



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

Dottorato di Ricerca
in Virologia e Biotecnologie Microbiche

XXII ciclo

***Drosophila melanogaster* come modello
per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili
umane di tipo ereditario.**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Tutor: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Dottoranda: Elena Sartori

31 dicembre 2009

Abstract	7
Riassunto	11
1 Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili	15
1.1 Le encefalopatie spongiformi trasmissibili umane	18
1.1.1 Le forme sporadiche delle TSE umane	19
1.1.2 Le forme infettive di TSE umane	20
1.2 Le forme ereditarie di TSE umane	23
1.2.1 La malattia di Creutzfeldt-Jacob familiare	24
1.2.2 La sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker	24
1.2.3 L'insonnia familiare fatale	25
1.3 Le mutazioni puntiformi con ruolo patogenetico	25
1.3.1 P102L (GSS)	26
1.3.2 P105L (GSS)	27
1.3.3 A117V (GSS)	27
1.3.4 D178N-V129 (fCJD)	27
1.3.5 D178N-M129 (IFF)	28
1.3.6 V180I (fCJD)	28
1.3.7 F198S (GSS)	29
1.3.8 E200K (fCJD)	29
1.3.9 V210I (fCJD)	29
1.3.10 Q212P (GSS)	30

1.3.11	Q217R (GSS)	30
1.3.12	M232R (fCJD)	30
2	La proteina prionica: Dr Jekyll e Mr Hyde?	31
2.1	La “ <i>Protein Only Hypothesis</i> ”	32
2.2	La proteina prionica cellulare	34
2.3	Il polimorfismo 129M/V	37
2.4	Il prione	38
2.5	Dalla proteina prionica al prione: il meccanismo di conversione	41
2.6	La via di infezione	42
3	<i>Drosophila melanogaster</i> come modello animale	45
3.1	I vantaggi del modello <i>Drosophila</i>	47
3.2	Costruire un modello animale di <i>Drosophila</i>	48
3.3	<i>Drosophila</i> come modello per lo studio di malattie neurodegenerative umane	51
3.3.1	<i>Drosophila</i> e malattie da poliglutamine	51
3.3.2	<i>Drosophila</i> e morbo di Parkinson	53
3.3.3	<i>Drosophila</i> e morbo di Alzheimer	53
3.3.4	<i>Drosophila</i> e paraplegie spastiche ereditarie	54
3.4	<i>Drosophila</i> e malattie da prioni	54
4	Scopo della tesi	57
5	Materiale e metodi	59
5.1	Materiali	59
5.1.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	59
5.1.2	Ciclo vitale di <i>Drosophila melanogaster</i>	60
5.1.3	Il sistema UAS/GAL4 in <i>Drosophila melanogaster</i>	64
5.1.4	Mezzo nutritivo per <i>Drosophila melanogaster</i>	65
5.1.5	Linee di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzate	66
5.1.6	Ceppi batterici utilizzati	68
5.1.7	Colture cellulari utilizzate	68
5.1.8	Plasmidi	68
5.1.9	Oligonucleotidi	71
5.2	Metodi	71
5.2.1	Isolamento di linfociti da sangue periferico	71
5.2.2	Estrazione di RNA da linfociti	72

5.2.3	Estrazione di RNA da <i>Drosophila melanogaster</i>	73
5.2.4	Estrazione di DNA da <i>Drosophila melanogaster</i>	73
5.2.5	PCR	74
5.2.6	RT-PCR	74
5.2.7	Mutagenesi sito-specifica	75
5.2.8	Real-Time PCR	77
5.2.9	Restrizioni enzimatiche	78
5.2.10	Preparazione del DNA plasmidico	78
5.2.11	Tecniche di clonaggio	79
5.2.12	Competenza e trasformazione batterica	80
5.2.13	Sequenziamento di acidi nucleici.	81
5.2.14	Allestimento degli incroci per l'identificazione degli individui transgenici	82
5.2.15	Caratterizzazione delle linee transgeniche	82
5.2.16	Allestimento degli incroci per l'analisi dell'espressione del transgene	91
5.2.17	Test di mortalità	91
5.2.18	Analisi della vitalità	92
5.2.19	Osservazione del fenotipo	92
5.2.20	Analisi dell'attività locomotoria in <i>Drosophila melanogaster</i>	93
5.2.21	Inclusioni in paraffina	97
6	Risultati	101
6.1	Identificazione e clonaggio del cDNA codificante H-PrP	102
6.2	Mutagenesi sito-specifica e clonaggio nel vettore pUAST	103
6.3	Generazione e caratterizzazione degli individui transgenici	105
6.3.1	Mappatura cromosomica dell'inserto	105
6.3.2	Verifica dell'integrità dell'inserto	106
6.3.3	Caratterizzazione delle linee transgeniche mediante ibridazione <i>in situ</i>	108
6.4	Valutazione dei livelli di espressione di H-PrP in <i>Drosophila melanogaster</i>	112
6.5	Effetti fenotipici dell'espressione di H-PrP in <i>Drosophila melanogaster</i>	115
6.5.1	Analisi della letalità	115
6.5.2	Analisi della vitalità	116
6.5.3	Osservazione del fenotipo comportamentale	122
6.5.4	Analisi dell'attività locomotoria e dei ritmi circadiani	125
6.5.5	Analisi delle sezioni istologiche dei cervelli	133

7	<i>Drosophila melanogaster</i>: modello <i>in vivo</i> per lo studio delle TSE ereditarie?	143
7.1	Generazione e caratterizzazione degli individui transgenici	145
7.2	Valutazione dei livelli di espressione di H-PrP in <i>Drosophila melanogaster</i> .	147
7.3	Effetti fenotipici dell'espressione di H-PrP in <i>Drosophila melanogaster</i> . .	148
7.3.1	Analisi della letalità	149
7.3.2	Analisi della vitalità	150
7.3.3	Osservazione del fenotipo comportamentale	153
7.3.4	Analisi dell'attività locomotoria e dei ritmi circadiani	154
7.3.5	Analisi delle sezioni istologiche dei cervelli	157
8	Conclusioni	161
	Bibliografia	165
	Pubblicazioni	185

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are a group of fatal neurodegenerative diseases that affect humans and other mammals. All these pathologies have long incubation periods followed by a chronic neurological disease with fatal outcomes and have similar pathology limited to the central nervous system. TSEs are characterized histopathologically by spongiosis and neural loss. The infectious agent in prion diseases is believed to be represented by a single protein, named prion protein (PrP^C). The “Protein Only Hypothesis” [1] suggests that TSE are caused by a disease-associated and improperly folded form of PrP^C, termed PrP^{Sc}. The nature of prions and the mechanism by which they propagate still poses fascinating basic questions.

Human TSEs are biologically unique in that the disease process can be triggered by different phenomena: i) infection with prion infected tissues, such as *kuru* and the new variant of Creutzfeldt-Jacob disease (vCJD); ii) a sporadic event that generates PrP^{Sc}, for example in CJD, and iii) inherited mutations in the human prion protein encoding gene *PRNP*, which cause fatal familial insomnia (FFI), Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (GSS) and familial CJD.

The extraordinary structural and functional conservation of genes and pathways observed in distantly related organisms, from yeast to primates, has made possible to use model organisms to further our understanding of human biology. Several studies performed using transgenic animal models have yielded a wealth of new knowledge about infectious, genetic and sporadic prion diseases.

The aim of this work is to investigate human inherited prion diseases (IPDs) thus helping to advance our knowledge of molecular mechanism responsible of these pathologies that are presently not understood, using a *Drosophila melanogaster* animal model.

Among invertebrate model organisms, *Drosophila* presents the highest degree of gene conservation to humans and, importantly, it has an high evolved nervous system. The fly brain is estimated to have more than 300,000 neurons and, similarly to mammals, is organised into areas with separated specialised functions. In addition, the fruit fly offers a number of experimental advantages, including short lifespan, well characterized development and anatomy, sequenced genome and simple transgenic analysis. Several studies indicate that not only basic cell biology but also higher-order events such as organs construction and function have been conserved between human and flies throughout the evolution. Moreover, an unparallel advantage of invertebrates is the ability to carry out large-scale genetic screens rapidly. Finally, *Drosophila* has an unrivalled battery of genetic tools including rapidly expanding collections of mutants, trasposon-based methods for gene manipulation, systems that allow controlled ectopic gene expression and balancer chromosomes. These attributes, along with the rapid generation time, inexpensive culture requirements and large progeny numbers produced in a single cross, make *Drosophila* an incisive tool for the analysis of human diseases.

