.08		
	GSS	#8	VV	Corteccia frontale	2.89 ± 0.14	71/81 – 147	
	F198S	#9	MV	Corteccia frontale	2.91 ± 0.09		
	GSS	#10	MV	Corteccia frontale	1.61 ± 0.03	91 - 142	
	A117V	#11	VV	Corteccia frontale	1.36 ± 0.04		
	GSS	P102L	#12	MM	Cervelletto	2.77 ± 0.08	81 - 150
					Corteccia frontale	2.41 ± 0.09	
			#13	MV	Corteccia frontale	1.53 ± 0.02	
					Cervelletto	1.63 ± 0.16	

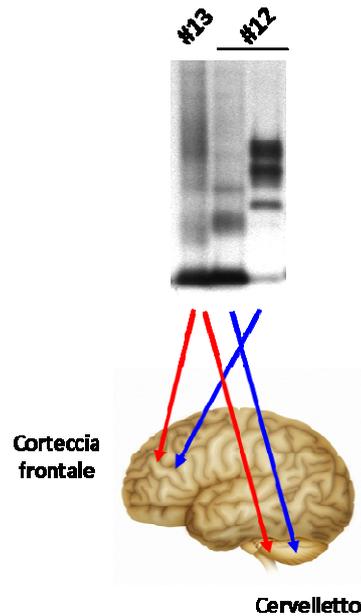
¶ polimorfismo ovino: amino acidi ai codoni 136, 141, 154 e 171 del gene della PrP ovina; polimorfismo umano al codone 129 del gene umano della PrP; \* deriva dall'epitope mapping come riportato in Tabella 8. La numerazione degli amino acidi si riferisce alla sequenza di PrP umana.



**Fig. 21. Analisi della stabilità conformazionale.**

**A:** blot rappresentativi di PrP<sup>Sc</sup> dopo trattamento con concentrazioni crescenti di GdnHCl. Nor98 caso #2, VPSPr VV caso #7, GSS F198S caso #8, GSS A117V caso #11, GSS P102L caso #13 corteccia frontale.

**B:** curve dose-risposta dei campioni analizzati con il CSSA (Tabella 9).



**Fig. 22. Western blot dei due casi di GSS P102L.**

Il caso #13 sembra essere caratterizzato solo dal frammento interno di 8 kDa. Il caso #12 è caratterizzato da frammenti di PrP<sup>res</sup> di 27-30 e 8 kDa: sono entrambi nella corteccia frontale mentre nel cervelletto si ritrova solo il frammento di 8 kDa.

In conclusione l'epitope mapping e l'analisi della stabilità conformazionale hanno mostrato differenze malattia-specifiche (Tabella 9). Comunque un singolo caso di GSS con la mutazione P102L (#13) ha esibito una stabilità conformazionale simile al Nor98 ed è discriminabile dal Nor98 solo per il legame con il SAF32. A tale proposito, è importante notare che l'inserzione della glicina (G) nell'ultimo repeat della sequenza di PrP ovina (Fig. 23) potrebbe avere impatto sul legame del SAF32 con il frammento di PrP<sup>res</sup> del Nor98.

<b>Human</b>	<b>73- WGQPHGGGWGQPHGGG - WGQGGGTHSQWNK -101</b>
<b>Ovine</b>	<b>76- WGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGG - SHSQWNK -104</b>
	<b>SAF32, 12B2, 9A2</b>

**Fig. 23. Allineamento della sequenza di PrP ovina e umana.**

L'epitopo dell'anticorpo SAF32 è in blu, del 12B2 in rosso e del 9A2 in verde. Notare l'inserzione G in posizione 92 nella PrP ovina.

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1. Stabilità conformazionale con CSSA

Il principale evento patogenetico delle EST coinvolge la trans-conformazione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>, portando all'accumulo di aggregati insolubili e parzialmente resistenti alle proteasi. Quindi la resistenza alla digestione con PK e l'insolubilità sono le caratteristiche distintive della PrP<sup>Sc</sup>. La gran parte degli studi sulla caratterizzazione molecolare della PrP<sup>Sc</sup>, però, si sono focalizzati principalmente sul frammento della PrP<sup>Sc</sup> resistente alla PK, a causa delle difficoltà nel differenziare la PrP<sup>C</sup> dalla PrP<sup>Sc</sup> degli omogenati cerebrali infetti. Tuttavia, è sempre più evidente che le isoforme di PrP<sup>Sc</sup> insolubili ma sensibili alle proteasi sono coinvolte in diverse malattie animali ed umane (Cronier et al., 2008; Gambetti et al., 2008; Pastrana et al., 2006; Safar et al., 1998; Thackray et al., 2007a; Tremblay et al., 2004; Tzaban et al., 2002). Queste forme di PrP<sup>Sc</sup> sono state individuate con diverse metodiche, tra le quali il CDI (Safar et al., 1998; Safar et al., 2005a; Thackray et al., 2007a), cattura immunologica (Nazor et al., 2005; Zou et al., 2004), centrifugazioni differenziali (Pastrana et al., 2006; Tzaban et al., 2002), digestione con termolisina (Cronier et al., 2008) e digestione a freddo con PK (Tremblay et al., 2004). Tra le tecniche capaci di individuare la PrP<sup>Sc</sup> sensibile alle proteasi (sPrP<sup>Sc</sup>), il Conformation Dependent Immunoassay (CDI) ha dimostrato di poter distinguere otto ceppi di prioni di hamster in base alla conformazione della PrP<sup>Sc</sup>, calcolando il rapporto del legame dell'anticorpo alla PrP nativa e denaturata in funzione della concentrazione della PrP<sup>Sc</sup> (Safar et al., 1998). Il CDI però dipende fortemente dagli anticorpi disponibili capaci di riconoscere gli epitopi nascosti della PrP<sup>Sc</sup>, come il 3F4 e questo ne limita l'utilizzo in molte specie, ruminanti inclusi.

Con il CSSA abbiamo sviluppato un protocollo per la caratterizzazione molecolare degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> che non sfrutta la loro resistenza alle proteasi, ma è basato su una procedura convenzionale di centrifugazione differenziale in presenza di detergenti e sulla solubilizzazione degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> dopo denaturazione con concentrazioni crescenti di GdnHCl. I risultati mostrano che il CSSA è un metodo affidabile e semplice e che è in grado di discriminare conformeri di PrP<sup>Sc</sup> associati a diversi ceppi di EST. Rispetto al CDI il CSSA offre due importanti vantaggi : i) non dipende dall'anticorpo usato e può essere quindi sfruttato per confrontare la stabilità conformazionale di PrP<sup>Sc</sup> di diverse specie; ii) non c'è ancora prova che il CDI sia capace di discriminare i ceppi

nell'ospite naturale mentre il CSSA ha mostrato di poter essere usato per isolati naturali umani ed ovini. In precedenti studi (Legname et al., 2006; Peretz et al., 2001; Peretz et al., 2002) è stato messo a punto un saggio di stabilità conformazionale (CSA) capace di discriminare conformeri di PrP<sup>Sc</sup> misurando il livello di perdita di resistenza alle proteasi in funzione di esposizioni crescenti alla GdnHCl. Questo metodo ha mostrato di essere molto utile nella tipizzazione molecolare dei ceppi in diverse specie (Cali et al., 2006; Green et al., 2008; Scott et al., 2005) ed è stato recentemente sfruttato per investigare alcuni meccanismi di base della replicazione dei prioni (Legname et al., 2006).

