

RIASSUNTO

La proteina prionica cellulare, PrP^C, è una glicoproteina di membrana conservata nei mammiferi ed espressa abbondantemente nei neuroni. A seguito di un processo di cambiamento conformazionale, la proteina si converte nell'isoforma patologica PrP^{Sc} che, caratterizzata da proprietà chimico-fisiche diverse da quelle della PrP^C, costituisce il prione, l'agente eziologico delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) fatali sia per l'uomo che per gli altri animali. Sebbene sia ormai accertato il coinvolgimento della PrP^{Sc} nelle EST, il meccanismo attraverso cui la PrP^{Sc} causa neurodegenerazione e la funzione fisiologica di PrP^C sono rimaste ignote.

Riguardo alla biologia della PrP^C, numerose evidenze sperimentali le hanno attribuito un numero elevato di ruoli, la maggior parte dei quali si esplicherebbe attraverso il coinvolgimento della proteina in multiple vie di segnalazione. Un'ipotesi che più si adatta a tale comportamento multi-sfaccettato, è che la funzione della PrP^C si esplichi agendo su un fattore a sua volta multi-potente - in grado quindi di controllare numerosi eventi cellulari - qual'è, ad esempio, lo ione Ca²⁺. Il Ca²⁺ è infatti un trasportatore pleiotropico di segnali nella cellula, in grado di controllare eventi che vanno dalla sopravvivenza alla morte della cellula.

In questo lavoro di tesi, abbiamo cercato di validare quest'ipotesi comparando, in colture primarie di neuroni granulari di cervelletto ottenuti da topi *wild-type* o privi di PrP^C, sia i movimenti locali di Ca²⁺ sia l'espressione dei sistemi più importanti deputati all'omeostasi dello ione. Per misurare i flussi di Ca²⁺, abbiamo utilizzato la foto-proteina, Ca²⁺-sensibile, equorina, indirizzata a specifici compartimenti cellulari: la membrana plasmatica, il lume del reticolo endoplasmico e la matrice mitocondriale.

Dai risultati ottenuti è emerso che, rispetto a quando è presente, l'assenza della PrP^C è causa di alterazioni dei movimenti dello ione in questi domini, ma anche della diversa espressione di canali, o di pompe, per il Ca²⁺. Ciò permette di concludere che, a fronte del chiaro intervento sull'omeostasi del Ca²⁺, la PrP^C sia un componente del sistema cellulare atto ad evitare l'accumulo tossico dello ione nella cellula.

ABSTRACT

The cellular prion protein, PrP^C, is a membrane-bound glycoprotein abundantly expressed in neurons, and highly conserved among mammals. Its bad reputation originates from the discovery that, following a misfolding process, PrP^C is converted into the pathogenic PrP^{Sc} isoform. PrP^{Sc} has novel physico-chemical and biologic properties, and is the main component of prions, the etiological agents of transmissible spongiform encephalopathies (TSE), which are fatal to both men and animals.

Although much is known about the involvement of PrP^{Sc} in the onset of TSE, the mechanisms of PrP^{Sc}-mediated neurodegeneration and the physiologic function of PrP^C are still obscure. Several lines of evidence have attributed to PrP^C a plethora of different biologic potentials, possibly by taking part in the activation of signalling pathways. The most reasonable hypothesis for this multi-faceted behaviour is that its function includes an additional multi-potent factor capable of controlling several cell events. Our working hypothesis is that this factor is Ca²⁺, the pleiotropic carrier of signals that controls the balance between the life and death of the cell.

In this work, we have probed the hypothesis by comparing, in primary cultures of cerebellar granule cells derived from wild-type and PrP-knockout mice, local Ca²⁺ movements, and the expression of major Ca²⁺-transporting systems. Measurements of Ca²⁺ fluxes have been accomplished by using recombinant aequorin, a Ca²⁺-sensitive photo-protein, genetically targeted to different cellular domains, i.e., the plasma membrane, the lumen of the endoplasmic reticulum and the matrix of mitochondria.

We found that, with respect to the presence of the protein, the absence of PrP^C causes alterations of local Ca²⁺ movements, and of the expression of channels and pumps selective for the ion. These results may thus allow to conclude that, given the clear intervention of PrP^C in Ca²⁺ homeostasis, PrP^C may be part of the cellular system(s) deputed to avoid the toxic accumulation of Ca²⁺ in the cell.

INTRODUZIONE

LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI O MALATTIE DA PRIONI

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST), o malattie da prioni (così chiamate dal nome dell'agente causale), sono un gruppo di malattie neurodegenerative rare ad esito invariabilmente infausto che colpiscono l'uomo e altri mammiferi (Prusiner, 1998). Sebbene fossero state sospettate già nei primi decenni del '900, sono ora classificate in modo puntuale sulla base dei sintomi clinici (demenza spesso associata ad atassia) e sull'analisi biochimico-istopatologica post-mortem del sistema nervoso centrale (SNC). Questo mostra invariabilmente una perdita diffusa di neuroni, ampie vacuolizzazioni, gliosi astrocitaria e, talvolta, depositi amiloidi. Tipiche dell'uomo sono la malattia di Creutzfeld-Jakob (CJD), la sindrome di Gerstman-Straussler-Scheinker (GSS), e l'insonnia familiare fatale (FFI); negli animali, lo scrapie degli ovini, la BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) dei bovini, e la malattia devastante cronica (Chronic Wasting Disease) dei cervidi. Recentemente, è stata caratterizzata una nuova forma umana, detta variante di CJD, connessa al probabile consumo di carne proveniente da bestiame malato di BSE. Come indica il loro stesso nome, le EST sono infatti malattie infettive che possono essere acquisite a seguito del consumo di, per l'appunto, alimenti infetti o per via iatrogena – paradigmatiche sono state quelle derivate dall'uso di strumenti non adeguatamente sterilizzati (elettrodi, strumenti chirurgici), o a seguito di trapianti di cornea e di somministrazione di ormoni (l'ormone della crescita umano e la gonadotropina) ottenuti da cadaveri. Tuttavia, le più frequenti sono le forme sporadiche ed ereditarie (vedi oltre).

I PRIONI

La natura dell'agente eziologico delle EST è stata dibattuta per molto tempo. Inizialmente, si pensava ad un virus lento per il sospetto che, comparso i sintomi generalmente in età adulta, il virus necessitasse di un lungo periodo di incubazione (Bolton et al., 1982, Cho, 1976). Tuttavia, lunghi anni di ricerca hanno smentito che si trattasse di un agente convenzionale. Già nel 1967 il gruppo di Alper riportò che l'agente responsabile dello scrapie ovino era estremamente resistente ai trattamenti - UV e radiazioni ionizzanti - che degradano gli acidi nucleici (Alper et al., 1967). Questi, ed altri esperimenti, dimostrarono poi che la massa residua del putativo acido nucleico era talmente piccola ($\sim 2 \times 10^5$ Da) da mettere seriamente in dubbio l'origine

virale o batterica (Alper et al., 1966). Parimenti, fu escluso che si potesse trattare di un virino (Prusiner, 1998). Fu nel 1967 che finalmente Griffith teorizzò la natura proteica dell'agente delle EST, con capacità auto-replicativa, da cui derivò la *protein only hypothesis* (Griffith, 1967).

Convinto della ragionevolezza dell'ipotesi, per molti anni l'americano Stanley Prusiner si adoperò ad isolare l'agente delle EST, o meglio una frazione di cervello malato arricchita di esso, per il quale, dimostrata la natura proteica (Gabizon et al., 1988), coniò l'acronimo "prione" (per *PRoteinaceous Infective ONly particle*) (Prusiner, 1982). Tuttavia, solo l'individuazione del gene (Basler et al., 1986) stabilì che la proteina predominante del prione (detta PrP^{Sc} da "scrapie") derivava dall'alterazione strutturale di una proteina cellulare costitutivamente espressa nei mammiferi, chiamata proteina prionica (PrP^C). Oggi è del tutto assodato che PrP^C e PrP^{Sc} condividano la stessa sequenza aminoacidica (Stahl et al., 1993) e le stesse modifiche post-traduzionali, e che differiscano per la sola conformazione: la PrP^C ha infatti un elevato (42%) contenuto di α -eliche e un basso (3%) contenuto in β -foglietti, mentre nella PrP^{Sc} i β -foglietti (43%) predominano sulle α -eliche (30%) (vedi Figura 1) (Pan et al. 1993). Tale cambiamento conformazionale impone alla PrP^{Sc} le proprietà chimico fisiche e biologiche sue proprie, tra cui la resistenza alle proteasi, l'insolubilità nei detergenti, la formazione di fibrille (identificabili con il colorante *Congo Red*) e di amiloidi e, non ultima, la capacità di autoreplicarsi (Bolton et al., 1982).

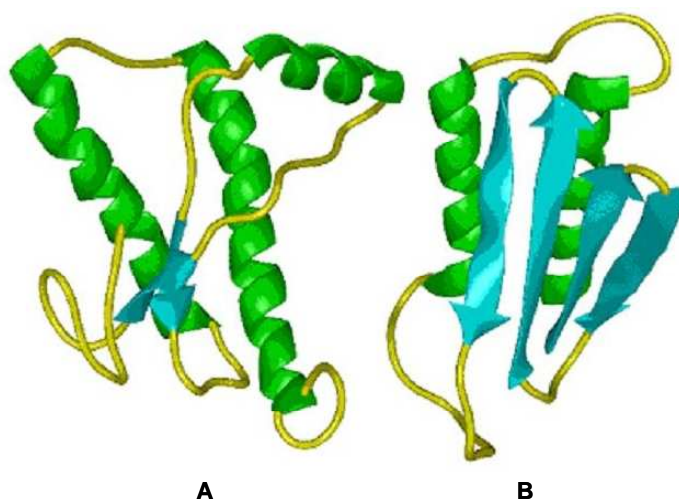


Figura 1. Rappresentazione tridimensionale della struttura secondaria e terziaria di PrP^C (A) e dell'isoforma patogena PrP^{Sc} (B) In verde sono riportate le α -eliche, in

azzurro i foglietti β ; in giallo le regioni non strutturate. Si può osservare il notevole aumento di strutture β nella PrP^{Sc} rispetto alla PrP^C.

Un punto di forza a favore della *protein only hypothesis* fu la dimostrazione che topi ingegnerizzati per l'assenza del gene della PrP^C non solo vivono (quasi) normalmente, ma sono resistenti all'inoculo cerebrale di materiale contenente i prioni (Bueler et al., 1993). Ciò ha dimostrato inequivocabilmente che la replicazione della PrP^{Sc} necessita della presenza di PrP^C (Brandner et al., 1996). Ad avvalorare la teoria sono poi stati fatti esperimenti di produzione di prioni *in vitro* utilizzando la tecnica del PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*) (Kocisko et al., 1994; Saborio et al., 2001) e la produzione per via ricombinante di forme di PrP con proprietà prione-simili (Legname et al., 2004).

Essendo il prione costituito da una proteina, è opportuno sottolineare la difficoltà di spiegare le diverse forme di EST umana, ciascuna caratterizzata dalla specificità dei sintomi clinici, dei periodi d'incubazione e delle aree cerebrali colpite (Prusiner, 1998). Fermo restando che la PrP^{Sc} potrebbe avere una capacità diversa di convertire la PrP^C a seconda della zona del cervello (e dell'individuo) in cui predomina, studi di trasmissibilità dei prioni in cellule ed animali hanno recentemente avanzato l'ipotesi che le diverse EST siano causate da diversi ceppi di prioni. Questi deriverebbero da conformazione diverse assunte dalla PrP^{Sc} che, riflettendosi in proprietà biologiche loro proprie, spiegherebbero il diverso tropismo cerebrale e il conseguente quadro clinico (Safar et al., 1998; Caughey et al., 1998). In altre parole, il prione “muterebbe” in varie conformazioni, e tra queste predominerebbe quella più favorevole all'ambiente, proprio come, in senso prettamente darwiniano, si comportano i mutanti degli acidi nucleici (Li et al., 2010).

IL GENE DELLA PRP^C

Il gene umano (*PRNP*) che codifica per la PrP^C è localizzato nel braccio corto del cromosoma 20 dove mappa nella banda 20p12→pter (Sparkes et al., 1986). Il gene, presente in singola copia per cromosoma, ha 2 esoni (il numero 1 e 3) separati da una sequenza intronica; il secondo esone contiene l'intero *open reading frame*, mentre l'altro, non codificante, viene comunque incluso nell'mRNA maturo (Lee et al., 1998). A monte del promotore c'è una regione che manca della sequenza del TATA box, ma che è provvista del CCAAT box e di siti di legame per i fattori di trascrizione SP1, AP1 e AP2 (Mahal et al., 2001). Sparse nel gene, ci sono anche sequenze ripetute

corte (*short interspersed repeated element*) e lunghe (*long interspersed repetitive element*) (Smitt et al., 1996; Smitt et al., 1996). Inoltre, alla distanza di 2303 bp dall'esone 1 è presente una regione altamente conservata di 99 bp interna al primo introne, identica per circa l'80 % a quella corrispondente all'esone 2 di topo e di pecora (Smitt et al., 1996). Dall'analisi dell'mRNA, si è visto che questa regione, denominata *exon 2-like*, non è presente nel prodotto della trascrizione ed è pertanto esclusa dalla proteina matura. Sebbene l'mRNA sia costitutivamente presente nel cervello degli animali adulti, la sua espressione è strettamente regolata durante lo sviluppo dell'individuo (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Studi di ibridazione hanno dimostrato che in alcune porzioni di cervello c'è un incremento nella quantità di mRNA parallelo allo sviluppo, mentre in altre porzioni l'espressione del gene si verifica ancor più precocemente (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Rimane che il gene della PrP^C, e i meccanismi della sua espressione, sono altamente conservati nei mammiferi, tant'è che le PrP^C di uomo, topo e hamster hanno un'omologia di sequenza di circa il 90 % (Chesebro et al., 1985).

MUTAZIONI E POLIMORFISMI NEL GENE *PRNP*

Sono stati individuati più di 20 mutazioni nel gene *PRNP* umano (Figura 2), la maggior parte delle quali si localizza nella regione che codifica per le sequenze ripetute (octarepeats), in quella corrispondente al primo foglietto β e alle eliche 2 e 3. Per esempio, l'inserzione aggiuntiva nella regione N-terminale di un numero di octarepeats superiore a tre causa la comparsa di CJD, con degenerazione soprattutto del cervelletto (Vital et al., 1999). Il CJD viene anche provocato dalla mutazione puntiforme E200K, caratterizzata dall'assenza di depositi di tipo amiloide, mentre la sostituzione Q217R, o la mutazione *amber* (Y145stop), sono state associate alla GSS (Zanusso et al., 1999). È interessante notare l'esistenza di polimorfismi, uno dei quali - V/M del codone 129 all'interno del primo β -foglietto, che può fungere da sito di nucleazione per la transizione conformazionale PrP^C-PrP^{Sc} (Mead et al., 2001, Riek et al., 1997) - è stato associato al tipo di malattia derivante dalla mutazione puntiforme D178N nella sequenza di PrP^C: CJD se con V, FFI se con M, al codone 129 (Collinge et al., 1991).

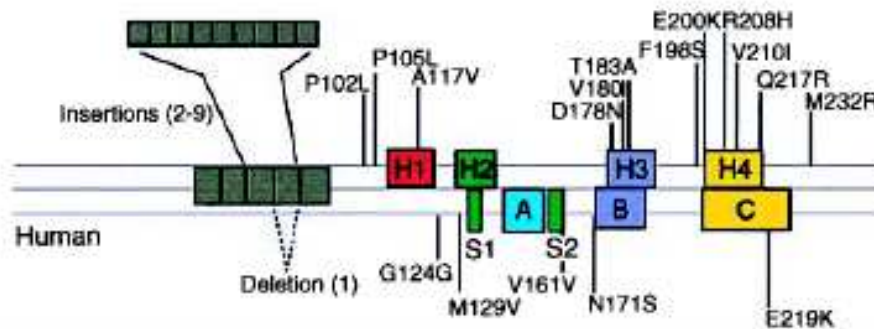


Figura 2. Mutazioni nella sequenza amminoacidica di PrP^C Vengono qui riportate alcune mutazioni, inserzionali o puntiformi, che nell'uomo causano malattie da prioni ereditarie.

PrP^C

La PrP^C è una glicoproteina - di circa 250 amino acidi - altamente conservata nel *sub-phylum* dei vertebrati, che si localizza sulla superficie esterna della membrana plasmatica attraverso un'ancora di glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI). La natura glicolipidica dell'ancora fa sì che la PrP^C si associ ai microdomini della membrana plasmatica ricchi in colesterolo e glicosfingolipidi, denominati *rafts* (Taylor et al., 2006). Tuttavia, alcuni dati evidenziano come essa possa risiedere anche in altri distretti della membrana ricchi di clatrina, dai quali originerebbe il processo endocitotico della proteina (Magalhaes et al., 2002). La PrP^C è espressa abbondantemente nel SNC, prevalentemente nei terminali sinaptici, ma si trova anche negli altri tessuti, in particolare nel sistema linforeticolare e nei muscoli scheletrico e cardiaco (Horiuchi et al., 1995).

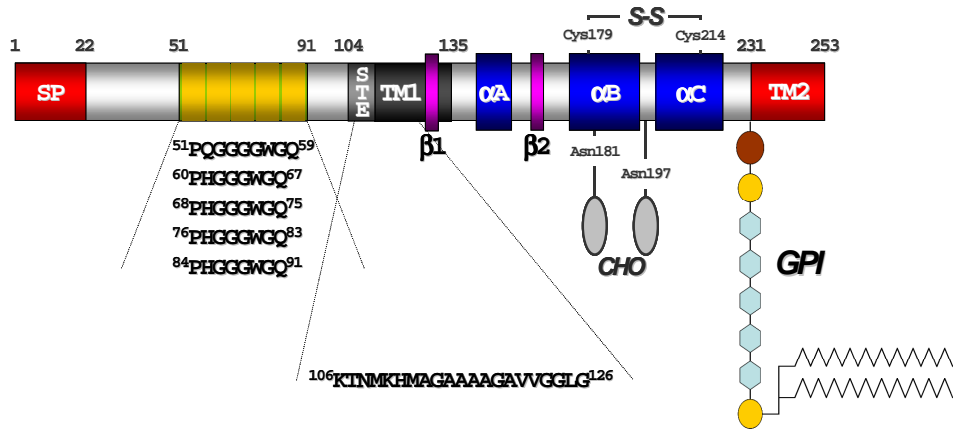


Figura 3. Organizzazione schematica della PrP^C umana Il peptide segnale (SP, aa 1-22) viene rimosso in sede di maturazione della proteina nel lume del reticolo endoplasmatico, così come gli aa 231-253. La porzione 51-91 costituisce l'octarepeats domain' formato da cinque copie in tandem di una sequenza di otto amminoacidi (octarepeat). Le regioni α A, α B e α C, rappresentano le tre α -eliche, mentre β 1 e β 2 rappresentano i due foglietti β . L'immagine riporta anche l'indicazione dei due residui di asparagina (Asn¹⁸¹ e Asn¹⁹⁷) che vengono glicosilati durante la maturazione della proteina, il ponte disolfuro (Cys¹⁷⁹-Cys²¹⁴) e l'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI).

Essendo una proteina di secrezione, la PrP^C viene sintetizzata nel reticolo endoplasmatico (RE) per poi essere portata, attraverso la via secretoria, alla membrana plasmatica (Orsi and Sitia, 2007). Durante questo tragitto, va incontro a maturazione attraverso modifiche post-traduzionali (Figura 4). La prima è il taglio del peptide segnale (i primi 22 aminoacidi dell'N-terminale della sequenza umana), seguita dall'attacco dell'ancora GPI al C-terminale (al residuo Ser 231 sempre nella sequenza umana) e dalla formazione del ponte disolfuro tra i due residui di cisteina 179-214 (nell'uomo). Altrettanto caratterizzanti sono le aggiunte di zuccheri complessi nei residui di Asn 181 e 197, e ciò comporta che la PrP^C possa esistere in isoforme diverse aventi una, due, o nessuna, ramificazione glucidica. Da notare la presenza all'N-terminale di sequenze di otto aminoacidi (PHGGGWGQ), ripetute cinque volte nell'uomo (Hornshaw et al., 1995). All'His (e forse anche alla Gly) di questo dominio (Hornshaw et al., 1995) è stata attribuita la capacità di legare il rame Cu²⁺ (Miura et al., 1996).

STRUTTURA

Le strutture secondaria e terziaria di PrP^C, dapprima ipotizzate con studi di *modeling*, sono ora note a seguito di studi di spettroscopia NMR (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997) che ne hanno messo in evidenza la caratteristica dicotomia (Fig. 4): da una parte la porzione N-terminale (di circa 100 aminoacidi) flessibile; dall'altra la porzione

C-terminale altamente strutturata (da circa il residuo 125) grazie alla presenza di tre α -eliche e due corti β -foglietti antiparalleli.

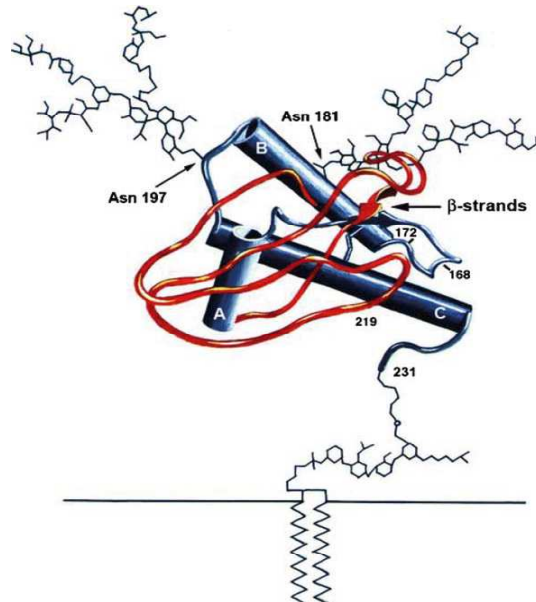


Figura 4. Struttura tridimensionale della PrP^C murina La proteina matura, che si estende dal residuo 23 al 231, è ancorata al foglietto esterno della membrana plasmatica. La PrP^C contiene due distinti domini conformazionali: il dominio N-terminale, che non possiede una struttura tridimensionale definita, ed il dominio C-terminale altamente strutturato sia nella forma fisiologica che in quella patologica della proteina. Dall'immagine appaiono evidenti le tre α -eliche (A, B, C) e i due siti di glicosilazione.

FUNZIONE

A tutt'oggi la funzione della PrP^C è sconosciuta, nonostante la disponibilità di modelli murini privi del gene per PrP^C (PrP-KO) che, però, hanno evidenziato solo lievi difetti neurofisiologici, cognitivi e comportamentali (Criado et al., 2005; Nazor et al., 2007). La conoscenza del ruolo della PrP^C è importante, non solo nei riguardi della fisiologia della cellula ma anche perché potrebbe fornire informazioni preziose sui meccanismi molecolari e cellulari che determinano la morte neuronale nelle malattie da prione. Di fatto, non sappiamo ancora se il danno da prione sia conseguente ad un'attività neurotossica propria del prione, o se, invece, derivi da una perdita di funzione di PrP^C a causa della continua conversione in PrP^{Sc}. Molti, comunque, sono stati gli studi sull'argomento e, di conseguenza, le proposte avanzate sulla possibile funzione della PrP^C: basti pensare alle decine e decine di partner funzionali finora identificati (Aguzzi et al., 2008). Di tutte queste ipotesi, ne analizzeremo qui le più stringenti, e/o quelle che abbiano attinenza con l'argomento della tesi.

