

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE SPECIALISTICHE**

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D6

Settore Scientifico disciplinare: MED/26

Influenza dell'ospite e del ceppo prionico sulle proprietà chimico-fisiche della proteina prionica patologica: studio comparato nell'uomo e in altre specie animali

Presentata da: dott.ssa Daniela Saverioni

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

Prof. Piero Parchi

Esame finale anno 2017

INDICE

INTRODUZIONE

1. LE MALATTIE DA PRIONI: GENERALITA'	1
2. BREVI CENNI STORICI	2
3. BIOLOGIA CELLULARE DELLA PrP ^C	4
4. CARATTERISTICHE DISTINTIVE DELLA PrP ^{Sc}	7
5. POLIMORFISMI E MUTAZIONI DEL GENE <i>PRNP</i> IN GRADO DI MODULARE LA SUSCETTIBILITA' ALLE EST	14
5.1 <i>EST</i> umane	14
5.2 <i>Scrapie</i>	16
5.3 <i>BSE</i>	17
5.4 <i>CWD</i>	17
6. ETEROGENEITA' FENOTIPICA DELLE MALATTIE DA PRIONI: IL CONCETTO DI "CEPPO" PRIONICO	17
6.1 <i>Malattia di Creutzfeldt-Jakob</i>	18
6.2 <i>BSE e vCJD</i>	23
6.3 <i>Scrapie</i>	25
6.4 <i>CWD</i>	26
7. PROPRIETA' BIOCHIMICHE DELLA PrP ^{Sc} ALLA BASE DELLA DEFINIZIONE DEI CEPPI	27
7.1 <i>Una carrellata sugli studi biochimici più noti</i>	27
7.2 <i>EST</i> umane	29
7.3 <i>BSE</i>	32
7.4 <i>Scrapie</i>	33
7.5 <i>CWD</i>	34
SCOPO DELLO STUDIO	36

MATERIALI E METODI

1. SELEZIONE DEI CASI E DEI TESSUTI	39
1.1 <i>EST umane</i>	39
1.2 <i>EST animali</i>	40
1.3 <i>Bank voles</i>	41
2. ANTICORPI	41
3. METODICHE	43
3.1 <i>Preparazione dell'omogenato totale (TH)</i>	43
3.2 <i>Purificazione della PrP^{Sc}</i>	43
3.3 <i>Quantificazione delle proteine totali</i>	43
3.4 <i>Digestione con PK</i>	43
3.5 <i>Deglicosilazione con PNGase F</i>	44
3.6 <i>Saggio di solubilizzazione mediata dalla temperatura (TSA)</i>	44
3.7 <i>Western blot</i>	44
3.8 <i>Interpolazione delle curve</i>	45
3.9 <i>Statistica</i>	45

RISULTATI

1. TIPIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLA CJD	46
1.1 <i>Fenotipo p-dCJD (MMiK)</i>	46
1.2 <i>Termosolubilità nella sCJD e nella vCJD</i>	47
2. TIPIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLE EST ANIMALI	51
2.1 <i>Premessa</i>	51
2.2 <i>Frammenti di PrP^{Sc} osservati</i>	52
2.3 <i>Rapporto tra le glicoforme</i>	56
2.4 <i>Resistenza alla PK</i>	58
2.5 <i>Termosolubilità</i>	60

3. TIPIZZAZIONE BIOCHIMICA DEI BANK VOLES	61
3.1 <i>Premessa: tipizzazione biochimica effettuata da ISS</i>	61
3.2 <i>Frammenti di PrP^{Sc} osservati</i>	63
3.3 <i>Rapporto tra le glicoforme</i>	66
3.4 <i>Resistenza alla PK</i>	66
3.5 <i>Termosolubilità</i>	68
DISCUSSIONE	71
BIBLIOGRAFIA	79

INTRODUZIONE

1. LE MALATTIE DA PRIONI: GENERALITA'

Le malattie da prioni, conosciute anche come encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST), sono un gruppo di patologie neurodegenerative rare, ad incubazione piuttosto lunga ed esito invariabilmente fatale, che colpiscono l'uomo e altri mammiferi.

Nell'uomo si distinguono tre grandi gruppi di EST, a seconda dell'eziologia apparente con cui si manifesta la patologia:

- a) forma sporadica, che racchiude il 90% dei casi e annovera:
 - la malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica (sCJD);
 - l'insonnia fatale sporadica (sFI);
 - la prionopatia variamente sensibile alle proteasi (VPSPr), descritta più recentemente.

- b) forma genetica o familiare, che comprende il restante 10% e annovera:
 - la malattia di Creutzfeldt-Jakob genetica o familiare (gCJD o fCJD);
 - l'insonnia fatale familiare (FFI);
 - la sindrome di Gertsman-Sträussler-Scheinker (GSS).

- c) forma acquisita, che comprende dei casi molto rari causati da contaminazione diretta con una fonte infettante, fra cui:
 - la malattia di Creutzfeldt-Jakob iatrogena (iCJD);
 - la nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD);
 - il kuru.

Negli altri mammiferi, le EST finora note sono tutte considerate malattie acquisite, derivate cioè da una fonte di infezione esogena. Le forme più diffuse, più conosciute e meglio studiate sono:

- a) l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), che colpisce, come descritto dal nome stesso, i bovini;
- b) lo scrapie, che colpisce pecore e capre;
- c) la malattia debilitante cronica degli alci e dei cervi (*CWD, chronic wasting disease*).

Tutte queste forme, a prescindere dalla specie in cui sono osservate e dall'eziologia con cui insorgono, condividono alcune caratteristiche ben conservate, quali la produzione di lesioni cosiddette spongiformi a carico del sistema nervoso centrale (SNC) dovute alla perdita neuronale, la capacità di trasmettersi ad individui sani se questi entrano in contatto con quelli malati in determinate circostanze e l'accumulo di una forma anormale di una proteina prodotta fisiologicamente dal SNC. Questa proteina, denominata proteina prionica cellulare (PrP^C), va incontro a una modificazione conformazionale che dà luogo al *misfolding*, generando così la proteina prionica patologica (PrP^{Sc}). Per questo motivo le malattie da prioni sono state recentemente annoverate nel gruppo più vasto delle cosiddette "*protein misfolding diseases*", ovvero malattie, tutte neurodegenerative, determinate dall'accumulo di isoforme anomale di proteine normalmente presenti nel SNC. Tali malattie, che comprendono forme molto più diffuse delle EST, quali la malattia di Alzheimer (AD), la malattia di Parkinson (PD) o l'amiloidosi sistemica, secondo recenti evidenze scientifiche, sembrerebbero condividere con le malattie da prioni il meccanismo patogenetico. Il *misfolding* proteico, in quest'ottica, sarebbe quindi un pattern piuttosto conservato associabile alla neurodegenerazione.

2. BREVI CENNI STORICI

La malattia da prioni che per prima venne descritta in letteratura è lo scrapie, le cui prime evidenze comparvero già nel 1600. I sintomi di questa patologia comprendono disturbi del comportamento e dell'equilibrio, ma soprattutto un intenso prurito (in inglese "*to scrape*" vuol dire grattarsi) che diede il nome alla patologia. Tuttavia la trasmissione sperimentale ad animali sani, a dimostrazione dell'infettività della malattia, avvenne solo nel 1939 (Zlotnik e Rennie, 1963, Chandler e Fisher, 1963).

La forma umana più diffusa di EST, invece, deve il suo nome alle osservazioni congiunte dei neurologi tedeschi Creutzfeldt (1920) e Jakob (1921).

Nel 1957, Gajdusek descrisse nella popolazione Fore della Papua Nuova Guinea una nuova malattia, il kuru (Gajdusek e Zigas, 1957), derivante dalla perpetrazione di rituali cannibalistici che prevedevano l'ingestione di tessuto cerebrale di individui affetti. Leggendo quell'articolo, William Hadlow, un patologo veterinario del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti, riconobbe le analogie esistenti tra il kuru e lo Scrapie della pecora e intuì che questa nuova malattia, come lo Scrapie, potesse essere trasmissibile (Hadlow, 1959). Nel corso degli anni '60 venne dimostrata sullo scimpanzé la natura trasmissibile del kuru (Gajdusek et al., 1966) e della CJD (Gibbs et al., 1968). Gli studi sul kuru valsero infine a Gajdusek il premio Nobel per la medicina (1976).

Più tardi, negli anni '70, diversi lavori dimostrarono come alcuni pazienti che erano stati sottoposti a particolari trattamenti di carattere medico, quali trapianto di cornea o di parti del sistema nervoso e somministrazione dell'ormone della crescita estratto da cadavere, presentassero una patologia del tutto simile alla già descritta malattia di Creutzfeldt-Jakob (iCJD).

L'attenzione dell'opinione pubblica sulle malattie da prioni fu però catturata solo negli anni '90, quando iniziarono a comparire nel Regno Unito casi di pazienti con una forma peculiare di CJD, che si manifestava in giovane età e con caratteristiche neuropatologiche diverse da quelle già osservate in letteratura, le cosiddette placche amiloidi di tipo "florido". Tale forma, battezzata nuova variante di CJD (vCJD), fu in breve ricondotta al consumo di carne proveniente da bovini affetti da BSE (Bruce, et al., Nature 1997). Quest'ultima EST aveva cominciato a diffondersi tra i bovini, principalmente nel Regno Unito, circa dieci anni prima, presumibilmente a causa di mangimi derivati a loro volta da carcasse di animali infetti (Wilesmith et al., 1988): la BSE negli anni successivi si configurò come un problema di sanità pubblica veterinaria prima e umana poi. L'identificazione dell'agente infettivo responsabile delle EST è dovuta ad un lungo percorso, iniziato negli anni '60. Infatti i primi studi dimostrarono come esso fosse del tutto resistente alle radiazioni ultraviolette e ionizzanti, usate per ottenere l'inattivazione degli acidi nucleici, e sensibile invece ai trattamenti con proteasi e ai pH estremi (Alper et al., 1967, Griffith, 1967). Pertanto se ne dedusse che non

poteva trattarsi di un agente infettivo convenzionale, quale un virus o un batterio, che necessariamente deve recare con sé una molecola di acido nucleico. Più tardi Prusiner riprese questi risultati e nel 1982 propose la teoria secondo cui la particella infettante delle EST è a natura prevalentemente, se non esclusivamente, proteica (il termine “prione”, in inglese “*prion*”, da lui coniato, è infatti un acronimo che sta *per PRoteinaceous Infective ONLY particle*) (Prusiner, 1982). Tale tesi, ancora oggi ritenuta valida, consentì a Prusiner di essere insignito del secondo Premio Nobel per gli studi sulle EST (1997).

Nel 1985 studi di clonaggio dimostrarono che la proteina prionica è codificata da un gene, denominato *PRNP*, presente nell'organismo ospite (Oesch et al., 1985). Successivamente altri studi dimostrarono che le forme familiari della CJD sono associate a mutazioni dello stesso gene (Hsiao et al., 1989, Hsiao et al., 1991). Ciò ha ulteriormente rafforzato l'ipotesi della “*protein only*” di Prusiner. Oggi è noto che tale gene, altamente conservato nelle diverse specie animali, reca numerosi polimorfismi e mutazioni in grado di modulare la suscettibilità alle diverse EST e il loro fenotipo clinico-patologico.

3. BIOLOGIA CELLULARE DELLA PrP^C

Il gene *PRNP* umano è un gene a singola copia, localizzato sul braccio destro del cromosoma 20; è lungo 16 kb e comprende due esoni, il secondo dei quali, più esteso, contiene per intero l'*open reading frame* (ORF) della proteina codificata, lunga 253 aminoacidi. La proteina va incontro a modificazioni post-traduzionali che determinano la rimozione di un peptide segnale composto da 22 aminoacidi all'estremità N-terminale. L'aggiunta della cosiddetta ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI), che ha la funzione di legare la proteina alla membrana cellulare, determina inoltre la rimozione di altri 23 residui all'estremità C-terminale. Infine, due siti di glicosilazione (Asn 181 e Asn 197) permettono il legame facoltativo di catene di oligosaccaridi complessi alla catena amminoacidica. Poiché questi siti possono essere occupati entrambi, uno solo o nessuno, la PrP^C esiste in tre isoforme diversamente glicosilate: diglicosilata, monoglicosilata e

non glicosilata, riconoscibili come tre bande di differente peso molecolare in Western blot (fig. 1).

Il gene *PRNP* umano presenta numerose omologie di sequenza con quello di molti altri mammiferi: questo elevato grado di conservazione suggerisce una funzione comune a più specie e di conseguenza particolarmente importante, sebbene finora essa rimanga sostanzialmente sconosciuta. Studi di cristallizzazione della PrP^C umana hanno dimostrato che essa si compone di diversi domini (fig. 2):

- a. un dominio N-terminale non strutturato, lungo circa 100 residui;
- b. un dominio globulare che si estende tra i residui 125-228;
- c. un piccolo dominio C-terminale flessibile (che interessa i residui 229-230/231).

Il dominio globulare comprende tre regioni ad α -elica e due a foglietto β antiparallelo. La struttura terziaria di questo dominio è raggiunta mediante interazioni non covalenti (per lo più ponti idrogeno, ponti salini o interazioni idrofobiche) tra le catene laterali dei residui che vengono in contatto durante il processo del *fold*ing proteico. Unica eccezione è rappresentata dal ponte disolfuro (interazione covalente) che si stabilisce tra i residui di cisteina in posizione 179 e 214 (Capellari et al., 2011).

La porzione N-terminale flessibile (residui 51-91) si compone di un nonapeptide (PQGGGGWGQ) seguito da quattro ripetizioni identiche di un octapeptide (PHGGGGWGQ). Tale regione, che comprende sei residui di istidina, ha un'elevata affinità per i cationi, in particolare il rame. In base a questa capacità di legame, è stato ipotizzato che la PrP^C sia coinvolta nella regolazione della concentrazione del rame a livello della fessura sinaptica (Kretzschmar et al., 2001). Numerose altre funzioni sono state proposte per questa proteina nel corso degli anni, dalla protezione contro lo stress ossidativo, al coinvolgimento nel differenziamento e nella trasduzione del segnale, al mantenimento della plasticità sinaptica (che include l'apprendimento e la memoria) (Peggion et al., 2017). Tuttavia i topi knock out per la PrP^C non hanno mostrato alcun fenotipo rilevante, ad eccezione della resistenza all'infezione da EST (Bueler et al., 1992, Manson et al., 1994). Per spiegare questa apparente incongruenza è stato ipotizzato che altri meccanismi compensatori entrino in gioco in un organismo in

condizioni ottimali, mentre è stato riportato che l'esposizione a danno ischemico, l'infiammazione o l'invecchiamento possono favorire l'emergere di fenotipi patologici legati alla mancanza della PrP^C in questi topi (Peggion et al., 2016).

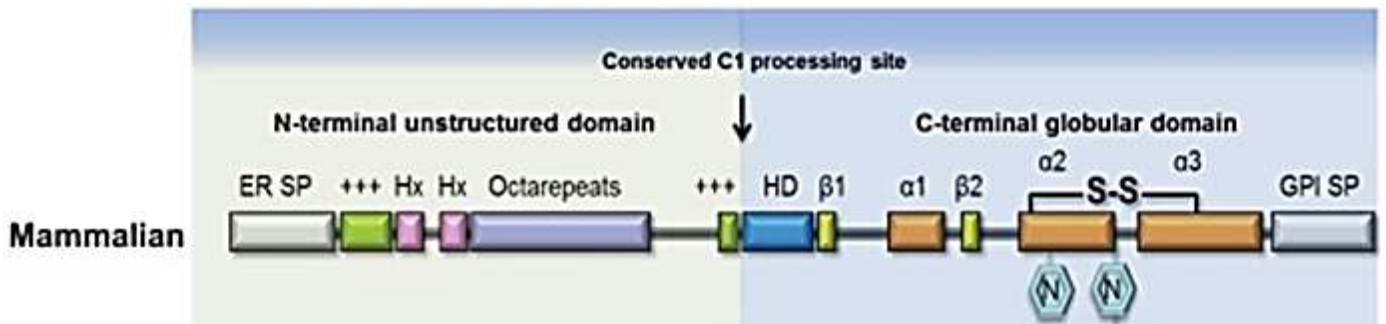


Figura 1: struttura dell'ORF del gene *PRNP* nei mammiferi. ER SP: peptide segnale di trasferimento al reticolo endoplasmatico; GPI SP: peptide segnale di attacco dell'ancora GPI; Hx: esapeptide; HD: motivo arricchito in alanina; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$: α -eliche 1, 2, 3; $\beta 1$, $\beta 2$: foglietti β 1 e 2; N: siti di glicosilazione (da Bakkebo et al., *Frontiers in Immunology* 2015).

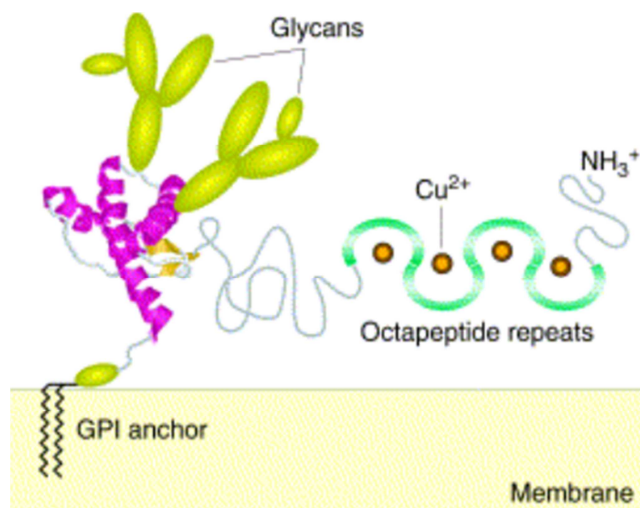


Figura 2: modello dei domini strutturali della PrP^C (da Caughey, *Trends Biochem Sci* 2001).

Nei bovini, il gene *PRNP* è localizzato sul cromosoma 13. Si compone di tre esoni anziché due come il suo omologo umano, ma in analogia con tutti i geni ortologhi delle varie specie, solo l'ultimo esone è tradotto in proteina. La proteina, prima di andare incontro alle modificazioni post-traduzionali, è lunga circa 264 amminoacidi. Anche la PrP bovina presenta i due domini: uno N-terminale, non strutturato, che contiene le ripetizioni octapeptidiche in grado di legare il rame, e uno C-terminale strutturato. Come nel caso della proteina umana, anche per quella bovina avvengono la rimozione di una porzione a livello della regione N-terminale nel reticolo endoplasmatico e l'aggiunta dell'ancora di GPI (Murdoch e Murdoch, 2015). Anche nel gene *PRNP* di cervo il terzo esone è quello codificante, per una sequenza proteica lunga 256 amminoacidi (Robinson et al., 2012). La struttura della proteina, molto simile a quella umana, annovera il dominio non strutturato N-terminale, lungo circa 100 amminoacidi, all'interno del quale sono presenti le sequenze octapeptidiche ripetute 5 volte (GGWGQPHG) in grado di legare gli ioni bivalenti. Segue il dominio C-terminale con le tre α -eliche e i due β -sheet antiparalleli, i siti di glicosilazione e il ponte disolfuro (Haley e Hoover, 2015). Come precedentemente accennato, l'omologia di sequenza del gene *PRNP* è molto estesa nelle diverse specie, fatti salvi alcuni polimorfismi specifici, particolarmente indagati nel gene ovino, che determinano una maggiore o minore suscettibilità alla malattia.

4. CARATTERISTICHE DISTINTIVE DELLA PrP^{Sc}

Come precedentemente esposto, la PrP^{Sc} si forma in seguito al *misfolding* della PrP^C. Tale *misfolding*, a sua volta, si accoppia ad un cambiamento della struttura secondaria della proteina: mentre nella forma fisiologica prevale la struttura ad α -elica, in quella patologica aumenta drasticamente il contenuto in foglietto β (dal 3% al 40%) (fig. 3). Ciò è stato dimostrato mediante studi strutturali quali la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR) e la spettroscopia al dicroismo circolare (Caughey e Raymond, 1991; Safar et al., 1993).

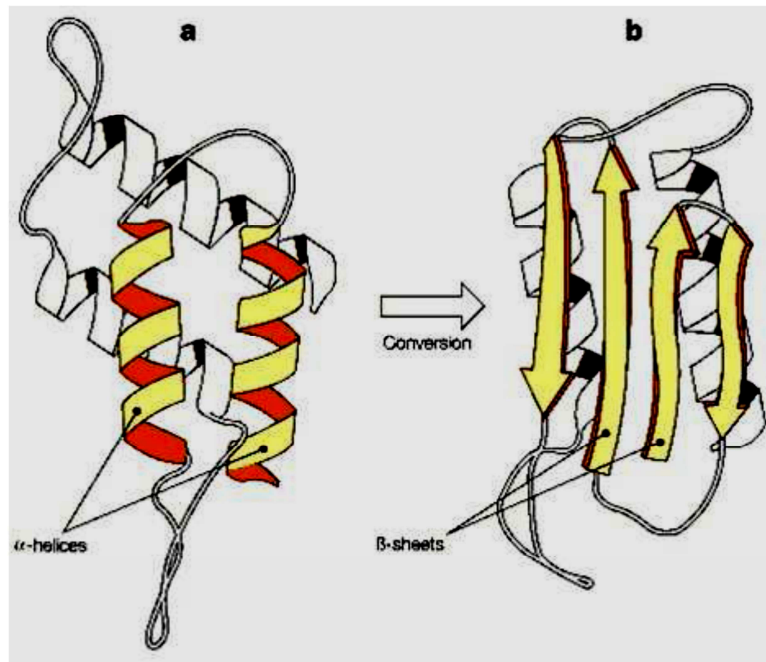


Figura 3: conversione della struttura primaria di PrP^C (prevalenza di α -elica) in quella di PrP^{Sc} (prevalenza di foglietto β) (da Prusiner, Prion biology and diseases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1999).

Tale variazione della struttura secondaria conferisce alla proteina nuove proprietà chimico-fisiche, in particolare:

- a. l'insolubilità in detergenti non denaturanti
- b. una maggiore tendenza all'aggregazione
- c. la parziale resistenza alla digestione proteolitica.

Queste proprietà sono state usate, nel corso degli anni, per separare l'una dall'altra componente. In particolare, la resistenza all'azione proteolitica è largamente utilizzata per la diagnosi di malattia da prione in tutte le specie animali, secondo il principio per cui in presenza di sola PrP^C il campione viene completamente digerito, mentre la presenza della PrP^{Sc} implica la rivelazione di frammenti resistenti alla proteolisi in Western blot (fig. 4). La porzione della proteina resistente alle proteasi è quella C-terminale, che reca i due siti di glicosilazione, dando origine pertanto alle tre isoforme diversamente glicosilate osservabili anche dopo digestione proteolitica. Al contrario, la porzione N-terminale viene idrolizzata al pari di ciò che avviene per la PrP^C.

Recentemente, sono state individuate EST in cui la PrP^{Sc} è particolarmente sensibile all'azione delle proteasi, dando luogo ad una digestione pressochè completa (VPSPr e GSS nell'uomo, Nor98 nella pecora), mentre una serie di studi condotti da Safar e collaboratori hanno messo in evidenza una componente della PrP^{Sc} denominata “*PK-sensitive PrP^{Sc}*” (ovvero PrP^{Sc} sensibile alla proteinasi K), presente in quantità rilevante anche nelle EST tradizionali, ovvero quelle diagnosticabili biochimicamente mediante saggi di digestione proteolitica (Safar et al., 2005). Tuttavia, un ulteriore studio ha messo in evidenza come questa componente non superi il 10% nella CJD sporadica (Saverioni et al., 2013).

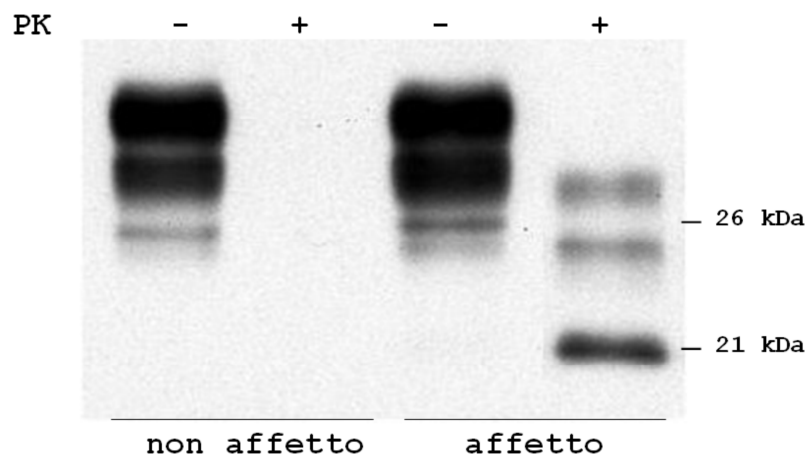


Figura 4: Western blot tipicamente usato per la discriminazione di campioni PrP^{Sc}-positivi da quelli negativi.

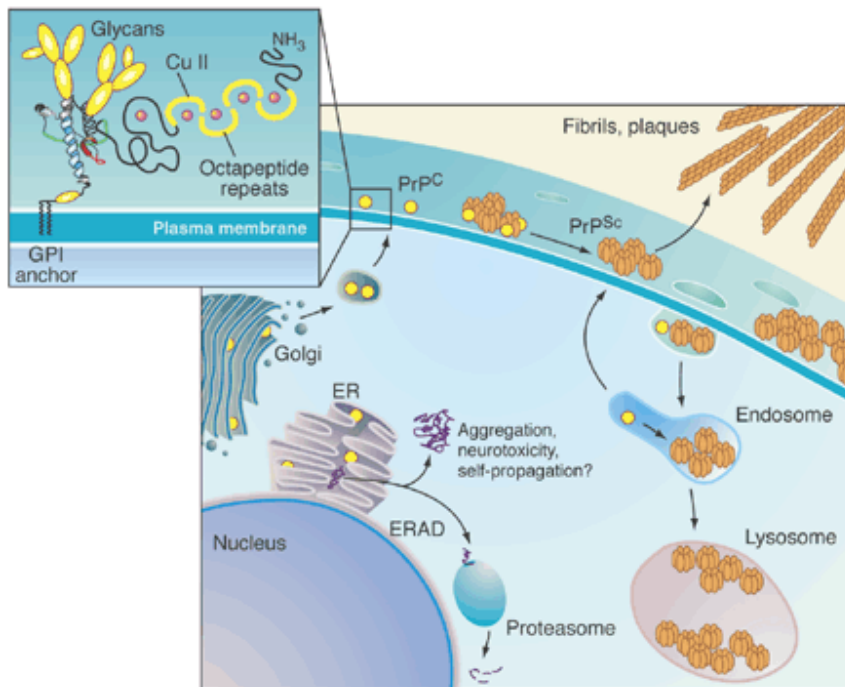


Figura 5: replicazione e deposizione della PrP^{Sc} (adattato da Priola et al., Science 2003).

Alla base della trasformazione della PrP fisiologica nella sua controparte patologica c'è un meccanismo di conversione, in cui la seconda funge da stampo per la riproduzione della propria struttura nella prima. Le due proteine entrano in contatto a livello di membrane lipidiche, i cosiddetti *lipid rafts*, che possono trovarsi sia sulla membrana plasmatica che in vescicole intracellulari (quali gli endosomi, i lisosomi, o perfino porzioni del reticolo endoplasmatico) (Poggiolini et al., 2013), dando così inizio a una amplificazione a cascata, che si propaga in maniera autocatalitica (fig. 5).

Tale processo di conversione della PrP^C in PrP^{Sc}, osservato in vivo, viene replicato nella cosiddetta “amplificazione in vitro”, che permette di moltiplicare in maniera virtualmente esponenziale le molecole di PrP^{Sc} presenti in un determinato campione biologico. In questo modo è possibile bypassare il limite di *detection* delle metodiche attualmente in uso per determinare la presenza di PrP^{Sc} in campioni a bassissimo contenuto (sangue, urine, liquor). Numerosi esperimenti dimostrano che la conversione in vitro, e quindi per estensione anche quella in vivo, necessita di cofattori molecolari per avere successo, mentre è inibita da altre sostanze. La natura e la funzione di tali cofattori restano ancora però largamente inesplorate. Finora, è stato dimostrato il

coinvolgimento di due tipi di cofattori, i lipidi e i polianioni (tra cui i glicosamminoglicani e i polisaccaridi solfati), oltre a frammenti di DNA e RNA, presumibilmente codificati dall'ospite, sebbene il loro preciso meccanismo d'azione resti ancora avvolto nel mistero (Poggiolini et al., 2013).

