

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Corso di Dottorato in Neuroscienze

Ciclo XXIV



RUOLO DEI *LIPID RAFT* NEL METABOLISMO DELLA PROTEINA PRIONICA

Coordinatore: Prof. Guido Cavaletti

Tutor: Prof.ssa Paola Palestini

Dott.ssa Diana CUNATI

Anno Accademico: 2010/2011

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	1
1.1 LE MALATTIE DA PRIONE	2
1.2 LA PROTEINA PRIONICA	6
1.3 FUNZIONI DELLA PROTEINA PRIONICA NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE	9
1.4 LA CONVERSIONE DELLA PROTEINA PRIONICA NATIVA NELL'ISOFORMA SCRAPIE	12
1.5 IL <i>TRAFFICKING</i> DELLA PrP ^C ED IL SUO RUOLO NELLA CONVERSIONE A PrP ^{Sc}	15
1.6 IL TAGLIO DELL'ECTODOMINIO ED IL CLIVAGGIO DI PrP ^C NELLA CONVERSIONE A PrP ^{Sc}	20
2. SCOPO DELLA TESI	24
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 APPARECCHIATURE	28
3.2 MATERIALI	28
3.3 COLTURE CELLULARI PRIMARIE	29
3.4 TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI	32
3.5 PURIFICAZIONE DELLE FRAZIONI DI MEMBRANA RESISTENTI AI DETERGENTI (DRM)	33
3.6 DOSAGGIO DELLE PROTEINE	35
3.7 ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE	37
3.8 WESTERN BLOTTING	39
3.9 TRATTAMENTO CON PNGAS1 F	41
3.10 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI GANGLIOSIDI	42
3.11 IMMUNOFLUORESCENZA	43
4. RISULTATI	45
4.1 GM1 E GD1A INCORPORATI NELLE CELLULE TRATTATE A 37°C	46
4.2 GT1B INCORPORATO NELLE CELLULE TRATTATE A 37°C	48
4.3 METABOLISMO DEL GM1 E DEL GD1A ESOGENI INCORPORATI NELLE CELLULE TRATTATE A 37°C	48
4.4 DISTRIBUZIONE DI PROTEINE NEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI PER 4 ORE A 37°C	50

4.5	<i>IMMUNOBLOTTING</i> DELLE PROTEINE DEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI PER 4 ORE A 37°C	51
4.6	DEGLICOSILAZIONE MEDIANTE PNGASI	55
4.7	QUOTA DI GM1 ESOGENO INCORPORATO NELLE CELLULE A 4°C	57
4.8	METABOLISMO DEL GM1 ESOGENO INCORPORATO NELLE CELLULE TRATTATE A 4°C	58
4.9	DISTRIBUZIONE DI PROTEINE NEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GM1 A 4°C	59
4.10	<i>IMMUNOBLOTTING</i> DELLE PROTEINE DEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GM1 PER 4 ORE A 4°C	60
4.11	IMMUNOFLUORESCENZA	63
5.	<u>DISCUSSIONE</u>	67
5.1	MODIFICAZIONI DELLA COMPOSIZIONE LIPIDICA DELLA MEMBRANA CELLULARE A 37°C	69
5.2	<i>IMMUNOBLOTTING</i> DELLE PROTEINE D'INTERESSE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI A 37°C	72
5.3	VALUTAZIONE DEL CLIVAGGIO DI PrP^C IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI A 37°C	74
5.4	MODIFICAZIONI DELLA COMPOSIZIONE LIPIDICA DELLA MEMBRANA CELLULARE A 4°C	76
5.5	IMMUNOFLUORESCENZA	77
5.6	CONCLUSIONI FINALI	79
	APPENDICE A – BIBLIOGRAFIA	80

1. INTRODUZIONE

1.1 LE MALATTIE DA PRIONE

Le malattie da prione, note anche come Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE), sono patologie neurodegenerative letali la cui eziologia è associata alla conversione della proteina prionica nativa (PrP^c) nell'isoforma denominata *scrapie* (PrP^{Sc}) ed all'accumulo di quest'ultima nel tessuto cerebrale. Le caratteristiche comuni di queste patologie risiedono nell'inevitabile neurodegenerazione e nella conseguente letalità.

Le malattie da prione nell'uomo comprendono la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), l'Insonnia Fatale Familiare (FFI), il Kuru e la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS); negli animali sono state finora riconosciute la Scrapie nella pecora, l'Encefalopatia Spongiforme del Bovino (BSE), la malattia cronica devastante del cervo e dell'alce americano, l'encefalopatia spongiforme dei felini e l'encefalopatia trasmissibile del visone. Nell'uomo le malattie da prione sono state distinte in tre categorie eziologiche: sporadiche, familiari ed acquisite, mentre negli animali sono conosciute solo forme infettive della malattia.

Tra le forme sporadiche, sono note la malattia di Creutzfeldt-Jakob (sCJD) (Jakob, 1921) e l'Insonnia Fatale sporadica (sFI).

La forma sporadica di CJD rappresenta circa l'85% di tutti i casi di CJD ed è la malattia da prioni di più frequente riscontro nell'uomo. Si ipotizza che tali forme siano legate ad una mutazione somatica o alla conversione spontanea della proteina prionica cellulare (PrP^c) nell'isoforma proteica anomala.

Le forme familiari rappresentano circa il 5-15% dei casi e sono legate a mutazioni puntiformi a carico di *Prnp*, il gene codificante la proteina prionica; queste forme vengono ereditate con modalità autosomica dominante. Le malattie da prione ereditarie sono state classificate nella sindrome di Gerstmann–Straussler–Scheinker (GSS), la forma familiare di Creutzfeldt-Jakob (fCJD) e l'Insonnia Fatale Familiare (FFI).

Le forme acquisite (circa l'1%) comprendono il Kuru, la malattia di Creutzfeldt-Jakob iatrogena (iCJD) e la nuova variante di CDJ (nvCJD) (Will, 1996). La diffusione del Kuru nelle isole della Nuova Guinea è stata associata alla diffusione della pratica dei riti di cannibalismo (Glasse, 1967; Alper, 1967; Gajdusek, 1966).

I casi iatrogeni noti sono rari e sono stati associati all'uso dell'ormone della crescita e di gonadotropine ottenute dall'ipofisi di soggetti affetti (Koch et al., 1985) o dall'utilizzo di strumenti neurochirurgici non adeguatamente sterilizzati o dall'esecuzione di trapianti di cornea o dura madre infetti.

Patologia	Ospite	Meccanismo patogenetico
Scrapie	Pecora	Infezione
Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE)	Bovino	Infezione mediante carne ed ossa contaminate da prioni
Encefalopatia Spongiforme Felina	Felino	Infezione
Malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD)	Uomo	Infezione da ormone della crescita umano o da strumenti chirurgici contaminati
Sindrome di Gerstmann-Sträussler -Scheinker (GSS)	Uomo	Mutazioni del gene <i>Prnp</i>
Kuru	Uomo	Infezione attraverso cannibalismo rituale
Insonnia Fatale Familiare (FFI)	Uomo	Mutazioni del gene <i>Prnp</i>
Nuova variante della CJD (nvCJD)	Uomo	Infezione attraverso consumo di carne e derivati di bovini contaminati da BSE

Tabella1. Le encefalopatie spongiformi trasmissibili.

Queste malattie insorgono nell'uomo in età adulta, hanno una latenza molto lunga ma evolvono rapidamente dopo la comparsa dei primi sintomi; la prognosi è infausta. Il periodo di latenza è di circa dieci anni nell'uomo, mentre nei roditori, utilizzati come modelli animali è di circa un anno. La localizzazione delle lesioni a livello cerebrale varia a seconda del tipo di malattia da prione: nella BSE le lesioni riguardano soprattutto il midollo allungato, nella FFI viene danneggiato il talamo, nei pazienti affetti da CJD prevalgono le alterazioni a carico della corteccia cerebrale mentre nel Kuru e nella GSS le lesioni maggiori sono riscontrate a livello del cervelletto (Figura 1).

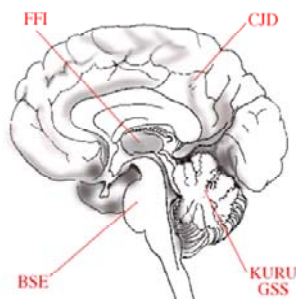


Figura 1. Localizzazione delle lesioni da malattie prioniche.

Nonostante la diversa localizzazione delle lesioni, la sintomatologia associata alle differenti malattie da prione evolve in modo simile: atassia, demenza, allucinazioni e mioclono sono comuni alla maggior parte dei pazienti e sono associati, nella maggior parte dei casi, alla degenerazione spongiforme della sostanza grigia e della corteccia cerebrale.

1.1.1 **La scoperta del prione come agente infettivo**

La possibilità di trasmissione delle encefalopatie spongiformi è stata osservata casualmente in Scozia nel 1937: dopo aver inoculato, con funzione antivirale, un gregge di pecore con un omogenato di tessuto cerebrale proveniente da animali accidentalmente affetti da Scrapie, è stato riscontrato, nei due anni seguenti, lo sviluppo della stessa malattia nell'intero gregge.

Con una simile procedura è stata verificata sperimentalmente l'effettiva trasmissibilità della patologia nelle pecore (Cullie, 1939) e nei topi (Chandler, 1961). Nell'uomo, la possibilità di una trasmissione della malattia per via infettiva era già stata ipotizzata osservando la diffusione del Kuru nelle tribù di cannibali della Nuova Guinea e poi definitivamente dimostrata con gli esperimenti condotti da Gajdusek sulle scimmie. A questi studi (Gajdusek, 1966) sono seguite poi le osservazioni della trasmissibilità della sindrome di Creutzfeldt-Jakob e della sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker agli animali.

Il lungo periodo di incubazione tra l'esposizione all'agente patogeno e l'insorgenza dei sintomi aveva inizialmente portato ad ipotizzare che si trattasse di un virus "lento". Ulteriori studi tuttavia hanno evidenziato caratteristiche di questo agente patogeno che differivano da quelle dei virus e di ogni altro agente infettante convenzionale noto. Nel 1967, Alper ha dimostrato la resistenza dell'agente responsabile della Scrapie ai trattamenti capaci di distruggere gli acidi nucleici (Alper, 1967), quali i raggi UV e le radiazioni ionizzanti; inoltre la replicazione di questi agenti non aveva portato all'osservazione delle modifiche morfologiche tipiche dei virus, ma il processo replicativo è risultato accompagnato dalla formazione, nei tessuti infetti, di una proteina amiloide costituita da filamenti lunghi da 4 a 6 µm. Da queste osservazioni sono nate numerose teorie; in particolare nel 1967 Griffith ipotizzò per la prima volta che l'agente eziologico di queste patologie potesse essere una proteina capace di replicare nell'organismo ospite (Griffith, 1967). Questa ipotesi venne poi accolta ed ulteriormente sviluppata da Prusiner che coniò il termine prione (acronimo di *PR*oteinaceous *I*nfective *O*nly *P*article) per indicare questo agente infettivo di natura proteica (Prusiner, 1982).

L'isolamento, da tessuti infetti, di una forma di proteina prionica resistente alle proteasi ha permesso di dimostrare l'infettività della proteina stessa e la relazione di proporzionalità tra la concentrazione della proteina ed il titolo infettivo. La purificazione della proteina ha permesso inoltre l'identificazione del gene codificante la proteina prionica; studi genetici successivi hanno dimostrato che la gran parte dei casi familiari di TSE sono associati a mutazioni a carico di questo gene (Prusiner 1998, Collinge, 2001). Charles Weissmann ha dimostrato poi che topi privi del gene codificante la proteina prionica risultavano resistenti all'infezione Scrapie e non permettevano la

diffusione della patologia (Weismann, 1996). Negli ultimi anni un grande contributo a supporto della teoria della proteina prionica quale agente infettivo è stato dato dalla dimostrazione che una forma ricombinante ed altamente purificata della proteina prionica può essere convertita, *in vitro*, in una struttura molto simile a quella dei prioni.

Inoltre, Legname ed i suoi collaboratori hanno prodotto una forma ricombinante e tronca della proteina prionica e ne hanno indotto la conversione in fibrille amiloidi; queste ultime sono state poi inoculate intracerebralmente in topi transgenici (MoPrP) sovraesprimenti il gene codificante la PrP^C.

Le fibrille inoculate hanno causato gravi problemi neurologici a 380 giorni dal trattamento; inoltre gli omogenati di tessuto cerebrale, ottenuti dai topi MoPrP inoculati, hanno portato allo sviluppo della malattia anche in topi *wild type* (Legname, 2004). Infine gli studi di Sigurdson hanno per la prima volta dimostrato che prioni generati spontaneamente in modelli murini sono capaci di infettare topi *wild type* (Sigurdson et al., 2009). Allo stato attuale è quindi possibile concludere che la proteina prionica *scrapie* è sia necessaria che sufficiente allo svolgimento di un'azione infettiva.

1.1.2 **Il gene *Prnp* ed alcune mutazioni patogenetiche**

Il gene *Prnp*, che codifica la proteina prionica, è situato sul braccio corto del cromosoma 20 dell'uomo; nelle diverse specie è in genere composto da due esoni separati da un introne piuttosto esteso.

Il primo esone contiene la maggior parte della regione 5' non tradotta, mentre il secondo esone contiene la parte finale della regione 5' non tradotta, l'intera regione codificante e l'intera regione 3' non tradotta.

Un dato importante è che, nei geni codificanti PrP^C finora noti, l'intera regione codificante si trova sempre nell'ultimo esone. Questa caratteristica impedisce di ipotizzare che PrP^{Sc} sia frutto di uno *splicing* alternativo dell'RNA (Prusiner, 1994).

Allo stato attuale sono state identificate due tipologie di mutazioni patogenetiche a carico del gene *Prnp*: al primo tipo appartengono le mutazioni puntiformi che causano una sostituzione aminoacidica (mutazioni missenso) o determinano la formazione di un codone di stop prematuro (mutazioni non-senso). Il secondo tipo di mutazioni è rappresentato dalle inserzioni: nella situazione normale la sequenza nucleotidica tra i codoni 51 e 91 codifica per un nonapeptide seguito in tandem da quattro identiche ripetizioni di una sequenza nucleotidica codificante per un octapeptide; le mutazioni per inserzione consistono nella ripetizione della sequenza codificante l'octapeptide fino a nove volte. L'aggiunta di un solo octapeptide, rispetto ai quattro normalmente presenti, viene classificato come un polimorfismo non patogenetico. Croes ed i suoi collaboratori hanno inoltre dimostrato l'esistenza di una correlazione inversa tra l'età d'insorgenza dei sintomi della patologia ed il numero di inserzioni di octapeptidi (Croes et al., 2004).

La prima mutazione puntiforme identificata (D178N) come causa dell'fCJD è stata la sostituzione di una prolina con una leucina nel codone 102 del gene *Prnp*; la mutazione D178N inoltre può causare sia la fCJD che la FFI, a seconda del polimorfismo presente a livello del codone 129.

La mutazione D178N, associata alla presenza della valina in posizione 129 (V129), determina una forma di fCJD i cui pazienti mostrano demenza ed una diffusa deposizione di PrP^{Sc} (Goldfarb et al., 1991). Se la mutazione D178N è associata ad una metionina in posizione 129, insorge invece una forma di FFI i cui pazienti presentano un disturbo progressivo del sonno che si rivela letale. L'analisi *post mortem* del cervello di pazienti malati di FFI mostra che l'accumulo di PrP^{Sc} è limitato a specifiche regioni del talamo.

Sono state inoltre individuate numerose varianti alleliche che potrebbero avere un ruolo nell'alterazione del rischio e nella manifestazione fenotipica delle malattie da prione, sia sporadiche che familiari (Mead, 2006; Mastrianni, 2010).

1.2 LA PROTEINA PRIONICA

La PrP^C ha un peso complessivo di 33-35 kDa ed è una glicoproteina di 209 aminoacidi (residui 23-231 secondo la numerazione della proteina prionica umana); come altre proteine di membrana è prodotta nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e attraverso il complesso di Golgi raggiunge la membrana cellulare. Durante la sua biosintesi la proteina prionica è sottoposta a numerose modifiche post-traduzionali tra cui l'eliminazione dei residui 231-254 che consente l'aggiunta di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI), funzionale alla localizzazione preferenziale della proteina a particolari microdomini di membrana denominati *lipid raft*. Altre modifiche post-traduzionali che avvengono a carico della PrP^C sono le glicosilazioni in posizione 181 e/o 197 che danno origine a tre isoforme della proteina: monoglicosilata, diglicosilata e non glicosilata.

La proteina prionica risulta espressa soprattutto nel sistema nervoso centrale; la quantità di proteina presente varia molto nelle diverse regioni cerebrali, tra tipi cellulari diversi e tra neuroni con un diverso fenotipo neurochimico. Elevati livelli di espressione del gene *Prnp* sono stati riscontrati nell'uomo anche in diverse componenti cellulari del sistema immunitario (Cashman et al., 1990; Dodelet, 1998; Dürig, 2000; Li, 2001; Starke et al., 2005), nel tessuto muscolare (Gohel et al., 1999), nello stomaco, nei reni e nella milza (Fournier, 1998). Nel ratto invece gli studi finora condotti ne hanno dimostrato l'espressione solo a livello del cervelletto e della retina (Laine, 2001; Chiarini et al., 2002).

Nonostante si tratti di una proteina altamente conservata nelle diverse specie il suo ruolo fisiologico non è tuttora completamente noto.

La struttura tridimensionale di PrP^C consiste in un dominio globulare C-terminale di oltre 100 aminoacidi (residui 121-231) ed una regione N-terminale di simile lunghezza (residui 23-120) ma strutturalmente flessibile e disordinata (Zahn et al., 2000). Il dominio globulare di PrP^C umana è organizzato in tre α -eliche intervallate da due foglietti β antiparalleli; questa struttura è stabilizzata

da un singolo ponte disolfuro che lega le eliche 2 e 3 mediante i residui 179 e 214. Ricordiamo che la regione N-terminale, compresa tra i residui 51-91, contiene un segmento costituito da una sequenza codificante un nonapeptide seguita da quattro ripetizioni di una sequenza codificante un octapeptide; l'espansione di queste ripetizioni conduce alla malattia da prioni ereditaria. Questa regione inoltre contiene due siti di legame per gli ioni rameici.

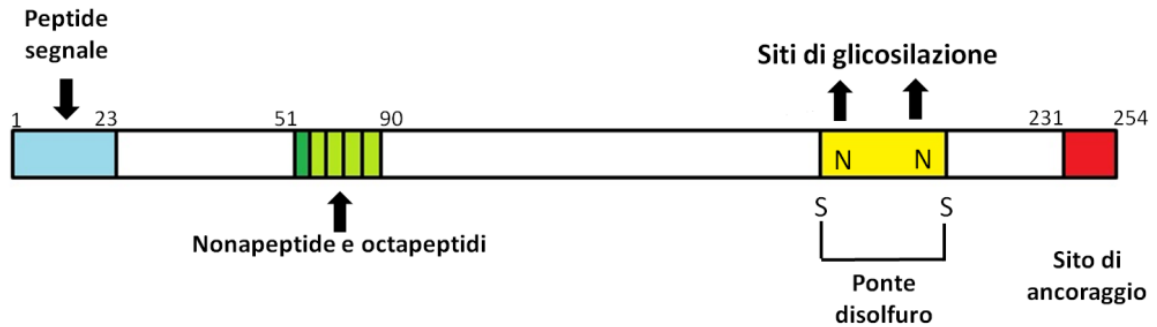


Figura 2. Rappresentazione schematica della proteina prionica cellulare.

In numerosi mammiferi questa struttura globulare è identica a quella della proteina prionica umana, come ci si aspetta dall'alta percentuale di identità di sequenza (Lopez et al., 2005; Lysek et al., 2005).

La parte centrale della catena polipeptidica (106-126) è una regione idrofobica altamente conservata che mostra proprietà neurotossiche (Chiesa e Harris, 2001). Tra tutti i peptidi sintetici finora studiati derivanti dalla nota sequenza della proteina prionica umana, il frammento che si estende nella regione 106-126 è risultato essere il più neurotossico e capace di formare facilmente fibrille amiloidi parzialmente resistenti alla proteolisi (Forloni, 1993; Selvaggini et al., 1993). In base a queste osservazioni è stato ipotizzato che questa sequenza aminoacidica possa svolgere un ruolo importante nella formazione dell'amiloide e nella neurodegenerazione caratteristica delle malattie da prione.

Quest'ipotesi è supportata dall'osservazione che la sequenza PrP (106-126) è presente in tutte le isoforme anomale della proteina prionica ritrovate nei cervelli dei pazienti affetti da malattie da prione (Florino et al., 1998), suggerendo quindi che questa regione possa innescare od agevolare l'instaurarsi di un fondamentale meccanismo patogenetico comune alle differenti forme di queste patologie (Fioriti et al., 2005).

Altri studi invece suggeriscono che la sequenza PrP (106-126) non sia di per sé tossica ma lo diventi solo in presenza di PrP^C; in neuroni di topi *Prnp knockout* infatti il peptide sintetico 106-126 non esercita alcun effetto neurotossico (Fioriti et al., 2005). E' stato quindi suggerito che la regione 106-126 non sia tossica di per sé ma necessiti della presenza della proteina prionica cellulare intera e che l'effetto neurotossico sia imputabile ad un'alterazione delle funzioni fisiologiche di PrP^C (Brown, 1994; Pietri et al., 2006).

Nelle cellule del sistema nervoso centrale, la proteina prionica localizza preferibilmente in microdomini di membrana arricchiti in colesterolo denominati *lipid raft* (Vey et al., 1996); alcuni studi ne dimostrano la presenza, seppur in quantità minore, nelle strutture membranose *endocitotiche* e nel citoplasma di una sub-popolazione di neuroni nell'ippocampo, nel talamo e nella neocorteccia (Mironov et al., 2003; Miesbauer et al., 2010). Numerosi studi indicano che PrP^C si sposta continuamente in modo ciclico dalla membrana plasmatica ai compartimenti endocitotici (Harris, 2003; Prado et al., 2004) ma il ruolo biologico dell'internalizzazione non è noto. Gli esperimenti condotti da Harris hanno dimostrato che la regione N-terminale della proteina prionica è essenziale sia per la sua stessa localizzazione sulla membrana cellulare che per la sua internalizzazione nelle cavità rivestite da clatrina (Lee et al., 2001); infatti una sequenza aminoacidica basica presente in questa regione si è dimostrata capace di conferire a PrP^C la capacità di entrare nelle cavità clatrina-rivestite. E' stato quindi ipotizzato che la PrP^C possa legarsi, attraverso la regione N-terminale, ad una proteina transmembrana che, contenendo un segnale di localizzazione, ne induce l'internalizzazione clatrina-mediata (Sunyach et al., 2003). Il recettore per la laminina è una delle proteine candidate a questo ruolo anche se, in base agli studi condotti, potrebbe essere responsabile solo per il 25-50% dell'internalizzazione di PrP^C (Lee et al., 2003). Quest'ultima quindi coinvolge probabilmente anche altri fattori capaci di interagire con regioni diverse della proteina prionica cellulare oppure potrebbe avvenire con una via clatrina-indipendente (Lee et al., 2003; Peters et al., 2003; Kaneko et al., 1997).

La caratteristica distintiva dell'internalizzazione di PrP^C è che la proteina deve fuoriuscire dai *lipid raft* e solo allora può entrare nelle cavità clatrina-rivestite (Figura 3).

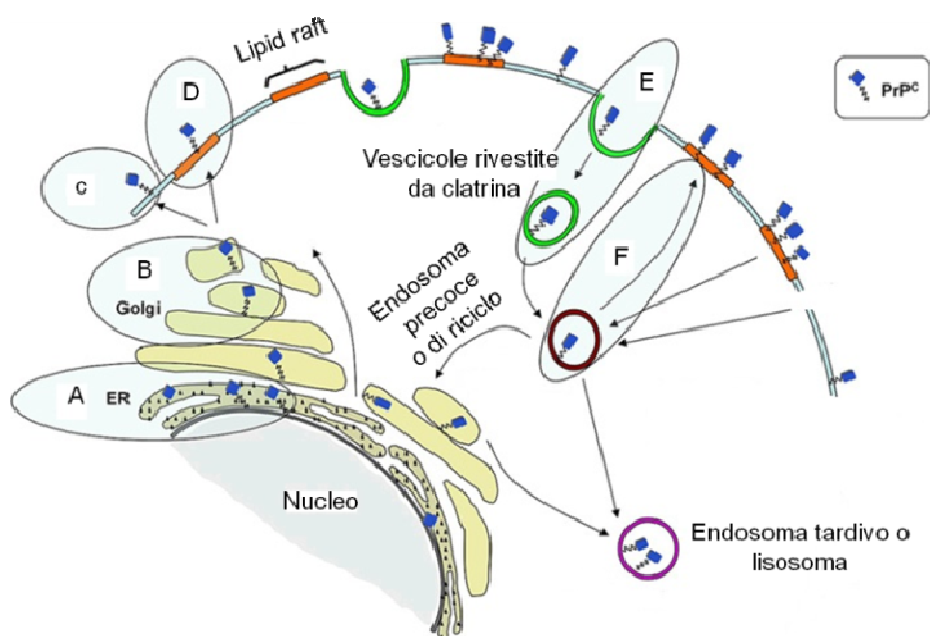


Figura 3. Trafficking e localizzazione della PrPC nelle cellule neuronali. La proteina è prodotta nel reticolo endoplasmatico (A) ed è trasportata dal complesso di Golgi (B) alla superficie cellulare dove localizza nella membrana plasmatica (C) ma soprattutto nei lipid raft (D). L'endocitosi di PrPC viene quindi mediata dalle vescicole rivestite da clatrina (E) e la proteina prionica può essere nuovamente trasportata alla superficie cellulare mediante gli endosomi di riciclo (F).

1.3 FUNZIONI DELLA PROTEINA PRIONICA NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

La PrP^C è presente in grande quantità nel sistema nervoso centrale e considerata la natura neurodegenerativa di tutte le malattie da prione, molti studi si sono focalizzati nello studio delle funzioni della proteina prionica a livello neuronale.

1.3.1 Topi *knockout* per la proteina prionica cellulare

I primi tentativi di dedurre la funzione della PrP^C dall'osservazione del fenotipo di topi *Prnp knockout* sono stati per lungo tempo fallimentari perché negli animali ottenuti non si osservava alcuna alterazione anatomica o funzionale ma risultavano resistenti all'infezione dopo inoculo di un omogenato di cervello murino infetto da PrP^{Sc} (Büeler et al., 1993); questi animali, denominati Prnp^{0/0} o Zurich I (ZrchI) non hanno mostrato anomalie anatomiche né a livello cerebrale, né a livello del muscolo scheletrico e degli organi viscerali. Anche in una seconda linea di topi *Prnp knockout*, noti come Npu o Prnp^{-/-} Edinburgh (Edbg), non sono state osservate alterazioni, in accordo coi risultati ottenuti precedentemente.

In seguito a questi studi si è quindi dedotto che PrP^C non fosse necessaria per un normale sviluppo cerebrale o che la sua assenza fosse compensata da un'altra proteina con funzioni ridondanti (Manson, 1992).

In netto contrasto con questi risultati sono stati poi generati topi *Prnp knockout* che mostravano un normale sviluppo ma che in età avanzata sviluppavano una grave atassia e la degenerazione delle cellule del Purkinje; queste osservazioni sono state fatte per la prima volta in topi denominati Nagasaki (Ngsk) (Sakaguchi et al., 1996). Inoltre la reintroduzione di *Prnp* riportava il fenotipo alla normalità.

Risultati molto simili sono stati poi confermati anche in altri topi *Prnp knockout* denominati Rcm0 (Moore et al., 1999) e ZurichII (Rossi et al., 2001).

I costrutti utilizzati per generare topi *Prnp knockout* che mostravano degenerazione cerebellare ed atassia differivano da quelli privi di alcun effetto fenotipico in quanto, nei primi, erano state rimosse ampie porzioni delle regioni fiancheggianti l'*Open Reading Frame*; è stato ipotizzato quindi che i diversi risultati ottenuti potessero dipendere dal metodo di delezione utilizzato (Weissmann, 1996). Infatti è stato dimostrato infatti che l'atassia era causata, in questi animali, dalla sovraespressione di un gene chiamato *Prnd* codificante per la proteina Doppel (Dpl) (Moore et al., 2001) e localizzato 16Kb a valle di *Prnp*.

La regione codificante per Dpl genera due trascritti principali, oltre ad un trascritto chimera derivante dallo *splicing* intragenico con *Prnp*. Tale trascritto è risultato sovraespresso in topi Ngsk, Rcm0 e Zrch II ma non in animali Zrch I o Npu (Moore et al., 2001): la sovraespressione del gene

codificante Doppel, piuttosto che l'assenza di PrP^C, sembra quindi provocare la neurodegenerazione osservata nelle linee Ngsk, Rcm0 e Zrch II.

I livelli di espressione di *Prnd* inoltre hanno mostrato una correlazione inversa con l'età di insorgenza della malattia (Moore, 2001).

La reintroduzione del gene *Prnp* in topi sovraespressanti *Prnd* ha riportato ad un fenotipo paragonabile a quello dei topi *wild type* (Moore et al., 2001; Nishida et al., 1999); la neurotossicità di Dpl quindi è contrastata da PrP^C, ma i meccanismi su cui si basa questo antagonismo sono ignoti.

Concludendo, in base agli studi finora eseguiti su topi *Prnp knockout* e non sovraespressanti il gene *Prnd*, l'idea dell'esistenza di una proteina omologa a PrP^C avente funzioni ridondanti e capace quindi di mediare la sopravvivenza neuronale nel sistema nervoso centrale è da considerarsi plausibile, ma allo stato attuale non è ancora stata dimostrata.