Therefore, we generated transgenic fruit flies for constructs carryng either wild type or mutated forms of human PrP (H-PrP). In particular, the mutations were: P102L, associated to GSS syndrome; D178N/129M associated to FFI; D178N/129V and E200K both associated to fCJD. With standard genetic crosses, the different human PrP forms were actively expressed in all tissues, in the entire nervous system, or in motor neurons. Flies expressing H-PrP exhibited severe age-dependent locomotor dysfunction and premature death. These flies showed a progressive loss of the ability to fly, followed by a progressive loss of the capability to walk on the tubes where they are collected: they did not fly, walked slowly, had difficulty righting themselves when they are knocked down. Moreover, they lost the control of their leg movements: leg quivered and the flies often fell on a side, like they missed the support of the legs. At the same time, they showed an altered movement of wings and antennae as they continuously groomed themselves. Locomotor activities were analyzed by specific behavioural tests and evaluating possible alteration in neuromuscular junctions.

Moreover, in order to evaluate the presence of tissue vacuolization/spongiosis and/or PrP^{Sc} deposition, adult flies brains were examined by standard hematoxiyin/eosin stained sections at different time points. In particular, we analyzed brain sections when flies display severe age-dependent behavioural alterations.

Our findings indicate that *Drosophila* could be a powerful tool to study human familial TSEs. In particular, H-PrP expression in transgenic flies gives rise to gross behavioural phenotypes that closely remind the neurodegeneration associated with altered function of prion diseases in humans.

While knowledge of the precise ways in which evolutionary conserved processes operate in humans will only come from the investigation of human themselves, studies in *Drosophila* will result in a better understanding of the gene networks involved, and how their perturbations in humans can lead to disease.

Le malattie da prioni, dette anche encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), comprendono un gruppo di malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo e altre specie di mammiferi. Tutte queste patologie hanno la caratteristica comune di presentare lunghi periodi di incubazione seguiti da una patologia cronica a carico del sistema nervoso che ha sempre esito fatale. A tutt'oggi, la teoria più accreditata per spiegare le TSE è la "Protein Only Hypothesis" [1], secondo la quale l'agente responsabile di queste malattie è una proteina in grado di replicarsi autonomamente, il prione (PrP^{Sc}). Il prione rappresenterebbe un'isoforma patologica di una proteina normalmente presente nelle cellule, la proteina prionica (PrP^{C}), e che risulta particolarmente concentrata a livello delle cellule nervose.

Nell'uomo, le malattie da prioni sono presenti in tre forme: i) infettiva, dovuta al meccanismo di conversione della proteina prionica nella sua isoforma patologica mediata dalla presenza di PrP^{Sc} , come nel caso del *kuru* e della variante della malattia di Creutzfeldt-Jacobs (vCJD); ii) sporadica, in seguito al cambiamento spontaneo della forma normale in PrP^{Sc} con un meccanismo non ancora noto, come, ad esempio nel caso della CJD, e infine una forma iii) ereditaria, trasmessa come carattere autosomico dominante associato a mutazioni a carico del gene *PRNP* codificante la proteina prionica. E' questo il caso di malattie quali l'insonnia familiare fatale (IFF), la malattia di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e la forma familiare della CJD (fCJD).

La straordinaria conservazione strutturale e funzionale dei geni in organismi diversi ha permesso di utilizzare modelli animali, dal lievito ai primati, per accrescere la nostra conoscenza della biologia dell'uomo.

Per poter contribuire al chiarimento della biologia dei prioni, del meccanismo patogenetico e del ruolo svolto dalle diverse mutazioni, abbiamo analizzato la possibilità di impiegare

come organismo modello *Drosophila melanogaster*, già ampiamente utilizzata con successo per lo studio di altre malattie neurodegenerative umane. Gli invertebrati, a differenza dei mammiferi, risultano particolarmente utili nello studio di geni la cui funzione è sconosciuta in quanto permettono di applicare l'analisi genetica in modo sistematico. La scelta del modello *Drosophila* si basa sul fatto che questo organismo presenta, tra gli invertebrati, la massima omologia con il genoma umano, un sistema nervoso particolarmente evoluto e un tempo di generazione breve. Inoltre, data l'ampia varietà di tecniche molecolari applicabili, permette un'analisi sistematica offrendo la possibilità di chiarire la funzione di geni in modo relativamente rapido ed efficiente rispetto ad altri modelli animali.

Ci siamo quindi proposti da un lato di creare un modello animale per lo studio della funzione della PrP umana normale e mutata che permetta di approfondire i processi neurodegenerativi alla base delle TSE, e dall'altro di utilizzare il moscerino della frutta per effettuare un rapido *screening* genetico di alcune tra le mutazioni note, in modo da poter determinare quelle che svolgono un ruolo importante nella patogenesi di queste malattie. Tra tutte le mutazioni finora identificate ne sono state scelte tre perchè rappresentative delle tre forme di TSE ereditarie nell'uomo: P102L, associata alla GSS, D178N/129M, associata alla IFF, D178N/129V e E200K associate alla fCJD.

Mediante microiniezione degli embrioni di *Drosophila*, sono state ottenute diverse linee di moscerini transgenici per costrutti codificanti la proteina prionica umana (H-PrP) *wild type* oppure recante le mutazioni indicate. Avvalendosi del sistema di espressione binario UAS/GAL4, sono stati allestiti gli incroci per promuovere l'espressione tessuto-specifica dei diversi transgeni, in particolare a livello ubiquitario, dell'intero sistema nervoso e nei motoneuroni. E' stato così possibile osservare che l'espressione delle diverse forme di H-PrP non interferisce con le fasi dello sviluppo del moscerino mentre nell'adulto causa un'alterazione del fenotipo comportamentale che si aggrava progressivamente in relazione all'età degli individui. Con il trascorrere dei giorni, i moscerini esprimenti H-PrP manifestano una progressiva perdita del controllo dei movimenti delle zampe, tremori e perdita dell'equilibrio, ai quali si accompagna una sempre più evidente lentezza dei movimenti, fino alla pressochè totale immobilità e alla morte precoce. I fenotipi motori sono stati analizzati utilizzando specifici test comportamentali. Inoltre, per valutare se i fenotipi patologici osservati fossero imputabili, a livello cerebrale, alla comparsa di vacuolizzazione/spongiosi e/o all'accumulo di PrP^{Sc}, sono state osservate le sezioni istologiche ottenute dall'inclusione delle sole teste di moscerini, collezionate a tempi di invecchiamento diversi, in modo da monitorare l'eventuale comparsa di fenomeni degenerativi in dipendenza dell'età degli individui.

Nel loro complesso, i risultati ottenuti sembrano indicare che *Drosophila melanogaster* possa rappresentare un valido modello animale da utilizzare nello studio delle malattie da

prioni ereditarie. In particolare, la progressione temporale dei sintomi e il tipo di sintomatologia osservata sembrano riprodurre l'evoluzione delle TSE nei mammiferi, supportando così la validità del modello animale qui proposto.

Mentre le conoscenze dei processi che operano nell'uomo potranno essere chiariti solamente studiando l'uomo stesso, gli studi condotti su *Drosophila* permettono di approfondire quali mutazioni sono coinvolte e come la loro espressione possa portare allo sviluppo della malattia.

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE), dette anche malattie da prioni, rappresentano forse le più affascinanti e intriganti tra tutte le malattie di natura infettiva che colpiscono il cervello di uomo e animali. Infatti, l'identificazione dell'agente eziologico che ne è alla base rimane ancor oggi uno degli argomenti più dibattuti della biologia, non essendo, dopo più di quarant'anni di ricerche, delle chiare prove scientifiche che avvalorino l'una o l'altra delle teorie avanzate per spiegare la natura infettiva di queste malattie.

Le TSE comprendono un gruppo di malattie neurodegenerative caratterizzate da lunghi periodi di incubazione seguiti da una patologia cronica a carico del sistema nervoso che ha sempre esito fatale.

Dal punto di vista istopatologico, sono caratterizzate dalla presenza di lesioni in una serie di distretti encefalici che si manifestano con la comparsa di vacuoli che conferiscono al tessuto nervoso un aspetto "spongioso" (fig. 1.1) e che sono dovuti all'atrofia e alla perdita di cellule neuronali. Negli individui affetti si assiste inoltre ad una intensa proliferazione delle cellule gliali e alla deposizione, a livello cerebrale, di una glicoproteina, il prione (PrP^{Sc}), a formare fibrille e placche simili a quelle presenti nella neurodegenerazione amiloide [1, 2].