Il protocollo sviluppato per il CSSA è concettualmente simile al CSA poiché deriva informazioni dalla stabilità conformazionale degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup>. Infatti come mostrato in Fig. 6 il CSA e il CSSA danno profili di denaturazione molto simili in omogenati cerebrali di arvicole inoculate con scrapie. Comunque il CSSA rappresenta un passo avanti nella tipizzazione molecolare dei prioni ed offre molti vantaggi rispetto a protocolli usati in precedenza. Con il CSA infatti per distinguere la PrP<sup>Sc</sup> denaturata da quella nativa viene sfruttata la suscettibilità alla PK ma, come è noto, i ceppi mostrano distinte suscettibilità alla PK mentre il CSA utilizza la stessa concentrazione di PK per derivare il livello di denaturazione della PrP<sup>Sc</sup> nei diversi ceppi. Inoltre nel CSA è necessario diluire la GdnHCl per permettere l'attività dell'enzima proteolitico. Tuttavia, è noto che la denaturazione della PrP<sup>Sc</sup> può essere un fenomeno parzialmente reversibile e, come riportato, la diluizione del denaturante potrebbe ristabilire l'iniziale resistenza alle proteinasi della PrP<sup>Sc</sup> (Kocisko et al., 1996). Con il CSSA questo problema viene arginato evitando ogni cambiamento della concentrazione del denaturante durante il saggio. Infatti, la fase di denaturazione è seguita dalla separazione delle frazioni solubili ed insolubili in centrifuga, nelle medesime condizioni della fase di denaturazione. La caratteristica forse più importante del CSSA è la sua capacità di caratterizzare la PrP<sup>Sc</sup> sensibile alle proteasi, permettendo quindi il confronto diretto delle stabilità conformazionali dei ceppi di EST associati a PrP<sup>Sc</sup> sensibili e resistenti alla PK.

Abbiamo quindi investigato il potenziale del CSSA per la tipizzazione di isolati ovini naturali di Nor98, che è caratterizzato da una quantità elevata di sPrP<sup>Sc</sup> insolubile (Buschmann et al., 2004). I risultati sono stati molto promettenti, poiché i campioni di Nor98 hanno mostrato un distinto profilo di denaturazione, nonostante gli isolati

analizzati derivassero da ovini con diversi genotipi e presumibilmente a diversi stadi della malattia. Inoltre, i campioni di Nor98 sono stati discriminati facilmente dai campioni di scrapie classica, che rappresenta un ceppo differente. Il CSSA ha permesso quindi la caratterizzazione della stabilità conformazionale di un ceppo proteasi-sensibile, del quale i metodi basati sulla proteolisi avrebbero caratterizzato solo una minima parte della PrP<sup>Sc</sup> presente nell'omogenato cerebrale. Questi risultati sono promettenti soprattutto in vista dei recenti studi (Cronier et al., 2008; Safar et al., 2005a) che hanno stimato che circa il 90% della PrP<sup>Sc</sup> presente negli isolati di sCJD e vCJD è PrP<sup>Sc</sup> proteasi-sensibile. Inoltre la recente scoperta di una proteinopatia proteasi-sensibile (VPSPr), una malattia da prioni umana mai riportata prima (Gambetti et al., 2008), potrebbe suggerire che le malattie da prioni caratterizzate da isoforme di PrP sensibili alle proteinasi siano più frequenti di quanto ritenuto fino ad ora. È stato riportato che gli omogenati cerebrali da casi di VPSPr contengono principalmente una forma di PrP insolubile sensibile alle proteasi, accompagnata da modeste quantità PrP tipicamente proteasi-resistente (Gambetti et al., 2008), in maniera simile ai risultati ottenuti con i campioni di Nor98.

Un'altra caratteristica del CSSA è che, evitando il trattamento con la PK, permette la caratterizzazione della full-length PrP<sup>Sc</sup> (FL-PrP<sup>Sc</sup>), compresa la parte N-terminale della proteina che viene idrolizzata dopo digestione con PK. Oltre alla FL-PrP, durante il CSSA vengono precipitati selettivamente anche i frammenti di PrP<sup>Sc</sup> prodotti *in vivo* per l'azione di proteasi cellulari ed extracellulari. Quindi il CSSA permette di derivare informazioni anche sulla loro stabilità conformazionale. Questi frammenti comprendono quelli C-terminali come C2 in scrapie e sCJD, così come il caratteristico frammento interno del Nor98, e sono facilmente distinguibili dalla FL-PrP anche per il legame con diversi anticorpi (Fig. 5). Questo aspetto è molto interessante perché permette di confrontare le proprietà conformazionali degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup> prodotti dalla FL-PrP o da frammenti di PrP<sup>Sc</sup> tagliati *in vivo*. L'epitope mapping della PrP<sup>Sc</sup> *in situ* infatti ha mostrato che gli aggregati di FL-PrP o C2 hanno diverse localizzazioni cellulari (Jeffrey et al., 2001). Inoltre, analizzando PrP<sup>Sc</sup> resistente alla termolisina di campioni ovini con scrapie e BSE, Owen e colleghi hanno mostrato il potenziale dei frammenti C2 per la tipizzazione dei ceppi (Owen et al., 2007).

Il principale inconveniente del CSSA potrebbe essere l'incompleta separazione delle due isoforme di PrP, PrP<sup>C</sup> e PrP<sup>Sc</sup>. È stato sviluppato un protocollo capace di

minimizzare questo problema, tuttavia l'1-4% della PrP<sup>C</sup> negli omogenati cerebrali da arvicole non malate (NBH) è stato ritrovato nel pellet. Ci sono comunque molte evidenze che questo inconveniente non interferisca con i risultati del CSSA. Infatti gli omogenati cerebrali di arvicole infettate contengono bassi livelli di PrP solubile ("bona fide" PrP<sup>C</sup>) (Fig. 2). Sulla base dei risultati ottenuti con il NBH, si può ritenere che meno del 5% della PrP<sup>C</sup> si ritrovi nel pellet; d'altra parte, nei cervelli malati la PrP<sup>C</sup> era il 5-30% della PrP totale. Da queste considerazioni, si può presupporre che il rapporto PrP<sup>Sc</sup>/PrP<sup>C</sup> nel pellet debba essere più grande di due ordini di grandezza, che rappresenta l'intervallo di lavoro del CSSA. Inoltre, è stata ottenuta una chiara solubilità differenziale della PrP<sup>C</sup> e della PrP<sup>Sc</sup> anche dopo l'aumento del rapporto PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup> nell'omogenato, unendo artificialmente SBH con NBH (Fig. 2). Ed ancora più importante, la frazione di PrP<sup>C</sup> sedimentata ha dimostrato di essere insensibile alla denaturazione (Fig. 3), non in grado quindi di interferire con il CSSA.