1.3.2 **La proteina prionica cellulare nel comportamento**

Uno dei primi fenotipi associati alla mancata espressione del gene *Prnp* è stata l'alterazione della coordinazione motoria in topi adulti Ngsk; questo deficit è risultato correlato alla perdita delle cellule cerebellari del Purkinje (Katamine et al., 1998) ed ad un'aumentata espressione del gene *Prnd* piuttosto che ad una perdita di funzione di PrP^C.

Studi condotti su topi ZrchI invece suggeriscono che l'assenza della proteina prionica comporta cambiamenti funzionali del sistema glutammatergico mentre i sistemi dopaminergico e adenosinergico sono preservati (Coitinho et al., 2002).

In condizioni di stress acuto inoltre i topi ZrchI mostrano minori livelli di ansietà rispetto ai controlli *wild type* (Nico et al., 2005); l'ansietà è accompagnata da una serie di comportamenti e risposte fisiologiche che tendono a proteggere l'individuo dal pericolo ed è considerata parte dei complessi meccanismi di adattamento alle condizioni avverse. I ridotti livelli di ansietà in topi ZrchI *Prnp* 0/0 suggeriscono quindi che PrP^C possa contribuire all'adattamento allo stress a livello sistemico (Nico et al., 2005).

1.3.3 **La proteina prionica cellulare nel ciclo sonno-veglia**

Numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento di PrP^C nel controllo del ciclo sonno-veglia. L'insonnia familiare fatale (FFI) è stata descritta nel 1986 come una patologia clinicamente caratterizzata da insonnia progressiva, disautonomia e gravi segni motori (Lugaresi et al., 1986). Negli anni seguenti, in soggetti affetti da FFI, sono state trovate forme di proteina prionica resistenti alle proteasi (Medori et al., 1992); la possibilità di trasmettere la patologia ad animali da laboratorio ha confermato poi definitivamente che l'FFI è un'amiloidosi cerebrale infettiva (Tateishi et al., 1995). Inoltre, tutti i pazienti affetti dalla malattia e appartenenti

alla stessa famiglia hanno mostrato una mutazione puntiforme a carico del gene *Prnp* (Medori et al., 1992) nel codone 178.

Anche in topi *Ngsk* ed *Npu* è stata osservata l'alterazione dei ritmi cicardiani e del sonno, suggerendo l'ipotesi che la FFI sia associata ad una perdita di funzione di PrP^C.

Oltre all'insonnia familiare fatale, situazioni di insonnia non trattabile sono state riportate sia in pazienti con una forma familiare di CJD (Chapman et al., 1996; Taratuto et al., 2002), che nel 45% dei pazienti con CJD sporadica (Taratuto et al., 2002; Kazukawa, 1987; Terzano et al., 1995; Vitrey et al., 1971) e nei casi di CJD iatrogena (Cabral, 2002). L'alterazione del sonno è probabilmente un sintomo clinico che è stato finora sottostimato nelle malattie da prione ma, considerata la sua elevata incidenza, potrebbe riflettere un meccanismo patogeno comune nella FFI e nella CJD.

1.3.4 **La proteina prionica cellulare e la memoria**

La generazione di topi *Prnp knockout* ha comportato risultati contrastanti anche nello studio del ruolo della proteina prionica nei meccanismi della memoria; nei primi esperimenti condotti in topi *Zrchl* non è stata dimostrata alcuna alterazione (Büeler, 1992) ma nei topi *Ngsk* è stata osservato, a 24 settimane d'età, un grave deficit nel consolidamento della memoria a lungo termine. Anche in questo caso, la presenza di alti livelli di Dpl precludono un'associazione diretta di questo deficit con la perdita di funzione della proteina prionica.

Topi *Npu* invece hanno mostrato un'alterata capacità di apprendimento spaziale senza alcuna alterazione delle altre forme di apprendimento; questo deficit viene meno con la ri-espressione del gene *Prnp*. In questo caso è stato quindi possibile attribuire questa alterazione alla perdita di funzione di PrP^C (Criado et al., 2005).

Come già emerso nei paragrafi precedenti, l'utilizzo di animali geneticamente modificati per studiare la funzione della proteina prionica risulta difficoltoso in quanto si ottengono risultati molto diversi a seconda del tipo di delezione attuato, del *background* genetico e dell'instaurarsi di meccanismi compensatori; per lo studio dei processi cognitivi (Izquierdo, 2000) ed in particolare per il consolidamento della memoria, sono stati utilizzati approcci farmacologici.

L'infusione nell'ippocampo di ratti adulti di anticorpi anti-PrP^C (Coitinho et al., 2003) o anti-laminina o di peptidi corrispondenti ai rispettivi siti di legame ha portato all'osservazione di un alterato consolidamento della memoria.

Gli effetti amnesici osservati dopo l'infusione nella regione CA1 di anticorpi anti-PrP^C che inibiscono l'interazione tra la proteina prionica e la laminina vengono meno per co-infusione del peptide LN γ -1, corrispondente al sito di legame per la PrP^C nella laminina. Questi risultati ed altri numerosi studi dimostrano che la proteina prionica presente a livello ippocampale gioca un ruolo fondamentale nell'elaborazione della memoria tramite l'interazione con la laminina ma con un meccanismo non ancora noto.

Un'altra interazione che prende parte al mantenimento della memoria a breve termine ed al consolidamento di quella a lungo termine è il legame della proteina ST11 (*STress Inducible protein 1*) a PrP^C (Coitinho et al., 2006); l'inibizione di questa interazione, mediante infusione ippocampale di anticorpi anti-PrP^C, ha condotto all'alterazione sia della memoria a lungo termine che di quella a breve termine. Inoltre l'infusione del peptide corrispondente alla sequenza 106-126 della PrP^C sembra inibire il consolidamento della memoria, competendo nell'interazione tra la proteina ST11 e PrP^C. Sorprendentemente il peptide corrispondente alla sequenza 230-245 della proteina ST11 e che contiene il sito di legame a PrP^C ha mostrato un potente effetto stimolatore nel mantenimento della memoria, processo che viene invece contrastato dal peptide 106-126 di PrP^C. Nel loro complesso questi risultati dimostrano che l'interazione di PrP^C con ST11 è importante sia per il mantenimento della memoria a breve termine che per il consolidamento della memoria a lungo termine e suggeriscono la possibilità di utilizzare il peptide corrispondente alla sequenza 230-245 della proteina ST11 come strumento terapeutico (Coitinho et al., 2006).

Gli effetti di PrP^C sul consolidamento della memoria sono quindi mediati da almeno due definite interazioni molecolari con proteine espresse sulla superficie delle cellule ippocampali: ST11 e la laminina.

1.4 LA CONVERSIONE DELLA PROTEINA PRIONICA NATIVA NELL'ISOFORMA SCRAPIE

L'evento chiave delle malattie da prione è il cambiamento conformazionale della proteina prionica nativa (PrP^C) nella sua isoforma patologica, PrP^{Sc} (*Scrapie Prion protein*); l'accumulo di quest'ultima è responsabile della neurodegenerazione caratteristica di queste malattie.

L'isoforma nativa è necessaria per la replicazione di PrP^{Sc} e per determinare l'insorgenza e la propagazione della malattia; i topi *Prnp knockout* infatti sono resistenti all'infezione da prioni e non replicano l'agente infettivo (Büeler et al., 1993).

Le due isoforme condividono la stessa struttura primaria e le stesse modifiche post-traduzionali (Stahl et al., 1993); PrP^{Sc} possiede però meno strutture ad α -elica (30%) e più foglietti- β (43%) rispetto a PrP^C (42% e 3% rispettivamente). La conversione della conformazione da strutture ad α -elica a strutture a foglietto- β rappresenta il punto chiave nella formazione di PrP^{Sc} (Pan et al., 1993; Prusiner, 1998; Büeler et al., 1993). Questo cambiamento conformazionale comporta inevitabilmente delle modifiche nelle proprietà chimico-fisiche della proteina. PrP^C è solubile in detergenti non denaturanti mentre PrP^{Sc} non lo è; inoltre l'isoforma *scrapie* mostra una certa resistenza alla proteasi K, a differenza della proteina prionica nativa. Nonostante quest'ultima caratteristica sia stata spesso utilizzata per una semplice identificazione di PrP^{Sc}, è stato dimostrato che non tutte le molecole di proteina prionica *scrapie* sono resistenti alla digestione da parte delle proteasi (Hsiao et al. 1994; Telling et al., 1996; Safar et al., 1998; Gambetti et al., 2008;

Colby et al., 2010). Inoltre PrP^{Sc} di specie diverse o di particolari ceppi possono mostrare un diverso grado di resistenza alla digestione enzimatica.

Il cambiamento di conformazione della proteina prionica è un processo post-traduzionale che teoricamente potrebbe avvenire sia all'interno della cellula, sia dopo che la proteina prionica ha raggiunto la sua corretta posizione extracellulare.

La conversione spontanea dell'isoforma normale in quella patologica è un evento raro; l'ipotesi pionieristica di Prusiner si basa sostanzialmente su due modelli. Il primo modello, detto *template-assistance* (Figura 4), ipotizza un'interazione tra la proteina prionica infettiva esogena e la proteina prionica nativa con la conseguente conversione di quest'ultima nell'isoforma *scrapie*. Questo processo ha un'energia di attivazione molto alta e richiederebbe perciò uno *chaperone* ed una fonte di energia.

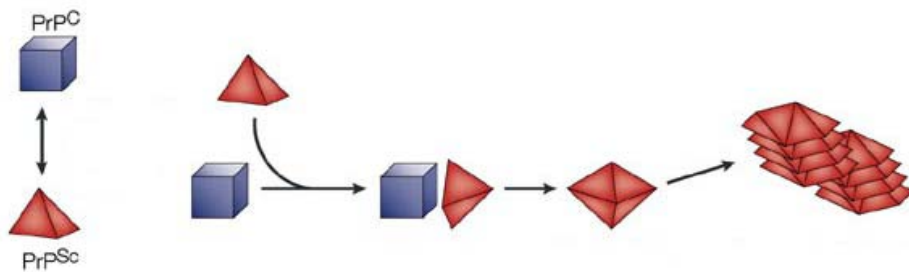


Figura 4. Rappresentazione del modello *template-assistance*

Il secondo modello, chiamato *seeding* o *nucleation-polymerization*, ipotizza che PrP^C e PrP^{Sc} esistano in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l'aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di PrP^{Sc} avverrebbe solo quando diverse molecole di PrP^{Sc} si organizzano in strutture altamente ordinate. All'interno di questa struttura simil-cristallina, PrP^{Sc} diviene stabile; la frammentazione di aggregati di PrP^{Sc} aumenterebbe quindi il numero di nuclei di cristallizzazione capaci di reclutare altre PrP^{Sc} e determinare un'apparente replicazione dell'agente prionico (Figura 5).

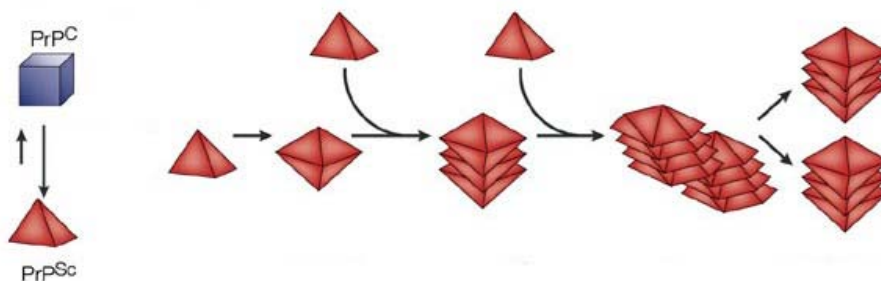


Figura 5. Rappresentazione del modello *seeding*.

Allo stato attuale sembra che il modello *template-assistance* possa spiegare meglio i risultati sperimentali ottenuti (Prusiner, 1990) in topi transgenici esprimenti sia la proteina prionica del criceto siriano (SHaPrP) che la proteina prionica murina (MoPrP).

Quando a questi topi sono stati inoculati prioni di origine murina, solo la MoPrP^C espressa dai topi transgenici viene reclutata e convertita in MoPrP^{Sc}. L'inoculazione di SHaPrP^{Sc} invece ha condotto alla sola conversione di SHaPrP^C nell'isoforma *scrapie*. Questi risultati quindi indicano che le molecole con la sequenza di PrP^C più appropriata ad adattarsi al template PrP^{Sc} vengono selezionate per la conversione.

E' stato inoltre ipotizzato che PrP^C debba subire un parziale *unfolding* a dare un intermedio, PrP*, che possa interagire direttamente con PrP^{Sc} e subire infine la conversione patogena (Baldwin et al., 1994).

Questa teoria è supportata dal fatto che per ottenere *in vitro* la conversione di PrP^C nell'isoforma *scrapie*, è necessario denaturare la proteina (Kocisko et al., 1994; Kaneko et al., 1997; Castilla et al., 2005).

L'osservazione delle infezioni da prione e la riproduzione sperimentale del processo di trasmissione hanno messo in luce notevoli differenze di suscettibilità fra specie diverse; nel 2010 Khan ha dimostrato che la chiave della suscettibilità all'infezione risiede nella propensione della proteina prionica nativa ad assumere la conformazione a β -struttura (Khan et al., 2010). In studi precedentemente condotti con proteine prioniche ricombinanti, è stato dimostrato che a pH basico o neutro PrP^C adotta una conformazione ad α -elica mentre a pH acido si ha la riduzione del ponte disolfuro ed un riarrangiamento in una β -struttura; tale forma condivide alcune proprietà caratteristiche della proteina prionica *scrapie*, inclusa la parziale resistenza alla proteolisi e la tendenza ad aggregarsi in fibrille. Questa β -struttura potrebbe quindi rappresentare una forma intermedia per giungere a PrP^{Sc} e le condizioni necessarie alla sua formazione risultano coincidere con quelle a cui va incontro la proteina prionica nativa durante l'internalizzazione nella cellula ed il suo riciclo; è noto infatti che negli endosomi tardivi e nei lisosomi il pH è acido. Questa teoria non contrasta con la precedente ipotesi della formazione di un intermedio PrP* in quanto un processo di *misfolding* può aver luogo solo quando la proteina nativa è almeno parzialmente denaturata o degradata.

1.5 IL TRAFFICKING DELLA PrP^C ED IL SUO RUOLO NELLA CONVERSIONE A PrP^{Sc}

1.5.1 Il reticolo endoplasmatico rugoso, il compartimento endolisosomiale e le membrane endocitotiche

Uno dei punti chiave della ricerca sui prioni riguarda la determinazione del sito o dei siti cellulari in cui avviene la conversione della proteina prionica cellulare nell'isoforma *scrapie*. La formazione di PrP^{Sc} potrebbe avvenire a livello della membrana plasmatica, dove si verifica con ogni probabilità il primo incontro tra l'isoforma endogena e quella esogena della proteina, oppure immediatamente dopo l'internalizzazione di PrP^C nel compartimento endolisosomiale (Prado et al., 2004; Borchelt et al., 1992). Un'altra possibilità è che PrP^{Sc}, dopo la sua internalizzazione, venga trasportata in modo anterogrado al complesso di Golgi e/o al reticolo endoplasmatico e possa quindi interferire nella biosintesi di PrP^C. E' stato infatti dimostrato che stimolando il trasporto retrogrado e l'accumulo di PrP^C nel reticolo endoplasmatico (RE) si ha un'aumentata produzione di PrP^{Sc} nelle cellule infette; questo risultato suggerisce un possibile coinvolgimento del RE nella conversione della proteina prionica. Questa ipotesi è plausibile considerando che proprio attraverso questo compartimento cellulare passa un'elevata quantità di proteina prionica endogena.

Il coinvolgimento del reticolo endoplasmatico in questa conversione patogena è supportato anche da studi in cui Harris ha dimostrato che la formazione di PrP^{Sc} è un processo multifasico che prevede la presenza di intermedi a diversa conformazione.

I dati disponibili suggeriscono che il RE possa svolgere funzioni diverse nelle malattie da prione di origine genetica rispetto alle forme infettive; nelle prime il reticolo endoplasmatico potrebbe rappresentare il compartimento in cui la PrP^C è spontaneamente trasformata nell'isoforma *scrapie* mentre nelle malattie da prione infettive potrebbe rappresentare un sito di amplificazione della PrP^{Sc} precedentemente prodotta in altri compartimenti cellulari.

Numerosi studi però indicano che la conversione della proteina prionica nativa nell'isoforma patogena sia un evento post-traduzionale che può aver luogo solo dopo il raggiungimento della superficie cellulare (Caughey, 1991; Borchelt e Taraboulos, 1992); è stato osservato infatti che l'esposizione ad anticorpi anti-PrP^C e la stimolazione del rilascio di PrP^C dalla membrana cellulare diminuisce la formazione di PrP^{Sc} (Supattapone, 2002). Quest'ultima inoltre risulta notevolmente ridotta se viene impedito il trasporto della proteina prionica nativa alla membrana cellulare.

I motivi per cui il raggiungimento della membrana plasmatica potrebbe essere necessario alla conversione della proteina prionica nativa nell'isoforma *scrapie* sono molteplici; per esempio una possibilità è che solamente a livello della membrana cellulare vengano completate le modifiche post-traduzionali necessarie per la sua conversione. Un'altra ipotesi è che PrP^C possa funzionare da recettore e mediare l'internalizzazione di PrP^{Sc} durante l'infezione; è plausibile inoltre che

l'ambiente proteico e lipidico della membrana cellulare possano favorire le interazioni tra la due forme della proteina prionica e agevolare la conversione dell'isoforma nativa a PrP^{Sc} (Prusiner, 1998).

Possiamo quindi ipotizzare che sia il reticolo endoplasmatico che la membrana cellulare prendano parte con meccanismi diversi alla conversione di PrP^C nell'isoforma *scrapie*.

Ulteriori studi hanno dimostrato anche un possibile coinvolgimento della via endocitotica; bloccando i processi di endocitosi, mediante abbassamento della temperatura, si è osservata una ridotta formazione di PrP^{Sc} (Borchelt et al., 1992). L'inibizione del riciclo della proteina prionica inoltre aumenta la produzione dell'isoforma *scrapie* nelle cellule infette, suggerendo quindi che la formazione di PrP^{Sc} possa avvenire anche in compartimenti intracellulari (Beranger, 2002).

Uno studio di Fevrier del 2004 inoltre ha dimostrato che entrambe le isoforme della proteina prionica vengono rilasciate nel medium di cellule infette in associazione con gli esosomi, indicando quindi che una delle vie a cui vanno incontro i compartimenti endosomiali e lisosomiali contenenti la PrP^{Sc} è la fusione esocitotica (Fevrier et al., 2004). Non è mai stata dimostrata finora la partecipazione di questi organelli nella conversione patogena della proteina prionica nativa.

1.5.2 **Lipid raft**

La membrana cellulare è un sottile rivestimento che delimita la cellula in tutti gli organismi viventi, la separa con l'ambiente esterno e ne regola gli scambi con questo. Il modello a mosaico fluido proposto nel 1972 da Singer e Nicholson prevedeva già l'esistenza di domini ovvero di zone in cui la concentrazione delle diverse componenti proteiche e lipidiche differisce dal resto della membrana cellulare. Questa intuizione implica anche la possibilità che diversi tipi di domini possano coesistere persino nella stessa membrana cellulare. Diversi studi condotti con tecniche differenti ed utilizzando sia modelli cellulari che artificiali hanno confermato questa ipotesi suggerendo che l'organizzazione in domini sia una caratteristica comune alle membrane biologiche.

Allo stato attuale è ormai accettata l'esistenza di micro- e macrodomini sul piano della membrana cellulare le cui proprietà chimico-fisiche sono diverse dal resto della membrana plasmatica. Nel 1986 Masserini et al. hanno osservato, mediante studi di calorimetria, una separazione di fase laterale di glicosfingolipidi in vescicole unilamellari grandi (LUV, *Large Unilamellar Vescicle*); inoltre è stato dimostrato che i gangliosidi hanno una tendenza a separare nel doppio strato della membrana in maniera proporzionale al numero di residui di acido sialico contenuti. All'aumentare del volume della testa del ganglioside (ovvero più grande è il numero di residui di acido sialico presenti nel ganglioside) più molecole di fosfatidilcolina risultano capaci di associarsi al ganglioside.

Il modello a mosaico fluido è stato quindi definitivamente rivisto nel 1997 da Simon e Ikonen in favore di un modello di membrana in cui all'interno del doppio strato lipidico fluido esistono zone

rese meno fluide dalla presenza di sfingolipidi e colesterolo allo stato liquido; tali zone si chiamano *lipid raft*.

I *lipid raft* sono regioni della membrana cellulare morfologicamente identificabili, rappresentate da accumuli di particolari proteine e lipidi. Queste regioni sono facilmente visibili in quanto presentano uno spessore maggiore (a causa di lipidi con code di acidi grassi di maggiore lunghezza rispetto ai fosfolipidi) delle restanti parti del doppio foglietto fosfolipidico; hanno un diametro medio compreso tra 100 e 200 nm e ricoprono una porzione della membrana cellulare che varia dal 5% al 13%.

La formazione dei microdomini di membrana sembra favorita sia dalle caratteristiche chimico-fisiche dei lipidi che dalle interazioni tra proteine o lipidi-proteine; le catene degli acidi grassi presenti nei fosfolipidi dei *lipid raft* tendono ad essere più sature rispetto a quelle della membrana circostante e la presenza di sfingolipidi, meno fluidi rispetto ai fosfolipidi, sono in gran parte responsabili della maggior rigidità dei domini lipidici rispetto alla membrana circostante (Schroeder, 1994).

Questi microdomini di membrana sono fortemente arricchiti in colesterolo, sfingomieline e glicosfingolipidi, come il ganglioside GM1, usato come marker. La composizione proteica è caratterizzata da proteine G monometriche ed eterotrimeriche (Ras, Rap), proteine ancorate al glicosilfosfatidilinositolo (GPI), isoenzimi della proteina chinasi C (PKC) e tirosin chinasi non recettoriale della famiglia Src (Fyn, Lyn).

I *lipid raft* sono coinvolti in una serie di processi biologici, tra cui il traffico intracellulare (Morris et al., 2006), lo smistamento di lipidi e proteine (Allen et al., 2007) e la modulazione di segnali intracellulari per mezzo del reclutamento di molecole effettrici. Ciò si verifica in quanto, in seguito a certi stimoli, i *lipid raft* si fondono a formare grossi domini, inducendo il raggruppamento di differenti componenti di membrana (Pike, 2003).

Il metodo tradizionale per la purificazione dei domini sfrutta le loro caratteristiche e viene quindi condotto seguendo una procedura basata sulla loro resistenza ai detergenti non ionici a freddo e sulla bassa densità di flottazione (Gorodinsky, 1995). Per questo motivo i microdomini lipidici sono anche chiamati anche "*Detergent Resistant Membrane Fractions*" (DRM).

Nelle cellule neuronali gli unici microdomini esistenti sono i *lipid raft* mentre nelle cellule non neuronali coesistono con le *caveolae*. Questi due domini lipidici sono distinti dal punto di vista morfologico, biochimico e funzionale; hanno simile composizione lipidica, diversa composizione proteica e differenti funzioni fisiologiche (Schnitzer, 1995; Li et al., 1997).

1.5.3 I gangliosidi nei *lipid raft*

I gangliosidi rappresentano una componente fondamentale dei *lipid raft*; si tratta di glicosfingolipidi acidi, contenenti uno o più residui di acido sialico; essi sono presenti nella membrana plasmatica delle cellule dei vertebrati, dove sono localizzati sul foglietto esterno del doppio strato lipidico (Wiegandt, 1985) e sono particolarmente abbondanti nel tessuto nervoso, soprattutto nella

sostanza grigia dove raggiungono una concentrazione pari ad 1/10 dei fosfolipidi totali. I gangliosidi sono costituiti da una porzione oligosaccaridica, che sporge all'esterno, alla quale sono legate molecole di acido sialico in numero variabile da 1 a 7 mediante un legame β -glicosidico e da una porzione idrofobica, chiamato ceramide. Quest'ultimo è inserito nel plasmalemma ed è formato da una molecola di acido grasso e da una sfingosina. Gli zuccheri che possono essere presenti nella porzione oligosaccaridica sono: glucosio, galattosio, N-acetilglucosammina e fucosio.

Il ceramide è costituito invece dalla sfingosina, una base a lunga catena, legata mediante un legame amminico ad un acido grasso che nel sistema nervoso dei mammiferi è prevalentemente l'acido stearico. La sfingosina può essere lunga da 16 a 22 atomi di carbonio e contenere o meno doppi legami. I gangliosidi sono molecole anfipatiche che in soluzione acquosa possono assumere una forma monomerică oppure micellare. Poiché sono molecole eterogenee, sia nella porzione oligosaccaridica che nel ceramide, i gangliosidi sono classificati in base alla sequenza oligosaccaridica e al numero dei residui di acido sialico legati ad essa mediante un legame α -glicosidico. Nei mammiferi l'acido sialico più rappresentato è l'acido N-acetilneuraminico. La ganglio-serie predominante nel cervello è glucosio, galattosio, N-acetilgalattosammina e galattosio; l'acido sialico è legato a livello del galattosio interno in modo tale da formare un piano perpendicolare a quello della catena oligosaccaridica. Nella classificazione di Svennerholm per i gangliosidi cerebrali la lettera G indica il ganglioside, la lettera M un solo residuo di acido sialico, la D due residui, la T tre residui e la Q indica i tetrasialoglicosfingolipidi. Un numero è assegnato poi al composto individuale, che si riferiva inizialmente, alla sua migrazione in un determinato sistema cromatografico.

Struttura	Abbreviazioni
Neu5Ac3Gal4GlcCer	GM3
GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GM2
Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GM1a
Neu5Ac3Gal3GalNAc4Gal4GlcCer	GM1b
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal4GlcCer	GD3
GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD2
Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD1a
Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD1b
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1a
Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1b
Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1c

E' stato dimostrato, *in vitro*, che la composizione proteica e lipidica dei *lipid raft* di cellule granulari ottenute dal cervelletto di ratti ad 8 giorni di vita è soggetto a numerosi cambiamenti (Prinetti et al., 2001) nel tempo: in generale si assiste ad un incremento complessivo sia del contenuto proteico che lipidico.

1.5.4 **I lipid raft nella conversione della proteina prionica**

La proteina prionica, come le altre proteine con un'ancora GPI, è associata per la maggior parte del proprio ciclo vitale ai *lipid raft*; è necessario ricordare però che ogni proteina può associarsi alla membrana con diverse cinetiche e coefficienti di ripartizione; per esempio può essere dispersa in membrana e, dopo l'attivazione di una specifica via di trasduzione, spostarsi all'interno dei domini.

I *lipid raft* sembrano giocare un ruolo critico nella conversione conformazionale della proteina prionica cellulare nell'isoforma *scrapie*; nei *lipid raft* estratti dal cervello di topi infetti sono state trovate sia PrP^C che PrP^{Sc} (Taraboulos et al., 1992; Baron, 2003). Alcuni studi suggeriscono inoltre che PrP^C e PrP^{Sc} associate ai *lipid raft* abbiano caratteristiche diverse in quanto non co-frazionano in seguito a centrifugazione su gradiente di densità (Naslavsky et al., 1997); questo risultato suggerisce o che isoforme diverse della proteina prionica si associano a tipi differenti di *lipid raft* o che l'associazione alla membrana di ciascuna isoforma ha caratteristiche peculiari.

Un'altra prova a favore del coinvolgimento dei *lipid raft* nella conversione patogena della proteina prionica risiede nel fatto che la rimozione di PrP^C dai domini, per effetto dello scambio dell'ancora GPI con un dominio transmembrana, impedisce la formazione dell'isoforma *scrapie* (Kaneko et al., 1997). Il meccanismo attraverso cui i *lipid raft* potrebbero controllare la formazione di PrP^{Sc} non sono noti ma sono stati proposti diversi modelli.

In primo luogo i *lipid raft* potrebbero indirizzare la proteina prionica nativa allo specifico compartimento cellulare in cui avverrebbe poi l'effettivo cambiamento conformazionale (Sarnataro et al., 2004; Campana et al., 2005). Un'altra ipotesi è che i microdomini di membrana possano fornire un ambiente proteico e lipidico favorevole alla conversione di PrP^C in PrP^{Sc} concentrando le due proteine in piccole regioni della membrana, allineandole in modo da promuovere la loro interazione e fornendo molecole necessarie per il cambiamento conformazionale.

Un'altra possibilità è che i lipidi presenti nei *lipid raft* possano fungere da *chaperon* molecolari facilitando l'*unfolding* di una o più α -eliche ed il *re-folding* in foglietti- β . L'importanza del microambiente circostante per le reazioni di conversione conformazionale è stata dimostrata da numerosi studi in cui specifici lipidi si sono comportati da *chaperon* molecolari (Bogdanov, 1999; Sanders, 2000).

La proteina prionica ricombinante può essere indotta ad assumere una struttura prevalentemente ad α -elica (α -PrP) o ricca di foglietti- β (β -PrP); considerando che l'evento chiave nella conversione della proteina prionica nativa consiste proprio in un cambiamento conformazionale che prevede la riduzione di strutture ad α -elica a favore dei foglietti- β , il legame di queste proteine ricombinanti a

modelli di membrana è utilizzato per studiare meglio il ruolo dei *lipid raft* in questa conversione. Questi studi mostrano che l'associazione di α -PrP ai domini determina una stabilizzazione della struttura ad α -elica; al contrario se β -PrP si lega alle membrane simili ai *lipid raft* viene destabilizzata (Critchley, 2004). E' stato quindi ipotizzato, in base a questi risultati, un ruolo protettivo dei *lipid raft* nel processo di conversione della proteina prionica nativa (Baron, 2002). Questo effetto verrebbe però destabilizzato quando PrP^{Sc} esogena si inserisce in membrana vicino a PrP^C.