Sono stati proposti due diversi meccanismi di replicazione della PrP^{Sc} in vivo (fig. 6).

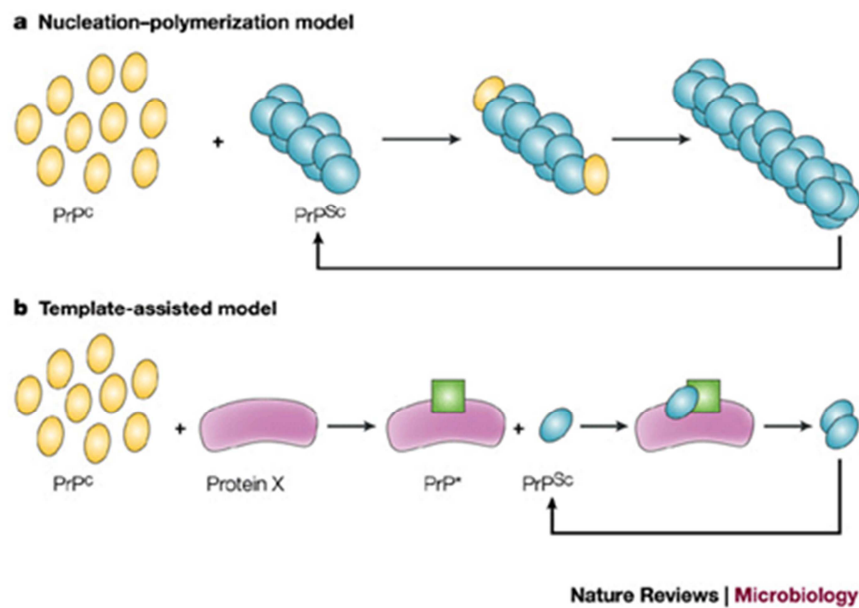


Figura 6: i due diversi modelli di amplificazione della PrP^{Sc} (da Soto, Nat Rew Microbiol 2004).

Nel cosiddetto modello di conversione assistita dallo stampo, la PrP^{Sc} esiste in forma di monomero termodinamicamente più stabile della PrP^C. Nel raro evento che una molecola di PrP^{Sc} si formi spontaneamente, oppure venga introdotta dall'esterno nell'organismo ospite, essa può orientare il *misfolding* della Pr^C mediante interazione diretta. In questo modello, il punto critico è la formazione del dimero PrP^C-PrP^{Sc} da cui prende l'avvio la conversione, oppure di un intermedio di reazione il cui *folding* è a metà fra le due conformazioni e ancora altamente instabile, denominato PrP*. In questo caso, la PrP^{Sc} funge da stampo in grado di catalizzare la conversione completa della PrP^C. Il modello della nucleazione-polimerizzazione, invece, propone che la conversione sia un

fenomeno reversibile. In questo quadro, il monomero di PrP^{Sc} sarebbe altamente instabile rispetto a quello di PrP^C e per stabilizzarsi necessiterebbe di formare un oligomero. Una volta formato questo nucleo, la PrP^C monomerică può essere efficacemente incorporata in esso adottando la conformazione della PrP^{Sc}. In questo caso, il passaggio limitante sarebbe la formazione del nucleo oligomerică, cosa che può essere accelerata in vitro mediante l'aggiunta di oligomeri di PrP^{Sc} preformati (Le et al., 2015).

Nelle diverse eziologie delle forme umane, la PrP^{Sc} che funge da stampo per la conversione può:

- a. formarsi spontaneamente per un evento stocastico e molto raro, quale ad esempio una mutazione somatica (malattia sporadica)
- b. provenire da una fonte infettante esogena (malattia acquisita)
- c. essere favorita da mutazioni genetiche che conferiscono instabilità alla PrP^C e rendono così più probabile il *misfolding*.

Nonostante sia ormai chiaro che la formazione della PrP^{Sc} sia l'evento molecolare capace di innescare la patogenicità di tutte le EST, resta ancora irrisolto l'interrogativo su come essa sia in grado di indurre tossicità nei tessuti in cui si localizza. Alcuni studi hanno dimostrato come l'assenza della PrP^C provvista di ancora di GPI renda la PrP^{Sc} innocua per l'organismo ospite, suggerendo quindi che gli oligomeri e le fibrille di PrP^{Sc} non sono tossici di per sé, ma necessitano della mediazione della proteina fisiologica per esercitare la loro tossicità. D'altro canto, la semplice privazione della funzione della PrP^C, che è stata ripetutamente invocata in seguito al cambiamento conformazionale legato alla formazione di PrP^{Sc}, non basta a determinarne la tossicità (come già precedentemente esposto, i topi knock-out per PrP^C non presentano alcun fenotipo patologico rilevante, anzi si dimostrano resistenti all'infezione da EST). Inoltre, spesso e volentieri la neurotossicità della PrP^{Sc} non correla con la sua infettività, portando quindi a ipotizzare che le due proprietà siano legate a isoforme diverse della molecola. Numerosi studi hanno dimostrato l'associazione degli oligomeri di PrP^{Sc} con la capacità infettiva (segnando quindi un punto a favore del modello della nucleazione-polimerizzazione precedentemente descritto), mentre resta ancora da chiarire se gli stessi

oligomeri (o una sottopopolazione di essi) sono responsabili anche della neurotossicità. Secondo alcune evidenze sperimentali, l'oligomero di PrP^{Sc} che si forma durante il processo di conversione è in grado di compromettere l'integrità delle membrane cellulari o di mediare un segnale neurotossico, innescato dalla PrP^{Sc} extracellulare, che sovrverte la funzione della PrP^C. Un'altra importante possibile fonte di neurotossicità è l'attivazione della microglia: non è ancora chiaro, infatti, il suo ruolo nel raggiungimento dell'equilibrio fra neuroprotezione e neurodegenerazione. Mentre si conosce la funzione protettiva delle cellule gliali nella *clearance* della PrP^{Sc} nelle fasi iniziali di deposizione della proteina, quindi in assenza di fenotipi istopatologici conclamati, è stato osservato che questa stessa funzione può subire uno *switch* improvviso verso il rilascio di citochine ad azione neurotossica in grado di mediare l'apoptosi neuronale e quindi, in ultima analisi, la neurodegenerazione. Tale *switch* si osserva, in modelli animali, in presenza di infiammazione sistemica, condizione non di rado associata alle patologie neurodegenerative (Poggiolini et al., 2013) (fig. 7).

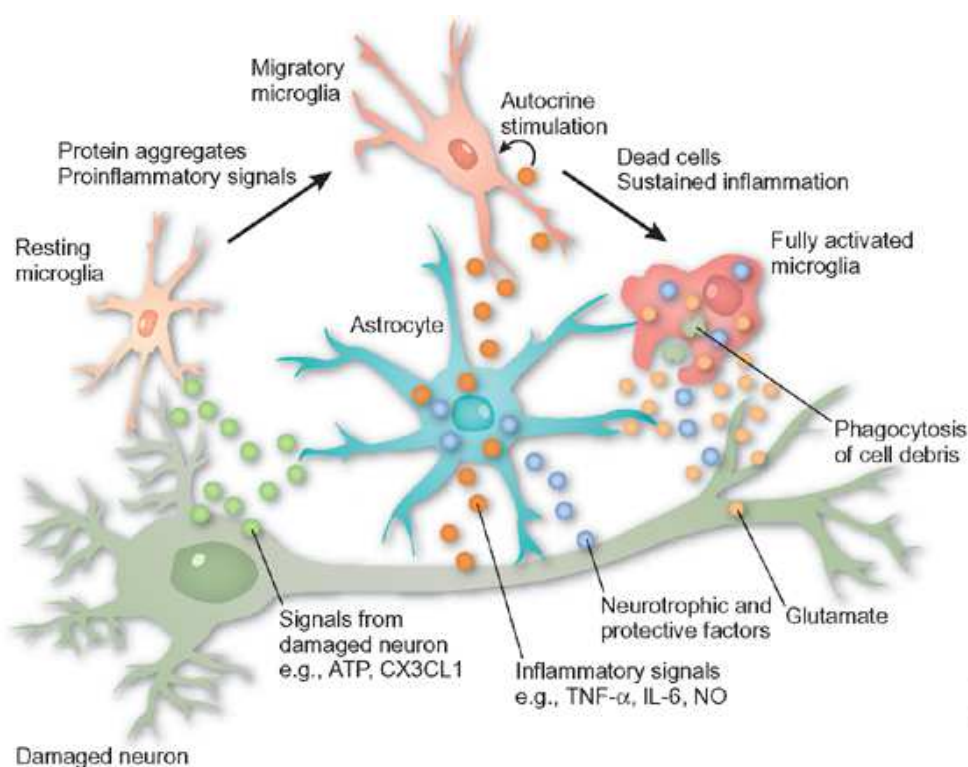


Figura 7: attivazione della microglia in seguito a danno neuronale (da Caesar, Nat Med 2006).

5. POLIMORFISMI E MUTAZIONI DEL GENE *PRNP* IN GRADO DI MODULARE LA SUSCETTIBILITA' ALLE EST

Come già in precedenza discusso, il sequenziamento delle ORF del gene *PRNP* nelle diverse specie animali ha permesso di individuare polimorfismi e mutazioni responsabili della maggiore o minore suscettibilità alle malattie da prioni, osservata nel corso del tempo. Inoltre, essendo questo gruppo di patologie altamente eterogeneo dal punto di vista fenotipico, le stesse variazioni della sequenza genetica possono orientare l'andamento della malattia verso un determinato fenotipo clinico-patologico.

5.1 *EST umana*. Nell'uomo, il principale polimorfismo responsabile della diversa suscettibilità alla CJD sporadica nella popolazione caucasica è quello relativo al codone 129, che può codificare per metionina (M) o valina (V). Tale polimorfismo, pesantemente implicato anche nell'insorgenza delle diverse varianti della CJD sporadica (vedere più avanti), può dare origine a tre diversi genotipi: omozigosi metionina (MM), omozigosi valina (VV) o eterozigosi (MV). Studi epidemiologici hanno messo in evidenza come, mentre nella popolazione sana gli eterozigoti si attestano intorno al 50% (seguono gli omozigoti MM che rappresentano il 39% e infine i VV con l'11%), questa distribuzione appare quasi invertita nella popolazione affetta da CJD sporadica. In questo gruppo, la numerosità degli omozigoti MM sale al 69%, mentre gli omozigoti VV comprendono il 18% e solo il restante 13% risulta composto da individui eterozigoti. Per la CJD iatrogena causata da contaminazione con ormone della crescita estratto da cadavere infetto la distribuzione dei genotipi non si discosta molto da quella osservata nella forma sporadica (un lieve calo degli omozigoti MM a fronte di un aumento degli omozigoti VV e degli eterozigoti, ma questi ultimi rappresentano sempre il gruppo meno prevalente), mentre per la vCJD (la forma derivata dalla BSE) i pazienti affetti mostrano tutti l'omozigosi MM, eccetto un caso di un paziente MV che ha ricevuto una trasfusione di sangue infetto e in seguito ha sviluppato depositi di PrP^{Sc} nella milza, trasmissibile a modelli murini, pur in assenza di sintomi (Parchi et al., 1999, Will, 2003, Diack et al., 2014). In base a queste evidenze, è stato ipotizzato che l'eterozigosi sia una condizione protettiva dall'insorgenza della patologia. A livello molecolare, ciò può essere spiegato mediante il concetto che più le due molecole (PrP^C e PrP^{Sc}) coinvolte nel

processo di conversione sono diverse, minori chances avrà il processo di concludersi con successo. Tale concetto, utile per la comprensione del meccanismo della cosiddetta *barriera di specie* (ovvero il fenomeno in base al quale non tutte le fonti infettanti di PrP^{Sc} sono in grado di replicarsi in ospiti di specie diverse da quella originale), ben si presta anche nel contesto della maggiore resistenza legata all'eterozigosi. Infatti in questo caso esiste la possibilità che entrino in contatto due molecole che differiscono fra loro virtualmente per un solo aminoacido, mentre nella condizione di omozigosi le due molecole sono teoricamente identiche. Un altro polimorfismo, al codone 219, che può codificare per acido glutamico (E) o lisina (K), risulta completamente protettivo in eterozigosi per la sCJD nella popolazione giapponese, sebbene non lo sia del tutto nei confronti della CJD acquisita (iatrogena o variante) e genetica (Kobayashi et al., 2015).

Un discorso a parte meritano le mutazioni, correlate alla gCJD, all'FFI e alla GSS nell'uomo ma finora mai riportate negli altri mammiferi. Queste mutazioni, tutte dominanti, possono avere maggiore o minore penetranza e determinare l'insorgenza di una specifica variante patologica o più di una, in associazione o meno al polimorfismo al codone 129 (fig. 8).

Emblematico è il caso della mutazione D178N: l'aplotipo D178N-129V genera CJD, mentre l'aplotipo D178N-129M causa FFI. L'aumento nel numero di ripetizioni dell'octapeptide in posizione N-terminale, denominato *OPRI* (*octa-peptide repeat insertions*) è in grado di causare sia il fenotipo gCJD che il fenotipo GSS, a seconda del numero delle ripetizioni presenti. Da 1 a 4 ripetizioni extra, il fenotipo più frequente è quello della CJD, mentre da 5 a 9 i pazienti sviluppano un fenotipo che ricorda la GSS oppure la demenza atipica (Schmitz et al., Mol Neurobiol 2016). L'ipotesi più plausibile per cui una mutazione del gene *PRNP* sia in grado di produrre una EST è che essa favorisca il *misfolding* della PrP^C, rendendo instabile la sua conformazione originaria. In realtà ciò risulta vero per pochissime delle mutazioni di *PRNP* finora note: questo aspetto necessita quindi di ulteriore investigazione (Capellari et al., 2011).

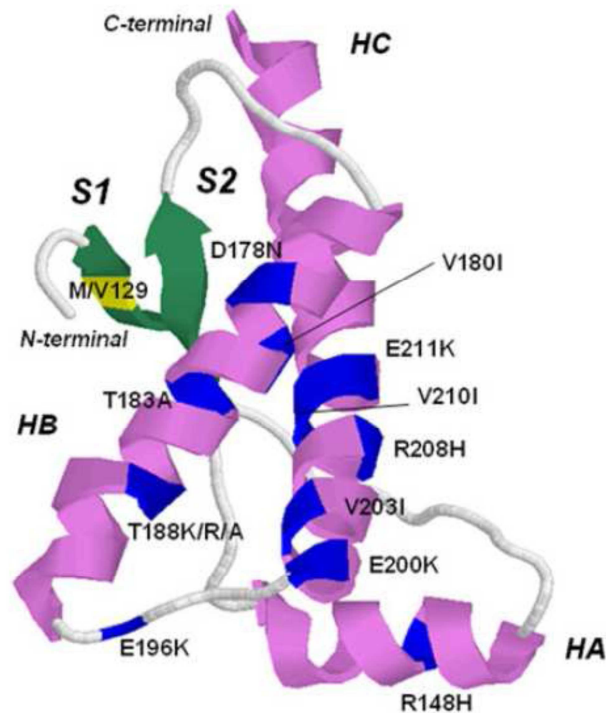


Figura 8: mutazioni presenti nel dominio globulare di PrP^C, in grado di causare CJD. In giallo è riportato il polimorfismo al codone 129 (da Capellari et al., Acta Neuropath 2011).

5.2 **Scrapie.** Nelle pecore, tre polimorfismi del gene *PRNP*, in associazione fra di loro, sono i principali modulatori della suscettibilità allo scrapie: al codone 136 (alanina, A, o valina, V), al codone 154 (istidina, H, o arginina, R), al codone 171 (glutamina, Q, arginina, R, o istidina, H). Gli aplotipi VRQ e ARQ sono considerati quelli che maggiormente predispongono a contrarre lo scrapie classico, mentre l'aplotipo ARR è considerato protettivo (Belt et al., 1995, Bossers et al., 1996). Al contrario, il genotipo ARR/ARR è spesso riscontrato negli ovini affetti da scrapie atipico. I polimorfismi che maggiormente influenzano l'insorgenza di questa variante sono stati identificati nei codoni 141 e 154, in particolare quando sono presenti gli alleli AHQ e AF₁₄₁RQ. Anche nelle capre esistono alcuni polimorfismi di *PRNP* protettivi nei confronti dell'insorgenza della malattia, in particolare quello al codone 222 in cui la lisina (K) sostituisce la glutamina (Q) oppure al codone 146, quando codifica per serina (S) o acido aspartico (D) anziché asparagina (N) (Billinis et al., 2002).

- 5.3 **BSE**. Nei bovini il numero di ripetizioni dell'octapeptide nella regione N-terminale di *PRNP* è generalmente 5-6. In una specifica razza di bovini la presenza di 7 ripetizioni di questa sequenza è stata collegata a una maggiore suscettibilità alla BSE. Inoltre, in alcuni bovini sono state riportate delezioni nella regione del promotore di *PRNP* che aumentano l'espressione della PrP^C e che risultano associate ad una maggiore suscettibilità alla BSE classica ma non alle forme atipiche (Brunelle et al., 2008). Infine nel 2006 è stato osservato, in un esemplare negli Stati Uniti, un polimorfismo al codone 211, che codifica per lisina (K) al posto del glutammato (E), in grado di conferire suscettibilità alla variante atipica BSE-H (Richt et al., 2008). E' stato successivamente dimostrato che tale polimorfismo è ereditabile e omologo alla mutazione umana E200K riscontrata in un numero significativo di casi di gCJD (Nicholson et al., 2008).
- 5.4 **CWD**. Nei cervi a coda bianca, i polimorfismi Q9H5, G96S e A116G sono stati riportati come importanti modulatori della suscettibilità alla CWD. In particolare, l'istidina in posizione 95 e la serina in posizione 96 sono in grado di conferire resistenza alla malattia, quest'ultima anche in singola copia (Johnson et al., 2006, Johnson et al., 2011), mentre il genotipo 116A è presente più frequentemente nei casi di CWD (Robinson et al 2012). Nelle altre specie animali colpite da CWD i polimorfismi di *PRNP* che determinano la suscettibilità alla malattia sono meno conosciuti.

6. ETEROGENEITA' FENOTIPICA DELLE MALATTIE DA PRIONI: IL CONCETTO DI "CEPPO" PRIONICO

Una delle caratteristiche più misteriose e allo stesso tempo affascinanti delle malattie da prioni è la loro eterogeneità fenotipica, sia nell'uomo che negli altri animali. Sebbene i sintomi osservabili siano tutti ascrivibili a danno neurologico, essi si presentano in una molteplicità di eventi che spazia da deterioramento cognitivo, disturbi visivi o del movimento e perfino insonnia. Anche la successione temporale dei sintomi lungo il decorso clinico è assolutamente varia, così come la durata della malattia, l'età di insorgenza, nonché la distribuzione regionale, a livello del SNC, dei depositi di PrP^{Sc}, che verosimilmente determinano la compromissione di determinate aree cerebrali e di

conseguenza il tipo di danno neurologico. Ancora, l'incidenza delle diverse varianti è decisamente oscillante, fermo restando che si tratta comunque di malattie rare. Alcune EST sono in grado di superare la barriera di specie, come precedentemente accennato, mentre altre no. All'estrema variabilità fenotipica si associa anche una mutevolezza delle caratteristiche molecolari osservabili nella PrP^{Sc}.

6.1 **Malattia di Creutzfeldt-Jakob.** La CJD sporadica è, a questo proposito, la malattia da prioni meglio studiata. L'eterogeneità clinica e patologica della CJD è nota fin dagli inizi del secolo scorso, tuttavia fino ai tardi anni '90 non è mai stato fatto alcun vero tentativo di classificazione sistematica. Parchi e collaboratori, nel 1999, dimostrarono che la sCJD si distingue in sei diversi fenotipi clinici e istopatologici (ovvero che differiscono fra loro per la sintomatologia e il quadro di distribuzione dei depositi di PrP^{Sc} e delle lesioni spongiformi), ampiamente correlate al genotipo al codone 129 del gene *PRNP* e alla lunghezza del frammento principale della PrP^{Sc} dopo trattamento con proteinasi K (PK) (Parchi et al., 1999, 2009). Il genotipo al codone 129, come precedentemente discusso, è implicato anche nella modulazione della suscettibilità alla malattia, con l'eterozigosi che riveste un ruolo protettivo in confronto all'omozigosi. Cionondimeno, l'insorgenza della patologia riguarda tutti e tre i genotipi. Il trattamento con PK permette di osservare, dopo migrazione elettroforetica e Western blot, due tipi di frammenti di PrP^{Sc}, entrambi privati della regione N-terminale, che differiscono fra loro per il peso molecolare: il tipo 1, che si associa a un frammento del peso di 21 kDa e ad una migrazione elettroforetica più lenta, comprende la sequenza proteica a partire dal residuo 82, mentre il tipo 2, del peso di 19 kDa e a migrazione elettroforetica più rapida, è troncato in corrispondenza del residuo 97. Il peso molecolare si riferisce alla forma non glicosilata, fermo restando che in Western blot si osservano tutte e tre le bande relative alle tre glicoforme, dal momento che la proteolisi non coinvolge i siti di glicosilazione in posizione C-terminale (fig. 9).

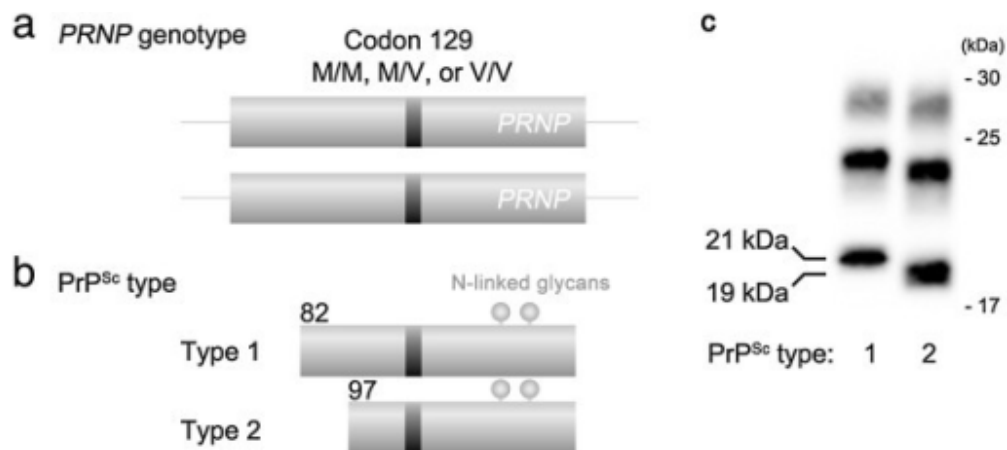


Figura 9: associazione del polimorfismo al codone 129 e del tipo di PrP^{Sc} prodotta dopo digestione proteolitica nelle diverse varianti della CJD sporadica (da Kobayashi et al., Acta Neuropathol Commun 2014).

L'associazione del genotipo al codone 129 e del tipo di frammento prodotto dopo digestione proteolitica della PrP^{Sc} dà origine alle 6 varianti clinico-patologiche note della sCJD.

- a) Il fenotipo MM1/MV1, che è il più frequente (40% dei casi), è associato a una durata media di malattia di 4 mesi e ad un'età media d'esordio di 70,1 anni. Esordisce con declino cognitivo in due terzi dei casi, atassia (un terzo), disfunzioni del linguaggio (un quarto), disturbi visivi (un quarto), mioclono o altri movimenti involontari (un quarto). I cambiamenti spongiformi, associati a piccoli vacuoli, si localizzano nella corteccia, nei gangli basali, nel talamo e nello strato molecolare cerebellare, mentre non si osservano affatto nell'ippocampo e nel tronco encefalico.
- b) Il fenotipo VV2, che rappresenta il 15% dei casi, si associa a una durata media di malattia di 6,3 mesi e ad un'età media di esordio di 64,5 anni. Esordisce con prominente atassia dell'andatura, prosegue con demenza e nei due terzi dei casi presenta mioclono. I cambiamenti spongiformi microvacuolari sono confinati agli strati profondi della corteccia. Risulta coinvolto anche l'ippocampo, mentre il cervelletto è interessato nella sua totalità (strato molecolare e strato granulare).

Anche il tronco encefalico risulta positivo alle colorazioni immunoistochimiche per PrP^{Sc}.

- c) Nel fenotipo MV 2K, il terzo più frequente (8%), la durata media di malattia è 15,8 mesi e l'età media d'esordio è 65,4 anni. I segni clinici osservati comprendono atassia e demenza, mentre a livello istopatologico la caratteristica principale è la presenza di placche cerebellari denominate placche kuru. Queste placche, di tipo amiloide, visibili anche con colorazioni aspecifiche, composte di depositi di PrP^{Sc} (perché risultano positive alle colorazioni specifiche), devono il loro nome al fatto di essere state inizialmente identificate nel kuru. Sono localizzate in tutte le aree cerebellari (strato molecolare e granulare), meno frequentemente nelle aree cerebrali. Altre alterazioni istologiche sono simili a quelli osservati nei VV2, con prevalenza dei depositi tipo placche (*plaque-like*).
- d) Per il fenotipo VV1, osservabile in circa l'1% dei casi, la durata media di malattia è 15,3 mesi e l'età d'esordio si attesta a 39,3 anni. Esordisce con demenza progressiva, principalmente del lobo fronto-temporale. Segni motori importanti, quali l'atassia e il mioclono, possono non manifestarsi all'esordio, ma quest'ultimo compare in seguito insieme ai segni piramidali. All'esame neuropatologico, le regioni cortico-striatali appaiono le più affette, mentre il cervelletto e il lobo occipitale sono relativamente risparmiati (rispetto ai lobi frontale e temporale).
- e) Il fenotipo MM/MV 2C condivide con il seguente le caratteristiche molecolari (omozigosi MM, per la maggioranza dei casi, e PrP^{Sc} di tipo 2) ma si distingue da esso per un interessamento prevalentemente corticale (C). Si presenta con una frequenza dell'1%, una durata media di malattia di 20 mesi, e un'età media all'esordio di 67,8 anni. I segni clinici riguardano prevalentemente danni cognitivi, mentre il mioclono sostenuto e i segni visivi sono generalmente assenti, così come rari o assenti sono i segni cerebellari. La caratteristica istopatologica distintiva di questo fenotipo sono i grandi vacuoli confluenti, ampiamente diffusi nella corteccia cerebrale, mentre i gangli basali e il talamo sono meno colpiti e l'ippocampo è generalmente risparmiato. I cambiamenti cerebellari sono assenti o focali.

f) L'ultimo fenotipo, l'MM 2T, si distingue dal precedente per il marcato interessamento talamico (T). La durata media di malattia è 15,5 mesi, l'età media di esordio 52,3 anni e la frequenza si attesta all'1%. I sintomi caratteristici includono l'insonnia, con incapacità di iniziare e mantenere il sonno, risvegli frequenti e gestualizzazione del contenuto del sogno, in un affaccendamento motorio inesausto (*enacted dreams*). Il mioclono è sempre presente. Il fenotipo si associa a un'atrofia prominente del talamo e dell'oliva inferiore, mentre si osservano alterazioni patologiche di scarso rilievo in altre aree cerebrali. Le lesioni spongiformi sono assenti o focali, limitatamente alla corteccia cerebrale. Lo striato è relativamente preservato (diversamente da tutti gli altri fenotipi).