Come accennato in precedenza, la natura dell'agente eziologico e il suo meccanismo di propagazione costituiscono un argomento ancora largamente dibattuto. Nel 1967 Griffith avanzò per la prima volta l'ipotesi che l'agente eziologico delle TSE fosse una proteina [3]. Da questa idea, Prusiner sviluppò, nei primi anni '80, quella che a tutt'oggi rimane la teoria più accreditata: la "*Protein Only Hypothesis*" e conìò il termine "prione" [1]. Secondo questa teoria, l'agente responsabile delle TSE è una proteina che è in grado di replicarsi

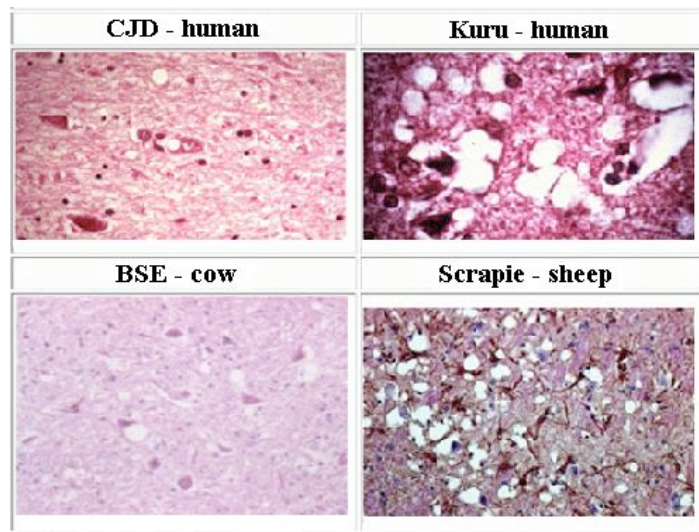


Figura 1.1: Sezioni di cervello di individui affetti da TSE. (Tratto e modificato da www.biophys.uni-duesseldorf.de)

autonomamente, il prione appunto, che rappresenterebbe l'isoforma patologica di una proteina normalmente presente nelle cellule, in particolare nei neuroni. L'accumulo a livello neuronale della forma alterata PrP^{Sc} causa la morte delle cellule anche se non è ancora stato chiarito se ciò avvenga per apoptosi, lisi, a causa della tossicità degli aggregati o per una minore resistenza agli stress.

La prima TSE ad essere identificata, più di 250 anni fa, fu lo *scrapie* delle pecore [4], che si manifesta con atassia, tremori, cachessia e, nella maggior parte dei casi, con un intenso prurito che induce gli animali a grattarsi furiosamente i fianchi contro qualsiasi oggetto verticale. Questa malattia era nota da secoli, basti pensare che già Dante, nel canto V del Paradiso, ricordava "siate uomini non pecore matte". La sua natura trasmissibile venne accidentalmente dimostrata negli anni '30 quando un gregge di pecore scozzesi venne inoculato, a scopo vaccinale, utilizzando omogenati di cervello estratti da individui affetti da *scrapie* [5]. Successivamente, vennero identificate altre encefalopatie spongiformi animali, quali la *chronic wasting disease* (CWD), evidenziata in cervidi presenti allo stato brado in alcuni parchi negli USA, la *feline spongiform encephalopathy* (FSE) che colpisce i felini domestici, la *transmissible mink encephalopathy* (TME) dei visoni in allevamento fino alla più famosa *bovine spongiform encephalopathy* (BSE) che, a partire dal 1986, ha colpito migliaia di bovini in allevamento intensivo in Gran Bretagna, espandendosi poi in tutta Europa. Ad eccezione di alcuni casi insorti spontaneamente, la maggior parte delle TSE animali sono state imputate ad infezioni esogene contratte per via alimentare in seguito all'introduzione nella catena alimentare di materiale proveniente da animali affetti da queste patologie. Ad esempio, si

pensa che la BSE abbia avuto la sua origine dallo *scrapie* che avrebbe fatto il salto di specie quando, all'inizio degli anni '80, il processo utilizzato per la trasformazione degli scarti della macellazione degli ovini in vari sottoprodotti, tra i quali le farine animali impiegate per l'alimentazione dei bovini, è stato modificato, eliminando l'utilizzo di solventi a base di petrolio utilizzati a temperature elevate, che erano evidentemente in grado di inattivare l'agente eziologico della malattia [6]. L'attenzione verso la BSE, che nonostante il divieto dell'utilizzo di farine animali non è ancora stata eradicata, si è accresciuta enormemente dopo l'individuazione di una nuova forma di encefalopatia spongiforme umana, denominata "nuova variante" della malattia di Creutzfeldt-Jacob (vCJD). Questa forma di TSE è stata identificata a partire dalla metà degli anni '90 e, sia per evidenze epidemiologiche, quali la sua comparsa nelle popolazioni residenti in zone interessate dall'epidemia di BSE e con un'incidenza direttamente proporzionale alla diffusione della patologia animale [7], sia per alcune caratteristiche del prione coinvolto [8, 9], viene considerata la conseguenza di una "infezione" esogena contratta per via alimentare attraverso l'ingestione di carne proveniente da bovini affetti da BSE [10]. Prima dell'identificazione di questa patologia, erano già state identificate altre encefalopatie spongiformi trasmissibili che colpiscono l'uomo. Già a partire dagli anni '20 del secolo scorso erano note infatti la malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD), che può presentarsi in forma sporadica (sCJD), iatrogena (iCJD) o familiare (fCJD) e la Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), il *kuru*, noto dal 1930 e l'insonnia familiare fatale (IFF), descritta per la prima volta in Italia da ricercatori dell'Università di Bologna in epoca più recente, verso la seconda metà degli anni '80 [11, 12, 13].



Figura 1.2: Individui affetti da *scrapie* (a), BSE (b), *kuru* (c) e CWD (d).

1.1 Le encefalopatie spongiformi trasmissibili umane

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili umane comprendono dei disordini neurodegenerativi che risultano biologicamente unici poichè possono essere presenti in tre forme: i) una forma sporadica che, seppur rara, insorge in seguito al cambiamento spontaneo della forma normale della proteina prionica in PrP^{Sc} attraverso un meccanismo non ancora noto (CJD); ii) una forma “infettiva”, o acquisita, nella quale la trasmissione della malattia avviene attraverso l’ingestione o l’inoculazione di tessuti provenienti da individui affetti da TSE (vCJD, *kuru*); e iii) una forma ereditaria, dovuta a mutazioni a carico del gene *PRNP* codificante la PrP^C e trasmessa come carattere autosomico dominante (FFI, fCJD, GSS) [14, 15, 16].

I primi sintomi delle TSE nell’uomo sono rappresentati da disfunzioni cognitive e atassia, cui si accompagnano, dal punto di vista istopatologico, spongiosi a livello cerebrale e attivazione di microglia e astrociti [17]. Questi cambiamenti sono accompagnati, come nelle TSE animali, dall’accumulo di PrP^{Sc} che rappresenterebbe la principale, se non unica, componente dell’agente infettivo, il prione [2, 14, 18]. Il meccanismo neurodegenerativo che accompagna l’accumulo di PrP^{Sc} nel cervello rimane ancora sconosciuto, anche se vi sono sempre maggiori evidenze che questo possa coinvolgere la via apoptotica con l’inibizione del proteosoma [19].

Tappa fondamentale nello studio delle TSE umane è stata la dimostrazione della natura trasmissibile dell’agente eziologico di queste malattie. Sul finire degli anni ’50, gli studi condotti da Gajdusek su una forma di atassia progressiva, caratterizzata da prevalenti sintomi cerebellari, presente nella tribù Fore della Papua Nuova Guinea e nota con il nome di *kuru*, hanno posto le basi delle attuali conoscenze sulle malattie da prioni umane.

Gajdusek (fig. 1.3) per primo notò che le sezioni istologiche provenienti da individui morti di *kuru*, presentavano un’assoluta identità delle lesioni encefaliche con quelle presenti negli animali affetti da *scrapie*. Inoltre egli riuscì a dimostrare che il *kuru* poteva essere sperimentalmente trasmesso da un uomo affetto ad alcuni primati. Infatti l’inoculo intracerebrale nei primati di sospensioni di tessuto nervoso provenienti da pazienti morti per il *kuru* causava, dopo un periodo di incubazione di circa 1-1,5 anni, la comparsa di manifestazioni cliniche e anatomo-patologiche molto simili a quelle presenti nella patologia umana [20, 21, 22, 23]. A partire da questi studi fu successivamente dimostrata, mediante inoculazione intracerebrale negli scimpanzè di tessuto nervoso proveniente da pazienti deceduti per altre TSE, la trasmissibilità sperimentale delle encefalopatie spongiformi umane quali la CJD e la GSS, dando un nuovo impulso alle ricerche in questo campo.