Come già accennato, alla PrP^C è stato attribuito un ruolo sul metabolismo del rame (Brown et al., 1997), e, dato che lo ione è parte essenziale di enzimi coinvolti nella rimozione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), anche nella protezione contro lo stress ossidativo. La proteina è, infatti, in grado di legare selettivamente Cu²⁺ (da due a sei ioni) e pertanto, durante il suo turnover, potrebbe trasportare lo ione attraverso la membrana plasmatica e, una volta dentro la cellula, “donarlo” agli enzimi citosolici Cu²⁺-dipendenti. Ciò è confortato dal fatto che il Cu²⁺ stesso stimola l'endocitosi della proteina (Pauly et al., 1998) e che la rimozione dalla PrP^C del dominio degli octarepeats, o la mutazione delle istidine che lo legano, aboliscono l'effetto. A supporto di questo ruolo, sono state portate evidenze anche a livello del cervello di animali modello che, se infetto da prioni, presentavano quantità di Cu²⁺ inferiore a quello sano. D'altronde, il legame con lo ione potrebbe far attribuire alla PrP^C un ruolo di *buffer* del Cu²⁺ nella fessura sinaptica, evitando in tal modo l'accumulo dello ione in questi spazi e proteggendo, di conseguenza, le membrane sinaptiche dal danno da ROS. Di fatto, è stato dimostrato che le cellule prive di PrP^C sono più suscettibili al danno ossidativo rispetto alle WT (Brown et al., 1997).

Eguale abbondanti sono i dati che supportano il coinvolgimento della PrP^C nell'adesione, migrazione e differenziamento cellulare, mediante l'interazione con diversi putativi partner funzionali che includono molecole di adesione cellulare, proteine di membrana e della matrice extracellulare (Sorgato and Bertoli, 2009). Tali interazioni medierebbero eventi di trasduzione del segnale, in linea con due aspetti della PrP^C - localizzazione nel foglietto esterno della membrana plasmatica; inserimento nei raft - tipici di molti complessi recettoriali (Santuccione et al., 2005). Ed infatti, parecchie evidenze sperimentali hanno permesso di ipotizzare che la PrP^C partecipi a meccanismi di traduzione del segnale e che questi, in linea con la generale proprietà di cito-protezione della proteina, contrastino specialmente la morte apoptotica della cellula. A questo proposito, ricordiamo la dimostrazione di come, rispetto ai WT, i neuroni di topi PrP-KO si siano rivelati maggiormente suscettibili all'apoptosi indotta da deprivazione di siero, o da TNF- α . o da sovraespressione di Bax (Kuwahara et al., 1999), e che, parimenti, l'attività della fosfatidilinositolo 3 chinasi, coinvolta anch'essa nella sopravvivenza cellulare, risulti minore in linee cellulari PrP-KO rispetto alle WT. Vanno poi menzionati i lavori con neuroni ippocampali o retinici, che hanno dimostrato come la PrP^C sia in grado di promuovere sia la loro sopravvivenza sia la

neuritogenesi. A seguito dell'interazione con la proteina STI1 (*STress Inducible protein 1*), secreta dagli astrociti, la PrP^C esplicherebbe il suo ruolo protettivo attraverso un aumento del cAMP, e pertanto l'attivazione della protein kinasi A (PKA), mentre attiverebbe il processo di neuritogenesi agendo sulla via delle MAP kinasi (Chiarini et al., 2002).

Dato che, nei neuroni, la PrP^C si localizza in modo particolare nelle sinapsi, sono stati anche condotti esperimenti per comprovare che la PrP^C intervenga in qualche maniera nella trasmissione sinaptica e/o nell'eccitabilità neuronale. RegISTRAZIONI elettrofisiologiche su fettine di cervello di topo PrP-KO hanno così evidenziato una riduzione del potenziamento sinaptico a lungo termine (*Long Term Potentiation, LTP*) e del potenziale iperpolarizzante postumo (*After Hyperpolarization Potential, AHP*). Dovuto a correnti al K⁺ in uscita, il processo dell'AHP porta il potenziale di membrana a valori più negativi rispetto al potenziale di riposo e riduce, pertanto, la possibile sovra-stimolazione neuronale che si verifica, tra l'altro, attraverso l'eccessiva entrata nella cellula del Ca²⁺. In questo stesso contesto, è bene ricordare che, sempre con approcci elettrofisiologici, è stato possibile mettere in evidenza come l'assenza neuronale di PrP^C si colleghi ad un flusso ridotto di Ca²⁺ mediato dai canali voltaggio dipendenti di tipo L. Un altro dato, del tutto coerente con la protezione esercitata dalla PrP^C sull'eccitotossicità da Ca²⁺, è la recente dimostrazione che la PrP^C, a seguito dell'interazione con la subunità 2D, deprime l'attività del recettore NMDA per il glutammato (Khosravani et al., 2008). D'altronde, questi risultati correlano con l'alterazione del segnale Ca²⁺ dimostrata su animali infettati con prioni, che precede la degenerazione sinaptica e la comparsa dei sintomi clinici (riassunto in Sorgato and Bertoli, 2009). Ciò suggerisce che l'alterazione dell'omeostasi dello ione sia un evento precoce, e non una conseguenza, della patogenesi della malattia.

Sulla base della letteratura passata, il laboratorio sede di questo lavoro di tesi ha analizzato più direttamente la correlazione tra PrP^C e Ca²⁺, utilizzando una linea cellulare trasfettata con un plasmide esprime la PrP^C, o il suo paralogo Doppel (che ha un'azione antagonista alla PrP^C), e diverse isoforme di equorina, una fotoproteina Ca²⁺-sensibile, indirizzate ai diversi compartimenti cellulari. Questo approccio sperimentale ha permesso di evidenziare come la PrP^C sia in grado di controllare i flussi di Ca²⁺ nei domini sottostanti la membrana plasmatica, nel lume del RE e nella matrice mitocondriale. Inoltre, grazie al paragone tra le cellule

(esprimenti PrP^C o Doppel, o ambedue), questo studio ha suggerito che i movimenti dello ione in presenza di PrP^C avrebbero un risultato generale di protezione e non, come nel caso della proteina Doppel, un effetto nefasto sulla vita della cellula (Brini et al., 2005).

Da quanto esposto, è chiaro che la letteratura indica un coinvolgimento multifunzionale della PrP^C nella fisiologia della cellula. Se è pur vero che ci sono altri esempi di proteine pleiotropiche, è altrettanto plausibile l'ipotesi che la PrP^C non espliciti direttamente tutti questi ruoli ma che utilizzi un secondo messaggero che, a seconda della proteina-partner presente nella cellula e il momento particolare della vita di questa, attivi vie che portino ad effetti diversi. Questa è stata l'ipotesi alla base del presente lavoro di tesi, condotto in colture primarie di neuroni, che ha considerato il Ca²⁺ la molecola segnale al centro della funzione della PrP^C. Pertanto, prima della presentazione dei risultati, vengono ora riportate informazioni riguardanti proprio il Ca²⁺ nella sua funzione di secondo messaggero e le proteine che regolano la sua omeostasi.

OMEOSTASI DEL CA²⁺

Tra tutti, il Ca²⁺ è il secondo messaggero riconosciuto come carrier d'informazione più universale in grado, quindi, di influenzare un numero elevatissimo di processi in altrettanti numerosi tipi di cellule. Questi vanno dalla fertilizzazione delle cellule uovo al ciclo e differenziamento cellulari, plasticità sinaptica, contrazione muscolare, attivazione o spegnimento di geni, fino alla morte della cellula ([50]Berridge, 1996). Il segnale Ca²⁺-mediato comporta variazioni della sua concentrazione nel citosol che sono precedute, o seguite, da variazioni in domini specifici della cellula prima del ripristino dello stato di riposo. Tutti questi processi sono catalizzati da un numero altrettanto elevato di proteine, ad ulteriore dimostrazione dell'importanza del segnale Ca²⁺ e del fatto che, non regolato opportunamente, questo stesso segnale si tramuta in un messaggio di morte (Carafoli, 2005).

INTERAZIONE CA²⁺-PROTEINE

Oltre al legame con le teste polari dei fosfolipidi di membrana, le proprietà chimico-fisiche del Ca²⁺ permettono allo ione di stabilire interazioni con siti proteici aventi una geometria strutturale irregolare. Infatti, questi siti sono incapaci di legare il Mg²⁺

con altrettanta facilità in quanto il Mg^{2+} , è caratterizzato da un'elevata densità di carica, richiede una struttura geometrica ottaedrica. Un modulo caratteristico è quello delle EF-hand, costituite da due eliche ortogonali fiancheggiate da un loop di 12 amino acidi, in cui lo ione si posiziona grazie alle cariche negative dei carbossili delle di Asp e Glu e alle interazioni con gli ossigeni carbonilici dello scheletro polipeptidico. L'affinità per questi siti fa sì che, in condizione di riposo, la concentrazione citosolica dello ione sia mantenuta a livelli estremamente più bassi, dell'ordine di 10-100 nM, rispetto a quella extracellulare che si aggira attorno all'1-3 mM. In risposta a segnali chimici o elettrici, la concentrazione cellulare di Ca^{2+} aumenta fino a 1-10 μM (ma anche mM, nel muscolo scheletrico e cardiaco) e ciò comporta l'attivazione di tutta una serie di processi che caratterizzano il tipo di cellula considerata.

VIE DI ENTRATA ED USCITA E LORO REGOLAZIONE

Come accennato, il segnale Ca^{2+} deve essere regolato finemente spaziotemporalmente, pena la morte della cellula. In essa sono quindi presenti non solo numerose vie d'entrata ma anche parecchi sistemi deputati a rimuovere il Ca^{2+} dal citosol. Lo ione entra nel citosol provenendo da due serbatoi principali - lo spazio extracellulare e i depositi intracellulari del reticolo endo- e sarco- (RS) plasmatici - a seguito dell'apertura di specifici canali che rispondono a segnali di varia natura, chimica (un neurotrasmettitore, un ormone, un secondo messaggero), elettrica (depolarizzazione), ecc. L'attività del canale comporta l'instaurarsi - in modo del tutto transiente - di elevate concentrazioni dello ione in microdomini a ridosso del punto di uscita dal canale. Di conseguenza, si attivano processi nelle immediate vicinanze, tra cui quelli enzimatici o che reclutano altri canali specifici per il Ca^{2+} , o altri ioni. Il risultato ultimo è il coinvolgimento dell'intera cellula e l'attivazione di quei processi che la caratterizzano. Immediatamente successiva, se non contemporanea, è l'attivazione dei sistemi di pompe e trasportatori che estrudono lo ione dalla cellula, o ne permettono il sequestro nel lume del RE e del RS. Anche se non in maniera esaustiva, vengono ora presentate le proteine coinvolte nel controllo del metabolismo dello ione.

I canali VOC (*Voltage Operated Calcium Channels*) Questi sono controllati dal voltaggio e sono tipici delle cellule eccitabili elettricamente. I VOC sono caratterizzati da

un'alta selettività per il Ca^{2+} e, in base alle proprietà farmacologiche ed elettrofisiologiche, sono classificati in canali di tipo L, che rispondono alla diidropiridina; N, presenti soprattutto nei neuroni; T, presenti nelle terminazioni dendritiche; P, Q ed R, individuati nelle cellule del Purkinje.

I canali attivati da ligando Sono canali la cui apertura segue l'interazione con un agonista. Ne fanno parte i recettori-canale ionotropici ROC (*Receptor Operated Calcium Channels*), e i canali regolati via secondo messaggero solubile.

I canali SOC (*Store Operated Calcium Channels*) Rispetto a quelli sopra riportati, questi canali della membrana plasmatica sono stati individuati e caratterizzati – sebbene forse in maniera non ancora del tutto completa - solo recentemente. Si distinguono per il meccanismo di *gating* atipico, ed infatti vengono attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari di Ca^{2+} , dando origine a quella che viene definita “entrata capacitativa di Ca^{2+} ” (CCE, *Capacitative Calcium Entry*). Si è postulato che il processo di CCE necessita dell'interazione di due proteine, Orai e STIM (*Stromal Interaction Molecule*); la prima è il canale vero e proprio localizzato nella membrana plasmatica, l'altra il modulatore di Orai localizzato nella membrana del RE. Nell'uomo come nel topo, Orai ha tre isoforme codificate da altrettanti geni ed espresse in modo ubiquitario, sebbene l'isoforma 2 sia maggiormente presente nel SNC. Tutte le isoforme hanno quattro segmenti transmembrana ad α -elica, con gli estremi N- e C-terminale rivolti al citosol. La porzione N-terminale dell'isoforma Orai 1 è ricca in prolina e arginina (Cahalan et al., 2007), e tutte hanno un dominio putativo *coiled-coil* all'estremo C-terminale. L'assemblaggio di quattro subunità di Orai origina il canale selettivo al Ca^{2+} (Figura 5). La famiglia delle proteine STIM ha due componenti (STIM1 e STIM2) omologhi per il ~61% ed espressi in maniera ubiquitaria. STIM, che attraversa la membrana del reticolo, è costituita da un solo segmento transmembrana il cui C-terminale si estende nel citosol, mentre l'N-terminale è rivolto verso il lume del reticolo. Quest'ultima porzione ha un motivo EF-hand, quella che rende ragione della funzione di STIM quale sensore della concentrazione di Ca^{2+} reticolare (Zhang et al., 2005). Tra l'EF-hand e la porzione transmembrana della proteina è presente un *Sterile-Alpha Motif* che, se deletto, previene l'attivazione della corrente di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare in quanto impedisce la formazione di clusters che si localizzano a ridosso della membrana plasmatica (Baba et al., 2006).

E dunque, quando il Ca^{2+} esce dal RE (vedi più avanti), STIM forma oligomeri costituiti da circa quattro di queste proteine, e va a localizzarsi nei punti della membrana dell'RE che si trovano strettamente ravvicinati alla membrana plasmatica, dove contatta Orai per attivarlo (Mercer et al.,2006). Non è ancora chiaro se le due membrane (del RE e la più esterna della cellula) siano contigue costituzionalmente o se esista un meccanismo che le porti a quella distanza di circa 4-6 nm necessaria perché STIM e Orai vengano in contatto.

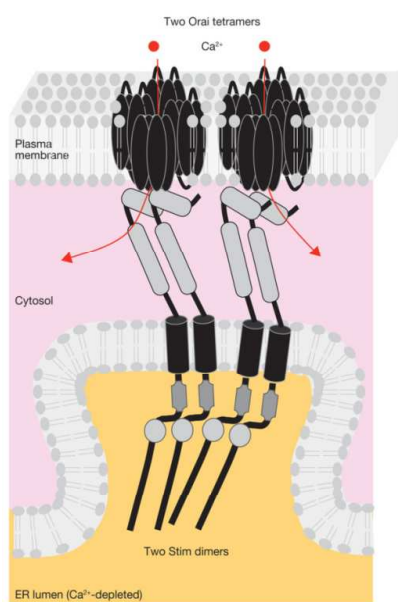


Figura 5. Organizzazione strutturale e attivazione dei canali Orai mediata da STIM La proteina STIM, presente nella membrana del RE, induce il reclutamento sulle regioni contigue con la membrana plasmatica delle subunità di Orai. Il dominio C-terminale di STIM interagisce direttamente con il dominio citosolico della proteina Orai che, oligomerizzandosi nella forma omotetramerica, permette la formazione del poro con conseguente ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare.

PMCA (*Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) È una pompa del Ca^{2+} espressa in tutte le cellule. Di essa, sono note quattro isoforme codificate da geni diversi e diversamente espresse in tutti i tessuti (la 2 e la 3, ad esempio, lo sono solo nel SNC). Tuttavia, a causa dello *splicing* alternativo (Strehler and Zacharias, 2001) per azione di fattori tessuto-specifici, il numero effettivo delle varianti della pompa è ancora più elevato. Ha un'elevata affinità per il Ca^{2+} (Domi et al., 2007), ma bassa capacità di trasporto (anche perché espressa in scarse quantità), ed è considerata una pompa *housekeeping*. Di peso di circa 125-140 kDa, è organizzata in 10 segmenti transmembrana, con i C- e N-terminali rivolti verso il citosol. La porzione citosolica della PMCA è composta da 3 regioni funzionalmente molto importanti: una posta tra i segmenti transmembrana 2 e 3; la seconda, che include il sito di legame per l'ATP e il residuo catalitico di aspartato, situata tra i segmenti 4 e 5; la terza è un'estesa coda C-terminale contenente il sito di legame per la calmodulina e i siti di fosforilazione da

parte delle protein chinasi PKA e PKC. La fosforilazione della coda C-terminale, da parte delle due chinasi, ha come effetto la diminuzione della K_m per il Ca^{2+} (che diviene pari a 1 μM) e l'incremento della V_{max} anche in assenza di calmodulina. Quest'ultima è il principale regolatore della pompa in quanto il suo legame, come complesso Ca^{2+} -calmodulina, causa un decremento del valore della K_m apparente per il Ca^{2+} da 5-10 a 0.4-0.5 μM e l'aumento della V_m di circa 10 volte. La ragione di ciò sta che, in assenza del complesso Ca^{2+} -calmodulina, la coda C-terminale della pompa si ripiega bloccando l'accesso di Ca^{2+} e di ATP al sito attivo.

NCX (*Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*) Sfruttando il gradiente del Na^+ , questo scambiatore coopera con la PMCA al processo di estrusione del Ca^{2+} dalla cellula. Di fatto, nonostante la bassa affinità per il Ca^{2+} ($K_m \approx 1-20 \mu M$), l'elevata capacità lo rende il principale sistema di estrusione di Ca^{2+} dalle cellule eccitabili con alto Ca^{2+} citosolico (Philipson, 1999). Lo scambiatore opera elettrogenicamente, essendo la stechiometria degli ioni trasportati di $3Na^+$ contro $1Ca^{2+}$. È bene notare, tuttavia, che l'NCX può operare anche in senso inverso, la direzione del trasporto dipendendo dal gradiente elettrochimico dei due ioni. Un tipico esempio è quello dell'NCX cardiaco che pompa Ca^{2+} verso l'esterno durante la fase di ripolarizzazione e di diastole, ma verso l'interno durante la fase di sistole. Si tratta comunque di una famiglia multigenica che comprende tre isoforme diversamente espresse nei vari tessuti, per cui l'NCX1 è molto espresso nel cuore, cervello, reni e in misura minore negli altri tessuti; l'NCX2 si trova solo nel SNC e nel muscolo scheletrico; l'NCX3 è espresso predominantemente nel muscolo scheletrico e, a bassi livelli, in alcune regioni del cervello. L'NCX ha 9 domini transmembrana, con l'N-terminale esterno alla cellula e il C-terminale interno ad essa (Nicoll et al., 1999), e un loop citosolico che connette due domini (5 e 6) transmembrana. Quest'ultima porzione ha sia il sito di legame per il Ca^{2+} che una funzione regolatoria, mentre l'N-terminale contiene probabilmente un sito di legame per il complesso Ca^{2+} -calmodulina. Anche per l'NCX c'è il processo tessuto-specifico dello splicing alternativo, che interessa una porzione citosolica regolatoria, per cui esistono varianti delle isoforme 1 e 3. È interessante notare che la trascrizione neuronale di NCX è strettamente collegata alla concentrazione cellulare di Ca^{2+} (Guerini et al., 2000). Ad esempio, ponendo colture di neuroni cerebellari in corso di maturazione in condizioni depolarizzanti (in presenza di 25 mM KCl) che attivano i canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, l'isoforma NCX2 viene *down*-regolata

rapidamente secondo un processo mediato dalla fosfatasi Ca^{2+} -dipendente calcineurina e orchestrato dal complesso Ca^{2+} -calmodulina. Riguardo all'isoforma 3, questa viene invece *up*-regolata dal Ca^{2+} che, legandosi al repressore genico DREAM (*Downstream Regulatory Element antagonist Modulator*), toglie l'inibizione dal gene di questa isoforma (Gomez et al., 2004). Questo esempio è paradigmatico della strategia cellulare che controlla il metabolismo del Ca^{2+} , specie in quelle cellule ove vi siano ampie fluttuazioni della concentrazione dello ione.

SERCA (*Sarco- Endo-plasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*) Come la PMCA, anche questa pompa, sita nella membrane del reticolo sarco- endo-plasmico, appartiene alla famiglia delle ATPasi di tipo P. Ha un peso molecolare apparente di 110 kDa, con 10 domini transmembrana. Sono conosciute tre isoforme (1, 2, 3) codificate da geni diversi, i cui trascritti subiscono lo *splicing* alternativo (le forme risultanti vengono indicate con le lettere a e b). La SERCA1a è l'isoforma maggiormente espressa nelle fibre muscolari adulte *fast twitch*, mentre la SERCA1b è presente nei muscoli *fast twitch* neonatali. L'isoforma 2a viene espressa nelle fibre *slow twitch* e nel muscolo cardiaco, quella 2b nella muscolatura liscia e in altri tipi cellulari tra cui i neuroni. Il sito più importante della pompa è un loop esteso che contiene il sito di legame per l'ATP e il Ca^{2+} , e l'acido aspartico necessario per la catalisi mediata da tutte le ATPasi di tipo P. Nel cuore e nelle fibre della muscolatura liscia, la SERCA viene regolata anche da una proteina accessoria chiamata fosfolambano (Tada et al., 1975), che la inattiva legandosi al dominio citosolico della pompa (sede del sito per l'ATP). A differenza della PMCA, catalizza lo scambio di 2 ioni Ca^{2+} con 2H^+ per molecola di ATP idrolizzata, per cui, oltre ad accumulare Ca^{2+} , il lumen del reticolo subisce il contemporaneo processo di alcalinizzazione. L'importanza di questa pompa sta nel fatto che crea all'interno della cellula una riserva cruciale di Ca^{2+} (con concentrazioni di Ca^{2+} libero dell'ordine di 1 mM) necessaria per la contrazione muscolare (nel caso del cuore e della muscolatura scheletrica) e per tutte le altre attività cellulari Ca^{2+} -dipendenti (negli altri tessuti). Per la maggior parte, il Ca^{2+} nel reticolo è sequestrato da chaperoni molecolari quali la calsequestrina e calreticulina, caratterizzate da un'alta capacità (legano circa 50 ioni per molecola), ma bassa affinità nei riguardi dello ione. Queste proprietà sono indispensabili per "tamponare" dentro il lumen grandi quantità di Ca^{2+} libero e, nel contempo, per renderlo immediatamente disponibile se la cellula lo richiede. Il rilascio immediato nel citosol dello ione avviene infatti a

seguito dell'apertura di canali attivati da meccanismi che dipendono dal tipo della cellula, descritti nel seguito.

Recettori-canale sensibili all'InsP3 (IP₃R) Presenti nella membrana del RE, si aprono quando legano con alta affinità (K_d compresa tra 10-80 nM) il secondo messaggero inositolo 1,4,5, trisfosfato (InsP3) formatosi a seguito della stimolazione di recettori della membrana plasmatica da parte di molecole ormonali, ATP, glutammato, ecc. Permettono così la fuoriuscita di Ca^{2+} secondo gradiente dal lume del reticolo verso il citosol. L'IP₃R è una proteina tetramerica ($M_w \approx 1$ MDa) caratterizzata da una estesa coda N-terminale (~85% della massa totale della proteina) contenente il sito di legame per l'InsP3, mentre la porzione che forma il canale vero e proprio è quella C-terminale organizzata in sei segmenti transmembrana. Anche in questo caso ci sono sia più geni che codificano per diverse isoforme (tipo I, prevalente nel muscolo liscio e cervello; tipo II, caratterizzato da un basso livello di espressione; tipo III, ampiamente distribuito in tutti i tessuti), sia lo *splicing* alternativo. L' IP₃R contiene anche siti di *consensus* per alcune chinasi, quali la PKA, la cui azione porta ad un aumento del rilascio di Ca^{2+} mediato da InsP3 (Khan and Wagner, 2006).