Oltre ai cosiddetti fenotipi "puri", sono stati riportati in letteratura anche casi di fenotipi "misti", casi cioè in cui si osserva la presenza concomitante di caratteristiche cliniche, molecolari e istopatologiche ascrivibili a due dei fenotipi "puri" (Parchi et al., Acta 2009, 2011). I fenotipi "misti" finora riportati in letteratura annoverano:

- MM/MV 1+2C
- MV 2K + 2C
- MM 2T + 2C
- VV 2+1

La CJD genetica ricalca in larga parte i fenotipi già descritti per la forma sporadica. I dati raccolti sembrano suggerire che la mutazione di per sé sia in grado di favorire l'insorgenza della malattia, ma il fenotipo osservato dipenda principalmente dagli stessi determinanti molecolari della forma sporadica. Ad esempio, i pazienti E200K-129M con PrP^{Sc} di tipo 1 danno un fenotipo non distinguibile dall'MM1/MV1. La mutazione D178N, come precedentemente accennato, in cis con l'allele 129M produce FFI, una forma che condivide molti aspetti clinici e neuropatologici con l'MM 2T (detto anche sFI, ovvero insonnia fatale sporadica) e si associa a una PrP^{Sc} di tipo 2, mentre in cis con l'allele 129V produce CJD riconducibile al fenotipo VV1 e si associa a una PrP^{Sc} di tipo 2.

La forma iatrogena della CJD legata al trapianto di dura madre, molto rara ma a maggiore frequenza nella popolazione giapponese, è stata associata a due fenotipi nei

pazienti omozigoti metionina al codone 129: un fenotipo senza placche di tipo kuru, associabile alla variante sporadica MM1/MV1 (np-dCJD), e un fenotipo con placche di tipo kuru, che ricorda la variante sporadica MV 2K (p-dCJD). Questo fenotipo, in cui si osserva la produzione di un frammento di PrP^{Sc} intermedio fra tipo 1 e tipo 2, del peso molecolare di circa 20 kDa, rappresenta una combinazione di caratteristiche istopatologiche e molecolari mai osservata nella sCJD. Tuttavia a ben guardare anche la variante sporadica MV 2K è associata alla presenza dello stesso frammento di 20 kDa, in combinazione con il tipo 2 già descritto. Pertanto sembra logico arguire che il fenotipo pd-CJD sia un adattamento, nei pazienti con genotipo MM, della forma sporadica MV 2K.

Le trasmissioni sperimentali hanno contribuito notevolmente a chiarire le basi molecolari della grande eterogeneità della CJD mediante il concetto di “ceppo prionico”. I ceppi prionici si definiscono come inoculi che, trasmessi ad animali singenici, sono in grado di manifestarsi con caratteristiche cliniche, istopatologiche e molecolari distinte e riproducibili fedelmente nei vari passaggi (fig. 10).

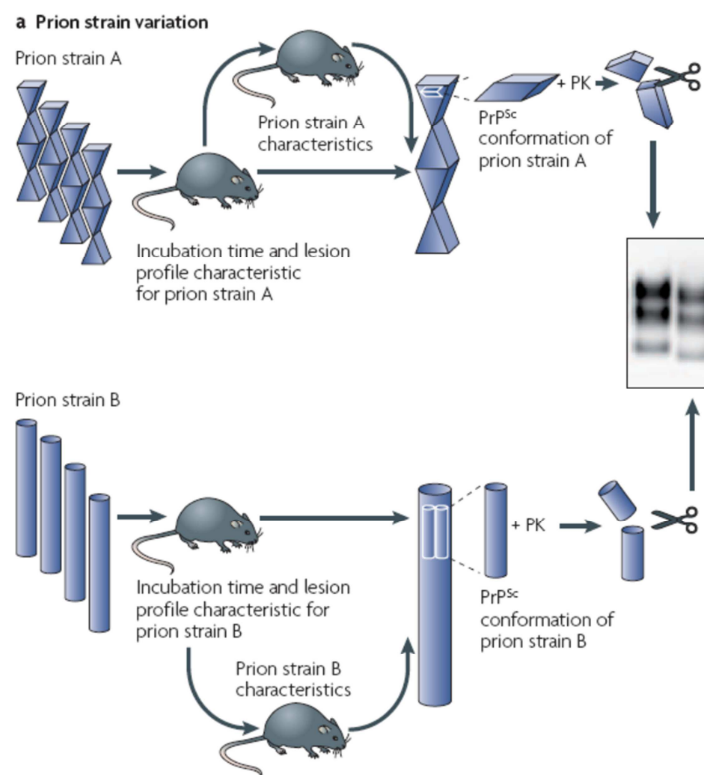


Figura 10: il concetto di “ceppo prionico” (da Aguzzi et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2007).

Tale concetto, mutuato dalla microbiologia, si ispira a quello più tradizionale di “ceppo batterico” o “ceppo virale”. Tuttavia, in assenza di qualsiasi molecola informazionale a tutt’oggi nota (DNA, RNA) associabile alla particella infettante proteica, questo concetto resta ancora fondamentalmente un mistero.

Ad ogni modo, le infezioni sperimentali in animali singenici hanno dimostrato che tutti i fenotipi della CJD sporadica si trasmettono come ceppi distinti, ad eccezione delle due varianti VV2/MV 2K che si trasmettono come un unico ceppo unitamente al kuru (Parchi et al., 2010, Bishop et al., 2010, Moda et al., 2012). Allo stesso modo, la forma genetica E200K-129MM1 ha caratteristiche di trasmissione indistinguibili dalla variante sporadica MM1/MV1 (Parchi et al., 2010). Ancora, mentre il fenotipo np-dCJD presenta caratteristiche di trasmissione completamente sovrapponibili all’MM1/MV1 sporadico, il fenotipo p-dCJD si trasmette in maniera del tutto identica ai fenotipi MV 2K/VV2 della CJD sporadica, confermando così la somiglianza fra queste varianti osservata empiricamente (Kobayashi et al., 2014).

6.2 **BSE e vCJD.** La BSE è stata riconosciuta come una nuova EST nel 1986. Esistono tuttavia documentazioni che segnalano casi di malattia assimilabile alla BSE già nel 1983. Al 2015, i casi di BSE riportati in tutto il mondo sono stati più di 190000, in 28 diversi Paesi. Nonostante le diverse teorie avanzate sull’origine della BSE nei bovini, nessuna è stata finora accettata dalla comunità scientifica. Tuttavia il veicolo di infezione più accreditato sono le farine di carne usate come mangimi, in cui venivano incluse anche carcasse di animali infetti. Infatti, a partire dal 1993, a circa 5 anni dall’adozione del divieto sull’impiego delle farine di carne di ruminante per l’alimentazione dei ruminanti stessi, è stato osservato nel Regno Unito un progressivo declino dei casi. I segni clinici della patologia includono cambiamenti progressivi neurologici e comportamentali (aumento del nervosismo, apprensione, aggressività), alterazioni dell’andatura o del movimento (tremori, debolezza, atassia degli arti posteriori) e perdita di peso. Il periodo tipico di incubazione può durare dai 2 agli 8 anni (Murdoch e Murdoch, 2015).

Nel 1996, cominciò ad apparire nell’uomo una nuova forma di CJD con caratteristiche piuttosto diverse da quelle già note (Will et al., 1996): la cosiddetta nuova variante

della CJD (vCJD). La vCJD colpisce soprattutto soggetti giovani: l'età media d'esordio dei sintomi è vicina ai 30 anni. In più della metà dei casi le sue manifestazioni cliniche consistono in disturbi psichici; i segni neurologici comprendono disturbi sensitivi, perdita di memoria e disturbi dell'equilibrio, mentre il deterioramento delle facoltà mentali e le contrazioni involontarie dei muscoli, caratteristici delle encefalopatie spongiformi, compaiono più tardi (Will, 2003, 2004). Il quadro istopatologico osservabile nell'autopsia è caratterizzato dalle cosiddette *placche floride* nella corteccia cerebrale e cerebellare. Si tratta di accumuli di sostanza amiloide formata da aggregati insolubili di PrP^{Sc}, circondati da un alone ricco di vacuoli. La PrP^{Sc} ha mostrato le stesse caratteristiche fisico-chimiche in tutti i soggetti finora testati, a conferma che la malattia è causata da un singolo ceppo di prione. La mobilità elettroforetica della PrP^{Sc} è di tipo 2, e quindi, comune ad altri fenotipi di CJD, ma il rapporto percentuale delle tre glicoforme, in cui predomina la proteina diglicosilata, la distingue da tutte le altre varianti sporadiche e acquisite di CJD (Ironsides et al., 2000), che invece mostrano una prevalenza della forma monoglicosilata. Come già discusso, tutti gli individui affetti sono omozigoti metionina al codone 129 di *PRNP*, eccetto un individuo MV in cui, dopo trasfusione, è stata rilevata la presenza di depositi di PrP^{Sc} nella milza, in grado di infettare modelli animali (Diack et al., 2014). In breve fu dimostrato che lo stesso ceppo in grado di causare la BSE era anche responsabile della vCJD, grazie a studi epidemiologici, di trasmissione al cinomolgo, un macaco giavanese il cui *PRNP* ha un'omologia del 95 per cento con il gene umano (Lasmezas et al., 1996), e ai topi (Bruce et al., 1997): in questi studi, gli animali infettati con inoculi provenienti da vCJD e BSE mostravano lo stesso fenotipo e le stesse proprietà biochimiche della PrP^{Sc}. La BSE, che si è dunque rivelata in grado di superare la barriera di specie, è attualmente l'unica EST sicuramente classificabile come zoonosi. Tra l'altro, la BSE è in grado di trasmettersi anche alle pecore infettate sperimentalmente.

Nel 2004, fu identificato un nuovo fenotipo di BSE, denominato *BASE* o *BSE-L*, in quanto la PrP^{Sc} ad esso associata dopo trattamento con PK produce un frammento a mobilità elettroforetica leggermente inferiore rispetto alla forma classica (L sta per low), denominata, quindi, *BSE-C*. *BASE* invece è l'acronimo di *bovine amyloidotic*

spongiform encephalopathy, in quanto a questo fenotipo è stata associata la presenza delle placche amiloidi, non riscontrabili invece nella forma classica. La prova che la BSE-L e la BSE-C sono causate da due ceppi prionici distinti è stata ottenuta dopo trasmissione sperimentale a topi transgenici per il gene bovino, che contraevano due fenotipi distinti di EST. Tuttavia, il ceppo BSE-L è in grado di convertirsi nel ceppo BSE-C dopo trasmissioni seriali in linee di topi inbred, il che ha portato a ipotizzare che la BSE derivi dalla BASE (Poggiolini et al., 2013).

La *BSE-H*, anche questa descritta per la prima volta nel 2004 (Biacabe et al., 2004), deve il suo nome alla presenza di un frammento di PrP^{Sc} in grado di migrare in elettroforesi in posizione leggermente superiore a quella relativa alla BSE-C (H = high). Sebbene questa variante sia in grado di ricapitolare la maggior parte delle caratteristiche fenotipiche della BSE-C dopo trasmissioni seriali ai topi wild-type (Baron et al., 2011), in trasmissioni alla stessa specie ha prodotto un fenotipo distinto, con diversi tempi di incubazione (Balkema-Buschmann et al., 2011; Konold et al., 2012).

6.3 **Scrapie.** Lo scrapie ha una distribuzione cosmopolita ed è considerato endemico nel Regno Unito e in molti paesi del mondo. L'Australia e la Nuova Zelanda sono gli unici paesi considerati indenni. Le alterazioni neuropatologiche osservate includono la vacuolizzazione e l'astrocitosi, oltre naturalmente ai depositi di PrP^{Sc}, mentre la perdita neuronale non è di solito rilevante (Jeffrey e Gonzalez, 2007). Al contrario dei bovini affetti dai BSE, in cui la maggior parte dell'infettività è associata al SNC, nelle pecore affette da scrapie si osserva una diffusa distribuzione dell'infettività nei tessuti, simile a quella osservata nelle pecore infettate sperimentalmente con la BSE (Jeffrey et al., 2006). Diversi ceppi di scrapie naturale sono stati isolati nel topo e nell'hamster, sebbene la caratterizzazione biochimica e istopatologica dei fenotipi ad essa associati sia di non facile realizzazione, a causa dell'elevata variabilità individuale riscontrata. Un ceppo con caratteristiche fenotipiche distinte, denominato CH1641 e derivato da una pecora Cheviot affetta da scrapie naturale dopo diversi passaggi in pecore e capre, fu descritto inizialmente nel 1988. Esso si distingue dallo scrapie classico in quanto presenta un frammento di PrP^{Sc} a mobilità elettroforetica più rapida. Il ceppo CH1641 presenta diversi aspetti che ricordano la BSE trasmessa sperimentalmente nelle pecore,

eccetto la difficile trasmissione al topo, che invece è molto più agevole per il ceppo BSE. Infine, nel 2003 fu descritto un ceppo di scrapie atipico in 5 pecore della Norvegia, denominato Nor98. Più tardi, casi simili sono stati riportati in altri paesi europei e negli Stati Uniti. Il pattern elettroforetico della PrP^{Sc} ad esso associata ne fa un unicum nel panorama dei ceppi di scrapie, con somiglianze che tendono verso le EST umane GSS e VPSP^r (Poggiolini et al., 2013). Ad oggi, tuttavia, non sono state riportate evidenze sperimentali di malattie da prioni umane potenzialmente derivate da infezione da scrapie, sebbene si sappia che questa malattia colpisce anche le capre.

6.4 **CWD.** La CWD è stata identificata per la prima volta nel 1967 in una mandria di cervi mulo domestici, grazie ad uno studio congiunto dell'università del Colorado e di quella del Wyoming (Stati Uniti). Inizialmente descritta come una sindrome debilitante e una malattia neurologica progressiva, la CWD fu infine classificata come EST nel 1980. Successivamente la patologia fu riscontrata in cervi wapiti domestici e selvatici, nei cervi mulo e a coda bianca, e negli alci. Oltre agli Stati Uniti, la CWD è stata riportata in Canada e in Corea del Sud. Dopo un tempo di incubazione variabile (tipicamente, da 18 mesi a 5 anni), i primi sintomi comprendono alterazioni comportamentali e dell'apparato locomotore. Seguono la perdita di peso, il bruxismo, alterazioni della postura e della posizione della testa, tremori del capo e atassia. La polidipsia e la polifagia, dovute alla perdita di peso e di massa muscolare, sono i segni distintivi della fase sintomatica della CWD. La degenerazione neuronale e l'astrocitosi sono osservate tipicamente nella sostanza grigia del diencefalo, della corteccia olfattiva e del midollo. Le placche amiloidi, talvolta di tipo florido, sono comuni, in contrasto alle placche granulari, tipiche della BSE. Anche nella CWD si possono distinguere due diversi ceppi: CWD1 e CWD2. Essi si differenziano, nelle trasmissioni sperimentali a furetti, Syrian hamster e topi transgenici, per tempo di incubazione, estensione dei depositi di PrP^{Sc}, percentuale di animali infettati, segni clinici, progressione della malattia, ma non per le proprietà biochimiche della proteina (Haley e Hoover, 2015). Anche per la CWD, tuttora non esistono evidenze sperimentali di trasmissione all'uomo. Tuttavia non è ancora del tutto chiaro se la PrP^{Sc} ad essa associata sia in grado di superare la barriera di specie.

7. PROPRIETA' BIOCHIMICHE DELLA PrP^{Sc} ALLA BASE DELLA DEFINIZIONE DEI CEPPI

7.1 *Una carrellata sugli studi biochimici più noti.* Come già discusso, tutte le EST nelle varie specie animali, con l'unica eccezione, per il momento, della CWD, si associano a diversi ceppi che sono distinguibili anche mediante analisi biochimica della PrP^{Sc}. L'evidenza sperimentale più semplice di tale eterogeneità biochimica è la migrazione elettroforetica dei frammenti prodotti dopo trattamento con PK. Tuttavia, nel tempo, molteplici saggi, sempre più sofisticati, sono stati proposti per studiare le differenze biochimiche nei vari ceppi di EST. L'ipotesi oggi maggiormente accreditata per spiegare la teoria dei ceppi in assenza di materiale genetico tradizionale (DNA, RNA) ad essi associato, è che i diversi fenotipi di EST siano determinati da altrettante conformazioni tridimensionali della PrP^{Sc}. Vista la difficoltà di effettuare degli studi strutturali diretti di comparazione delle varie isoforme patologiche della proteina, a causa della sua spiccata tendenza all'aggregazione che impedisce di purificarla in forma monomerica, la via degli studi biochimici indiretti resta la migliore a disposizione per ricavare informazioni sulle varie conformazioni della PrP^{Sc}. Storicamente, la prima osservazione di differenze biochimiche nella PrP^{Sc} associata a ceppi diversi di EST si deve a Bessen e Marsch. Essi, studiando due fenotipi distinti di encefalopatia spongiforme trasmissibile del visone, il primo denominato *HY*, da *hyper*, caratterizzato da ipereccitazione, tremore e atassia, e l'altro *DY*, da *drowsy*, caratterizzato da una progressiva letargia, riportarono che le due isoforme di PrP^{Sc} estratte dai cervelli di questi animali avevano proprietà biochimiche diverse. Queste includevano sia il pattern di migrazione elettroforetica in seguito alla digestione con PK, che mostrava due profili differenti, sia le proprietà di sedimentazione e di resistenza all'azione della proteasi. La proteina denominata *PrPResHY*, infatti, veniva solo parzialmente idrolizzata anche dopo 48 ore di trattamento, mentre la *PrPResDY* si digeriva completamente dopo 12 ore (Bessen e Marsh, 1994). Nel 1996 Telling e collaboratori hanno esteso le osservazioni di Bessen e Marsh a due ceppi umani. Inoculando varianti fenotipiche di CJD associate rispettivamente a PrP^{Sc} di tipo 1 e di tipo 2 (fCJD-E200K, fCJD-D178N, sCJD e FFI) in topi singenici (il cui *PRNP* era un

gene chimerico uomo-topo) hanno riprodotto negli animali inoculati i profili elettroforetici della PrP^{Sc} osservati nell'uomo (Telling et al., 1996). I primi studi strutturali in FTIR hanno confermato la differenza di conformazione tridimensionale nei due ceppi prionici già caratterizzati biochimicamente nel visone, dimostrando come la struttura di *PrPresDY* si distinguesse significativamente da quella di *PrPresHY* e da quella di un terzo ceppo, il 263K, tipico dell'hamster (Caughey et al., 1998). Successivamente, un altro gruppo riuscì ad identificare differenze ceppo-specifiche nella struttura secondaria di ceppi di Scrapie e di BSE-C mediante la stessa metodica, dopo passaggio in hamster (Thomzig et al., 2004, Spasov et al., 2006).

Nel 1998, Safar e collaboratori misero a punto un nuovo saggio biochimico basato sulla capacità denaturante della guanidina idrocloruro (GdnHCl) di perturbare la struttura tridimensionale della PrP^{Sc}, rendendo così accessibili alcuni epitopi in precedenza nascosti. Applicando un test ELISA, essi riuscirono ad avere una misurazione piuttosto precisa della quantità di PrP^{Sc} rilevabile prima e dopo trattamento con GdnHCl. In base a questo saggio, denominato *CDI (conformation-dependent immunoassay)* questi autori osservarono 8 distinti ceppi prionici nell'hamster (Safar et al., 1998).

Il saggio di denaturazione mediante GdnHCl, che misura in Western blot la riduzione della resistenza alla PK dopo l'*unfolding* mediato dalla guanidina a diverse concentrazioni, denominato *CSA (conformational stability assay)*, è stato usato frequentemente per testare la stabilità conformazionale della PrP^{Sc} associata a vari ceppi prionici. La relazione che intercorre fra stabilità conformazionale, tempo di incubazione e capacità di replicazione in vitro è stata investigata spesso negli ultimi anni, poiché può essere la chiave per spiegare la stretta associazione tra le proprietà biochimiche della proteina e i fenotipi clinico-patologici osservati. Legname et al. (2006) stabilirono che una ridotta capacità di resistere alla denaturazione mediata da GdnHCl (quindi, presumibilmente, una conformazione meno stabile) è correlata a un minor tempo di incubazione in ceppi prionici adattati al topo. Tuttavia, questi risultati non vennero confermati da Ayers e colleghi (2011), i quali trovarono che una maggiore stabilità conformazionale, sempre misurata tramite CSA, è invece associata a una riduzione del tempo di incubazione nei ceppi adattati all'hamster. Secondo Gonzalez-

Montalban et al. (2011), i ceppi prionici adattati all'hamster che si rivelano conformazionalmente meno stabili in CSA sono anche quelli più lenti nella replicazione in vivo e in vitro. Questo quadro è stato ulteriormente completato dall'osservazione che la maggiore stabilità conformazionale, misurata mediante la resistenza alla dissociazione dei polimeri di PrP^{Sc} in seguito a trattamento con temperature crescenti, correla con la maggiore neuroinvasività nei ceppi murini (Bett et al., 2011). In uno studio di centrifugazione in velocità di sedimentazione su diversi ceppi ovini e dell'hamster, la capacità del ceppo di produrre una patologia a decorso rapido è stata messa in correlazione con la presenza di particelle infettanti a lenta sedimentazione, quindi presumibilmente di piccole dimensioni (Tixador et al., 2010). Questa componente di PrP^{Sc} è, inoltre, quella che si amplifica meglio nei saggi di replicazione in vitro (Laferrière et al., 2013).

7.2 **EST umana.** Nell'uomo, le prime inferenze sulle differenze conformazionali di PrP^{Sc} si devono alla scoperta dei due principali frammenti ottenuti dopo trattamento con PK, il tipo 1 e il tipo 2 (Parchi et al., 1996). La logica di questa associazione è che in una determinata conformazione proteica certe regioni sono più o meno accessibili al taglio proteolitico, che quindi può avvenire in quelle regioni o in altre. In aggiunta ai due frammenti principali, vennero individuati altri frammenti, di minori dimensioni, denominati CTF12 e CTF13, dal loro peso molecolare, che includono la porzione C-terminale della proteina (Zou et al., 2003): in seguito si dimostrò che questi frammenti sono prodotti in diversa quantità nei diversi sottotipi di sCJD, misurabile e riproducibile, con la maggiore presenza riscontrata nelle varianti associate al tipo 1 (Notari et al., 2008). Anche il rapporto tra le glicoforme di PrP^{Sc} può essere considerato un segno distintivo del ceppo prionico: mentre tutte le forme sporadiche mostrano una prevalenza della banda monoglicosilata, anche se ci sono delle lievi differenze fra sottotipi (Parchi et al., 1999), la vCJD come detto è associata alla prevalenza della forma diglicosilata (Collinge et al., 1996), così come le forme genetiche legate ad alcune mutazioni (D178N, E200K). Queste ultime, però, non possono considerarsi dei ceppi prionici distinti, in quanto si associano a più fenotipi riconducibili ai ceppi sporadici. La PrP^{Sc} estratta da tessuto affetto da GSS, dopo digestione con PK, genera frammenti di diversa lunghezza rispetto alla CJD, e

specialmente uno dal peso molecolare di 8 kDa, che è considerato un tratto distintivo di questa variante (Colucci et al., 2006). In alcuni casi di GSS, la PrP^{Sc} è insolitamente sensibile alla PK, sebbene presenti aggregati di dimensioni simili a quelli osservati nella sCJD. La VPSPr, invece, è stata finora riscontrata solo in forma sporadica, ma il pattern elettroforetico della PrP^{Sc} ad essa associata mostra interessanti somiglianze con quello della GSS, in primis il frammento di 8 kDa. Mentre inizialmente la VPSPr venne descritta come una forma notevolmente sensibile alla digestione proteolitica (Gambetti et al., 2008), successivamente questa caratteristica è stata messa in relazione al genotipo al codone 129 (Zou et al., 2010): in soggetti omozigoti VV la sensibilità è massima, mentre si attenua negli eterozigoti ed è minima negli omozigoti MM. A causa delle somiglianze biochimiche tra VPSPr e GSS, è stato ipotizzato che la prima sia la forma sporadica della seconda, sebbene i fenotipi patologici osservati siano piuttosto dissimili. Quindi non è chiaro, in questo caso, se si possa parlare di un unico ceppo “GSS-VPSPr” (figg. 11-12).

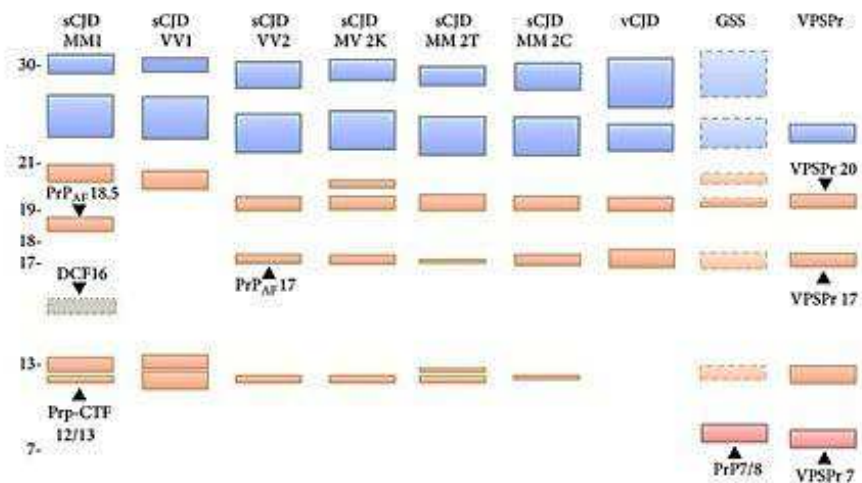


Figura 11: discriminazione dei ceppi di EST umane in base al peso molecolare dei frammenti di PrP^{Sc} osservati dopo digestione proteolitica e migrazione elettroforetica (da Poggiolini et al., Int J Cell Biol 2013).

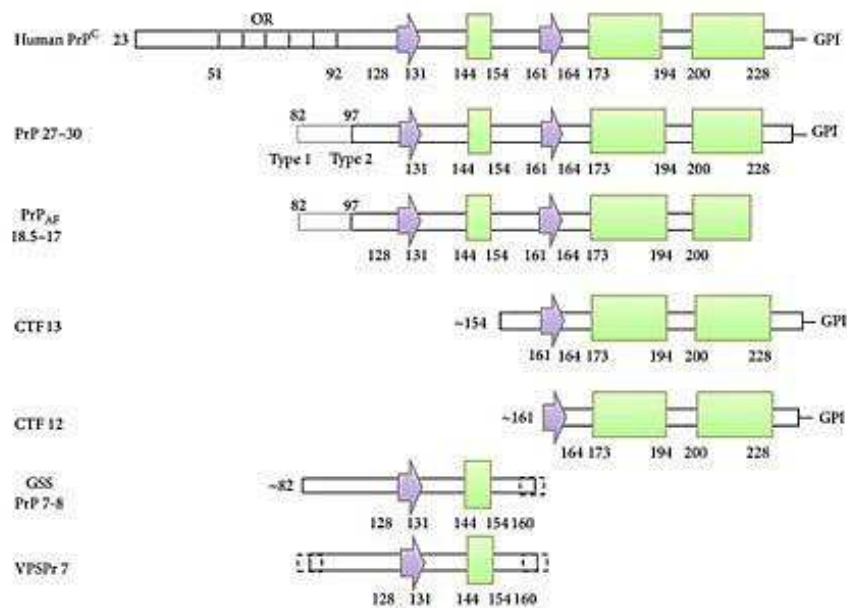


Figura 12: rappresentazione schematica della struttura secondaria e della posizione, rispetto alla sequenza proteica intera, dei frammenti di PrP^{Sc} relativi alle varie EST umane (da Poggiolini et al., Int J Cell Biol 2013).

La resistenza alla digestione con PK è stata considerata, fin dalle prime osservazioni di Bessen e Marsh, un metodo per la differenziazione biochimica dei ceppi prionici. Uno studio condotto sulla proteina purificata estratta da cervelli affetti da tutte le varianti di sCJD ha dimostrato che il grado di resistenza alla digestione proteolitica è significativamente diverso nei diversi ceppi, con le varianti associate al tipo 1 che presentano una maggiore suscettibilità all'azione dell'enzima. Inoltre tale proprietà sembra essere parzialmente correlata al grado di aggregazione della proteina: più sono abbondanti gli aggregati di grandi dimensioni, maggiore è la resistenza alla PK, seppur con qualche eccezione. Di conseguenza, la resistenza alla PK sembra determinata in parte dal grado di aggregazione della PrP^{Sc}, in parte dalla forza dei legami che tengono insieme i monomeri nell'aggregato (Saverioni et al., 2013).