A riprova dell'importanza dell'ambiente lipidico nel processo di conversione della proteina prionica cellulare è stato dimostrato che un ridotto contenuto di sfingolipidi favorisce la conversione della proteina prionica nella forma scrapie (Naslavsky et al., 1999); trattando le cellule ScN2a con la fumonisina B1 (inibitore della ceramide sintasi) o la sfingomielinasi si ha una riduzione della sfingomielina e del ganglioside GM1 fino al 50% mentre PrP^{Sc} aumenta di 3-4 volte. Al contrario, il PDMP (un inibitore degli glicosfingolipidi) agisce riducendo PrP^{Sc} ed aumentando i livelli di sfingomielina. Questo dimostra che i livelli di PrP^{Sc} sono correlati inversamente con i livelli di sfingomielina (Naslavsky et al., 1999).

Inoltre, la distruzione dei *lipid raft*, mediante deplezione del colesterolo, decrementa la formazione di PrP^{Sc} (Gilch et al., 2006) così come il trattamento con la lovastatina, un inibitore della HMG-CoA reductasi (Taraboulos et al., 1995; Gilch et al., 2006). In aggiunta a ciò è stato dimostrato che l'aggiunta di colesterolo nei *lipid raft* inibisce il *misfolding* della proteina prionica (Scheinost et al., 2009). Un recente studio inoltre ha evidenziato che l'inibizione del riciclo di colesterolo impedisce la propagazione di PrP^{Sc} (Gilch et al., 2009).

Secondo questi studi è plausibile che modificazioni nella composizione dei lipidi che costituiscono i *lipid raft* possano influenzare la conversione della proteina prionica cellulare (PrP^C) nella forma scrapie (PrP^{Sc}).

1.6 IL TAGLIO DELL'ECTODOMINIO ED IL CLIVAGGIO DI PrP^C NELLA CONVERSIONE A PrP^{Sc}

Numerose proteine presenti sulla superficie cellulare sono soggette alla proteolisi post-traduzionale generando frammenti che spesso svolgono importanti funzioni biologiche; la stessa PrP^C può subire diversi tipi di taglio dell'ectodominio (Parkin, 2004) e due diversi tipi di clivaggio endoproteolitico (Hooper, 2005).

Una riduzione dei livelli di PrP^C sulla superficie cellulare, causata dal rilascio della proteina stessa dalla membrana, potrebbe teoricamente diminuire la formazione di PrP^{Sc} come effetto della riduzione della quantità di proteina prionica nativa disponibile alla conversione nell'isoforma patogena.

Nel 2004 Parkin ha individuato, nelle cellule di neuroblastoma umane, due possibili meccanismi di taglio dell'ectodominio: uno sembra essere dovuto all'intervento di una fosfolipasi mentre l'altro coinvolge l'azione di almeno una zinco-metalloproteasi; lo stesso Parkin, in collaborazione con Hooper, ha in seguito dimostrato che il taglio dell'ectodominio di PrP^C è mediato da almeno due membri della famiglia delle ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*): ADAM9 e ADAM10 (Walmsley, 2009). Questo studio inoltre smentisce, nel modello cellulare utilizzato, un coinvolgimento del taglio dell'ectodominio di PrP^C nella riduzione della formazione dell'isoforma *scrapie*.

Come abbiamo ricordato, PrP^C può essere soggetta a due principali tipi di clivaggio endoproteolitico; nel cervello umano ed in colture di neuroblastomi, è stata dimostrata l'esistenza di un clivaggio fisiologico che avviene all'interno della regione neurotossica della proteina, tra i residui 110 e 111, portando alla formazione di un frammento solubile N-terminale (N1) di 9 kDa e di un frammento C-terminale di 17 kDa (C1) che resta attaccato alla membrana mediante l'ancora GPI (Chen, 1995; Jimenez-Huete et al., 1998; Nieznanski, 2005). Questo clivaggio costitutivo o α -clivaggio, risulta essere stimolato da agonisti della protein chinasi C (Vincent et al., 2000) e mediato dalle metalloproteasi ADAM10 e ADAM17. Considerando che l' α -clivaggio avviene nella regione neurotossica di PrP^C, la quale sembra avere un ruolo fondamentale nella transizione conformazionale a PrP^{Sc}, è possibile ipotizzare un potenziale ruolo di questo taglio nella modulazione della patogenesi della malattia da prione.

La proteina prionica cellulare può essere anche tagliata all'interno o vicino alla ripetizione dell'octapeptide per generare un frammento C-terminale di 21 kDa (C2) ed il corrispondente frammento N-terminale solubile di 7 kDa (N2). Questo taglio è mediato da specie reattive dell'ossigeno (McMahon, 2001; Watt et al., 2005) ed è chiamato β -clivaggio.

Non è ancora chiaro quale ruolo abbiano le forme solubili di PrP^C nella malattia da prione; da una parte potrebbero essere richieste per le fasi iniziali dell'infezione ed un aumento del taglio di PrP^C potrebbe quindi favorire il processo infettivo. Dall'altra parte, l'aumento del taglio di PrP^C potrebbe ridurre la quantità di proteine legate alla membrana, necessarie per la successiva conversione in PrP^{Sc} (Kanu et al., 2002).

Nel 2005 Laffont-Proust ha dimostrato una correlazione positiva tra la quantità di frammenti C1 presenti nella corteccia cerebrale umana e la presenza della zinco-metalloproteasi ADAM10 (Laffont-Proust et al., 2005); al contrario nel 2009 Endres ha dimostrato che in topi transgenici la sovraespressione della proteina ADAM10 determina una riduzione dell'mRNA della PrP^C e dei prodotti del suo α -clivaggio (Prinzen et al., 2009). Questa discrepanza viene attribuita alle notevoli variazioni inter-individuali osservate negli studi su preparazioni di tessuto umani o alle differenze inevitabili tra primati e roditori. Risultati contraddittori, in modelli sperimentali differenti, riguardano anche la localizzazione cellulare di ADAM10 e la determinazione della sede dell' α -clivaggio di PrP^C. Nel 1995 Taraboulos sostiene che la presenza dei frammenti C1 a livello dei *lipid raft* suggerisce che l' α -clivaggio avvenga proprio a livello di questi microdomini di membrana

(Taraboulos et al., 1995) mentre altri studi suggeriscono che questo taglio endoproteolitico possa avvenire nel complesso di Golgi (Walmsley et al., 2009).

Negli esperimenti finora condotti però esiste un consenso comune sulla stimolazione dell' α -clivaggio di PrP^C da parte degli agonisti della PKC. Ne risulta che il significato funzionale della co-localizzazione della PrP^C e di PKC in alcuni *lipid raft* può essere spiegato in due modi: prima di tutto, PrP^C è un substrato della PKC e la fosforilazione-defosforilazione di PrP^C ne potrebbe modulare l'attività biologica; secondo, è stato dimostrato che il taglio fisiologico tra i residui 110/111-112 di PrP^C è regolato da effettori della via attivata dalla PKC (Vincent et al., 2000).

E' stato dimostrato inoltre che la riduzione dei livelli di colesterolo, indotta con la metil- β -ciclodestrina (M β CD) o la lovastatina, determina un aumento dell'attività α -secretasica di ADAM10; questo aumento è paragonabile a quello ottenuto con gli esteri del forbolo (agonisti della PKC). L'effetto della riduzione del colesterolo, ottenuta con la M β CD, è reversibile e sembra dipendere in parte dall'aumento della fluidità di membrana. Il trattamento con la lovastatina invece sembra stimolare l'espressione di ADAM10 (Kojro et al., 2001).

Le proteine ADAM appartengono ad una vasta famiglia di glicoproteine transmembrana, evolutivamente conservate dai protozoi ai mammiferi e caratterizzate da specifici domini proteici.

Finora sono state identificate circa 40 ADAM, meno della metà posseggono un sito catalitico attivo e solo alcune di queste, tra cui ADAM17, ADAM10 e ADAM9, risultano essere effettivamente dotate di un'attività protesica.

Le ADAM sono proteine integrali di membrana di tipo I e sono caratterizzate da una struttura a multi-dominio conservata tra le diverse specie. All'N-terminale è presente una sequenza segnale che direziona le proteine al *secretory pathway* seguita da un pro-dominio, un dominio metalloproteasico, un dominio disintegrinico, una regione ricca in cisteine ed un dominio EGF. E' presente poi una corta regione transmembrana ed un dominio citosolico; dopo la sintesi, queste proteine raggiungono il complesso di Golgi dove la loro maturazione si completa con processi di glicosilazione e la rimozione del prodominio mediante la convertasi 7 rendendo possibile la coordinazione dello zinco al dominio metalloproteasico (Reiss, 2009).

Sembra che ADAM10 promuova il clivaggio costitutivo, mentre ADAM17 (TACE: *TNF α converting enzyme*) potrebbe essere responsabile del clivaggio PKC-dipendente ma a tal proposito risultati contrastanti sono ottenuti in modelli sperimentali diversi.

I substrati delle ADAM sono numerosi ed includono le caderine, la L-selectina, il TNF α , l'APP, i ligandi del recettore per l'EGF, il recettore Notch e numerosi altri ancora.

Sono stati inoltre generati topi ADAM *knockout* e solamente la mancata espressione di ADAM10, ADAM17, ADAM19 e ADAM22 ha determinato la morte degli animali già a livello embrionale oppure perinatale.

Le ADAM sono proteine transmembrana che hanno la caratteristica unica di poter mediare sia l'adesione cellulare, mediante il loro dominio disintegrinico, che il rilascio proteolitico di proteine di membrana. Queste proteasi quindi risultano implicate in numerosi processi pato-fisiologici che comprendono la neurogenesi, le malattie infiammatorie, il cancro e la fertilità.

2.SCOPO DELLA TESI

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili rappresentano un ampio gruppo di patologie neurodegenerative che possono colpire sia l'uomo che numerosi animali; tra queste malattie le più note sono la sindrome di Creutzfeldt-Jakob (CJD) nell'uomo, l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) e lo Scrapie nelle pecore. Queste patologie hanno un lungo periodo di incubazione ma una volta manifeste la loro progressione è molto rapida e conduce inevitabilmente alla morte. Allo stato attuale non è stato individuato alcun trattamento efficace.

L'agente eziologico comune a queste malattie è rappresentato unicamente dall'isoforma anomala, denominata *scrapie*, della proteina prionica nativa (PrP^C). Quest'ultima è una glicoproteina associata alla superficie cellulare mediante un'ancora GPI e risulta espressa prevalentemente a livello neuronale; il suo ruolo fisiologico non è stato tuttora ben definito ma, considerando l'elevata conservazione della sua sequenza aminoacidica nelle diverse specie animali, si può ipotizzare che svolga importanti funzioni fisiologiche. In particolare la proteina prionica nativa sembra essere coinvolta nella protezione dallo stress ossidativo (Singh, 2010), nella trasduzione dei segnali (Chiarini, 2002), nella trasmissione sinaptica (Mallucci, 2002; Collinge, 1994), nella neuritogenesi (Graner, 2000) e nell'apoptosi (Mattei, 2011).

La proteina prionica nativa localizza preferibilmente in microdomini lipidici di membrana, arricchiti in colesterolo e glicosfingolipidi, denominati *lipid raft*; questi ultimi sembrano svolgere un ruolo determinante nella conversione della proteina prionica nell'isoforma *scrapie*, strutturalmente ricca in β -foglietti. La deplezione di colesterolo mediante lovastatina, un inibitore dell'HMG-CoA reduttasi, determina la distruzione dei *raft* e riduce la formazione di PrP^{Sc} (Taraboulos, 1995; Marella, 2002; Bate, 2004); inoltre la rimozione di PrP^C dai microdomini, ottenuta sostituendo l'ancora-GPI con un dominio transmembrana e citosolico di una proteina non associata ai *raft*, previene la formazione di PrP^{Sc} (Taraboulos et al., 1995). Altri studi invece (Wang et al., 2007) dimostrano che la deplezione di sfingolipidi determina un'aumentata formazione dell'isoforma *scrapie*.

I *raft* fornirebbero un ambiente favorevole alla conversione di PrP^C in PrP^{Sc}, concentrando le due proteine in piccole regioni della membrana, allineandole in modo da promuovere la loro interazione e fornendo le molecole richieste per la formazione di PrP^{Sc} (Sarnataro et al., 2004; Campana et al., 2005). Dal momento che i gangliosidi rappresentano una componente lipidica fondamentale dei *lipid raft*, una particolare attenzione è stata rivolta verso queste molecole.

E' stato dimostrato che i gangliosidi possono muoversi liberamente nelle regioni *raft* e *non-raft* della membrana cellulare e che gangliosidi esogeni, presenti nel medium di coltura, possono essere incorporati facilmente dalle cellule a livello della membrana plasmatica (Moss, 1976). In base a queste premesse considerando che la conversione della proteina prionica nativa nell'isoforma patogena sembra avvenire all'interno dei microdomini lipidici, uno degli scopi di questa tesi è di verificare se, modificando la composizione lipidica delle membrane cellulari, e quindi dei *lipid raft* stessi, si possa indurre una ridistribuzione di PrPC sulla membrana plasmatica nelle zone non-raft, riducendo così la quantità di proteina suscettibile alla trasformazione nell'isoforma patogena. La proteina prionica cellulare inoltre può essere interessata dal clivaggio naturale che avviene

all'interno di una regione della proteina (residui 106-126) che sembra essere fortemente coinvolta nella trasformazione all'isoforma patogena. Questo taglio endoproteolitico determina la formazione di un frammento solubile N-terminale (N1) e di un frammento C-terminale (C1) che resta associato alla membrana cellulare tramite l'ancora GPI ma non può più essere convertito in PrP^{Sc} (Harris et al., 1993). Questo clivaggio prende il nome di clivaggio costitutivo o α -clivaggio.

Il fatto che l' α -clivaggio avvenga nella regione neurotossica centrale di PrP^C che ha un ruolo fondamentale nella transizione conformazionale a PrP^{Sc}, chiaramente evidenzia un potenziale ruolo del clivaggio costitutivo nella modulazione della patogenesi della malattia da prione.

E' ormai noto che il normale clivaggio di PrP^C è stimolato da agonisti della via di segnale della proteina chinasi C (Vincent et al., 2000) ed è mediato da ADAM10 e ADAM17, due metalloproteasi ad attività disintegrinica.

Studi condotti su cellule granulari di cervelletto di ratto in coltura hanno inoltre dimostrato che l'attivazione della PKC può indurre cambiamenti sul foglietto esterno della membrana plasmatica modulando lo stato di segregazione dei glicolipidi (Palestini, 1998); in particolare è stato osservato che il pretrattamento con glutammato o con PMA (un agonista della PKC) riduce la suscettibilità del GT1b e del GD1a alla sialidasi di *Vibrio cholerae*.

In liposomi di fosfatidiliserina inoltre è stato dimostrato che un incremento del contenuto di gangliosidi può modificare l'attività della proteina chinasi C stessa influenzando le caratteristiche strutturali del doppio strato fosfolipidico: in particolare, all'aumentare della concentrazione di GM1 si ha un incremento graduale dell'attività dell'enzima seguito poi da una progressiva diminuzione quando la concentrazione del ganglioside supera il 2% molare (Pei, 2002). Quanto osservato in letteratura dimostra l'importanza del ruolo svolto dall'ambiente lipidico di membrana nella modulazione dell'attività enzimatica di questa chinasi. Abbiamo quindi ipotizzato che la modificazione della composizione lipidica della membrana plasmatica, mediante trattamento delle cellule in coltura con diversi gangliosidi, possa indurre, via PKC, un aumento dell'attività catalitica di ADAM10 e/o ADAM17 con un risultante incremento della formazione dei frammenti N1 e C1 e riduzione della quantità di proteina prionica intera passibile alla conversione nell'isoforma *scrapie*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 APPARECCHIATURE

- Centrifuga BR4i, *Jouan Laboratory-Equipment*
- Centrifuga TL-100, *Beckman Coulter*
- Ultracentrifuga Optima L90K, *Beckman Coulter*
- Sonicatore Ultrasonics Branson 2510, *Branson*
- Spettrofotometro Microplate reader 550, *Bio-Rad*
- Densitometro GS710, *Bio-Rad*
- Apparecchiatura per elettroforesi Mini-protean II, *Bio-Rad*
- Apparecchiatura per western blotting, *Hofer*
- Microscopio IX50, *Olympus*
- Incubatore CB 150, *Binder*
- Stufa Venticell VC55, *MMM Group*
- Beta-Imager 2000 Z, *Biospace*
- Tri-Carb 1900 CA, *Packard*
- Cappa sterile a flusso laminare verticale VBH 48 MP/99, *Steril S.p.a*
- Camera CCD e software di imaging molecolare, *Kodak dS Image station 2000R*
- Microscopio confocale LSM-710, *Zeiss*

3.2 MATERIALI

- Medium per colture cellulari (*Basal Medium Eagle*), glutammina, gentamicina, inibitore della tripsina (SBTI), citosina-arabinosio-furanoside (AraC), acido morfolinoetanosulfonico (MES), poli-L-lisina, fluoruro di sodio (NaF), sodio ortovanadato (Na₃VO₄), fluoruro di fenilmetansulfonile (PMSF), leupetina, glicina, glicerolo, Hepes, sodio-dodecil-solfato, β-mercaptoetanololo, TEMED, (Sigma-Aldrich);
- DNasi (Roche);
- Siero fetale bovino (EuroClone);
- Membrane di nitrocellulosa (Amersham);
- Saccarosio, idrossido di sodio (Merck);
- Acrilammide, persolfato d'ammonio, standard proteici (Bio-Rad);
- Anticorpi primari anti-ADAM10, anti-proteina chinasi C (Santa Cruz Biotechnology);
- Anticorpi primari anti-proteina prionica 8G8, anti-proteina prionica SAF32 (Cayman Chemical);
- Anticorpo primario anti-proteina prionica 6H4 (Prionics); anticorpo primario anti-ADAM17 (Abcam);
- Anticorpo anti-THY1 (Chemicon);

- Anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano (List Biological);
- PNGasi F (New England Biolabs);
- Soluzione di gelatina, 4,6-diaminidino, 2-fenilindolo (DAPI), (Sigma);
- Subunità B della tossina colerica coniugata con Alexa Fluor 594, anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor 594 od Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

3.3 COLTURE CELLULARI PRIMARIE

Il modello cellulare utilizzato è rappresentato da colture primarie di cellule granulari ottenute prelevando i cervelletti di ratti Sprague-Dawley (Charles River) all'ottavo giorno di vita. Sono state allestite come descritto da Gallo et al., 1982 e da Vaccarino et al., 1987 attuando le modifiche introdotte da Schramm et al., 1990 e Valsecchi et al., 1993.

Le colture ottenute sono costituite per il 95% da cellule granulari con una contaminazione di cellule gliali mantenuta attorno al 5%. Per impedire la proliferazione delle cellule non neuronali è stata aggiunta citosina-arabinosio-furanoside (AraC) ad ogni piastra.

L'AraC, essendo un analogo della citidina, agisce inibendo la sintesi degli acidi nucleici; la sua incorporazione interferisce quindi con i processi di divisione cellulare ed esercita un'azione citostatica sulle cellule in attiva proliferazione.

Le cellule granulari vengono utilizzate all'ottavo giorno in coltura. Durante il primo giorno *in vitro* dalle cellule originano i coni di crescita e nei giorni a seguire si osserva l'emissione dei neuriti. Il differenziamento morfologico e funzionale vengono completati solo all'ottavo giorno in coltura con lo sviluppo di una fitta rete di fibre fascicolate che connettono le cellule, la formazione di sinapsi attive e l'espressione di recettori e neurotrasmettitori del sistema glutammatergico (Gallo et al., 1982).

SOLUZIONI PER LA PREPARAZIONE DI COLTURE PRIMARIE DI CELLULE GRANULARI

Soluzione bicarbonato KREBS-RINGER (KRB):

NaCl	1,2 M
KCl	0,048 M
KH ₂ PO ₄	0,012 M
Glucosio	0,14 M
NaHCO ₃	0,25 M
Rosso Fenolo	0,01 %

Soluzione 1:

KRB supplementato con

BSA	0,3 %
MgSO ₄	0,95 mM

Soluzione 2:

soluzione 1 supplementata con

Tripsina	2345 unità/L
----------	--------------

Soluzione 3:

soluzione 1 supplementata con

DNAsi	0,008 %
SBTI	52 mM
MgSO ₄	3,17 mM

Soluzione 4:

soluzione 1 e soluzione 3 in rapporto 21:4 (v/v)

Soluzione 5:

soluzione 1 supplementata con

MgSO ₄	2,5 mM
CaCl ₂	0,12 mM

Terreno di coltura completo:

BME contenente 10% di FCS inattivato con incubazione per 30 minuti a 57 °C supplementato con

Gentamicina	0,01 %
Glutammina	0,03 %
KCl	20 mM

Tutte le operazioni in seguito descritte vengono eseguite sotto cappa sterile a flusso laminare, a temperatura ambiente.

Il procedimento inizia con il taglio della cute, il sollevamento della calotta cranica ed il prelievo del cervelletto. Quest'ultimo viene privato delle meningi, lavato con la soluzione 1 e finemente tagliato con una lametta per una prima omogeneizzazione meccanica.

L'omogenato ottenuto è stato risospeso con la soluzione 1, trasferito in provette e sottoposto a centrifugazione a 180 g per 1 minuto. Il *pellet*, separato dal surnatante, è stato risospeso con la soluzione 2, preriscaldata alla temperatura di 37°C, per ottenere una blanda separazione delle cellule mediante tripsinizzazione. La sospensione ottenuta è stata mantenuta in continua agitazione in un bagno termostato alla temperatura di 37°C per 15 minuti; è stato poi aggiunto un egual volume di soluzione 4 contenente SBTI, un inibitore della tripsina, e DNAsi, un enzima che dissocia gli aggregati di materiale cromatinico eventualmente fuoriuscito dalle cellule danneggiate dalla tripsina. La sospensione cellulare è stata quindi trasferita in apposite provette e centrifugata a 180 g per 1 minuto.

Ai *pellet*, dopo separazione dal surnatante, è stata aggiunta la soluzione 3, contenente anch'essa SBTI e DNAsi, per bloccare completamente l'azione della tripsina. Al fine di ottenere una maggior disaggregazione delle cellule, i *pellet* sono stati omogeneizzati meccanicamente con una pipetta Pasteur. Si attendono circa 2 minuti per permettere la spontanea precipitazione sul fondo della provetta di ammassi cellulari non disgregati; il surnatante lattescente viene trasferito nella soluzione 5. Il trattamento sopra descritto è stato ripetuto più volte fino alla completa scomparsa degli aggregati.

La sospensione cellulare così ottenuta è stata raccolta in provette idonee e centrifugata a 60 g per 5 minuti. Dopo aver aspirato il surnatante, il *pellet* viene risospeso in un volume noto di terreno di crescita ottenendo così l'omogenato cellulare ed un'aliquota viene utilizzata per la conta nella camera di Neubauer. Dopo aver determinato il numero di cellule presenti nel volume di terreno in cui è stato risospeso il *pellet*, è stato calcolato il volume di terreno di crescita necessario a diluire l'omogenato cellulare al fine di ottenere una concentrazione pari a $9 \cdot 10^5$ cellule/ml. In seguito alla diluizione, 10 ml di sospensione sono stati seminati in piastre aventi un diametro di 100 mm e 6 ml della stessa sospensione sono seminati in piastre di 60 mm di diametro in cui sono stati posizionati due vetrini coprioggetto.

Le piastre sono precedentemente trattate con 10 ml di una soluzione di poli-L-lisina (10 mg/ml), rimossa dopo circa 2 ore, per permettere l'adesione delle cellule alle piastre stesse.

Le piastre, contenenti le colture cellulari, vengono mantenute a 37°C in un termostato umidificato al 5% di CO₂ in aria.

Il giorno seguente è stata aggiunta ad ogni piastra AraC (concentrazione finale di 2,5 µg/µl) per bloccare la replicazione delle cellule non neuronali.

3.4 TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI

Soluzione di Locke (pH 7.40):

NaCl	154 mM
D-Glucosio	5,6 mM
KCl	5,6 mM
NaHCO ₃	3,6 mM
CaCl ₂ ·4H ₂ O	2,3 mM
HEPES	5 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM

Le cellule granulari all'ottavo giorno in vitro sono state sottoposte al trattamento con i gangliosidi GM1 o GD1a o GT1b come descritto da Pitto et al., 1999.

In una provetta di vetro sterile è preparata una soluzione di Locke contenente il ganglioside d'interesse (GM1o GD1a o GT1b) alla concentrazione finale di $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Per calcolare la quantità di ganglioside incorporato dalle cellule, due piastre sono sottoposte a "pulse" con una soluzione, nel caso del trattamento col GM1, di [3H]-GM1 e GM1 (concentrazione finale $2 \cdot 10^{-6}$ M). Per preparare questa soluzione, sono stati prelevati prelevati 1.8 μ Ci di [3H]-GM1 ripreso in Cloroformio e Metanolo 2:1, (radioattività specifica 1,2 Ci/mmmole). Il solvente è stato evaporato con un debole flusso di azoto ed il GM1 radiomarcato è stato nuovamente risospeso in Cloroformio e Metanolo 2:1, evaporato con azoto, poi lasciato 20 minuti a 37°C per eliminare ogni residuo di solvente. Infine, è stato risospeso in 10ml della soluzione contenente GM1 non marcato, per arrivare alla concentrazione finale di $2 \cdot 10^{-6}$ M. Questa soluzione è stata agitata e sonicata ripetutamente per 1h, in modo da avere una soluzione omogenea, infine posta a 37°C per 15 minuti.

Il valore di radioattività è stato controllato prima del trattamento delle cellule tramite il contatore di scintillazione liquida Beta-Imager 2000 Z. Le piastre sono state lavate per 2 volte con la soluzione di Locke e messe in incubazione con la stessa soluzione per 1 ora a 37°C. In seguito, due piastre sono sottoposte a *pulse* con la soluzione di [3H]-GM1 e GM1, mentre le altre vengono sottoposte ad incubazione con la soluzione contenente GM1 non radiomarcato a 37°C per 4 ore o a 4°C per 4 ore. In esperimenti paralleli alcune piastre sono incubate con la sola soluzione di Locke a 37 °C o a 4°C per 4 ore e rappresentano il controllo

Per il trattamento con GD1a si è seguita la stessa procedura ma il trattamento delle cellule è stato effettuato solo a 37°C per 4 ore. Il trattamento delle cellule con GT1b è stato effettuato solo col ganglioside non radiomarcato.

Trascorse 4 ore, le cellule sono state lavate nuovamente con soluzione di Locke per 3 volte e incubate col terreno, che prima era stato loro tolto, per 20 minuti a 37°C (*chase*). Questa incubazione in presenza di siero è necessaria per rimuovere la quota di ganglioside debolmente associata al doppio strato fosfolipidico e non inserita in membrana. In seguito, si procede alla purificazione delle frazioni di membrana resistenti ai detergenti (DRM) ed al frazionamento cellulare.

3.5 PURIFICAZIONE DELLE FRAZIONI DI MEMBRANA RESISTENTI AI DETERGENTI (DRM)

Tampone MBS 1X:

tampone MES pH 6.5	25 mM
NaCl	150 mM

Soluzione MBS-T:

tampone MBS 1X addizionato con

TritonX-100	1%
-------------	----

Al momento dell'utilizzo sono stati aggiunti ad entrambe le soluzioni gli inibitori delle proteasi:

PMSF	1 mM
Leupeptina	75 unità/ml

Soluzioni di saccarosio per il gradiente discontinuo:

Saccarosio 80%:	80 g di saccarosio in 100ml di MBS 1X
Saccarosio 30%:	30 g di saccarosio in 100ml di MBS 1X
Saccarosio 5%:	5 g di saccarosio in 100ml di MBS 1X

Per la preparazione delle frazioni di membrana resistenti ai detergenti (DRM) sono state raccolte, secondo la procedura descritta da Palestini et al., 2002 , le cellule di 6 piastre da 100 mm di diametro per ogni gradiente.

Le cellule, trattate o meno con i rispettivi gangliosidi, sono state lavate 2 volte con la soluzione di Locke a 4°C, raccolte in 5 ml della stessa soluzione e poi centrifugate a 1600 g per 5 minuti.

In seguito ad aspirazione del surnatante, i *pellet* sono risospesi in 2 ml di soluzione MBS-T contenente gli inibitori delle proteasi e lasciati in ghiaccio per 30 minuti. I campioni sono quindi

omogeneizzati mediante l'utilizzo di un potter e viene prelevata un'aliquota dell'omogenato, mantenuta poi a -20°C. Dopo il trasferimento in provette da centrifuga, ai campioni sono stati aggiunti 2 ml di saccarosio 80%, in modo tale da ottenere una concentrazione finale pari al 40%. Successivamente sono stati stratificati sopra ai campioni 4 ml di saccarosio 30% e 4 ml di saccarosio 5% ottenendo così un gradiente di saccarosio discontinuo. Il gradiente è stato ultracentrifugato per 18 ore a 250000g a 4°C utilizzando un rotore BECKMAN SW41. Dal gradiente sono state raccolte, dall'alto verso il basso, 12 frazioni da 1 ml ciascuna; la frazione 5, corrispondente alla banda opaca migrata all'interfaccia 5%-30% di saccarosio, contiene i *lipid raft*, le componenti di membrana a bassa densità di galleggiamento resistenti ai detergenti (DRM). Le frazioni dalla 6 alla 8 vengono chiamate *intermediate density fractions* (IDF) e quelle dalla 9 alla 12 *high density fractions* (HDF).

Dalle 12 frazioni e dall'omogenato, ottenuti dalle cellule trattate con i diversi gangliosidi, viene prelevata un'aliquota poi sottoposta a conteggio della radioattività.

Tutti i campioni ottenuti dalle cellule trattate con i gangliosidi e da quelle controllo sono analizzati per contenuto proteico.

3.5.1 FRAZIONAMENTO CELLULARE

Buffer di estrazione A :

Tris HCl a pH 7.4	20 mM
EDTA	2 mM
EGTA	0,5 mM
NaF	10 mM

Buffer di estrazione A-T:

buffer di estrazione A miscelato con

Triton X-100	1%
--------------	----

Al momento dell'utilizzo vengono aggiunti , ad entrambe le soluzioni, gli inibitori delle proteasi:

Na ₃ VO ₄	1 mM
PMSF	0,5 mM
Leupeptina	10 µg/ml

Per gli esperimenti di frazionamento cellulare sono state utilizzate un numero opportuno di cellule all'ottavo giorno di coltura in vitro, seguendo il protocollo già descritto in lavori precedenti (Palestini et al., 2002).