Recettori-canale sensibili alla rianodina (RyR)

L'RyR è presente nella membrana del RS del muscolo scheletrico e cardiaco, ma anche dei neuroni e linfociti. Come l'IP₃R, è tetramerico e con la stessa organizzazione delle code N- e C-terminale. Esistono 3 diverse isoforme: tipo 1, presente in molti tessuti anche se espresso maggiormente nel tessuto muscolare scheletrico; tipo 2, presente nel cuore e nel cervello; tipo 3, presente solo in alcune regioni del cervello e nei linfociti. Nel RS del muscolo scheletrico, la distribuzione del RyR segue il *network* delle cisterne terminali adiacenti al sistema dei tubuli a T che derivano da invaginazioni della membrana sarcoplasmatica, mentre è *random* negli altri tipi di cellule. Questa disposizione trova il suo razionale nel meccanismo che porta all'apertura del RyR che si diversifica a seconda della cellula. Infatti, mentre nella muscolatura scheletrica viene aperto da un accoppiamento elettro-meccanico con i VOC della membrana plasmatica, nel cuore e nel SNC lo stimolo deriva dal processo *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release*.

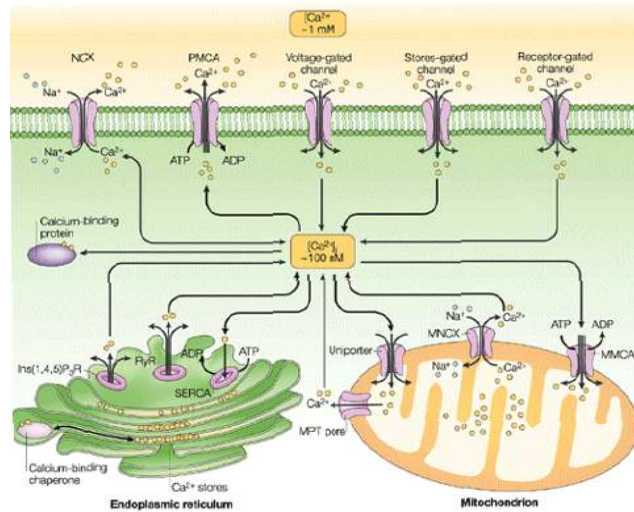


Figura 6. Omeostasi cellulare dello ione Ca^{2+} Vengono qui riportati tutti i flussi di Ca^{2+} nei diversi domini di una cellula.

I MITOCONDRI E L'OMEOSTASI DEL Ca^{2+}

I mitocondri giocano un ruolo cruciale nell'omeostasi del Ca^{2+} perché in grado di accumulare lo ione nella matrice attraverso un trasporto secondo gradiente elettrochimico. L'accumulo di Ca^{2+} è catalizzato dal 'mitochondrial Ca^{2+} uniporter', relativamente specifico e a bassa affinità ($K_m \approx 1-10 \mu\text{M}$) (Carafoli, 2003). L'estrusione dello ione dalla matrice avviene, invece, ad opera di trasportatori quali gli scambiatori $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ che agiscono con stechiometria diversa; nel primo caso essa è di 1Ca^{2+} contro 3Na^+ (Baysal et al., 1994), nel secondo di 1Ca^{2+} contro 2H^+ . Studi sul profilo di espressione di questi due scambiatori hanno mostrato che, sebbene entrambi siano presenti nel mitocondrio, esiste la predominanza del primo sull'altro secondo un *pattern* tessuto specifico. Ne deriva che il meccanismo Na^+ -dipendente è predominante nei tessuti eccitabili (cardiaco, nervoso, muscolare scheletrico), mentre quello Na^+ -indipendente predomina nei tessuti non eccitabili (tessuto epatico, epitelii renali e polmonari).

L'utilizzo di sonde sensibili al Ca^{2+} , quali la proteina equorina che, ingegnerizzata specificatamente, può essere indirizzata a specifici domini cellulari, ha permesso di dimostrare che, a seguito di stimoli fisiologici, aumenti della concentrazione citosolica di Ca^{2+} sono seguiti da incrementi paralleli della concentrazione di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale. Si è poi dimostrato che questi aumenti, non facilmente

spiegabili dalla bassa affinità dell'*uniporter* per il Ca^{2+} , sono probabilmente dovuti alla vicinanza dei mitocondri (Rizzuto et al., 1998) con microdomini ad alto Ca^{2+} generati in prossimità dei canali sensibili all'InsP3, che rilasciano lo ione dal RE (Rizzuto et al., 1993).

L'aumento di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale è di grande rilevanza per il metabolismo, in quanto attiva tre deidrogenasi del ciclo di Krebs, e cioè la piruvato-, l' α -chetoglutarato- e l'isocitrato- deidrogenasi (Hansford and Zorov, 1998). Un altro evento, al centro di numerose recenti indagini e che si verifica in condizioni patologiche, è la modifica dell'assetto della membrana interna del mitocondrio conseguente al sovraccarico di Ca^{2+} nella matrice. In questi casi si attiva l'apertura del poro di transizione di permeabilità (*Permeability Transition Pore*, PTP) ([63]Bernardi et al., 1998), cui segue il rigonfiamento del mitocondrio, l'aumento di permeabilità della membrana esterna, e il rilascio di quei fattori pro-apoptotici (il citocromo c, l'AIF, ecc.) che promuovono la morte programmata della cellula. Di conseguenza, un accurato controllo dei livelli mitocondriali di Ca^{2+} è d'importanza fondamentale per la fisiologia della cellula.

Ca^{2+} E MALATTIE NEURONALI

Il Ca^{2+} è indubbiamente il messaggero intracellulare più importante che agisce nei neuroni, dove media un numero elevato di stimoli che si traducono in molteplici funzioni che vanno dal rilascio dei neurotrasmettitori – dopo la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana plasmatica - a processi quali l'LTP.

D'altronde, come già ricordato, non solo sono molte le vie attraverso cui il Ca^{2+} entra nel neurone ma sono altrettanto numerose quelle di estrusione dalla cellula. Non stupisce, pertanto, che l'invecchiamento e le malattie neurodegenerative legate all'età evidenzino una qualche compromissione del controllo cellulare su questi flussi che si traducono nell'accumulo eccessivo di Ca^{2+} . Tale accumulo è tossico per varie ragioni, ma soprattutto perché il Ca^{2+} attiva proteasi, quali le calpaine e le caspasi, che promuovono la degradazione del citoscheletro e l'alterazione del metabolismo (Chan et al., 1999; Nixon, 2003), e, non ultimo, l'attivazione dell'apoptosi. D'altronde, sebbene in condizioni fisiologiche i mitocondri proteggano i neuroni sequestrando il Ca^{2+} dal citosol, se l'accumulo mitocondriale è eccessivo allora sappiamo che esso apre il PTP, un'altra causa di apoptosi (Hajnoczky et al., 2006).

Un esempio di tossicità (definito processo di eccitotossicità) è dato dal glutammato, il più importante neurotrasmettitore eccitatorio del SNC (Hartmann et al., 2005). Agendo sui recettori ionotropici e metabotropici, il glutammato fa accumulare nel citoplasma il Ca^{2+} proveniente o dallo spazio sinaptico o dai depositi del RE. E dunque, una eccessiva attivazione di queste vie d'entrata di Ca^{2+} provoca un aumento incontrollato di Ca^{2+} citosolico che, se prolungato, compromette la vita del neurone (Arundine et al., 2003). Un altro esempio si collega allo stress ossidativo, che anch'esso può alterare il metabolismo del Ca^{2+} e portare alla morte neuronale. Infatti, se l'attività di proteine coinvolte nell'omeostasi del Ca^{2+} , in particolare le Ca^{2+} -ATPasi della membrana plasmatica e del RE, ma anche di altre pompe quale la Na^+/K^+ -ATPasi, viene compromessa dalla perossidazione lipidica provocata dai radicali idrossilici e dal perossinitrito, ciò provoca la depolarizzazione del neurone e quindi l'entrata di Ca^{2+} attraverso i canali voltaggio-dipendenti che, non compensata da un efficiente sistema di estrusione, determina un accumulo di Ca^{2+} superiore alla tollerabilità della cellula (Mattson, 1998).

Come abbiamo ricordato in precedenza, alterazioni dell'omeostasi di Ca^{2+} sono state riportate in cellule affette da prioni. In linea con il ruolo centrale dello ione nella fisiologia neuronale, egualmente numerose sono le evidenze riscontrate in altre disordini neurodegenerativi, quali, ad esempio, la malattia di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica, e la malattia di Huntington (Mattson, 2007).

CENNI SULL'ANATOMIA DEL CERVELLETTO

Il sistema nervoso è composto essenzialmente da due tipi di cellule: i neuroni, responsabili della ricezione e della trasmissione degli impulsi nervosi, e le cellule della glia o neuroglia, che hanno funzioni di supporto strutturale e funzionale rispetto ai neuroni.

Esso è la sede di maggior espressione della PrP^{C} e risulta essere il tessuto bersaglio nelle malattie da prione; l'accumulo della PrP^{Sc} e la perdita neuronale soprattutto a livello della corteccia cerebellare sono la causa principale dei sintomi clinici delle EST.

Il cervelletto è localizzato nella fossa endocranica posteriore ed occupa il 10% del volume totale dell'encefalo, ma contiene più della metà dei neuroni cerebrali. Macroscopicamente si possono riconoscere una porzione centrale, il verme, e i due

emisferi cerebellari di destra e di sinistra. La superficie cerebellare ha un'organizzazione estremamente regolare e presenta una caratteristica suddivisione ad opera di fessure primarie in lobi, che a loro volta sono suddivisi in lobuli da fessure secondarie, suddivisi in lamine e poi in lamelle da fessure via via più piccole, in modo da aumentare la superficie cerebellare. Esso è formato da sostanza grigia superficiale (la corteccia cerebellare) costituita dal corpo cellulare dei neuroni, e da una parte centrale di sostanza bianca contenente gli assoni dei neuroni della porzione superficiale.

La struttura microscopica della corteccia cerebellare presenta tre strati principali che, dalla superficie alla profondità, sono: lo strato molecolare, lo strato delle cellule del Purkinje e lo strato granulare. Lo strato granulare rappresenta lo spessore maggiore, comprende circa il 98% dei neuroni cerebellari e, nella CJD sporadica, la marcata perdita di neuroni granulari è una delle lesioni caratteristiche.

In aggiunta ai neuroni, nel sistema nervoso sono presenti le cellule gliali:

- oligodendrociti, che contribuiscono alla formazione della guaina mielinica;
- microglia, piccole cellule ovoidali senza prolungamenti, ma aventi funzione di macrofagi e quindi fagocitaria;
- astrociti, cellule che svolgono un ruolo attivo nel metabolismo e nell'omeostasi cerebrale.

La funzione principale del cervelletto è quella di coordinare l'attività muscolare e mantenere il tono posturale e l'equilibrio.

MATERIALI E METODI

TOPI UTILIZZATI NEGLI ESPERIMENTI

Gli animali utilizzati negli esperimenti sono topi del ceppo FVB:

- *wild-type* (genotipo PrP^{+/+}, **indicati come WT**) (Harlan, Milano)
- *knock-out* (genotipo PrP^{-/-}, **indicati come PrP-KO**) per PrP^C su background FVB puro al 99% (F10, gentilmente concessi dalla Dr.ssa G. Mallucci, MRC, University College, London, UK) (2).

I topi knock-out derivano da topi Zurich I PrP^{-/-}, ottenuti originariamente su un genotipo ibrido Sv129X/C57-Bl6 (1). Questi topi sono stati incrociati per dieci generazioni in emizigosi con topi FVB PrP^{+/+}. I discendenti PrP^{+/-} (N10) sono stati incrociati tra di loro per ottenere una progenie PrP-KO (PrP^{-/-} /FVB F10) con genotipo FVB pressoché puro.

Tutti gli animali sono stati mantenuti in singole gabbie ventilate e trattati secondo le linee guida per la cura degli animali.

Per escludere che eventuali differenze osservate nelle misure di Ca²⁺ fossero da imputare a modificazioni genetiche spontanee occorse nel tempo nei ceppi *inbred*, piuttosto che al diverso genotipo per PrP^C, gli esperimenti sono stati realizzati anche usando *littermates* PrP^{+/+} (**indicati come PrP^{+/+}**) e PrP^{-/-} (**indicati come PrP^{-/-}**) ottenuti incrociando topi eterozigoti PrP^{+/-}. Questi ultimi, a loro volta, sono stati generati incrociando topi WT e PrP-KO dei ceppi *inbred*.

COLTURE CELLULARI DI NEURONI GRANULARI DEL CERVELLETTO

Prima di procedere con l'espianto dei cervelletti è stato preparato il necessario per il mantenimento e la digestione del tessuto neuronale; ogni soluzione utilizzata ha come base la soluzione di Krebs (NaCl 124 mM, KCl 5.4 mM, Glucosio 3.6 mM, Na₂PO₄ 1 mM, HEPES 24.9 mM, MgSO₄ 0.465 mM e BSA 0.3 % p/v). Dove indicato, la soluzione è stata addizionata con: tripsina, inibitore della tripsina DNAsi I, MgSO₄ o CaCl₂.

I precursori delle cellule granulari del cervelletto (CGC) sono stati ottenuti da topi di 7 giorni di età, cioè nel momento in cui esse sono ancora in fase migratoria per raggiungere la corretta locazione nello strato granulare del cervelletto. A tal scopo gli animali sono stati sacrificati per decapitazione, il cervelletto è stato prelevato dopo

apertura della scatola cranica e, mediante l'utilizzo di uno stereo-microscopio, ripulito da vasi sanguigni e meningi e infine mantenuto in ghiaccio nella soluzione di Krebs.

Dopo eliminazione della soluzione di Krebs si è proceduto alla disgregazione meccanica dei cervelletti mediante l'uso di un bisturi sterile, i frammenti sono stati raccolti e digeriti enzimaticamente 10 minuti a 37°C sotto agitazione in 10 ml di buffer contenente tripsina I da pancreas porcino (276 U/ml, ICN Biomedicals Inc.).

Dopo digestione, la sospensione viene mescolata con un uguale volume di buffer contenente: inibitore della tripsina (0.0832 mg/ml Soybean inhibitor Type I-S, Sigma), DNAsi I (25.6 U/ml, Roche), MgSO₄ (0.246 mM) e infine centrifugata (180xg, 4 min). Il pellet ottenuto viene risospeso, previa eliminazione della soluzione precedente, in buffer contenente: inibitore della tripsina (0.52 mg/ml), DNAsi I (160 U/ml) ed MgSO₄ (1.55 mM). Le cellule dissociate sono recuperate e trasferite in un nuovo tubo nel quale viene aggiunto CaCl₂ (0.1 mM) e MgSO₄ (1.7 mM) e infine sedimentate per centrifugazione (180xg, 9 min).

Il pellet che si ottiene viene risospeso in Minimum Essential Medium (MEM, Sigma) supplementato con siero fetale bovino (10 %, FBS Euroclone), L-glutammina (2 mM, Eurobio), gentamicina (0.02 mg/ml, Gibco) e KCl (25 mM). Il potassio a così alte concentrazioni risulta necessario per garantire la differenziazione e la sopravvivenza a lungo termine dei granuli in coltura (22).

Un'aliquota di cellule viene prelevata e colorata con il reattivo di Turk (specifico per i nuclei) allo scopo di evidenziarle e contarle mediante la cameretta di Thoma.

Prima di seminare le cellule i pozzetti delle piastre vengono incubati con una soluzione di poli-lisina 100 µg/ml (Sigma) sciolta in PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.4) a 37°C per circa un'ora. Questotrattamento (*coating*) favorisce l'attecchimento delle cellule sulla superficie del pozzetto o del vetrino. Al momento della semina, l'eccesso di poli-lisina viene eliminato mediante 3 lavaggi con PBS.

Per le misure all'equirinometro e per l'immunocitochimica sono state usate piastre da 24 pozzetti nelle quali viene depositato un vetrino in borosilicato da 13 mm di diametro, precedentemente sterilizzato con etanolo, mentre per le colture destinate ai Western blotting, le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti prive di vetrino.

Nei paragrafi successivi vengono riportate il numero di cellule utilizzate per specifico esperimento.

IMMUNOCITOCHIMICA

Le cellule adese ai vetrini sono fissate con paraformaldeide (PFA) al 2% in PBS per 30 minuti a 4°C e successivamente lavate 2 volte con PBS freddo.

In seguito, le cellule vengono permeabilizzate con Triton 0.1% (Sigma) in PBS e incubate a 4°C per 10 minuti; successivamente sono lavate per 2 volte in PBS freddo.

A questo punto, vengono incubate per 1 ora a 37°C con l'anticorpo primario (specifico per l'epitopo che si vuole evidenziare), diluito in BSA all'1% (Calbiochem) in PBS. Poi si procede con altri 2 lavaggi in PBS da 10 minuti ciascuno che hanno la funzione di eliminare l'eccesso di anticorpo primario. Infine le cellule vengono nuovamente incubate a 37°C per 1 ora, con l'anticorpo secondario diluito in BSA 1% in PBS.

Per poter evidenziare tutte le cellule presenti nel vetrino si procede andando a colorare i nuclei con un colorante fluorescente per il DNA, l'Hoescht (Sigma), il quale emette luce blu quando eccitato da luce ultravioletta (350 nm). La procedura prevede un periodo di incubazione al buio delle cellule con il colorante allo 0.1% in PBS di 15 minuti a temperatura ambiente.

Dopo, i vetrini vengono lavati 2 volte per 10 minuti con PBS, montati su vetri portaoggetti con una soluzione di glicerolo (Sigma) al 90% in PBS e infine, osservati al microscopio a fluorescenza (Axiovert 100, Zeiss).

Tutte le immagini sono state acquisite con il software Axioviewer (Zeiss) ed elaborate utilizzando il software Metamorph 7.5 (Universal Imaging).

ANTICORPI PRIMARI UTILIZZATI IN IMMUNOCITOCHIMICA:

- gli astrociti sono stati marcati con anticorpo policlonale α -GFAP diluito 1:500 (Dako) il quale riconosce la proteina gliale fibrillare che risulta essere un marcatore specifico di queste cellule.
- PrP^C è marcata con l'anticorpo monoclonale α -8H4 diluito 1:100 (gentilmente concesso dal Dr. Man Sun Sy, Cleveland), in grado di riconoscere la sequenza 180-192 della PrP^C murina.

ANTICORPI SECONDARI UTILIZZATI IN IMMUNOCITOCHIMICA:

- α -mouse coniugato alla fluoresceina isotiocianato (Fluorescein IsoThioCyanate, FITC, Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:50 in grado di riconoscere la frazione costante (Fc) degli anticorpi primari prodotti in topo; emette luce verde.
- α -rabbit coniugato alla rodamina isotiocianato (Tetramethyl Rhodamin IsoThioCyanate, TRITC, Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:50 in grado di riconoscere la frazione costante di anticorpi primari prodotti in coniglio; emette luce rossa.

INFEZIONE DEI GRANULI CEREBELLARI

Per veicolare la sequenza di DNA codificante la fotoproteina equorina indirizzata ai diversi compartimenti intracellulari dei granuli cerebellari, si è usato il virus dell'HIV-1 modificato geneticamente. Esso è un lentivirus che si presta all'infezione stabile di cellule di ogni tipo in quanto ha un ciclo vitale di tipo lisogenico e quindi non provoca la morte della cellula ospite, a differenza dei virus litici.

I lentivirus appartengono alla famiglia dei retrovirus, ma a differenza degli altri membri della famiglia, possono infettare anche cellule non replicanti, il che li rende dei buoni candidati per la trasfezione delle cellule a differenziazione terminale come quelle del sistema nervoso, in coltura.

Il virus dell'HIV-1 è stato modificato geneticamente in modo da renderlo non competente per la replicazione, in questo modo il ciclo del virus è bloccato alla prima infezione ed esiste un bassissimo rischio che possa revertire al genotipo wild type; inoltre, è stato pseudotipizzato con proteine dell'envelope del virus della stomatite vescicolare (VSV-G, glicoproteina G) per superare le limitazioni del tropismo cellulare.

La produzione del virus prevede la trasfezione transiente delle cellule HEK 293T (cellule di *packaging*) mediante il metodo della coprecipitazione con $Ca_3(PO_4)_2$. Questa operazione permette l'inserimento dei plasmidi che andranno poi a generare le particelle virali contenenti il gene codificante l'equorina.

I plasmidi utilizzati sono:

- **pMD2.VSVG**, che codifica per l'envelope pseudotipizzato;

- **pRSV-REV**, che codifica per la proteina che permette all' RNA neoformato di passare al citosol;
- **pMDLg/pRRE**, che codifica per il capsid;
- **transgene mpAEQ**, per l'equorina indirizzata sotto la membrana plasmatica; **reAEQ**, per l'equorina indirizzata al reticolo endoplasmico e **mitAEQ** per l'equorina indirizzata al mitocondrio.

La raccolta del virus si effettua mediante centrifugazione a 50000 g (Beckmann) del terreno di coltura a 72 e a 96 ore dalla trasfezione delle cellule di *packaging*. Le particelle virali vengono poi risospese in PBS e conservate a -80°C.

I granuli sono trasdotti a 24 ore dalla loro semina, mentre a 48 ore parte del terreno di coltura viene sostituito con terreno fresco e addizionato con citosina arabinoside (Ara C, 0,01 mM). Questa sostanza assicura una coltura arricchita in cellule granulari, poiché ostacola la proliferazione dei fibroblasti e degli astrociti.

Le operazioni di produzione virale e di infezione delle cellule granulari cerebellari sono state svolte in una stanza classificata livello 2 di biosicurezza, all'interno dell'Istituto Veneto di Medicina Molecolare (VIMM) di Padova.

MISURAZIONI DELLA CONCENTRAZIONE DI Ca^{2+} CON EQUORINA

EQUORINA, UNA SONDA PROTEICA PER MISURARE LE CONCENTRAZIONI INTRACELLULARI DI Ca^{2+}

In questo lavoro di tesi è stata impiegata la fotoproteina equorina quale sonda sensibile al Ca^{2+} . La proteina, isolata per la prima volta dall'organismo marino *Aequorea victoria*, è costituita da un polipeptide (apoproteina) (di 189 residui amino acidici di ~21 kDa) avente tre domini EF-hand che legano Ca^{2+} ad alta affinità. Al centro c'è una cavità nella quale si posiziona il gruppo prostetico celenterazina (~400 Da) che lega l'apoproteina con un legame perossidico. Quando il Ca^{2+} si lega, l'equorina va incontro ad una reazione intramolecolare irreversibile tale per cui la celenterazina viene ossidata a celenteramide, con conseguente liberazione di un fotone con lunghezza d'onda di 486 nm. La reazione dipende dalla concentrazione di Ca^{2+} per cui a concentrazioni >100 μ M la reazione è istantanea e tutta l'equorina viene "consumata". Invece, a concentrazioni più basse, tipicamente comprese tra 0.5-

10 μM , un opportuno algoritmo permette di quantificare la concentrazione di Ca^{2+} correlandola alla frazione di equorina consumata (e quindi di luce emessa). Tuttavia, la concentrazione di Ca^{2+} in vari compartimenti cellulari è spesso superiore al range utile per il calcolo. Pertanto, è stato necessario o ridurre l'affinità dell'equorina per il Ca^{2+} di ~20 volte (con la mutazione Asp119→Ala in uno dei siti di legame); oppure modificare l'affinità della celenterazina per l'equorina (celenterazina n). Queste manovre hanno così permesso di misurare $[\text{Ca}^{2+}]$ superiori a 100 μM .

Per misura i flussi di Ca^{2+} nei vari compartimenti cellulari, in questo lavoro abbiamo usato equorine ingegnerizzate sì da portare segnali che le indirizzavano verso uno specifico ambiente della cellula. In dettaglio:

- la presequenza derivata dalla subunità VIII della citocromo c ossidasi umana per la matrice mitocondriale (Rizzuto et al., 1992);
- la regione N-terminale della catena pesante delle immunoglobuline per il lume del RE (Sitia and Meldolesi, 1992);
- la proteina SNAP-25 per i domini citosolici della membrana plasmatica (Marsault et al., 1997).