## 5.2 Discriminazione dei ceppi con il CSSA

Il potenziale del CSSA per la discriminazione dei ceppi è stato investigato analizzando ceppi di sCJD e gCJD umana e scrapie ovina adattati in arvicola rossastra, ceppi già caratterizzati in dettaglio precedentemente (Di Bari et al., 2008; Nonno et al., 2006). In questi studi le arvicole infettate con isolati di MM1/MV1 sCJD e E200K gCJD avevano mostrato pattern di trasmissione identici tra loro ed erano caratterizzati da un frammento non glicosilato di PrP<sup>res</sup> di 19 kDa, mentre MM2 sCJD mostrava un frammento non glicosilato di PrP<sup>res</sup> di circa 17 kDa. Diversamente, tutti gli isolati italiani di scrapie (Di Bari et al., 2008; Piening et al., 2006), così come il ceppo murino ME7 (Nonno et al., 2006), dopo trasmissione in arvicola erano caratterizzati dall'accumulo di una PrP<sup>res</sup> non glicosilata di peso molecolare intermedio (18 kDa) tra i tipi umani 1 e 2 di CJD. Questi differenti tipi di PrP<sup>res</sup> derivano da diversi siti di taglio della PrP<sup>Sc</sup> da parte della PK, che si pensa riflettano distinte conformazioni degli aggregati di PrP<sup>Sc</sup>. Con il CSSA abbiamo mostrato che in effetti questi 3 tipi di PrP<sup>res</sup> sono caratterizzati da aggregati di PrP<sup>Sc</sup> con distinte suscettibilità alla denaturazione con GdnHCl. Quindi, la PrP<sup>Sc</sup> da arvicole infettate con MM1 sCJD, MV1 sCJD e E200K gCJD, caratterizzata da una PrP<sup>res</sup> di 19 kDa, ha mostrato una elevata resistenza alla denaturazione, mentre i campioni di MM2 sCJD, caratterizzati da un frammento di PrP<sup>res</sup> di 17 kDa, sono stati i più suscettibili e la scrapie SS7, caratterizzata da una PrP<sup>res</sup>

di 18 kDa, ha mostrato una suscettibilità intermedia. È interessante notare che la variabilità dei valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  interna ad ogni gruppo è stata molto bassa (Tabella 2) ed ha permesso il confronto statistico tra i differenti gruppi, consolidando l'idea che i valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  riflettano proprietà della PrP<sup>Sc</sup> ceppo-specifiche piuttosto che individuali.

È stato recentemente suggerito che la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> sia direttamente proporzionale alla lunghezza del periodo di incubazione nei topi infettati con diversi ceppi di prioni (Legname et al., 2006). Riguardo ciò, è importante notare che i risultati in arvicole sembrano contraddire questa conclusione, infatti la minore stabilità conformazionale è associata a prioni che portano a più lunghi periodi di incubazione, cioè MM2 sCJD con un periodo di sopravvivenza di ~330 giorni post-infezione (dpi), mentre la scrapie SS7 (tempo di sopravvivenza di ~90 dpi) e MM1/MV1 sCJD (~130 dpi) hanno mostrato maggiore stabilità conformazionale e minori tempi di incubazione rispetto a MM2 sCJD.

Il potenziale discriminativo dei ceppi del CSSA è stato esplorato anche nelle malattie naturali. A questo scopo sono stati analizzati tre degli isolati umani ed ovini utilizzati per la trasmissione in arvicola. I due isolati da pazienti con MM1 e MM2 sCJD sono stati facilmente discriminati in base alla loro stabilità conformazionale, con MM1 sCJD che ha esibito una minore suscettibilità alla denaturazione rispetto a MM2 sCJD (valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 3,31 M per MM1 sCJD e 1,63 M per MM2 sCJD). Questi risultati rispecchiano precedenti studi con il CSA che mostravano che la PrP<sup>Sc</sup> associata a MM1 sCJD era due volte più stabile di quella associata a MM2 sCJD, con valori di  $[GdnHCl]_{1/2}$  di 2,76 M e 1,63 M per MM1 sCJD e MM2 sCJD (Cali et al., 2006). Naturalmente, questi dati necessitano conferma con un più ampio numero di isolati.

Oltre a valutare il potenziale discriminativo di isolati naturali, questo approccio ha permesso di confrontare la stabilità conformazionale dei prioni nel loro ospite naturale e dopo trasmissione in arvicola. È stato mostrato precedentemente che i ceppi di prioni possono sia mantenere le loro proprietà biologiche che mutare dopo trasmissione in una nuova specie ospite (Bruce, 1993). Più recentemente è stato riportato che, durante la trasmissione inter-specifica, un cambiamento nella conformazione è accompagnato dall'emergenza di un nuovo ceppo, mentre la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> è mantenuta quando un ceppo viene riprodotto fedelmente in un nuovo ospite (Peretz et al., 2002). I risultati di questo lavoro mostrano che l'ordine di grandezza della stabilità

conformazionale degli isolati di sCJD e scrapie è in generale preservato dopo l'adattamento in arvicola (Fig. 7). In particolare, la stabilità conformazionale di MM2 sCJD è risultata identica prima e dopo trasmissione in arvicola. Studi precedenti hanno mostrato che MM2 sCJD, e in modo minore MM1 sCJD, incontrano una barriera di trasmissione molto bassa in arvicola rossastra (Nonno et al., 2006). Queste osservazioni possono suggerire che MM2 e probabilmente MM1 sCJD propagano fedelmente le loro proprietà di ceppo dopo trasmissione in arvicola. Il modello della selezione conformazionale prevede che la struttura primaria della PrP<sup>C</sup> dell'ospite influenzi la varietà dei possibili tipi di PrP<sup>Sc</sup> che sono termodinamicamente preferiti durante la propagazione (Collinge and Clarke, 2007). In questo modello la barriera di trasmissione è determinato dal grado di sovrapposizione tra i tipi di PrP<sup>Sc</sup> permessi o preferiti dalla PrP<sup>C</sup> dell'ospite e della specie donatrice. Si potrebbe quindi ritenere che la sequenza di PrP di arvicola sia prona ad adottare alcune conformazioni di PrP<sup>Sc</sup> umane ed è stato mostrato che questa proprietà potrebbe risiedere nella presenza di alcuni particolari aminoacidi in posizioni rilevanti della PrP di arvicola (Agrimi et al., 2008; Piening et al., 2006).

Infine il CSSA è stato sfruttato per discriminare isolati di prioni ovini di campo, mostrando che questo metodo è di grande valore per la discriminazione dei ceppi in ospiti naturali. Infatti, la stabilità conformazionale dei prioni è fortemente associata al ceppo, sia di scrapie classica che di Nor98 e non dipende da fattori individuali come età, stadio clinico o genotipo della PrP (Tabella 3).