Le cellule, trattate o meno coi gangliosidi, sono state lavate 2 volte con la soluzione di Locke e raccolte in 2,5 ml di Buffer di estrazione A contenente gli inibitori delle proteasi. I campioni vengono prima sonicati ed in seguito, al fine di omogeneizzare le cellule, è stata usata una pipetta automatica (P-200), attraverso la quale sono stati fatti passare i campioni per 40 volte.

Dagli omogenati è stata prelevata un'aliquota ed il rimanente è stato trasferito in provette da centrifuga e centrifugato a 100000 g per 1 ora a 4°C, in una centrifuga Beckman TL-100 con rotore ad angolo fisso. I surnatanti rappresentano le frazioni citosoliche mentre i *pellet* sono arricchiti in plasmamembrane.

Le proteine di membrana sono state estratte dai *pellet* utilizzando 2,5 ml di buffer di estrazione A-T contenente gli inibitori delle proteasi; i pellet vengono quindi omogeneizzati come descritto sopra e dopo una breve sonicazione sono posti in ghiaccio per 30 minuti. Gli estratti sono stati trasferiti in opportune provette e centrifugati a 15000 g per 20 minuti a 4°C. I surnatanti ottenuti rappresentano le frazioni di membrana.

Dalle frazioni citosoliche, dalle frazioni di membrana e dall'omogenato, ottenuti dalle cellule trattate coi gangliosidi, è stata prelevata un'aliquota e sottoposta a conteggio della radioattività. In seguito, tutti i campioni sono analizzati per contenuto proteico.

3.6 DOSAGGIO DELLE PROTEINE

L'analisi proteica viene condotta in seguito a precipitazione con acido tricloroacetico (TCA) 30% delle 12 frazioni dei gradienti di saccarosio e a dialisi delle frazioni citosoliche e di membrana.

Un'aliquota di ciascun campione è analizzata per contenuto proteico mediante dosaggio con BCA.

Metodo con BCA

L'acido bicinconinico (BCA), sottoforma del suo sale sodico solubile in acqua, è un reagente sensibile, stabile ed altamente specifico per gli ioni Cu⁺. I legami peptidici e quattro amminoacidi (cisteina, cistina, triptofano e tirosina) sono considerati responsabili della produzione di colore nei campioni proteici dosati mediante BCA.

Il reattivo è costituito da una soluzione di solfato di rame (Cu₂SO₄) alcalino contenente tartrato di sodio. Gli ioni Cu²⁺ vengono ridotti dai residui amminoacidici dei campioni proteici a ioni Cu¹⁺.

Proteine + Cu²⁺ → Cu¹⁺ in ambiente alcalino

La reazione di due molecole di BCA con uno ione Cu⁺ sviluppa un colore violaceo con un massimo di assorbimento a 562 nm.

$2 \text{ BCA} + \text{Cu}^{1+} \rightarrow \text{complesso BCA-Cu}^{1+}$ con forte assorbenza a 562 nm

Le soluzioni utilizzate sono:

Soluzione A

1000 ml di reagente base, che contiene carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, reagente BCA e tartrato di sodio in 0,2 M NaOH.

Soluzione B

25 ml di soluzione di solfato di rame (Cu_3SO_4) 4%.

Viene utilizzata una piastra contenente 96 pozzetti disposti in 12 file da 8. Nella fila 1, i primi 2 pozzetti sono occupati dal bianco, costituito da acqua bidistillata per un volume di 10 μl in ciascun pozzetto.

Nei seguenti 6 pozzetti è stato seminato il primo standard (albumina di siero bovino 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in doppio, come descritto:

2 μl (0.4 μg);

4 μl (0.8 μg);

10 μl (2 μg).

Nei successivi 8 pozzetti della fila 2 è stato seminato il secondo standard (albumina di siero bovino 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sempre in doppio, in questo modo:

2 μl (4 μg);

3 μl (6 μg);

5 μl (10 μg);

8 μl (16 μg).

A questo punto sono state aggiunte nelle file restanti le opportune quantità di campioni, sempre in doppio.

Alla fine tutti i pozzetti, relativi agli standard e ai campioni, sono stati portati ad un volume finale di 10 μl con acqua bidistillata. La miscela di reazione (soluzione C) è preparata unendo le soluzioni A e B nel rapporto 50:1.

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μl di soluzione C e la vaschetta è stata messa a 37°C per 30 minuti. Trascorso tale tempo viene fatta la lettura dell'assorbanza a 562 nm allo spettrofotometro (Microplate Reader 550, Bio-Rad). Questo strumento, automaticamente, fornisce il contenuto proteico dei vari campioni, ovvero costruisce una retta di taratura utilizzando gli

standard e da questa ricava, attraverso un'analisi di regressione lineare, i microgrammi di proteine di ciascun campione.

3.7 ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE

Soluzione A: *RESOLVING GEL* al 12%

Acqua bi-distillata	4,9 ml
Acrilammide 30 %	6 ml
Tris 1,5 M pH 8.8	3,8 ml
Sodiododecilsolfato (SDS) 10%	150 µl
APS 10 %	150 µl
TEMED	6 µl

Soluzione B: *STACKING GEL*

Tris 0.5 M pH 6.8	2,95 ml
Acrilammide 30 %	750 µl
Acqua bi-distillata	1,25 ml
APS 10 %	50 µl
TEMED	5 µl

Soluzione C: *RUNNING BUFFER*

RUNNING BUFFER 5X:

Tris 15,1 g

Glicina 94 g

Acqua bi-distillata fino a volume finale di 1000 ml

Il running buffer si utilizza a concentrazione finale 1X con l'aggiunta di SDS 0,1%.

Soluzione D: LAEMMLI BUFFER 5X

Tris pH 6.8	250 mM
SDS	10%
Glicerolo	50%
β -Mercaptoetanolo	5%
Blu di bromofenolo	0,5%

L'elettroforesi SDS-PAGE condotta secondo il metodo ideato da Laemmli (Laemmli, 1970) permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare; prevede l'impiego di un detergente anionico, il sodio dodecilsolfato (SDS) che funge da denaturante proteico e conferisce una carica globale negativa alle catene proteiche da analizzare. Di conseguenza la migrazione delle proteine nel gel di acrilammide dipende esclusivamente dalla loro massa. La corsa elettroforetica è effettuata utilizzando l'apparecchiatura Bio-Rad Mini-protean II.

La soluzione A (*resolving gel*) viene lasciata polimerizzare per 1 ora nel "sandwich" dell'apparecchiatura Bio-Rad, costituito da due lastre di vetro separate da due spaziatori di 1,5 mm. Successivamente la soluzione B (*stacking gel*), preparata al momento dell'utilizzo, viene posta sopra al resolving gel e, dopo inserzione di un apposito pettine di plastica, è lasciata polimerizzare per 1 ora a temperatura ambiente. A gelificazione ultimata, il pettine viene tolto lasciando nello *stacking gel* i pozzetti di alloggio per il caricamento dei campioni e dello standard (una miscela di proteine a peso molecolare noto). Il risultato finale è un gel particolarmente risolvente rappresentato da un sistema di tipo discontinuo: uno *stacking gel* più lasso, necessario all'impaccamento dei campioni in modo che la loro entrata nel resolving gel sia sincrona, ed il resolving gel, di dimensioni maggiori e con porosità ridotta, utilizzato per separare le proteine in base al proprio peso molecolare.

Per la migrazione elettroforetica adeguate quantità di campioni sono state risospese nel Laemmli *buffer* (concentrazione finale 1X), bollite per 5 minuti a 100 °C e centrifugati per 2 minuti a 18400 g. Il β -mercaptoetanolo, presente nel Laemmli *buffer*, riduce i ponti disolfuro eventualmente presenti nelle proteine destabilizzandone la struttura terziaria, mentre l'SDS legandosi fortemente alle proteine, le denatura e conferisce loro una carica negativa.

Nel frattempo il gel, non ancora caricato con i campioni, viene assemblato nell'apparato per l'elettroforesi, rappresentato dalla cella elettroforetica costituita da due vasche contenenti ciascuna un elettrodo. I campioni sono stati risospesi nel Laemmli *buffer* quindi caricati nei pozzetti lasciandone libero uno per lo standard. Terminato ciò le due vasche vengono riempite di soluzione C (*running buffer*) ed il tutto viene collegato ad un generatore di corrente che applica una differenza di potenziale tra i due elettrodi, generando nel gel un gradiente di potenziale elettrico.

In queste condizioni i complessi SDS-proteina migrano in modo inverso alla loro dimensione; essendo carichi negativamente continuano a muoversi verso l'anodo ed avendo la medesima carica per unità di lunghezza (in media una molecola di SDS si lega ogni due aminoacidi della

catena) si spostano all'interno del *resolving* gel con la stessa mobilità. La separazione dei complessi SDS-proteina avviene quindi in base agli effetti di setaccio molecolare dovuti alle dimensioni dei pori del gel.

La corsa è stata condotta a due diversi voltaggi: ad 80 Volt, fino al superamento da parte del fronte di migrazione dello *stacking* gel e a 100 Volt per il resto della corsa elettroforetica.

L'utilizzo del blu di bromofenolo, presente nel Laemmli *buffer*, consente infatti di individuare la posizione del fronte di migrazione. L'elettroforesi termina quando il fronte raggiunge il fondo del *resolving* gel. Al termine della corsa elettroforetica segue il *Western Blotting*.

3.8 WESTERN BLOTTING

Per identificare le diverse proteine presenti in ciascun campione sono stati allestiti esperimenti di *Western blotting* utilizzando i gel ottenuti dall'elettroforesi.

Soluzione 1: PBS 10X (pH 7.40)

NaCl 1,37 M

KCl 0,027 M

Na₂HPO₄ 0,089 M

KH₂PO₄ 0.015 M

Soluzione 2: SOLUZIONE DI BLOCKING

Latte in polvere 5%

Tween-20 0,2%

Portato a volume finale con la soluzione 1 (concentrazione finale 1X).

Soluzione 3: TRANSFER BUFFER

Tampone CAPS (acido-3(cicloesilammino)-1propansolfonico) 100 mM pH 11

Metanolo 10%.

Per questi esperimenti è stata utilizzata un'apparecchiatura costituita da una vaschetta dotata di un sistema di raffreddamento esterno ad acqua, nella quale sono inserite delle griglie. I gel SDS-PAGE, al termine della corsa elettroforetica, sono stati lasciati per 5 minuti ad equilibrarsi nella soluzione 3 (*transfer buffer*).

La membrana di nitrocellulosa viene lavata in acqua bidistillata e quindi immersa nel *transfer buffer*, per qualche minuto, ad equilibrarsi con le spugnette e la carta assorbente (3 mm).

Dopo aver preparato tutti i componenti sono stati allestiti i "sandwich". Le griglie vengono aperte e su di esse sono disposti: una spugna, 2 fogli di carta assorbente (ben imbevuti di *transfer buffer*), il gel, la membrana di nitrocellulosa, altri 2 fogli di carta assorbente ed infine un'altra spugna (sempre ben imbevuti di *transfer buffer*). Dopo aver rimosso eventuali bolle d'aria, le griglie vengono chiuse e disposte all'interno della vaschetta facendo attenzione a posizionarle in modo tale che la membrana sia rivolta verso il polo positivo mentre il gel verso quello negativo, al fine di consentire il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana.

La vaschetta è stata poi riempita con il *transfer buffer* e collegata al generatore di corrente. Il trasferimento avviene per 2 ore e 15 minuti a 250 mA a 4°C .

Per verificare l'effettivo trasferimento delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa quest'ultima viene immersa per 5 minuti in una soluzione di Rosso Ponceau, che lega indiscriminatamente le proteine e successivamente si lava il colorante non legato con acqua bidistillata per 2 minuti. Se il trasferimento è avvenuto correttamente risulteranno visibili le bande corrispondenti alle proteine.

L'immagine della membrana di nitrocellulosa è stata quindi acquisita al densitometro prima di essere decolorata completamente con PBS 1X.

La membrana viene poi immersa nella soluzione 2 per 1 ora a temperatura ambiente o a 4°C per tutta la notte, per permettere la saturazione dei siti di legame aspecifici delle proteine e procedere all'*immunoblotting*.

In seguito la membrana viene incubata per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse, opportunamente diluito nella soluzione di *blocking* (anti-PKC 1:200, anti-ADAM10 1:200, anti-ADAM17 1:500, anti-PrP6H4 1:2500, anti-PrP8G8 1:200, anti-PrPSAF32 1:1000). In seguito vengono effettuati quattro lavaggi, di 15 minuti ciascuno, con la soluzione 2.

La membrana è stata mantenuta per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente ed in continua agitazione con l'anticorpo secondario HRP (*Horse-radish peroxidase*)-coniugato, sempre diluito in modo opportuno nella soluzione di *blocking*. Si effettuano quindi quattro lavaggi, di 15 minuti ciascuno, con la soluzione di *blocking* ed un ultimo lavaggio, sempre di 15 minuti, con il PBS 1X. Terminati i lavaggi, si procede con la rivelazione delle proteine di interesse mediante il sistema *ECL (Enhanced Chemio-luminescence)*: in presenza di perossido d'idrogeno (H_2O_2) e di luminolo (substrato chemioluminescente), la perossidasi di rafano riduce l' H_2O_2 e ossida il luminolo che emette luce. La membrana viene incubata con il substrato per 5 minuti. La luce emessa viene visualizzata posizionando la membrana in uno strumento di rivelazione, *Kodak dS Image Station 2000R*, che consente di visualizzare ed acquisire l'immagine dell'emissione di luce, e quindi delle proteine di interesse, direttamente sul monitor del computer. Questa tecnica di rivelazione è preferibile all'esposizione della membrana di nitrocellulosa ad una lastra fotografica, in quanto l'intervallo di linearità della misura che si ottiene con questa modalità è maggiore.

3.9 TRATTAMENTO CON PNGasi F

La PNGasi F (Peptide: N-Glicosidasi F) è un'amidasi che catalizza la rottura del legame tra residui di asparagina e oligosaccaridi all'interno delle glicoproteine, in seguito a deaminazione dell'asparagina ad acido aspartico.

Per il trattamento con PNGasi è stato utilizzato il *kit New England Biolabs*.

Soluzione 1: DENATURING BUFFER 10X

SDS 5%

DTT 0,4 M

Soluzione 2: REACTION BUFFER 10X

Sodio fosfato 0,5 M pH 7.5

Soluzione 3: NP40 10%

Soluzione 4: PNGasi F

Peptide: N-Glicosidasi F 500,000 U/ml in NaCl 50mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, Na₂EDTA 5mM, Glicerolo 50%

Una quantità pari a 100 µg di proteine delle frazioni 8-9-10-11-12 dei gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a *pulse* con GM1 o GD1a per 4 ore a 37°C, sono state evaporate con un debole flusso di azoto, risospese in 8 µl di acqua ed infine denaturate aggiungendo 2 µl di *denaturing buffer* 5X per raggiungere un volume totale di reazione pari a 10 µl e scaldando a 100°C per 10 minuti; la frazione contenente i *lipid raft* (frazione 5) è stata sottoposta allo stesso trattamento ma, non potendo avere 100 µg di proteine si è proceduto utilizzando la massima quantità disponibile. Successivamente sono stati aggiunti 2 µl di soluzione 2, 2 µl di soluzione 3, 1 µl di soluzione 4 e acqua in modo da ottenere un volume finale di reazione pari a 20 µl. L'incubazione è stata condotta a 37°C per 12 ore. La reazione enzimatica è stata bloccata aggiungendo un ugual volume di Laemmli *buffer* 2X (vedi paragrafo elettroforesi) ed i campioni ottenuti vengono utilizzati per l'elettroforesi.

3.10 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI GANGLIOSIDI

Soluzione 1: Reattivo di Ehrlich

4-dimetilamminobenzaldeide 0,04M

Acido cloridrico 7,4% v/v

Etanolo 80% v/v

Le frazioni di membrana e le frazioni citosoliche sono state dializzate; aliquote pari a 5700 dpm delle membrane ottenute da cellule trattate con GM1 a 4°C per 4 ore e con gli altri gangliosidi (GM1, GD1a) a 37°C per 4 ore sono state liofilizzate. Allo stesso modo, un'aliquota pari a 100µg delle frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GT1b sono state liofilizzate.

Si è proceduto poi con l'estrazione dei gangliosidi mediante trattamento in ghiaccio con THF (tetraidrofurano) ed H₂O in rapporto 4:1 v/v, sonicazione e centrifugazione a 18400 g per quattro volte consecutive (Tettamanti et al., 1973).

I surnatanti ottenuti sono stati evaporati con azoto e risospesi con 10µl di cloroformio: metanolo 2/1 v/v sempre a freddo. I gangliosidi radiomarcanti sono stati quindi separati mediante cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione (HPTLC); sono state utilizzate lastre su supporto di vetro, precedentemente attivate per 1 ora a 100°C. Nel caso delle frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GT1b, si procede allo stesso modo utilizzando però, come fase stazionaria, una lastra su supporto di alluminio. I campioni sono stati seminati goccia a goccia sulla linea di base; parallelamente alla quantità nota dei campioni estratti sono state seminate quantità note degli opportuni standard. Successivamente la lastra di corsa viene posta in una vasca di vetro per cromatografia ascendente, contenente il solvente per la precorsa: cloroformio: metanolo 2/1 v/v. La vasca, chiusa con un coperchio, è stata precedentemente lasciata equilibrare per circa 1 ora, affinché l'interno del recipiente si saturi del vapore del solvente. Effettuata la precorsa a temperatura ambiente, la lastra viene lasciata asciugare prima di procedere con la corsa vera e propria, che permette la separazione dei gangliosidi.

La lastra asciutta viene posta in una seconda vasca di vetro contenente la soluzione cloroformio: metanolo: CaCl₂ 0.2% 50/42/11 v/v/v; terminata la corsa si lascia asciugare nuovamente la lastra. Le bande corrispondenti ai diversi gangliosidi vengono in seguito acquisite per *radiocromatoscanning*. Nel caso delle frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GT1b, si procede allo stesso modo ma l'acquisizione della bande corrispondenti ai diversi gangliosidi viene effettuata al densitometro (GS 710, Biorad) dopo aver spruzzato la lastrina con la soluzione di Ehrlich ed averla messa in stufa a 180°C per 15 minuti.

3.11 IMMUNOFLUORESCENZA

Soluzione 1: LS-PBS pH 7.2

NaCl 150 mM

Tampone sodio fosfato 10 mM

Soluzione 2: HS-PBS pH 7.2

NaCl 500 mM

Tampone sodio fosfato 20 mM

Soluzione 3: GDB 2X

Gelatina 0,2 % (p/v)

Triton X-100 0,3% (p/v)

KH₂PO₄ 20 mM

NaCl 0,45 M

Sono stati inoltre condotti alcuni esperimenti preliminari di immunofluorescenza; le cellule controllo, non trattate coi gangliosidi, sono state fissate su vetrino mediante incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente con paraformaldeide al 4% (p/v) e saccarosio al 4% (p/v) sciolti in PBS 0,12 M, pH 7.40.

Trascorsi 20 minuti sono stati effettuati tre lavaggi da 10 minuti con PBS. Infine i vetrini vengono conservati a 4°C, al buio, fino al loro utilizzo.

Dopo essere stati fissati, i vetrini vengono sottoposti prima a 3 lavaggi da 5 minuti con la soluzione 1 e poi a 3 lavaggi da 5 minuti con la soluzione 2. Successivamente vengono incubati per 30 minuti a temperatura ambiente nella soluzione 3 che, grazie alla presenza del detergente Triton X-100, consente la permeabilizzazione delle membrane cellulari e garantisce la saturazione dei siti aspecifici, per via della presenza della gelatina. Questo trattamento è compatibile con tutti gli anticorpi utilizzati in questi esperimenti.

Segue l'incubazione di 2 ore con gli anticorpi primari diluiti (anti-PrP6H4 1:250, anti-PrP8G8 1:20, anti-PrPSAF32 1:100) sempre nella soluzione 3 a temperatura ambiente. Al termine di tale incubazione, si susseguono 3 lavaggi da 10 minuti con la soluzione 2, così da eliminare l'anticorpo primario in eccesso non legato o legato in modo aspecifico. In seguito viene effettuata l'incubazione, dalla durata di 1 ora con l'anticorpo secondario coniugato a specifici fluorocromi diluito nella soluzione 3. Al termine vengono effettuati 3 lavaggi da 5 minuti con la soluzione 2 e lo stesso con la soluzione 1; tra il secondo e il terzo lavaggio con la soluzione 1 viene fatta

l'incubazione con DAPI (4,6-diaminidino, 2-fenilindiolo) 1 μ M in PBS che legandosi al DNA è in grado di colorare i nuclei.

Negli esperimenti di immunofluorescenza condotti con la tossina colerica (diluizione 1:500) già coniugata al fluorocromo, all'incubazione di 2 ore seguono 3 lavaggi da 10 minuti con la soluzione 2 e si procede come sopra descritto.

I vetrini dei campioni così trattati vengono montati su vetri porta-oggetto interponendo 100 μ l di PBS: Glicerolo 1/9 v/v e sigillando i bordi dei vetrini copri-oggetto con lo smalto.

I vetrini sono stati poi osservati al microscopio confocale Zeiss (LSM-710) collegato ad un computer dotato del *software* per l'analisi delle immagini (Zeiss, Zen 2009).

4. RISULTATI

4.1 GM1 E GD1a INCORPORATI NELLE CELLULE TRATTATE A 37°C

Le cellule granulari all'ottavo giorno di coltura *in-vitro*, sono state sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione con GM1 e [3 H]-GM1 o GD1a e [3 H]-GD1a, si è proceduto alla preparazione dei microdomini lipidici mediante un gradiente discontinuo di saccarosio, da cui sono state raccolte 12 frazioni da 1 ml ciascuna.

La frazione 5 contiene i *lipid raft*; le frazioni dalla 6 alla 8 comprendono soprattutto il complesso di Golgi mentre a densità maggiori frazionano il reticolo endoplasmatico, i microsomi, i mitocondri e di nuclei cellulari.

Dalle 12 frazioni e dall'omogenato ottenuti è stata prelevata un'aliquota poi sottoposta a misurazione della radioattività con un contatore a scintillazione liquida (Tri-Carb 1900 CA, Packard); essendo noti l'attività specifica di [3 H]-GM1 e [3 H]-GD1a ed i valori di disintegrazione per minuto (dpm), è stato possibile risalire alla quantità di ganglioside radiomarcato incorporato nelle singole frazioni e nell'omogenato. Infine, conoscendo il rapporto tra la quantità di GM1 e di [3 H]-GM1 o di GD1a e [3 H]-GD1a con cui sono state trattate le cellule, è possibile risalire alla quantità di ganglioside totale, radiomarcato e non, incorporato in tutte le frazioni del gradiente.

I risultati, espressi come mmoli di ganglioside incorporate per singola frazione e come distribuzione percentuale, sono riportati di seguito.

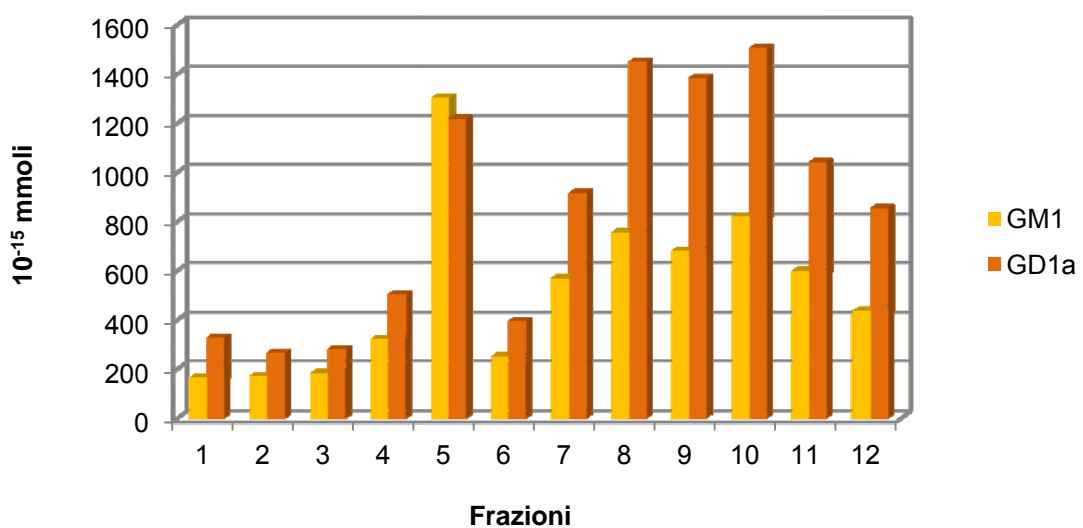


Figura 6. Distribuzione di GM1 e GD1a calcolata in mmoli per ciascuna frazione del gradiente.

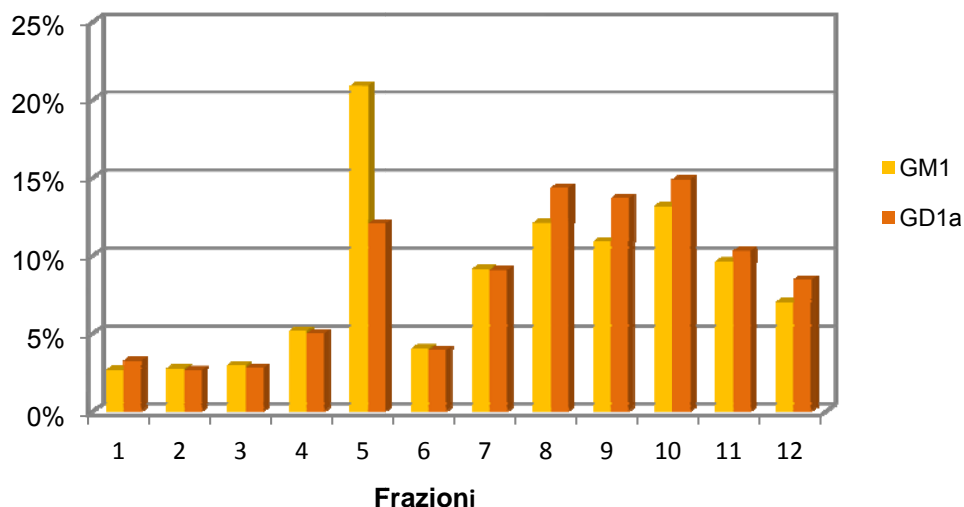


Figura 7. Distribuzione percentuale di GM1 e GD1a nelle diverse frazioni del gradiente.

La quantità di GM1 esogeno incorporato nelle cellule sottoposte a *pulse* per 4 ore a 37°C è pari a 3,4 nmoli/mg di proteine rispetto ad un valore di GM1 endogeno di 0,96 nmoli/mg presente nelle medesime colture cellulari primarie, all'ottavo giorno *in vitro* (Valsecchi et al., 1996).

Come si può osservare nella figure sovrastanti, il 21% del GM1 incorporato nelle cellule localizza nella frazione 5, ovvero nei domini di membrana resistenti ai detergenti (DRM). La restante quota di GM1 esogeno incorporato si distribuisce, con percentuali comprese tra il 7 e il 13%, nelle frazioni dalla 7 alla 12 e percentuali dal 2,6 al 5% sono presenti nelle frazioni 1-2-3-4 e 6.

Nelle cellule sottoposte a *pulse* con GD1a per 4 ore a 37°C, la quantità di ganglioside esogeno incorporato corrisponde a 3,8 nmoli/mg di proteine, pari a 1,3 volte rispetto al GD1a endogeno (2,95 nmoli/mg) presente nelle stesse colture cellulari primarie all'ottavo giorno *in vitro* (Valsecchi et al., 1996).

Il 12% del GD1a incorporato localizza nei DRM; nelle frazioni 1-2-3-4 e 6 è stata incorporata una quota di GD1a esogeno compresa tra il 2,6 ed il 5% mentre, nelle frazioni dalla 7 alla 12, i valori percentuali sono compresi tra 8,4 e 14,3%. Si nota, rispetto al trattamento col GM1, un'importante riduzione della percentuale di ganglioside esogeno incorporato nella frazione 5 ed un'aumentata distribuzione di GD1a nelle frazioni a maggior densità (8-9-10-11-12).

4.2 GT1b INCORPORATO NELLE CELLULE TRATTATE A 37°C

In altri esperimenti, cellule granulari all'ottavo giorno di coltura *in-vitro* sono state sottoposte a trattamento con GT1b $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 37°C; non disponendo del ganglioside radiomarcato non è stato possibile valutare la distribuzione del GT1b nelle 12 frazioni del gradiente; si è proceduto, sia nei controlli che nelle cellule trattate col ganglioside esogeno, separando le frazioni di membrana da quelle citosoliche, secondo il protocollo descritto nel capitolo precedente. Nei campioni così ottenuti, i diversi gangliosidi sono stati separati ed analizzati mediante HPTLC (

Figura 8); la presenza di opportuni standard ed il dosaggio delle proteine precedentemente effettuato su aliquote di questi stessi campioni, ha permesso di calcolare che la quantità di GT1b esogeno incorporato nelle cellule è pari a 3,2 nmoli/mg di proteine rispetto ad un valore di GT1b endogeno di 3,7 nmoli/mg di proteine. Si può inoltre osservare che, rispetto alle frazioni di membrana controllo, il mancato aumento di GD1b, metabolita diretto del GT1b, è indice del fatto che i risultati ottenuti siano imputabili esclusivamente al ganglioside somministrato.