I costrutti portano anche la porzione HA1 (di 9 residui amino acidici) della emoagglutinina del capsido del virus dell'influenza che, immunogenico assai più che non l'equorina, permette di monitorare le chimere mediante l'uso di un anticorpo monoclonale commerciale.

Oltre agli evidenti vantaggi di tali modifiche, è bene sottolineare altri legati all'uso dell'equorina: la relativa facilità di introdurre il cDNA nella cellula (utilizzando Ca^{2+} -fosfato, liposomi, o particelle virali) e la non tossicità della loro espressione.

RICOSTITUZIONE DELL'EQUORINA IN CELLULE VIVE

La ricostituzione è diversa in base al tipo di equorina utilizzata per l'analisi:

mpAEQ: si elimina il terreno contenuto nei pozzetti e si effettuano 3 lavaggi con la soluzione Krebs Ringer Buffer (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 0.4 mM, MgSO_4 1 mM, HEPES 20 mM; pH 7.4 a 37 °C, KRB) addizionata di glucosio 5,5 mM e di EGTA 100 μM .

L'EGTA è un chelante specifico ad alta affinità per lo ione Ca^{2+} e quindi ne determina l'eliminazione nell'ambiente extracellulare.

In ciascun pozzetto vengono aggiunti 200µl di soluzione di Krebs-Ringer, celenterazina wild-type (Sigma). Le cellule sono infine incubate per circa 1 ora a 37°C con 5% CO₂.

reAEO: prima della ricostituzione, i vetrini con adese le cellule sono stati lavati 3 volte e incubati per 10 minuti a 37°C con la soluzione Krebs Ringer Buffer addizionato di tBHQ 10 µM (Sigma) ed EGTA 3 mM (Sigma). Successivamente i vetrini sono stati incubati per 40 minuti a 4 °C in 200 µl di soluzione di Krebs-Ringer con EGTA 1 mM, ionomicina 5 µM (uno ionoforo che favorisce lo svuotamento di questo ione dalla cellula e quindi dal RE), celenterazina n (5 µM) che contiene un gruppo prostetico di sintesi a minore affinità, che permette di effettuare le misurazioni in compartimenti cellulari ad elevata [Ca²⁺]_{er} e tBHQ 20 µM. Dopo questa incubazione, il vetrino viene riposto all'interno della cameretta dell'equorinometro e viene perfuso con la soluzione salina addizionata di EGTA 200 µM e successivamente con salina addizionata del 2 % di BSA, in modo da eliminare la ionomicina.

La procedura che richiede un preventivo svuotamento del reticolo per ricostituire l'equorina in esso targhettata, è necessaria in quanto, alla [Ca²⁺]_{er} presente in condizioni di riposo, l'equorina, unita al suo gruppo prostetico, reagirebbe “bruciandosi” in pochi secondi non permettendo quindi alcuna misurazione.

Mit.Aeq: si procede come per la ricostituzione dell'equorina targhettata sotto la membrana citoplasmatica con la differenza che le cellule devono essere incubate per 1 ora e 30 minuti a 37°C con 5% CO₂.

MISURA DELLA LUMINESCENZA DELL'EQUORINA

I vetrini da 13 mm di diametro con adese le cellule, vengono posizionati all'interno di una camera di perfusione (diametro 15 mm, altezza 2 mm), posta a diretto contatto con un fotomoltiplicatore con amplificatore-discriminatore incorporato. La camera è termostata a 37 °C e perfusa mediante una pompa peristaltica (Gilson Minipuls3) con la soluzione salina di Krebs-Ringer, che a seconda dell'esperimento, viene addizionata con opportune sostanze (vedi risultati).

Alla fine di ogni esperimento le cellule sono permeabilizzate con una soluzione di digitonina 100 µM e CaCl₂ 10 mM. In questo modo, l'elevata quantità di calcio che

entra nella cellula consuma tutta l'equorina rimasta ed è quindi possibile calcolare il contenuto totale di equorina (L_{max}). I dati sono poi processati da un algoritmo che calcola a ritroso L/L_{max} dove L è la luce emessa in un dato momento dell'esperimento e L_{max} il valore massimo di luce emessa (valore che decresce gradualmente con il consumo dell'equorina).

Il segnale in uscita dall'amplificatore-discriminatore è raccolto da un contatore di fotoni EMI C660, inviato ad un computer e registrato per l'analisi successiva. La conversione del segnale di luminescenza in valori di $[Ca^{2+}]$ avviene mediante un programma costruito sul modello matematico presentato in Brini *et al.*, 1995.

GENOTIPIZZAZIONE TRAMITE PCR DEI TOPI DERIVATI DA INCROCI

Una volta rimosso il cervelletto per la preparazione delle colture primarie, la parte rimanente dell'encefalo dai topi nati dall'incrocio fra emizigoti $PrP^{+/-}$, viene divisa in due parti.

Una metà viene usata per la genotipizzazione mentre l'altra metà viene usata per eseguire immunoblot contro PrP^C .

Per eseguire la genotipizzazione, per prima cosa si estrae il DNA dal tessuto cerebrale e successivamente si esegue una PCR per amplificare il gene *Prnp* che permette di distinguere se il topo è $PrP-KO$, $PrP-WT$ o $PrP^{+/-}$.

Allo scopo di digerire i tessuti e favorire l'estrazione del DNA, una parte del cervello dei topi è incubato nel termomixer a $55^{\circ}C$ *overnight*, in un tampone di lisi (Tris 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.2%, NaCl 200 mM, pH 8) addizionato con proteinasi K (Roche).

A digestione avvenuta, i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti in modo da eliminare i residui cellulari. Il DNA viene fatto precipitare dal surnatante con isopropanolo (Sigma) e successivamente lavato con etanolo al 70% (J. T. Baker).

Successivamente il DNA viene risospeso in 50 μ l di acqua sterile 'DNAse free', e incubato per 15 minuti nel termomixer a $55^{\circ}C$ in modo tale da facilitarne la solubilizzazione.

A questo punto si allestisce la reazione di amplificazione del gene bersaglio (PCR) che viene condotta in ogni provetta, preparando una miscela di reazione contenente:

- desossinucleotidi trifosfati (dNTPs 250 μ M, Promega) per costituire i nuovi filamenti;

- i primers: *forward P3* (per topi PrP^{-/-}) 5'-ATT-CGC-AGC-GCA-TCG-CCT-TCT-ATC-GCC-3'; *forward P10* (per topi PrP-WT) 5'-GTA-CCC-ATA-ATC-AGT-GGA-ACA-AGC-CCA-GC-3'; *reverse P3'NC* (per topi PrP-WT e PrP^{-/-}) 5'CCC-TCC-CCC-AGC-CTA-GAC-CAC-GA-3'.

Il primer P3 si appaia con una sequenza interna alla cassetta neo^R che è stata inserita nel DNA dei topi PrP-KO al posto dell'ORF del gene *Prnp*, P10 si appaia con una regione presente nell'ORF del gene *Prnp* presente nei topi PrP-WT, mentre P3'NC si appaia con una sequenza situata nella regione del gene non tradotta, che è presente in entrambi i ceppi murini. I primers sono prodotti da Sigma Genosys e le concentrazioni usate sono: P10 1µM, P3 1 µM e P3'NC 2 µM;

- una DNA polimerasi termoresistente: *Taq* polimerasi 1.25 U/µl (Promega);
- altri elementi di supporto necessari per creare le condizioni ottimali per la reazione: *Flexi Buffer* (2.5 µl, Promega), MgCl₂ (1.5 mM, Promega) e DMSO (10%, Sigma);
- 1 µg di DNA da amplificare.

Dopodiché le provette sono state inserite in un *termocycler* (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems) che provvede ad eseguire variazioni cicliche di temperatura, tali da favorire l'amplificazione del DNA di interesse. Le fasi di un ciclo PCR sono riportate di seguito:

1. fase di denaturazione: la miscela di reazione contenente la sequenza da amplificare viene portata ad una temperatura di 95°C per 45 secondi, alla quale la doppia elica separa completamente nei due filamenti di cui essa è composta;
2. fase di annealing: la temperatura viene abbassata a 55°C per altri 45 secondi al fine di permettere il legame dei primers alle regioni loro complementari, sui filamenti di DNA denaturati;
3. fase di prolungamento: la temperatura viene alzata fino a 72°C per 1 minuto in modo da favorire al massimo l'attività della *Taq* polimerasi la quale determina l'allungamento dei primers appaiati, sfruttando come stampo il filamento singolo del DNA.

Queste fasi sono state ripetute ciclicamente per non più di 40 volte in quanto al di sopra dei 50 cicli la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau* dovuto, per esempio, a carenza degli oligonucleotidi utilizzati come inneschi o a causa del consumo degli dNTPs.

ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Questa tecnica è impiegata per la separazione e l'analisi del DNA amplificato mediante PCR.

Poiché le molecole di DNA sono dotate di carica netta negativa, dovuta alla presenza dei gruppi fosfato dissociati, quando vengono caricate su gel di agarosio in presenza di un opportuno tampone di corsa TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) e sottoposta ad un campo elettrico, esse migreranno verso l'anodo. Dal momento che il rapporto carica/massa è uguale per molecole di diversa lunghezza, la velocità di migrazione dipenderà esclusivamente dalla massa e quindi dalla capacità delle molecole di superare più o meno rapidamente i pori del gel, le cui dimensioni sono determinate dalla concentrazione d'agarosio impiegata.

Per l'analisi dei DNA amplificati sono utilizzati gel di agarosio all'1.2% addizionati con bromuro d'etidio (10 mg/ml, Sigma), una molecola che si intercala fra le basi del DNA e che è in grado di emettere fluorescenza rosso-arancio (intorno ai 560 nm) quando irradiata con luce UV (260-360 nm).

I campioni di DNA sono stati caricati dopo averli mescolati con una soluzione colorante composta da 0.25 % di blu di bromofenolo in 30 % di glicerolo sciolti in tampone TAE.

Il gel immerso in tampone di corsa è stato sottoposto ad elettroforesi a temperatura ambiente applicando un voltaggio di 80 V e un amperaggio massimo. La visualizzazione del DNA è stata ottenuta mediante un transilluminatore a raggi UV (Hoefer macro Vue Uvis-20).

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DI MEMBRANA

Per l'estrazione delle proteine di membrana, i CGC (24×10^6 cellule) sono stati risospesi in 500 μ l di tampone di lisi (Hepes/KOH 10 mM, saccarosio 0.32 M, MgSO₄ 0.5 mM, β -mercaptoetanolo 2 mM, inibitori delle proteasi [inibitore delle proteasi *Complete Mini*TM, Roche Diagnostics], pH 7.4). I campioni sono stati quindi

sottoposti dapprima a sonicazione (3 cicli da 20 secondi) e poi a 4 cicli di *shock* termico, ponendoli in azoto liquido per 30 secondi e successivamente a 37°C fino a scongelamento. L'omogenato è stato centrifugato a 10000g per 10 minuti a 4°C. Questo step permette di far sedimentare i nuclei, gli altri organelli cellulari e le cellule non rotte. Il surnatante è stato poi sottoposto ad ultracentrifugazione a 117000g per 30 minuti (ultracentrifuga Beckman Optima Max-E). Il pellet che si ricava, arricchito in proteine di membrane cellulari, è stato quindi risospeso in 60 µl di tampone di risospensione (Hepes/KOH 10 mM, saccarosio 0.32 M inibitori delle proteasi, pH 7.4).

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Per l'analisi delle proteine sono stati impiegati o le porzioni di cervello prelevate dai diversi topi, oppure i CGC (3×10^6 cellule). In entrambi i casi ogni campione è stato risospeso in un buffer di lisi appropriato (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, inibitore delle proteasi) e l'omogenato è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti.

La lisi è stata effettuata meccanicamente andando a vortexare 3 volte per 40 secondi, ciascuno campione ad intervalli di 20 secondi in ghiaccio. Successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 14000xg per 15 minuti a 4°C in modo tale da favorire la sedimentazione delle cellule non rotte e dei detriti cellulari, il surnatante è stato poi trasferito in una nuova provetta.

A questo punto è stato stimato il contenuto proteico totale mediante il metodo BCA.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO CON IL METODO DI LOWRY E BCA

Il contenuto proteico totale dei campioni analizzati è stato effettuato mediante il metodo di Lowry, utilizzando il kit commerciale a nostra disposizione (*Total Protein Kit Micro Lowry Peterson's Modification*, Sigma), oppure utilizzando il metodo dell'acido bicinconinico (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce).

La scelta tra i due metodi è stata effettuata in base al tipo di buffer utilizzato per la solubilizzazione delle proteine in esame, in quanto le sostanze utilizzate possono interferire in maniera diversa con i reagenti impiegati durante l'esecuzione del saggio. Di seguito vengono brevemente descritti i due metodi.

- Il saggio di Lowry si basa sia sulla reazione del biuretto, dove i legami peptidici proteici reagiscono con il Cu^{2+} in condizioni alcaline producendo Cu^+ che reagisce con il reagente di Folin (miscela di tungstato, molibdato e fosfato di sodio); sia sulla reazione di Folin-Ciocalteu che prevede essenzialmente la riduzione di fosfomolibdotungstato a eteropolimolibdenio blu ad opera dei residui di tirosina e triptofano. Il prodotto della reazione ha una forte colorazione blu, con un picco di assorbimento a 660 nm.
La concentrazione proteica dei campioni viene quindi determinata mediante lettura spettrofotometrica e dal confronto dei campioni con una retta di taratura ottenuta con soluzioni di BSA a concentrazione nota.
- Il metodo dell'acido bicinconinico (BCA) è simile a quello di Lowry in quanto sfrutta la riduzione del Cu^{2+} a Cu^+ da parte delle proteine in condizioni alcaline. Due molecole di BCA chelano uno ione rameoso, creando un addotto con un intenso colore violetto che presenta un massimo di assorbanza a 560 nm. Anche in questo caso, è possibile ricavare la concentrazione dei campioni di interesse andando a confrontare l'assorbanza dei singoli campioni con quella di soluzioni di BSA a concentrazione nota.

ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE (SDS-PAGE)

La tecnica di elettroforesi consente di separare le proteine di una miscela in base al loro peso molecolare. Essa consiste nella migrazione delle proteine denaturate in sodio dodecil-solfato (SDS), mediante un campo elettrico costante all'interno di un gel di poliacrilammide.

La procedura prevede che i campioni da separare vengono dapprima bolliti per 5 minuti nel tampone Laemmli (Tris/HCl 62.5 mM, SDS 2%, glicerolo 10%, blu di bromofenolo 0.03%, β -mercaptoetanolo 5%, pH .8). L'SDS si lega fortemente alle proteine (~1.4 g/g di proteina), denaturandole e fornendo loro una quantità di carica negativa costante per unità di massa; il β -mercaptoetanolo invece riduce i ponti disolfuro eventualmente presenti nelle proteine. Con questo trattamento tutte le proteine della miscela si aprono quindi in una struttura filamentosa con una serie di molecole di SDS carico negativamente, lungo la catena polipeptidica (una

molecola di SDS si lega in media ogni due residui amminoacidici). Pertanto, durante l'elettroforesi, i complessi proteina-SDS si muoveranno tutti verso l'anodo (positivo) e, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, la loro mobilità risulterà inversamente proporzionale al \log_{10} del loro peso molecolare. Se si fanno correre contemporaneamente al campione, proteine standard di peso molecolare noto, è possibile stimare il peso molecolare delle proteine del campione analizzato.

Il gel di poliacrilammide in SDS viene preparato seguendo il metodo di (Laemmli, 1970). Il gel è composto di due parti: lo *stacking* gel superiore (pH 6.8, acrilammide al 5%), che serve ad impaccare le proteine del campione, e il *running* gel inferiore (pH 8.8, acrilammide 8-15%) nel quale avviene la vera e propria separazione delle proteine. La concentrazione di acrilammide in quest'ultima porzione è variabile e viene scelta in base al peso molecolare della proteina che si vuole analizzare.

La diversa composizione e il diverso pH esistenti tra queste due parti del gel, fanno in modo che il campione di proteine si concentri in una banda sottile prima che entri nel gel di separazione.

La piastra elettroforetica, delle dimensioni di 8x10 cm, viene fissata nell'apposito apparecchio (Bio-Rad Miniprotean-3) ed immersa nel tampone di corsa (Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.4).

IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT)

L'immunoblot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici.

Una volta terminata l'elettroforesi, il gel viene rimosso dai vetri e steso su di una membrana di poli-vinilidene-fluoruro (PVDF) [Immobilon-P, Millipore] (che deve essere precedentemente attivata in metanolo), o di nitrocellulosa [Bio-Rad], sulle quali verranno trasferite elettroforeticamente le proteine precedentemente separate. Si usano quindi della carta di Whatman e delle spugnette per tenere insieme gel e membrana, come un *sandwich* che viene sospeso mediante una pinza, e per garantire un flusso uniforme di corrente ionica durante il trasferimento. La pinza viene quindi immersa nel tampone di trasferimento (25 mM Tris/HCl pH 8.4, glicina 192 mM, metanolo 20%, SDS 0.03%), e viene applicato un campo elettrico ortogonale al gel

(corrente costante di 90mA *overnight*, oppure 350 mA per 1h e 15 min circa) che forza le proteine a migrare fuori dal gel, verso la membrana alla quale aderiscono. Una volta verificato il trasferimento uniforme delle proteine mediante colorazione con Rosso Ponceau la membrana viene successivamente incubata, sotto lenta agitazione (1 ora, RT), nella soluzione di bloccaggio (PBS contenente Tween-20 0.1% e BSA 3%, oppure latte scremato 5%), in modo da saturare i siti di legame aspecifici per gli anticorpi. Si procede quindi all'incubazione con l'anticorpo primario desiderato (vedi paragrafo successivo) (diluito), che viene fatta nella soluzione di bloccaggio a RT, per circa un'ora oppure a 4°C *overnight*. Dopo due lavaggi di 15 minuti a RT in tampone PBS-T (PBS contenente Tween-20 0.1%), si aggiunge l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) [Santa Cruz Biotechnology] diluito 1:3000 nella soluzione di bloccaggio, lasciando il tutto in agitazione per 1 ora. Al termine di questo periodo si procede nuovamente con i lavaggi in PBS-T e poi in PBS. Infine, le bande immunoreattive vengono visualizzate mediante chemiluminescenza, utilizzando i reagenti ed il protocollo del kit commerciale ECL [Enhanced Chemi-Luminescence, Millipore]. Il segnale luminoso (λ_{max} di 425 nm) sviluppato in seguito all'ossidazione del luminolo (contenuto nel kit) da parte della HRP viene rivelato per mezzo di un apparecchio computerizzato che si avvale di una videocamera CCD con sistema di raffreddamento [Kodak Imaging Station 440CF] in grado di acquisire il segnale luminoso convertendolo in immagine digitale. La quantificazione delle bande immunoreattive è stata eseguita mediante l'analisi densitometrica con l'ausilio del software Kodak 1D, come descritto nel seguito.

ANTICORPI UTILIZZATI IN *WESTERN BLOT*

Gli anticorpi primari utilizzati in *Western blot* sono stati i seguenti (tra parentesi la diluizione):

- Ancorpo monoclonale di topo anti-Prp clone 8H4 (diluizione 1:7000), che riconosce la sequenza 180-192 della PrP murina (gentilmente fornito dal Dr. Man Sun Sy, Cleveland OH, USA);
- Anticorpo monoclonale di topo anti-PMCA murina clone 5F10 (1:2000, Sigma), diretto contro tutte le isoforme;

- Anticorpo policlonale di coniglio #1004 (1:400), diretto contro la sequenza C-terminale della proteina ORAI2 murina (gentilmente fornito dal Dr. Veit Flockerzy, Homburg, Germany);
- Anticorpo policlonale di capra anti-SERCA2 #N-19 (1:200, Santa Cruz Biotechnology);
- Anticorpo monoclonale di topo anti-GAPDH clone MAB374 (1:1000, Chemicon International)
- Anticorpo monoclonale di topo anti- α -tubulina clone B-5-1-2 (1:1000, Sigma)
- Anticorpo policlonale di coniglio anti-calreticulina murina (1:20000, StressGene)
- Anticorpo policlonale di coniglio anti-recettoreIP3 (1:1000), diretto contro l'isoforma 1 (Bioreagents);
- Anticorpo policlonale di coniglio anti-calcineurina murina (1:1000, Chemicon International).

ANALISI DENSITOMETRICA

L'elaborazione densitometrica delle bande immunoreattive sulla membrana di nitrocellulosa/PVDF è stata condotta con l'ausilio del software *KODAK 1D*. I valori di intensità derivano dalla somma delle intensità dei singoli *pixel* dell'area esaminata, per ogni banda di interesse, sottratta del *background* dell'area stessa. L'intensità delle bande immunoreattive è stata normalizzata o all'intensità della banda relativa alla gliceraldeide-3fosfato-deidrogenasi (GAPDH), o a quella della α -tubulina, utilizzate entrambe come proteine *housekeeping*, oppure alla quantità reale di proteine totali caricate nella corsia corrispondente. Quest'ultima è stata determinata mediante analisi densitometrica dell'immagine della membrana colorata con Rosso Ponceau, opportunamente digitalizzata con l'ausilio di uno scanner. Si ottengono così dei valori relativi di intensità delle bande di interesse espressi in unità arbitrarie, che permettono di confrontare e mediare i valori ottenuti con gel diversi.

SCOPO DELLA TESI

Nonostante i quasi 40 partner associati alla proteina e le molteplici funzioni ad essa attribuite (Aguzzi et al., 2008), a tutt'oggi l'effettivo ruolo della PrP^C nella cellula rimane oscuro. Di fatto, essa sembra svolgere una pletora di funzioni, che vanno dalla protezione contro l'apoptosi e lo stress ossidativo, alla promozione dell'adesione e maturazione delle cellule.

Il Ca²⁺ è un secondo messaggero che più di altri esplica un ruolo centrale in innumerevoli processi cellulari. Pertanto, grazie anche alla sua particolare localizzazione che ricorda quella di molti recettori, non è da escludere che la PrP^C partecipi ai processi sopra elencati, ed altri ancora, regolando - direttamente o indirettamente - l'omeostasi di questo importante secondo messaggero. Quest'ipotesi trova supporto in precedenti osservazioni, condotte su cellule PrP-KO, o infettate da prioni, a favore dell'influenza della proteina sull'omeostasi di Ca²⁺. Riguardo al possibile controllo dei flussi locali di Ca²⁺, l'unica analisi di questo tipo è stata condotta utilizzando la linea stabile CHO trasfettata opportunamente per (sovra)esprimere la PrP^C ([49]Brini et al., 2005) Dimostrando questo studio come la proteina sia effettivamente in grado di regolare i movimenti di Ca²⁺ in molti domini cellulari, il rapporto PrP^C- Ca²⁺ potrebbe spiegare le funzioni eterogenee, spesso contrastanti, ascritte alla proteina. Nel contempo, questo stesso rapporto potrebbe rendere ragione di come la proteina, sostanzialmente 'benigna' per la cellula, possa trasformarsi in un agente neurotossico a seguito della modificazione conformazionale in PrP^{Sc}.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato di analizzare l'influenza di PrP^C sull'omeostasi del Ca²⁺ utilizzando un modello più aderente alle condizioni naturali, quale quello offerto dalle colture primarie di cellule di granuli del cervelletto (CGC) che, per quest'occasione, sono oltretutto state derivate da topi con diverso genotipo per PrP^C: *wild type* (WT) o *knock-out* per la PrP^C (PrP-KO). L'utilizzo di specifici protocolli di stimolazione e di sonde proteiche luminescenti, Ca²⁺-sensibili, indirizzate in determinati compartimenti cellulari, ha poi permesso di analizzare puntualmente i flussi di Ca²⁺ in diversi domini della cellula, quali la regione sottostante la membrana plasmatica, il lume del RE e la matrice mitocondriale. Infine, l'analisi dei livelli d'espressione di una serie di proteine direttamente coinvolte

nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} , ha permesso di valutare l'aspetto più meccanicistico del rapporto PrP^{C} - Ca^{2+} .