Nell'uomo, gli studi di stabilità conformazionale basati sul trattamento con GdnHCl sono piuttosto frammentari. Uno di questi ha riportato, dopo CSA, una maggiore stabilità conformazionale della PrP^{Sc} ottenuta da sCJDMM1 rispetto a quella ottenuta

da sCJDMM 2C (Cali et al., 2009). Un altro, condotto mediante CDI, ha evidenziato una maggiore stabilità nei ceppi sCJDMM1/VV2 rispetto alla vCJD, mentre ha dato risultati divergenti su due casi di GSS (Choi et al., 2010). Un terzo ha proposto un metodo innovativo, sempre basato sul trattamento con GdnHCl, che misura l'aumento della solubilità della PrP^{Sc} indotto dalla denaturazione, denominato *CSSA (conformation stability and solubility assay)*. Anche questa tecnica ha rivelato una maggiore stabilità del ceppo sCJDMM1 rispetto all'MM 2C, su campioni di tessuto derivati da infezione sperimentale in bank vole (Pirisinu et al., PLoS 2010). In un nostro recente lavoro, abbiamo dimostrato che la metodica della denaturazione mediata da GdnHCl non è in grado di discriminare le varianti di sCJD e la vCJD (Cescatti et al., 2016). I ceppi MM1 e MM 2C della sCJD sono stati estensivamente studiati anche da Safar e collaboratori, mediante una serie di metodiche. Questo gruppo ha dimostrato che il primo ceppo contiene aggregati di PrP^{Sc} di minori dimensioni rispetto al secondo e una minore quantità di PK-sensitive PrP^{Sc}, è in grado di replicarsi più rapidamente nei saggi di amplificazione in vitro ed è associato ad una maggiore stabilità conformazionale, misurata mediante CDI: tutto ciò si accompagna ad una minore durata di malattia della variante MM1 rispetto alla MM 2C. Infine, mediante studi di spettrometria di massa accoppiata allo scambio idrogeno/deuterio (HXMS) i due ceppi hanno mostrato anche una diversa struttura secondaria (Kim et al., 2012, Safar et al., PLoS 2015). Tuttavia questi studi non sono mai stati allargati ad altre varianti, per cui non è chiaro se queste correlazioni siano occasionali o estensibili all'intero spettro delle EST umane.

7.3 **BSE.** I tre ceppi di BSE oggi noti si distinguono, come precedentemente discusso, per la diversa lunghezza dei frammenti di PrP^{Sc} dopo trattamento con PK. Tuttavia questa non è l'unico tratto molecolare che ne permette il riconoscimento. Infatti la PrP^{Sc} ottenuta da BSE-H produce, oltre al frammento principale, anche un frammento C-terminale di circa 14 kDa, non riscontrabile negli altri due ceppi (Biacabe et al., Prion 2007). (figg. 13-14). I tre ceppi di BSE si differenziano anche per il rapporto tra le glicoforme e la resistenza alla PK. Per quanto riguarda la prima proprietà, mentre in BSE-C e BSE-H la PrP^{Sc} predominante è quella diglicosilata (50-60% del totale), nella BSE-L le due forme glicosilate sono circa equivalenti in quantità (40%) (Priemer et al.,

2013). Il ceppo più resistente alla PK è la BSE-C, segue BSE-L mentre la BSE-H è quello più sensibile (Priemer et al., 2013). Anche in topi transgenici infettati con il ceppo BSE-C e con un inoculo derivante da un caso bovino giapponese di BSE-L, la PrP^{Sc} proveniente dal primo gruppo mostra un aumento di resistenza alla proteolisi rispetto al secondo. Non sono state riscontrate, invece, differenze nella stabilità conformazionale in CSA nei due gruppi (Masujin et al., 2008). Un altro studio, che ha misurato il grado di denaturazione indotto dalla guanidina senza ricorrere alla digestione con PK, mediante un test ELISA che riconosce PrP^{Sc} integra, ma non PrP^C né PrP^{Sc} *unfolded* (IDEXX Herdcheck ELISA), ha confermato la somiglianza nelle curve di denaturazione fra BSE-C e BSE-L, mentre ha evidenziato una stabilità conformazionale significativamente maggiore per la BSE-H (Vrentas et al., 2013).

7.4 **Scrapie.** Anche in questo caso la principale metodica biochimica per il riconoscimento dei ceppi è la migrazione elettroforetica dei frammenti di PrP^{Sc} prodotti dopo digestione proteolitica. Il ceppo CH1641 si distingue dai ceppi di scrapie classico per la lunghezza del frammento principale di PrP^{Sc}, che mostra una migrazione elettroforetica più rapida, ma anche per la presenza del frammento secondario C-terminale di 14 kDa (Baron et al., 2007), non osservabile negli altri ceppi. Il ceppo Nor98 è associato ad un pattern elettroforetico ancora diverso, che presenta il frammento di 8 kDa, tipicamente osservato nella GSS e nella VPSP_r umane, nonché a una significativa riduzione della resistenza alla proteolisi (anche questa caratteristica riscontrabile in GSS e VPSP_r) (figg. 13-14). Il CSSA è in grado di discriminare fra lo scrapie classico e il Nor98, poiché quest'ultimo mostra una minore stabilità conformazionale (Pirisinu et al., 2013) e fra lo scrapie (che include i ceppi classici e il CH1641) e la BSE ovina, molto più resistente (Pirisinu et al., 2011). Spesso le analisi biochimiche sulla PrP^{Sc} derivata da scrapie ovino hanno evidenziato differenze legate al genotipo dell'ospite più che al ceppo in sé: è stato infatti dimostrato che nelle pecore con genotipo VRQ/VRQ affette da scrapie classico la *PK-sensitive PrP^{Sc}* è più abbondante rispetto a quella riscontrata nelle pecore con genotipo ARQ/ARQ (Thackray et al., 2007). Ancora, i due isolati propagati in topi sono associati a due isoforme di PrP^{Sc} con diversa stabilità conformazionale: l'inoculo proveniente da pecore VRQ/VRQ si è dimostrato più sensibile alla denaturazione rispetto all'altro (Thackray et al., 2008). Un ulteriore

studio si è occupato di caratterizzare biochimicamente nel dettaglio un inoculo di scrapie classico dagli USA, che ha dimostrato tempi di incubazione molto ridotti in pecore dal genotipo 136AV/VV-171QQ rispetto al genotipo 136AA-171QQ. Questo inoculo è risultato omogeneo nei diversi genotipi per il profilo di migrazione elettroforetica dopo digestione con PK e per il grado di resistenza alla digestione stessa, ma non per la resistenza alla denaturazione (misurata di nuovo tramite la metodica *IDEXX Herdcheck ELISA*), che appare significativamente maggiore nella PrP^{Sc} associata al genotipo 136AA rispetto ai genotipi 136AV/VV. Anche in questo caso, quindi, sembra confermarsi l'associazione tra elevata stabilità conformazionale e incubazione lenta della malattia (Vrentas et al., 2012).

7.5 **CWD.** Per questa EST, la differenziazione in ceppi, per ora, non è stata supportata da discriminazione biochimica (figg. 13-14).

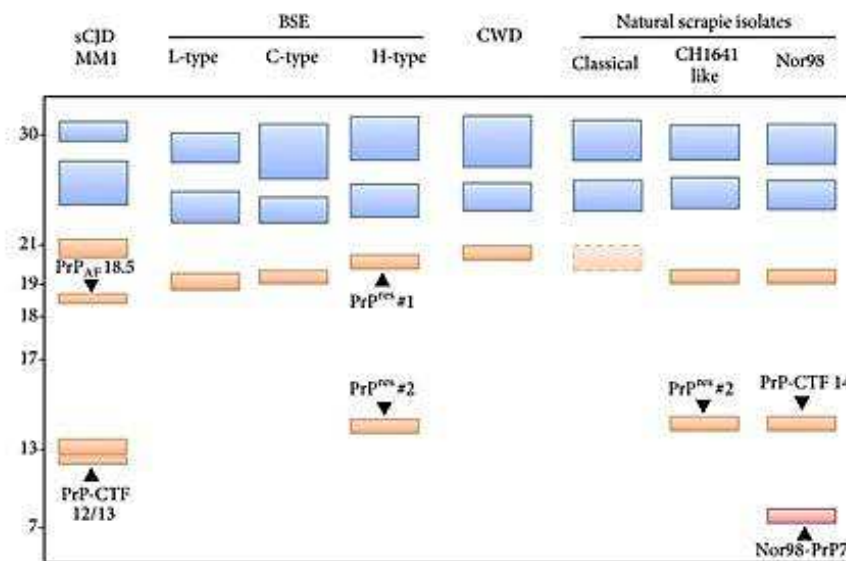


Figura 13: discriminazione dei ceppi di EST animali in base al peso molecolare dei frammenti di PrP^{Sc} osservati dopo digestione proteolitica e migrazione elettroforetica (da Poggiolini et al., Int J Cell Biol 2013).

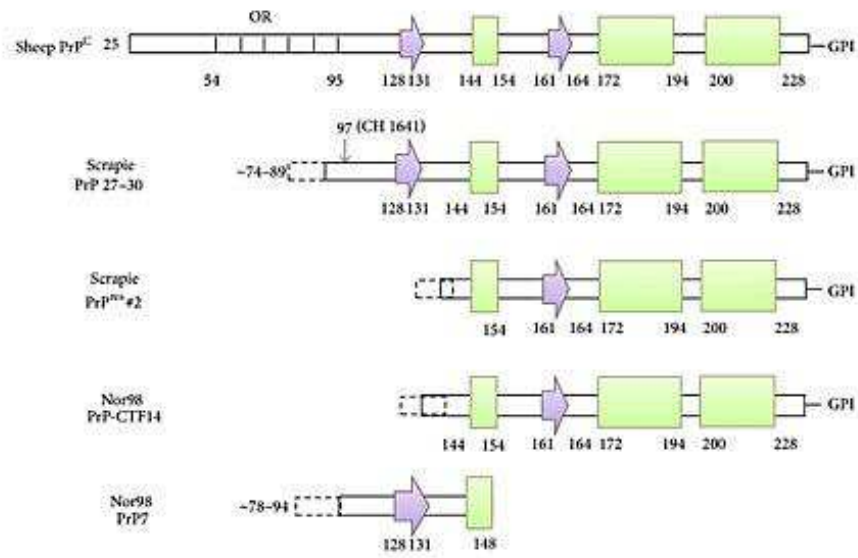


Figura 14: rappresentazione schematica della struttura secondaria e della posizione, rispetto alla sequenza proteica intera, dei frammenti di PrP^{Sc} relativi alle varie EST animali (da Poggiolini et al., Int J Cell Biol 2013).

SCOPO DELLO STUDIO

Una delle più grandi sfide nella comprensione delle malattie da prioni e, più in generale, di tutta la famiglia delle “*protein misfolding diseases*”, è l’identificazione dei tratti molecolari responsabili della grande variabilità clinico-patologica che caratterizza queste patologie. Il concetto di ceppi prionici determinati da conformazioni proteiche alternative che correlano con le diverse varianti fenotipiche della malattia è supportato da crescenti evidenze non solo nelle malattie da prioni classiche, ma anche in altre malattie neurodegenerative, come le taupatie (Sanders et al., 2014) e le sinucleinopatie (Nussbaum, 2017) che, non a caso, vengono sempre più spesso definite patologie “prion like”.

La tipizzazione biochimica si è rivelata un importante strumento per il riconoscimento dei ceppi prionici, poiché elimina la necessità delle trasmissioni sperimentali, molto più impegnative in termini di tempo e di risorse. Essa rappresenta, pertanto, il migliore sistema attualmente a disposizione per individuare i ceppi come entità distinte nei loro ospiti naturali e dopo trasmissione intra- ed interspecie. Oltre alla evidente rilevanza diagnostica (tutti i test diagnostici sia nell’uomo che negli animali sono basati sulla detezione e caratterizzazione della PrP^{Sc}), la tipizzazione biochimica della PrP^{Sc}:

- 1) consente la ricerca di eventuali ceppi comuni tra uomo e altre specie utili per la valutazione del potenziale zoonotico delle EST animali;
- 2) permette la ricerca di proprietà condivise tra ceppi prionici utili all’identificazione dei determinanti strutturali delle proprietà biologiche dei ceppi prionici.

Come precedentemente discusso, la correlazione tra proprietà biochimiche della PrP^{Sc} e variabilità fenotipica della malattia è stata oggetto di numerosi studi. La malattia meglio studiata da questo punto di vista, è la CJD sporadica, per la quale è disponibile un’approfondita caratterizzazione molecolare, sebbene non ancora conclusiva. Per quanto riguarda invece le EST animali e, soprattutto, il loro confronto con le forme umane, gli studi, con la sola eccezione del ceppo BSE-vCJD, sono molto più frammentari. Tra i contributi più significativi va ricordata la descrizione delle somiglianze tra forme umane GSS e VPSP^r e lo Scrapie atipico Nor98, ovvero una ridotta resistenza alla proteinasi K e

un analogo pattern elettroforetico dopo digestione con PK. Tuttavia, altre proprietà quali la stabilità conformazionale dimostrano un quadro più complesso caratterizzato da una significativa eterogeneità all'interno di questi gruppi (Pirisinu et al., 2013). Un altro studio ha messo a confronto la CWD con la sCJDMM1, riportando diverse somiglianze biochimiche della PrP^{Sc} associata ai due fenotipi, tra cui la mobilità elettroforetica (21 kDa), il sito di taglio in posizione 78-82 (simile a quello riportato per la variante MM1), e la stabilità conformazionale misurata mediante CSA. Il medesimo lavoro ha però registrato una diversa distribuzione della PrP^{Sc} tra le tre glicoforme, in quanto in quella associata alla CWD prevale la forma diglicosilata, diversamente da quanto si osserva nella sCJDMM1, in cui è preponderante la forma monoglicosilata (Xie et al., 2006). La prevalenza della forma diglicosilata sembra una costante nelle EST animali, in quanto si riscontra anche nella BSE e nello Scrapie. Il rapporto tra le glicoforme rappresenta, come già discusso, la caratteristica biochimica attraverso la quale la vCJD si differenzia rispetto alle forme sporadiche con analogo genotipo al codone 129 (MM) e tipo di PrP^{Sc} (tipo 2).

Il presente studio si propone di ampliare la caratterizzazione biochimica delle EST umane e animali e di effettuare una comparazione sistematica dei diversi ceppi sia intra- che interspecie, con particolare attenzione ai ceppi umani. La comparazione è stata effettuata, per tutte le EST analizzate, nell'ospite naturale (uomo, pecora, capra, bovino, cervo) e, per la sCJD, anche dopo infezione sperimentale al piccolo roditore *bank vole*. La trasmissione di tutti i ceppi di sCJD è stata realizzata in due linee genetiche di *bank vole*, una recante il genotipo MM al codone 109 di *PRNP*, omologo del 129 umano (Bv109M), l'altra con genotipo II (istidina) (Bv109I), dal gruppo del dott. Nonno dell'Istituto Superiore di Sanità. Il *bank vole*, a differenza di altri modelli sperimentali, è particolarmente suscettibile all'infezione da EST ed è stato in grado di dare luogo al fenotipo patologico a partire da tutti gli inoculi impiegati, almeno in una percentuale di animali. L'analisi delle caratteristiche biochimiche della proteina estratta da tessuto infetto di questi animali, mediante confronto con le stesse caratteristiche osservate nell'inoculo originale, ha permesso di stabilire quali di queste sono determinate dall'ospite e quali dal ceppo infettante. Inoltre, poiché il campione dello studio annovera anche tessuti affetti da vCJD (uomo) e BSE (bovino), questo tipo di confronto è stato possibile anche per un modello naturale di infezione dello stesso ceppo in specie diverse. L'identificazione dei tratti

molecolari determinati prevalentemente o esclusivamente dall'inoculo rispetto a quelli orientati in tutto o in parte dall'ospite, a sua volta, può contribuire a una migliore comprensione del meccanismo molecolare in grado di conferire alla proteina prionica le proprietà distintive ceppo-specifiche.

MATERIALI E METODI

1. SELEZIONE DEI CASI E DEI TESSUTI

1.1 *EST umana*. E' stato analizzato il tessuto nervoso proveniente da 70 pazienti affetti da CJD. Per la maggior parte dei casi, il tessuto autoptico, congelato e fissato in formalina, è stato ottenuto dal Laboratorio di Neuropatologia, dietro consenso informato, a scopo diagnostico. La diagnosi è avvenuta mediante analisi biochimica (digestione proteolitica e rivelazione della presenza di PrP^{Sc} mediante Western blot) e genetica (valutazione del polimorfismo al codone 129 e dell'eventuale presenza di mutazioni patogene nella porzione codificante del gene *PRNP*) sul tessuto congelato, istologica (valutazione semiquantitativa di degenerazione spongiforme, perdita neuronale e proliferazione/attivazione gliale) e immunoistochimica (caratterizzazione dei depositi di PrP^{Sc}) sul tessuto in formalina. Sulla base dei risultati ottenuti ciascun caso è stato quindi classificato secondo i criteri proposti da Parchi e colleghi (Parchi et al., 1999).

I tessuti di vCJD (solo congelato) sono stati ottenuti dal gruppo del dott. Ironside della *National CJD Research and Surveillance Unit* dell'Università di Edimburgo (Regno Unito) e dal gruppo del dott. Tagliavini dell'Istituto Carlo Besta di Milano. I tessuti di p-dCJD (CJD iatrogena causata da infezione dopo impianto di dura madre in soggetti 129MM, associata alla formazione di placche kuru) e di un caso fenotipicamente simile, ma senza una storia clinica di trapianto di dura madre (solo congelato), sono stati ottenuti grazie ad una collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Kitamoto della *Tohoku University School of Medicine* di Sendai (Giappone). Tutti i prelievi sono stati effettuati dalla corteccia frontale.

In tabella 1 è riportato il numero di casi di CJD suddivisi per eziologia e variante (casi sporadici).

EST		Numero di casi
sCJD	VV1	9
	MM1	12
	MM 2T	4
	MM 2C	7
	MM/MV 1 + 2C	6
	MV 2K	10
	VV2	12
vCJD		6
p-dCJD/p-dCJD like		4

Tabella 1: ripartizione dei casi di CJD usati nello studio.

1.2 **EST animali.** Grazie alla collaborazione con il gruppo del dott. Romolo Nonno del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità, sono stati ottenuti 37 campioni di tessuto congelato affetto dalle principali forme di EST animali: Scrapie, BSE e CWD. La ripartizione del campione è riportata in tabella 2.

Specie	EST	Ceppo	Numero di casi
bovino	BSE	BSE-C	4
bovino	BSE	BSE-L	4
bovino	BSE	BSE-H	2
pecora	BSE sperimentale	BSE-C	3
pecora	Scrapie	Scrapie classico	6
capra	Scrapie	Scrapie classico	4
pecora	Scrapie	CH1641	5
capra	Scrapie	CH1641	1
cervo wapiti	CWD	/	2
cervo a coda bianca	CWD	/	3
alce	CWD	/	3

Tabella 2: ripartizione dei casi di EST animali usati nello studio.

1.3 **Bank voles.** In seguito alle trasmissioni di sCJD effettuate sui bank voles dal gruppo del dott. Nonno dell'ISS, sono stati ottenuti i seguenti campioni, tutti derivati da trasmissione secondaria in Bv109M, riportati in tabella 3.

Inoculo	Numero di casi
MM1	3
VV1	9
MM 2T	6
MM 2C	6
MV 2K	2
VV2	9

Tabella 3: ripartizione dei campioni di bank voles infettati con tutte le varianti di sCJD.

2. ANTICORPI

Gli anticorpi primari utilizzati in questo studio sono stati diversi, per permettere la rivelazione dei vari frammenti di PrP^{Sc} in tutti gli organismi analizzati. In figura 15 è riportata una comparazione dell'omologia di sequenza del gene *PRNP* nelle varie specie animali testate, con l'indicazione degli epitopi riconosciuti dai vari anticorpi. Per la visualizzazione in Western blot, sono stati utilizzati il 9A2 (1:8000), il 12F10 (1:2000), lo Sha31 (1:2000), l'L42 (1:250) e il SAF60 (1:2000). Per i soli campioni derivati da tessuto umano, sono stati impiegati il 12B2 (1:8000), il 3F4 (1:30000) e il T2 (1:5000). Tutti gli anticorpi primari sono stati ottenuti dal Laboratorio di Neuropatologia grazie a diverse collaborazioni con gruppi di ricerca italiani e stranieri che si occupano dello studio delle EST. Gli anticorpi secondari utilizzati, coniugati con HRP, sono stati antimouse (1:4000) o antirabbit (1:3000), a seconda della specie in cui è stato prodotto il primario scelto (GE Healthcare).

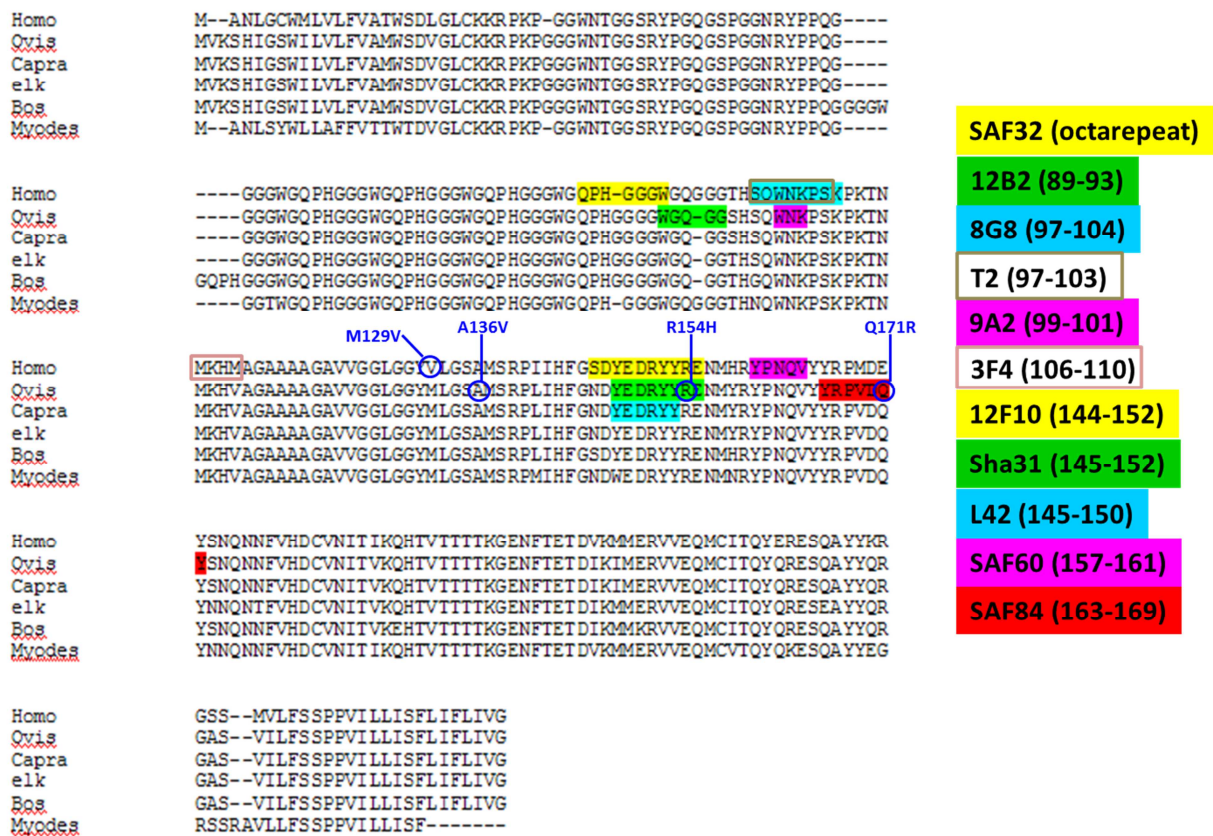


Figura 15: allineamento di sequenza del gene *PRNP* ed epitopi riconosciuti dai diversi anticorpi nelle specie oggetto di questo studio. Nei riquadri pieni sono riportati gli epitopi presenti in tutte le specie e gli anticorpi in grado di riconoscerli, mentre nei riquadri vuoti sono riportati quelli presenti solo nella sequenza umana (con relativi anticorpi). Il T2 riconosce il suo specifico epitopo solo se esso è in posizione N-terminale all'interno di un peptide, pertanto è in grado di legare selettivamente la PrP^{Sc} umana tipo 2 (troncata al residuo 97).

3. METODICHE

- 3.1 **Preparazione dell'omogenato totale (TH).** I campioni (circa 50 mg) sono stati omogenati al 10% peso/volume in tampone di lisi (LB) contenente 100 mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodio deossicolato, 100mM Tris, pH 6,9 o 8.
- 3.2 **Purificazione della PrP^{Sc}.** Per i tessuti di cui si disponeva di quantità sufficiente (almeno 500 mg), i campioni sono stati omogenizzati in 1,75 ml di TEND 2X (20 mM Tris, pH 8,3, 1 mM EDTA, 130 mM NaCl, 1 mM ditiotreitolo) e 1,75 ml di Sarkosyl al 20% e sottoposti a ultracentrifuga a 22500 g per 25 minuti a 4° C, per eliminare i detriti cellulari. I surnatanti (S1) sono stati quindi adagiati su un cuscino di saccarosio (1 ml di saccarosio al 20%) in un nuovo tubo e ultracentrifugati nuovamente a 150000 g per 143 minuti a 4 °C. Dopo aver scartato i surnatanti (S2), i pellet (P2) sono stati incubati overnight a 4 °C in 100 µl di TBS e infine risospesi in 2,5 ml di TEND 1X, 10% NaCl e 1% Sarkosyl dopo tre cicli di congelamento e scongelamento tramite sonicazione controllata. I campioni sono stati quindi adagiati di nuovo su un cuscino di saccarosio e ultracentrifugati a 150000 g per 143 minuti a 18 °C. Dopo aver rimosso i surnatanti (S3), i pellet (P3) sono stati risospesi in 400 µl di TNS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Sarkosyl) a pH 7,4, incubati overnight e quindi dissolti dopo tre cicli di congelamento e scongelamento tramite sonicazione controllata.
- 3.3 **Quantificazione delle proteine totali.** Sul TH e sul P3 il contenuto proteico totale è stato misurato mediante il kit BCA Protein Assay Reagent (Pierce). I valori sono stati portati per tutti i campioni a 5500 µg/ml (TH) o 150 µg/ml (P3).
- 3.4 **Digestione con PK.** Gli omogenati e i purificati sono stati digeriti con proteinasi K (Roche Diagnostics) a 37°C o 55°C per 60 minuti in blanda agitazione (300 rpm) usando diverse concentrazioni dell'enzima. Le digestioni sono state effettuate talvolta in singolo, talvolta in repliche a concentrazioni crescenti di PK (curve di PK). La digestione è stata bloccata aggiungendo fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) ad una concentrazione finale di 3,6 mM. I campioni sono stati portati al volume desiderato

mediante aggiunta di tampone Laemli (concentrazioni finali 3% SDS, 10% glicerolo, 2mM EDTA, 62,5 mM Tris a pH 6,8) e bolliti per 6 minuti a 100 °C.

3.5 Deglicosilazione con PNGaseF. Nei casi in cui è stato necessario rimuovere i glicani della proteina prionica, è stato usato il kit della New England Biolab basato sull'azione dell' Endoglicosidasi F (PNGaseF). Il campione è stato precipitato in metanolo, risospeso in tampone denaturante e bollito per 10 minuti a 100 °C. Dopo l'aggiunta di 4 µl di tampone di reazione, 4 µl di NP40 10% e 2 µl di PNGaseF, il campione è stato incubato a 37 °C per 2-4 ore, nuovamente precipitato in metanolo ed infine risospeso in un opportuno volume di tampone Laemli.