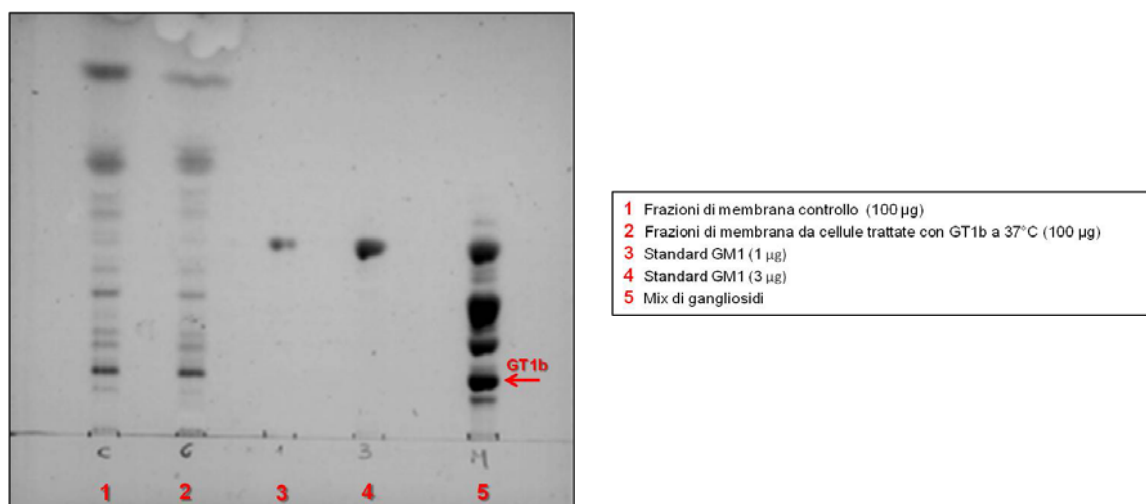


Figura 8. Separazione cromatografica su strato sottile di gangliosidi estratti da aliquote di frazioni di membrana controllo e di frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GT1b per 4 ore a 37°C.

4.3 METABOLISMO DEL GM1 E DEL GD1a ESOGENI INCORPORATI NELLE CELLULE TRATTATE A 37°C

Al fine di verificare se il ganglioside esogeno con cui sono state trattate le cellule, sia stato metabolizzato durante le 4 ore di *pulse* a 37°C, si è proceduto separando le frazioni di membrana da quelle citosoliche secondo il protocollo descritto nel capitolo precedente. Da aliquote di frazioni di membrana, corrispondenti a 5700 dpm, ottenute da piastre contenenti colture cellulari trattate con gangliosidi, a cui era stato aggiunto [3 H]-GM1 o [3 H]-GD1a come radiomarcante, sono stati

estratti e separati i gangliosidi mediante HPTLC. Nelle frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GM1 è stata rilevata, mediante *radiocromatoscanning*, l'assenza di prodotti del catabolismo di questo ganglioside (GM2 e GM3) e nelle frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GD1a, l'assenza di GM1 (Figura 9).

I risultati che verranno di seguito illustrati sono pertanto attribuibili molto probabilmente all'incorporazione del ganglioside esogeno somministrato e non ad eventuali metaboliti da esso derivanti.

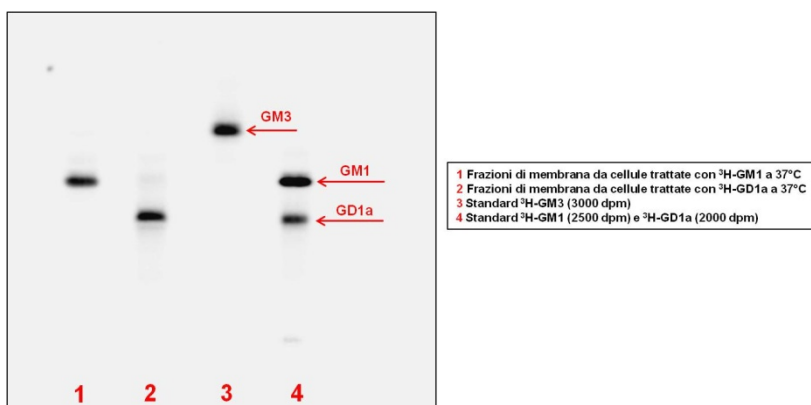


Figura 9. Separazione cromatografica su strato sottile di gangliosidi estratti da aliquote di frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GM1 o GD1a per 4 ore a 37°C.

4.4 DISTRIBUZIONE DI PROTEINE NEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI PER 4 ORE A 37°C

Le proteine delle 12 frazioni del gradiente ottenute dalle cellule controllo e dalle cellule sottoposte a *pulse* con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C, sono state precipitate con acido tricloroacetico al 30% e risospese con un adeguato volume di acqua. Un'aliquota di ciascun campione è stata analizzata per contenuto proteico mediante dosaggio con acido bicinconico (BCA).

Dai risultati ottenuti con questo dosaggio è stato possibile poi valutare la distribuzione percentuale delle proteine nelle dodici frazioni di ciascun gradiente.

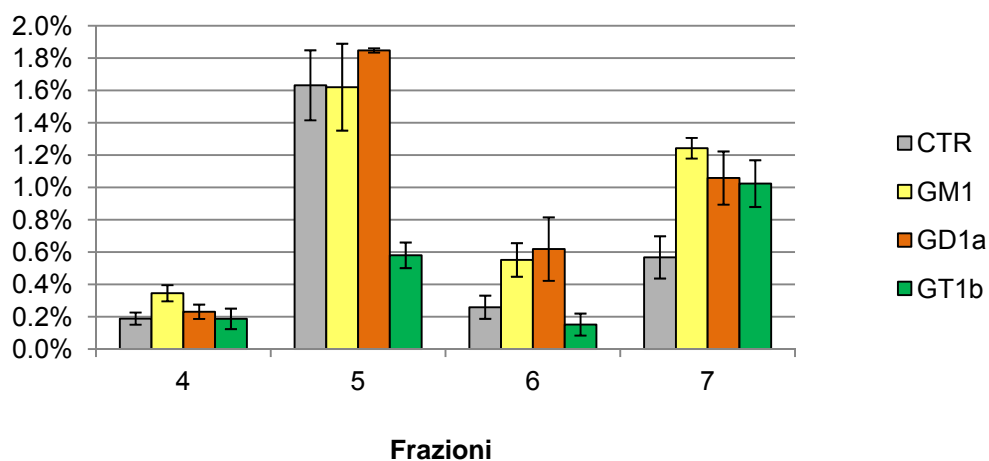


Figura 10. Distribuzione percentuale di proteine nelle frazioni 4-5-6-7 del gradiente ottenute da cellule controllo e da cellule trattate per 4 ore a 37°C con GM1 o GD1a o GT1b.

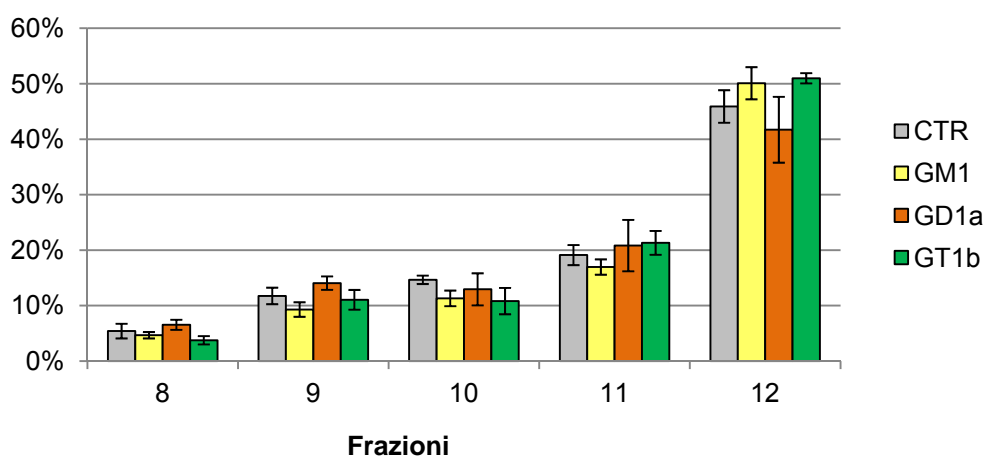


Figura 11. Distribuzione percentuale di proteine nelle frazioni 8-9-10-11-12 del gradiente ottenute da cellule controllo e da cellule trattate per 4 ore a 37°C con GM1 o GD1a o GT1b.

Nella frazione 5 (contenente i *lipid raft*) dei gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule trattate con GM1 o GD1a la percentuale di proteine presenti è compresa, come valore medio, tra l'1,62 e l'1,85%; le frazioni 5 dei gradienti ottenuti da cellule sottoposte a trattamento con GT1b contengono invece una percentuale di proteine notevolmente inferiore e pari a 0,57%.

La distribuzione di proteine nelle frazioni 1-2-3, sia dei gradienti di controllo che di quelli ottenuti da cellule trattate a 37°C per 4 ore coi gangliosidi esogeni, non è stata riportata in quanto la percentuale di proteine presenti è, in ognuna di queste tre frazioni, inferiore a 0,01%.

4.5 IMMUNOBLOTTING DELLE PROTEINE DEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI PER 4 ORE A 37°C

Le proteine delle 12 frazioni del gradiente ottenute da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C, dopo essere state precipitate e risospese in acqua, sono state separate per elettroforesi monodimensionale e trasferite mediante *western blotting* su una membrana di nitrocellulosa. Specifiche proteine di interesse sono state poi rilevate mediante chemiluminescenza. Per l'immunodecorazione della proteina prionica sono stati utilizzati tre diversi anticorpi primari: 6H4 riconosce la sequenza amminoacidica compresa tra le posizioni 144 e 152 di PrP^C, in corrispondenza della prima α -elica, vicino al C-terminale. Il secondo anticorpo utilizzato, SAF32, riconosce gli amminoacidi 79-92 della proteina prionica cellulare, in prossimità dell'N-terminale. Il terzo anticorpo utilizzato, 8G8, è specifico per la sequenza 95-110, a valle del sito di β -clivaggio (90-91).

4.5.1 PrP^C, immunodecorazione con 6H4

Nelle cellule trattate con GM1 per 4 ore a 37°C, in corrispondenza della frazione 5, la quantità di proteina prionica presente risulta molto ridotta rispetto alle cellule controllo.

Nel gradiente ottenuto da cellule trattate con GD1a non si osserva alcuna rilevante differenza nella distribuzione e nella quantità di proteina prionica rispetto ai controlli. In corrispondenza della frazione 5, del gradiente ottenuto da cellule sottoposte a trattamento con GT1b, si osserva la diminuzione della quantità di PrP^C rilevata, rispetto ai controlli.

Si nota che, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule trattate coi diversi gangliosidi, la proteina prionica sembra localizzata quasi esclusivamente a livello dei *lipid raft* (frazione 5) (Figura 12).

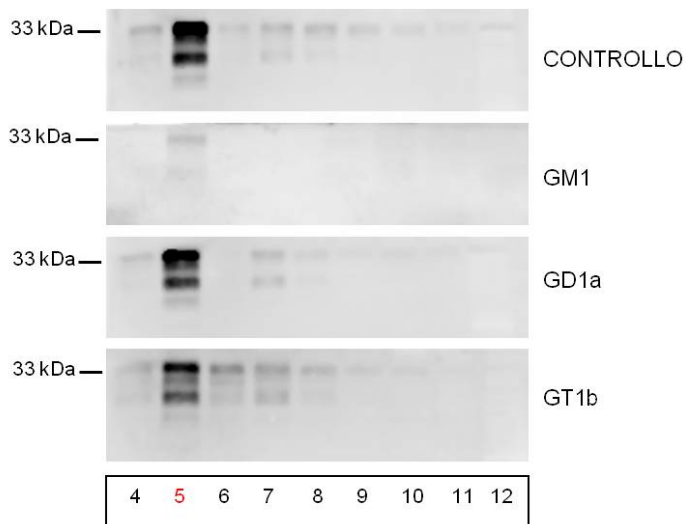


Figura 12. Distribuzione di PrP^C nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C.

4.5.2 PrP^C, immunodecorazione con SAF32

Nelle cellule trattate con GT1b, in corrispondenza della frazione 5, la quantità di proteina prionica rilevata è minore rispetto alle cellule controllo; una lieve diminuzione è visibile anche nella frazione 5 dei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 o GD1a. Si nota sia nei controlli, che nei gradienti provenienti da cellule trattate coi diversi gangliosidi, che la proteina prionica non risulta localizzata in modo esclusivo nella frazione 5 ma appare distribuita anche lungo le frazioni del gradiente comprese tra 7 e 12 (Figura 13).

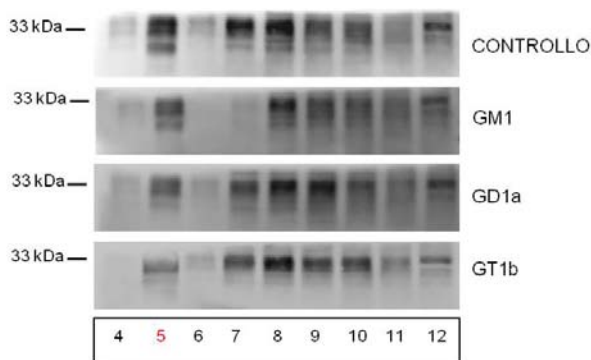


Figura 13. Distribuzione di PrP^C nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C.

4.5.3 **PrP^C, immunodecorazione con 8G8**

L'immunodecorazione della proteina prionica nativa, con l'anticorpo primario 8G8, non permette di rilevare la presenza di eventuali differenze nella distribuzione e nella quantità di PrP^C nelle 12 frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C. All'altezza di corsa corrispondente a 33 kDa è visibile solamente un segnale molto debole che sembra localizzare preferibilmente nelle frazioni 8-12.

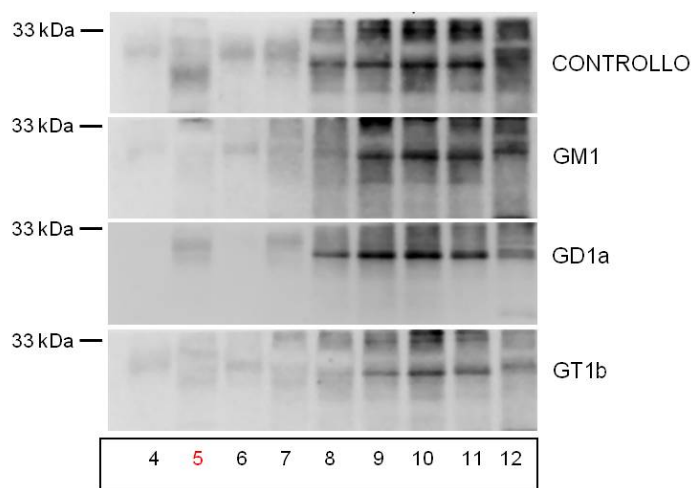


Figura 14. Distribuzione di PrP^C nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C.

4.5.4 **PKC**

Nei gradienti di cellule trattate con GM1 o GT1b, la quantità di PKC presente nella frazione 5 risulta raddoppiata rispetto ai controlli; anche nelle cellule trattate con GD1a si osserva un incremento della quantità di chinasi presente, anche se di minore entità (Figura 15).

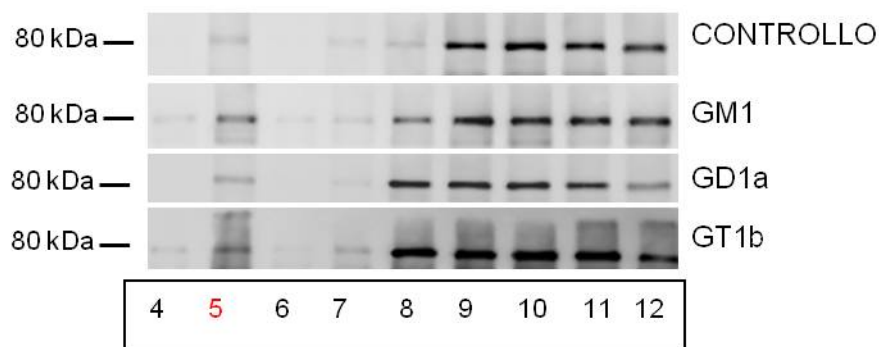


Figura 15. Distribuzione di PKC nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C.

4.5.5 **ADAM10**

Nei gradienti di cellule trattate con GT1b, la quantità di ADAM10 presente nella frazione 5 risulta inferiore rispetto ai controlli; si nota sia nei controlli, che nei gradienti provenienti da cellule trattate coi diversi gangliosidi, che questa proteina localizza quasi esclusivamente nella frazione 5 (Figura 16).

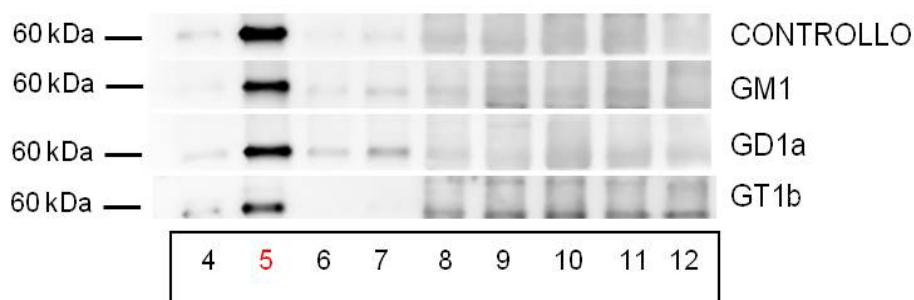


Figura 16. Distribuzione di ADAM10 nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a o GT1b per 4 ore a 37°C.

4.5.6 **Thy1, nei gradienti ottenuti da cellule controllo e sottoposte a trattamento con GM1 per 4 ore a 37°C**

Nei gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 per 4 ore a 37°C è stata valutata la quantità e la distribuzione della proteina Thy1 nelle dodici frazioni del gradiente (Figura 17). Quest'ultima, come PrP^C, è una glicoproteina associata alla membrana delle cellule neuronali mediante un'ancora GPI e, come recentemente dimostrato (Farina et al.,2009), risulta fortemente arricchita nei *lipid raft*. Si nota, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1, Thy1 localizza quasi esclusivamente nella frazione 5 e la sua quantità non è influenzata dal trattamento col ganglioside esogeno.

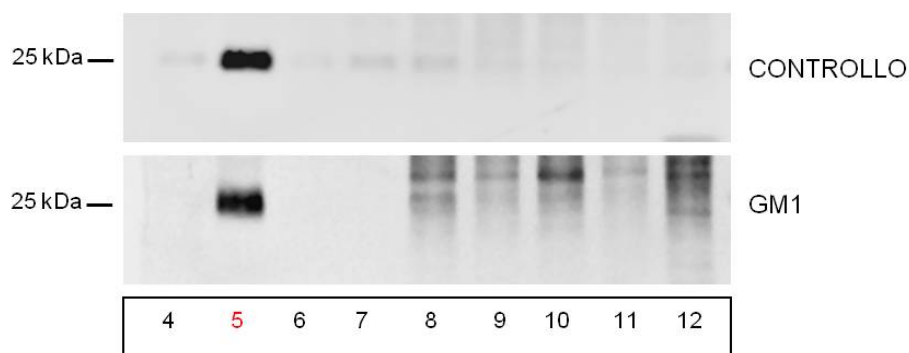


Figura 17. Distribuzione di Thy 1 nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 per 4 ore a 37°C.

4.6 DEGLICOSILAZIONE MEDIANTE PNGasi

Per osservare l'eventuale formazione di frammenti derivanti dal clivaggio, di tipo α o β , della proteina prionica cellulare risulta necessario, in base a quanto dimostrato da studi precedenti (Laffont-Proust, 2005; Hooper et al., 2008), procedere alla deglicosilazione dei campioni, prima della loro separazione elettroforetica.

Per verificare la formazione di questi frammenti, le frazioni 5-8-9-10-11-12 dei gradienti ottenuti in seguito a trattamento con GM1 o GD1a per 4 ore a 37°C sono state deglicosilate mediante trattamento con PNGasi F (*New England Biolabs*), risolte mediante elettroforesi monodimensionale, infine trasferite e rilevate tramite *western blotting* e chemiluminescenza.

4.6.1 PrP^C, immunodecorazione con 6H4

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario 6H4 evidenzia, sia nei gradienti controllo che in quelli ottenuti da cellule trattate con GM1 o GD1a a 37°C, la presenza di due bande distinte: la prima, a 27 KDa, corrisponde alla proteina prionica deglicosilata mentre la seconda, a 17 KDa, rappresenta il frammento C-terminale (C1) derivante dall' α -clivaggio della proteina stessa (Hooper et al., 2008).

Si nota che, successivamente al trattamento di deglicosilazione, la presenza della proteina prionica è rilevabile anche nella frazione 5 del gradiente ottenuto da cellule trattate con GM1 a 37°C. Sia nei controlli, che nei gradienti ottenuti da cellule trattate coi gangliosidi, si può notare che la quantità di proteina prionica intera deglicosilata è paragonabile alla quantità di frammenti C1 derivanti dall' α -clivaggio.

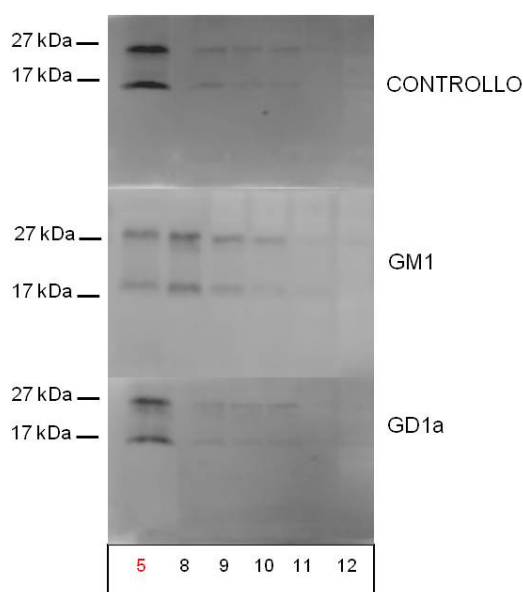


Figura 18. Distribuzione di PrP^C, dopo deglicosilazione, nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a per 4 ore a 37°C.

4.6.2 PrP^C, immunodecorazione con SAF32

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario SAF32 evidenzia, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 o GD1a a 37°C, la presenza di una sola banda all'altezza di 27KDa, corrispondente alla proteina prionica cellulare deglicosilata. Si nota in tutti e tre i gradienti che la proteina appare distribuita nei *lipid raft* e lungo le frazioni 8-12 del gradiente.

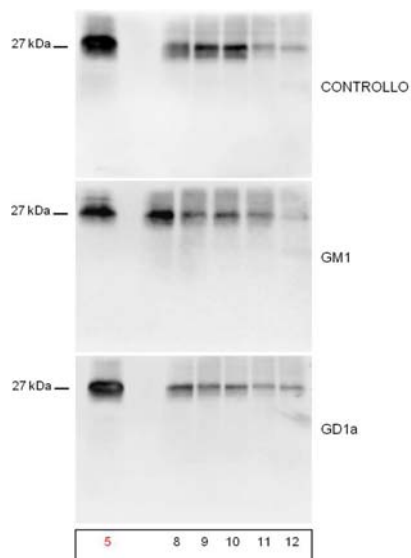


Figura 19. Distribuzione di PrP^C, dopo deglicosilazione, nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a per 4 ore a 37°C.

4.6.3 PrP^C, immunodecorazione con 8G8

Nell'immunodecorazione con l'anticorpo primario 8G8, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a, è visibile all'altezza di corsa corrispondente a 27 KDa solamente un segnale molto debole che sembra localizzare preferibilmente nelle frazioni 8-12. Ad altezze inferiori si nota in tutte le frazioni, sia nei controlli che nei trattati, la presenza di bande molto probabilmente aspecifiche.

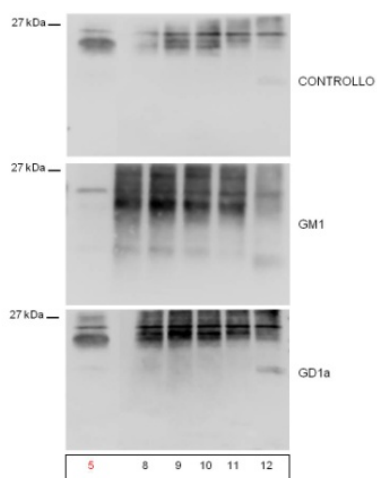


Figura 20. Distribuzione di PrP^C, dopo deglicosilazione, nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a per 4 ore a 37°C.

4.7 QUOTA DI GM1 ESOGENO INCORPORATO NELLE CELLULE A 4°C

In esperimenti successivi, cellule granulari all'ottavo giorno di coltura *in-vitro* sono state sottoposte a trattamento con GM1 $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 4°C al fine di bloccare i processi di endocitosi, rallentare i movimenti laterali dei lipidi a livello della membrana cellulare e verificare quindi l'effetto della temperatura di incubazione sull'incorporazione del GM1 esogeno e sulla distribuzione delle proteine di interesse lungo il gradiente. La quantità di GM1 esogeno incorporato nelle cellule trattate per 4 ore a 4°C è pari a 2,5 nmoli/mg di proteine; nelle figure sottostanti è rappresentata la distribuzione del ganglioside nelle 12 frazioni del gradiente (Figura 21 e Figura 22).

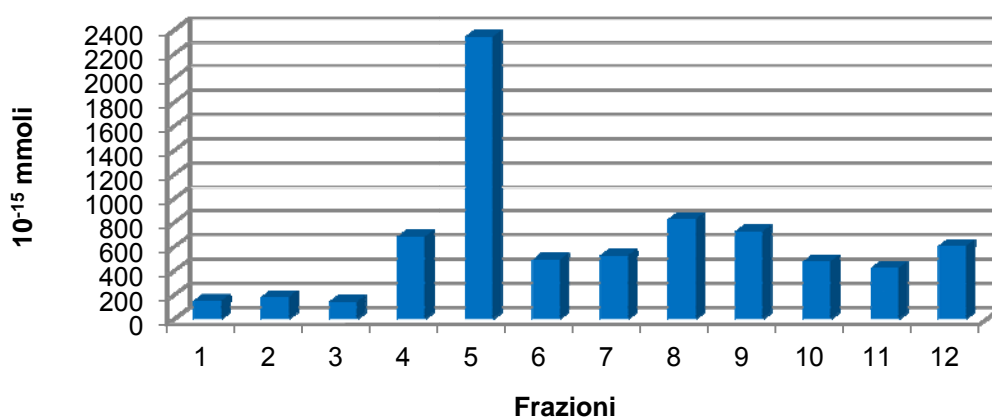


Figura 21. Distribuzione di GM1, calcolata in mmoli, per ciascuna frazione del gradiente.

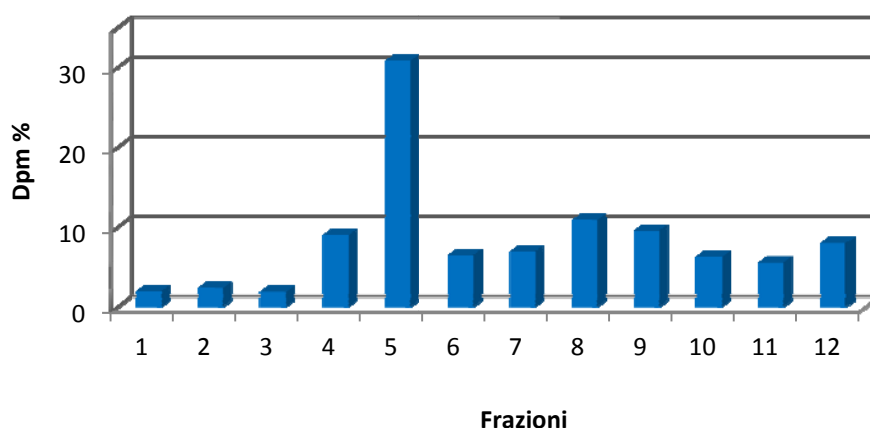


Figura 22. Distribuzione percentuale di GM1 per ciascuna frazione del gradiente

Il 30% del GM1 incorporato nelle cellule localizza nella frazione 5, ovvero nei DRM. La restante quota del ganglioside incorporato si distribuisce, con percentuali comprese tra il 5 e il 10% nelle altre frazioni e percentuali inferiori al 2,5% sono presenti nelle frazioni 1-2-3.

Questa distribuzione indica che a basse temperature (4°C) il ganglioside GM1 si incorpora più facilmente nei *lipid raft*, piuttosto che nelle altre zone della membrana plasmatica.

4.8 METABOLISMO DEL GM1 ESOGENO INCORPORATO NELLE CELLULE TRATTATE A 4°C

Come nei precedenti esperimenti, al fine di verificare se il ganglioside esogeno con cui sono state trattate le cellule sia stato metabolizzato durante le 4 ore di *pulse* a 4°C, si è proceduto separando le frazioni di membrana da quelle citosoliche secondo il protocollo descritto nel capitolo precedente. Da aliquote di frazioni di membrana, corrispondenti a 5700 dpm, ottenute da piastre contenenti colture cellulari trattate con [³H]-GM1, sono stati estratti ed analizzati i gangliosidi presenti mediante cromatografia su strato sottile. Nelle frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con [³H]-GM1 è stata confermata, dalla rivelazione mediante *radiocromatoscanning*, l'assenza di prodotti del metabolismo di questo ganglioside.