RISULTATI

Come premesso nelle sezioni precedenti, lo studio dell'influenza della PrP^C sui flussi locali di Ca²⁺, e sulle proteine che li governano, è stato condotto su colture primarie di cellule granulari cerebellari (CGC) esprimenti, o meno, la proteina prionica. Pertanto, i neuroni sono stati derivati rispettivamente dai ceppi murini FVB *wild type* (WT) e F10 ablati per il gene *prnp* (PrP-KO). Inoltre, al fine di escludere che, piuttosto che al diverso genotipo per PrP^C, le differenze eventualmente osservate fossero imputabili a modificazioni geniche occorse spontaneamente nel tempo nei ceppi *inbred* (*genetic drift*), abbiamo utilizzato anche topi PrP^{+/+} e PrP^{-/-} ottenuti accoppiando animali eterozigoti PrP^{+/-}, a loro volta derivati dall'incrocio dei topi *inbred*. Tuttavia, diversamente che nei ceppi originali, i CGC di questi incroci sono stati analizzati per i soli movimenti di Ca²⁺.

Come di seguito riportato, il lavoro sperimentale ha dapprima riguardato aspetti “tecnici” che avvalorassero la bontà del modello scelto, per poi focalizzarsi sul monitoraggio dell'omeostasi del Ca²⁺ nei granuli cerebellari con diverso genotipo per PrP^C.

ESPRESSIONE DELLA PRP^C

Dato che, seppure ubiquitaria, la PrP^C è particolarmente abbondante nel SNC, abbiamo comunque monitorato la presenza della proteina in tutte le colture primarie di CGC da noi utilizzate. L'analisi del pattern di espressione condotta mediante immunolabelling con un anticorpo specifico anti-PrP, ha rivelato - sia nei ceppi *inbred* PrP^{+/+} sia negli incroci PrP^{+/+} e PrP^{+/-} - la presenza di diverse bande immunoreattive corrispondenti alle diverse glicoforme della proteina (non-glicosilata, mono- e diglicosilata) (Figura 1). Per contro, nessun segnale apprezzabile era evidente nelle CGC derivate dalla linea PrP-KO *inbred* o ottenuta dagli incroci. Questi risultati hanno pertanto confermato che quest'aspetto del modello scelto era effettivamente adatto allo studio.

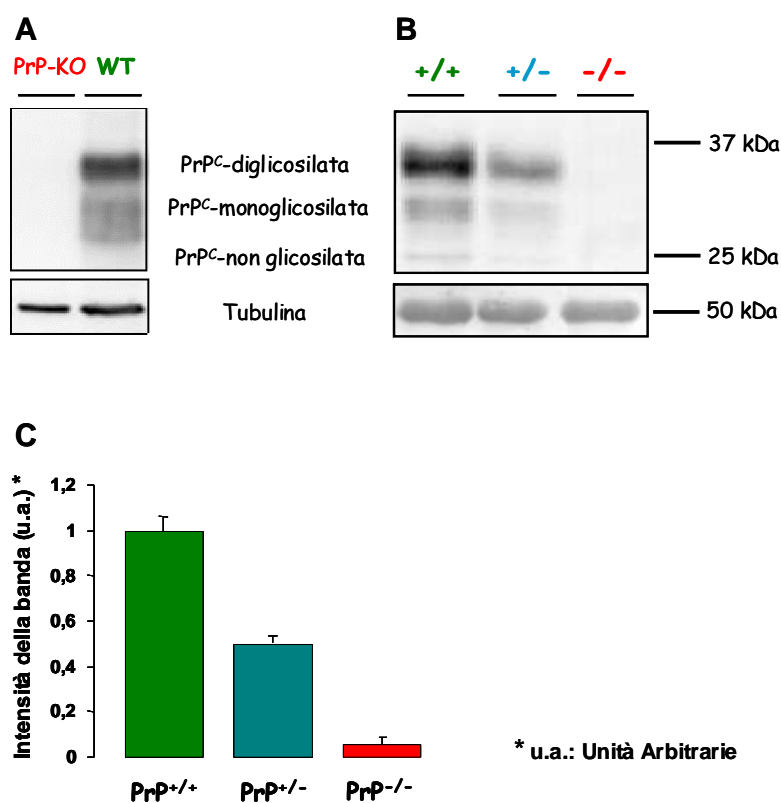


Figura 1. Espressione della PrP^C nei CGC

La Figura riporta un *Western blot* di CGC derivate da ceppi murini FVB *inbred* (WT: n=10; PrP-KO n=12) (A) o dagli incroci (PrP^{+/+}: n=10; PrP^{+/-}: n=15; PrP^{-/-}: n=9) (B), dopo separazione elettroforetica (SDS-PAGE, 12% acrilammide) di 10 µg di proteine, trasferimento delle proteine su membrana di nitrocellulosa, e trattamento di questa con l'anticorpo monoclonale anti-PrP 8H4. Si può notare come le tre diverse isoforme della PrP^C siano presenti nelle CGC dei topi omo- (PrP^{+/+}) ed etero- (PrP^{+/-}) zigoti, e che nessun segnale sia invece evidente nei neuroni dei topi PrP-KO (o nei PrP^{-/-}). Il pannello inferiore di ogni blot riporta l'immunorivelazione della proteina tubulina (anticorpo B512), usata come standard interno per l'analisi densitometrica. (C) Istogramma dell'analisi densitometrica dei *Western blot* di CGC derivati dagli incroci, che mostra che gli emizigoti PrP^{+/-} (0.5 ± 0.038 unità arbitrarie, u.a., n=15) esprimono metà PrP^C rispetto ai PrP^{+/+} (1.00 ± 0.06 u.a., n=10), e che nei PrP^{-/-} l'espressione della proteina è praticamente assente (0.06 ± 0.029 u.a., n=9).

VALUTAZIONE DELLA PUREZZA DELLE COLTURE DI CGC

Le colture primarie di CGC derivano dalla disgregazione dell'organo corrispondente ricavato dall'animale. Le cellule isolate possono essere mantenute *in vitro* ed andare

incontro al processo di differenziamento. È tuttavia di primaria importanza che le colture così ottenute siano pure, non contaminate, cioè, da altri tipi di cellule. A causa della loro rapidità di replicazione, uno dei principali contaminanti che si ritrovano in questa tipologia di colture sono gli astrociti.

Per ogni coltura di CGC utilizzata negli studi abbiamo quindi valutato il grado di contaminazione da astrociti. Ciò è stato possibile con saggi immunocitochimici (Figura 2), usando anticorpi (coniugati a molecole fluorescenti) contro il marker astroctario d'eccellenza, la GFAP (*Glial Fibrillare Acidic Protein*), e riportando poi il numero di astrociti presenti al numero totale di cellule (nel campo considerato) marcate con il tracciante fluorescente Hoechst che s'intercala nella doppia elica del DNA. Dal rapporto ottenuto, abbiamo potuto concludere che, in media, le colture avevano un grado di contaminazione da astrociti inferiore al 4%, e quindi un grado di purezza in CGC superiore al 90% come riportato in letteratura per questo tipo di colture (Carafoli et al., 1999).

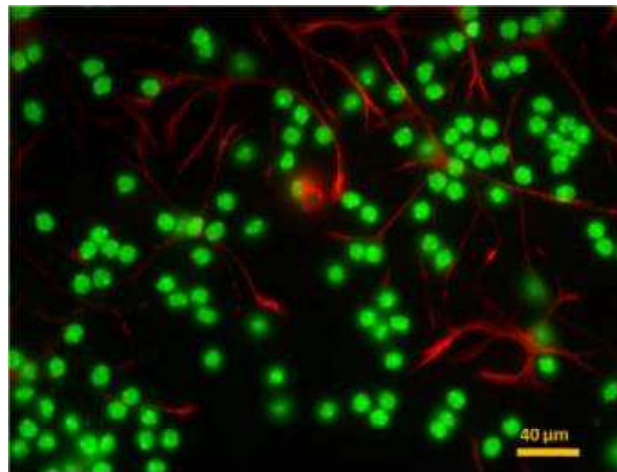


Figura 2. Purezza delle colture primarie di CGC

Le cellule sono state incubate con anticorpo primario anti-GFAP e successivamente con l'anticorpo secondario coniugato al TRITC. L'immunomarcatura evidenzia la scarsa presenza di astrociti (in rosso) rispetto a tutte le cellule (CGC e astrociti) colorate con il tracciante nucleare fluorescente Hoechst (in verde).

Gli esperimenti riportanti nei paragrafi successivi sono riferiti ai ceppi *inbred* WT e PrP-KO. Alla fine di questa sezione vengono riportati anche gli esperimenti ottenuti, mediante l'utilizzo della sonda equorina, sulle CGC derivate dagli incroci PrP^{+/+} e PrP^{-/-}.

MISURA DEI FLUSSI DI CA²⁺

DOMINI CITOSOLICI DELLA MEMBRANA PLASMATICA

I primi domini cellulari analizzati per le variazioni della concentrazione di Ca²⁺ sono stati quelli sottostanti la membrana plasmatica. A tale scopo, a 24 ore dalla semina i CGC sono stati infettati con il vettore lentivirale pLV-mpAEQ che, grazie alla sequenza di indirizzamento della SNAP25, permette alla chimera equorina-SNAP25 (mpAEQ) di localizzarsi nel foglietto interno della membrana plasmatica.

Per meglio apprezzare le curve riportate nella Figura 3, è bene sottolineare alcuni punti cruciali del protocollo applicato. Il primo riguarda la necessaria ricostituzione dell'equorina con il suo gruppo prostetico celenterazina - portata a termine antecedentemente al posizionamento del vetrino nella cameretta del luminometro - che, dovendo avvenire in assenza di Ca²⁺, viene aggiunta al mezzo (Krebs Ringer Buffer) contenente il chelante del Ca²⁺ EGTA. L'assenza dello ione dal mezzo provoca il progressivo svuotamento di Ca²⁺ dal RE, fenomeno che rientra perfettamente nel disegno sperimentale. Infatti, delle molte vie di entrata di Ca²⁺ dall'ambiente esterno al citosol, il protocollo usato ha voluto seguire l'entrata dello ione attraverso i canali SOC, il cui poro - composto principalmente dalla proteina Orai - si apre, per l'appunto, a seguito dello svuotamento di Ca²⁺ dal RE e del conseguente cambiamento conformazionale della proteina del RE, STIM (vedi l'Introduzione). Fatto trascorrere il tempo necessario alla ricostituzione e svuotamento del RE (60 min), il vetrino è inserito nel luminometro, e dopo una breve perfusione (in assenza di Ca²⁺), l'esperimento inizia perfondendo le cellule col mezzo contenente 1 mM Ca²⁺. Come mostrato nella Fig. 3A, la sonda mpAEQ monitora l'entrata capacitativa di Ca²⁺ (l'emissione di luce è qui già convertita in concentrazioni di Ca²⁺) che, raggiunto un certo picco, decresce fino a raggiungere un determinato stato stazionario. Il decremento, attribuibile all'estrusione del Ca²⁺ dal

citofosfo, vede il coinvolgimento di diverse proteine che si attivano nel tempo a seconda delle loro caratteristiche biochimiche. In particolare, la prima fase è riconducibile all'NCX della membrana plasmatica, la seconda alla PMCA (anch'essa della membrana plasmatica) e alla SERCA (del RE). Dato che la SERCA ripristina le concentrazioni basali di Ca^{2+} nel lumen del RE, gli oligomeri di STIM1 si dissociano interrompendo, in questa maniera, l'attività dei SOC.

La Figura. 3A mostra che le fluttuazioni di Ca^{2+} nei domini della membrana plasmatica hanno un andamento che dipende dalla presenza della PrP^C. Il transiente di entrata è, infatti, superiore di ~190% nei granuli cerebellari PrP-KO rispetto al ceppo WT. Inoltre, ancora diversamente che nelle CGC WT, i neuroni privi di PrP^C recuperano la concentrazione basale di Ca^{2+} (conseguente all'estrusione) con un andamento chiaramente bifasico, e mettono in evidenza uno stato pseudo-stazionario che ritarda di decine di secondi il ripristino delle concentrazioni di riposo.

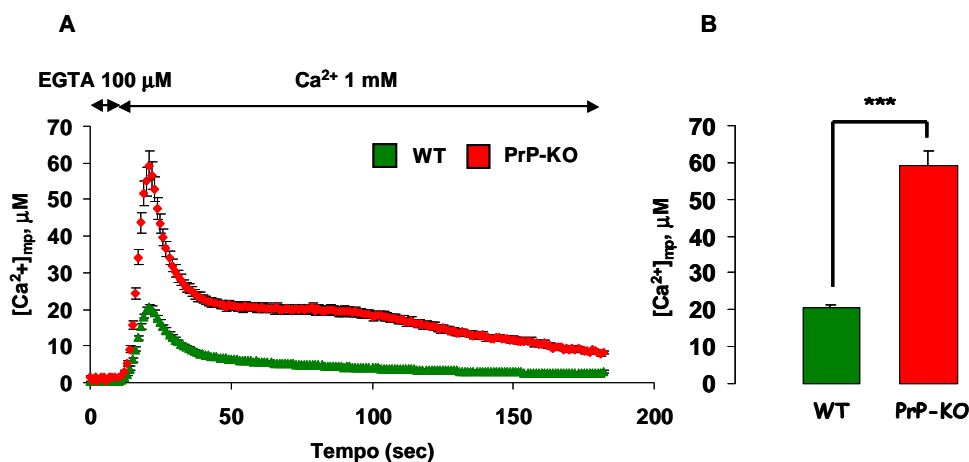


Figura 3. Flussi di Ca^{2+} nei domini citosolici della membrana plasmatica di CGC WT e PrP-KO, monitorati dalla sonda mpAEQ

(A) Le tracce descrivono l'andamento temporale della concentrazione di Ca^{2+} nei domini sottostanti la membrana plasmatica nelle CGC esprimenti la sonda mpAEQ. Le cellule sono state precedentemente svuotate del Ca^{2+} del RE e ciò determina l'apertura dei canali SOC che, a seguito della perfusione col mezzo contenente 1 mM CaCl_2 , mediano l'entrata del Ca^{2+} monitorata dalla sonda. Questo transiente risulta molto più elevato nei CGC PrP-KO rispetto a quelle WT. Nella successiva fase di svuotamento, le CGC PrP-KO si distinguono nuovamente per uno stato pseudo-stazionario che mediamente contiene più Ca^{2+} ($20.34 \pm 1.21 \mu\text{M}$, $n=27$) rispetto alle cellule WT ($5.83 \pm 0.25 \mu\text{M}$, $n=22$). Ogni punto sperimentale riporta un valore medio \pm ES.

(B) Il diagramma a barre riporta il valore di picco del transiente di Ca^{2+} accumulato nei domini di membrana dei due tipi di CGC analizzate. I valori riportano la media \pm ES (WT: $20.68 \pm 0.82 \mu\text{M}$, $n=22$; PrP-KO: $59.25 \pm 4.04 \mu\text{M}$, $n=27$). [*** $p < 0.001$, Student t-test]

In conclusione, i dati ora riportati dimostrano che in assenza della PrP^C più Ca^{2+} si accumula nei domini sottostanti la membrana plasmatica, i quali, inoltre, mantengono una concentrazione dello ione in condizioni di stato stazionario che è più elevato che quando la PrP^C è normalmente espressa. Questo risultato è di grande interesse, non solo perché dimostra, per la prima volta in colture neuronali primarie, come la PrP^C influenzi l'accumulo di Ca^{2+} in questi domini (probabilmente regolando l'entrata dello ione dall'esterno); ma anche perché l'elevato Ca^{2+} osservato in assenza della proteina, sia in transiente che in stato stazionario, correla con la maggiore eccitabilità già riportata per neuroni PrP-KO (Khosravani et al., 2008), o infettati da prioni (Johnston et al., 1998; Johnston et al., 1998).

INIBIZIONE DELLA CORRENTE CAPACITATIVA MEDIANTE LANTANIO

Per stabilire che i flussi di Ca^{2+} monitorati con il precedente protocollo fossero attribuibili ai soli SOC, è stato necessario applicare lo stesso protocollo in presenza di lantanio (La^{3+}), inibitore di questa classe di canali. Di fatto, come riportato dagli istogrammi della Figura 4, la presenza del La^{3+} (durante la perfusione assieme a CaCl_2 1 mM) riduce grandemente i valori di picco dei transienti in entrambi i tipi di neuroni, permettendo così di concludere che i transienti registrati con l'impAEQ, in seguito a deplezione dello ione dal RE, sono effettivamente mediati dai SOC.

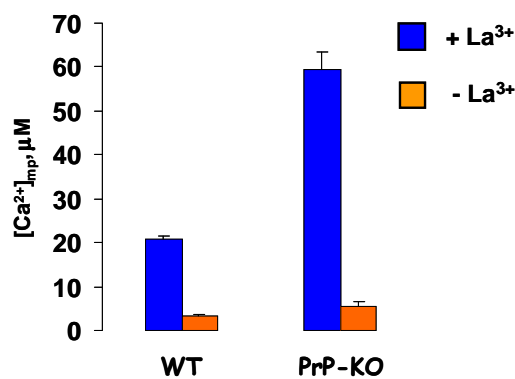


Figura 4. Analisi dei picchi di Ca^{2+} in CGC trattate, o no, con La^{3+}

Il diagramma a barre rappresenta la media dei valori di picco dei transienti di entrata del Ca^{2+} , nei domini adiacenti alla membrana plasmatica, monitorate dalla sonda mpAEQ in presenza (arancione) o assenza (blu) di 0.3 mM La^{3+} . Si noti come il trattamento con l'inibitore dei SOC

provochi una diminuzione del picco molto evidente. I valori riportano la media \pm ES (WT: $3.3 \pm 0.37 \mu\text{M}$, n=10 rispetto al controllo $20.59 \pm 0.82 \mu\text{M}$, n=22; PrP-KO: $5.65 \pm 1.07 \mu\text{M}$, n=12, rispetto al controllo $59.26 \pm 4.04 \mu\text{M}$, n=27).

Il diverso comportamento dei flussi di Ca^{2+} riscontrato nei granuli cerebellari esprimenti la, o privi della, PrP^C (vedi Figura 3) non trova un'immediata ragione meccanicistica. Esso, infatti, è il risultato di una serie complessa di attività: da una parte i canali responsabili dell'entrata dello ione, dall'altra tutte le proteine coinvolte nelle molteplici vie di estrusione del Ca^{2+} dal citosol, i.e. lo scambiatore NCX e le pompe PMCA e SERCA. Per appurare se, al di là di cambiamenti della loro attività (comunque non facilmente valutabile nel nostro laboratorio), le proteine fossero diversamente espresse nei due tipi di neuroni, sono stati realizzati degli esperimenti di *Western blot* per valutare i livelli di espressione delle proteine coinvolte nell'omeostasi del Ca^{2+} . Da notare che, a questo scopo, sono state utilizzate CGC rimaste in coltura per 96 ore, lo stesso intervallo di tempo normalmente impiegato per saggiare le CGC riguardo ai flussi di Ca^{2+} .

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI ORAI

È stato riconosciuto che questa proteina costituisce il poro del canale responsabile della corrente capacitativa di Ca^{2+} , la cui apertura è conseguente all'interazione con la proteina STIM che funge da sensore di concentrazione dello ione nel lume del RE ([69]Zhang et al., 2005). Per testare la sua espressione, gli esperimenti sono stati condotti isolando, attraverso ultracentrifugazione, una frazione ricca di proteine di membrane delle CGC WT e PrP-KO. La frazione è stata poi sottoposta a separazione elettroforetica, elettroblottata su foglio di nitrocellulosa e rivelata con l'anticorpo specifico per l'isoforma 2 di Orai (la più espressa nel SNC). Come riportato nella Figura 5, la densitometria della banda immunoreattiva mostra che le CGC PrP-KO esprimono la proteina in quantità minore (per circa il 30%) rispetto alle CGC WT.

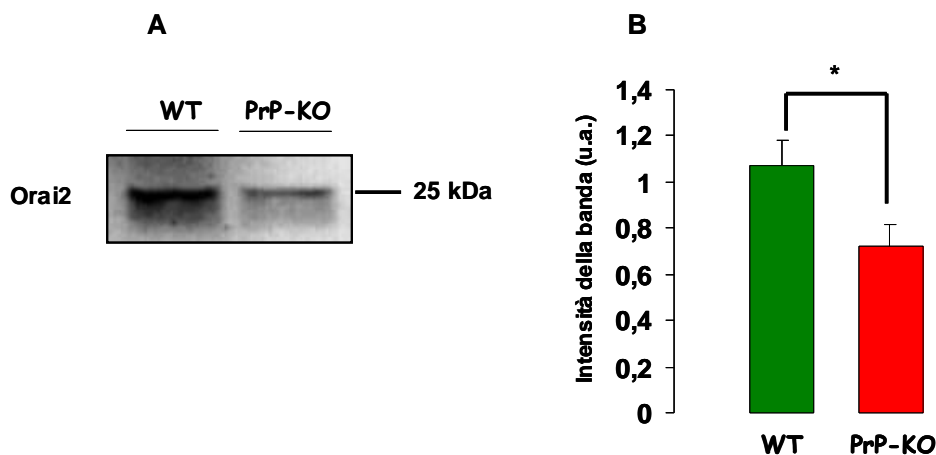


Figura 5. Espressione di Orai2 nei CGC WT e PrP-KO

(A) *Western blot* rappresentativo di Orai2 presente in una frazione arricchita di proteine di membrane dei due diversi tipi di CGC raccolti dopo 96 ore di coltura *in vitro*. 15 μ g totali di proteine totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE (12% acrilammide), elettrotrasferiti su nitrocellulosa e rivelati utilizzando l'anticorpo policlonale #1004 diretto contro la sequenza C-terminale della proteina murina.

(B) Istogramma dell'analisi densitometrica di Orai2 nei due diversi tipi di cellule, dalla quale è possibile osservare che la proteina ha un livello di espressione minore nelle CGC PrP-KO (0.72 ± 0.11 u.a.; $n=10$), rispetto alle CGC WT (1.07 ± 0.1 u.a.; $n=11$). I dati riportati sono le medie \pm ES. [* $p < 0.01$, Student t-test]

Se da un lato l'evidente diminuzione dell'espressione di Orai2, in seguito all'ablazione del gene per la PrP^C, suggerisce che la PrP^C possa influenzare – direttamente o indirettamente – l'espressione del canale, dall'altro questo risultato non è di facile interpretazione in quanto, in prima analisi, non correla affatto con il picco del transiente d'entrata del Ca²⁺ che, come mostra la Fig. 3, è di gran lunga superiore a nelle CGC PrP-KO rispetto a quelle WT.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLO SCAMBIATORE NCX

Lo scambiatore Na⁺/Ca²⁺ è una proteina a bassa affinità per il Ca²⁺, ma ad alta capacità, che, proprio per questi aspetti, contribuisce in maniera essenziale a estrarre il Ca²⁺ dal citosol quanto lo ione è ad alte concentrazioni. Delle tre isoforme di NCX, la 1 e la 3 sono quelle più presenti nelle CGC. Tuttavia, essendo l'espressione dipendente da Ca²⁺ e calcineurina (Li et al, 2000), la quantità di queste

isoforme può variare durante le fasi di maturazione dei granuli. Come per l'Orai, il monitoraggio dell'NCX mediante *Western blot* è stato condotto utilizzando una frazione ricca di proteine di membrana dalle diverse CGC - mantenuti nelle stesse condizioni di coltura delle cellule destinate alle misure di Ca^{2+} - testata con anticorpi specifici contro le isoforme 1 e 3.

Come mostrato nella Figura 6, l'analisi densitometrica delle bande immunoreattive derivate dai CGC WT e PrP-KO non ha rivelato alcuna differenza di espressione né per l'isoforma 1 né per l'isoforma 3 dello scambiatore.