3.6 Saggio di solubilizzazione mediata dalla temperatura (TSA). Questo saggio è stato adattato dalla metodica riportata da Bett e collaboratori (Bett et al., 2012). Il TH è stato digerito con PK 8 U/ml per 1 h a 37 °C in blanda agitazione (300 rpm). A ciò è seguita l'aggiunta del PMSF alla concentrazione finale di 3,6 mM. Le aliquote sono state mescolate con un ugual volume di tampone di Laemli (concentrazione finale: 1,5% SDS, 5% glicerolo, 1 mM EDTA, 31,25 mM Tris a pH 6,8) e riscaldate a temperature comprese tra 25 °C e 95 °C per 6 minuti in agitazione più sostenuta (1000 rpm).

3.7 Western blot. Tutti i campioni preparati sono stati mescolati con una soluzione di colorante/ β -mercaptoetanololo 8% e successivamente separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 13% o al 15%, a diverso potere risolutivo a seconda delle singole esigenze sperimentali (Biorad). Le proteine sono state trasferite su membrane di fluoruro di polivinilidene (PVDF) (Immobilon P™, Millipore), per 2h a 65 V a freddo, bloccate in 10% latte scremato/tampone TBS-Tween a 37°C per 1h e incubate overnight a 4 °C con l'opportuno anticorpo primario. Dopo 4 lavaggi in TBS-Tween da 10 minuti ciascuno, è avvenuta l'incubazione in anticorpo secondario per 1 ora a temperatura ambiente. Sono seguiti ulteriori 4 lavaggi da 10 minuti ciascuno in TBS-Tween; successivamente l'immunoreattività è stata visualizzata con il substrato chemiluminescente HRP (Immobilon Western, Millipore) e il segnale visualizzato mediante un sistema di acquisizione digitale (LAS-3000, Fujifilm). L'analisi

densitometrica è stata effettuata mediante il software Aida Image Analyzer v.4.15 (Raytest).

3.8 **Interpolazione delle curve.** La digestione con PK a concentrazioni crescenti, come pure la solubilizzazione a temperature crescenti, monitorate mediante Western blot, hanno permesso di costruire dei grafici che riportano in ascissa la concentrazione di PK o la temperatura utilizzata, e in ordinata la percentuale di segnale rilevabile, rispetto al campione digerito con la concentrazione di PK più bassa o scaldato alla temperatura più alta. Da ciascun grafico sono state interpolate l'ED₅₀ (ovvero la concentrazione di PK in grado di digerire il 50% della PrP^{Sc}) e la T₅₀ (ovvero la temperatura in grado di solubilizzare il 50% della PrP^{Sc}).

3.9 **Statistica.** Per l'analisi statistica è stato utilizzato il Software SigmaPlot 12.0. Per individuare le differenze statisticamente significative tra due gruppi è stato utilizzato il test *t* di Student, mentre per il confronto di più gruppi è stata impiegata l'ANOVA (*ANalysis Of VAriance*).

RISULTATI

1. TIPIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLA CJD

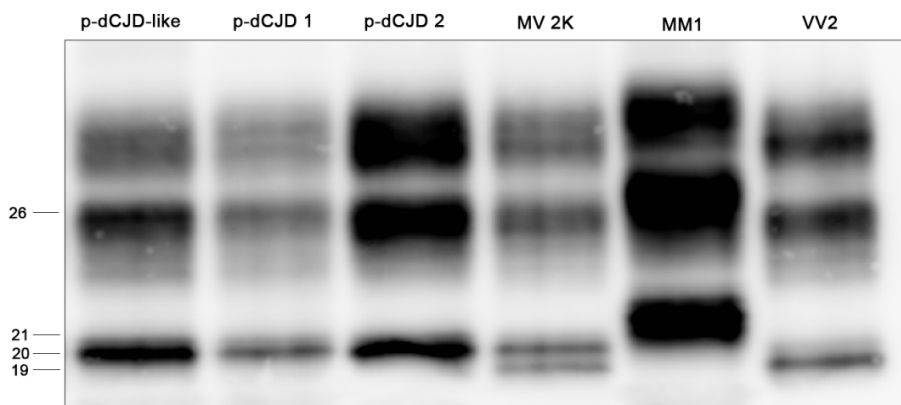


Figura 16: Western blot della PrP^{Sc} associata al fenotipo p-dCJD e simili (MMiK), a confronto con la PrP^{Sc} tipo 1 (21 kDa, sCJDMM1), tipo 2 (19 kDa, sCJDVV2) e il doppietto 20+19 kDa (sCJDMV 2K). La membrana è stata incubata con l'anticorpo primario 3F4. Sulla sinistra sono riportati i pesi molecolari delle diverse bande, espressi in kDa.

- 1.1 **Fenotipo p-dCJD (MMiK).** I casi di p-dCJD omozigoti MM al codone 129 sono stati analizzati mediante digestione proteolitica e Western blot per la caratterizzazione del frammento principale di PrP^{Sc}. Tutti hanno dimostrato la presenza di un frammento intermedio tra il tipo 1 e il tipo 2, del peso molecolare di circa 20 kDa (fig. 16). Tale frammento, già riportato in letteratura, è stato rinvenuto anche nel tessuto cerebrale derivato da un paziente sottoposto a intervento neurochirurgico diverso dal trapianto di dura madre e in quello prelevato da un soggetto la cui professione era neurochirurgo. In aggiunta alla tipizzazione biochimica, il gruppo del prof. Kitamoto della Tohoku University di Sendai ha effettuato esperimenti di trasmissione a topi transgenici per il gene *PRNP* umano (recanti il genotipo 129MM, MV o VV), i quali hanno evidenziato modalità di trasmissione del tutto identiche fra i casi di p-dCJD e i due casi MM con PrP^{Sc} intermedia di 20 kDa non derivati da trapianto di dura madre. Pertanto questi due casi, ai quali in precedenza era stata diagnosticata una forma sporadica, sono stati assimilati completamente al fenotipo p-dCJD, finora rinvenuto solo in pazienti con storia clinica di trapianto di dura madre. A sua volta questo fenotipo (denominato MMiK) è

derivato dal ceppo V2 adattato in soggetti con genotipo 129MM, come dimostrato da trasmissioni sperimentali precedenti.

1.2 **Termosolubilità nella sCJD e nella vCJD.** Il saggio di solubilizzazione mediato dalla temperatura (*TSA, temperature solubility assay*) è un sistema innovativo, finora sperimentato solo su alcuni ceppi prionici adattati al topo, per misurare la stabilità conformazionale della PrP^{Sc} (Bett et al., 2012). Questa metodica, in breve, consiste nell'esposizione a temperature crescenti, in presenza di SDS, di diverse aliquote di un campione di PrP^{Sc} estratta da tessuto cerebrale dopo digestione proteolitica. In seguito a questo trattamento, si effettua un Western blot in condizioni non denaturanti, ovvero senza bollitura del campione. Il riscaldamento è in grado di produrre una parziale solubilizzazione degli aggregati di PrP^{Sc}, che aumenta all'aumentare della temperatura. La PrP^{Sc} liberata sotto forma monomerica dagli aggregati preesistenti può attraversare le maglie del gel di poliacrilamide ed essere così visualizzata in Western blot. L'intensità del segnale osservato è proporzionale alla quantità di PrP^{Sc} rilasciata in forma monomerica alle varie temperature.

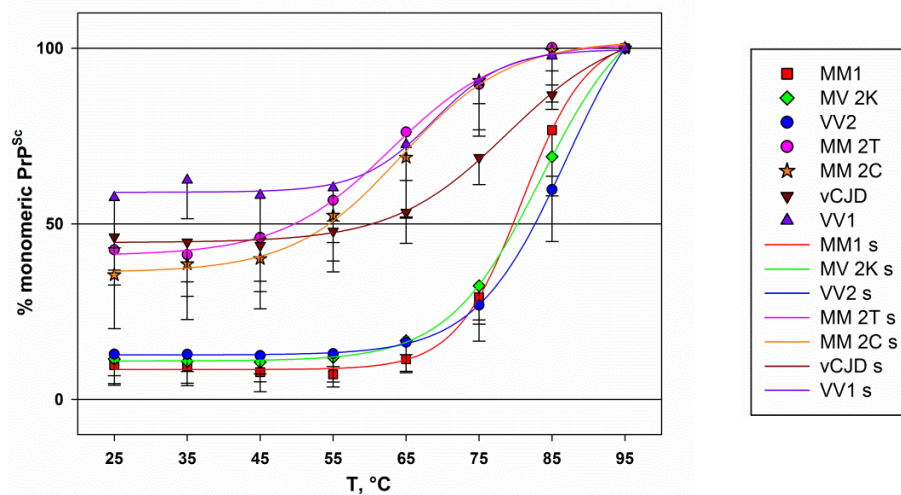


Figura 17: grafico dell'andamento delle curve di termosolubilità ottenute per ciascuna variante della sCJD e per la vCJD. s = sigmoide interpolante i dati sperimentali, espressi come media \pm deviazione standard ($R^2 \geq 0,95$).

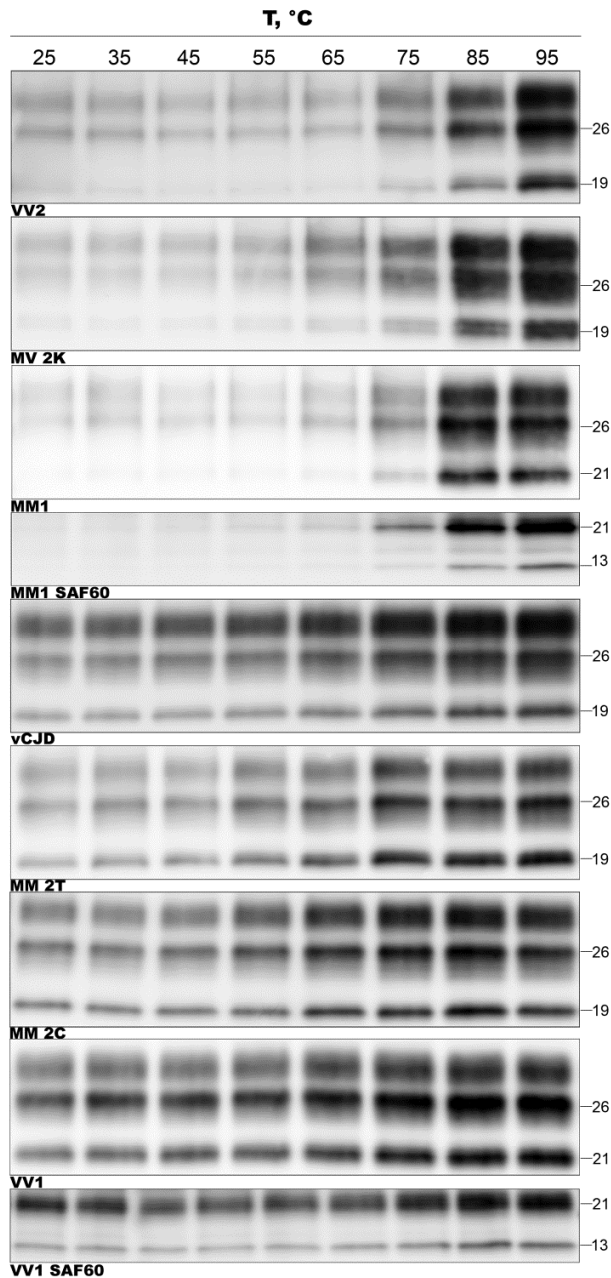


Figura 18: Western blot di monitoraggio del TSA per tutte le varianti di sCJD e per la vCJD. L'incubazione è avvenuta usando 3F4 come anticorpo primario per tutte le varianti, eccetto che per i tipi MM1 e VV1 (per cui l'incubazione è avvenuta anche con l'anticorpo primario SAF60). I pesi molecolari riportati sulla destra sono espressi in kDa.

Le curve di solubilizzazione mediata dal calore, effettuate per ognuna delle 6 varianti della sCJD e per la vCJD, hanno dimostrato un andamento ceppo-specifico (figg. 17-18). In particolare, i tipi MM1-MV 2K-VV2 si sono dimostrati maggiormente resistenti alla denaturazione ($T_{50} \geq 80 \text{ }^\circ\text{C}$), i tipi MM 2C-MM 2T-vCJD si sono dimostrati mediamente resistenti ($55 \text{ }^\circ\text{C} \leq T_{50} \leq 70 \text{ }^\circ\text{C}$), mentre il tipo VV1 si è dimostrato particolarmente sensibile ($T_{50} < 25 \text{ }^\circ\text{C}$) (tab. 4).

Variante CJD	N	T₅₀ (°C)	PrP^{Sc} mon 35 °C (%)	PrP^{Sc} mon 75 °C (%)
sCJDMM1	12	79,84 ± 2,54	8,87 ± 4,96	29,65 ± 7,39
sCJDVV2	12	82,50 ± 3,46	13,08 ± 7,87	28,38 ± 12,90
sCJDMV 2K	10	79,27 ± 3,14	11,29 ± 4,03	32,70 ± 10,29
sCJDMM 2T	4	55,52 ± 7,15	33,56 ± 14,81	91,90 ± 22,48
sCJDMM 2C	7	56,76 ± 7,09	41,64 ± 14,24	91,43 ± 14,65
vCJD	6	66,10 ± 3,69	44,69 ± 11,91	69,68 ± 6,47
sCJDVV1	9	< 25	62,36 ± 11,31	95,45 ± 22,28

Tabella 4: T₅₀, PrP^{Sc} monomerica a 35 °C e PrP^{Sc} monomerica a 75 °C riportate come media ± deviazione standard, calcolate per ciascuna variante della sCJD e per la vCJD. Per la T₅₀ i confronti statisticamente significativi si sono rivelati MM1-VV2-MV 2K vs MM 2T-MM 2C (p<0,001), MM1-VV2-MV 2K vs vCJD (p<0,001) vCJD vs MM 2T (p<0,005). Per la PrP^{Sc} monomerica a 35 °C, i confronti statisticamente significativi individuati sono stati MM1-VV2-MV 2K vs VV1 (p<0,001), MM1-VV2-MV 2K vs MM 2T- MM 2C-vCJD (p<0,001 eccetto VV2 vs MM 2T, per cui p<0,002), MM 2T-MM 2C-vCJD vs VV1 (p<0,001 eccetto VV1 vs vCJD, per cui p<0,005). Per la PrP^{Sc} monomerica a 75 °C sono stati individuati i seguenti confronti statisticamente significativi: MM1-VV2-MV 2K vs vCJD e vs MM 2T-MM 2C-VV1 (p<0,001), vCJD vs MM 2T (p=0,029), vs MM 2C (p<0,005), vs VV1 (p=0,016).

Inoltre, il monitoraggio del TSA in Western blot con due diversi anticorpi in grado di riconoscere selettivamente il tipo 1 e il tipo 2 della PrP^{Sc} in tessuto cerebrale affetto dal fenotipo misto MM1+2C (rispettivamente 12B2 e T2) ha evidenziato un andamento sovrapponibile a quello osservato per i fenotipi puri (figg.19-20, tab.5).

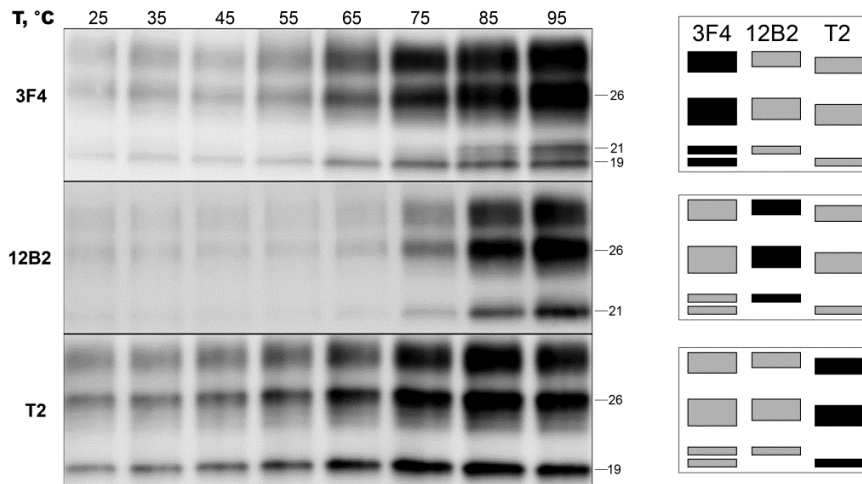


Figura 19: Western blot dopo TSA in campioni da tipi misti sCJDMM1+2C, incubati con 3F4, 12B2 e T2. Il profilo elettroforetico proprio di tipi misti 1+2, ottenuti con ciascun anticorpo, è riportato nella parte destra della figura.

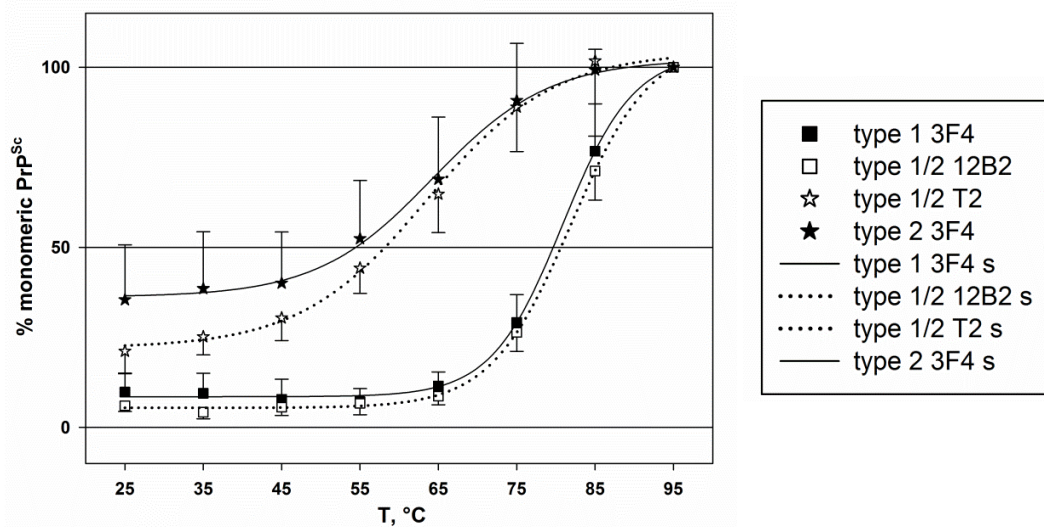


Figura 20: grafico delle curve di termosolubilità ottenute con 12B2 (selettivo per il tipo 1) e con il T2 (selettivo per il tipo 2) in campioni da tipo misto sCJDMM1+2C, a confronto con i rispettivi tipi puri (MM1 e MM 2C) sviluppati con 3F4. s = curva sigmoide interpolante i dati sperimentali, espressa come media \pm deviazione standard ($R^2 \geq 0,95$).

Variante sCJD	anticorpo	N	T ₅₀ (°C)	PrP ^{Sc} mon 35 °C (%)	PrP ^{Sc} mon 75 °C (%)
MM1	3F4	12	79,84 ± 2,54	8,87 ± 4,96	29,65 ± 7,39
MM1+2C	12B2		80,37 ± 1,50	4,51 ± 1,81	26,13 ± 4,74
MM 2C	3F4	7	56,76 ± 7,09	41,64 ± 14,24	91,43 ± 14,65
MM1+2C	T2		59,91 ± 3,26	24,84 ± 4,60	87,52 ± 11,56

Tabella 5: T₅₀, PrP^{Sc} monomerica a 35 °C e PrP^{Sc} monomerica a 75 °C riportate come media ± deviazione standard, calcolate per i tipi puri sCJDMM1 e MM 2C (incubazione con 3F4) a confronto con il tipo misto MM1+2C (incubazione con 12B2 per rilevare il tipo 1 e con T2 per il tipo 2). Per la T₅₀, i confronti tipo 1 (3F4-12B2) vs tipo 2 (3F4-12B2) si sono dimostrati statisticamente significativi (p<0,001); per la PrP^{Sc} monomerica a 35 °C, i confronti tipo 1 (3F4-12B2) vs tipo 2 (3F4-12B2) si sono dimostrati statisticamente significativi (p<0,005) eccetto tipo 1 (3F4) vs tipo 2 (T2), non significativo; per la PrP^{Sc} monomerica a 75 °C i confronti tipo 1 (3F4-12B2) vs tipo 2 (3F4-T2) si sono dimostrati statisticamente significativi (p<0,001).

2. TIPIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLE EST ANIMALI

2.1 **Premessa.** Il tessuto cerebrale affetto dalle diverse EST animali si è rivelato generalmente di scarsa qualità, probabilmente dovuta al lungo periodo post-mortem precedente il campionamento, che ne ha condizionato significativamente la conservazione ottimale a livello molecolare. In alcuni casi le quantità di tessuto sono state abbondanti, in altri scarse. La quantità di PrP^{Sc} estratta dai singoli campioni è risultata molto oscillante (in alcuni casi soddisfacente, in altri talmente bassa da risultare non apprezzabile con le metodiche utilizzate). Per questi motivi, alcuni dei campioni non sono stati inclusi in nessuna delle analisi; altri, invece, sono stati inclusi solo in alcune di esse.

2.2 **Frammenti di PrP^{Sc} osservati.** La migrazione elettroforetica del campione dopo digestione proteolitica è avvenuta in gel al 15%, per permettere una migliore risoluzione dei frammenti a basso peso molecolare (≤ 20 kDa), sull'omogenato totale in LB100 a pH 6,9, ovvero le condizioni utilizzate in precedenza presso il Laboratorio di Neuropatologia per la caratterizzazione dei frammenti di PrP^{Sc} nelle varianti della sCJD (Notari et al., 2004). I migliori anticorpi nel pannello di quelli a disposizione si sono rivelati Sha31 (145-152) per i frammenti principali, all'intorno dei 20 kDa, e SAF60 (157-161) per i frammenti C-terminali (CTF14). La determinazione del peso molecolare dei frammenti principali di PrP^{Sc} si è rivelata particolarmente difficoltosa, a causa della scarsa quantità di proteina in diversi casi unita, a volte, alla scarsa nitidezza del segnale. Per meglio risolvere il segnale, si è ricorsi anche alla deglicosilazione del campione.

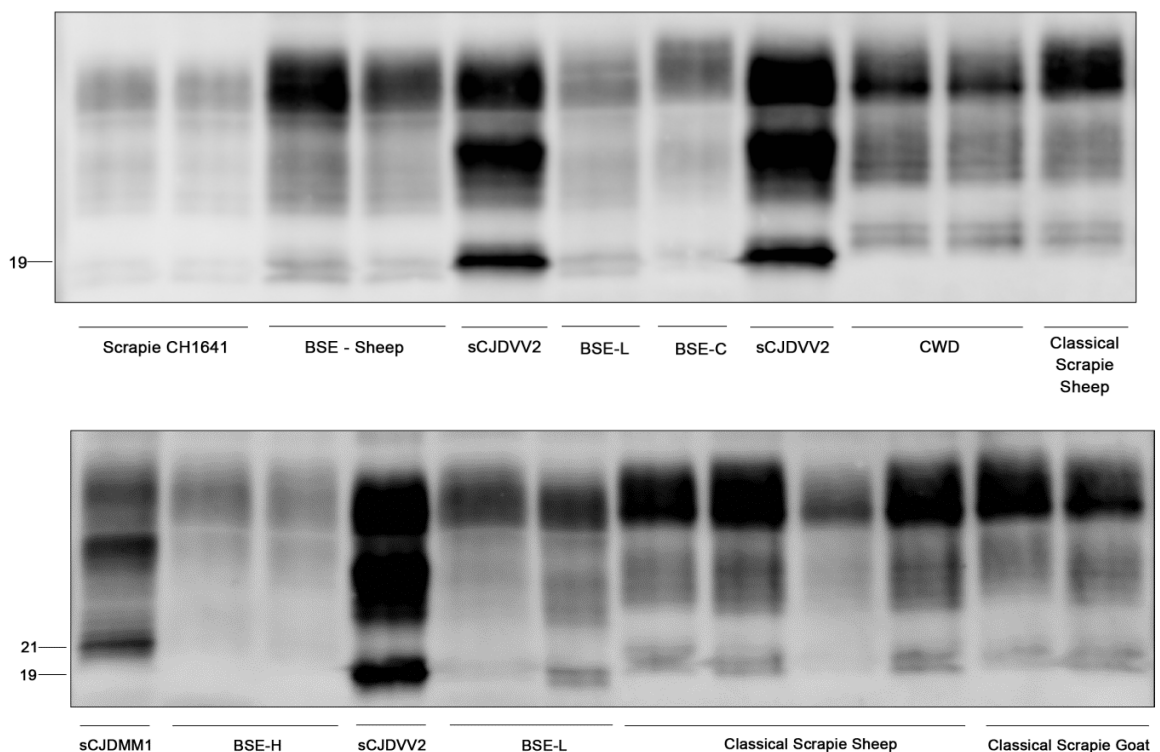


Figura 21: Western blot di campioni (non deglicosilati) rappresentativi delle EST animali comprese in questo studio, a confronto con i principali fenotipi della sCJD (MM1 e VV2). Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario Sha31. I pesi molecolari sono espressi in kDa.

Ad ogni modo, si è riusciti a stabilire che in tutti i ceppi di EST animali analizzati, la lunghezza del frammento principale di PrP^{Sc} è compresa fra il tipo 1 e il tipo 2 umano, con tre importanti eccezioni: BSE-H (>21 kDa) e Scrapie CH1641/BSE ovina (<19 kDa). La CWD, lo Scrapie classico sia nelle pecore che nelle capre e la BSE-C presentano un frammento di dimensioni inferiori al tipo 2, mentre la BSE-L mostra una PrP^{Sc} delle stesse dimensioni del tipo 2 umano. A volte, i frammenti si presentano come doppietti (figg 21-22).

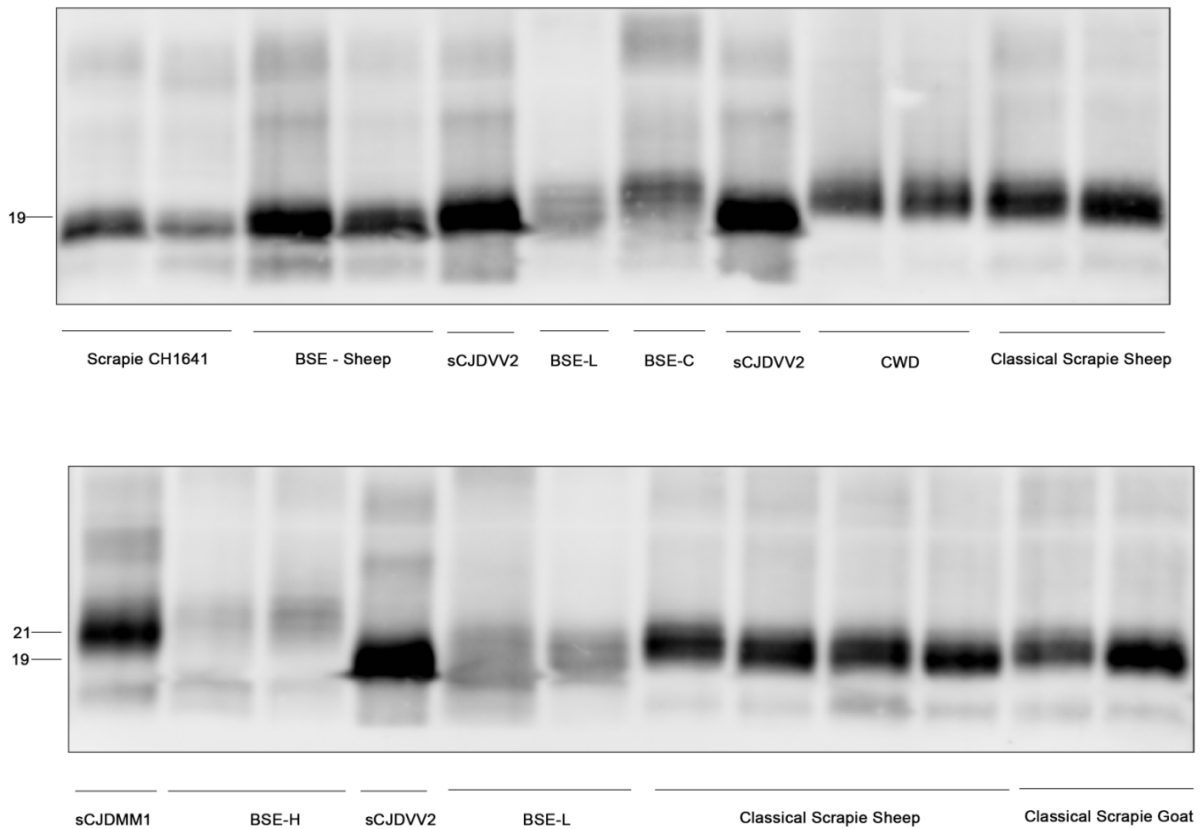


Figura 22: Western blot di campioni (deglicosilati) rappresentativi delle EST animali comprese in questo studio, a confronto con i principali fenotipi della sCJD (MM1 e VV2). Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario Sha31. I pesi molecolari sono espressi in kDa.