Figura 1.3: Dr. Gajdusek con pazienti della tribù Fore affetti da *kuru*. (Tratto e modificato da <http://learn.genetics.utha.edu>)

1.1.1 Le forme sporadiche delle TSE umane

All'incirca l'80% delle forme sporadiche di TSE umane si manifestano come malattia di Creutzfeldt-Jakob (sCJD) con una frequenza ogni anno di circa 1-2 casi per milione di persone, con uguale distribuzione nei diversi continenti e pari incidenza tra maschi e femmine [24, 25]. L'eziologia di questa patologia rimane al momento ancora sconosciuta anche se alcune ipotesi avanzate per spiegarla riguardano la presenza di mutazioni somatiche a carico del gene *PRNP* nelle cellule neuronali coinvolte dalla patologia [24, 10, 26], oppure un raro evento stocastico che porta alla conversione spontanea di PrP^C in PrP^{Sc} [10]. Un importante ruolo nello sviluppo di questa patologia, così come avviene nelle forme genetiche di TSE umane, è svolto dal polimorfismo presente in posizione 129. In tale punto della sequenza proteica può infatti essere presente un residuo di metionina (M) oppure una valina (V). Pur non essendo di per se stesso patologico, questo polimorfismo svolge un importante ruolo nel determinare la predisposizione di un individuo allo sviluppo delle malattie da prioni [25, 27, 28]. All'incirca il 38% della popolazione europea presenta omozigosi per l'allele M, il 51% eterozigosi e l'11% omozigosi per V ed è stato dimostrato che l'omozigosi al codone 129 predispone allo sviluppo delle forme sporadiche di TSE [25, 27, 28, 29]. In contrasto con la distribuzione nella popolazione generale, la frequenza di omozigosi V/V o M/M nei casi di sCJD è di circa il 90%, configurandosi così l'omozigosi in posizione 129 come un

fattore di rischio per l'insorgenza della patologia. In alcune popolazioni, come ad esempio quella giapponese, l'elevata frequenza di omozigosi M/M riscontrata nei casi di sCJD risulta mascherata dall'elevata frequenza del fenomeno nella popolazione normale. Poichè l'incidenza di questa forma di TSE in Giappone non risulta essere più elevate rispetto al resto del mondo, l'omozigosi al codone 129 non rappresenta un elemento predittivo della malattia, ma piuttosto costituisce un importante fattore predisponente, probabilmente in grado di agire in concomitanza con altri fattori non ancora identificati ma che potrebbero essere essenziali per la comparsa della patologia [30].

La forma classica di sCJD è caratterizzata da demenza pre-senile solitamente accompagnata da mioclono. L'insorgenza della malattia avviene solitamente tra i 45 e i 75 anni con un'età media di 68 [25]. Dal punto di vista clinico, la progressione della patologia è rapida, all'incirca di 5 mesi, e i sintomi includono affaticamento, declino delle capacità motorie, insonnia, depressione, perdita di peso e sensazioni di dolore generalizzato. In aggiunta alla demenza e al mioclono, molto spesso si presentano segni extrapiramidali, atassia cerebellare e interessamento della regione corticale. La conferma di sCJD è comunque legata alla dimostrazione della comparsa di fenomeni di spongiosi a livello cerebrale, perdita di cellule neuronali e astrocitosi. La formazione di placche amiloidi non si accompagna normalmente alla CJD [31], nonostante l'immunoistochimica evidenzi la presenza di PrP che appare con una deposizione piuttosto diffusa nel tessuto cerebrale [17, 31, 32]. Oltre a rappresentare un fattore di rischio, il genotipo a livello del codone 129 sembra essere in grado di influenzare il fenotipo clinico della sCJD. Una omozigosi M/M infatti è generalmente associata ad una forma di demenza rapidamente progressiva, mentre il genotipo V/V è frequentemente associato ad un decorso più prolungato e con prevalenti sintomi di atassia [30].

1.1.2 Le forme infettive di TSE umane

Nonostante le malattie da prioni umane siano trasmissibili, le forme infettive di tali patologie sono dei fenomeni rari legati a situazioni del tutto eccezionali. Fino ad ora sono state identificate il *kuru* e la vCJD, acquisite mediante ingestione di tessuti provenienti da individui affetti da TSE, e la CJD di natura iatrogena dovuta ad una non corretta pratica clinica.

Il *kuru*

L'esempio meglio conosciuto di TSE acquisita nell'uomo è il *kuru*, o malattia del riso, scoperto intorno agli anni '50 del secolo scorso. La sua trasmissione è stata associata al fenomeno di endocannibalismo rituale presente nella tribù Fore della Papua Nuova Guinea

[20, 21, 23]. Grazie agli studi di Gajdusek venne dimostrato che la pratica di far ingerire a donne e bambini il cervello del capo famiglia morto costituiva la via di trasmissione della malattia. Ciò è stato confermato dal fatto che, dopo una massiccia campagna contro il cannibalismo, i casi di *kuru* sono progressivamente diminuiti fino praticamente a scomparire [23].

Dal punto di vista clinico, la patologia è caratterizzata da una progressiva atassia cerebellare con una tardiva o assente comparsa di demenza. I sintomi principali sono costituiti dall'iniziale sviluppo di un'andatura incerta che progredisce fino ad una infermità totale, e da discinesie facciali dovute a spasmi ai muscoli facciali che conferiscono agli individui affetti un'espressione sorridente, da qui il nome di "malattia del riso". Il *kuru* è caratterizzato da periodi di incubazione lunghissimi, che superano anche i 50 anni, prima che compaiano i primi segni della malattia.

E' stato dimostrato che anche in questo caso, il genotipo a livello del codone 129 del gene *PRNP* svolge un importante ruolo non soltanto nella suscettibilità dell'individuo allo sviluppo della patologia, ma anche nel determinare la durata del periodo di incubazione: la maggior parte della popolazione sopravvissuta all'epidemia di *kuru* infatti è risultata essere eterozigote M/V [20, 23, 33].

La diffusione di pratiche cannibalistiche in tutti e cinque i continenti risulta in contrasto con la presenza della malattia soltanto nella popolazione Fore. Per spiegare questa evidenza, è stato ipotizzato che il vantaggio rappresentato dall'eterozigosi al codone 129 abbia fornito una solida base per una pressione selettiva nella popolazione [20, 23].

La variante della malattia di Creutzfeldt-Jacob

A partire dal 1995 è stata individuata una nuova forma di encefalopatia spongiforme trasmissibile umana, particolarmente diffusa nel Regno Unito, denominata "nuova variante" della malattia di Creutzfeldt-Jacob (vCJD). La comparsa di questa nuova forma di malattia da prioni e la conferma sperimentale che tale patologia è causata dallo stesso ceppo prionico che causa la BSE nei bovini [8, 9, 34, 35], ha portato alla convinzione che l'esposizione alla epidemia di BSE sia stata alla base della comparsa della vCJD [16, 36]. L'eziologia da "infezione" esogena della malattia trova solide motivazioni non solo sotto il profilo epidemiologico, per la chiara correlazione spazio-temporale con la presenza dell'epidemia di BSE negli animali di allevamenti intensivi a scopo alimentare, ma anche, come accennato in precedenza, sotto il profilo eziologico [34]. E' stato dimostrato che il prione della vCJD può essere trasmesso a topi transgenici per la PrP bovina e che in essi causa la comparsa di una patologia identica a quella indotta dal prione della BSE, risultando indistinguibile

da quest'ultimo sotto ogni profilo, mentre presenta significative differenze nella sequenza aminoacidica rispetto alla PrP patologica presente nei casi di sCJD [34]. Queste evidenze sperimentali fanno ipotizzare che, nel corso degli anni '90 del secolo scorso, un gran numero di persone possa essere stato esposto, per via alimentare, al prione della BSE con la conseguenza che attualmente un numero imprecisato di soggetti con possibili fattori genetici predisponenti (ad esempio omozigoti M/M al codone 129 di *PRNP*) si trovi in fase di incubazione della patologia, con la conseguente possibile comparsa di numerosi casi di vCJD nei prossimi anni [30].

La malattia, che si manifesta inizialmente con alterazioni comportamentali e sintomi psichiatrici (quali depressione, stati ansiosi, insonnia, apatia, allucinazioni e paranoia), presenta un decorso relativamente protratto, portando alla morte degli individui affetti nel giro di circa 14 mesi dall'inizio della sintomatologia [37] rispetto ai 5 mesi della forma classica di CJD [25]. Dal punto di vista istopatologico è caratterizzata dalla presenza di placche amiloidi "floride", costituite da un denso "core" di depositi amiloidotici circondato da numerosi vacuoli [36]. Inoltre, a differenza di quanto avviene per la sCJD, la nuova variante insorge in soggetti giovani, con un'età media di 26 anni [37, 38] contro i circa 68 anni della forma sporadica [25].