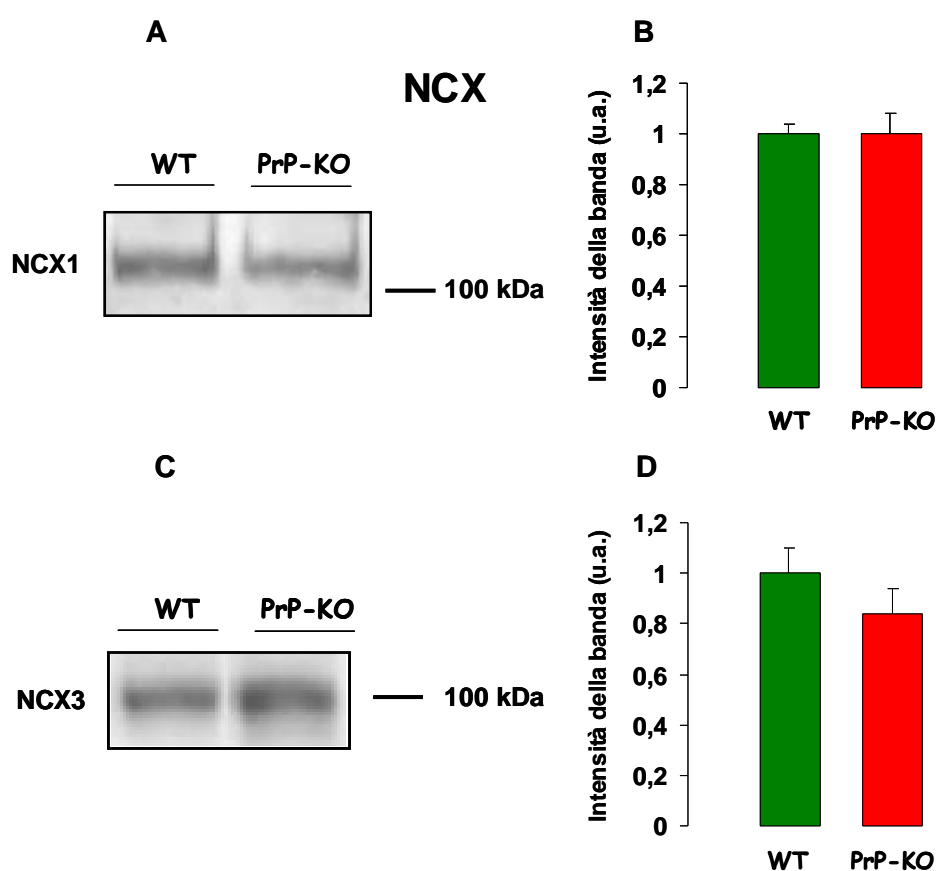


Figura 6. Espressione delle isoforme 1 e 3 dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} nelle CGC WT e PrP-KO (A) e (C) *Western blot* rappresentativo dell'isoforma 1 (A) e 3 (C) dello scambiatore NCX presenti in una frazione arricchita di proteine di membrane dei due diversi tipi di CGC raccolti dopo 96 ore di coltura *in vitro*. 30 μ g di proteine totali sono stati separati su SDS-PAGE (8% acrilammide), elettrotrasferiti su nitrocellulosa e trattati con un antisiero policlonale contro l'isoforma 1 (A) o l'isoforma 3 (C). (B) e (D) Istogramma dell'analisi densitometrica delle bande immunoreattive per l'isoforma 1 (WT: 1.00 ± 0.04 u.a., $n=10$; PrP-KO: 1.00 ± 0.08 u.a., $n=6$) (B) o 3 (WT: 1.0 ± 0.1 u.a., $n=13$; PrP-KO: 0.84 ± 0.1 u.a.,

n=8) (D), da cui si evince che non ci sono differenze significative nella loro espressione nei CGC WT e PrP-KO. I dati riportano le medie \pm ES.

Poiché è probabile che l'azione dell'NCX sia immediatamente successiva a, se non contemporanea con, l'entrata del Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare, questo risultato sta ad indicare che l'accumulo maggiore di Ca^{2+} rilevato nelle CGC PrP-KO dalla sonda mpAEQ non dipende da una presenza inferiore di NCX in questi neuroni rispetto ai WT. Parimenti seppure il ripristino delle condizioni basali sia considerevolmente ritardato nelle CGC PrP-KO rispetto alle WT, la cinetica della prima fase di discesa dopo il picco è simile in entrambi i tipi cellulari, a indicare che l'attività dell'NCX è paragonabile.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE POMPE PMCA E SERCA

Pompendo Ca^{2+} fuori dal citosol, anche la PMCA (la Ca^{2+} -ATPasi sita nella membrana plasmatica) contribuisce in maniera rilevante al ripristino e mantenimento dei livelli basali dello ione che la normale attività della cellula fa oscillare di continuo. Tuttavia, l'alta affinità per il Ca^{2+} e la bassa capacità rendono la PMCA particolarmente importante ai fini dell'estrusione quando i livelli citosolici di Ca^{2+} sono meno elevati di quelli necessari per il coinvolgimento dell'NCX. Pari è il ruolo della SERCA che, localizzata nella membrana del RE, estrude Ca^{2+} dal citosol pompendolo nel lumen del reticolo. Da notare che l'analisi dell'espressione di queste due pompe è stata condotta analogamente a quanto descritto per l'Orai e l'NCX. Come si può osservare nella Figura 8 A e B, l'espressione della PMCA è ridotta di ~20% nei neuroni PrP-KO rispetto ai neuroni WT. Tuttavia, i pannelli C e D mostrano che l'assenza di PrP^C provoca una diminuzione dell'espressione della SERCA che è ancora più marcata, i.e. di ~30%, rispetto al WT.

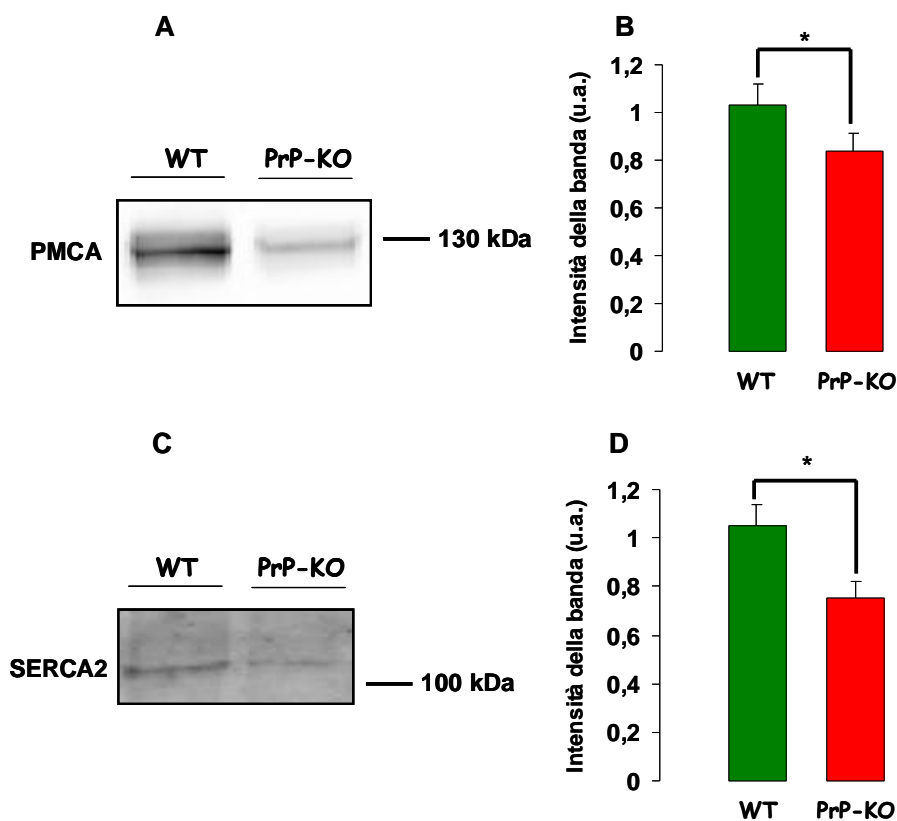


Figura 7. Espressione della PMCA e SERCA2 nelle CGC WT e PrP-KO

(A) (C) *Western blot* rappresentativo della PMCA (A) e SERCA (C) presenti in una frazione arricchita di proteine di membrane dei due diversi tipi di CGC raccolti dopo 96 ore di coltura *in vitro*. 10 (in A) e 50 (in C) μg di proteine totali sono stati separati su SDS-PAGE (8% acrilammide), elettrotrasferiti su nitrocellulosa e trattati (in A) con l'anticorpo monoclonale (5F10) diretto contro un epitopo presente in tutte le isoforme di PMCA; in (C) con l'anticorpo policlonale specifico (N19) per l'isoforma ubiquitaria SERCA2(b). (B) (D) Istogramma dell'analisi densitometrica delle bande reattive all'anticorpo anti-PMCA (B) o a quello contro la SERCA2, da cui si evince che il livello di espressione di PMCA (0.84 ± 0.07 u.a., $n=16$) e di SERCA2 (0.75 ± 0.06 u.a., $n=8$) è inferiore rispetto a quelli rilevati nelle cellule WT (PMCA: 1.03 ± 0.08 u.a., $n=16$; SERCA2: 1.05 ± 0.08 u.a., $n=8$). I dati riportano le medie \pm ES. [$*p < 0.01$, Student t-test]

Riguardo alla SERCA, è interessante notare che già nelle linee stabili CHO, trasfettate o meno con plasmidi per la PrP^C, si era osservato che l'espressione della pompa era regolata dalla PrP^C ([49] Brini et al., 2005). Comunque, la conseguenza più plausibile delle osservazioni sull'espressione della PMCA e SERCA, qui riportate, è che la minore attività delle pompe – conseguenti all'espressione inferiore in assenza della

PrP^C – contribuisca al, o sia la causa diretta del, fenotipo bifasico che le CGC PrP-KO mostrano nella regione sottostante la membrana plasmatica in condizioni di stato stazionario. Infine, considerandoli nella loro globalità, i risultati di *Western blotting* delle Figure 5 e 7 indicano – di nuovo per la prima volta in colture primarie neuronali - come la PrP^C sia in grado di modulare l'espressione di molti sistemi (canali e pompe) deputati all'omeostasi del Ca²⁺.

NEL LUMEN DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

La Figura 8 riporta i flussi di Ca²⁺ nel RE quali monitorati dalla sonda reAEQ localizzata nel lumen reticolare dei due tipi di neuroni sotto studio. Trattandosi del RE, il protocollo applicato è stato più complesso. Il RE, infatti, accumula grandi quantità di Ca²⁺, per cui la ricostituzione della sonda con il suo gruppo prostetico (celenterazina) necessita di particolari condizioni, in modo da evitare il consumo immediato dell'oloproteina. Ciò comporta, principalmente, una deplezione massiccia del Ca²⁺, mediante l'aggiunta di EGTA più concentrato che negli altri casi, e dello ionoforo ionomicina (per i dettagli vedi la sezione Materiali e Metodi), ma anche l'uso di un gruppo prostetico mutato la celenterazina n.

Come ampiamente osservato dalla letteratura, la perfusione delle cellule con 1 mM CaCl₂ determina l'immediato accumulo di Ca²⁺ nel lumen del RE, fino a raggiungere un livello di stato stazionario di [Ca²⁺]_{RE}, che dovrebbe mimare le condizioni fisiologiche di equilibrio. Tale stato stazionario è notevolmente inferiore (di ~30%) nelle CGC PrP-KO rispetto a quelle WT. Questo dato può essere spiegato dalla minore espressione della pompa SERCA nelle CGC PrP-KO, quale riportato nella Figura 7. A fronte di questi risultati, si è deciso di analizzare se la presenza della PrP^C fosse in grado di influenzare anche il rilascio del Ca²⁺ dal RE. Pertanto, dopo la fase di riempimento del RE, le cellule sono state perfuse con una soluzione priva di Ca²⁺ e contenente ATP, la cui azione sui recettori purinergici è accoppiata alla produzione di IP₃ e, di conseguenza, all'attivazione dei canali del RE IP₃-sensibili (recettore per l'IP₃, IP₃R). Al fine di analizzare al meglio il processo di svuotamento del RE mediato dall'IP₃R, nella soluzione di perfusione è stato incluso anche un inibitore della pompa SERCA, bloccando in tal modo questa via di rientro del Ca²⁺ verso il lumen del RE

(vedi legenda della Figura 9). Con questo protocollo, tuttavia, il processo di svuotamento del RE non ha mostrato alcuna dipendenza dall'espressione di PrP^C.

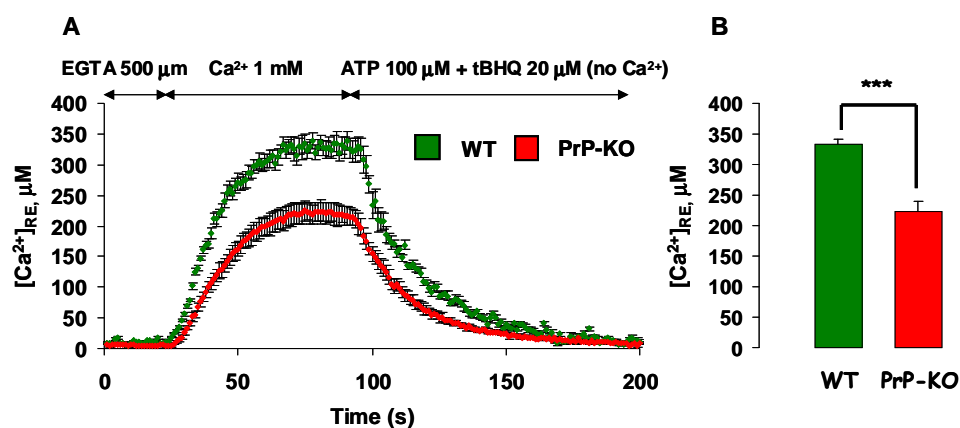


Figura 8. Flussi di Ca²⁺ nel lumen del reticolo endoplasmatico delle CGC WT e PrP-KO, monitorati dalla sonda reAEQ

(A) Le tracce descrivono l'andamento temporale della concentrazione di Ca²⁺ nel lumen del RE delle CGC esprimenti la sonda reAEQ, a seguito della perfusione delle cellule (precedentemente svuotate del Ca²⁺ del RE con EGTA 500 µM e ionomicina 5 µM) con 1 mM CaCl₂. Lo ione entra nel citosol attraverso i canali SOC e viene accumulato nel lumen del RE grazie all'attività della SERCA. Si può notare che, nella fase di riempimento del lumen, i neuroni PrP-KO raggiungono uno stato stazionario significativamente più basso rispetto al WT. La seconda parte della traccia è stata ottenuta perfondendo i CGC con il mezzo privo di Ca²⁺ ma contenente ATP 100 µM. Legandosi ai recettori purinergici, l'ATP provoca la formazione dell'InsP₃ che, agonista dei canali IP₃R del RE, promuove la fuoriuscita di Ca²⁺ dal lumen. Tuttavia, onde evitare la "bruciatura" del gruppo prostetico della sonda, l'uscita dello ione è stato accelerato dall'aggiunta di un inibitore della SERCA (tBHQ, 20 µM). Come evidente, la presenza o l'assenza della PrPC non influenza la cinetica di rilascio di Ca²⁺. Ogni punto sperimentale riporta un valore medio ± ES. (B) L'istogramma riporta il valore del plateau di riempimento del Ca²⁺ raggiunto nelle CGC PrP-KO (223.86 ± 16.05 µM, n=7) e WT (333.40 ± 8.93 µM, n=8). I dati rappresentano le medie ± ES [***p<0.001, Student t-test]

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA CALRETICULINA E DELL'IP₃R

Seppure sia plausibile che l'inferiore capacità totale di pompaggio della SERCA nei CGC PrP-KO contribuisca al minore accumulo di Ca²⁺ in queste cellule (Figura 8 C, D), abbiamo analizzato (tramite *Western blot*.) l'espressione di altre proteine reticolari

coinvolte nell'omeostasi dello ione, onde verificare l'eventuale loro coinvolgimento nelle differenze osservate fra i due ceppi. Fra le tante, abbiamo considerato la calreticolina, la più importante proteina tra quelle che agiscono da *buffer* del Ca^{2+} nel lume del RE dei neuroni, e il recettore-canale IP_3R . Questi canali, infatti, possono essere transientemente aperti anche in assenza del loro agonista, e contribuire allo stato stazionario della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. Per saggiare l'espressione dell' IP_3R si è adoperato un anticorpo contro l'isoforma 1, la più espressa nei neuroni, ma risultati analoghi sono stati ottenuti con un anticorpo che riconosce tutte le isoforme del recettore (dati non riportati). Il confronto dei CGC WT e PrP-KO, riportato in Figura 9 non ha evidenziato, tuttavia, differenze statisticamente significative fra i CGC WT e PrP-KO sia per l'espressione della calreticolina (A, B) sia per quella dell' IP_3R (C, D).

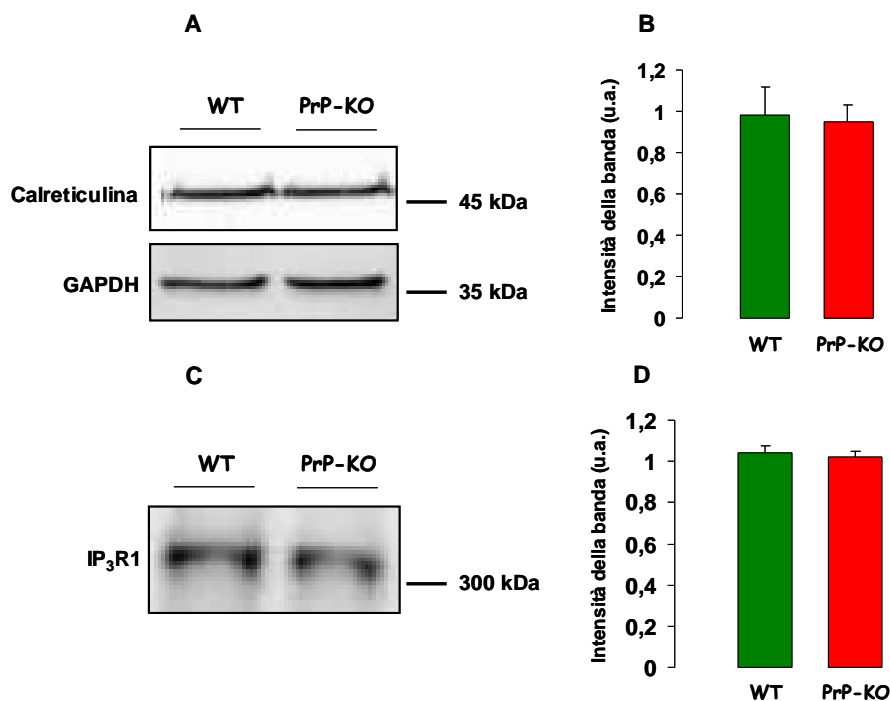


Figura 9. Espressione della calreticulina e dell'isoforma I del IP_3R nelle CGC WT e PrP-KO

(A) Livelli di espressione della calreticulina valutati mediante *Western blot* su lisati di CGC raccolte dopo 5 giorni di coltura *in vitro*. 15 μg totali di proteine solubili sono state separate tramite SDS-PAGE (12% acrilammide) e trasferite su membrana di nitrocellulosa per l'immunorivelazione con l'anticorpo specifico contro la calreticulina (SPA600). (B) Analisi densitometrica delle bande immunoreattive di calreticulina, condotta confrontandone l'intensità con quelle di uno standard interno (GAPDH, rivelato con l'anticorpo MAB374). L'istogramma non mostra differenze statisticamente significative per l'espressione di

calreticolina nei CGC WT e PrP-KO (WT: 0.98 ± 0.14 a.u., $n=3$; PrP-KO: 0.95 ± 0.08 a.u., $n=3$). I dati sono le medie \pm ES. (C) Livelli di espressione dell'IP₃R valutati mediante *Western blot* su preparati purificati di membrane di CGC raccolti dopo 5 giorni di coltura *in vitro*. 30 μ g di proteine totali sono state separate su gradiente di gel (4-12% acrilammide), elettrotrasferite su membrana di PVDF ed infine trattate con l'anticorpo contro l'isoforma 1 dell'IP₃R. (D) L'istogramma riporta l'analisi densitometrica nella quale ogni banda immunoreattiva è stata normalizzata al contenuto totale di proteine. Anche per questa proteina, i dati non mostrano differenze statisticamente significative nei CGC WT e PrP-KO (WT: 1.04 ± 0.04 a.u., $n=7$; PrP-KO: 1.02 ± 0.03 a.u., $n=7$). I dati sono le medie \pm ES.

NELLA MATRICE MITOCONDRIALE

Il mitocondrio è in grado di accumulare Ca²⁺ attraverso due vie: mediante l'ingresso di Ca²⁺ citosolico, e ad opera del Ca²⁺ presente nel lumen del RE, quando ne venga stimolato lo svuotamento, in virtù dello stretto accoppiamento spaziale e funzionale fra l'IP₃R del RE e l'uniporco mitocondriale per lo ione ([60]Rizzuto et al., 1998).

L'analisi dei movimenti di Ca²⁺ nel mitocondrio è stata condotta usando come sonda l'equorina mtAEQ, indirizzata alla matrice dell'organello, ed applicando, dapprima, lo stesso protocollo già usato per evidenziare i movimenti dello ione nei domini sottostanti la membrana plasmatica. Tale protocollo porta all'attivazione dei canali SOC, e il Ca²⁺ che entra si accumula nel citosol e da qui nel mitocondrio a favore di gradiente elettrochimico. Pertanto, l'entrata di Ca²⁺ dall'ambiente extracellulare si traduce in un aumento di Ca²⁺ mitocondriale in forma transiente, in quanto lo ione viene poi rapidamente estruso dalla matrice, mediante i trasportatori posti sulla membrana interna, ristabilendo così il livello basale dello ione nell'organello. In queste condizioni, il transiente mitocondriale di Ca²⁺ è considerevolmente superiore (di ~30%) nei neuroni PrP-KO rispetto alla controparte WT (Figura 10, A, B).

Nella Figura 10 (pannelli C e D) sono anche descritti i flussi mitocondriali di Ca²⁺ quando le stesse cellule, ripristinato nel mitocondrio il livello basale di Ca²⁺, vengono perfuse con ATP e l'inibitore (tBHQ) della SERCA. Come illustrato in precedenza, questo protocollo stimola la rapida fuoriuscita di Ca²⁺ dal RE (vedi Figura 8) e, di conseguenza, evoca un secondo transiente di Ca²⁺ nella matrice dell'organello. Anche in questo caso, l'aumento transiente di Ca²⁺ nella matrice mitocondriale è significativamente maggiore (di ~35%) nelle CGC PrP-KO a quelle WT.