### **5.3 Sviluppo del WB discriminatorio**

Vista l'alta capacità discriminativa del CSSA nell'analisi di isolati naturali (sCJD, scrapie e Nor98), abbiamo investigato il potenziale di questa nuova tecnica in ambito applicativo, ed in particolare per il riconoscimento molecolare della BSE negli ovi-caprini. A tal fine abbiamo studiato un pannello di isolati ovini che rappresentano la variabilità ad oggi nota, includendo isolati di scrapie classica, Nor98, CH1641-like e campioni di BSE sperimentale in pecora. In particolare era interessante confrontare i campioni CH1641-like con la BSE, visto che le tecniche discriminative attualmente disponibili non permettono una loro differenziazione. I campioni di BSE hanno mostrato una stabilità conformazionale nettamente maggiore rispetto a tutti gli isolati naturali ovini, ed in particolare rispetto ai CH1641-like. In base a questa caratteristica

abbiamo messo a punto un nuovo test molecolare discriminativo, apportando alcune variazioni al metodo in uso in Italia per la sorveglianza della BSE negli ovi-caprini, il WB discriminatorio dell'Istituto Superiore di Sanità. I risultati hanno mostrato che l'uso combinato di due caratteristiche molecolari indipendenti, il taglio N-terminale della PK e la resistenza alla denaturazione, permette di differenziare gli isolati di scrapie classica e di CH1641-like dalla BSE dei piccoli ruminanti.

Tuttavia è stata osservata una certa variabilità tra i campioni di CH1641-like, sia quando analizzati con il CSSA (Tabella 4) che con il WB discriminatorio. Come riportato in precedenza (Stack et al., 2006), i rapporti di anticorpi di alcuni campioni di CH1641-like sono vicini al cut-off (Fig. 13A). Inoltre, la variabilità nell'analisi della stabilità conformazionale osservata con il CSSA ha influenzato i rapporti di denaturazione misurati con il WB discriminatorio, con 2 campioni di CH1641-like che hanno mostrato una più elevata resistenza alla GdnHCl rispetto a tutti gli altri campioni di scrapie. A causa del limitato numero di isolati di CH1641-like, sono necessari ulteriori studi per valutare il loro effettivo grado di variabilità. Questa variabilità, oltre creare problemi nella discriminazione, potrebbe dipendere dalla possibile presenza di più varianti conformazionali di PrP<sup>Sc</sup> (e forse ceppi) negli isolati di CH1641-like. Le similitudini biologiche dei campioni di CH1641-like sia dopo trasmissione in topi transgenici ovis (Baron et al., 2008) che in arvicole (U. Agrimi, dati non pubblicati) sono degne di nota. Tuttavia, gli isolati di CH1641-like producono un certo grado di variabilità molecolare della PrP<sup>Sc</sup> in entrambi i modelli animali che potrebbe essere legata alla variabilità molecolare della PrP<sup>Sc</sup> estratta dai cervelli ovis.

Nonostante il limitato numero di campioni, questo studio supporta la convinzione che gli isolati di CH1641-like possano essere discriminati dalla BSE dei piccoli ruminanti dal punto di vista molecolare in maniera convincente. Inoltre, l'elevata stabilità conformazionale della BSE, quando confrontata con quella degli isolati di scrapie classica, Nor98 e CH1641-like, suggerisce il potenziale del nuovo WB discriminatorio proposto in questo studio per discriminare la BSE da tutte le altre EST dei piccoli ruminanti.

## **5.4 Caratterizzazione molecolare di ceppi umani e animali adattati in arvicola**

Utilizzando metodiche già esistenti insieme al nuovo saggio di stabilità conformazionale, sono state confrontate le proprietà biochimiche dei ceppi associati a malattie da prioni umane ed animale, dopo essere stati adattati in arvicola rossastra.

L'analisi della PrP<sup>res</sup> associata alle malattie sporadiche umane e alle malattie da prioni animali ha mostrato innanzitutto che la scrapie, BSE, MM1/MV1 e MM2 sCJD, hanno mantenuto il loro pattern molecolare dopo trasmissione in arvicola, a differenza di VV2 sCJD e della BASE.

L'analisi della PrP<sup>res</sup> ha inoltre permesso la categorizzazione degli isolati di prioni, mostrando che tutte le EST animali hanno caratteristiche molecolari distinte dalla CJD sporadica, ad eccezione della BASE.

L'analisi della stabilità conformazionale ha confermato la classificazione molecolare della PrP<sup>res</sup> pur non permettendo di discriminare ulteriormente i tipi individuati sulla base della caratterizzazione delle proprietà della PrP<sup>res</sup>.

Le similitudini evidenziate tra BASE e VV2 CJD incoraggiano ulteriori studi comparativi sulla natura delle forme sporadiche e sulla possibile relazione tra EST animali ed umane.

## **5.5 Confronto molecolare di Nor98 con malattie da prioni umane**

L'analisi comparativa di isolati di Nor98 con alcune malattie da prioni umane (VPSPr e GSS) ha rivelato differenze che, seppur lievi, sembrano essere significative.

Innanzitutto l'analisi della mobilità elettroforetica ha rivelato che il peso molecolare relativo del frammento di PrP<sup>res</sup> del Nor98 è più grande dei rispettivi frammenti presenti in VPSPr e GSS con la mutazione A117V, mentre sembra essere molto simile alle GSS con le mutazioni F198S e P102L. Nonostante ciò, l'analisi accurata di tali frammenti attraverso l'epitope mapping, ha mostrato differenze di sito di taglio sia N- che C-terminale anche nei casi in cui il peso molecolare della PrP<sup>res</sup> è simile: VPSPr vs GSS A117V, Nor98 vs GSS F198S e P102L. Tali risultati hanno mostrato chiaramente una inaspettata eterogeneità delle caratteristiche molecolari tra i frammenti interni di PrP<sup>res</sup> associate alle EST umane e il Nor98, tuttavia consistente con l'esistenza di diversi ceppi nonostante la presenza di frammenti di PrP<sup>res</sup> simili.

Anche l'analisi della stabilità conformazionale ha mostrato differenze specifiche tra il Nor98 e i casi umani analizzati, ad eccezione di un caso di GSS P102L.

L'analisi molecolare comparativa ha rivelato quindi proprietà fisico-chimiche della PrP<sup>Sc</sup> specifiche sia per malattia che per mutazione. Inoltre i risultati hanno mostrato che i campioni umani analizzati sono differenti dal Nor98 con l'eccezione di un caso di GSS P102L caratterizzato esclusivamente dal frammento interno di PrP<sup>res</sup>.

L'analisi molecolare comparativa deve inevitabilmente tenere conto delle problematiche legate al confronto di PrP<sup>Sc</sup> provenienti da specie diverse: come è stato sottolineato (Fig. 23), diversità aminoacidiche nella sequenza di PrP ovina e umana possono determinare differenze che potrebbero essere esclusivamente determinate dal legame o meno di un anticorpo ad un determinato epitopo. Poiché tali similitudini o differenze non possono essere determinate esclusivamente con tali metodiche di caratterizzazione molecolare, è sicuramente necessario includere ulteriori analisi che comprendano il sequenziamento N-terminale e la caratterizzazione biologica dopo trasmissione in modelli animali.

## 6. CONCLUSIONI

In questo studio è stata messa a punto una tecnica in grado di studiare la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> dopo denaturazione con GdnHCl. A differenza di tecniche già utilizzate in precedenza, questo saggio analizza la stabilità conformazionale della PrP<sup>Sc</sup> studiando il grado di insolubilità dopo trattamento con GdnHCl invece della resistenza alla PK. Ciò ha permesso di analizzare anche la PrP<sup>Sc</sup> sensibile alla digestione proteolitica oltre che la PrP<sup>res</sup>. Il saggio ha dimostrato di avere un elevato grado di discriminazione dei ceppi sia in modelli animali che in isolati naturali ovini ed umani.