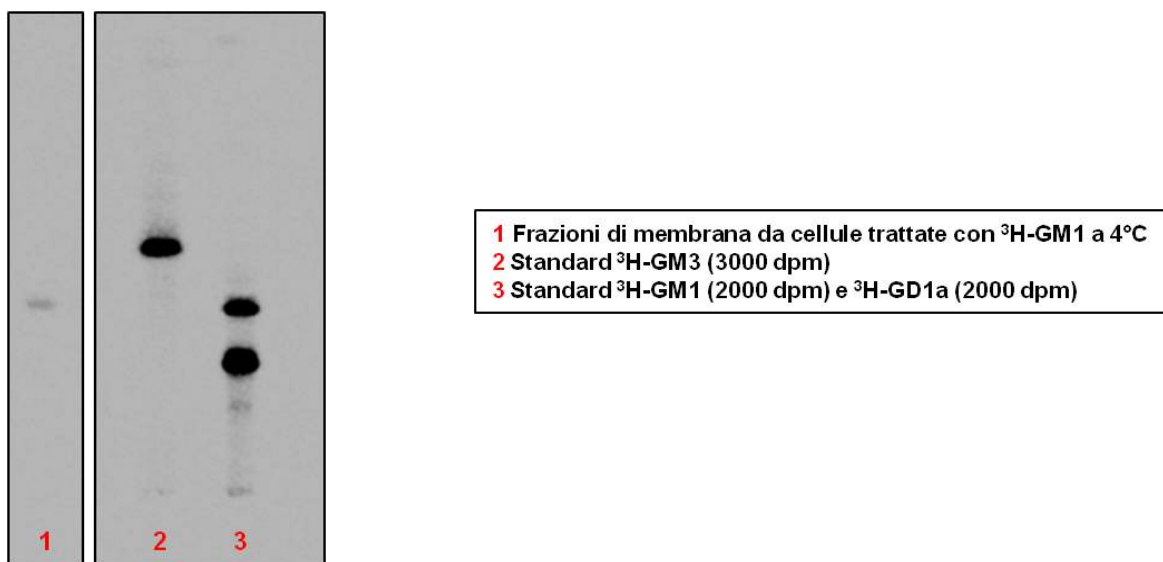


Figura 23. Separazione cromatografica su strato sottile di gangliosidi estratti da aliquote di frazioni di membrana ottenute da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C.

4.9 DISTRIBUZIONE DI PROTEINE NEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GM1 a 4°C

Come nella prima serie di esperimenti condotti a 37°C, le proteine delle 12 frazioni del gradiente ottenute da cellule controllo e da cellule sottoposte a trattamento con GM1 per 4 ore a 4°C, sono state precipitate con acido tricloroacetico al 30% e risospese con un adeguato volume di acqua. Un'aliquota di ciascun campione è stata analizzata per contenuto proteico mediante dosaggio con acido bicinconinico (BCA). Dai risultati ottenuti da questo dosaggio è stato possibile poi valutare la distribuzione percentuale delle proteine nelle dodici frazioni di ciascun gradiente.

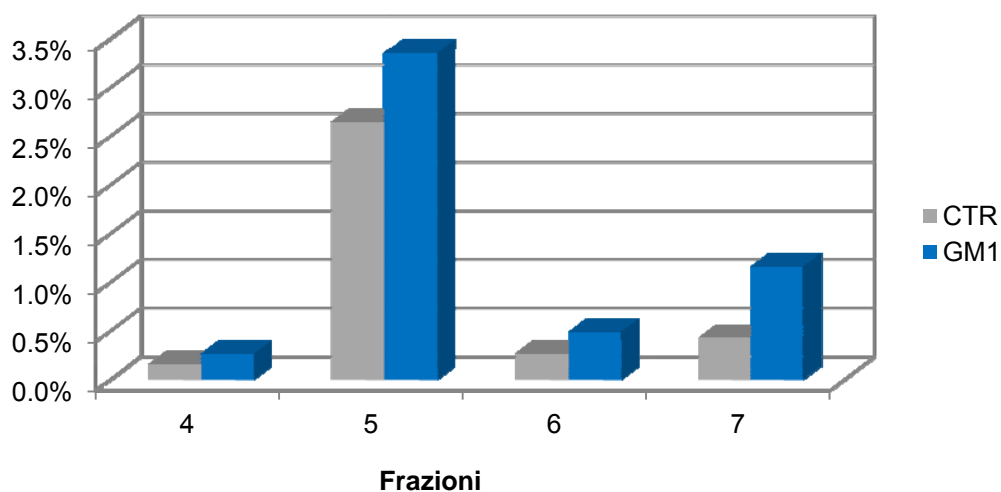


Figura 24. Distribuzione percentuale di proteine nelle frazioni 4-5-6-7 del gradiente ottenute da cellule controllo e da cellule trattate per 4 ore a 4°C con GM1.

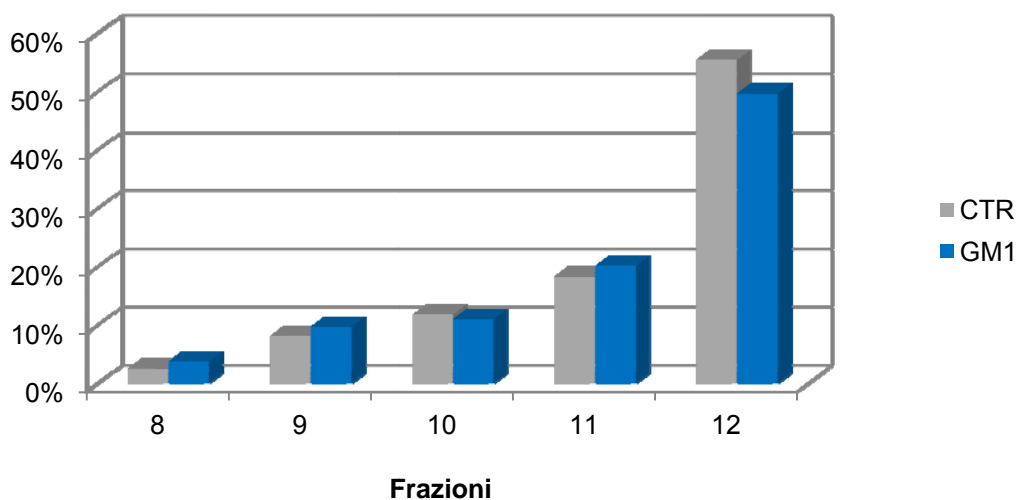


Figura 25. Distribuzione percentuale di proteine nelle frazioni 8-9-10-11-12 del gradiente ottenute da cellule controllo e da cellule trattate per 4 ore a 4°C con GM1.

Nella frazione 5 (contenente i *lipid raft*) del gradiente ottenuto da cellule controllo e da cellule trattate con GM1 la percentuale di proteine presenti è compresa tra 2,7 e 3,4%.

La distribuzione di proteine nelle frazioni 1-2-3, sia dei gradienti di controllo che di quelli ottenuti da cellule trattate a 37°C per 4 ore coi gangliosidi esogeni, non è stata riportata in quanto la percentuale di proteine presenti è, in ognuna di queste tre frazioni, inferiore a 0,01%.

4.10 **IMMUNOBLOTTING DELLE PROTEINE DEL GRADIENTE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GM1 PER 4 ORE A 4°C**

Come negli esperimenti precedenti, da cellule trattate con GM1 ($2 \cdot 10^{-6}$ M) e non (controllo) per 4 ore a 4°C, sono stati preparati i microdomini lipidici mediante un gradiente discontinuo di saccarosio da cui sono state raccolte 12 frazioni da 1 ml ciascuna. Dalle tutte le frazioni del gradiente sono state precipitate le proteine, separate mediante elettroforesi. Specifiche proteine di interesse sono state rilevate mediante *western blotting* e successivo metodo di rilevazione mediante chemiluminescenza.

4.10.1 **PrP^C, immunodecorazione con 6H4**

A 4°C, temperatura a cui l'endocitosi viene bloccata ed i movimenti laterali dei lipidi a livello della membrana cellulare vengono notevolmente rallentati, la proteina prionica nativa risulta preferenzialmente localizzata nei lipid raft ed aumenta nelle cellule trattate con GM1 (Figura 26).

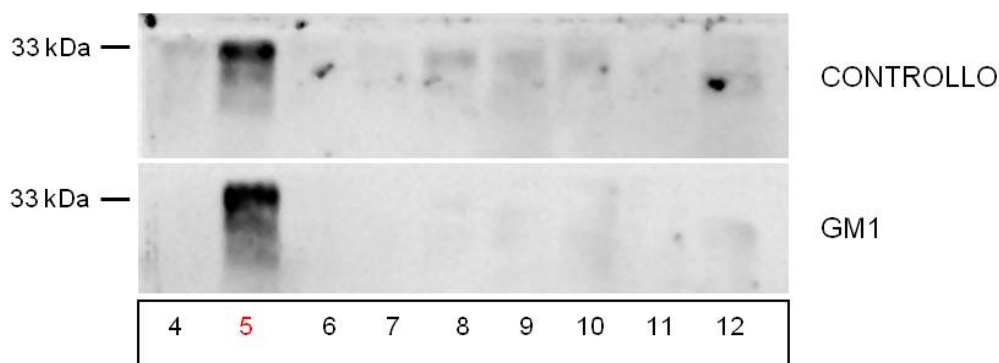


Figura 26. Distribuzione di PrP^C nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C.

4.10.2 **PrP^C, immunodecorazione con SAF32**

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario specifico per la sequenza amminoacidica 79-92 di PrP^C (vicina al C-terminale della proteina stessa) evidenzia, rispetto ai controlli, un aumento di circa 3 volte della quantità di proteina prionica nativa localizzata nella frazione 5 del gradiente ottenuto da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C; come nei precedenti esperimenti condotti a

37°C con lo stesso ganglioside, si osserva una buona distribuzione della proteina prionica cellulare anche nelle frazioni a maggiore densità di flottazione (Figura 27).

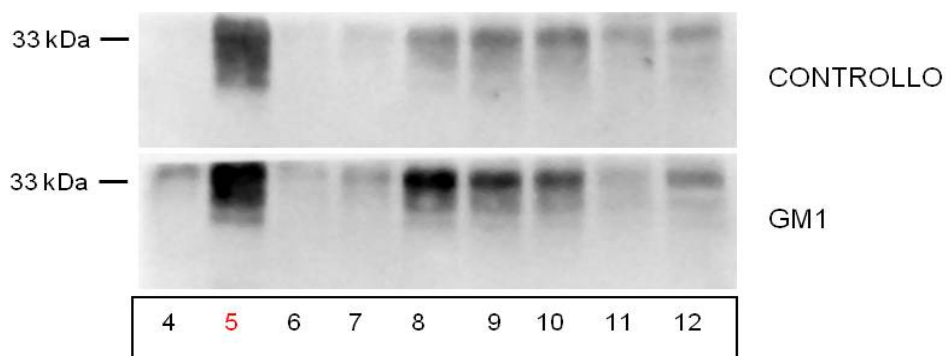


Figura 27. Distribuzione di PrP^C nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule sottoposte a pulse con GM1 per 4 ore a 4°C.

4.10.3 PrP^C, immunodecorazione con 8G8

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario specifico per la sequenza amminoacidica 95-110 di PrP^C, evidenzia, rispetto ai controlli, l'aumento della quantità di proteina prionica nativa localizzata nella frazione 5 del gradiente ottenuto da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C; si osserva inoltre una buona distribuzione della proteina prionica cellulare anche nelle frazioni 8-9-10 di entrambi i gradienti.

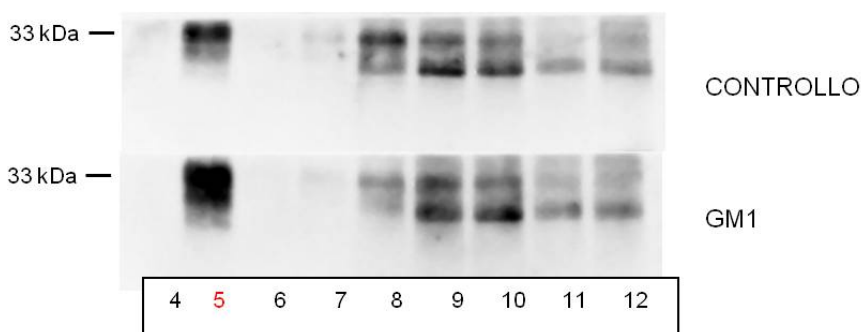


Figura 28. Distribuzione di PrP^C nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C.

4.10.4 **PKC**

A 4°C, una piccola quota di PKC (Figura 29) risulta localizzata nella frazione 5 ed in seguito all' incubazione con GM1 la sua associazione ai microdomini non varia, rispetto ai controlli.

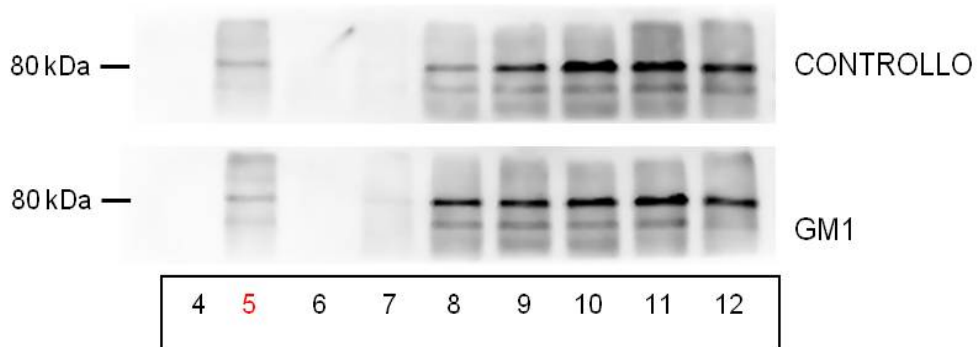


Figura 29. Distribuzione di PKC nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C.

4.10.5 **ADAM10**

A 4°C (Figura 30) ADAM10 risulta fortemente arricchita nei *lipid raft* (frazione 5), sia nei controlli che nelle cellule trattate con GM1. Nelle altre frazioni di membrana, la quantità di ADAM10 è minima, sia in cellule controllo che in seguito al trattamento con GM1 a 4°C. Non è stata osservata alcuna differenza nella quantità di ADAM10 presente nel gradiente controllo ed in quello ottenute da cellule trattate col ganglioside esogeno.

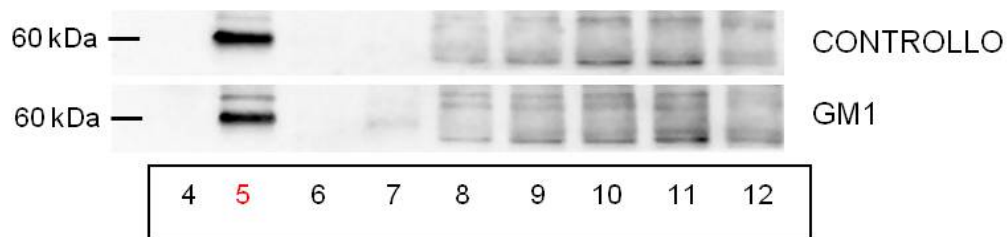


Figura 30. Distribuzione di ADAM10 nelle diverse frazioni di gradienti ottenuti da cellule controllo e da cellule trattate con GM1 per 4 ore a 4°C.

4.11 IMMUNOFLUORESCENZA

Infine, sono stati condotti alcuni esperimenti di immunofluorescenza su cellule di controllo, non sottoposte a *pulse* con gangliosidi esogeni, fissate, come descritto nel capitolo precedente, in paraformaldeide.

In questi esperimenti sono state effettuate delle doppie marcature con la subunità B della tossina colerica, di cui il ganglioside GM1 è il recettore, coniugata al fluorocromo Alexa Fluor 594 (*Invitrogen*) e con gli anticorpi primari anti-proteina prionica 6H4, SAF32 ed 8G8.

Considerando la lunghezza d'onda d'emissione dei fluorocromi utilizzati, la presenza di GM1, recettore per la tossina colerica, è risultata visibile come segnale rosso mentre il legame dei singoli anticorpi primari alla proteina prionica si è palesato con un segnale verde, derivante dall'utilizzo di un anticorpo secondario coniugato ad Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*). I nuclei delle cellule appaiono blu per effetto della colorazione con DAPI (4,6-Diammino-2-fenilindolo).

4.11.1 Doppia immunofluorescenza con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo anti-proteina prionica 6H4

Negli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo primario anti-proteina prionica 6H4, risulta ben visibile la localizzazione di quest'ultimo soprattutto a livello della membrana plasmatica; sembra inoltre che la proteina prionica, rilevata con l'anticorpo 6H4, localizzi preferibilmente in determinate zone della membrana cellulare formando dei raggruppamenti a cui, con una certa probabilità, corrispondono proprio i *lipid raft*.

A livello di questi *cluster* inoltre è visibile, mediante emissione di un segnale di colore giallo, una buona co-localizzazione della subunità B della tossina colerica, quindi del GM1, con la proteina prionica rilevata dall'anticorpo primario 6H4.

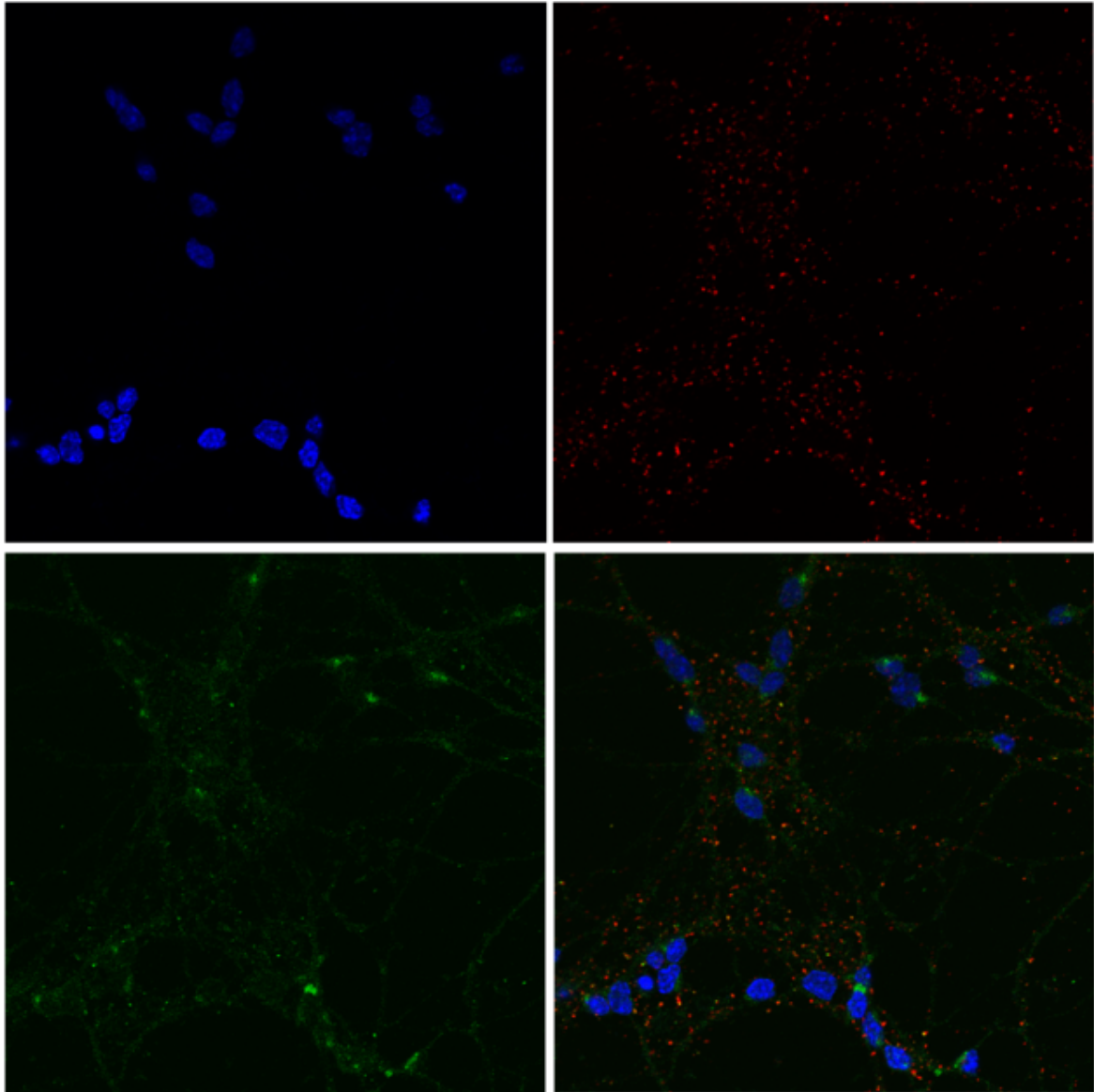


Figura 31. Doppia immunofluorescenza condotta su cellule controllo con la subunità B della tossina colerica (segnale rosso) e l'anticorpo primario anti proteina prionica 6H4 (segnale verde).

4.11.2 Doppia immunofluorescenza con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo anti-proteina prionica SAF32

Negli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo primario anti-proteina prionica SAF32, risulta ben visibile una diffusa distribuzione di quest'ultimo, non solo a livello della membrana plasmatica, ma anche nelle regioni perinucleari, in organelli interni e probabilmente a livello del complesso di Golgi.

Anche in questo esperimento si osservano alcune zone di co-localizzazione con la subunità B della tossina colerica ma, ad una prima analisi, risultano numericamente ridotte.

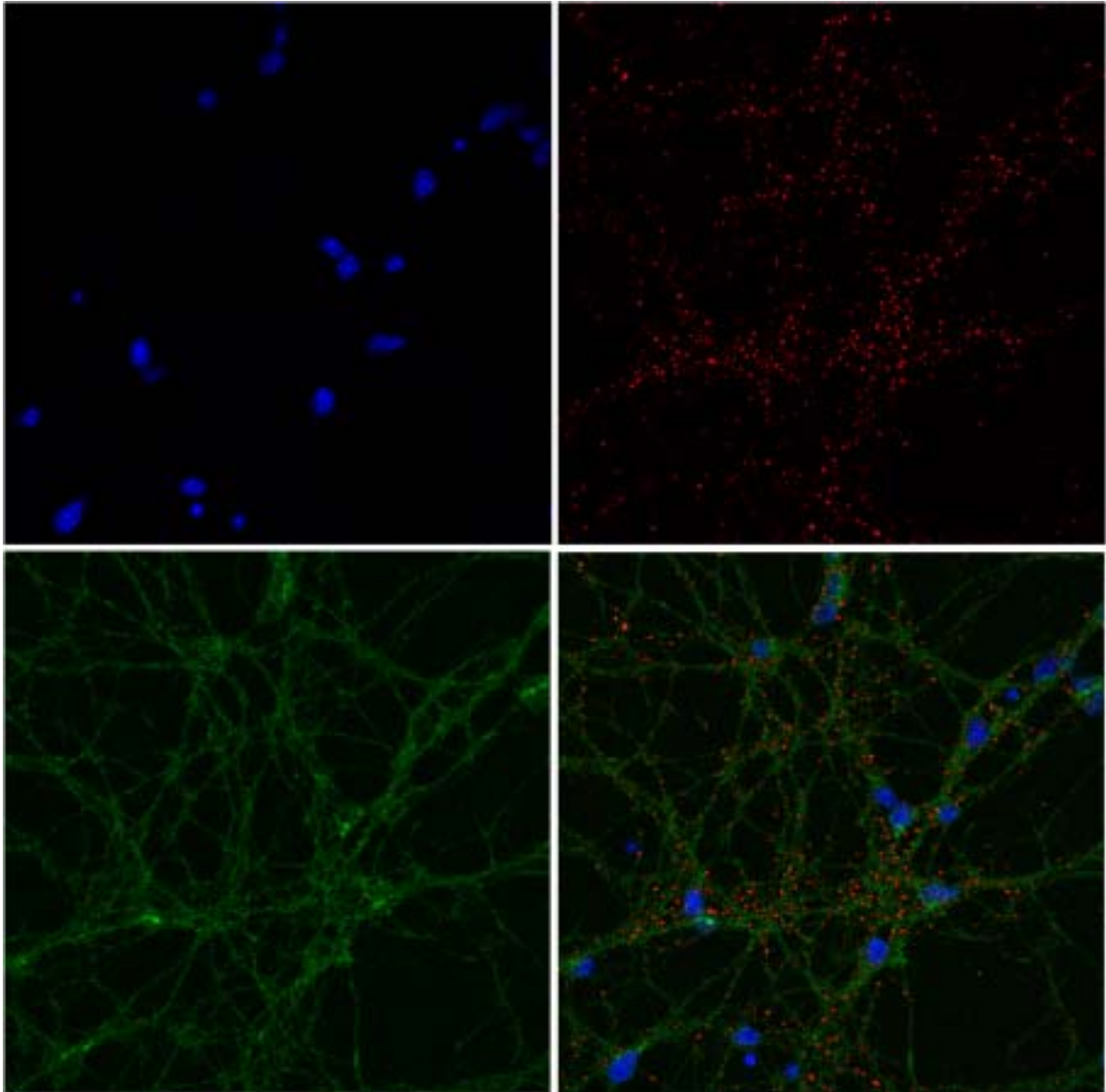


Figura 32. Doppia immunofluorescenza condotta su cellule controllo con la subunità B della tossina colerica (segnale rosso) e l'anticorpo primario anti proteina prionica SAF32 (segnale verde).

4.11.3 Doppia immunofluorescenza con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo anti-proteina prionica 8G8

Negli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo primario anti-proteina prionica 8G8, si osserva l'emissione di un debole e diffuso segnale verde. Dal confronto con prove di immunofluorescenza condotte utilizzando solamente l'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo, è possibile comunque distinguere un segnale specifico che sembra localizzare in modo diffuso sia a livello intracellulare che nella membrana plasmatica.

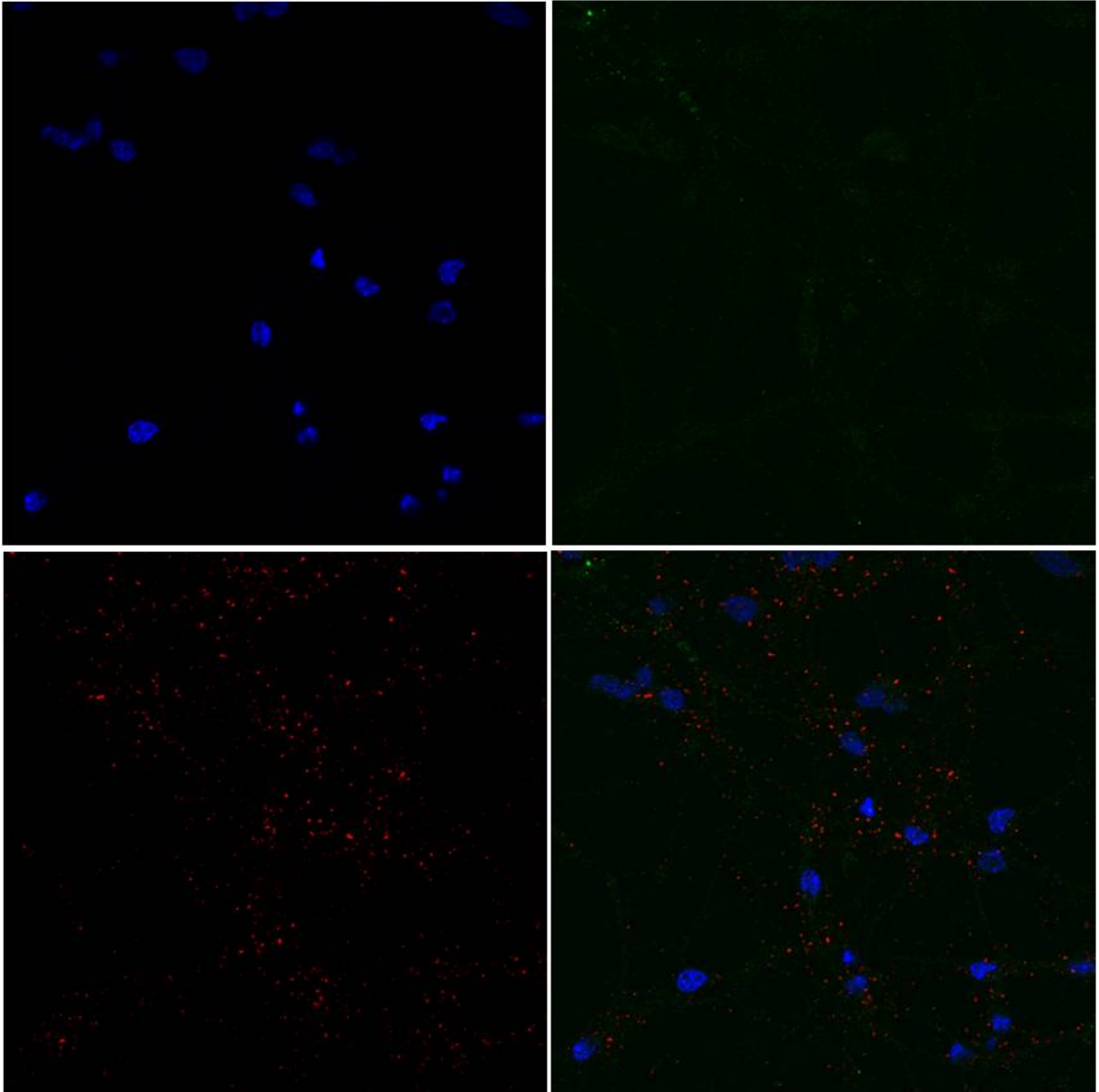


Figura 33. Doppia immunofluorescenza condotta su cellule controllo con la subunità B della tossina colerica (segnale rosso) e l'anticorpo primario anti proteina prionica 8G8 (segnale verde).



Figura 34. Immunofluorescenza condotta su cellule controllo con il solo anticorpo secondario coniugato ad Alexa Fluor 488.

5. DISCUSSIONE

Le malattie da prione sono patologie neurodegenerative letali la cui eziologia è associata alla conversione della proteina prionica nativa (PrP^C) nell'isoforma denominata *scrapie* (PrP^{Sc}) ed all'accumulo di quest'ultima nel tessuto cerebrale. Le caratteristiche comuni di queste patologie risiedono nell'inevitabile neurodegenerazione e nella conseguente letalità.

Nonostante l'elevata conservazione interspecie della sequenza amminoacidica della proteina prionica cellulare, le sue funzioni fisiologiche rimangono largamente sconosciute; è ormai noto però che la presenza di PrP^C è necessaria per lo sviluppo della patologia.