La malattia di Creutzfeldt-Jacob iatrogena

Intorno agli anni 1970 è stata dimostrata la trasmissibilità interumana della malattia di Creutzfeldt-Jacob attraverso qualche centinaio di casi di CJD iatrogena (iCJD). Le due principali cause di iCJD sono dovute a procedure mediche che prevedono l'impianto di dura mater e trattamenti con l'ormone della crescita o gonadotropine di origine estrattiva derivati da ghiandole pituitarie provenienti da cadaveri di soggetti affetti da CJD ancora non clinicamente evidente [39, 40]. Un numero minore di casi è stato collegato a procedure quali il trapianto di cornea o l'utilizzo di elettrodi stereotassici o attrezzi chirurgici utilizzati in precedenza su pazienti con ogni probabilità affetti da CJD in fase preclinica e non sterilizzati adeguatamente [39, 40].

Dal punto di vista clinico, la iCJD si manifesta con sintomi differenti in relazione alla diversa eziologia e, in particolare, alla via di esposizione al prione umano [21, 40, 41]. Le vie di infezione periferiche sono tipicamente associate a lunghi periodi di incubazione e solitamente caratterizzate da una sindrome simile al *kuru*, nella quale ha un carattere preminente l'atassia rispetto ai fenomeni di demenza. Nei pazienti invece che sono stati esposti al prione umano in seguito all'impianto di dura mater, nei quali la sede di infezione è topologicamente molto vicina al cervello, si manifestano sintomi simili alla forma sporadica di CJD [42].

1.2 Le forme ereditarie di TSE umane

Le encefalopatie spongiformi umane possono presentarsi, fatto unico tra i mammiferi che possono essere colpiti da queste malattie, in forma familiare. Queste TSE vengono trasmesse come carattere autosomico dominante e il processo patogenetico è legato alla presenza di specifiche mutazioni a carico del gene *PRNP* localizzato nel braccio corto del cromosoma 20 [43, 44, 45, 46]. Come nel caso delle forme sporadiche e infettive, lo sviluppo della malattia si pensa sia dovuto al cambiamento conformazionale della proteina prionica cellulare nella sua isoforma patologica PrP^{Sc}.

Dal punto di vista clinico, le TSE ereditarie sono classificate in malattia di Creutzfeldt-Jacob familiare (fCJD), sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e insonnia familiare fatale (IFF) [46].

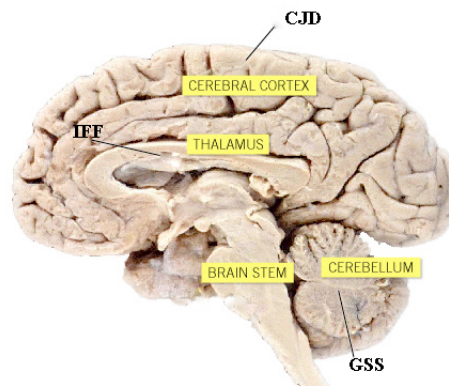


Figura 1.4: Schema raffigurante delle regioni del cervello interessate dalle diverse TSE. (Tratto e modificato da <http://learn.genetics.utah.edu>)

Fino ad ora sono state identificate più di 30 mutazioni a carico di *PRNP* [14, 15, 44, 46] ma non è ancora stato chiarito in quale modo queste mutazioni causino il processo patogenetico. L'ipotesi maggiormente condivisa dai ricercatori è che esse destabilizzino la PrP^C causando una aumentata tendenza della forma normale della proteina prionica ad assumere la struttura patologica di PrP^{Sc} [45]. Nei soggetti portatori di una mutazione, in genere mutazioni puntiformi che causano una sostituzione aminoacidica e/o la formazione di un codone di STOP prematuro, oppure, più raramente, mutazioni da inserzione/delezione, si pensa possa essere presente una modificazione della sequenza proteica in grado di causare una diminuzione della probabilità che la proteina prionica assuma la conformazione normale PrP^C. E' possibile che anche in questi casi, le molecole di PrP^{Sc} endogene neoformate intervengano, a loro volta, nel catalizzare la conversione di altre molecole di proteina normale nella sua isoforma patologica [46].

Nelle TSE di natura ereditaria, alterazioni quali demenza progressiva, atassia, difficoltà motorie (corea), mioclono e comparsa di placche amiloidi, possono essere presenti in diverse combinazioni. In alcuni casi possono essere assenti i fenomeni di spongiosi a livello cerebrale nonostante la presenza di accumuli PrP e quindi una risposta immunoistochimica positiva [49]. L'esistenza di una così ampia variabilità non soltanto in individui che presentano mutazioni diverse ma anche in pazienti recanti la stessa mutazione, indica chiaramente che la classificazione di queste malattie non può basarsi solamente sulla presenza di una mutazione piuttosto che un'altra [50]. Data la grande variabilità fenotipica osservata nelle malattie da prioni ereditarie e la loro similarità con altre malattie neurodegenerative, quale ad esempio il morbo di Alzheimer, il sequenziamento del gene *PRNP* deve essere considerato un importante criterio diagnostico da applicare a tutti quei pazienti che presentano demenza e atassia e per i quali non si è stati in grado di fornire una diagnosi certa [49, 50].

1.2.1 La malattia di Creutzfeldt-Jacob familiare

La malattia di Creutzfeldt-Jacob familiare è associata a numerose mutazioni a carico del gene *PRNP* che causano le sostituzioni aminoacidiche D178N, V180I, E200K, R208H, V210I, M232R. Solitamente si presenta con importanti fenomeni di demenza e una varietà di alterazioni neurologiche, nella maggior parte dei casi atassia e mioclono, con un decorso che si aggira attorno ai sei mesi. Nella maggior parte dei pazienti non sono presenti placche amiloidi di natura glicoproteica dovute alla deposizione di PrP^{Sc} e, dal punto di vista clinico, presenta le caratteristiche precedentemente descritte per la sCJD.

1.2.2 La sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker

La sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker fu descritta per la prima volta intorno agli anni '20 ed è associata a diverse mutazioni a carico del gene *PRNP* che causano le sostituzioni aminoacidiche P102L, P105L, A117V, F198S, Q212P, Q217R. Nei pazienti affetti, tipicamente si manifesta come atassia cronica cerebellare, con disturbi della postura, ariflessia, disfagia e demenza che compare nelle fasi tardive della malattia e che, in alcuni casi, può presentarsi in forma lieve [51]. La GSS può essere considerata una variante della CJD e viene distinta da quest'ultima poichè in essa predomina l'atassia, mentre lo stato di demenza e mioclono sono maggiormente prominenti nella CJD [21]. La GSS inoltre è caratterizzata a livello neuropatologico dall'intensa presenza di placche amiloidi dovute alla deposizione di PrP^{Sc}, mentre i fenomeni di spongiosi a carico del tessuto cerebrale possono presentarsi in forma più o meno marcata [51].

1.2.3 L'insonnia familiare fatale

L'insonnia familiare fatale è stata associata fino ad ora ad una singola mutazione puntiforme a carico del gene *PRNP* che porta alla sostituzione aminoacidica D178N, in presenza di un residuo di metionina in corrispondenza del polimorfismo in posizione 129 della sequenza proteica [13]. Sono stati riportati alcuni casi di IFF sporadica ma si tratta di un evento ancor più raro [52, 53].

Questa TSE è caratterizzata dalla comparsa di una progressiva insonnia cui fanno seguito atassia e mioclono. Nelle fasi tardive, la malattia porta ad una insonnia pressochè totale, demenza, rigidità, distonia e mutismo. Dal punto di vista neuropatologico, nei pazienti affetti da IFF sono presenti lesioni dovute alla perdita di neuroni, spongiosi e gliosi che interessano principalmente la regione talamica.

1.3 Le mutazioni puntiformi con ruolo patogenetico

Fino ad oggi sono state identificate numerose mutazioni puntiformi in grado di svolgere un ruolo determinante nella patogenesi delle TSE familiari (fig. 1.5).