L'unione di tecniche già in uso insieme al saggio messo a punto ha permesso di poter discriminare i ceppi analizzando contemporaneamente diverse proprietà della PrP<sup>Sc</sup> associata alle malattie da prioni. Infatti sulla base delle proprietà conformazionali di vari isolati naturali ovini europei, osservate con CSSA, è stato possibile migliorare il potenziale discriminativo del metodo WB ufficialmente in uso per differenziare campioni di scrapie, CH1641-like e BSE ovina, fino ad ora difficilmente discriminabili se non ricorrendo alla caratterizzazione biologica dopo trasmissione in modelli animali.

Il potenziale zoonotico delle EST è tutt'oggi poco definito, sia per la relativa rarità di queste patologie, che impatta fortemente sulla possibilità di ottenere forti evidenze dagli studi epidemiologici, sia a causa della mancanza di approcci molecolari affidabili per il confronto dei ceppi tra specie diverse. Il miglioramento delle tecniche già disponibili e l'introduzione di una nuova tecnica in grado di investigare diverse proprietà biochimiche della PrP<sup>Sc</sup> ha permesso di affrontare per la prima volta un'analisi comparativa degli isolati umani ed animali.

Tali studi sono stati eseguiti sia su ceppi adattati in arvicola che su isolati naturali, includendo in particolare ceppi di EST le cui proprietà biochimiche elusive ne avevano limitato la caratterizzazione fino ad ora. I risultati hanno mostrato interessanti convergenze tra forme sporadiche trasmesse in arvicola come la BASE bovina e la VV2 sCJD umana, così come tra Nor98 ovino e una forma genetica umana (GSS P102L). A parte la BSE, questi risultati mostrerebbero per la prima volta preoccupanti somiglianze tra ceppi umani ed animali, potenzialmente indicativi di un link eziopatogenetico. Tali convergenze però necessitano di ulteriori ed approfondite analisi molecolari su un numero più elevato di casi e di una caratterizzazione biologica utilizzando modelli animali. Tuttavia i dati ottenuti dalla caratterizzazione biochimica dimostrano l'efficacia

della tipizzazione molecolare nell'analisi di ceppi animali ed umani ai fini della valutazione del rischio legato alla presenza di ceppi animali potenzialmente zoonotici.

## **PUBBLICAZIONI**

**Pirisinu, L.**, Migliore, S., Di Bari, M.A., Esposito, E., Baron, T., D'Agostino, C., De Grossi, L., Vaccari, G., Agrimi, U., and Nonno, R. (2011). Molecular discrimination of sheep bovine spongiform encephalopathy from scrapie. *Emerg Infect Dis* 17, 695-698.

**Pirisinu, L.**, Di Bari, M., Marcon, S., Vaccari, G., D'Agostino, C., Fazzi, P., Esposito, E., Galeno, R., Langeveld, J., Agrimi, U., *et al.* (2010). A new method for the characterization of strain-specific conformational stability of protease-sensitive and protease-resistant PrP. *PLoS One* 5, e12723.

Vetrugno, V., Di Bari, M.A., Nonno, R., Puopolo, M., D'Agostino, C., **Pirisinu, L.**, Pocchiari, M., and Agrimi, U. (2009). Oral pravastatin prolongs survival time of scrapie-infected mice. *J Gen Virol* 90, 1775-1780.

## **BIBLIOGRAFIA**

Agrimi, U., Nonno, R., Dell'Omo, G., Di Bari, M.A., Conte, M., Chiappini, B., Esposito, E., Di Guardo, G., Windl, O., Vaccari, G., *et al.* (2008). Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog* 4, e1000113.

Agrimi, U., Di Bari, M.A., Pirisinu, L., Marcon, S., D'Agostino, C., Fazzi, P., Simson, S., Frassanito, P., Casalone, C., Cardone, F., Pocchiari, M., Vaccari, G., Nonno, R. (2009). Biological typing of prion strains. Comparison of animal and human prion isolates following transmission to bank vole (*Myodes glareolus*). III International Symposium on "The New Prion Biology: Basis Science, Diagnosis And Therapy", April 2-4, Venice.

Alper, T. (1993). The scrapie enigma: insights from radiation experiments. *Radiat Res* 135, 283-292.

Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S.L., Beringue, V., Litaize, C., Simon, S., Le Dur, A., Laude, H., Simmons, H., Lugan, S., *et al.* (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog* 7, e1001285.

Angers, R.C., Kang, H.E., Napier, D., Browning, S., Seward, T., Mathiason, C., Balachandran, A., McKenzie, D., Castilla, J., Soto, C., *et al.* (2010). Prion strain mutation determined by prion protein conformational compatibility and primary structure. *Science* 328, 1154-1158.

Asante, E.A., Linehan, J.M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A.L., Welch, J., Hill, A.F., Lloyd, S.E., Wadsworth, J.D., *et al.* (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J* 21, 6358-6366.

Baron, T., Bencsik, A., Vulin, J., Biacabe, A.G., Morignat, E., Verchere, J., and Betemps, D. (2008). A C-terminal protease-resistant prion fragment distinguishes ovine "CH1641-like" scrapie from bovine classical and L-Type BSE in ovine transgenic mice. *PLoS Pathog* 4, e1000137.

Baron, T., and Biacabe, A.G. (2007). Molecular behaviors of "CH1641-like" sheep scrapie isolates in ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *J Virol* 81, 7230-7237.

Baron, T., Crozet, C., Biacabe, A.G., Philippe, S., Verchere, J., Bencsik, A., Madec, J.Y., Calavas, D., and Samarut, J. (2004). Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* 78, 6243-6251.

Barron, R.M., Campbell, S.L., King, D., Bellon, A., Chapman, K.E., Williamson, R.A., and Manson, J.C. (2007). High titers of transmissible spongiform encephalopathy infectivity associated with extremely low levels of PrPSc in vivo. *J Biol Chem* 282, 35878-35886.

Baylis, M., Houston, F., Kao, R.R., McLean, A.R., Hunter, N., and Gravenor, M.B. (2002). BSE - a wolf in sheep's clothing? *Trends Microbiol* 10, 563-570.

Bellworthy, S.J., Hawkins, S.A., Green, R.B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., Lockey, R., Jeffrey, M., Ryder, S., Berthelin-Baker, C., *et al.* (2005). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec* 156, 197-202.

Benestad, S.L., Arsac, J.N., Goldmann, W., and Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res* 39, 19.

Benestad, S.L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M.A., and Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153, 202-208.

Berg, L.J. (1994). Insights into the role of the immune system in prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 429-432.

Beringue, V., Andreoletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J.L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabe, A.G., Baron, T., *et al.* (2007). A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci* 27, 6965-6971.

Beringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T.L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A.G., Baron, T., Vilotte, J.L., *et al.* (2006). Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog* 2, e112.

Beringue, V., Vilotte, J.L., and Laude, H. (2008). Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res* 39, 47.

Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66, 2096-2101.

Bessen, R.A., and Marsh, R.F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68, 7859-7868.

Biacabe, A.G., Laplanche, J.L., Ryder, S., and Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5, 110-115.