Le due isoforme della proteina prionica condividono la stessa struttura primaria e le stesse modifiche post-traduzionali (Stahl et al., 1993); PrP^{Sc} possiede però meno strutture ad α -elica (30%) e più foglietti- β (43%) rispetto a PrP^C (42% e 3% rispettivamente). La conversione della conformazione da strutture ad α -elica a strutture a foglietto- β rappresenta il punto chiave nella formazione di PrP^{Sc} (Pan et al., 1993; Prusiner, 1998; Büeler et al., 1993). Questo cambiamento conformazionale comporta inevitabilmente delle modifiche nelle proprietà chimico-fisiche della proteina. PrP^C è solubile in detergenti non denaturanti mentre PrP^{Sc} non lo è; inoltre l'isoforma *scrapie* mostra una certa resistenza alla proteasi K ed alla denaturazione (Zampieri et al., 2009), a differenza della proteina prionica nativa.

La proteina prionica cellulare, come le altre proteine con un'ancora GPI, è associata per la maggior parte del proprio ciclo vitale ai *lipid raft*; questi ultimi sono microdomini di membrana fortemente arricchiti in colesterolo, sfingomielina e glicosfingolipidi, come il ganglioside GM1, usato come marker.

I *lipid raft* sembrano giocare un ruolo critico nella conversione conformazionale della proteina prionica cellulare nell'isoforma *scrapie*; nei *lipid raft* estratti dal cervello di topi infetti sono state trovate sia PrP^C che PrP^{Sc} (Taraboulos et al., 1992; Baron, 2003).

La deplezione di colesterolo mediante lovastatina, un inibitore dell'HMG-CoA reduttasi, determina la distruzione dei *raft* e riduce la formazione di PrP^{Sc} (Taraboulos, 1995; Marella, 2002; Bate, 2004); inoltre la rimozione di PrP^C dai microdomini, ottenuta sostituendo l'ancora-GPI con un dominio transmembrana e citosolico di una proteina non associata ai *raft*, previene la formazione di PrP^{Sc} (Taraboulos et al., 1995).

Altri studi invece (Wang et al., 2007) hanno dimostrato che la deplezione di sfingolipidi determina un'aumentata formazione dell'isoforma *scrapie*. Infine, Simons ha verificato che l'incorporazione di gangliosidi esogeni nella membrana cellulare può determinare la fuoriuscita di proteine con un'ancora GPI dai microdomini lipidici (Simons et al., 1999)

In base a queste premesse, uno degli scopi di questa tesi è di verificare se la modificazione della composizione lipidica delle membrane cellulari, e quindi dei *lipid raft* stessi, possa influenzare la distribuzione di PrP^C sulla membrana plasmatica ed intervenire sulla quantità di proteina suscettibile alla trasformazione nell'isoforma patogena.

La proteina prionica cellulare inoltre può essere interessata dal clivaggio naturale che avviene all'interno di una regione della proteina (residui 106-126) che sembra essere fortemente coinvolta nella trasformazione all'isoforma patogena. Questo taglio endoproteolitico determina la formazione di un frammento solubile N-terminale (N1) e di un frammento C-terminale (C1) che resta associato alla membrana cellulare tramite

l'ancora GPI, ma non può più essere convertito in PrP^{Sc} (Harris et al., 1993). Questo clivaggio prende il nome di clivaggio costitutivo o α -clivaggio.

Un altro tipo di taglio endoproteolitico, indotto dalla presenza di specie reattive dell'ossigeno, può avvenire in corrispondenza degli amminoacidi 90-91 determinando così la formazione di un frammento solubile N-terminale (N2) e di un frammento C-terminale (C2) la cui funzione, allo stato attuale, resta sconosciuta.

Studi precedenti inoltre hanno dimostrato, in liposomi di fosfatidiliserina, che un incremento del contenuto di gangliosidi può modificare l'attività della protein chinasi C stessa influenzando le caratteristiche strutturali del doppio strato fosfolipidico: in particolare, all'aumentare della concentrazione di GM1 si ha un incremento graduale dell'attività dell'enzima seguito poi da una progressiva diminuzione quando la concentrazione del ganglioside supera il 2% molare (Pei, 2002). Esistono inoltre evidenze che il trattamento con gangliosidi alteri, per fosforilazione, molte cascate di segnali intracellulari; numerose vie di segnale, attivate da tirosin chinasi recettoriali o mediate dalla PKC, risultano influenzate dai gangliosidi (Hakomori e Igarashi, 1995).

Quanto osservato in letteratura dimostra l'importanza del ruolo svolto dall'ambiente lipidico di membrana nella modulazione dell'attività enzimatica di questa chinasi.

Un altro scopo di questa tesi dunque è di verificare se la modificazione della composizione lipidica della membrana plasmatica, mediante trattamento delle cellule in coltura con diversi gangliosidi, possa indurre, via PKC, un aumento dell'attività catalitica di ADAM10 e/o ADAM17 con un risultante incremento della formazione dei frammenti N1 e C1 e riduzione della quantità di proteina prionica intera passibile alla conversione nell'isoforma *scrapie*.

Il modello cellulare utilizzato in questo studio è rappresentato da colture primarie di cellule granulari ottenute da cervelletti di ratti Sprague-Dawley all'ottavo giorno di vita; le cellule sono state utilizzate all'ottavo giorno in coltura, in modo tale che il differenziamento morfologico e funzionale venisse completato con lo sviluppo di una fitta rete di fibre fascicolate, formazione di sinapsi attive ed espressione di recettori e neurotrasmettitori del sistema glutammatergico (Gallo et al., 1982). Mediante aggiunta di citosina-arabinosiofuranoside, la contaminazione di cellule gliali è mantenuta al 5%.

5.1 MODIFICAZIONI DELLA COMPOSIZIONE LIPIDICA DELLA MEMBRANA CELLULARE A 37°C

Il primo obiettivo di questo studio consiste nella modificazione della composizione lipidica della membrana cellulare e degli stessi *lipid raft* mediante trattamento con gangliosidi esogeni per 4 ore a 37°C. Infatti è già stato dimostrato che i gangliosidi possono muoversi liberamente nelle regioni *raft* e *non-raft* della membrana cellulare e che gangliosidi esogeni, presenti nel medium di coltura, possono essere incorporati facilmente dalle cellule a livello della membrana plasmatica (Moss, 1976). Manipolazioni della composizione lipidica dei *lipid raft* ne possono alterare l'insolubilità ai detergenti ed il *sorting* delle proteine nei neuroni.

Allo stato attuale è stato dimostrato che un ridotto contenuto di sfingolipidi favorisce la conversione della proteina prionica nella forma *scrapie* (Naslavsky et al., 1999); trattando le cellule ScN2a con fumonisina B1

(inibitore della ceramide sintasi) o sfingomielinasi si ha una riduzione della sfingomielina mentre PrP^{Sc} aumenta di 3-4 volte. Al contrario, il PDMP (un inibitore della glucosiltransferasi) agisce riducendo PrP^{Sc} ed aumentando i livelli di sfingomielina. Questo dimostra che i livelli di PrP^{Sc} sono correlati inversamente con i livelli di sfingomielina (Naslavsky et al., 1999).

Nel nostro studio, colture primarie di cellule granulari all'ottavo giorno di coltura *in vitro* sono state inizialmente sottoposte a *pulse* con GM1 o GD1a o GT1b $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 37°C; si è scelto inoltre di trattare le cellule anche con GD1a e GT1b, anch'essi fisiologicamente presenti nei *lipid raft*, per verificare se il maggiore ingombro sterico dovuto all'aumentato numero di residui di acido sialico (due per il GD1a e tre per il GT1b) possa influenzare la quantità e la distribuzione di ganglioside esogeno incorporato nelle cellule e nei *lipid raft*, così come la distribuzione delle proteine di interesse. Trascorso il tempo di incubazione coi gangliosidi esogeni si è proceduto alla preparazione dei microdomini lipidici mediante un gradiente discontinuo di saccarosio, da cui sono state raccolte 12 frazioni; nelle frazioni 1-4 sono presenti soprattutto proteine citoplasmatiche, nella frazione 5 localizzano i *lipid raft* mentre nelle frazioni dalla 6 alla 8 sono presenti le proteine del complesso di Golgi. Infine, nelle frazioni 9-11 localizzano le proteine del reticolo endoplasmatico e dei microsomi mentre l'ultima frazione contiene soprattutto i nuclei cellulari, i mitocondri e la rimanente membrana plasmatica (Fielding, 2006).

La quantità di GM1 esogeno incorporata risulta pari a 3,4 nmoli/mg di proteine; considerando che nelle medesime colture cellulari primarie, all'ottavo giorno *in vitro*, il contenuto di GM1 endogeno è pari a 0,96 nmoli/mg (Valsecchi et al., 1996), si deduce che si è ottenuto un incremento di 3,5 volte rispetto alla condizione fisiologica.

Per quanto riguarda il GD1a, la quantità incorporata è di 3,8 nmoli/mg di proteine rispetto ad un valore di ganglioside endogeno pari 2,95 nmoli/mg; l'aumento osservato è stato quindi di 1,3 volte in confronto alla condizione fisiologica.

Il 21% del GM1 incorporato localizza nella frazione 5 ma questa percentuale si abbassa al 12% quando le cellule vengono trattate con GD1a. Si osserva inoltre un'aumentata distribuzione di GD1a, in confronto al GM1, nelle frazioni dalla 8 alla 12. Ricordando che in quest'ultime frazionano il complesso di Golgi, il reticolo plasmatico e gli endosomi si potrebbe ipotizzare che parte del ganglioside incorporato venga endocitato ed eventualmente metabolizzato.

Questi risultati confermano quanto osservato in studi precedenti: la somministrazione di GM1 esogeno a 37°C determina un arricchimento di questo ganglioside soprattutto a livello dei *lipid raft*; la quota di GM1 incorporato nei microdomini lipidici, calcolata come nmoli di ganglioside per milligrammi di proteine, risulta infatti 3 volte superiore rispetto a quella presente nelle altre frazioni (Simons et al, 1999).

Per quanto riguarda l'incorporazione totale di GM1 e GD1a, nell'intero gradiente, non si osserva una differenza significativa. Negli esperimenti condotti sottoponendo le cellule a *pulse* per 4 ore a 37°C con GT1b, non disponendo del ganglioside radiomarcato, è stato possibile valutare solamente la quantità totale incorporata nelle cellule, pari a 3,7 nmoli/mg di proteine e corrispondente ad un incremento di 0,9 volte rispetto allo stesso rapporto in condizioni fisiologiche. Abbiamo inoltre verificato, durante le 4 ore di trattamento a 37°C, la mancata formazione di prodotti del catabolismo dei gangliosidi esogeni utilizzati; tutti i

risultati ottenuti dovrebbero essere imputabili esclusivamente al ganglioside con cui è stato effettuato il trattamento e non all'eventuale presenza di metaboliti da esso derivanti.

In seguito si è valutato, rispetto ai controlli, l'effetto del trattamento coi gangliosidi esogeni sulla distribuzione delle proteine lungo i gradienti ottenuti; la differenza più significativa che è stata osservata è una diminuzione notevole delle proteine nella frazione 5 dei gradienti ottenuti da cellule trattate con GT1b.

Dai risultati ottenuti si può concludere che il differente ingombro sterico dei gangliosidi esogeni utilizzati (Figura 35) per il trattamento delle cellule non ha influito in modo significativo sulla quantità totale di glicosfingolipide incorporato ma ha avuto effetto sulla sua localizzazione nei *lipid raft* (frazione 5); all'aumentare del numero di residui di acido sialico, si è infatti osservata una riduzione della quantità di ganglioside esogeno incorporato nelle frazione 5.

E' noto che, nei gangliosidi, ad un lieve aumento della complessità della catena oligosaccaridica corrisponde un incremento notevole della loro voluminosità (Prinetti, 2011); all'interno dei *lipid raft* quindi è prevedibile che gangliosidi a minore ingombro possano incorporarsi più facilmente.

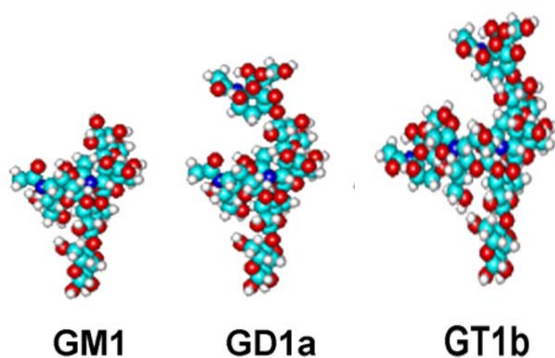


Figura 35. Rappresentazione schematica del diverso ingombro della componente della componente saccaridica dei gangliosidi utilizzati.

E' plausibile che un'aliquota del ganglioside incorporato, sia nei *lipid raft* che nel resto della membrana plasmatica, vada incontro a processi di endocitosi che tuttavia è limitata considerando i risultati ottenuti dagli studi metabolici.

Possiamo inoltre concludere che solamente il trattamento delle cellule con GT1b $2 \cdot 10^{-6}$ M, per 4 ore a 37°C è in grado di determinare la riduzione delle proteine totali presenti nella frazione 5, che contiene i *lipid raft*.

E' possibile che l'incorporazione di questo ganglioside nei microdomini lipidici possa, a causa della sua voluminosità, destabilizzare la struttura dei *lipid raft* determinando così lo spostamento delle proteine presenti verso le regioni *non raft* e la riduzione, in termini "numerici", degli stessi micro domini lipidici.

5.2 IMMUNOBLOTTING DELLE PROTEINE D'INTERESSE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI A 37°C

Considerato il nostro interesse focalizzato sulla proteina prionica cellulare, abbiamo scelto di utilizzare tre diversi anticorpi primari capaci di riconoscere tre diverse sequenze di PrP^C, secondo lo schema sottostante. L'anticorpo primario 6H4 è specifico per la sequenza amminoacidica 144-152 localizzata nella prima α -elica della proteina, in prossimità del C-terminale di PrP^C, a valle del sito di α -clivaggio; è noto (Apostol, 2011) che proprio questa regione è coinvolta nel riarrangiamento della proteina prionica nativa nell'isoforma patogena.

L'anticorpo SAF32 invece riconosce la sequenza compresa tra le posizioni 79-92, vicino all'N-terminale, in prossimità del sito di β -clivaggio, nella regione che risulta limitatamente coinvolta nel cambiamento conformazionale all'isoforma *scrapie*.

Infine l'anticorpo 8G8, specifico per la sequenza amminoacidica 95-110, a valle del sito di β -clivaggio ed immediatamente a monte di quello di α -clivaggio. Questo anticorpo, da quanto emerge in letteratura riconosce prevalentemente l'isoforma *scrapie*. (Andreoletti, 2004).

Mediante l'immunodecorazione con questi tre anticorpi sarebbe quindi teoricamente possibile distinguere tra la presenza della proteina prionica intera e di frammenti derivanti dai due possibili tipi di taglio endoproteolitico. In base a quanto dimostrato da studi precedenti è necessario però procedere alla deglicosilazione dei campioni, prima della loro separazione elettroforetica, per poter effettivamente rilevare, mediante *western blotting*, l'eventuale formazione dei frammenti C ed N-terminali. Si è quindi preferito fare una prima analisi della distribuzione delle proteine di interesse lungo il gradiente e procedere solo in un secondo momento, alla deglicosilazione con PNGasi.

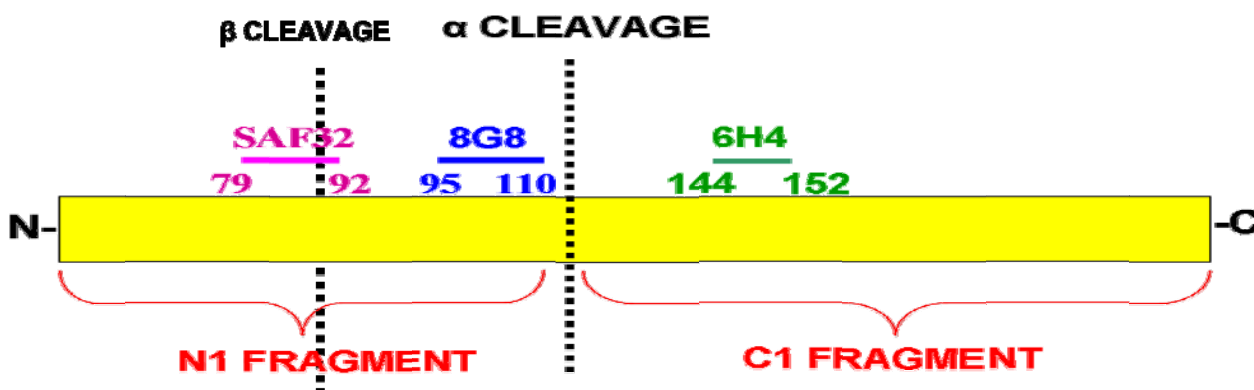


Figura 36. Rappresentazione schematica di PrP^C e delle sequenze amminoacidi che riconosciute dagli anticorpi primari utilizzati.

L'immunodecorazione condotta con i tre diversi anticorpi ha condotto a risultati sorprendenti.

Con l'anticorpo primario anti-PrP^C 6H4, si nota che sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule trattate con GD1a e GT1b, la proteina prionica è localizzata quasi esclusivamente a livello dei *lipid raft*. Questo risultato è in accordo con numerosi studi precedenti che, proprio avvalendosi dell'utilizzo di questo unico anticorpo, hanno dedotto che PrP^C localizza preferibilmente nei *lipid raft* (Brown, 1992; Taraboulos, 1995; Harme, 1995). Abbiamo però osservato che, nella frazione 5 del gradiente ottenuto da cellule trattate con GM1, la proteina prionica nativa è quasi assente, così come nelle altre frazioni.

Utilizzando l'anticorpo primario anti-PrP^C SAF32 invece, sia nei controlli che nei gradienti provenienti da cellule trattate coi diversi gangliosidi, la proteina prionica non risulta localizzata in modo esclusivo nella frazione 5 ma appare distribuita anche lungo le frazioni del gradiente comprese tra la 7 e la 12. Solo nelle cellule trattate con GT1b, abbiamo osservato un'importante riduzione di PrP^C, a livello dei *lipid raft*; possiamo ricondurre questo risultato all'elevato ingombro di questo ganglioside che potrebbe quindi determinare la fuoriuscita di alcune proteine dai microdomini lipidici. Uno studio di Simons e Kurzchalia ha dimostrato infatti che la manipolazione del contenuto lipidico delle membrane cellulari, mediante somministrazione di gangliosidi esogeni, può determinare la fuoriuscita dai microdomini lipidici di alcune proteine con ancora GPI (Simons, 1999).

Considerata l'elevata voluminosità del GT1b e quanto riportato in letteratura, possiamo quindi concludere che nelle cellule sottoposte a *pulse* con questo ganglioside per 4 ore a 37°C, la riduzione della proteina prionica nativa rilevata nei *lipid raft* è attribuibile all'ingombro del GT1b ed alla diminuzione numerica dei microdomini lipidici stessi. Questo risultato non è stato ottenuto nelle cellule trattate con GM1 o GD1a, la cui componente oligosaccaridica occupa un volume notevolmente inferiore.

Per quanto riguarda la distribuzione della proteina chinasi C, si osserva nella frazione 5 dei gradienti ottenuti da cellule trattate coi gangliosidi, un incremento della sua quantità, rispetto ai controlli. In lavori precedenti è stato dimostrato che ad un'aumentata attivazione della PKC corrisponde una maggior formazione dei frammenti N1 e C1; questa azione sembra essere mediata dalle metalloproteasi ADAM10 e ADAM17 (Vincent, 2008). Alla luce del ruolo che dovrebbe avere questa chinasi nell'attivazione di ADAM10 e ADAM17, abbiamo proceduto valutando anche la distribuzione, lungo il gradiente, di queste due proteine; ADAM10 risulta localizzata quasi esclusivamente nei *lipid raft*, sia nei gradienti controllo che in quelli ottenuti da cellule trattate coi diversi gangliosidi. Ad un'aumentata presenza di PKC non corrisponde, nel nostro modello cellulare, un'aumentata presenza di ADAM10 nei *lipid raft*; nel caso del trattamento con GT1b si assiste persino ad una sua diminuzione.

L'incubazione delle cellule con GT1b per 4 ore a 37°C determina, nei *lipid raft*, la riduzione delle proteine totali e di tutte le proteine d'interesse considerate, ad eccezione della proteina chinasi C. E' possibile che quest'ultima, a differenza delle altre proteine considerate, non risenta dell'incorporazione di questo ganglioside sulla superficie dei *lipid raft*, essendo localizzata sul foglietto interno della membrana cellulare; questi risultati quindi confermano ulteriormente le nostre precedenti conclusioni: il GT1b, inserendosi a livello del foglietto esterno della membrana cellulare può determinare, a causa del suo ingombro sterico, lo spostamento, verso le regioni *non raft*, delle proteine localizzate sul foglietto esterno dei microdomini lipidici ma non sembra esercitare nessun effetto sulle proteine rivolte verso il foglietto interno della membrana cellulare.

Abbiamo valutato anche la distribuzione di ADAM17 lungo le 12 frazioni dei gradienti ma, sia nei controlli che nei trattati, questa proteina non risulta localizzata nei *lipid raft* e la quantità rilevata nelle altre frazioni è molto bassa; per questo motivo l'analisi fatta non è stata riportata nel precedente capitolo. Abbiamo quindi concluso che, nel nostro modello cellulare, è poco probabile che un eventuale incremento dell' α -clivaggio di PrP^C possa essere mediato, via PKC, da ADAM10 o ADAM17.

5.3 VALUTAZIONE DEL CLIVAGGIO DI PrP^C IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON GANGLIOSIDI ESOGENI A 37°C

I risultati ottenuti ci hanno condotti ad indagare ulteriormente, soprattutto alla luce della diversa distribuzione che sembra avere la proteina prionica, lungo le frazioni del gradiente, in base al tipo di anticorpo primario utilizzato ed all'apparente assenza di PrP^C rilevabile nei *lipid raft*, con l'anticorpo 6H4, in seguito a trattamento con GM1. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nell'aumentato clivaggio di PrP^C; considerando la sequenza amminoacidica riconosciuta dall'anticorpo primario 6H4, è evidente che quest'ultimo è in grado di legarsi in modo specifico sia alla proteina prionica intera che ai frammenti C1 e C2. Questi ultimi però non sono visibili, in *western blotting*, se non si procede con la deglicosilazione dei campioni prima della loro separazione mediante corsa elettroforetica. La distinzione tra la proteina prionica nativa intera ed i frammenti C1 e C2 potrà quindi poi avvenire in base al peso molecolare, ovvero alla distanza percorsa nella separazione elettroforetica.

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario 6H4 evidenzia, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 o GD1a a 37°C, la presenza di due bande distinte: la prima, a 27 KDa, corrisponde alla proteina prionica deglicosilata mentre la seconda, a 17 KDa, rappresenta il frammento C1 derivante dall' α -clivaggio della proteina stessa. Si nota che, successivamente al trattamento di deglicosilazione, la presenza della proteina prionica cellulare è rilevabile, seppur con minore intensità, anche nella frazione 5 del gradiente ottenuto da cellule trattate con GM1 a 37°C. La quantità di frammenti C1 derivanti dall' α -clivaggio è del tutto paragonabile, sia nei controlli che nei trattati, alla quantità di proteina prionica intera deglicosilata; si può concludere quindi che il trattamento con GM1 o GD1a non influenza in alcun modo il taglio endoproteolitico della proteina prionica e ch

e, in condizioni fisiologiche, il 50% della proteina prionica nativa presente, sia nei *lipid raft* che nelle frazioni 8-12, è α -clivata.

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario SAF32 conferma questa conclusione in quanto evidenzia, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 o GD1a a 37°C, la presenza di una sola banda corrispondente alla proteina prionica cellulare deglicosilata. La quantità di proteina prionica intera rilevata lungo il gradiente non sembra essere influenzata dal trattamento con questi gangliosidi; la mancata rilevazione dei frammenti N1 ed N2 nelle frazioni 8-12 inoltre si pone a dimostrazione del fatto che il clivaggio della proteina prionica intera non può che avvenire a livello della membrana plasmatica e non in compartimenti intracellulari come altri studi suggeriscono (Walmsley, 2008). Si nota, sia nei controlli che nelle cellule trattate con ciascun ganglioside, che la proteina appare distribuita nei *lipid raft* e lungo le frazioni 8-12 del gradiente.

L'immunodecorazione con l'anticorpo primario 8G8 non consente di rilevare, tra i controlli ed i gradienti ottenuti da cellule sottoposte a trattamento con GM1 o GD1a, la presenza di differenze nella distribuzione e nella quantità di proteina prionica intera o di frammenti N1, derivanti da un'eventuale α -clivaggio. All'altezza di corsa corrispondente a 27 KDa è visibile solamente un segnale molto debole che sembra localizzare preferibilmente nelle frazioni 8-12.

I risultati che hanno attratto la nostra attenzione in modo particolare sono stati:

- la mancata rilevazione, mediante immunodecorazione con 6H4, della proteina prionica nei *lipid raft* di gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 a 37°C;
- la ricomparsa, dopo glicosilazione ed immunodecorazione con 6H4, della proteina prionica intera e del frammento C1 nei *lipid raft* e nelle frazioni 8-10 dei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 a 37°C.

Alla luce di questi risultati, si è approfondito lo studio della letteratura esistente riguardante le interazioni tra proteine e gangliosidi; numerosi studi (Matsuzaki et al., 2010; Kakio et al., 2002; Choo-Smith, 1997) hanno identificato l'esistenza di una forma di proteina amiloide (A β) capace di legarsi in modo molto forte al GM1; questo legame induce un cambiamento conformazionale di A β , un'alterata immunoreattività e la capacità di accelerare l'aggregazione in strutture fibrillari. Inoltre il legame di A β sembra avvenire proprio all'interno di microdomini lipidici di membrana; nei doppi strati lipidici di tipo *non-raft* infatti l'interazione tra A β ed il GM1 non avviene, anche quando la quantità di questo ganglioside è uguale a quello dei sistemi *raft-like*.

E' stato dimostrato che questo differente comportamento di A β , nelle membrane *raft* e *non raft*, è dovuto al fatto che la proteina riconosce e lega in modo specifico solo i *cluster* di GM1, caratteristici dei *lipid raft*; la proteina A β , mediante il suo legame col GM1, adotta una conformazione alterata che ne stimola l'assemblaggio in fibrille. E' stato quindi individuato il ruolo del GM1 quale nucleo endogeno di polimerizzazione della A β nel cervello.

Altri studi (Ariga et al., 2008) confermano che il legame di A β al GM1 induce un progressivo cambiamento conformazionale della proteina da una struttura *random coil* ad una estremamente ricca in β -foglietti.

Altri gangliosidi, tra cui il GT1b ed il GD1a, mostrano, rispetto al GM1, una maggiore forza di legame ad A β ma esercitano un effetto limitato sulla polimerizzazione di questo peptide.

L'invecchiamento rappresenterebbe quindi un fattore di rischio per lo sviluppo dell'Alzheimer in quanto, all'aumentare dell'età si verifica un aumento del contenuto di GM1 (Valsecchi et al., 1995), soprattutto a lunga catena, che potrebbe far aumentare la clusterizzazione di questo ganglioside nelle membrane plasmatiche delle cellule neuronali, soprattutto a livello dei *lipid raft* aumentando il cambiamento conformazionale di A β .

In base ai risultati ottenuti ed a quanto riportato in letteratura, abbiamo ipotizzato che una simile interazione possa avvenire tra il GM1 e PrP^C; l'elevata incorporazione del GM1 esogeno a livello dei *lipid raft* determina sicuramente un arricchimento di questo ganglioside nei microdomini lipidici conseguente aumento di *cluster* di GM1. In queste condizioni l'interazione tra il ganglioside e la proteina verrebbe favorito, rispetto alla condizione fisiologica, e potrebbe essere responsabile di un parziale cambiamento conformazionale di PrP^C a dare una forma, che chiameremo "*simil-scrapie*", arricchita in β -foglietti e con caratteristiche chimico-fisiche intermedie tra la proteina prionica nativa e l'isoforma patogena. Inoltre è stato dimostrato (Wang, 2007) che la proteina prionica nativa può interagire coi lipidi della membrana cellulare mediante un iniziale contatto elettrostatico tra la regione N-terminale di PrP^C (ricca di amminoacidi carichi positivamente)

e le cariche negative dei lipidi anionici; a questo seguirebbe poi un'interazione di natura idrofobica tra i lipidi stessi e la regione 111-134 della proteina.

La mancata rilevazione, mediante immunodecorazione con 6H4, della proteina prionica nei *lipid raft* di cellule trattate con GM1 a 37°C, è stata quindi attribuita all'assunzione da parte di PrP^C di una conformazione "*simil-scrapie*", non più riconoscibile dall'anticorpo 6H4. E' facilmente obiettabile che, conducendo la separazione elettroforetica in condizioni denaturanti, l'eventuale cambiamento conformazionale non dovrebbe influire sulla capacità dell'anticorpo di legarsi alla proteina. Numerosi studi però dimostrano che "varietà" diverse di proteina prionica possiedono una diversa resistenza alla proteolisi ma anche alla denaturazione (Zampieri, 2009). Abbiamo quindi ipotizzato che il trattamento di denaturazione da noi condotto non sia stato sufficiente a far perdere completamente alla forma "*simil-scrapie*" la sua conformazione, rendendo così difficile il suo riconoscimento da parte dell'anticorpo. Studi precedenti hanno già dimostrato che il GM1, legandosi saldamente alla tirosin chinasi recettoriale A (Trk A), è capace di formare un complesso resistente alla denaturazione con sodio-dodecil-solfato (Mutoh, 1995). Inoltre considerando che, con l'anticorpo primario 6H4, la proteina prionica viene rilevata, sia nei controlli che nei trattati, solo nella frazione 5, è possibile che la stessa isoforma "*simil-scrapie*" sia presente anche nelle frazioni a maggior densità frazionano il reticolo endoplasmatico, il complesso di Golgi e gli altri organelli intracellulari.