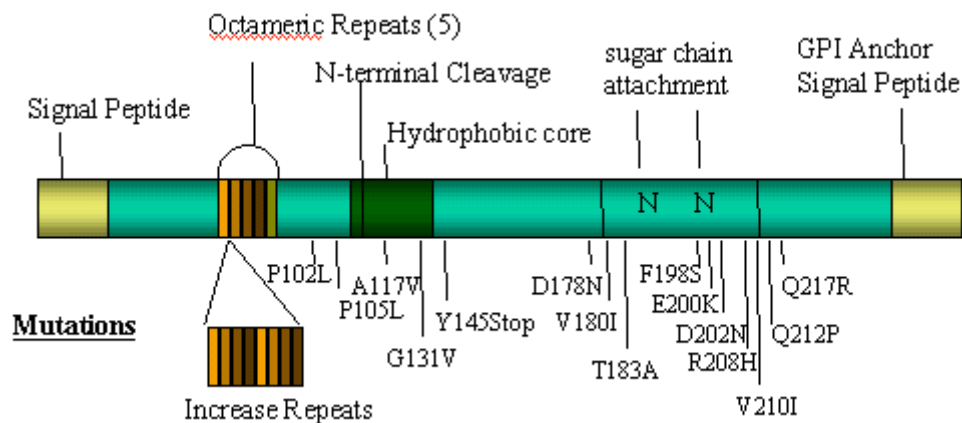


Figura 1.5: Principali mutazioni finora identificate nella sequenza proteica di PrP. (Tratto e modificato da www.bath.ac.uk)

Tra di esse, la maggior parte è stata riscontrata in numerosi pazienti affetti da queste malattie, mentre altre sono state evidenziate in singoli casi e il loro ruolo patogenetico è stato assunto in base alla loro assenza negli individui sani. Le più importanti mutazioni note sono riassunte nella tabella 1.1.

Mutazione	Patologia	Residuo in posizione 129
P102L	GSS	M>>V
P105L	GSS	V
A117V	GSS	V
D178N	FFI, CJD	M (IFF), V (CJD)
V180I	CJD	M
F198S	GSS	V
E200K	CJD	M>>V
R208H	CJD	M
V210I	CJD	M
Q212P	GSS	M
Q217R	GSS	V
M232R	CJD	M

Tabella 1.1: Principali mutazioni puntiformi riscontrate in pazienti affetti da TSE ereditaire, patologie ad esse associate e composizione aminoacidica del polimorfismo in posizione 129.

1.3.1 P102L (GSS)

La prima mutazione ad essere stata identificata in associazione con le TSE ereditarie è stata la P102L che causa la sostituzione di una prolina con un residuo di leucina nella sequenza aminoacidica della PrP umana. Questa mutazione è la più comune tra quelle riscontrate nei pazienti affetti da GSS e finora risulta distribuita con uguale frequenza in tutto il mondo [55, 60]. Nella maggior parte dei casi, essa risulta associata ad un residuo di metionina 129, pur essendo stati identificati due casi nei quali era presente la valina 129 [56, 61].

Il fenotipo clinico della GSS associata alla mutazione P102L-M129 è caratterizzato da una lenta progressione della patologia a carico della regione cerebellare, cui si accompagnano atassia e difficoltà motorie [55]. Nelle fasi finali della malattia, si manifestano alterazioni mentali e del comportamento, cui seguono demenza, mutismo e totale immobilità. L'età di insorgenza della GSS va dai 40 ai 60 anni e, nel giro di circa 6 mesi, il paziente va incontro a morte.

Sono stati riportati solamente due casi di pazienti affetti da GSS associata alla mutazione P102L-V129 [56, 61] ed essi presentavano un decorso clinico atipico molto lungo, all'incirca di 12 mesi [56].

Dal punto di vista neuropatologico, la sindrome è caratterizzata dalla presenza di depositi sia fibrillari che non, nelle regioni cerebellare e nel parenchima cerebrale, accompagnati da fenomeni di spongiosi più o meno marcati [55, 62]. Le modificazioni spongiformi, la perdita di popolazioni neuronali e l'astrocitosi possono variare e le forme più gravi si accompagnano ad un decorso più rapido. Nei casi associati alla mutazione P102L-V129, non si nota spon-

giosi a livello cerebrale e vi è solo una modesta quantità di deposizioni amiloidi a livello della neocorteccia [56].

1.3.2 P105L (GSS)

La mutazione P105L-V129 è stata riscontrata in 5 famiglie giapponesi non imparentate che presentavano casi di GSS .

La patologia associata a questa mutazione insorge attorno ai 40-50 anni di età e tipicamente si manifesta con paraparesi spastica, demenza e atassia, con un decorso che va dai 6 ai 12 mesi [63, 64]. Nei cervelli dei pazienti affetti si assiste alla deposizione di PrP a livello della corteccia cerebrale, associata a morte neuronale e astrocitosi negli strati corticali più profondi [65].

1.3.3 A117V (GSS)

La mutazione A117V è stata riscontrata molto raramente. I sintomi clinici che si accompagnano alla GSS associata sono principalmente demenza, atassia e mioclono [66]. La malattia compare tra i 19 e i 64 anni e il decorso si presenta piuttosto lungo, anche se con una grande variabilità al suo interno, da 1 a 11 anni. In tutti i casi clinici studiati, è stata evidenziata la presenza di placche amiloidotiche di PrP a livello della corteccia cerebrale e fenomeni di spongiosi più o meno marcati [67].

1.3.4 D178N-V129 (fCJD)

La sostituzione di un acido aspartico con un residuo di asparagina in posizione 178 della sequenza di PrP causa l'insorgenza di fCJD quando in posizione 129 è presente un residuo di valina [54]. Nel caso di individui omozigoti V/V129, la malattia si presenta ad una più giovane età ed è caratterizzata da un decorso molto più rapido rispetto a quanto avviene nei pazienti eterozigoti V/M129.

I pazienti che presentano fCJD associata a questa mutazione manifestano i primi sintomi, rappresentati da una grave perdita di memoria, ad un'età molto più precoce rispetto alla sCJD (all'incirca 15 anni prima) e il decorso della malattia risulta essere meno rapido, mediamente intorno ai 23 mesi [68, 69].

Dal punto di vista isotopatologico, vi è una grande variabilità nella distribuzione delle lesioni a livello cerebrale nei pazienti affetti. Le regioni maggiormente colpite sono solitamente la corteccia cerebrale e i gangli basali, mentre la regione cerebellare risulta solo par-

zialmente interessata. Inoltre, fenomeni di spongiosi e gliosi risultano predominanti rispetto alla morte neuronale [68].

1.3.5 D178N-M129 (IFF)

La stessa mutazione che causa fCJD quando è accompagnata da un residuo di valina in posizione 129, causa insonnia familiare fatale quando è associata alla metionina [54]. Come nel caso della fCJD precedentemente descritto, anche questa patologia è influenzata dalla zigosità in posizione 129: gli individui omozigoti M/M129 tendono a presentare un decorso più rapido della malattia con prevalenti sintomi di insonnia e più leggere disfunzioni motorie e cognitive, mentre i pazienti eterozigoti M/V129 manifestano una progressione più lenta con sintomi motori più severi nelle prime fasi della patologia, quando compaiono i disturbi del sonno [54].

La IFF viene definita come demenza talamica caratterizzata da una progressiva insonnia, atassia, mioclono cui si accompagnano segni piramidali. Alla comparsa dei sintomi, intorno ai 50 anni di età, i deficit della memoria e dell'attenzione sono lievi ma si aggravano con il progredire della malattia, che presenta una durata di circa 13 mesi [70, 71].

Le principali lesioni istopatologiche nei casi di insonnia familiare fatale interessano la regione talamica e sono rappresentati da atrofia dei nuclei anteriori ventrali e mediodorsali. L'atrofia può interessare anche le cortecce cerebrale e cerebellare. Solitamente, nei pazienti affetti da IFF non si evidenziano fenomeni di spongiosi [13, 70].

L'accumulo di PrP^{Sc} nei pazienti affetti da non necessariamente interessa le regioni che presentano i maggiori danni tissutali, suggerendo che probabilmente i nuclei talamici potrebbero essere più suscettibili a lesioni causate dal processo degenerativo rispetto ai danni causati dalla deposizione di PrP alterata [72, 73].

1.3.6 V180I (fCJD)

La mutazione V180I è stata riscontrata in quattro pazienti giapponesi affetti da CJD [74, 75]. Caratteristica di questa forma di fCJD è l'insorgenza ad un'età molto avanzata, attorno agli 80 anni, con una progressione rapida che porta alla morte nel giro di circa un anno. Il sintomo principale è la demenza e, all'esame istologico, si evidenziano le lesioni tipiche della malattia di Creutzfeldt-Jacob: spongiosi, morte neuronale e gliosi [74, 75].

1.3.7 F198S (GSS)

La mutazione F198S associata alla GSS è stata evidenziata in due famiglie statunitensi e in entrambi i casi è risultata essere associata ad un residuo di valina in posizione 129 [76, 77].