Biacabe, A.G., Morignat, E., Vulin, J., Calavas, D., and Baron, T.G. (2008). Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* 14, 298-300.

Bishop, M.T., Will, R.G., and Manson, J.C. (2010). Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12005-12010.

Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-1311.

Brown, K., and Mastrianni, J.A. (2010). The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 277-298.

Browning, S.R., Mason, G.L., Seward, T., Green, M., Eliason, G.A., Mathiason, C., Miller, M.W., Williams, E.S., Hoover, E., and Telling, G.C. (2004). Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP. *J Virol* 78, 13345-13350.

Bruce, M.E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* 49, 822-838.

Bruce, M.E. (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull* 66, 99-108.

Bruce, M.E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., and Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol* 83, 695-704.

Bruce, M.E., and Dickinson, A.G. (1987). Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol* 68 ( Pt 1), 79-89.

Bruce, M.E., and Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 172, 125-138.

Bruce, M.E., Nonno, R., Foster, J., Goldmann, W., Di Bari, M., Esposito, E., Benestad, S.L., Hunter, N., and Agrimi, U. (2007). Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. *Vet Rec* 160, 665-666.

Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., *et al.* (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498-501.

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.

Buschmann, A., Gretzschel, A., Biacabe, A.G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M., Baron, T., Casalone, C., and Groschup, M.H. (2006). Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol* 117, 103-116.

Buschmann, A., and Groschup, M.H. (2005). Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* 192, 934-942.

Buschmann, A., Luhken, G., Schultz, J., Erhardt, G., and Groschup, M.H. (2004). Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol* 85, 2727-2733.

Cali, I., Castellani, R., Yuan, J., Al-Shekhlee, A., Cohen, M.L., Xiao, X., Moleres, F.J., Parchi, P., Zou, W.Q., and Gambetti, P. (2006). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain* 129, 2266-2277.

Capellari, S., Strammiello, R., Saverioni, D., Kretschmar, H., and Parchi, P. (2011). Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol* 121, 21-37.

Capobianco, R., Casalone, C., Suardi, S., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Catania, M., Rossi, G., Di Fede, G., Giaccone, G., *et al.* (2007). Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog* 3, e31.

Casaccia, P., Ladogana, A., Xi, Y.G., and Pocchiari, M. (1989). Levels of infectivity in the blood throughout the incubation period of hamsters peripherally injected with scrapie. *Arch Virol* 108, 145-149.

Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., and Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3065-3070.

Caughey, B., Raymond, G.J., Ernst, D., and Race, R.E. (1991). N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol* 65, 6597-6603.

Chen, S.G., Teplow, D.B., Parchi, P., Teller, J.K., Gambetti, P., and Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* 270, 19173-19180.

Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24, 519-550.

Collinge, J., and Clarke, A.R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318, 930-936.

Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.

Discriminatory testing Handbook: "TSE strain characterization in small ruminants - A technical handbook for national reference laboratories in the EU". Version 4, January 2010.

Comoy, E.E., Casalone, C., Lescoutra-Etcheagaray, N., Zanusso, G., Freire, S., Marce, D., Auvre, F., Ruchoux, M.M., Ferrari, S., Monaco, S., *et al.* (2008). Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS One* 3, e3017.

Cronier, S., Gros, N., Tattum, M.H., Jackson, G.S., Clarke, A.R., Collinge, J., and Wadsworth, J.D. (2008). Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J* 416, 297-305.

Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J., and Baron, T. (2001). Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol* 75, 5328-5334.

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., *et al.* (2008). The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J Gen Virol* 89, 2975-2985.

Di Bari, M.A., Nonno, N., Vaccari, G., D'Agostino, Parisi, C., Simson, S., Frassanito, P., Castilla, J., Agrimi, U. (2008). Transmission of deer and elk prions to bank vole. *Neuroprion*, 8<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> October, Madrid

Dickinson, A.G. (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* 44, 209-241.

Dickinson, A.G., Stamp, J.T., Renwick, C.C., and Rennie, J.C. (1968). Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent. *J Comp Pathol* 78, 313-321.

Eloit, M., Adjou, K., Coulpier, M., Fontaine, J.J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., *et al.* (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec* 156, 523-524.

Espinosa, J.C., Morales, M., Castilla, J., Rogers, M., and Torres, J.M. (2007). Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J Gen Virol* 88, 1379-1383.

Fediaevsky, A., Maurella, C., Noremark, M., Ingravalle, F., Thorgeirsdottir, S., Orge, L., Poizat, R., Hautaniemi, M., Liam, B., Calavas, D., *et al.* (2010). The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet Res* 6, 9.

Fediaevsky, A., Tongue, S.C., Noremark, M., Calavas, D., Ru, G., and Hopp, P. (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res* 4, 19.

Foster, J.D., Bruce, M., McConnell, I., Chree, A., and Fraser, H. (1996). Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet Rec* 138, 546-548.

Foster, J.D., and Dickinson, A.G. (1988a). Genetic control of scrapie in Cheviot and Suffolk sheep. *Vet Rec* 123, 159.

- Foster, J.D., and Dickinson, A.G. (1988b). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec* 123, 5-8.
- Foster, J.D., Hope, J., and Fraser, H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec* 133, 339-341.
- Foster, J.D., Parnham, D.W., Hunter, N., and Bruce, M. (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol* 82, 2319-2326.
- Fraser, H. (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull* 49, 792-809.
- Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 78, 301-311.
- Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* 83, 29-40.
- Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D., and Prusiner, S.B. (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6617-6621.
- Gabizon, R., Telling, G., Meiner, Z., Halimi, M., Kahana, I., and Prusiner, S.B. (1996). Insoluble wild-type and protease-resistant mutant prion protein in brains of patients with inherited prion disease. *Nat Med* 2, 59-64.
- Gajdusek, D.C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197, 943-960.
- Gambetti, P., Cali, I., Notari, S., Kong, Q., Zou, W.Q., and Surewicz, W.K. (2011). Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases. *Acta Neuropathol* 121, 79-90.
- Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alsheklee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M.A., Gonzalez-Romero, D., *et al.* (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 63, 697-708.
- Gambetti, P., Parchi, P., Petersen, R.B., Chen, S.G., and Lugaresi, E. (1995). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol* 5, 43-51.
- Green, K.M., Browning, S.R., Seward, T.S., Jewell, J.E., Ross, D.L., Green, M.A., Williams, E.S., Hoover, E.A., and Telling, G.C. (2008). The elk PRNP codon 132 polymorphism controls cervid and scrapie prion propagation. *J Gen Virol* 89, 598-608.

Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.

Griffiths, P.C., Spiropoulos, J., Lockey, R., Tout, A.C., Jayasena, D., Plater, J.M., Chave, A., Green, R.B., Simonini, S., Thorne, L., *et al.* (2010). Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol* 91, 2132-2138.

Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448-450, 526.

Hill, A.F., Joiner, S., Beck, J.A., Campbell, T.A., Dickinson, A., Poulter, M., Wadsworth, J.D., and Collinge, J. (2006). Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain* 129, 676-685.

Jacobs, J.G., Langeveld, J.P., Biacabe, A.G., Acutis, P.L., Polak, M.P., Gavier-Widen, D., Buschmann, A., Caramelli, M., Casalone, C., Mazza, M., *et al.* (2007). Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol* 45, 1821-1829.

Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.

Jeffrey, M., and Gonzalez, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 373-394.

Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Foster, J., Langeveld, J.P., van Zijderveld, F.G., Grassi, J., and Hunter, N. (2006). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol* 134, 171-181.

Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Ryder, S.J., Bellworthy, S.J., and Jackman, R. (2001). Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J Comp Pathol* 125, 271-284.

Jones, E.M., and Surewicz, W.K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell* 121, 63-72.

Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., and Diringer, H. (1985). Biochemical differences among scrapie-associated fibrils support the biological diversity of scrapie agents. *J Gen Virol* 66 ( Pt 8), 1715-1722.

Kimberlin, R.H., and Walker, C.A. (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* 39, 487-496.

Kocisko, D.A., Lansbury, P.T., Jr., and Caughey, B. (1996). Partial unfolding and refolding of scrapie-associated prion protein: evidence for a critical 16-kDa C-terminal domain. *Biochemistry* 35, 13434-13442.

Kong, Q., Huang, S., Zou, W., Vanegas, D., Wang, M., Wu, D., Yuan, J., Zheng, M., Bai, H., Deng, H., *et al.* (2005). Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J Neurosci* 25, 7944-7949.

Kong, Q., Zheng, M., Casalone, C., Qing, L., Huang, S., Chakraborty, B., Wang, P., Chen, F., Cali, I., Corona, C., *et al.* (2008). Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *J Virol* 82, 3697-3701.

Kuczius, T., and Groschup, M.H. (1999). Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* 5, 406-418.

Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J., and Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275, 402-405.

Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T.L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J.L., Sarradin, P., Benestad, S.L., *et al.* (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16031-16036.

Legname, G., Nguyen, H.O., Peretz, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2006). Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19105-19110.

Lezmi, S., Martin, S., Simon, S., Comoy, E., Bencsik, A., Deslys, J.P., Grassi, J., Jeffrey, M., and Baron, T. (2004). Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immunohistochemical methods. *J Virol* 78, 3654-3662.

Li, J., Browning, S., Mahal, S.P., Oelschlegel, A.M., and Weissmann, C. (2010). Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science* 327, 869-872.

Mange, A., Beranger, F., Peoc'h, K., Onodera, T., Frobert, Y., and Lehmann, S. (2004). Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 96, 125-132.

Mazza, M., Iulini, B., Vaccari, G., Acutis, P.L., Martucci, F., Esposito, E., Peletto, S., Barocci, S., Chiappini, B., Corona, C., *et al.* (2010). Co-existence of classical scrapie and Nor98 in a sheep from an Italian outbreak. *Res Vet Sci* 88, 478-485.

McKinley, M.P., Meyer, R.K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A., and Prusiner, S.B. (1991). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* 65, 1340-1351.

Meyer, R.K., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Braunfeld, M.B., Barry, R.A., and Prusiner, S.B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2310-2314.

Nazor, K.E., Kuhn, F., Seward, T., Green, M., Zwald, D., Purro, M., Schmid, J., Biffiger, K., Power, A.M., Oesch, B., *et al.* (2005). Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* 24, 2472-2480.

Nonno, R., Di Bari, M.A., Cardone, F., Vaccari, G., Fazzi, P., Dell'Omo, G., Cartoni, C., Ingrosso, L., Boyle, A., Galeno, R., *et al.* (2006). Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* 2, e12.

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., *et al.* (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.

Orgel, L.E. (1996). Prion replication and secondary nucleation. *Chem Biol* 3, 413-414.

Owen, J.P., Rees, H.C., Maddison, B.C., Terry, L.A., Thorne, L., Jackman, R., Whitlam, G.C., and Gough, K.C. (2007). Molecular profiling of ovine prion diseases by using thermolysin-resistant PrP<sup>Sc</sup> and endogenous C2 PrP fragments. *J Virol* 81, 10532-10539.

Padilla, D., Beringue, V., Espinosa, J.C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Laude, H., *et al.* (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog* 7, e1001319.

Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., *et al.* (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 10962-10966.

Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S.G., Farlow, M., Dickson, D.W., Sima, A.A., Trojanowski, J.Q., *et al.* (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* *39*, 767-778.

Parchi, P., Chen, S.G., Brown, P., Zou, W., Capellari, S., Budka, H., Hainfellner, J., Reyes, P.F., Golden, G.T., Hauw, J.J., *et al.* (1998). Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8322-8327.

Parchi, P., Strammiello, R., Giese, A., and Kretzschmar, H. (2011). Phenotypic variability of sporadic human prion disease and its molecular basis: past, present, and future. *Acta Neuropathol* *121*, 91-112.

Pastrana, M.A., Sajnani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C., and Requena, J.R. (2006). Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrPSc fraction. *Biochemistry* *45*, 15710-15717.

Pattison, I.H., and Millson, G.C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol* *71*, 101-109.

Peretz, D., Scott, M.R., Groth, D., Williamson, R.A., Burton, D.R., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (2001). Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci* *10*, 854-863.

Peretz, D., Williamson, R.A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D.R., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Scott, M.R. (2002). A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* *34*, 921-932.

Piccardo, P., Dlouhy, S.R., Lievens, P.M., Young, K., Bird, T.D., Nochlin, D., Dickson, D.W., Vinters, H.V., Zimmerman, T.R., Mackenzie, I.R., *et al.* (1998). Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J Neuropathol Exp Neurol* *57*, 979-988.

Piccardo, P., Liepnieks, J.J., William, A., Dlouhy, S.R., Farlow, M.R., Young, K., Nochlin, D., Bird, T.D., Nixon, R.R., Ball, M.J., *et al.* (2001). Prion proteins with

different conformations accumulate in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations. *Am J Pathol* 158, 2201-2207.

Piccardo, P., Manson, J.C., King, D., Ghetti, B., and Barron, R.M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4712-4717.

Piening, N., Nonno, R., Di Bari, M., 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* 281, 9373-9384.

Pirisinu, L., Di Bari, M., Marcon, S., Vaccari, G., D'Agostino, C., Fazzi, P., Esposito, E., Galeno, R., Langeveld, J., Agrimi, U., *et al.* (2010). A new method for the characterization of strain-specific conformational stability of protease-sensitive and protease-resistant PrP. *PLoS One* 5, e12723.

Pirisinu, L., Migliore, S., Di Bari, M.A., Esposito, E., Baron, T., D'Agostino, C., De Grossi, L., Vaccari, G., Agrimi, U., and Nonno, R. (2011). Molecular discrimination of sheep bovine spongiform encephalopathy from scrapie. *Emerg Infect Dis* 17, 695-698.

Plinston, C., Hart, P., Chong, A., Hunter, N., Foster, J., Piccardo, P., Manson, J.C., and Barron, R.M. (2011). Increased susceptibility of human-PrP transgenic mice to bovine spongiform encephalopathy infection following passage in sheep. *J Virol* 85, 1174-1181.

Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.

Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.

Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363-13383.

Race, R., and Chesebro, B. (1998). Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 392, 770.

Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4, 1157-1165.

Safar, J.G., Geschwind, M.D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., *et al.* (2005a). Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3501-3506.