Una caratterizzazione più fine, usando come metro di paragone la PrP^{Sc} 20 kDa associata al fenotipo MMiK umano descritto in precedenza, ha evidenziato come CWD e BSE-C producono una PrP^{Sc} di peso molecolare appena superiore ($\approx 20,5$ kDa), mentre la PrP^{Sc} derivata dallo Scrapie classico nella pecora sembra migrare appena un po' più in basso ($\approx 19,5$ kDa) e quella derivata dallo Scrapie classico della capra circa alla stessa altezza (≈ 20 kDa) (fig. 23).

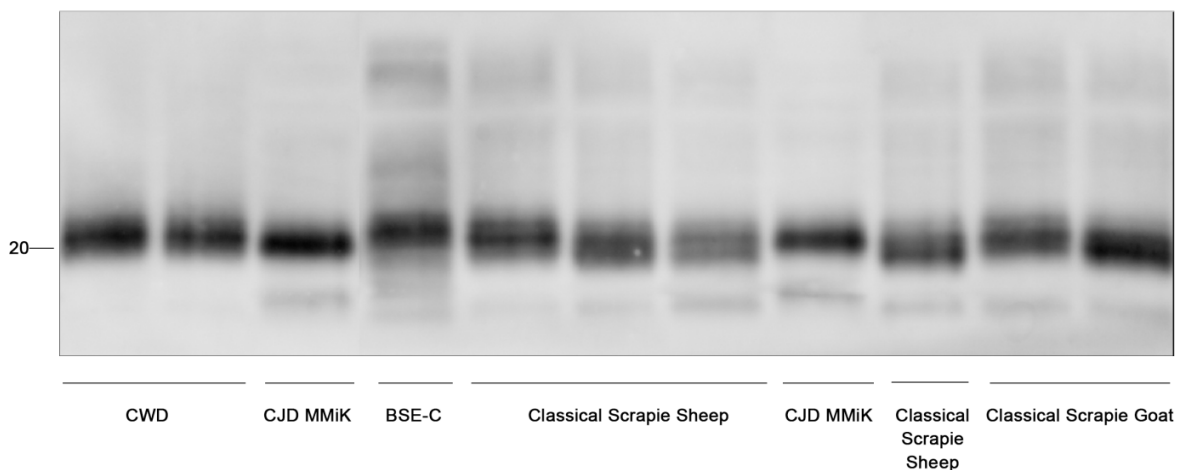


Figura 23: Western blot di campioni (deglicosilati) rappresentativi delle EST animali comprese in questo studio, a confronto con il frammento di PrP^{Sc} 20 kDa (MMiK). Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario Sha 31. I pesi molecolari sono espressi in kDa.

I frammenti C-terminali, del peso molecolare di circa 13-14 kDa (per confronto con il CTF13 umano), sono stati rilevati in quantità abbondante nei campioni di BSE-H e Scrapie CH1641, in tracce nei campioni di Scrapie classico (pecora e capra) e BSE ovino e per nulla in CWD, BSE-C e BSE-L (fig. 24). La quantificazione dei frammenti C-terminali è stata effettuata con maggiore precisione nei campioni purificati (P3) dopo deglicosilazione, che hanno permesso una più nitida visualizzazione del segnale. Le quantità del frammento C-terminale presenti nel purificato sono generalmente aumentate rispetto a quelle rinvenute nell'omogenato, probabilmente a causa del trattamento sperimentale (ultracentrifuga e successiva sonicazione), ma restano invariate le differenze tra i ceppi (tab. 6, fig. 25).

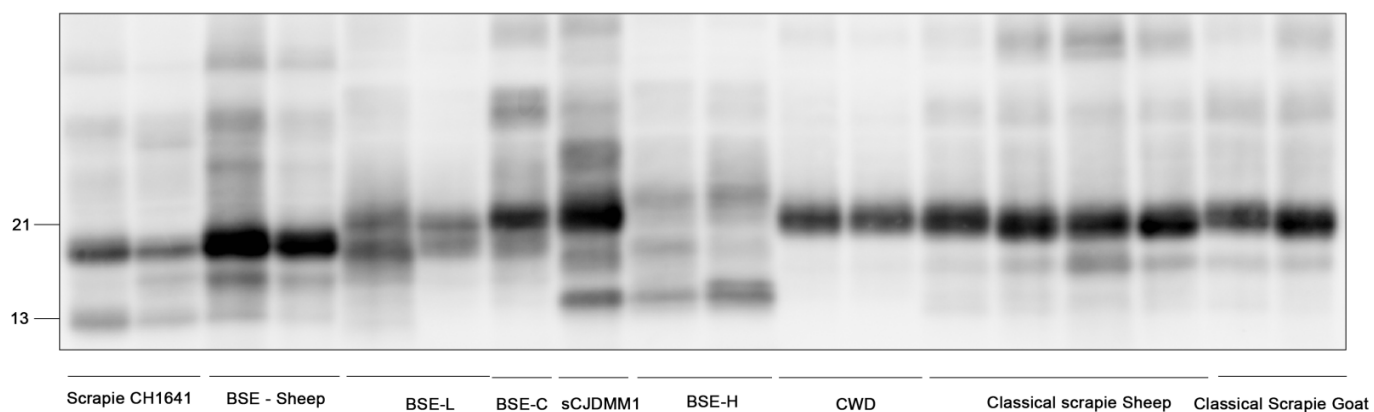


Figura 24: Western blot di campioni (deglicosilati) rappresentativi delle EST animali comprese in questo studio, per la rivelazione del frammento C-terminale di 14 kDa. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario SAF60. I pesi molecolari sono espressi in kDa.

Specie	ceppo	N	≈ 19-21 kDa (%)	≈ 13-14 kDa (%)
bovino	BSE-L	2	79,81 ± 0,48	20,19 ± 0,48
bovino	BSE-H	2	33,01 ± 1,13	66,97 ± 1,17
bovino	BSE-C	1	85,37	14,59
pecora	BSE-C	3	68,73 ± 4,32	31,30 ± 4,35
pecora	Scrapie classico	4	80,81 ± 8,45	19,26 ± 8,53
capra	Scrapie classico	3	71,38 ± 12,35	28,62 ± 12,35
pecora	Scrapie CH1641	2	47,39 ± 5,37	52,61 ± 5,37
cervo/alce	CWD	5	85,99 ± 9,17	14,00 ± 9,19

Tabella 6: ripartizione percentuale del frammento principale di PrP^{Sc} (19-21 kDa) e del frammento C-terminale (13-14 kDa) nelle diverse EST animali analizzate in questo studio, calcolate sul campione purificato (P3).

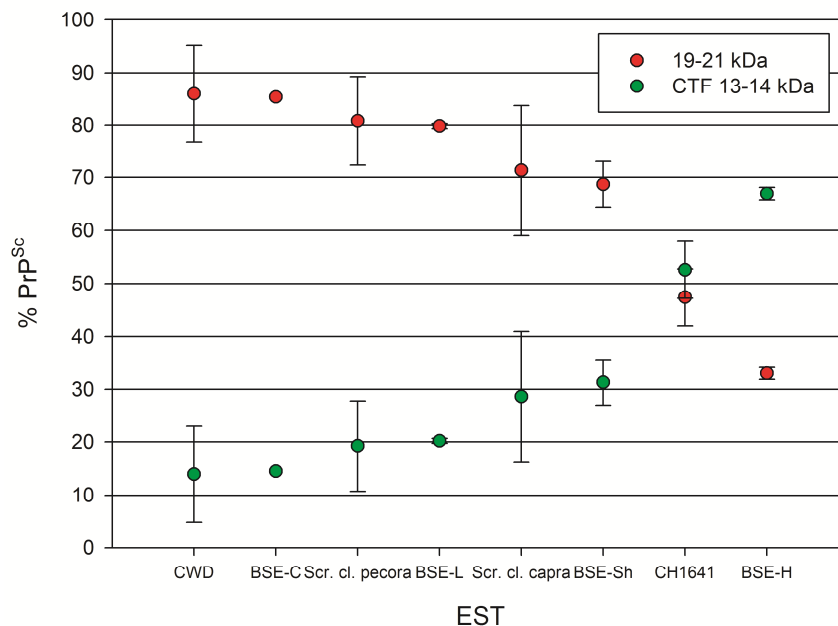


Figura 25: grafico riportante la distribuzione percentuale dei due tipi di frammenti di PrP^{Sc} osservati nelle EST animali analizzate.

2.3 Rapporto tra le glicoforme. Come già riportato in letteratura, in tutte le EST animali la PrP^{Sc} si presenta con netta prevalenza della banda diglicosilata ($\geq 50\%$) rispetto alla monoglicosilata, contrariamente a quanto avviene nella CJD sporadica (in cui predomina la forma monoglicosilata). L'unico ceppo che fa eccezione sembra essere la BSE-L, in cui la forma diglicosilata ($\approx 40\%$) e quella monoglicosilata ($\approx 35\%$) sono all'incirca equivalenti. Nella CWD, seppure la PrP^{Sc} diglicosilata sia comunque quella più abbondante, lo stacco è meno netto rispetto alle altre EST. La trasmissione della BSE-C all'uomo, osservata nella variante vCJD, modifica drasticamente il rapporto tra le glicoforme in favore della PrP^{Sc} diglicosilata, rispetto alla sCJD. Nella specie ovina, sebbene la differenza non sia così marcata come per la vCJD rispetto alla sCJD, i rapporti tra le glicoforme della PrP^{Sc} associata al ceppo BSE-C presentano valori molto simili a quelli originali (bovino) e abbastanza discordanti rispetto a quanto osservato per lo Scrapie classico, anche se non per lo Scrapie CH1641 (tab. 7 e fig. 26).

Specie	ceppo	N	D (%)	M (%)	U (%)
bovino	BSE-L	2	40,75 ± 2,09	35,94 ± 0,24	23,31 ± 1,85
bovino	BSE-H	2	61,19 ± 6,17	30,91 ± 3,55	7,90 ± 4,07
bovino	BSE-C	1	65,03	26,84	8,13
pecora	BSE-C	3	66,83 ± 4,58	25,83 ± 2,43	7,34 ± 2,22
pecora	Scrapie classico	4	54,49 ± 8,36	31,60 ± 2,89	13,91 ± 5,93
capra	Scrapie classico	3	52,53 ± 5,41	35,49 ± 2,10	11,97 ± 3,56
pecora	Scrapie CH1641	2	69,12 ± 0,43	25,58 ± 0,92	5,28 ± 0,48
cervo/alce	CWD	5	47,18 ± 0,82	36,71 ± 1,08	16,11 ± 1,90

Tabella 7: ripartizione percentuale (rispetto al totale) delle tre glicofornie della PrP^{Sc} nelle diverse EST animali analizzate in questo studio, calcolata sul campione purificato (P3).

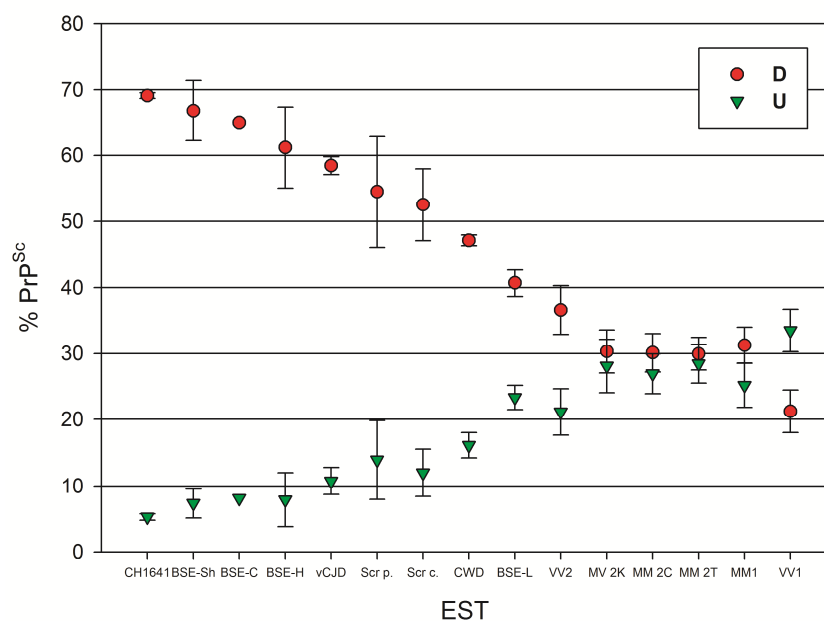


Figura 26: grafico riportante la distribuzione percentuale della forma diglicosilata (D) e di quella non diglicosilata (U) della PrP^{Sc} sul totale delle tre glicofornie, nelle diverse EST animali analizzate in questo studio a confronto con la sCJD e la vCJD (Scr p. = Scrapie classico della pecora; Scr c. = Scrapie classico della capra).

2.4 **Resistenza alla PK.** Le curve di resistenza sono state realizzate sul campione purificato a contenuto proteico totale fisso (150 µg/ml), risospeso in buffer a pH 7,4 e usando per la rivelazione in Western blot l'anticorpo SAF60, mantenendo quindi inalterate le condizioni usate in precedenza per lo screening dei ceppi di sCJD e vCJD (Saverioni et al., JBC 2013). Le concentrazioni di PK utilizzate sono state talvolta drasticamente variate per misurare al meglio l'ampio spettro di resistenza osservato (circa 4 ordini di grandezza). Il confronto dell'ED₅₀ ha evidenziato che tutti i ceppi associati alle EST animali dimostrano maggiore resistenza alla PK rispetto a quelli umani, ad eccezione di BSE-H, BSE-L e CWD, che si collocano nel range della CJD. BSE-C è di gran lunga il ceppo più resistente fra quelli testati (ED₅₀ > 166,5 U/ml), BSE-H si colloca all'altro estremo (ED₅₀ < 0,1), appena più resistente del ceppo sCJDVV1, il più sensibile in assoluto (tab. 8, figg. 27-28). Per quanto riguarda i tre ceppi di BSE, si osserva la minima resistenza in BSE-H, una resistenza intermedia in BSE-L e la massima resistenza in BSE-C. Da notare che il ceppo BSE-C negli altri ospiti (uomo, pecora) non raggiunge i valori tipici osservati nel bovino, ma la resistenza alla PK è aumentata rispetto a quanto rilevato per le EST più diffuse in quella specie (CJD, Scrapie). I valori di ED₅₀ presentano tuttavia una variabilità molto alta a causa della scarsa numerosità del campione, pertanto non sono da considerarsi conclusivi.

Specie	ceppo	N	ED₅₀ (U/ml)
bovino	BSE-L	2	0,874 ± 1,077
bovino	BSE-H	2	0,051 ± 0,072
bovino	BSE-C	1	>166,700
pecora	BSE-C	3	30,818 ± 26,67
pecora	Scrapie classico	4	14,316 ± 10,866
capra	Scrapie classico	3	12,390 ± 9,528
pecora	Scrapie CH1641	2	10,200 ± 9,045
cervo/alce	CWD	4	0,554 ± 0,416

Tabella 8. Valori di ED₅₀, espressi come media ± deviazione standard, calcolati per ognuna delle EST analizzate in questo studio.

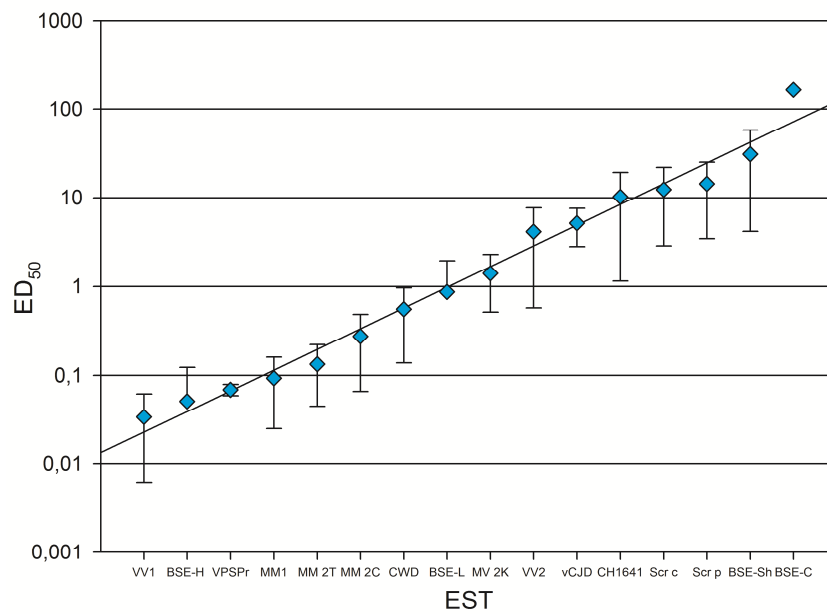


Figura 27: grafico riportante il confronto dell'ED₅₀ per tutte le EST animali analizzate in questo studio con la sCJD e la vCJD (Scr p. = Scrapie classico della pecora; Scr c. = Scrapie classico della capra).

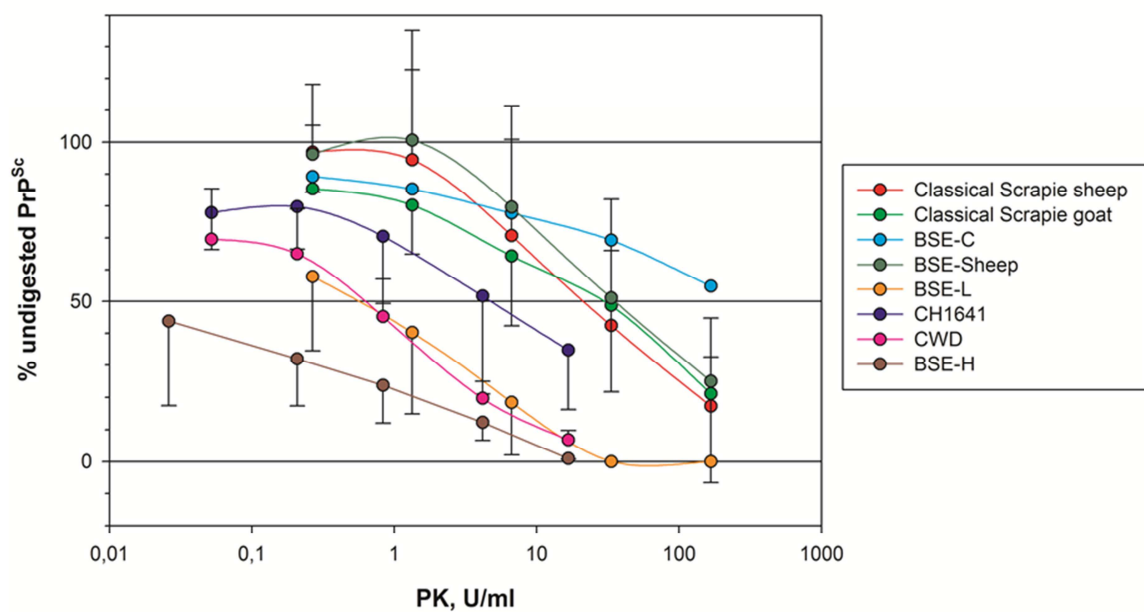


Figura 28: curve di digestione relative a ciascuna EST oggetto di questo studio. Il range delle quantità di PK è stato regolato a seconda della resistenza di ciascun gruppo.

2.5 **Termosolubilità.** Le curve derivate dal trattamento a diverse temperature sono state ottenute sull'omogenato totale alle medesime condizioni impiegate per i campioni di tessuto umano. I grafici delle curve che riportano i valori di PrP^{Sc} monomerica osservata in funzione della temperatura mostrano anch'essi un andamento ceppo-specifico, così come osservato per la CJD umana. Anche in questo caso si possono distinguere ceppi resistenti (BSE-C, in cui $T_{50} \geq 80$ °C), ceppi intermedi (Scrapie classico, BSE ovina e BSE-L, in cui $T_{50} \approx 70$ °C) e ceppi sensibili (CWD e Scrapie CH1641, in cui $T_{50} \leq 25$ °C) (fig. 29, tab. 9). Al contrario della resistenza alla PK, la misura della termosolubilità fornisce valori perfettamente sovrapponibili allo spettro determinato per la CJD. Va notato che il ceppo BSE-C, a seconda dell'ospite in cui si riproduce, può variare la sua termosolubilità (massima nel bovino, intermedia nella pecora e nell'uomo). Alcuni dei campioni testati in altre analisi sono stati esclusi da questa, in quanto il segnale non era quantificabile. In particolare, non è stato possibile procedere all'analisi dei campioni di BSE-H, a causa della scarsissima qualità del segnale ottenuto.

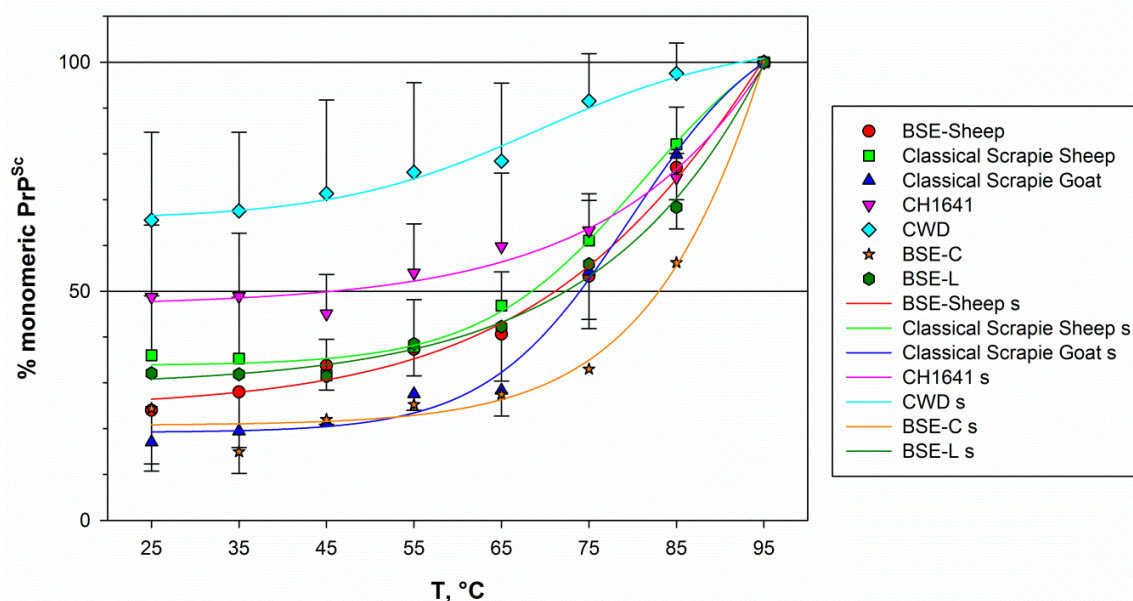


Figura 29: grafico dell'andamento delle curve di termosolubilità ottenute per ciascuna EST animale analizzata. s = sigmoide interpolante i dati sperimentali, espressi come media \pm deviazione standard ($R^2 \geq 0,95$).

EST (specie)	N	T ₅₀ (°C)	PrP ^{Sc} mon 35 °C (%)	PrP ^{Sc} mon 75 °C (%)
BSE-C (pecora)	3	71,82 ± 8,66	27,99 ± 12,15	53,25 ± 11,45
Scrapie classico (pecora)	4	71,06 ± 2,61	35,28 ± 13,41	61,05 ± 8,80
Scrapie classico (capra)	2	73,95 ± 4,78	19,44 ± 9,21	54,34 ± 10,50
CH1641 (pecora)	3	≈ 25	48,92 ± 13,79	63,23 ± 8,07
CWD (cervo, alce)	6	< 25	67,55 ± 17,13	91,51 ± 10,33
BSE-C (bovino)	1	83,02	14,96	56,24
BSE-L (bovino)	1	72,35	31,88	55,93

Tabella 9 T₅₀, PrP^{Sc} monomerica a 35 °C e PrP^{Sc} monomerica a 75 °C riportate come media ± deviazione standard, calcolate per ciascuna delle EST animali analizzate in questo studio.

3. TIPIZZAZIONE BIOCHIMICA DEI BANK VOLES

3.1 **Premessa: tipizzazione biochimica effettuata da ISS.** Il gruppo del dott. Romolo Nonno dell'ISS ha classificato, in base all'analisi biochimica di tutti gli animali inoculati con tutti i ceppi della sCJD, i tipi molecolari risultanti dalle trasmissioni in Bv109M.

- Tipo A: è caratterizzato da un frammento principale di PrP^{Sc} di circa 19 kDa, positivo con tutti gli anticorpi del pannello riportato in fig. 15, e da due frammenti secondari, uno C-terminale di 14 kDa (14K, riconosciuto con SAF84), ed un frammento interno tronco sia al C-terminale che all'N-terminale di circa 8 kDa (8K, riconosciuto da 9A2 e 12B2).
- Tipo A⁺: è molto simile al tipo A, per la presenza dei frammenti 14K e 8K, ma il frammento principale è caratterizzato da un peso molecolare leggermente superiore a 19 kDa e soprattutto dalla forte presenza di un frammento di accompagnamento a peso molecolare circa 2 kDa inferiore, ma con ugual reattività ai diversi anticorpi, tentativamente identificato come PrP^{Sc} priva dell'ancora GPI. Tale tipo molecolare si associa a due caratteristiche: la quantità molto elevata di

segnale complessivo (molto superiore a tutti gli altri tipi) e la presenza di placche amiloidi.

- Tipo C: è caratterizzato dalla presenza del solo frammento principale di PrP^{Sc}, con peso molecolare inferiore al tipo A. La banda non glicosilata è molto ampia e spesso appare come doppietto (con SAF84 e Sha31), mentre la parte più bassa della banda non è riconosciuta da 9A2 e 12B2. Talvolta si può osservare una piccola variabilità di peso molecolare apparente e di rapporto tra anticorpi C- ed N-terminali tra gli individui, che si accompagna ad alcune caratteristiche patologiche. In particolare, i campioni con PrP^{Sc} a peso molecolare relativamente inferiore (C*) tendono ad avere poche lesioni nelle aree corticali ed ippocampali, nonché grandi vacuoli talamici; al contrario, quelli con PrP^{Sc} a peso molecolare maggiore (C**) tendono ad avere un forte coinvolgimento corticale.
- Tipo E: è caratterizzato dalla presenza di un frammento principale di circa 17 kDa, poco o nulla riconosciuto dal 12B2, che può apparire in forma di doppietto con Sha31; il frammento principale è accompagnato da frammenti secondari 14K e 7K (negativo al 12B2).

Tutti gli animali inoculati con MM/MV1 e VV1 hanno mostrato il tipo A, evidenziando quindi una convergenza in bank vole di ceppi che nell'ospite naturale (uomo) si sono rivelati distinti. Tutti e solo gli animali inoculati con MM 2T hanno mostrato il tipo E, evidenziando la piena corrispondenza del ceppo E=MM 2T. Gli animali inoculati con MM/MV 2C hanno mostrato il tipo C (C* o C**), così come alcuni animali inoculati con MV 2K e VV2. In alcuni casi, l'inoculo MV 2K in Bv109M ha prodotto il tipo A e l'inoculo VV2 il tipo A⁺. Quindi per gli inoculi MM 2C/MV 2K/VV2 non c'è perfetta corrispondenza tra ceppo originale e tipo molecolare osservato in bank vole. In base a questi dati, i campioni analizzati in questo studio si possono riclassificare come in tabella 10.