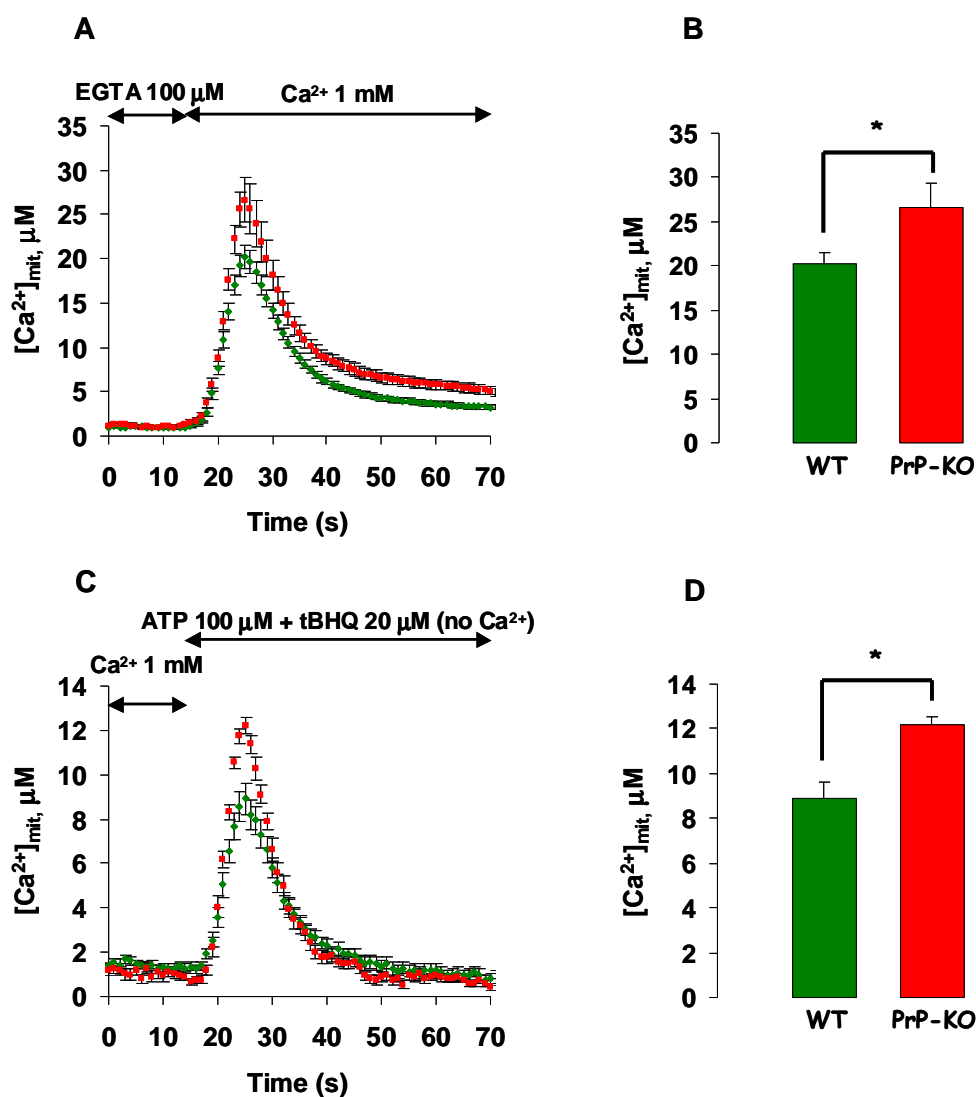


Figura 10. Flussi di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale dei CGC WT e PrP-KO, monitorati dalla sonda mitAEQ, a seguito dell'apertura dei canali SOC (A, B) o dei recettori-canale IP_3R (C, D)

(A) Le tracce rappresentano la media dell'andamento temporale della concentrazione di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale delle CGC, usati dopo 96 ore di coltura *in vitro*. I neuroni, precedentemente svuotati del Ca^{2+} del RE, sono stati perfusi con 1 mM CaCl_2 che entra nel citosol grazie all'attivazione dei SOC, e poi nel mitocondrio a seguito dell'attività dell'uniporco (B) Il diagramma a barre riporta il valore di picco raggiunto dal Ca^{2+} nella matrice dell'organello, che è superiore nei CGC PrP-KO ($26.62 \pm 2.77 \mu\text{M}$, $n=27$) rispetto ai WT ($20.26 \pm 1.34 \mu\text{M}$, $n=33$). I dati rappresentano le medie \pm ES. [$*p < 0.01$, Student t-test]

(C) Le tracce rappresentano la media dell'andamento temporale della concentrazione di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale delle CGC WT e PrP-KO, dapprima trattate come descritto per (A) e, poi, terminato l'efflusso dello ione dal mitocondrio, con l'inibitore tBHQ ($20 \mu\text{M}$)

della SERCA e ATP (100 μM). Quest'ultimo provoca lo svuotamento del Ca^{2+} dal lume del RE e, di conseguenza, l'entrata dello ione nella matrice del mitocondrio. Come nell'esperimento riportato in (A), anche in questo caso l'assenza della PrP^C induce un accumulo di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale maggiore che quando la proteina è presente nei neuroni. (D) Il diagramma a barre riporta il valore di picco del Ca^{2+} nella matrice dell'organello che nei neuroni PrP-KO è maggiore di circa 35% rispetto ai neuroni WT (PrP-KO: $12.20 \pm 0.35 \mu\text{M}$, n=10; CGC PrP-WT: $8.91 \pm 0.71 \mu\text{M}$, n=15). I dati rappresentano le medie \pm ES. [*p<0.01, Student t-test]

Nel loro insieme, i dati della Figura 10 suggeriscono che PrP^C sia in grado di limitare l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} nella matrice del mitocondrio, indipendentemente dalla provenienza dello ione (dal citosol o dal lumen del RE). E dunque, alla luce del ruolo molto delicato giocato dal Ca^{2+} mitocondriale nei confronti della vita della cellula, questi dati confermano la presunta attività benefica attribuita alla PrP^C.

MISURA DEI FLUSSI DI Ca^{2+} IN CGC DERIVATI DA INCROCI SPECIFICI DEI TOPI *INBRED*

Nonostante i ceppi originali WT e KO da noi utilizzati fossero congenici con *background* FVB, non è possibile escludere che variazioni genetiche occorse nel tempo nei ceppi *inbred* siano causa di fenotipi particolari (Steele et al., 2007), soprattutto rispetto ad un parametro così sensibile come l'omeostasi del Ca^{2+} . Per questa ragione, l'analisi dell'influenza della PrP^C sui movimenti locali di Ca^{2+} ha compreso anche colture di CGC derivate da *littermates* PrP^{+/+} e PrP^{-/-} che, originati incrociando eterozigoti PrP^{+/-}, ottenuti a loro volta da topi *inbred* PrP^{+/+} e PrP^{-/-}, assicuravano una migliore identità genetica. È da notare, inoltre, che le colture primarie di CGC di questi topi sono state preparate e coltivate come nel caso dei ceppi *inbred*, e che anche i protocolli di stimolazione per i movimenti del Ca^{2+} sono stati gli stessi.

Come riportato nelle Figure 12-14, questo studio ha dimostrato che i flussi di Ca^{2+} nei domini citosolici della membrana plasmatica, nel lumen del RE e nella matrice mitocondriale sono analoghi a quelli osservati nei ceppi *inbred*.

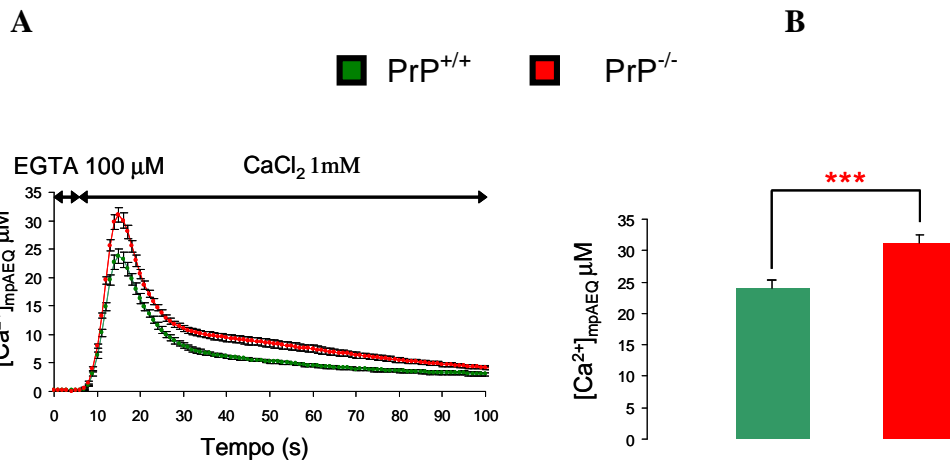


Figura 11. Flussi di Ca^{2+} nei domini citosolici della membrana plasmatica di CGC $PrP^{+/+}$ e $PrP^{-/-}$ (derivati incrociando topi $PrP^{+/-}$), monitorati dalla sonda mpAEQ
 (A) e (B) sono stati ottenuti applicando lo stesso protocollo descritto nella legenda della Figura 4. Anche in questo caso, l'assenza di PrP^C determina: 1), un valore di picco di riempimento dei domini e 2), un valore del livello basale, superiori rispettivamente di ~30 e ~50 % rispetto ai CGC $PrP^{+/+}$. Le tracce in (A) sono la media di 18 (per i neuroni $PrP^{+/+}$) e 24 tracce per quelli $PrP^{-/-}$. I dati riportati in (B) sono le medie \pm E.S. [*** $p < 0.001$, Student t-test]

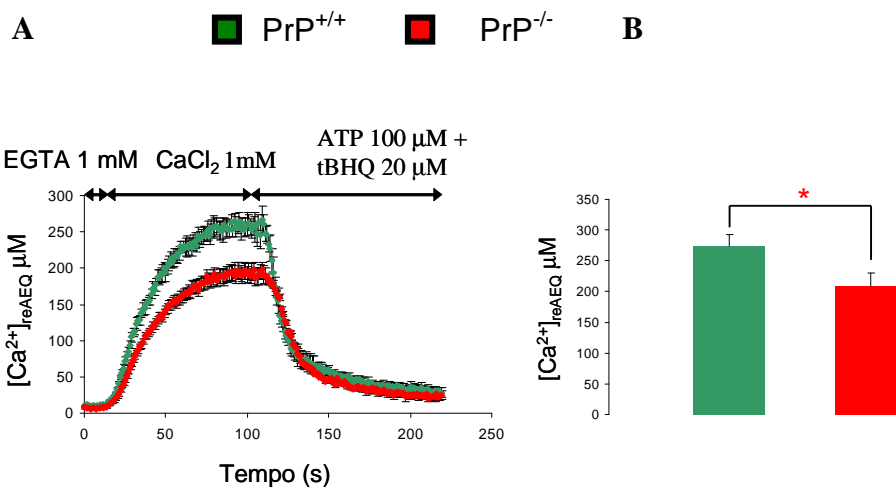


Figura 12. Flussi di Ca^{2+} nel lumen del reticolo endoplasmatico di CGC $PrP^{+/+}$ e $PrP^{-/-}$ (derivati incrociando topi $PrP^{+/-}$), monitorati dalla sonda reAEQ
 (A) e (B) sono stati ottenuti applicando lo stesso protocollo descritto nella legenda della Figura 9. Anche in questo caso, l'assenza di PrP^C determina: 1), un valore di picco di riempimento del lumen del RE che nei CGC $PrP^{-/-}$ è di ~23% inferiore rispetto ai CGC $PrP^{+/+}$; 2) la stessa cinetica di svuotamento nei due tipi di neuroni. Le tracce in (A) sono la media di 6 (per i neuroni $PrP^{+/+}$) e 7 (per quelli $PrP^{-/-}$) tracce. I dati riportati in (B) sono le medie \pm E.S. [* $p < 0.05$, Student t-test]

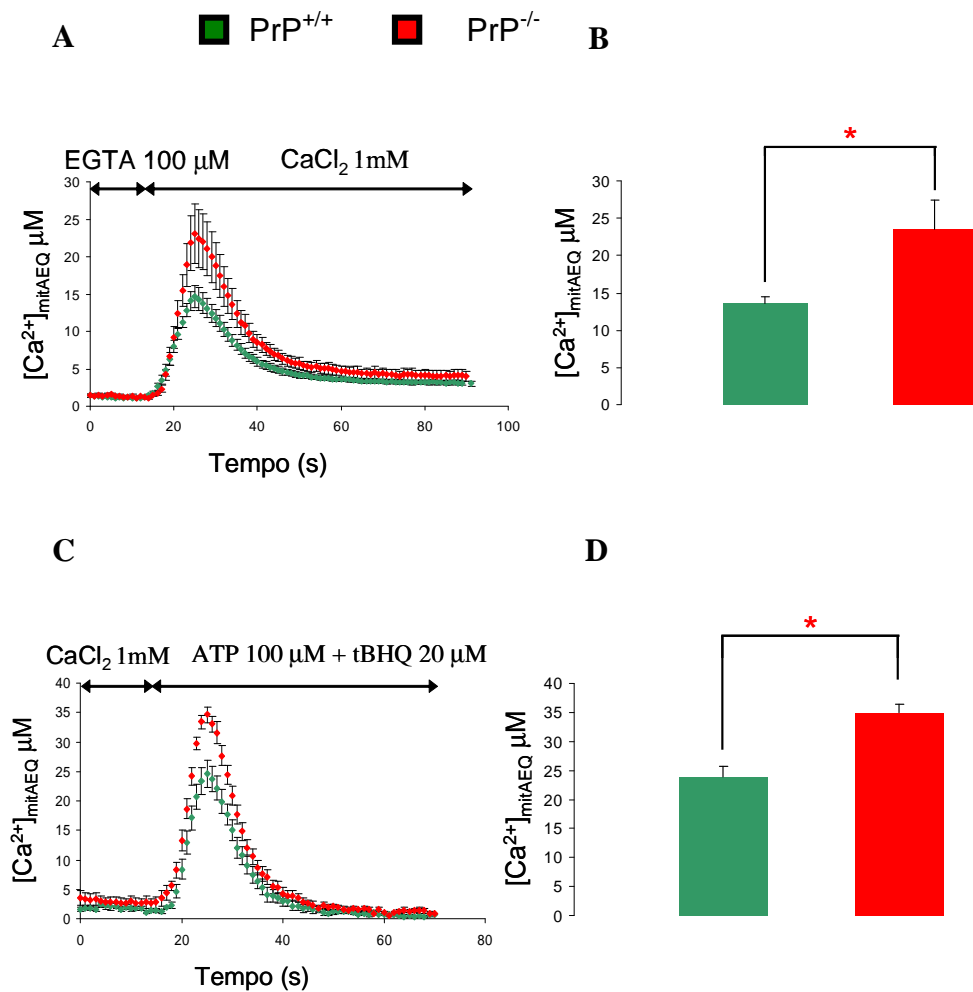


Figura 13. Flussi di Ca²⁺ nella matrice mitocondriale dei CGC PrP^{+/+} e PrP^{-/-} (derivati incrociando topi PrP^{+/-}), monitorati dalla sonda mitAEQ, a seguito dell'apertura dei canali SOC (A,B), o dei recettore-canali IP₃R (C,D)

(A), (B) e (C), (D) sono stati ottenuti applicando lo stesso protocollo descritto rispettivamente nella legenda della Figura 10(A,B) e (C,D). Anche in questi casi, l'assenza di PrP^C determina sempre un valore di picco di riempimento della matrice mitocondriale che nei CGC PrP^{-/-} è di ~60% superiore rispetto ai CGC PrP^{+/+}. Le tracce in (A) e (C) sono la media rispettivamente di 19/11 (per i neuroni PrP^{+/+}) e 12/8 (per quelli PrP^{-/-}) tracce. I dati riportati in (B) e (D) sono le medie ± E.S. [*p<0.05%, Student t-test]

ANALISI DI ESPRESSIONE DELLA CALCINEURINA

L'importanza riguardo lo studio del pattern di espressione di questa proteina deriva dalla necessità di capire i transienti osservati utilizzando la sonda equorina indirizzata alla membrana plasmatica. In aggiunta, recenti evidenze sperimentali hanno evidenziato che PrP^C può influenzare il controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ sia in condizioni fisiologiche (Herms et al., 2000), sia durante l'insorgenza della patologia, quando cioè la proteina risulta mutata conformazionalmente (Ferreiro et al., 2008).

La proteina fosfatasi calcineurina (PP2B) è una Ser/Thr fosfatasi regolata dal complesso Ca²⁺-calmodulina, coinvolta in un'ampia varietà di fenomeni fisiologici tra i quali: l'attivazione linfocitaria, lo sviluppo muscolare e neuronale.

In particolare essa regola, tramite defosforilazione, numerosi fattori di trascrizione coinvolti nell'espressione di geni che codificano per canali e trasportatori del Ca²⁺ tra i quali la PMCA, l'NCX e il recettore dell'IP₃ (Carafoli et al., 1999). In vitro, questa funzione viene esplicitata durante le 96 ore di coltura dei CGC a causa delle condizioni parzialmente depolarizzanti nelle quali sono mantenute queste cellule (KCl 25 mM, vedi Colture cellulari di granuli del cervelletto in Materiali e Metodi).

Poiché i dati precedenti mostrano una minore espressione della Ca²⁺-ATPasi da parte dei CGC PrP-KO, è stato ritenuto opportuno valutare se tale alterazione sia imputabile ad una diversa espressione della fosfatasi 2B. Per questo motivo è stato analizzato tramite Western blot il livello di espressione della subunità catalitica A della calcineurina nei CGC WT e PrP-KO.

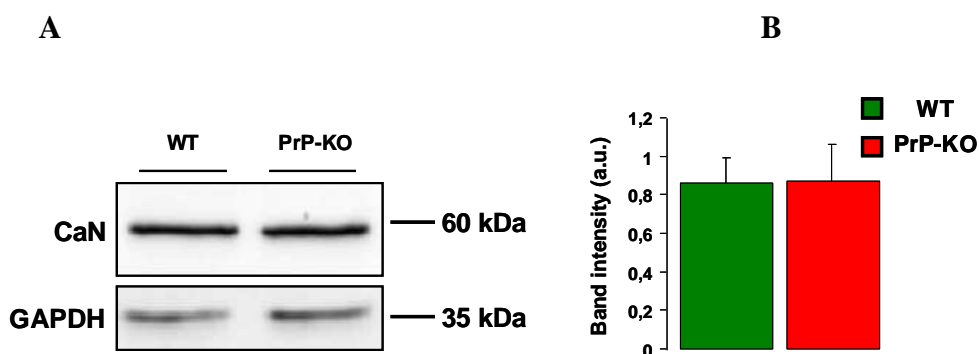


Figura 14. Espressione della calcineurina A nei CGC.

(A) 10 µg di lisati cellulari totali di CGC raccolti a 96 ore dalla semina, separati elettroforeticamente (SDS-PAGE, 12%acrilammide), elettrotrasferiti su nitrocellulosa ed

immunorivelati con anticorpo monoclonale specifico contro la calcineurina. Il Western blot anti-GAPDH è mostrato come controllo del caricamento.

(B) L'istogramma, che rappresenta l'analisi densitometrica normalizzata al contenuto di GAPDH, mostra che non vi sono differenze statisticamente significative nell'espressione della calcineurina A nei CGC WT (0.86 ± 0.13 a.u., n=9) e PrP-KO (0.87 ± 0.19 a.u., n=9). I dati riportati sono le medie \pm ES.

L'analisi ha dimostrato che non vi sono differenze per quanto riguarda l'espressione della calcineurina A.

Il risultato ottenuto indica che la minore espressione della PMCA in CGC PrP-KO non è da imputare ad una diversa espressione della calcineurina. Sarà comunque opportuno valutare, in futuro, se nelle condizioni di coltura delle cellule in ambiente parzialmente depolarizzante, essa presenti una ridotta attività nei PrP-KO.

DISCUSSIONE

Un insieme di evidenze sperimentali, ridondanti e spesso confuse, ottenute su modelli cellulari ed animali geneticamente modificati, ha paradossalmente ostacolato, fino ad oggi, la comprensione del reale significato fisiologico della PrP^C. Infatti, alla proteina sono state ascritte molte possibili funzioni, talvolta contrastanti tra loro. Una possibilità ragionevole è che la proteina partecipi a complessi di trasduzione del segnale sulla superficie cellulare, interagendo con partner funzionali diversi, ed influenzando diverse vie di segnalazione a seconda del tipo e dello stato della cellula (Sorgato et al., 2009). L'ipotesi che ha ispirato questo lavoro è che il fattore comune dei molteplici aspetti di PrP^C possa essere lo ione Ca²⁺, il secondo messaggero in grado di controllare, così come PrP^C, un gran numero di processi fisiologici. Nominandone solo alcuni, il Ca²⁺ è infatti coinvolto in fenomeni che vanno dalla trasmissione e plasticità sinaptica, alla contrazione muscolare, alla trascrizione genica. Di conseguenza, quando la regolazione molto fine dell'omeostasi del Ca²⁺ viene irrimediabilmente compromessa, le conseguenze per la cellula sono disastrose, e spesso la portano la morte. Non a caso, il dismetabolismo dello ione potrebbe essere una causa principale di molte malattie neurodegenerative (Mattson, 1998). A supporto dell'ipotesi di questo lavoro, si sono ormai accumulate parecchie evidenze su modifiche rilevanti nel controllo del Ca²⁺, ricavate da modelli PrP-KO o infettati da prioni (per una rassegna, si veda Sorgato and Bertoli, 2009 BBRC). Inoltre, studi, effettuati in passato nel laboratorio sede di questa tesi, hanno dimostrato alterazioni significative dei flussi locali dello ione in diversi compartimenti cellulari della linea cellulare immortalizzata CHO, a seguito della sovra-espressione ectopica di PrP^C (Brini et al., 2005).

Nel tentativo di confermare ed ampliare tali risultati, in questo lavoro sono stati confrontati - in colture primarie di cellule granulari del cervelletto (CGC) derivate da topi WT e PrP-KO - i movimenti di Ca²⁺ nei domini citosolici sottostanti la membrana plasmatica, nel lume del reticolo endoplasmatico e nella matrice mitocondriale. Nelle stesse cellule sono anche stati anche comparati i livelli di espressione di una serie di proteine coinvolte nel metabolismo dello ione. I risultati emersi hanno evidenziato delle differenze, in alcuni casi molto accentuate, nei neuroni privi di PrP^C rispetto a quelli WT. Le informazioni ottenute sono di notevole

importanza in quanto, a differenza delle linee cellulari stabilizzate, i neuroni primari derivati dall'organo non contengono alcuna alterazione genica in grado di generare un fenotipo proliferativo, e sono inoltre capaci di ripercorrere, *in vitro*, quasi tutte le tappe di differenziamento che si attuano *in vivo*, costituendo, pertanto, un modello più appropriato in cui studiare l'effetto fisiologico di PrP^C. Va inoltre ricordato che il cervelletto è la sede di maggior espressione della PrP^C, e risulta essere un tessuto bersaglio nelle malattie da prione.

Un aspetto di questo lavoro degno di nota consiste nell'aver riprodotto i dati dei flussi locali di Ca²⁺ su due modelli di coltura primaria di CGC, uno ottenuto dai ceppi WT e PrP-KO *inbred*, l'altro derivato dall'incrocio degli eterozigoti PrP^{+/-}. Infatti, come già ricordato, i ceppi originali WT e KO da noi utilizzati sono congenici con background FVB. Tuttavia, non è possibile escludere che un *drift* genetico occorso nel tempo nei ceppi *inbred* abbia causato fenotipi particolari (Steele et al., 2007), soprattutto rispetto ad un parametro così sensibile come l'omeostasi del Ca²⁺. Pertanto, il fatto che le differenze tra WT e KO dei ceppi *inbred* siano state riscontrate anche nelle colture neuronali ricavate da *littermates* PrP^{+/+} e PrP^{-/-}, riducono al minimo l'eventualità che i dati ottenuti siano la conseguenza di un epifenomeno.