Safar, J.G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J.E., Prusiner, S.B., and Riesner, D. (2005b). Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 79, 10796-10806.

Scott, M.R., Peretz, D., Nguyen, H.O., Dearmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol* 79, 5259-5271.

Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15137-15142.

Sigurdson, C.J. (2008). A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet Res* 39, 41.

Sigurdson, C.J., Manco, G., Schwarz, P., Liberski, P., Hoover, E.A., Hornemann, S., Polymenidou, M., Miller, M.W., Glatzel, M., and Aguzzi, A. (2006). Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol* 80, 12303-12311.

Simmons, M.M., Konold, T., Simmons, H.A., Spencer, Y.I., Lockey, R., Spiropoulos, J., Everitt, S., and Clifford, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res* 3, 20.

Simmons, M.M., Konold, T., Thurston, L., Bellworthy, S.J., Chaplin, M.J., and Moore, S.J. (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res* 6, 14.

Simmons, M.M., Moore, S.J., Konold, T., Thurston, L., Terry, L.A., Thorne, L., Lockey, R., Vickery, C., Hawkins, S.A., Chaplin, M.J., *et al.* (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis* 17, 848-854.

Simoneau, Steve, Ruchoux, Marie-Madeleine, Vignier, Nicolas, Lebon, Pierre, Freire, Sophie, Comoy, Emmanuel, Deslys, Jean-Philippe, and Fournier, Jean-Guy. Small critical RNAs in the scrapie agent. Available from Nature Precedings <<http://hdl.handle.net/10101/npre.2009.3344.1>> (2009)

Stack, M., Gonzalez, L., Jeffrey, M., Martin, S., Macaldowie, C., Chaplin, M., Thorne, J., Sayers, R., Davis, L., Bramwell, J., *et al.* (2009). Three serial passages of bovine spongiform encephalopathy in sheep do not significantly affect discriminatory test results. *J Gen Virol* 90, 764-768.

Stack, M., Jeffrey, M., Gubbins, S., Grimmer, S., Gonzalez, L., Martin, S., Chaplin, M., Webb, P., Simmons, M., Spencer, Y., *et al.* (2006). Monitoring for bovine

spongiform encephalopathy in sheep in Great Britain, 1998-2004. *J Gen Virol* 87, 2099-2107.

Stack, M.J., Chaplin, M.J., and Clark, J. (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 104, 279-286.

Tamguney, G., Giles, K., Bouzamondo-Bernstein, E., Bosque, P.J., Miller, M.W., Safar, J., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2006). Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J Virol* 80, 9104-9114.

Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428, 323-328.

Taylor, D.M. (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J* 159, 10-17.

Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S.B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-2082.

Thackray, A.M., Hopkins, L., and Bujdoso, R. (2007a). Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem J* 401, 475-483.

Thackray, A.M., Hopkins, L., Klein, M.A., and Bujdoso, R. (2007b). Mouse-adapted ovine scrapie prion strains are characterized by different conformers of PrP<sup>Sc</sup>. *J Virol* 81, 12119-12127.

Thuring, C.M., Erkens, J.H., Jacobs, J.G., Bossers, A., Van Keulen, L.J., Garssen, G.J., Van Zijderveld, F.G., Ryder, S.J., Groschup, M.H., Sweeney, T., *et al.* (2004). Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol* 42, 972-980.

Tremblay, P., Ball, H.L., Kaneko, K., Groth, D., Hegde, R.S., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Safar, J.G. (2004). Mutant PrP<sup>Sc</sup> conformers induced by a synthetic peptide and several prion strains. *J Virol* 78, 2088-2099.

Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., and Taraboulos, A. (2002). Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* *41*, 12868-12875.

Vaccari, G., D'Agostino, C., Nonno, R., Rosone, F., Conte, M., Di Bari, M.A., Chiappini, B., Esposito, E., De Grossi, L., Giordani, F., *et al.* (2007). Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Virol* *81*, 7306-7309.

Vanik, D.L., Surewicz, K.A., and Surewicz, W.K. (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell* *14*, 139-145.

Vetrugno, V., Di Bari, M.A., Nonno, R., Puopolo, M., D'Agostino, C., Pirisinu, L., Pocchiari, M., and Agrimi, U. (2009). Oral pravastatin prolongs survival time of scrapie-infected mice. *J Gen Virol* *90*, 1775-1780.

Vorberg, I., Groschup, M.H., Pfaff, E., and Priola, S.A. (2003). Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J Virol* *77*, 2003-2009.

Wadsworth, J.D., Asante, E.A., and Collinge, J. (2010). Review: contribution of transgenic models to understanding human prion disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* *36*, 576-597.

Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J., and Collinge, J. (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* *358*, 171-180.

Wang, F., Wang, X., Yuan, C.G., and Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* *327*, 1132-1135.

Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* *121*, 419-420.

Wells, G.A., Spiropoulos, J., Hawkins, S.A., and Ryder, S.J. (2005). Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet Rec* *156*, 401-407.

Westaway, D., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1989). Unraveling prion diseases through molecular genetics. *Trends Neurosci* *12*, 221-227.

Zou, W.Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J.P., Castellani, R., Notari, S., *et al.* (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 68, 162-172.

Zou, W.Q., Zheng, J., Gray, D.M., Gambetti, P., and Chen, S.G. (2004). Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1380-1385.

## RINGRAZIAMENTI

Il più grande ringraziamento è per il Dott. Romolo Nonno senza il quale questo lavoro non sarebbe stato possibile. Sono contenta di aver avuto la possibilità di lavorare con una persona dal grande profilo professionale ed umano. Ha sempre mostrato grande disponibilità e generosità mettendomi a disposizione la sua esperienza ed insegnandomi prima di tutto lo spirito critico, fondamentale in questo lavoro: senza mettere in dubbio ciò che si vede e ciò che può sembrare ovvio, si rischia di “deformare i fatti per adattarli alle teorie”!

Ringrazio inoltre il Dott. Umberto Agrimi per il suo continuo sostegno e fiducia e per i suoi preziosi suggerimenti durante tutto il mio corso di dottorato.

Vorrei ringraziare il Prof. Giovanni Poglayen per la sua collaborazione nonostante gli ostacoli causati dalla distanza.

Un ringraziamento al Prof. Pierluigi Gambetti e al Dott. Wen-Quan Zou per la disponibilità ed ospitalità durante la permanenza presso il Dipartimento di Patologia della Case Western Reserve University.

Un particolare ringraziamento è per Elena Esposito e Stefano Marcon che mi hanno messo a disposizione la loro grande esperienza e che con il loro spirito hanno reso piacevoli le lunghe giornate passate in laboratorio!

Un ultimo ma sempre importante ringraziamento è per tutto il reparto di Malattie da Prioni del Dipartimento di Sanità Pubblica e Sicurezza Alimentare dell’Istituto Superiore di Sanità, perché senza un gran lavoro di equipe non si può fare una grande ricerca: Gabriele Vaccari, GianMario Cosseddu, Michele Angelo Di Bari, Barbara Chiappini, Claudia D’Agostino, Claudia Conte, Geraldina Riccardi, Paolo Frassanito, Nadia Palazzini, Shimon Simson, Consiglia Parisi e Alfredo Caggiano.