Inoculo	Numero di casi	Tipo molecolare
MM1/MV1	3	A
VV1	9	A
MM 2T	6	E
MM 2C	6	C**
MV 2K	2	C*
VV2	7	C*
	2	A ⁺

Tabella 10: classificazione dei campioni di tessuto da trasmissioni di sCJD in Bv109M in base al tipo molecolare.

3.2 **Frammenti di PrP^{Sc} osservati.** Anche in questo caso, l'analisi è stata svolta sull'omogenato totale in LB100 a pH 6,9, in gel di acrilamide al 15% usando gli anticorpi Sha31 (frammento principale) e SAF60 (frammento C-terminale 13-14 kDa). Per quanto riguarda il frammento principale, la PrP^{Sc} degli animali infettati con tutti gli inoculi riproduce piuttosto fedelmente la dicotomia tipo 1/tipo 2 osservata negli inoculi originali, con la particolarità che tutti i frammenti originati hanno un peso molecolare leggermente superiore rispetto a quelli da cui sono derivati (fig. 30). Quindi gli animali infettati con le varianti umane associate al tipo 1 mostrano un frammento a peso molecolare leggermente maggiore del tipo 1, mentre quelli infettati con le varianti associate al tipo 2 mostrano un frammento intermedio fra il tipo 1 e il tipo 2 umano, eccetto il tipo E (da MM 2T), che sembra migrare alla stessa altezza della PrP^{Sc} tipo 2. Tuttavia la PrP^{Sc} prodotta in seguito a infezione con VV1 è indistinguibile rispetto a quella originata dopo infezione con MM1, mentre così non è negli inoculi originali, in quanto la prima produce un doppietto di cui la banda inferiore migra in posizione appena un po' più bassa del tipo 1 (visibile in gel ad alta risoluzione). Nel tipo A⁺ derivato da VV2, il frammento principale di PrP^{Sc} è in effetti composto da un doppietto di cui la banda superiore si presenta dello stesso peso molecolare del tipo 1 (21 kDa), mentre la banda inferiore è assimilabile al peso molecolare del tipo 2 (19 kDa). Ciò è maggiormente evidente nel campione deglicosilato (fig. 31).

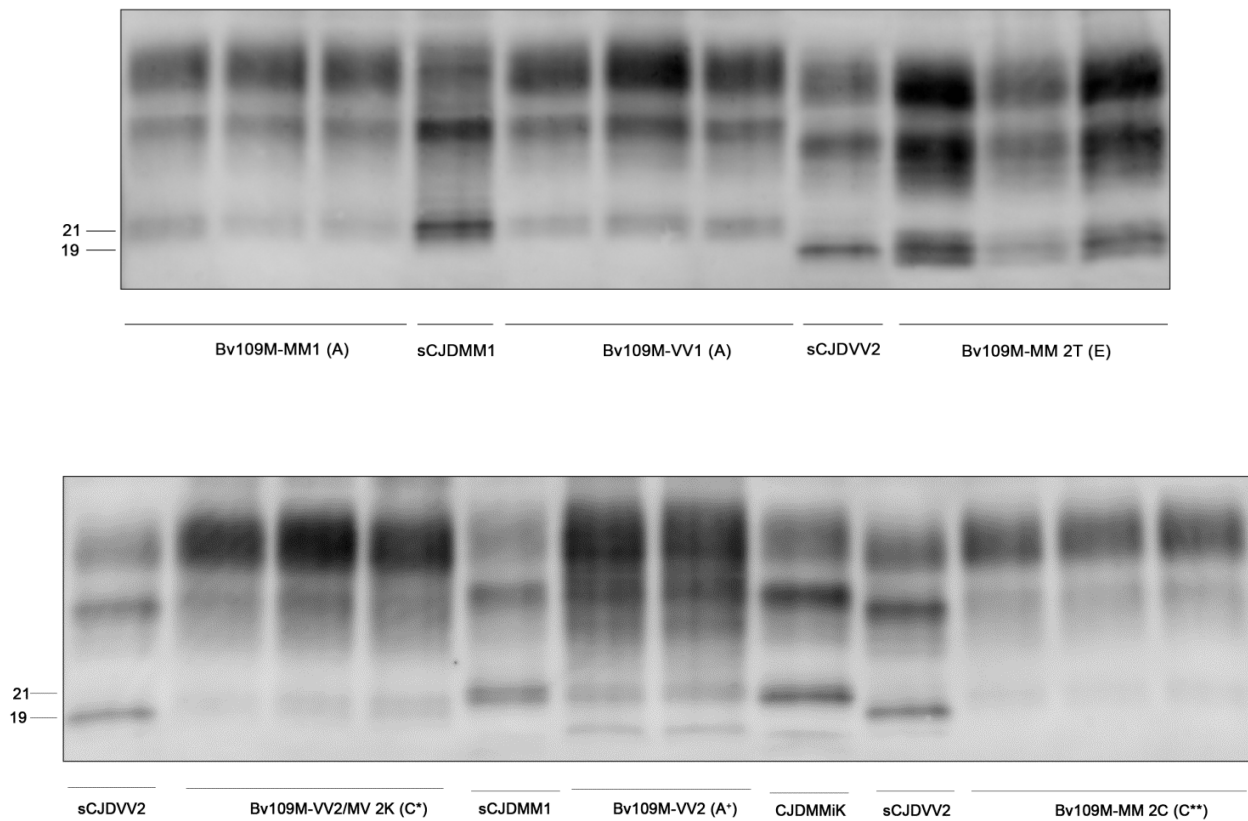


Figura 30: profilo elettroforetico della PrP^{Sc} derivata da tessuto cerebrale di bank voles (Bv109M) infettati con i diversi tipi della sCJD (campioni non deglicosilati). Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario Sha 31. I pesi molecolari sono espressi in kDa.

La ricerca del frammento C-terminale all'intorno dei 13-14 kDa ha dimostrato ancora una volta piena correlazione con quanto atteso in base agli inoculi originali, ovvero presenza del CTF13 nel tessuto cerebrale infettato con le varianti associate al tipo 1 e assenza in quello infettato con le varianti associate al tipo 2, eccetto che per la variante MM 2T che infatti si associa al CTF13 anche nell'uomo. Anche in questo caso, il tipo A⁺ sembra fare eccezione, in quanto è quello in cui il frammento C-terminale di 13-14 kDa è più abbondante, contrariamente a quanto avviene nell'inoculo originale (sCJDVV2) in cui non è presente affatto (fig. 31, tab.11).

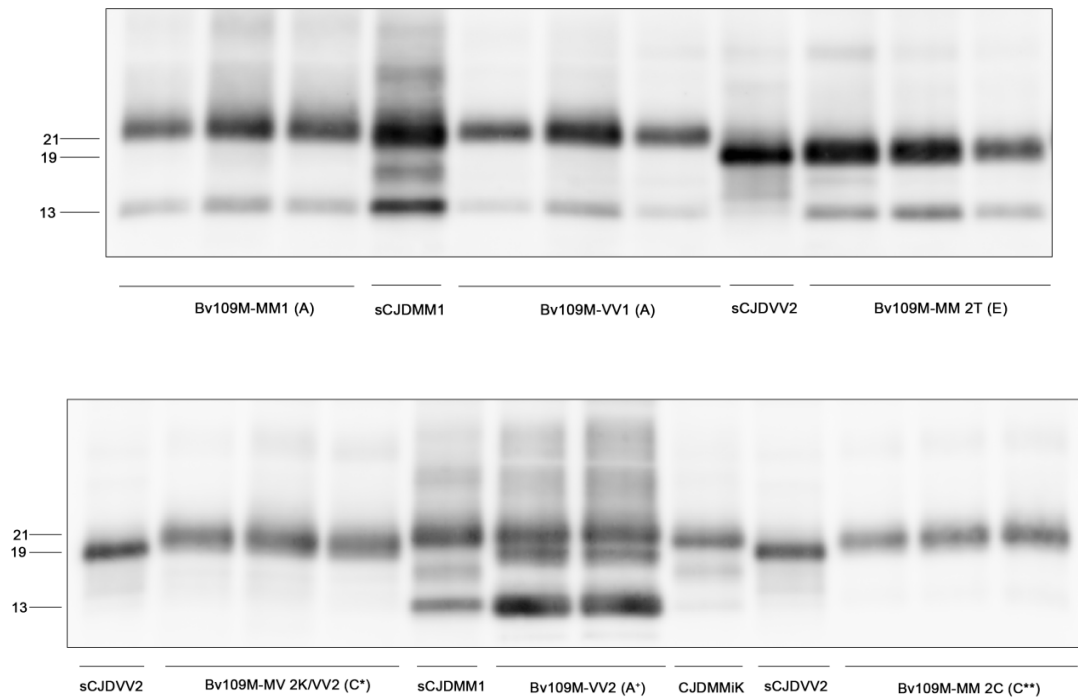


Figura 31: profilo elettroforetico della PrP^{Sc} derivata da tessuto cerebrale di bank voles infettati con i diversi tipi di sCJD, comprensivo del frammento C-terminale di 13-14 kDa, così come appare dopo deglicosilazione. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario SAF60. I pesi molecolari sono espressi in kDa.

Inoculo	Tipo molecolare	N	≈ 19-21 kDa (%)	≈ 13-14 kDa (%)
MM 2T	E	6	85,64 ± 5,34	14,36 ± 5,34
MM1	A	3	82,28 ± 1,58	17,72 ± 1,58
VV1	A	9	87,96 ± 3,95	12,04 ± 3,95
MV 2K/VV2	C*	9	100	0
MM 2C	C**	6	100	0
VV2	A ⁺	2	52,46 ± 2,23	47,54 ± 2,23

Tabella 11: ripartizione percentuale del frammento principale di PrP^{Sc} (19-21 kDa) e del frammento C-terminale (13-14 kDa) nei diversi tipi molecolari ottenuti da Bv109M dopo trasmissione di tutti i tipi di sCJD.

3.3 **Rapporto tra le gliciforme.** Anche questa analisi è stata condotta sull'omogenato totale (TH) a pH 6,9. La PrP^{Sc} derivata dall'infezione sperimentale dei bank voles mostra in generale una prevalenza della forma diglicosilata in tutti gli animali inoculati rispetto alla sCJD nell'uomo, che come detto si associa a una preponderanza della forma monoglicosilata. Tuttavia è possibile osservare una prevalenza della banda diglicosilata ancora maggiore nei campioni inoculati con VV2/MV 2K e MM 2C rispetto agli altri animali, quindi nel tipo molecolare C (C* e C**), mentre nel tipo E (derivato da MM 2T) le due isoforme glicosilate tendono a distribuirsi equamente (tab. 12).

Inoculo	Tipo molecolare	N	D (%)	M (%)	U (%)
MM 2T	E	6	43,87 ± 2,74	40,41 ± 1,15	15,16 ± 2,60
MM1	A	3	57,32 ± 0,72	32,22 ± 1,99	10,07 ± 2,05
VV1	A	9	54,00 ± 2,43	34,16 ± 2,22	11,00 ± 1,40
MV 2K/VV2	C*	9	69,09 ± 1,27	27,11 ± 1,16	2,96 ± 0,83
MM 2C	C**	6	68,74 ± 1,72	24,76 ± 2,10	3,17 ± 0,58
VV2	A ⁺	2	52,53 ± 3,67	41,67 ± 1,85	4,27 ± 1,12

Tabella 12: ripartizione percentuale (rispetto al totale) delle tre gliciforme della PrP^{Sc} nei diversi tipi molecolari ottenuti da Bv109M dopo trasmissione di tutti i tipi di sCJD.

3.4 **Resistenza alla PK.** Per i campioni di bank voles, le curve di resistenza sono state realizzate sull'omogenato totale, per impossibilità di procedere alla purificazione della PrP^{Sc} a causa del basso quantitativo di tessuto disponibile. Per ovviare alla elevata resistenza alla PK osservata nella PrP^{Sc} derivata da bank vole (molto superiore a quella dimostrata dalla PrP^{Sc} estratta da tessuto umano), il TH è stato omogenato in LB100 a pH 8 (pH ottimale di lavoro della PK) anziché 6,9 e la digestione proteolitica è avvenuta a 55 °C anziché 37 °C. Anche in questo caso, l'anticorpo usato per la rivelazione in Western blot è stato il SAF60, tuttavia non è stato possibile procedere a un confronto diretto con la PrP^{Sc} ottenuta da tessuto umano a causa delle diverse condizioni sperimentali usate. Il campione analizzato è stato un subset di quello totale,

in quanto il tessuto disponibile è stato spesso sufficiente per un solo test biochimico tra resistenza alla PK e TSA. Il profilo ottenuto dalle curve di digestione ha evidenziato differenze degne di nota fra gli animali infettati con i diversi inoculi, che ricalcano piuttosto fedelmente, anche questa volta, l'andamento osservato nella CJD umana (Saverioni et al., JBC 2013). I campioni derivati da infezione con MM 2T (tipo E) si sono dimostrati i più sensibili all'azione della PK; seguono i campioni appartenenti al tipo A (inoculi MM/MV1 e VV1), che evidentemente riproducono tutti il grado di resistenza alla PK del ceppo MM/MV1 umano, anch'esso più resistente del ceppo MM 2T in esperimenti condotti sul TH (mentre il ceppo VV1 lo è meno); ancora più resistenti sono i campioni appartenenti al tipo C* (inoculi VV2/MV 2K), in parallelo al ceppo umano VV2/MV 2K, più resistente di MM/MV1; il grado massimo di resistenza è invece associato al tipo C** (inoculo MM 2C), il che costituisce l'unica forte discrepanza con l'inoculo originario, il cui grado di resistenza è compreso tra MV/MM1 e VV2/MV 2K. Il tipo A⁺ mostra un grado di resistenza intermedio tra il tipo C* e il tipo C** (tab. 13, fig. 32).

Inoculo	Tipo molecolare	Numero di casi	ED₅₀
MM 2T	E	3	9,30 ± 2,84
MM/MV1	A	3	20,01 ± 8,73
VV1	A	3	15,65 ± 6,39
MV 2K/VV2	C*	3	28,27 ± 6,51
MM 2C	C**	3	83,86 ± 25,56
VV2	A ⁺	2	35,19 ± 12,65

Tabella 13: ED₅₀, espresso come media ± deviazione standard, calcolato per i diversi tipi molecolari derivanti dalle trasmissioni delle diverse varianti di sCJD in Bv109M. I confronti statisticamente significativi risultano quelli fra il tipo C** e tutti gli altri ($p \leq 0,001$).

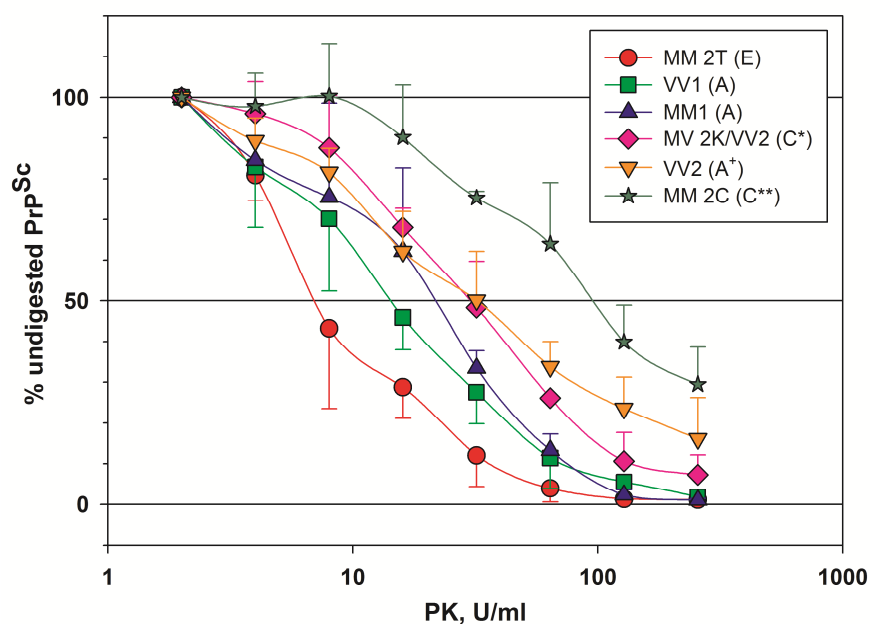


Figura 32: grafico riportante le curve di resistenza alla PK per ogni tipo molecolare ottenuto da bank voles Bv109M dopo trasmissione delle diverse varianti di sCJD.

3.5 **Termosolubilità.** Le curve di termosolubilità ottenute per i diversi tipi molecolari derivati da bank voles Bv109M sono paragonabili a quelle derivate dai ceppi di CJD in quanto le condizioni sperimentali sono rimaste invariate (TH a pH 6,9). Anche in questo caso, i dati prodotti derivano da un subset del campione totale, per scarso quantitativo del tessuto derivante da ogni singolo animale. La T_{50} calcolata per queste curve ricalca in buona parte, ma non completamente, quanto già osservato per la CJD; i tipi molecolari A e C*, derivati da inoculi MM1 e VV2, si comportano come i ceppi umani originali; il tipo molecolare A derivato da inoculo VV1 non rispecchia quanto osservato nel ceppo originale, ma riproduce il grado di termosolubilità proprio del tipo A derivato da inoculo MM1; neanche il tipo molecolare C**, derivato da inoculo MM 2C, si associa ai valori di T_{50} osservati per il ceppo originario, attestandosi sui valori osservati per i tipi A e C*; infine il tipo E, derivato da inoculo MM 2T, si mostra abbastanza fedele a quanto osservato nel ceppo originale, seppur non completamente sovrapponibile. Del tutto diverso dall'inoculo originario (VV2) è invece il tipo A⁺, che

non ricalca nessuno dei precedenti, ma sembrerebbe avvicinarsi al ceppo VV1 umano (particolarmente termosensibile) (tab. 14, fig.33).

Inoculo	Tipo	N	T₅₀ (°C)	PrP^{Sc} mon 35 °C (%)	PrP^{Sc} mon 75 °C (%)
MM 2T	E	3	69,88 ± 7,23	29,17 ± 6,69	56,28 ± 7,57
MM1	A	3	75,53 ± 1,82	16,21 ± 4,15	49,81 ± 3,23
VV1	A	5	78,21 ± 2,46	15,93 ± 8,08	39,42 ± 7,73
VV2	C*	3	78,95 ± 4,75	27,65 ± 6,29	44,51 ± 8,22
MM 2C	C**	3	81,77 ± 1,11	18,62 ± 2,78	34,36 ± 1,24
VV2	A ⁺	2	≈ 25-55	48,33 ± 9,41	100,97 ± 19,46

Tabella 14: T₅₀, PrP^{Sc} monomerica a 35 °C e PrP^{Sc} monomerica a 75 °C riportate come media ± deviazione standard, calcolate per ciascun tipo molecolare derivato da Bv109M inoculati con i diversi ceppi della sCJD. Per la T₅₀, l'unico confronto statisticamente significativo è tra il tipo E e il tipo C** (p < 0,005). Per la PrP^{Sc} monomerica a 35 °C, sono statisticamente significativi i confronti tra il tipo A⁺ e il tipo A, sia derivato da inoculo MM1 che da VV1, nonché tra il tipo A⁺ e il tipo C** (p < 0,004). Per la PrP^{Sc} monomerica a 75 °C, risultano statisticamente significativi i confronti tra il tipo A⁺ e tutti gli altri (p < 0,005).

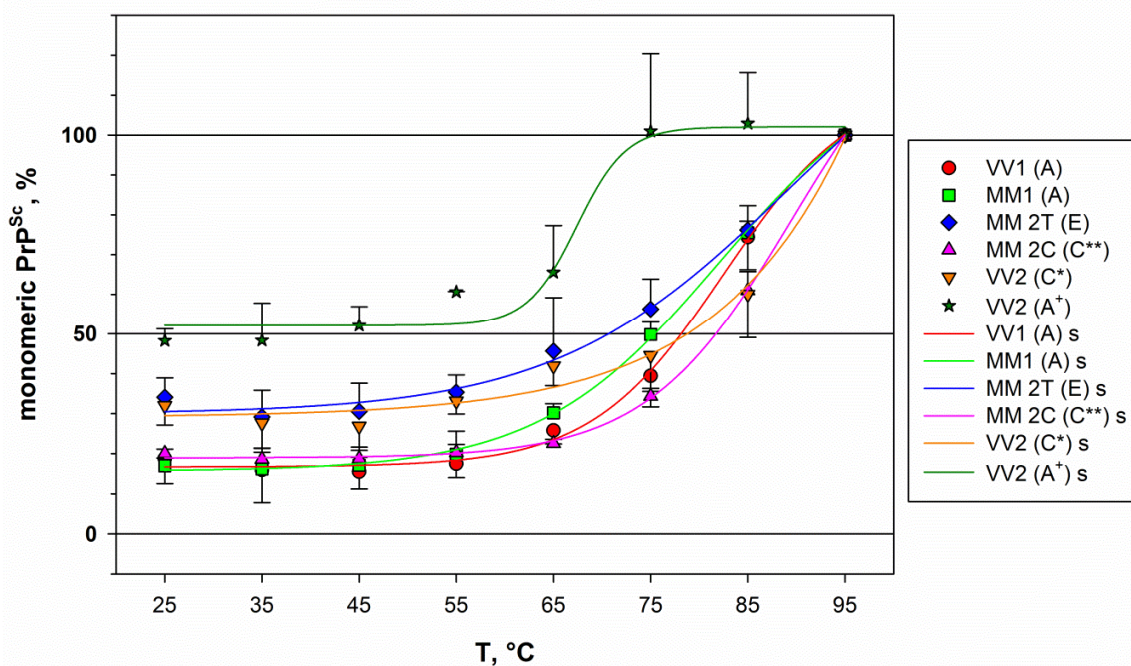


Figura 33: il grafico riporta l'andamento delle curve di termosolubilità osservate nella PrP^{Sc} da campioni di Bv109M, divisi per inoculo e tipo molecolare prodotto. s = sigmoide interpolante i dati ricavati dall'analisi densitometrica dei Western blot, espressi come media \pm deviazione standard ($r^2 \geq 0,95$).

Come si può vedere dal grafico (fig. 33), l'andamento di ogni curva ottenuta dopo TSA, sebbene non combaci perfettamente tra inoculo originale e tipo molecolare prodotto dopo infezione, è riconducibile ad almeno uno dei profili osservati per i ceppi di sCJD. Fa eccezione il ceppo C* (derivato da inoculo VV2), che nella T₅₀ riproduce il ceppo VV2 umano, ma già a temperature molto basse mostra una quantità di PrP^{Sc} in forma monomerica decisamente elevata rispetto all'inoculo da cui è derivato.

DISCUSSIONE

La caratterizzazione biochimica dei ceppi di EST nelle diverse specie animali è di fondamentale importanza per la loro identificazione e classificazione, in alternativa alla trasmissione sperimentale, dispendiosa in termini di tempo e di risorse. Inoltre, essa può individuare fattori molecolari significativi associati alle diverse conformazioni tridimensionali che sembrano costituire le basi molecolari dei ceppi prionici. Numerosi studi hanno correlato una o più proprietà biochimiche della proteina prionica patologica con le caratteristiche proprie del fenotipo clinico-patologico della malattia (tempo di incubazione, sintomatologia, aree cerebrali maggiormente colpite, ecc.), con risultati spesso contrastanti. Ad oggi, le correlazioni più significative e riproducibili tra laboratori tra proprietà biochimiche della PrP^{Sc} e fenotipo clinico-patologico della malattia, che sono alla base di una classificazione molecolare dei sottotipi della malattia, riguardano la CJD sporadica (Parchi et al., 1999, 2009).

Allo scopo di approfondire ulteriormente le conoscenze sulle basi molecolari dei ceppi prionici e i rapporti tra ceppi umani e animali abbiamo (1) applicato nuove metodiche di analisi allo studio delle varianti fenotipiche della sCJD ed (2) esteso le analisi effettuate nella sCJD alle EST naturali di altre specie animali e alle trasmissioni sperimentali della sCJD. A tal fine, la PrP^{Sc} estratta da un totale di quasi 150 campioni di tessuto cerebrale, umano e animale, affetto da malattia naturale o trasmessa sperimentalmente, è stata analizzata per quanto riguarda il profilo di migrazione elettroforetica (frammento principale e frammenti accessori), il rapporto tra le glicofornie, la resistenza alla digestione con PK e la termosolubilità. L'analisi di queste proprietà, già note per la sCJD eccetto la termosolubilità degli aggregati di PrP^{Sc}, ha permesso una miglior caratterizzazione dei ceppi di EST testati rispetto ai dati della letteratura.

L'individuazione di un nuovo raro fenotipo di CJD in pazienti omozigoti metionina al codone 129 del gene *PRNP*, ad eziologia quasi certamente acquisita, ha ampliato lo spettro fenotipico di questa patologia, che sebbene rara comprende almeno 7 varianti con tratti distintivi. Questo nuovo fenotipo, in particolare, deriva dall'adattamento del ceppo V2 in ospiti 129MM ed ha come caratteristica distintiva il frammento di PrP^{Sc} intermedio di 20

kDa e le placche amiloidi di tipo kuru, da cui la denominazione MMiK, in analogia alla terminologia utilizzata per la sCJD (K sta per placche kuru). Il riconoscimento dei tratti fenotipici distintivi e i risultati della trasmissioni sperimentali, effettuate dal gruppo del prof. Kitamoto presso la Tohoku University a Sendai in collaborazione con il nostro gruppo, hanno dimostrato che questo fenotipo non è limitato ai pazienti che hanno subito un trapianto di dura madre; lo abbiamo, infatti, riscontrato in almeno due individui che non avevano mai subito tale trattamento ma che erano comunque stati verosimilmente esposti all'agente (uno era stato sottoposto a trattamento neurochirurgico mentre l'altro esercitava la professione di neurochirurgo). Va sottolineato che questo fenotipo non è mai stato a tutt'oggi riscontrato tra i casi classificati come sporadici, sebbene derivi dal ceppo V2 che è il secondo più diffuso nella forma sporadica. La caratterizzazione biochimica della PrP^{Sc} associata alla variante MMiK mediante il confronto con i due fenotipi sporadici che derivano dal ceppo V2 (sCJDMV 2K e VV2) è ancora in corso. Tale caratterizzazione aiuterà a comprendere meglio l'influenza del genotipo dell'ospite sulle caratteristiche biochimiche della PrP^{Sc} e su come questa possa influenzare il fenotipo clinico-patologico.

Il saggio della termosolubilità è una metodica relativamente nuova che è stata utilizzata per lo studio di ceppi prionici adattati al topo (Bett et al., 2012) ma mai testata sui ceppi prionici umani e su quelli associati alle principali EST naturali animali. Nella CJD, la maggiore termosensibilità correla significativamente con la maggiore durata e la minore frequenza della malattia e con la minore invasività (misurata in termini di *attack rate* e tempo di incubazione) dopo trasmissione sperimentale. Questo risultato è in accordo con quanto osservato nei ceppi prionici di scrapie adattati all'hamster, dove una maggiore stabilità conformazionale correla con una maggiore invasività (Ayers et al., 2011, Gonzalez-Montalban et al., 2011), ma non in quelli adattati al topo, in cui è stato osservato il contrario (Bett et al., 2012). Inoltre, la termosolubilità non sembra mostrare alcuna correlazione con la resistenza alla PK: infatti, le varianti di CJD associate a una minore resistenza alla PK sono drasticamente diverse tra loro in quanto a termosolubilità (vedi sCJDVV1 e MM1). (tab. 15).