I primi sintomi clinici compaiono tra i 50 e i 70 anni di età e sono rappresentati da perdita di memoria e difficoltà di deambulazione. Gli individui omozigoti V/V129 presentano un'insorgenza precoce rispetto agli eterozigoti M/V129 [76]. Con il progredire della GSS si assiste ad un deterioramento delle facoltà cognitive, bradichinesia, rigidità degli arti fino alla morte del paziente che può sopraggiungere dopo un tempo molto variabile, che va dai 2 ai 12 anni.

L'esame istologico del cervello rivela tipicamente la presenza di placche amiloidi a livello della corteccia cerebrale mentre vi sono solo modesti fenomeni di spongiosi [78].

1.3.8 E200K (fCJD)

La sostituzione aminoacidica E200K rappresenta la più comune tra le mutazioni associate alla forma familiare di CJD [29, 55, 69] e risulta ugualmente distribuita nei cinque continenti. In tutti i soggetti studiati, E200K risulta associata alla presenza di una metionina in posizione 129 [79].

Le caratteristiche cliniche dei pazienti con E200K fCJD sono del tutto simili a quelle che si presentano nei casi di CJD sporadica anche se la malattia insorge all'incirca 7 anni prima rispetto a questi ultimi [80]. In alcuni casi, si possono presentare manifestazioni atipiche quali insonnia e demielinizzazione dei nervi periferici [79]. Come per gli aspetti clinici, anche le caratteristiche istopatologiche della E200K fCJD sono del tutto simili a quelle della forma sporadica della malattia: spongiosi cerebrale, perdita neuronale e gliosi [81].

1.3.9 V210I (fCJD)

La sostituzione di una valina con una isoleucina in posizione 210 della sequenza della proteina prionica umana è stata fino ad oggi riscontrata in 8 pazienti affetti da CJD [79].

I casi clinici studiati manifestano tutti demenza e mioclono mentre non vi è omogeneità per quanto riguarda alterazioni cerebellari o sensitive [79]. L'esame istologico evidenzia, anche in questa forma di malattia di Creutzfeldt-Jacob, spongiosi cerebrale, gliosi e perdita delle popolazioni neuronali a livello delle cortecce cerebrale e cerebellare [79].

1.3.10 Q212P (GSS)

La Q212P GSS insorge attorno ai 60 anni di età con il graduale sviluppo di difficoltà nella coordinazione dei movimenti e nel parlare. All'incirca tre anni dopo la comparsa dei primi sintomi, i pazienti affetti presentano ancora un normale stato mentale mentre manifestano segni di atassia. Questa condizione va incontro ad un rapido peggioramento che porta alla morte nel giro di ulteriori 3 anni [82].

1.3.11 Q217R (GSS)

Due pazienti statunitensi di origine svedese affetti da GSS presentavano la sostituzione di un residuo di glutamina con una arginina in posizione 217 [77]. Nei due soggetti i primi sintomi psichiatrici sono comparsi a 47 e 66 anni di età: il primo a 62 anni iniziò a manifestare demenza e atassia che lo portò a morte a 67 anni, mentre il secondo sopravvisse per sei anni durante i quali si svilupparono demenza e manifestazioni cliniche tipiche del morbo di Parkinson [77]. Gli aspetti neuropatologici evidenziati post-mortem rispecchiano quelli della F198S GSS: depositi di placche amiloidi di PrP^{Sc} a livello cerebrale e cerebellare e deposizione di fibrille di proteina alterata nella corteccia [79].

1.3.12 M232R (fCJD)

La mutazione M232R è stata trovata in 11 pazienti giapponesi [74] dei quali solo 4 sono stati studiati in dettaglio. Questi 4 casi non hanno manifestato demenza, fatto atipico nei casi di GSS, ma presentavano alterazioni nelle funzioni corticali [79], spongiosi, perdita di popolazione neuronale e una severa astrocitosi [83].

La proteina prionica: Dr Jekyll e Mr Hyde?

I prioni sono stati indicati come i responsabili di numerosi episodi tragici che hanno colpito il '900. Negli anni '50, il *kuru* decimò un'intera popolazione della Nuova Guinea, la CJD iatrogena è stata, fino ad oggi, la causa di più di 250 morti e, più recentemente, la trasmissione della BSE all'uomo ha indotto una diffusa paura sulle ripercussioni, sia di natura economica che di sanità pubblica, che la diffusione di questa nuova malattia poteva avere. D'altro canto, la biologia dei prioni rappresenta un campo affascinante ma ancora poco noto. Qualche anno fa, alcuni ricercatori ritenevano che le TSE fossero tra le patologie neurodegenerative meglio conosciute [84], ma ancor oggi, a seconda di chi si interpella, questa affermazione può essere ritenuta completamente corretta oppure del tutto falsa. Certamente, le malattie da prioni sono, al giorno d'oggi, abbastanza conosciute e ciò lo si deve innanzitutto all'intuizione dei pionieri di questo campo, come Stanley Prusiner e Charles Weissmann, e a tutti quei ricercatori che hanno permesso che 30 anni di ricerche abbiano portato, in poco tempo, ad enormi passi avanti sulla comprensione di queste patologie. Le pietre miliari nella ricerca dei prioni a partire dagli anni '80 sono state l'identificazione della proteina prionica PrP^{Sc} associata alle TSE [85], la formulazione della "*Protein Only Hypothesis*" [1], l'identificazione e il clonaggio del gene cellulare *PRNP* codificante la proteina prionica [86], la scoperta che la barriera di specie è strettamente dipendente dalla sequenza di PrP^C dell'ospite [87], l'associazione tra le mutazioni a carico del gene *PRNP* e le forme ereditarie di TSE [60] e la dimostrazione che topi privi della proteina prionica sono vitali e resistenti alla patologia [88, 89]. Nonostante questo, vi sono ancora molti punti oscuri che devono essere chiariti. Non è infatti ancora stato possibile precisare con certezza la natura dell'agente in-

fettivo, così come non è ancora stata chiarita nei dettagli la struttura molecolare della PrP^{Sc}. La mancanza di prove scientifiche certe è alla base dell'esistenza di più teorie volte a chiarire la natura dell'agente eziologico delle malattie da prioni, teorie che, nonostante il premio Nobel attribuito a Prusiner per la sua "*Protein Only Hypothesis*", trovano ancora numerosi sostenitori.

A causa del lungo periodo di incubazione dal momento dell'esposizione all'agente patogeno alla comparsa dei primi sintomi, inizialmente si pensava che le malattie da prioni fossero dovute ad un lentivirus [90]. Alper e colleghi dimostrarono però che l'agente responsabile delle TSE era resistente ai trattamenti che normalmente sono in grado di inattivare gli acidi nucleici, come gli UV o le radiazioni ionizzanti [91]. Questi risultati portarono allo sviluppo di altre ipotesi, una delle quali identificava l'agente infettivo in un virino, una piccola molecola di acido nucleico circondata da uno strato di proteine [92]. Questa struttura potrebbe spiegare la resistenza del patogeno alle procedure utilizzate per distruggere gli acidi nucleici. Anche se questa ipotesi è in grado di fornire una spiegazione a diverse osservazioni e dati sperimentali, 40 anni di ricerche non hanno portato all'identificazione di un acido nucleico esogeno specificatamente associato alla particella infettiva che causa le malattie da prioni [2].

Nel 1967, Griffith avanzò per la prima volta l'ipotesi che l'agente eziologico delle TSE potesse essere una proteina con la sorprendente capacità di replicarsi autonomamente all'interno delle cellule [3]. Questa idea venne successivamente ripresa da Prusiner per avanzare la sua "*Protein Only Hypothesis*" [1], che al giorno d'oggi rimane la teoria maggiormente condivisa dai ricercatori che si occupano di queste patologie.

2.1 La "*Protein Only Hypothesis*"

Nel 1982, Stanley Prusiner pubblicò per la prima volta la sua "*Protein Only Hypothesis*" che identifica l'agente eziologico responsabile delle encefalopatie spongiformi trasmissibili in una proteina in grado di autoreplicarsi all'interno delle cellule [1]. Egli conìò per la prima volta il termine "prione" indicando questo nuovo agente infettivo di natura proteica.