Il risultato ottenuto con la PNGasi conferma questa ipotesi: ricordiamo che dopo glicosilazione ed immunodecorazione con 6H4, la proteina prionica intera ed i frammenti C1 vengono rilevati non solo nei *lipid raft*, ma anche nelle frazioni 8-10 dei gradienti ottenuti da cellule trattate con GM1 a 37°C. Il protocollo di deglicosilazione prevede non solo l'aggiunta di PNGasi ai campioni ma anche un pre-trattamento, a 100°C per 10 minuti, con una soluzione di denaturante inclusa nel *kit* (*PNGase F, New England Biolabs*); è quindi possibile che la deglicosilazione, unitamente al pre-trattamento ed ad un'ulteriore denaturazione eseguita col Laemmli *buffer* prima del caricamento in elettroforesi possano indurre la completa denaturazione della forma "*simil-scrapie*" rendendone così possibile il riconoscimento da parte dell'anticorpo 6H4.

5.4 MODIFICAZIONI DELLA COMPOSIZIONE LIPIDICA DELLA MEMBRANA CELLULARE A 4°C

Esperimenti successivi sono stati condotti sottoponendo le cellule a *pulse* con GM1 per 4 ore a 4°C; abbiamo scelto di abbassare la temperatura di incubazione al fine di rallentare i movimenti di diffusionali laterali dei lipidi ed il traffico intracellulare tra la plasma membrane e i compartimenti intracellulari; teoricamente i *lipid raft* non vanno incontro ad endocitosi conseguentemente il ganglioside esogeno incorporato e tutte le proteine rimangono sulla superficie della cellula.

Si è deciso di effettuare questa prova solo col GM1 essendo il ganglioside che allo stato attuale ci ha fornito i risultati più interessanti.

La quantità di GM1 esogeno incorporato è pari a 2,5 nmoli/mg di proteine e ben il 30% localizza nella frazione 5; anche in questo caso abbiamo verificato mediante cromatografia su strato sottile, l'assenza di prodotti di catabolismo del GM1. Nonostante la percentuale di GM1 incorporata nei *lipid raft* sia maggiore rispetto agli esperimenti precedenti, considerando la maggior incorporazione totale del ganglioside negli esperimenti a 37°C, il rapporto tra nmoli di GM1 e milligrammi di proteine nella frazione 5 è molto simile in entrambi in trattamenti.

Non è stata riscontrata, nella distribuzione delle proteine lungo le 12 frazioni del gradiente, alcuna variazione rispetto ai controlli.

Gli esperimenti di *western blotting*, l'immunodecorazione della proteina prionica è stata condotta con i tre diversi anticorpo primari precedentemente utilizzati. Per quanto riguarda la localizzazione di PrP lungo il gradiente non è stata osservata alcuna variazione rispetto ai controlli, ma con tutti e tre gli anticorpi utilizzati è stato osservato un lieve aumento della proteina prionica rilevata nella frazione 5. Abbiamo attribuito questo leggero incremento al blocco dei processi di endocitosi e di traffico intracellulare che determinano indubbiamente un rallentamento dei fenomeni di riciclo delle proteine localizzate sulla superficie cellulare.

Si nota che l'anticorpo 6H4 riesce a rilevare la proteina prionica presente nei *lipid raft*, sia nei controlli che nei gradienti ottenuti dal trattamento con GM1 a 4°C; questo risultato è coerente con quelli precedentemente ottenuti a 37°C in quanto, ad una temperatura di incubazione così bassa, i movimenti laterali dei gangliosidi sono rallentati ed in una simile condizione è improbabile che la presenza di GM1 possa influire sulla conformazione della proteina prionica.

5.5 IMMUNOFLUORESCENZA

Nell'immunodecorazione della proteina prionica, nei gradienti ottenuti da cellule controllo e sottoposte a trattamento con i gangliosidi esogeni per 4 ore a 37°C, sembra che PrP^C localizzi diversamente nelle 12 frazioni del gradiente, in base al tipo di anticorpo primario utilizzato.

Negli studi riportati in letteratura, l'anticorpo che viene utilizzato per dimostrare la localizzazione esclusiva della proteina prionica nei *lipid raft*, è l'anticorpo 6H4; in accordo coi nostri esperimenti infatti, utilizzando questo anticorpo viene rilevata solamente la proteina prionica presente nei microdomini lipidici. L'utilizzo di anticorpi anti-PrP SAF32 e 8G8 (che riconoscono sequenze vicine all'N-terminale) hanno permesso però di individuare la presenza della proteina anche nelle frazioni del gradiente corrispondenti al complesso di Golgi, il reticolo endoplasmatico ed altre strutture endocellulari (tra cui endosomi e lisosomi).

Studi precedentemente condotti (Khan, 2010) hanno dimostrato che a bassi valori di pH, tipico per esempio degli endosomi tardivi e dei lisosomi, la proteina prionica cellulare si riorganizza prevalentemente in una β -struttura denominata β -PrP; tale forma si crea per riarrangiamento del ponte disolfuro nativo. L'elevata flessibilità conformazionale della regione N-terminale permette di assumere che piccole variazioni delle condizioni dell'ambiente circostanti possano indurre una riorganizzazione strutturale della proteina. L'anticorpo 8G8 inoltre è utilizzato in numerosi studi proprio al fine di riconoscere le forme di PrP ricche in foglietti β .

Per verificare la selettività dell'anticorpo 6H4 nel riconoscere la proteina prionica presente nei *lipid raft*, la capacità di SAF32 di riconoscere entrambe le forme e la predilezione di 8G8 per le forme β -PrP, abbiamo condotto degli studi di immunofluorescenza su cellule di controllo, non sottoposte a *pulse* con gangliosidi esogeni. Negli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con la subunità B della tossina colerica ed i singoli anticorpi anti-PrP, abbiamo osservato la localizzazione preferenziale dell'anticorpo 6H4 in strutture di membrana riconducibili con ogni probabilità ai *lipid raft*. E' visibile inoltre una buona co-localizzazione col ganglioside GM1. Come ci aspettavamo invece, gli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con SAF32 hanno mostrato un segnale molto più diffuso, non limitato a specifiche regioni di membrana e presenta anche nelle regioni perinucleari ed in strutture citoplasmatiche; la co-localizzazione col GM1 risulta ridotta.

Negli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con la subunità B della tossina colerica e l'anticorpo primario anti-proteina prionica 8G8, si osserva l'emissione di un debole e diffuso segnale verde. Dal confronto con prove di immunofluorescenza condotte utilizzando solamente l'anticorpo secondario coniugato al fluorocromo, è possibile comunque distinguere un segnale specifico. La debolezza di quest'ultimo però non permette di trarre informazioni precise né sulla localizzazione cellulare della proteina prionica rilevata con l'anticorpo 8G8, né su un'eventuale colocalizzazione con la subunità B della tossina colerica, ovvero col GM1. Si può comunque escludere la presenza dei raggruppamenti osservati, a livello della membrana plasmatica, negli esperimenti di doppia immunofluorescenza condotti con l'anticorpo primario 6H4. Questo risultato dimostra che negli studi di localizzazione delle proteine, si dovrebbe procedere con maggior cautela ed utilizzare perlomeno due anticorpi primari capaci di riconoscere in modo specifico sequenze amminoacidiche che localizzano in regioni diverse della stessa proteina; la maggior parte degli studi presenti in letteratura, focalizzati sullo studio della proteina prionica, ricorrono all'utilizzo dell'anticorpo 6H4 a riprova dell'arricchimento di questa proteina nei *lipid raft*. I risultati da noi ottenuti ne confermano la localizzazione all'interno dei microdomini lipidici di membrana ma non in modo esclusivo.

5.6 CONCLUSIONI FINALI

Si può concludere che:

- il trattamento delle cellule con GM1 $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 37°C determina un'elevata incorporazione del ganglioside nei *lipid raft* e sembrerebbe indurre il riarrangiamento della proteina prionica nativa in un'isoforma *simil-scrapie* resistente alla denaturazione; questa stessa forma potrebbe essere presente fisiologicamente anche in compartimenti intracellulari.
- Il trattamento delle cellule con GT1b $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 37°C determina, a causa del suo ingombro sterico, l'uscita dai *lipid raft* delle proteine presenti a livello del foglietto esterno della membrana cellulare, tra cui la proteina prionica. Questo ganglioside è risultato l'unico capace di indurre lo spostamento di PrP^C nelle regioni *non raft*.
- Il trattamento delle cellule con i gangliosidi esogeni da noi utilizzati non determina alcun aumento dell' α -clivaggio della proteina prionica nativa.
- La proteina prionica non localizza esclusivamente nei *lipid raft*.
- Il trattamento delle cellule con GM1 $2 \cdot 10^{-6}$ M per 4 ore a 4°C determina un'elevata incorporazione del ganglioside nei *lipid raft* ma il rallentamento dei movimenti di diffusione laterali dei lipidi e la complessiva rigidità del sistema, dovuta alla bassa temperatura, non permettono un'efficace interazione tra la proteina prionica ed il ganglioside

APPENDICE A – Bibliografia

- Allen JA**, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM; *Nat. Rev. Neurosci.* (2007) 8 (2): 128-40.
- Alper T**, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC; *Nature* (1967) 214 (5090): 764-6.
- Andréoletti O**, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbière F, Ferré P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F. *Nat Med.* (2004) 10(6): 591-3.
- Apostol MI**, Surewicz WK. *J Biol Chem.* (2011) 286(21).
- Ariga T**, McDonald MP, Yu RK. *J Lipid Res.* (2008);49(6):1157-75.
- Baldwin MA**, Pan KM, Nguyen J, Huang Z, Groth D, Serban A, Gasset M, Mehlhorn I, Fletterick RJ, Cohen FE, et al.; *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* (1994) 343 (1306): 435-41.
- Baron GS**, Caughey B; *Biol. Chem.* (2003) 278 (17): 14883-92.
- Baron GS**, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B; *EMBO J.* (2002) 21 (5): 1031-40.
- Bate C**, Salmona M, Diomede L, Williams A. *J Biol Chem.* (2004) 279 (15): 14983-90.
- Beranger F**, Mange A, Goud B, Lehmann S; *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 38972–38977.
- Bogdanov M**, Dowhan W; *J Biol Chem.* (1999) 274 (52): 36827-30.
- Borchelt DR**, Taraboulos A, Prusiner SB; *J. Biol. Chem.* (1992) 267 (23): 16188-99.
- Brown DR**, J Herms e HA Kretzschmar; *Neuroreport.* (1994) 5: 2057–2060.
- Büeler H**, Aguzzi A, Sailer A, Greiner R-A, Autenried P, Aguet M, Weissmann C; *Cell* (1993) 73: 1339–1347.
- Cabral AL**, Lee KS, Martins VR; *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 5675–5682.
- Campana V**, Sarnataro D, Zurzolo C; *Trends Cell. Biol.* (2005) 15 (2): 102-11.
- Cantù L**, Del Favero E, Sonnino S, Prinetti A. *Chem Phys Lipids.* (2011) 164 (8):796-810.
- Cashman NR**, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE; *Cell* (1990) 61: 185.
- Castilla J**, Saa P, Hetz C, Soto C; *Cell* (2005) 121: 195–206.
- Caughey B**, Raymond GJ; *J. Biol. Chem.* (1991) 266 (27): 18217-23.
- Chandler RL**; *Lancet* 1 (1961): 1378–1379.
- Chapman J**, Arlazoroff A, Goldfarb LG, Cervenakova L, Neufeld MY, Werber E, Herbert M, Brown P, Gajdusek DC, Korczyn AD; *Neurology* (1996) 46: 758–761.

- Chen SG**, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L; J. Biol. Chem. (1995) 270 (32): 19173-80.
- Chiarini LB**, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R; EMBO J. (2002) 21: 3317–3326.
- Chiesa R**, Harris DA; Neurobiol. Dis. (2001) 8 (5): 743-63.
- Choo-Smith LP**, Surewicz WK. FEBS Lett. (1997);402(2-3): 95-8.
- Coitinho AS**, Dietrich MO, Hoffmann A, Dall'Igna OP, Souza DO, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I, Lara DR; Brain. Res. (2002) 107: 190–194.
- Coitinho AS**, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR; Eur. J. Neurosci. (2006) 24: 3255–3264.
- Coitinho AS**, Hajj GM, Lopes MH, Rossato JI, Freitas AR, Castro CC, Brentani RR, Izquierdo II, Martins VR; Neurobiol. Dis. (2007) 26: 282–290.
- Coitinho AS**, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I; Neuroreport. (2003) 14: 1375–1379.
- Colby DW**, Wain R, Baskakov IV, Legname G, Palmer CG, Nguyen H-OB, Lemus A, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB; PLoS Pathog (2010) 6: e1000736.
- Collinge J**, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. Nature (1994) 370 (6487): 295-7.
- Collinge J**; Annu. Rev. Neurosci. (2001) 24: 519–550.
- Criado JR**, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB; Neurobiol. Dis. (2005) 19: 255–265.
- Critchley P**, Kazlauskaitė J, Eason R, Pinheiro TJ; Biochem Biophys Res Commun. (2004) 313 (3): 559-67.
- Croes EA**, Theuns J, Houwing-Duistermaat JJ, Dermaut B, Slegers K, Roks G, Van den Broeck M, van Harten B, Van Duijn CM et al.; J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (2004) 75 (8): 1166-70.
- Cullie, J & Chelle**; PL. CR. Seances Acad. Sci. (1939): 1058–1160.
- Dodelet VC**, Cashman NR; Blood (1998) 91: 1556–1561.
- Dürig J**, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmücker U, Bieschke J, Dührsen U, Kretzschmar; HBr. J. Haematol. (2000) 108 (3): 488-95.
- Fevrier B**, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2004) 101(26): 9683-8.
- Fioriti**, E Quaglio, T Massignan, L Colombo, RS Stewart, M Salmons, DA Harris, G Forloni e R Chiesa; Mol. Cell. Neurosci. (2005) 28: 165–176.

- Florio T**, S Thellung, C. Amico, M Robello, M Salmona, O Bugiani, F Tagliavini, G Forloni e G Schettini; *J. Neurosci. Res.* (1998) 54: 341–352.
- Forloni G**, N Angeretti, R Chiesa, E Monzani, M Salmona, O Bugiani, F Tagliavini; *Nature* (1993) 362: 543–546.
- Fournier JG**, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O, Lasmezas CI, Deslys JP, Dormont Brown PD; *Cell Tissue Res.* (1998) 292: 77–84.
- Gajdusek**, DC, Gibbs, CJ & Alpers, M; *Nature* (1966) 209: 794–796.
- Gallo V**, Ciotti, M.T., Coletti, A., Aloisi, F. e Levi, G. *Neurobiology* (1982) 79: 7219-7923.
- Gambetti P**, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, et al; *Ann. Neurol.* (2008) 63: 697–708.
- Gilch S**, Bach C, Lutzny G, Vorberg I, Schätzl HM; *Cell Mol Life Sci.* (2009) 66 (24): 3979-91.
- Gilch S**, Kehler C, Schätzl HM; *Mol Cell Neurosci.* (2006) 31(2): 346-53.
- Giordano G.**, Sanchez-Perez, A.M., Burgal, M., Montoliu, C., Costa, L.G. e Felino, V. *J Neurochem.* (2005) 92: 143-157.
- Glasse R**; *Trans NY Acad. Sci.* (1967) 29 (6): 748-54.
- Gohel C**, Grigoriev V, Escaig-Haye F, Lasmézas CI, Deslys JP, Langeveld J, Akaaboune M, Hantaï D, Fournier JG. *J Neurosci Res.* (1999);55(2):261-7.
- Goldfarb LG**, Haltia M, Brown P, Nieto A, Kovanen J, McCombie WR, Trapp S, Gajdusek DC; *Lancet*(1991):337-425.
- Gorodinsky A**, Harris DA; *J. Cell. Biol.* (1995) 129 (3): 619-27.
- Graner E**, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (2000) 76 (1): 85-92.
- Griffith JS**; *Nature* (1967) 215 (5105): 1043-4.
- Hakomori S**, Igarashi Y. *J Biochem.* (1995) 118 (6):1091-103.
- Harmey JH**, Doyle D, Brown V, Rogers MS. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995) 210 (3): 753-9.
- Harris DA**, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R. *Biochemistry* (1993) 32 (4): 1009-16.
- Harris DA**; *Br. Med. Bull.* (2003) 66: 71-85.
- Hooper NM**; *Biochem Soc Trans.* (2005) 33: 335-8.
- Hsiao KK**, Groth D, Scott M, Yang S-L, Serban H, Rapp D, Foster D, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB; *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91: 9126–9130.

- Izquierdo I**, McGaugh JL; *Behav. Pharmacol.* (2000) 11: 517–534.
- Jakob A**; *Neurol. Psychiatr.* (1921) 64: 147-228.
- Jiménez-Huete A**, Lievens PM, Vidal R, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Frangione B, Prelli F; *Am J Pathol.* (1998) 153 (5): 1561-72.
- Kakio A**, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. *Biochemistry.* (2002); 41(23): 7385-90.
- Kaneko K**, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 18; 94(6): 2333-8.
- Kanu N**, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR, Bostock CJ, Brockes JP; *Curr. Biol.* (2002) 12 (7): 523-30.
- Katamine S**, Nishida N, Sugimoto T, Noda T, Sakaguchi S, Shigematsu K, Kataoka Y, Nakatani A, Hasegawa S, Moriuchi R, Miyamoto T; *Cell. Mol. Neurobiol.* (1998) 18: 731–742.
- Kazukawa S**, Nakamura I, Endo M, Hori A, Inao G; *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* (1987) 41: 651–661.
- Khan MQ**, Sweeting B, Mulligan VK, Arslan PE, Cashman NR, Pai EF, Chakrabartty A; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2010) 107 (46): 19808-13.
- Khan MQ**, Sweeting B, Mulligan VK, Arslan PE, Cashman NR, Pai EF, Chakrabartty A. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107 (46):19808-13.
- Kocisko DA**, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT Jr., Caughey B; *Nature* (1994) 370: 471–474.
- Kojro E**, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98 (10): 5815-20.
- Laffont-Proust I**, Faucheux BA, Hässig R, Sazdovitch V, Simon S, Grassi J, Hauw JJ, Moya KL, Haïk S; *FEBS Lett.* (2005) 579 (28): 6333-7.
- Laine J**, Marc ME, Sy MS, Axelrad H; *Eur. J. Neurosci.* (2001) 14: 47–56.
- Lee KS**, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR; *Rev. Med. Virol.* (2003) 13(6): 399-408.
- Lee KS**, Magalhães AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA; *J. Neurochem.* (2001) 79 (1): 79-87.
- Legname G**, Baskakov IV, Nguyen H-OB, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB; *Science* (2004) 305: 673–676.
- Li R**, Liu D, Zanusso G, Liu T, Fayen JD, Huang JH, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS; *Cell Immunol.* (2001) 207: 49–58.
- Liu J**, Oh P, Horner T, Rogers RA, Schnitzer JE; *J. Biol. Chem.* (1997) 272(11):7211-22.
- Lopez-Garcia F**, Zahn R, Riek R, Wuthrich K; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 97: 8334–8339.

- Lugaresi E**, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P; *N. Engl. J. Med.* (1986) 315 (16): 997-1003.
- Lysek DA**, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005) 102: 640–645.
- Mallucci GR**, Ratté S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J. *EMBO J.* (2002) 21 (3): 202-10.
- Manson J**, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J; *Development* (1992) 115: 117–122.
- Marella M**, Lehmann S, Grassi J, Chabry J. *J Biol Chem.* (2002) 277 (28): 25457-64.
- Mastrianni JA**; *Genet. Med.* (2010) 12 (4): 187-95.
- Matsuzaki K**, Kato K, Yanagisawa K. *Biochim Biophys Acta.* (2010);1801(8):868-77.
- Mattei V**, Matarrese P, Garofalo T, Tinari A, Gambardella L, Ciarlo L, Manganelli V, Tasciotti V, Misasi R, Malorni W, Sorice M. *Mol Biol Cell.* (2011).
- McMahon HE**, Mangé A, Nishida N, Créminon C, Casanova D, Lehmann S; *J. Biol. Chem.* (2001) 276 (3): 2286-91.
- Mead S**; *Eur. J. Hum. Genet.* (2006) 14 (3): 273-81.
- Medori R**, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, Tinuper P, Avoni P, Mochi M, Baruzzi A, Hauw JJ, Ott J, Lugaresi E et al.; *N. Engl. J. Med.* (1992) 326: 444–449.
- Miesbauer M**, Rambold AS, Winklhofer KF, Tatzelt J; *Curr Issues Mol Biol.* (2010) 12 (2): 109-18.
- Mironov A Jr**, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ; *J. Neurosci.* (2003) 23: 7183–7193.
- Moore RC**, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D; *J. Mol Biol.* (1999) 292: 797–817.
- Moore RC**, Mastrangelo P, Bouzamondo E, Heinrich C, Legname G, Prusiner SB, Hood L, Westaway D, DeArmond SJ, Tremblay P; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98:15288–15293.
- Morris RJ**, Parkyn CJ, Jen A; *FEBS. Lett.* (2006) 580 (23): 5565-71.
- Moss J**, Fishman PH, Manganiello VC, Vaughan M, Brady RO. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1976) 73 (4):1034-7.
- Naslavsky N**, Shmeeda H, Friedlander G, Yanai A, Futerman AH, Barenholz Y, Taraboulos A. *J Biol Chem.* (1999) 274 (30): 20763-71.

- Naslavsky N**, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A; *J. Biol. Chem.* (1997) 272 (10): 6324-31.
- Nico PB**, de-Paris F, Vinade ER, Amaral OB, Rockenbach I, Soares BL, Guarnieri R, Wichert-Ana L, Calvo F, Walz R, Izquierdo I, Sakamoto AC, Brentani R, Martins VR, Bianchin MM; *Behav. Brain Res.* (2005) 162: 173–181.
- Nieznanski K**, Rutkowski M, Dominik M, Stepkowski D; *Biochem J.* (2005) 387: 93-100.
- Nishida N**, Tremblay P, Sugimoto T, Shigematsu K, Shirabe S, Petromilli C, Erpel SP, Nakaoke R, Atarashi R, Houtani T, Torchia M, Sakaguchi S, DeArmond SJ, Prusiner SB, Katamine S; *Lab. Invest.* (1999) 79: 689–697.
- Oh P**, Schnitzer JE; *Mol. Biol. Cell.* (2001) 12: 685–698.
- Palestini P**, Botto L, Guzzi F, Calvi C, Ravasi D, Masserini M, Pitto M. *J Neurosci Res.* (2002) 67(6):729-38.
- Palestini P**, Pitto M, Ferraretto A, Tettamanti G, Masserini M. *Biochemistry.* (1998) 37 (9): 3143-8.
- Palestini**, Botto, L., Guzzi, Calvi, Ravasi, D., Masserini, M. e Pitto, M. *J. Neuroscience Research* (2002) 67: 729 - 738.
- Pan KM**, Stahl N, Prusiner SB; *Protein Sci.* (1992) 1 (10): 1343-52.
- Parkin ET**, Watt NT, Turner AJ, Hooper NM; *J. Biol. Chem.* (2004) 279(12): 11170-8.
- Pei B**, Liu ZP, Chen JW. *Chem Phys Lipids.* (2002) 114 (2):131-8.
- Peters PJ**, Mironov A Jr, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB; *J. Cell. Biol.* (2003) 162 (4): 703-17.
- Pietri M**, A Caprini, S Mouillet-Richard, E Pradines, M Ermonval, J Grassi, O Kellermann e B Schneider; *J. Biol. Chem.* (2006) 281: 28470–28479.
- Pike LJ**; *J. Lipid. Res.* (2003) 44 (4): 655-67.
- Pitto M.**, Palestini, P., Ferraretto, A., Flati, S., Pavan, A., Ravasi, D., Masserini, M. e Bottiroli, G. *Biochem. J.* (1999) 344: 177-184.
- Prado MA**, Alves-Silva J, Magalhães AC, Prado VF, Linden R et al.; *J. Neurochem.* (2004) 88 (4): 769-81.
- Prinetti A**, Chigorno V, Prioni S, Loberto N, Marano N, Tettamanti G, Sonnino S; *J. Biol. Chem.* (2001) 276 (24): 21136-45.
- Prinzen C**, Trümbach D, Wurst W, Endres K, Postina R, Fahrenholz F; *BMC Genomics* (2009) 10: 66.
- Prusiner SB**; *Annual Review of Microbiology* (1994) 48: 655-686.
- Prusiner SB**; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95: 13363–13383.

- Prusiner SB**; Science (1982) 216 (4542): 136-44.
- Reiss K**, Saffig P; Semin. Cell. Dev. Biol. (2009) 20 (2): 126-37.
- Rogers NG**, Basnight M, Gibbs CJ, Gajdusek DC; Nature (1967) 216 (5114): 446-9.
- Rossi D**, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C; EMBO J. (2001) 20: 694–702.
- Safar J**, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB; Nat. Med. (1998) 4: 1157–1165.
- Sakaguchi S**, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T; Nature (1996) 380: 528–531.
- Sanders CR**, Nagy JK; Curr. Opin. Struct. Biol. (2000) 10 (4): 438-42.
- Sarnataro D**, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L, Zurzolo C. Mol Biol Cell. (2004) 15 (9): 4031-42.
- Scheinost JC**, Witter DP, Boldt GE, Offer J, Wentworth P Jr; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2009) 48 (50): 9469-72.
- Schnitzer JE**, McIntosh DP, Dvorak AM, Liu J, Oh P; Science (1995) 269 (5229): 1435-9.
- Schramm M**, Eimerl, S., Costa, E. Proc. Natl. Acad.Sci. (1990) 87: 1193-1197.
- Schroeder R**, London E, Brown D; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91 (25): 12130-4.
- Selvaggini C**, L De Gioia, L Cantu, E Ghibaudi, L Diomede, F Passerini, G Forloni, O Bugiani, F. Tagliavini e M Salmona; Biophys. Res. Commun. (1993) 194: 1380–1386.
- Sigurdson CJ**, Nilsson KP, Hornemann S, Heikenwalder M, Manco G, Schwarz P, Ott D, Rulicke T, Liberski PP, Julius C, Falsig J, Stitz L, Wüthrich K, Aguzzi A; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2009) 106 (1): 304-9.
- Simons M**, Friedrichson T, Schulz JB, Pitto M, Masserini M, Kurzchalia TV. Mol Biol Cell. (1999) 10(10):3187-96.
- Singh N**, Singh A, Das D, Mohan ML. Antioxid Redox Signal. (2010) 12 (11):1 271-94.
- Stahl N**, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB; Biochemistry (1993) 32: 1991–2002.
- Starke R**, Harrison P, Mackie I, Wang G, Erusalimsky JD, Gale R, Massé JM, Cramer E, Pizzey A, Biggerstaff J, Machin S; J. Thromb. Haemost. (2005) 3 (6): 1266-73.
- Sunyach C**, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R; EMBO J. (2003) 22 (14): 3591-601.
- Supattapone S**, Nishina K, Rees JR; Biochem. Pharmacol. (2002) 63 (8): 1383-8.

- Taraboulos A**, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB; *Mol. Biol. Cell.* (1992) 3(8): 851-63.
- Taraboulos A**, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB. *J Cell Biol.* (1995) 129(1): 121-32.
- Taratuto AL**, Piccardo P, Reich EG, Chen SG, Sevlever G, Schultz M, Luzzi AA, Rugiero M, Abecasis G, Endelman M, Garcia AM, Capellari S, Xie Z, Lugaresi E, Gambetti P, Dlouhy SR, Ghetti B; *Neurology* (2002) 58: 362–367.
- Tateishi J**, Brown P, Kitamoto T, Hoque ZM, Roos R, Wollman R, Cervenakova L, Gajdusek DC; *Nature* (1995) 376: 434–435.
- Telling GC**, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB; *Science* (1996) 274: 2079–2082.
- Terzano MG**, Parrino L, Pietrini V, Mancina D, Spaggiari MC, Rossi G, Tagliavini F; *Sleep* (1995) 18: 849–858.
- Thomas K Koch**, Bruce O Berg, Stephen J De Armond, Richard F Gravina; *N. Engl. J. Med.* (1985) 313: 731-733.
- Vaccarino**, F. M., Alho, H., Santi, M. R. e Guidotti, A. *J. Neurosci.* (1987) 7: 65-76.
- Vaccarino**, F., Guidotti, A., Costa, E. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* (1978) 84 (23): 8707-8711.
- Valsecchi, M.**, Palestini, P., Chigorno, V., Sonnino, S. e Tettamanti, G. *J. Neurochem.* (1993) 60 (1): 193-196.
- Vey M**, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93: 14945–14949.
- Vincent B**, Paitel E, Frobert Y, Lehmann S, Grassi J, Checler F.J *Biol Chem.* (2000) 275 (45): 35612-6.
- Vitrey M**, Huguét P, Samson-Dollfus D; *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* (1971) 30: 253–254.
- Walmsley AR**, Watt NT, Taylor DR, Perera WS, Hooper NM. *Mol Cell Neurosci.* (2009) 40 (2): 242-8.
- Walmsley AR**, Watt NT, Taylor DR, Perera WS, Hooper NM. *Mol Cell Neurosci.* (2009)40 (2): 242-8.
- Wang F**, Yang F, Hu Y, Wang X, Wang X, Jin C, Ma J. *Biochemistry* (2007)12;46(23):7045-53.
- Watt NT**, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WS, Hooper NM, *J. Biol. Chem.* (2005) 280 (43): 35914-21.
- Weissmann C**; *FEBS Lett.* (1996) 389: 3–11.
- Wiegandt H**; *New Comprehensive Biochemistry, Glicolipids* (1985) 10: 199-260.

Will Rg, Ironside Jw, Zeidler M; Lancet (1996) 347: 921-925.

Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97: 145–150.

Zampieri M, Legname G, Altafini C. PLoS Comput Biol. (2009) 5(7):e1000420.