Variante CJD	ceppo	Incidenza (% sul totale dei casi di sCJD)	Durata media di malattia (mesi)	Attack rate (%)	Tempo di incubazione (giorni)	T ₅₀ (°C)	ED ₅₀ (U/ml)
VV2	V2	15	6.3	100	274 ± 4 302 ± 9	82.05 ± 3.70	4.137 ± 3.562
MV 2K		8		100	288 ± 3 329 ± 3	79.48 ± 3.63	1.407 ± 0.892
MM1	M1	40	4.0	100	446 ± 3 467 ± 24	79.66 ± 2.32	0.093 ± 0.068
vCJD	BSE	rara	14	83 100	540 ± 41 668 ± 22	65.26 ± 3.19	5.192 ± 2.378
MM 2T	M 2T	1	15.5	93	535 ± 32	59.41 ± 6.04	0.134 ± 0.089
VV1	V1	1	15.3	50	568 ± 0	< 25	0.034 ± 0.028
MM 2C	M 2C	1	20.0	0	-	57.11 ± 5.96	0.276 ± 0.210

Tabella 15. Confronto tra dati clinici ed epidemiologici, risultati delle trasmissioni sperimentali e proprietà biochimiche della PrP^{Sc} nei diversi ceppi della sCJD e nella vCJD. I dati riportati nella terza colonna sono ricavati da Parchi et al., 2009, eccetto che per la vCJD (Diack et al., 2014). I dati riportati nella quarta colonna sono ricavati da Parchi et al., 2009; la durata di malattia del ceppo V2 è quella relativa alla variante VV2, cioè nel genotipo più favorevole alla replicazione del ceppo. I dati riportati nella quarta e nella quinta colonna si riferiscono a trasmissioni sperimentali in topi transgenici per il *PRNP* umano, espresso a livelli normali (Kobayashi et al., 2010, Bishop et al., 2010, Moda et al., 2011, Kobayashi et al., 2013, Takeuchi et al., 2013, Kobayashi et al., 2015). I dati riportati nella quinta colonna sono relativi a questo studio e quelli riportati nella sesta sono ricavati da Saverioni et al., 2013.

I risultati di un nostro recente studio (Saverioni et al., 2013) avevano suggerito una interessante correlazione fra la presenza del CTF13, la percentuale relativa della PrP^{Sc} in forma glicosilata e la resistenza alla digestione con PK. Tra le varianti sporadiche la preponderanza di forme glicosilate ha i valori più bassi nei VV1 e va crescendo, nell'ordine, in MM1, MM 2T, MM 2C, MV 2K e VV2, fino a diventare massima nella vCJD. Allo stesso modo la quantità di CTF13 diminuisce e la resistenza alla PK aumenta seguendo lo stesso ordine. Nel presente studio abbiamo esteso queste analisi alle altre EST naturali e alle trasmissioni sperimentali in bank voles, confermando solo in parte questo tipo di correlazione. Per quanto riguarda la glicosilazione e la resistenza alla PK la correlazione si è dimostrata nel complesso significativa, in quanto quasi tutte le EST animali naturali e le varianti sCJD dopo trasmissione al bank vole mostrano aumento della glicosilazione che va di pari passo con un aumento della resistenza alla PK. Ci sono, tuttavia, alcune eccezioni:

1. la BSE-H è associata a una PrP^{Sc} altamente glicosilata nonostante mostri una bassa resistenza alla PK e un'abbondanza di frammento CTF13-14; questa combinazione di fattori è unica nel panorama delle EST naturali, in quanto per tutte le altre, la maggior glicosilazione si accompagna sempre ad una riduzione del peso molecolare del frammento di PrP^{Sc} e/o a una riduzione della quantità del CTF13-14;
2. nei bank voles inoculati con le diverse varianti della sCJD, la PrP^{Sc} è decisamente più glicosilata e più resistente alla PK rispetto alla PrP^{Sc} dell'inoculo umano. Tuttavia, tale correlazione non è sempre evidente all'interno delle diverse varianti di PrP^{Sc} individuate nei bank voles (il tipo A⁺ è meno glicosilato di C* e C** ma mostra resistenza alla PK intermedia tra i due).

Anche la correlazione fra abbondanza del CTF13-14 e resistenza alla PK presenta qualche significativa eccezione:

1. tra le EST animali, i due ceppi con maggiore abbondanza di CTF13-14, la BSE-H e lo scrapie CH1641, mostrano una significativa divergenza nella resistenza alla PK (il primo è molto più sensibile del secondo); va notato però che questi due ceppi mostrano la maggior differenza di peso molecolare nel frammento principale di PrP^{Sc} (la maggiore in

assoluto fra tutte le EST, in quanto nel primo caso il p. m. è superiore a 21 kDa, mentre nel secondo esso è inferiore a 19 kDa).

2. La BSE ovina presenta quantità rilevabili del CTF13-14, anche se inferiori rispetto alle EST discusse in precedenza, nonostante sia associata ad una notevole resistenza alla digestione con PK. Anche in questo caso tuttavia il frammento principale di PrP^{Sc} ha un peso molecolare inferiore a 19 kDa.
3. Tra i gruppi di bank voles inoculati con i diversi ceppi di sCJD, il tipo A⁺, che è quello con maggiore abbondanza del CTF13-14, presenta una elevata resistenza alla PK. Tuttavia anche in questo caso, oltre all'abbondante glicosilazione, va segnalata la presenza di un doppietto con frammento dal peso molecolare assimilabile al tipo 2.
 - a. Da queste osservazioni sembra che la resistenza alla PK e l'abbondanza del CTF13-14 siano determinati dalla combinazione di:
 - b. glicosilazione
 - c. lunghezza del frammento principale di PrP^{Sc}

Lo scrapie CH1641 e la BSE ovina risultano simili per molte delle caratteristiche discusse in precedenza: nei due ceppi la PrP^{Sc} mostra lo stesso rapporto tra le glicoforme, il CTF13-14 è presente in entrambi (anche se si osserva prevalentemente nel primo) e la resistenza alla PK è abbastanza paragonabile (anche se maggiore nel secondo). I nostri dati indicano che il TSA è il metodo più efficace per distinguere le due forme; infatti, mentre la BSE ovina si è rivelata piuttosto termoresistente ($T_{50} > 70$ °C), lo scrapie CH1641 è decisamente più sensibile ($T_{50} \approx 25$ °C). Date le note difficoltà nel distinguere i due ceppi a livello molecolare, questa metodica biochimica può costituire un'alternativa semplice ed efficace alla laboriosa trasmissione sperimentale (Jeffrey et al., 2006) per l'identificazione di questi due ceppi.

La termosensibilità sembra la proprietà biochimica tra quelle analizzate che meno risente della variabilità determinata dalle differenze di specie, sebbene correlazione con l'invasività del ceppo e l'incidenza di malattia sia più difficile per le EST animali, in quanto manca una raccolta sistematica di dati in questo senso. Tuttavia, non è un caso che la BSE-

C, probabilmente la EST in grado di propagarsi più facilmente fra le diverse specie, sia associata ad un'elevata termoresistenza della PrP^{Sc}. Analogamente, lo scrapie nella sua forma classica, abbondantemente diffuso fra gli ovini e i caprini di ogni parte del mondo, presenta valori medio-alti di termoresistenza. La CWD e lo scrapie CH1641, invece, decisamente meno diffusi, si sono dimostrati ceppi più termosensibili.

Per i tre ceppi di BSE i nostri dati confermano quelli già riportati in letteratura sulla glicosilazione e la resistenza alla PK. La maggior presenza di PrP^{Sc} glicosilata si riscontra in BSE-C e BSE-H, mentre BSE-L presenta un profilo in cui le due bande glicosilate tendono a distribuirsi equamente (Priemer et al., 2013). La maggior resistenza alla PK è osservata in BSE-C, mentre BSE-L presenta una resistenza intermedia e BSE-H è il ceppo più sensibile alla PK (Priemer et al., 2013, Masujin et al., 2008).

Il confronto degli inoculi di sCJD nel loro ospite naturale e dopo trasmissione al bank vole ha prodotto risultati significativi ai fini della comprensione dell'influenza dell'ospite nella determinazione delle caratteristiche del ceppo. In generale, i tipi molecolari prodotti dai bank voles tendono a riprodurre le differenze osservabili nelle varianti della CJD, pur mostrando anche caratteristiche evidentemente impresse dell'ospite. Infatti, il frammento principale della PrP^{Sc} mantiene la distinzione tra inoculi di tipo 1 e 2, ma shifta di circa 0,5-1 kDa verso l'alto in quasi tutti i casi. La presenza del CTF13-14, quando si osserva, appare quantitativamente ridotta rispetto alla corrispondente variante umana, eccetto che nel tipo E, prodotto da MM 2T. La glicosilazione è generalmente aumentata in tutti gli animali analizzati, ma con differenze tipo-specifiche in larga misura riconducibili al ceppo di partenza, così come la resistenza alla PK. L'unica proprietà che sembra mantenersi costante rispetto agli inoculi originali è, anche in questo caso, la termosolubilità. Fanno eccezione gli animali inoculati con MM 2C, che non riescono a riprodurre il ceppo originale, ma danno origine a un tipo molecolare ibrido con caratteristiche che in parte rispecchiano quelle derivate dall'inoculo VV2, in parte nuove, e gli animali inoculati con VV2 che danno luogo al tipo A⁺, dalle caratteristiche così peculiari da non riflettere nessuno dei ceppi umani originali. A questo proposito è degno di nota il fatto che il ceppo MM 2C, a differenza degli altri ceppi, non si propaga nei topi transgenici che esprimono livelli fisiologici di PrP^C (Bishop et al., 2010, Moda et al., 2011, Kobayashi et al., 2015,

Kobayashi et al., 2016). Pertanto sembra verosimile ipotizzare che la conformazione tridimensionale della PrP^{Sc} associata a questa variante sia difficile da replicare, mentre nel bank vole, particolarmente permissivo all'infezione da prione, questo ceppo converte comunque la PrP^C, ma in maniera non fedele all'originale. Inoltre, il tipo A⁺ ricorda per alcuni aspetti (presenza del doppietto di PrP^{Sc}, presenza di placche kuru) il fenotipo umano MMiK (originato dalla propagazione del V2 nel genotipo umano 129-MM). Poiché la caratterizzazione biochimica del tipo MMiK non è ancora ultimata, resta tutta da confermare l'identità MMiK = A⁺.

Un altro studio, effettuato in precedenza nel nostro laboratorio, ha messo in correlazione alcune proprietà biochimiche della PrP^{Sc} ottenuta dopo trasmissione sperimentale della sCJD a primati non umani di varie specie con quelle proprie degli inoculi originali. In queste scimmie sono stati individuati essenzialmente due pattern: il primo, denominato *a*, caratterizzato da un frammento di 21 kDa e una predominanza della PrP^{Sc} diglicosilata, osservato dopo inoculo con sCJDMM1, sCJDMM1+2, fCJD E200K e iCJDMM1; il secondo, denominato *b*, caratterizzato da un doppietto 21/20 kDa in corrispondenza del frammento principale di PrP^{Sc} e da una predominanza della forma monoglicosilata, osservato dopo inoculo con sCJD MV 2K, VV2, kuru e iCJDMMiK (Parchi et al., 2010). Anche in questo caso, dunque, si può ipotizzare un'azione del ceppo prionico su una base determinata dall'ospite, sebbene qui lo shift rispetto all'inoculo originale appaia più complesso di quanto osservato nel bank vole.

Anche il ceppo BSE-C è stato studiato in ospiti diversi (bovino, uomo, pecora). Dai dati raccolti sembra evidente come questo ceppo sia quello maggiormente in grado di indurre caratteristiche quali la glicosilazione e la resistenza alla PK indipendentemente dall'ospite. La capacità di produrre il CTF13-14, invece, appare ospite-specifica: il frammento è, infatti, assente nell'uomo e nel bovino, ma parzialmente presente nella pecora. Analogamente, anche il frammento principale di PrP^{Sc} non è riprodotto in maniera fedele in tutti gli ospiti.

In conclusione, i risultati di questo studio identificano alcune regole generali riguardo alle proprietà biochimiche della PrP^{Sc} nei ceppi prionici. In particolare, la variabilità determinata dall'ospite sia nella stessa specie che soprattutto tra specie diverse, è in grado

di modulare, almeno in parte, tutte le proprietà biochimiche da noi analizzate. Tra queste, la meno influenzabile, sembra essere la termosolubilità. Verosimilmente, quindi, ciascun ceppo è in grado di adattare più o meno efficacemente la PrP^C dell'ospite alla sua conformazione (la BSE-C sembra essere il ceppo più efficace nel riprodurre le sue caratteristiche nell'ospite). Il processo di conversione sarà tanto più efficace quanto più il ceppo infettante riuscirà a modificare i vincoli strutturali incontrati nella molecola da convertire.

In base ai risultati ottenuti è stato possibile tracciare un profilo biochimico distintivo della PrP^{Sc} di 11 ceppi prionici analizzati in 6 specie diverse. L'estensione delle osservazioni dalla CJD sporadica alle EST animali naturali più note e alle trasmissioni sperimentali di CJD nei bank voles ha consentito di allargare la gamma delle combinazioni possibili delle quattro proprietà biochimiche considerate in questo studio ben oltre quelle già note nella sCJD, dimostrando quindi che i pattern riconosciuti in quest'ultima non sono certo esaustivi. In particolare, sembra che la glicosilazione, determinata dall'ospite ma anche influenzata dal ceppo, sia la proprietà biochimica che maggiormente determina la resistenza alla PK, sebbene questa sia anche influenzata da altri fattori molecolari (lunghezza del frammento principale di PrP^{Sc} e presenza del CTF13-14).

BIBLIOGRAFIA

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967; 214:764-6.

Ayers JI, Schutt CR, Shikiya RA, Aguzzi A, Kincaid AE, Bartz JC. The strain-encoded relationship between PrP replication, stability and processing in neurons is predictive of the incubation period of disease. *PLoS Pathog.* 2011; 7:e1001317.

Balkema-Buschmann A1, Ziegler U, McIntyre L, Keller M, Hoffmann C, Rogers R, Hills B, Groschup MH. Experimental challenge of cattle with German atypical bovine spongiform encephalopathy (BSE) isolates. *J Toxicol Environ Health A* 2011; 74:103-9.

Baron T, Biacabe AG. Molecular behaviors of "CH1641-like" sheep scrapie isolates in ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *J Virol.* 2007; 81:7230-7.

Baron T, Vulin J, Biacabe AG, Lakhdar L, Verchere J, Torres JM, Bencsik A. Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice. *PLoS One* 2011; 6:e15839.

Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* 1995; 76:509-17.

Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 1994; 68:7859-68.

Bett C, Joshi-Barr S, Lucero M, Trejo M, Liberski P, Kelly JW, Masliah E, Sigurdson CJ. Biochemical properties of highly neuroinvasive prion strains. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1002522.

Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* 2004; 5:110-5.

Biacabe AG, Jacobs JG, Bencsik A, Langeveld JP, Baron TG. H-type bovine spongiform encephalopathy: complex molecular features and similarities with human prion diseases. *Prion* 2007; 1:61-8.

Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, Papadopoulos O, Sklaviadis T. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol*. 2002; 83:713-21.

Bishop MT, Will RG, Manson JC. Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:12005-10.

Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* 1996; 77:2669-73.

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389:498-501.

Brunelle BW, Greenlee JJ, Seabury CM, Brown CE 2nd, Nicholson EM. Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle. *BMC Vet Res*. 2008; 4:36.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H, Lipp P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M and Weissman C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356: 577-582.

Cali I, Castellani R, Alsheklee A, Cohen Y, Blevins J, Yuan J, Langeveld JP, Parchi P, Safar JG, Zou WQ, Gambetti P. Co-existence of scrapie prion protein types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: its effect on the phenotype and prion-type characteristics. *Brain* 2009; 132:2643-58.

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

Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem.* 1991; 266:18217-23.

Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem.* 1998; 273:32230-5.

Cescatti M, Saverioni D, Capellari S, Tagliavini F, Kitamoto T, Ironside J, Giese A, Parchi P. Analysis of conformational stability of abnormal prion protein aggregates across the spectrum of Creutzfeldt-Jakob disease prions. *J Virol* 2016; 90:6244-54.

Chandler RL, Fischer J. Experimental transmission of scrapie to rats. *Lancet* 1963; 41:1165.

Choi YP, Peden AH, Gröner A, Ironside JW, Head MW. Distinct stability states of disease-associated human prion protein identified by conformation-dependent immunoassay. *J Virol.* 2010; 84:12030-8.

Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside JW, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996; 383:685–690.

Colucci M, Moleres FJ, Xie ZL, Ray-Chaudhury A, Gutti S, Butefisch CM, Cervenakova L, Wang W, Goldfarb LG, Kong Q, Ghetti B, Chen SG, Gambetti P. Gerstmann-Sträussler-Scheinker: a new phenotype with 'curly' PrP deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65:642-51.

Diack AB, Head MW, McCutcheon S, Boyle A, Knight R, Ironside JW, Manson JC, Will RG. Variant CJD. 18 years of research and surveillance. *Prion.* 2014;8:286-95.

Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 1957; 257:974-8.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature.* 1966; 209:794-6.

Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, Belay ED, Schonberger LB, Marder K, Harris C, Burke JR, Montine T, Wisniewski T, Dickson DW, Soto C, Hulette CM, Mastrianni JA, Kong Q, Zou WQ. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 2008; 63:697-708.

Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*;161:388-9.

Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV. Relationship between conformational stability and amplification efficiency of prions. *Biochemistry* 2011; 50:7933-40.

Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967; 215:1043-4.

Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet*, 1959: 289-290.

Haley NJ, Hoover EA. Chronic wasting disease of cervids: current knowledge and future perspectives. *Annu Rev Anim Biosci* 2015; 3:305-25.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann- Straussler syndrome. *Nature* 1989; 338:342-5.

Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB and Gabizon R. Mutation of the prion protein in Lybian Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl. J Med* 1991, 324:1091-1097.

Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L, Will RG. Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* 2000; 37:1-9.

Jakob A. Über eine der multiplen sklerose klinisch nahenstehende erkrankung des zentralnervensystems 92 (spastische pseudosklerose) mit bemerkwertem anatomischen befunde. *Med Klin* 1921; 13:372-376.

Jeffrey M, González L, Chong A, Foster J, Goldmann W, Hunter N, Martin S. Ovine infection with the agents of scrapie (CH1641 isolate) and bovine spongiform encephalopathy: immunochemical similarities can be resolved by immunohistochemistry. *J Comp Pathol* 2006; 134:17-29.

Jeffrey M, González L. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33:373-94.

Johnson C, Johnson J, Vanderloo JP, Keane D, Aiken JM, McKenzie D. Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol*. 2006; 87:2109-14.

Johnson CJ, Herbst A, Duque-Velasquez C, Vanderloo JP, Bochsler P, Chappell R, McKenzie D. Prion protein polymorphisms affect chronic wasting disease progression. *PLoS One* 2011; 6:e17450.

Kim C, Haldiman T, Surewicz K, Cohen Y, Chen W, Blevins J, Sy MS, Cohen M, Kong Q, Telling GC, Surewicz WK, Safar JG. Small protease sensitive oligomers of PrP^{Sc} in distinct human prions determine conversion rate of PrP^C. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002835.

Kobayashi A, Sakuma N, Matsuura Y, Mohri S, Aguzzi A, Kitamoto T. Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection. *J Virol*. 2010; 84:3230-8.

Kobayashi A, Iwasaki Y, Otsuka H, Yamada M, Yoshida M, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Deciphering the pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with codon 129 M/V and type 2 abnormal prion protein. *Acta Neuropathol Commun* 2013; 1:74.

Kobayashi A, Matsuura Y, Mohri S, Kitamoto T. Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2:32.

Kobayashi A, Teruya K, Matsuura Y, Shirai T, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Mohri S, Kitamoto T. The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol* 2015; 130:159-70.

Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, Kitamoto T. Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease MM1+2C and MM1 are identical in transmission properties. *Brain Pathol.* 2016; 26:95-101.

Konold T, Arnold ME, Austin AR, Cawthraw S, Hawkins SA, Stack MJ, Simmons MM, Sayers AR, Dawson M, Wilesmith JW, Wells GA. Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle - an update. *BMC Res Notes* 2012;5:674.

Kretzschmar HA, Tings T, Madlung A, Giese A, Herms J. Prion protein as copper-binding protein at the synapse. *Methods Mol Med* 2001;59:17-30.

Laferrère F, Tixador P, Moudjou M, Chapuis J, Sibille P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Laude H, Rezaei H, Béringue V. Quaternary structure of pathological prion protein as a determining factor of strain-specific prion replication dynamics. *PLoS Pathog.* 2013; 9:e1003702.

Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ. BSE transmission to macaques. *Nature* 1996; 381:743-744.

Le NT, Narkiewicz J, Aulić S, Salzano G, Tran HT, Scaini D, Moda F, Giachin G, Legname G. Synthetic prions and other human neurodegenerative proteinopathies. *Virus Res.* 2015; 207:25-37.

Legname G, Nguyen HO, Peretz D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:19105-10.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 1994; 8:121-7.

Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-

type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2008; 2:123-8.

Moda F, Suardi S, Di Fede G, Indaco A, Limido L, Vimercati C, Ruggerone M, Campagnani I, Langeveld J, Terruzzi A, Brambilla A, Zerbi P, Fociani P, Bishop MT, Will RG, Manson JC, Giaccone G, Tagliavini F. MM2-thalamic Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological, biochemical and transmission studies identify a distinctive prion strain. *Brain Pathol.* 2012; 22:662-9.

Murdoch BM, Murdoch GK. Genetics of Prion Disease in Cattle. *Bioinform Biol Insights* 2015;9:1-10.

Nicholson EM, Brunelle BW, Richt JA, Kehrlı ME Jr, Greenlee JJ. Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE. *PLoS One* 2008; 3:e2912.

Notari S, Capellari S, Giese A, Westner I, Baruzzi A, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar HA, Parchi P. Effects of different experimental conditions on the PrP^{Sc} core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem* 2004; 279:16797-804.

Notari S, Strammiello R, Capellari S, Giese A, Cescatti M, Grassi J, Ghetti B, Langeveld JP, Zou WQ, Gambetti P, Kretzschmar HA, Parchi P. Characterization of truncated forms of abnormal prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem.* 2008; 283:30557-65.

Nussbaum RL. Genetics of Synucleinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* pii: a024109 [Epub ahead of print]

Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40:735-46.

Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, Petersen RB, Gambetti P. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996; 39:767-78.

Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol*. 1999; 46:224-33.

Parchi P, Strammiello R, Notari S, Giese A, Langeveld JP, Ladogana A, Zerr I, Roncaroli F, Cras P, Ghetti B, Pocchiari M, Kretzschmar H, Capellari S. Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrP^{Sc} types: an updated classification. *Acta Neuropathol* 2009; 118:659-71.

Parchi P, Cescatti M, Notari S, Schulz-Schaeffer WJ, Capellari S, Giese A, Zou WQ, Kretzschmar H, Ghetti B, Brown P. Agent strain variation in human prion disease: insights from a molecular and pathological review of the National Institutes of Health series of experimentally transmitted disease. *Brain* 2010; 133:3030-42.

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

Peggion C, Bertoli A, Sorgato MC. Almost a century of prion protein(s): From pathology to physiology, and back to pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 483:1148-1155.

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

Pirisinu L, Migliore S, Di Bari MA, Esposito E, Baron T, D'Agostino C, De Grossi L, Vaccari G, Agrimi U, Nonno R. Molecular discrimination of sheep bovine spongiform encephalopathy from scrapie. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:695-8.

Pirisinu L, Nonno R, Esposito E, Benestad SL, Gambetti P, Agrimi U, Zou WQ. Small ruminant Nor98 prions share biochemical features with human Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and Variably Protease-Sensitive Prionopathy. *PLoS One* 2013; 8:e66405.

Poggiolini I, Saverioni D, Parchi P. Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: an update from studies on Mammalian prions. *Int J Cell Biol* 2013; 2013:910314.

Priemer G, Balkema-Buschmann A, Hills B, Groschup MH. Biochemical Characteristics and PrP(Sc) Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. *PLoS One* 2013; 8:e67599.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216:136-44.

Richt JA, Hall SM. BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000156.

Robinson SJ, Samuel MD, O'Rourke KI, Johnson CJ. The role of genetics in chronic wasting disease of North American cervids. *Prion* 2012; 6:153-62.

Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem*. 1993; 268:20276-84.

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4:1157-65.

Safar JG, Geschwind MD, Deering C, Didorenko S, Sattavat M, Sanchez H, Serban A, Vey M, Baron H, Giles K, Miller BL, Dearmond SJ, Prusiner SB. Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:3501-6.

Safar JG, Xiao X, Kabir ME, Chen S, Kim C, Haldiman T, Cohen Y, Chen W, Cohen ML, Surewicz WK. Structural determinants of phenotypic diversity and replication rate of human prions. *PLoS Pathog* 2015; 11:e1004832.

Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, Barker SJ, Foley AC, Thorpe JR, Serpell LC, Miller TM, Grinberg LT, Seeley WW, Diamond MI. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 2014; 82:1271-88.

Saverioni D, Notari S, Capellari S, Poggiolini I, Giese A, Kretzschmar HA, Parchi P. Analyses of protease resistance and aggregation state of abnormal prion protein across the spectrum of human prions. *J Biol Chem* 2013; 288:27972-85.

Schmitz M, Dittmar K, Llorens F, Gelpi E, Ferrer I, Schulz-Schaeffer WJ, Zerr I. Hereditary Human Prion Diseases: an Update. *Mol Neurobiol* 2016 Jun 20 [Epub ahead of print].

Spasov S, Beekes M, Naumann D. Structural differences between TSEs strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760:1138-49.

Takeuchi A, Kobayashi A, Ironside JW, Mohri S, Kitamoto T. Characterization of variant Creutzfeldt-Jakob disease prions in prion protein-humanized mice carrying distinct codon 129 genotypes. *J Biol Chem* 2013; 288:21659-66.

Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 1996; 274:2079-82.

Thackray AM, Hopkins L, Bujdoso R. Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem J* 2007; 401:475-83.

Thackray AM, Hopkins L, Spiropoulos J, Bujdoso R. Molecular and transmission characteristics of primary-passaged ovine scrapie isolates in conventional and ovine PrP transgenic mice. *J Virol* 2008; 82:11197-207.

Thomzig A, Spasov S, Friedrich M, Naumann D, Beekes M. Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J Biol Chem*. 2004; 279:33847-54.

Tixador P, Herzog L, Reine F, Jaumain E, Chapuis J, Le Dur A, Laude H, Béringue V. The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000859.

Vrentas CE, Greenlee JJ, Tatum TL, Nicholson EM. Relationships between PrP^{Sc} stability and incubation time for United States scrapie isolates in a natural host system. *PLoS One* 2012; 7:e43060.

Vrentas CE, Greenlee JJ, Baron T, Caramelli M, Czub S, Nicholson EM. Stability properties of PrP^{Sc} from cattle with experimental transmissible spongiform encephalopathies: use of a rapid whole homogenate, protease-free assay. *BMC Vet Res* 2013; 9:167.

Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 1988; 123:638-44.

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*. 1996; 347:921-5.

Will RG. Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull* 2003; 66:255-65.

Will RG. Clinical features of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 284:121-32.

Xie Z, O'Rourke KI, Dong Z, Jenny AL, Langenberg JA, Belay ED, Schonberger LB, Petersen RB, Zou W, Kong Q, Gambetti P, Chen SG. Chronic wasting disease of elk and deer and Creutzfeldt-Jakob disease: comparative analysis of the scrapie prion protein. *J Biol Chem* 2006; 281:4199-206.

Zlotnik I, Rennie JC. Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol* 1963; 73:150-62.

Zou WQ, Capellari S, Parchi P, Sy MS, Gambetti P, Chen SG. Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 2003; 278:40429-36.

Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, Shimoji M, Langeveld JP, Castellani R, Notari S, Crain B, Schmidt RE, Geschwind M, Dearmond SJ, Cairns NJ, Dickson D, Honig

L, Torres JM, Mastrianni J, Capellari S, Giaccone G, Belay ED, Schonberger LB, Cohen M, Perry G, Kong Q, Parchi P, Tagliavini F, Gambetti P. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 2010; 68:162-72.