Indubbiamente, le differenze più eclatanti dovute alla presenza, o all'assenza, di PrP^C, sono quelle registrate nei domini adiacenti la membrana plasmatica, ove, a seguito dell'ingresso di Ca²⁺ mediato dallo svuotamento delle riserve intracellulari, il transiente di accumulo dello ione è drammaticamente più alto e prolungato nelle CGC PrP-KO rispetto ai neuroni WT. Il transiente risulta dalla sovrapposizione dei processi, temporalmente coordinati, di influsso e fuoriuscita di Ca²⁺. Nelle condizioni sperimentali utilizzate, il primo evento è mediato quasi completamente dai SOC. Abbiamo infatti dimostrato che l'influsso capacitativo di Ca²⁺ nelle CGC viene fortemente ridotto dall'aggiunta di cationi trivalenti (ad es. La³⁺) che bloccano questa via di entrata. Recentemente è stata fatta chiarezza sull'identità molecolare dei SOC, costituiti da un sensore della concentrazione di Ca²⁺ del lume del RE, la proteina trans-membrana del RE, STIM, accoppiato - mediante interazione fisica - ad un canale al Ca²⁺ della membrana plasmatica il cui poro è foderato dalla proteina multimerica Orai (Gwack et al., 2007). I nostri risultati indicano, sorprendentemente, che l'espressione dell'isoforma 2 di Orai (quella principalmente presente nei neuroni)

è significativamente ridotta nelle CGC PrP-KO rispetto ai neuroni che esprimono PrP^C. Di conseguenza, il transiente elevato di Ca²⁺ osservato nei domini sotto la membrana plasmatica dei neuroni PrP-KO non sembra essere giustificato da una maggiore espressione di questo sistema di influsso. Si potrebbe, in realtà, postulare che l'espressione di Orai-2 sia ridondante rispetto a STIM, e che sia pertanto quest'ultima a determinare l'efficienza complessiva del sistema. Sarà pertanto doveroso, in futuro, confrontare l'espressione di STIM in neuroni PrP-KO e WT, o verificare se, in assenza di PrP^C, la regolazione e/o l'attività di questi canali siano alterate (ad es. con un aumento della conduttanza e della probabilità di apertura in determinate condizioni).

Il ripristino del livello basale di Ca²⁺ dei domini della membrana plasmatica – e, di conseguenza del citosol – è operato dall'azione concertata dello scambiatore NCX e delle pompe PMCA e SERCA, che estrudono lo ione nell'ambiente extra-cellulare e nel lume del RE. In particolare, si può assumere che durante la fase culminante del transiente Ca²⁺ tutti questi sistemi lavorino a pieno regime, nonostante il contributo predominante dello scambiatore che dimostra alta capacità, ma bassa affinità, per lo ione. I nostri risultati indicano che i livelli di espressione delle due isoforme neuronali di scambiatore (NCX1 e NCX3) non variano in funzione della presenza, o assenza, di PrP^C. Al contrario, si osserva una significativa riduzione nell'espressione sia della pompa PMCA (di cui abbiamo la stima globale di tutte le isoforme) che della pompa SERCA (di cui abbiamo testato l'isoforma 2 neuronale) nelle CGC PrP-KO rispetto ai WT. Tale osservazione potrebbe giustificare, almeno in parte, l'aumento e la persistenza del transiente di Ca²⁺ nelle cellule prive di PrP^C. Inoltre, essendo entrambe meccanismi di trasporto del Ca²⁺ a bassa capacità, ma ad alta affinità, la PMCA e la SERCA contribuiscono in modo fondamentale al corretto mantenimento della concentrazione citosolica di riposo di Ca²⁺. Di conseguenza, una minore espressione di queste pompe, e quindi un aumento – anche lieve – del livello basale di Ca²⁺ nel citosol, potrebbe giustificare tutte quelle osservazioni sperimentali che riportano un aumento dell'eccitabilità in neuroni privi PrP^C (Sorgato and Bertoli, 2009 BBRC).

Nel considerare un possibile effetto indiretto della PrP^C sull'espressione della PMCA, si è analizzata l'espressione della fosfatasi Ca²⁺-dipendente calcineurina che opera come regolatore della trascrizione. È risaputo, infatti, che essa svolge, durante il

differenziamento di neuroni *in vivo* e *in vitro*, un ruolo fondamentale nell'espressione delle diverse isoforme di PMCA (e di NCX) (Carafoli et al., 1999). Nessuna differenza significativa è stata trovata nei livelli di calcineurina dei due tipi di neuroni. Tuttavia, l'assenza di PrP^C potrebbe essere collegata a specifici livelli di Ca²⁺ presenti nel citosol dei due tipi di neuroni durante gli stadi di maturazione che, in questa fase, sono tenuti in condizioni depolarizzanti per l'aggiunta nel mezzo di K⁺ 25 mM. Pur se quest'aspetto non è stato affrontato nel lavoro di tesi, non si può escludere che nelle fasi precedenti agli esperimenti una minore entrata di Ca²⁺ nelle cellule PrP-KO si sia tradotta in una diminuita attività della calcineurina che, di conseguenza, ha portato a una diminuzione della trascrizione genica. L'eventuale coinvolgimento di questo meccanismo nel controllo dei livelli cellulari di PMCA nelle CGC con diverso genotipo per PrP^C dovrà essere comunque valutato più approfonditamente, mediante saggi di attività specifici per la calcineurina da effettuarsi a tempi diversi di maturazione *in vitro* dei neuroni.

Di particolare rilevanza è l'osservazione che anche i livelli di SERCA, in particolare dell'isoforma 2, sono più bassi nei neuroni privi di PrP^C. Questo risultato è in linea con l'aumento di questa isoforma già osservato in cellule CHO in seguito alla sovra-espressione ectopica di PrP^C (Ref Brini et al, 2005). La minore espressione di SERCA2 potrebbe giustificare la riduzione nell'accumulo di Ca²⁺ nel lume del RE registrato nelle CGC PrP-KO rispetto alle cellule WT, dato, quest'ultimo, anch'esso in linea con i precedenti studi nelle cellule CHO, ma in contrasto con l'ipotesi di una maggiore attività della SERCA in assenza di PrP^C che è stata suggerita da osservazioni su neuroni ippocampali CA1 (Powell et al., 2008). Alla riduzione del Ca²⁺ reticolare in assenza di PrP^C non sembra contribuire la calreticulina, una proteina che agisce come buffer del Ca²⁺ nel lume del RE, i cui livelli di espressione sono invariati fra CGC PrP-KO e WT. Né si sono osservate differenze nel processo di svuotamento del RE dei due tipi di neuroni, a seguito della stimolazione con ATP che porta alla produzione di IP₃ nel citosol. Questo risultato è in accordo con i livelli di espressione dell'isoforma neuronale del recettore per l'IP₃ (IP₃R), che non appaiono significativamente modificati nei neuroni PrP-KO rispetto ai WT.

Oltre a modulare in qualche modo l'espressione dei sistemi di trasporto del Ca²⁺, PrP^C potrebbe anche modularne l'attività mediante interazioni dirette o indirette. Va ricordato che PrP^C è localizzata sulla superficie della membrana plasmatica, ma si

trova anche, come proteina di secrezione, legata alla membrana del RE. Fino ad oggi, sono stati identificati oltre 40 putativi partner della proteina (Aguzzi et al., 2008). La proteina quindi, potrebbe influenzare uno o più di questi meccanismi di ingresso ed uscita del Ca^{2+} attraverso un'interazione funzionale. E' noto, per esempio, che la PMCA è localizzata ad alta concentrazione nelle caveole (Guerini et al., 2005) dove risiede anche la PrP^C (Massimino et al., 2002). In questo contesto, va ricordato che la PrP^C sembra limitare l'attività del recettore NMDA per il glutammato mediante un'interazione fisica diretta con la subunità 2D del recettore (Khosravani et al., 2008). Cambiamenti nel controllo dei flussi Ca^{2+} possono giustificare non solo l'alterata eccitabilità ed alcune disfunzioni sinaptiche riportate in neuroni PrP-KO o in modelli di infezione da prioni, ma potrebbero anche spiegare il presunto ruolo anti-apoptotico ascrivito a PrP^C da numerose evidenze sperimentali (REFS). È ben noto che un sovraccarico intracellulare di Ca^{2+} è in grado di scatenare processi apoptotici, e questo è vero non soltanto per i livelli citosolici dello ione, ma anche, in particolare, per le concentrazioni di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale. Un accumulo di Ca^{2+} nell'organello può, infatti, portare alla cosiddetta transizione di permeabilità (Lemasters et al., 2009), con conseguente perdita dell'integrità mitocondriale e rilascio di fattori pro-apoptotici dall'organello (Li et al., 1997). Per questo motivo abbiamo analizzato le variazioni transienti di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale, evocate da due diversi protocolli che stimolassero l'ingresso capacitativo di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare o il rilascio dello ione dal RE. In entrambi i casi si è osservato che i picchi di Ca^{2+} nella matrice sono più elevati nei neuroni PrP-KO rispetto alla controparte WT. Nel primo caso, il fenomeno è facilmente interpretabile in virtù dei transienti più alti che si osservano nelle regioni adiacenti alla membrana plasmatica in assenza di PrP^C. Il secondo protocollo di stimolazione ha previsto, invece, l'ingresso di Ca^{2+} nel mitocondrio a seguito del suo rilascio dal RE, grazie alla contiguità spaziale fra RE e mitocondrio (Rizzuto et al., 1998). In questo caso, il risultato non è – al momento – facilmente razionalizzabile, dato che le CGC PrP-KO mostrano valori di Ca^{2+} reticolare più bassi, ed uguali cinetiche di svuotamento del RE, rispetto ai neuroni WT. Questi risultati sono comunque consistenti con un ruolo della PrP^C finalizzato a contenere la concentrazione dello ione nel mitocondrio ed a antagonizzare, così, gli stimoli apoptotici.

In conclusione, è stato dimostrato che la presenza, o assenza, della PrP^C è in grado di modulare l'espressione di alcune proteine deputate al controllo dell'omeostasi cellulare del Ca²⁺, e che questo si riflette in alterazioni, anche drammatiche, nei flussi locali dello ione in alcuni domini/compartimenti cellulari. Un ruolo fisiologico ascrivito a PrP^C suggerisce la sua partecipazione a processi di trasduzione del segnale a livello della membrana plasmatica. Sono stati identificati, infatti, numerosi possibili partner funzionali di PrP^C sulla superficie cellulare, ed alcune delle vie di segnalazione influenzate dalla presenza, o assenza, della proteina (Linden et al., 2008; Sorgato et al., 2009). Poiché alcune di queste vie sono in grado di controllare anche l'espressione genica, un'ipotesi interessante è che il processo di segnalazione mediato da PrP^C influenzi la trascrizione genica di un certo numero di proteine, tra le quali alcune coinvolte nel controllo del segnale Ca²⁺.

A tal proposito è necessario ricordare che il protocollo ottimale per la maturazione e la sopravvivenza a lungo termine delle CGC in coltura, prevede l'impiego di concentrazioni non fisiologiche di K⁺ (25 mM). E' stato ipotizzato che questo trattamento depolarizzante serva a mimare *in vitro* l'effetto *in vivo* di una prima innervazione dei granuli da parte di neuroni glutammatergici. Nonostante una depolarizzazione transiente induca un aumento temporaneo di Ca²⁺ citosolico, seguita da un rapido ritorno ai livelli basali, una depolarizzazione cronica mantiene la concentrazione basale di Ca²⁺ persistentemente più elevata (2-3 volte maggiore rispetto alle condizioni fisiologiche) (REF?). Dato che il Ca²⁺ è un importante elemento di controllo dell'espressione genica, questo fenomeno provoca cambiamenti nell'espressione di diversi geni collegati al Ca²⁺ stesso: PMCA2, PMCA3 e IP₃R vengono fortemente sovra-regolati, mentre PMCA4 e NCX2 sono velocemente sotto-regolati (Carafoli et al., 1999). Quindi il fatto che la PMCA - ma anche altre proteine coinvolte nel controllo dello ione - sia espressa in misura minore nei CGC PrP-KO, rispetto ai neuroni WT, potrebbe essere un'ulteriore conferma di come questa proteina abbia un ruolo importante nell'omeostasi del Ca²⁺.

BIBLIOGRAFIA

- Aguzzi,A., Baumann,F. and Bremer,J. (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.*, **31**, 439-477.
- Alper,T., Cramp,W.A., Haig,D.A. and Clarke,M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.
- Alper,T., Haig,D.A. and Clarke,M.C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 278-284.
- Arundine,M., Tymianski,M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, **34**, 325-337.
- Baba,H., Hayashi,K., Fujii,Y., Mizushima,A., Watarai,H., Wakamori,M., Numaga,T., Mori,Y., Iino,M., Hikida,M. and Kurosaki,T. (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16704-16709.
- Basler,K., Oesch,B., Scott,M., Westaway,D., Walchli,M., Groth,D.F., McKinley,M.P., Prusiner,S.B. and Weissmann,C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428.
- Baysal,K., Jung,D.W., Gunter,K.K., Gunter,T.E. and Brierley,G.P. (1994) Na^{+} -dependent Ca^{2+} efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive $Ca^{2+}/2Na^{+}$ exchanger. *Am. J. Physiol.*, **266**, 800-808.
- Bernardi,P., Colonna,R., Costantini,P., Eriksson,O., Fontane,E., Ichas,F., Massari,S., Nicolli,A., Petronilli,V. and Scorrano,L. (1998) The mitochondrial permeability transition. *Biofactors.*, **8(3-4)**, 273-281.
- Berridge,M.J. (1996) Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology*, **499.2**, 291-306.
- Bolton,D.C., McKinley,M.P. and Prusiner,S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.
- Brandner,S., Raeber,A., Sailer,A., Blättler,T., Fischer,M., Weissmann,C. and Aguzzi,A. (1996) Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93(23)**, 13148-13151.
- Brini,M., Miuzzo,M., Pierobon,N., Negro,A. and Sorgato,M.C. (2005) The prion protein and its paralogue doppel affect calcium signaling in chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 2799-2808.

- Brown,D.R., Schulz-Schaeffer,W.J., Schmidt,B. and Kretzschmar,H.A. (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.*, **146**, 104-112.
- Bueler,H., Aguzzi,A., Sailer,A., Greiner,R.A., Autenried,P., Aguet,M. and Weissmann,C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73(7)**, 1339-1347.
- Cahalan,M.D., Zhang,S.L., Yeromin,A.V., Ohisen,K., Roos,J. and Stauderman,K.A. (2007) Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium*, **42**, 133-144.
- Carafoli,E. (2003) Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 175-181.
- Carafoli,E. (2005) Calcium – a universal carrier of biological signals.*The FEBS Journal*, **272**, 1073-1089.
- Carafoli,E., Genazzani,A. and Guerini,D. (1999) Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 624-632.
- Caughey,B., Raymond,G.J. and Bessen,R.A. (1998) Strain-dependent differences in β -sheet conformations of abnormal prion protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32230-32235.
- Chan,S.L. and Mattson,M.P. (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.*, **58**, 167-190.
- Chesebro,B., Race,R., Wehrly,K., Nishio, J., Bloom,M., Lechner,D., Bergstrom,S., Robbins,K., Mayer,L., Keith,J.M., Garon,C. and Haase,A. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-335.
- Chiarini,L.B., Freitas,A.R.O., Zanatta,S.M., Brentani,R.R., Martins,V.R. and Linden,R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *The EMBO Journal*, **13**, 3317-3326.
- Cho,H.J. (1976) Is the scrapie agent a virus? *Science*, **262**, 411-412.
- Collinge,J., Palmer,M.S. and Dryden,A.J. (1991) Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeld-Jakob disease. *Lancet*, **337**, 1441-1442.
- Criado,J.R., Sanchez-Alavez,M., Conti,B., Giacchino,J.L., Wills,D.N., Henriksen,S.J., Race,R., Manson,J.C., Chesebro,B. and Oldstone,M.B. (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.*, **19**, 255-265.

Domi,T., Di Leva,F., Fedrizzi,L., Rimessi,A., Brini,M. (2007) Functional specificità of PMCA isoforms? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1099**, 237-246.

Gabizon,R., McKinley,M.P.,Groth,D. and Prusiner,S.B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 6617-6621.

Gomez,R., Gabellini,N., Barrio,J., Torres,B., Rizzato,F., Oselladore,B., Pintado,B., Gutierrez-Adan,A., Mellstrom,B., Naranjo,J.R. and Carafoli,E. (2004) DREAM, a calcium-dependent transcriptional repressor, regulates NCX3 gene expression. *EMBO Workshop on Calcium Signaling and Diseases, Capri, Italy. Abstract.*

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

Guerini,L.L. and Carafoli,E. (2000) Calcineurin controls the transcription of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms in developing cerebellar neurons. *J. Biol. Chem.*, **275**, 20903-20910.

Guerini,L.L., Coletto,L. and Carafoli,E. (2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium*, **38**, 281-289.

Gwack,Y., Srikanth,S., Feske,S., Cruz-Guilloty,F., Oh-hora,M., Neems,D.S., Hogan,P.G. and Rao,A. (2007) Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J. Biol. Chem.*, **282**, 16232-16243.

Hajnoczky,G., Csordas,G., Das,S., Garcia-Perez,C., Saotome,M., Sinha,S. and Yi,M. (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, **40**, 553-560.

Hansford,R.G. and Zorov,D. (1998) Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol. Cell. Biochem.*, **184**, 359-369.

Hartmann,J. and Konnerth,A. (2005) Determinants of postsynaptic Ca^{2+} signaling in Purkinje neurons. *Cell Calcium*, **37**, 459-466.

Horiuchi,M., Yamazaki,N., Ikeda,T., Ishiguro,N. and Shinagawa,M.A. (1995) A cellular form of prion protein (PrP^C) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J. Gen. Virol.*, **76**, 2583-2587.

Hornshaw,M.P., McDermott,J.R. and Candy,J.M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 621-629.

Hornshaw,M.P., McDermott,J.R., Candy,J.M. and Lakey,J.H. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 993-999.

Khan,T.M., Wagner,L., (2006) AktKinase phosphorylation of inositol1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Biol. Chem.*, **281(6)**, 3731-3737.

Khosravani,H., Zhang,Y., Tsutsui,S., Hameed,S., Altier,C., Hamid,J., Chen,L., Villemaire,M., Ali,Z., Jirik,F.R. and Zamponi,G.W. (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The J. Cell Biol.*, **181**, 551-565.

Kocisko,D.A., Come,J.H., Priola,S.A., Chesebro,B., Raymond,G.J., Lansbury,P.T. and Caughey,B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, **370**, 471-474.

Kuwahara,C., Takeuchi,A.M., Nishimura,T., Haraguchi,K., Kubosaki,A., Matsumoto,Y., Saeki,K., Matsumoto,Y., Yokoyama,T., Itohara,S. and Onodera,T. (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, **400**, 225-226.

Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lee,I.Y., Westaway,D., Smit,A.F.A., Wang,K., Seto,J., Chen,L., Acharya,C., Ankener,M., Baskin,D., Cooper,C., Yao,H., Prusiner,S.B and Hood,L.E. (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res.*, **8**, 1022-1037.

Legname,G., Baskakov,I.V., Nguyen,H.O.B., Riesner,D., Cohen,F.E., DeArmond,S.J. and Prusiner,S.B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.

Lemasters,J.J., Theruvath,T.P., Zhong,Z. and Nieminen,A.L. (2009) Mitochondrial calcium and the permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1395-1401.

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

Linden,R., Martins,V.R., Prado,M.A., Cammarota,M., Izquierdo,I. and Brentani,R.R. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.*, **88**, 673-728.

Magalhaes,A.C., Silva,J.A., Lee,K.S., Martins,V.R., Prado,V.F., Ferguson,S.S., Gomez,M.V., Brentani,R.R. and Prado,M.A. (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33311-33318.

Mahal,S.P., Asante,E.A., Antoniou,M. and Collinge,J. (2001) Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*, **268(1-2)**, 105-114.

- Marsault,R., Murgia,M., Pozzan,T. and Rizzuto,R. (1997) Domains of high Ca^{2+} beneath the plasmamembrane of living A7r5 cells. *EMBO J.*, **16**, 1575-1581.
- Mattei,V., Garofalo,T., Misasi,R., Circella,A., Manganelli,V. and Lucania,G. (2004) Prionprotein ia a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett.*, **50**, 14-18.
- Mattson,M.P. (1998) Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.*, **21**, 53-57.
- Mead,S., Mahal,S.P., Beck,J., Campbell,T., Farral,M., Fisher,E. and Collinge,J. (2001) Sporadic – but not variant – Creutzfeldt-Jakob disease is associated with polymorphisms upstream of PRNP Exon 1. *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1225-1235.
- Mercer,J.C., Dehaven,W.I., Smyth,J.T., et al. (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, STIM1. *J. Biol. Chem.*, **281**, 24979-24990.
- Miura,T., Hori-I,A. and Takeuchi,H. (1996) Metal-dependent alpha-helix formation promoted by tha glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett.*, **396**, 28-252.
- Nazor,K.E., Seward,T. and Telling,G.C. (2007) Motor behavioral and neuropathological dificits in mice deficient for normal prion protein expression. *Biochem. Biophys. Acta*, **1772**, 645-653.
- Nicoll,D.A., Ottolia,M., Lum,L., Lu,Y. And Philipson,K.D. (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *J. Biol. Chem.*, **274**, 910-917.
- Nixon,R.A. (2003) The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res.*, **2**, 407-418.
- Oesch,B., Westaway,D., Wälchli,M. McKinley,M.P., Kent,S.B.H., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746.
- Orsi,A. and Sitia,R. (2007) Interplays between covalent modifications in the endoplasmic reticulum increase conformational diversity in nascent prion protein. *Prion*, **1:4**, 236-242.
- Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., et al. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10962-10966.
- Pauly,P.C. and Harris,D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33107-22110.

- Philipson, K.D. (1999) Sodium-calcium exchange. In *Calcium as a Cellular Regulator* (Carafoli, E. & Klee, C. eds), Oxford University Press, New York, 279-294
- Powell, A.D., Toescu, E.C., Collinge, J. and Jefferys, J.G. (2008) Alterations in Ca^{2+} -buffering in prion-null mice: association with reduced afterhyperpolarizations in CA1 hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **28**, 3877-3886.
- Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1998) Prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363-13383.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, **382**, 180-182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. and Wüthrich, K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS letters*, **413**, 282-288.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighbouring mitochondria. *Science*, **262**, 744-747.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. and Pozzan, T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*, **280**, 1763-1766.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhaes, P.J., Di Virgilio, F. and Pozzan, T. (2003) Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*, **22**, 8619-8627.
- Rizzuto, R., Simpson, A.W.M., Brini, M. and Pozzan, T. (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, **358**, 325-328.
- Saborio, G.P., Permanne, B. and Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.*, **4**, 1157-1165.
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I. And Schachner, M. (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59Fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.*, **169**, 341-354.

Sitia,R. and Meldolesi,J. (1992) Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 1067-1072.

Smit,A.F.A. (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 743-748.

Smit,A.F.A., Tóth,G., Riggs,A.D. and Jurka,J. (1996) Ancestral, mammalian-wide subfamilies of LINE1 repetitive sequences. *J. Mol. Biol.*, **246**, 401-417.

Sorgato,M.C. and Bertoli,A. (2009) From cell protection to death: may Ca²⁺ signals explain the chameleonic attributes of the mammalian prion protein? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 171-174.

Sorgato,M.C., Peggion,C. and Bertoli,A. (2009) Is,indeed, the prion protein a Harlequin servant of “many” masters? *Prion*, **3**, 202-205.

Sparkes,R.S., Simon,M., Cohn,V.H., Fournier,R.E., Lern,J., Klisak,I., Heinzmann,C., Blatt,C., Lucero,M., Mohandas,T., *et al.* (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83(19)**, 7358-7362.

Stahl,N. et al (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991-2002.

Strehler,E.E. and Zacharias,D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.*, **81**, 21-50.

Tada,M., Kirchberger,M.A. and Katz,A.M. (1975) Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **250**, 2640-2647.

Taylor,D.R. and Hooper,N.H. (2006) The prion protein and lipid rafts. *Mol.Membr. Biol.*, **23**, 89-99.

Vital,C., Gray,F., Vital,A., Ferrer,X. and Julien,J. (1999) Prion disease with octapeptide repeat insertion. *Clin. Exp. Pathol.*, **47(3-4)**, 153-159.

Zanusso,G., Petersen,R.B., Jin,T., Jing,Y., Kanoush,R., Ferrari,S., Gambetti,P. and Singh,N. (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23396-23404.

Zhang,S.L., Yu,Y., Roos,J., Kozak,J.A., Deerinck,T.J., Ellisman,M.H., Stauderman,K.A. and Cahalan,M.D. (2005) STIM1 is Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, **437**, 902-905.