Il passo cruciale per la determinazione di questa particella infettiva fu l'identificazione nei tessuti infetti di una forma della proteina prionica, normalmente presente nelle cellule, resistente alla degradazione proteolitica [85]. L'identificazione del gene *PRNP* e il fatto che esso codifica una normale proteina dell'ospite [93], fece ipotizzare che la PrP potesse presentarsi in due forme alternative: una, PrP^C, presente in numerosi tipi cellulari e, con particolare abbondanza, nel cervello anche di individui sani, e una sua isoforma patologica, PrP^{Sc}, evidenziata solo negli individui infetti [1]. Secondo la teoria di Prusiner, la conversione di PrP^C

in PrP^{Sc} implicherebbe una diminuzione dell’ampiezza delle regioni ad α -elica della proteina normale con un conseguente aumento delle strutture a foglietto- β tipiche dell’isoforma patologica. Questi cambiamenti strutturali sarebbero la causa delle differenti proprietà biochimiche tra le due proteine, quali la resistenza al trattamento con proteasi, la solubilità e la capacità di formare aggregati [94].

L’identificazione delle TSE di natura familiare dovute a mutazioni a carico del gene *PRNP* non soltanto hanno dato supporto al ruolo centrale svolto dalla PrP nella patogenesi di queste malattie, ma hanno fornito delle solide basi alla “*Protein Only Hypothesis*”. Un altro importante dato sperimentale a favore della teoria di Prusiner è quello fornito dal gruppo di Charles Weissmann [89], che dimostra come topi privi del gene *PRNP* sono resistenti all’infezione quando inoculati con omogenati di cervello provenienti da individui affetti. Una ulteriore pietra miliare a supporto della teoria dei prioni fu l’osservazione che la proteina patologica catalizzava la conversione di PrP^C in PrP^{Sc} in un sistema *cell-free* [95].

Nonostante la “*Protein Only Hypothesis*” spieghi numerose evidenze delle TSE, vi è un punto debole che continua ad essere messo in risalto dai detrattori di questa teoria [96]. Le malattie da prioni sono caratterizzate dalla presenza di differenti ceppi prionali che divergono nei tempi di incubazione, nelle caratteristiche cliniche e dal punto di vista neuropatologico [2]. Nelle malattie infettive, solitamente, ceppi differenti sono dovuti a mutazioni o polimorfismi presenti nel genoma dell’agente infettivo. Per conciliare la presenza di ceppi differenti con l’idea di un patogeno costituito dalla sola componente proteica, è stato proposto che i ceppi prionali presentino delle alterazioni nella loro conformazione o nello stato di aggregazione che possono replicare con successo a spese della PrP^C dell’ospite [2]. Questi differenti ceppi della PrP^{Sc} potrebbero avere differenti capacità sia di azione, nel catalizzare la conversione di PrP^C, sia nell’interessare regioni distinte del cervello, causando la comparsa di sintomi diversi e alterazioni neuropatologiche caratteristiche di un determinato ceppo prionico [97].

Un’altra evidenza poco conciliante con la teoria di Prusiner è che, pur esistendo nella maggior parte dei casi una correlazione tra la presenza e la quantità di PrP^{Sc} e l’infettività, sono stati riportati casi di infezione in assenza di una quantità rilevabile di proteina alterata [98] o di campioni con una abbondante presenza di PrP^{Sc} in assenza di malattia [99]. Per spiegare questi dati, i sostenitori della teoria dei prioni sostengono che, nonostante la resistenza alla digestione proteolitica sia una caratteristica tipica dell’isoforma patologica PrP^{Sc}, essa non va di pari passo con l’infettività e che solo una parte della proteina infettiva sia resistente alle proteasi [100].

Anche se non è mai stato identificato un acido nucleico esogeno specificatamente associato all’agente infettivo delle TSE, alcuni gruppi hanno riportato la presenza di piccole quantità di

acidi nucleici in campioni provenienti da individui infetti [96, 101]. Inoltre, è stato dimostrato che la PrP^{Sc} è in grado di interagire con alta affinità con gli acidi nucleici, specialmente RNA [102, 103], e che quest'ultimo può aiutare il processo di conversione della proteina prionica in prione [104].

Un altro argomento spesso usato contro l'ipotesi dei prioni è l'assenza di una origine infettiva per altre malattie neurodegenerative associate ad un cambiamento strutturale di proteine e alla loro aggregazione, come, ad esempio, il morbo di Alzheimer o di Parkinson. In queste patologie, l'interazione tra proteina normale e proteina alterata porta alla formazione di nuove proteine patologiche con un processo molto simile al meccanismo di conversione ipotizzato per la PrP [105, 106].

In ogni caso, la prova più importante per confermare la “*Protein Only Hypothesis*” non è ancora stata ottenuta: la generazione della particella infettiva *in vitro*. Se l'agente infettivo è l'isoforma patologica PrP^{Sc} e la sua replicazione è promossa dall'interazione con la proteina prionica cellulare, allora l'intero processo dovrebbe essere riproducibile *in vitro*. Questo esperimento è ritenuto dalla maggior parte degli scienziati che si occupano di prioni come l'ultima e definitiva prova della teoria di Prusiner.

Le evidenze scientifiche a favore della “*Protein Only Hypothesis*” sono comunque numerose e stanno trasformando il concetto di “prione” in un nuovo dogma, con vaste implicazioni per diverse aree della biologia. I prioni, definiti come proteine infettive in grado di trasmettere un'informazione biologica attraverso la propagazione di una proteina con una diversa conformazione, rappresentano infatti un nuovo meccanismo nel quale non vi sono alterazioni nel genoma dell'individuo. Fino a che non sarà possibile generare *in vitro* il prione, rimane comunque la possibilità che la PrP^{Sc} non sia la sola e unica componente dell'agente infettivo che causa le encefalopatie spongiformi trasmissibili.

2.2 La proteina prionica cellulare

Il gene *PRNP* è localizzato, nell'uomo, nel cromosoma 20 e codifica per una glicoproteina di membrana la cui sequenza, prima del processamento, è di 253 a.a. Nella forma matura, i primi 22 residui aminoacidici vengono rimossi dopo la traduzione, mentre gli ultimi 23 a.a. vengono anch'essi rimossi prima dell'aggiunta dell'ancora di glicosil-fosfoinositolo (GPI) alla serina in posizione 230 [108]. La proteina prionica cellulare è localizzata a livello extracellulare, ancorata alla superficie esterna della membrana plasmatica attraverso l'ancora GPI (fig. 2.1).

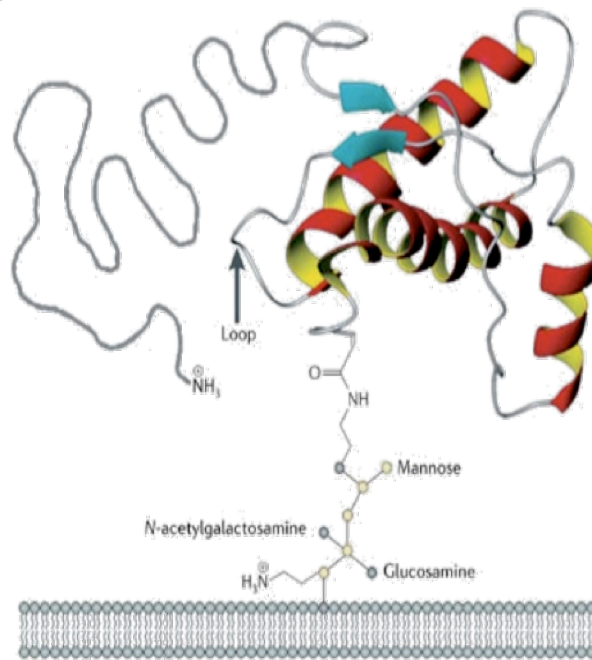


Figura 2.1: Localizzazione cellulare della proteina prionica. (Tratto e modificato da [121])

Inoltre, essa può andare incontro a glicosilazione facoltativa mediante l'aggiunta di due zuccheri ai residui di asparagina in posizione 181 e 197 della sequenza aminoacidica, presentandosi perciò in forma mono-, di- o non-glicosilata [109, 110]. Le tre forme della PrP^C sono presenti sulla superficie cellulare approssimativamente in rapporto 75:20:5 [111]. Sebbene il ruolo di tale glicosilazione rimanga sconosciuto, è stato ipotizzato un suo possibile coinvolgimento nel *trafficking* cellulare e nella funzione della proteina [111].

La PrP^C consta di due regioni con caratteristiche strutturali distinte. Nei mammiferi, la porzione N-terminale presenta una sequenza octapeptidica PHGGSWGQ (OR) che può essere ripetuta per un numero di volte variabile a seconda della specie. Ognuna di queste sequenze di otto aminoacidi è in grado di legare metalli divalenti quali, ad esempio, il rame, anche se il ruolo fisiologico di queste interazioni rimane ancora sconosciuto [112]. L'N-terminale della proteina prionica umana presenta cinque ripetizioni OR e una regione altamente idrofobica (HC, *hydrophobic core domain*) preceduta da una regione idrofilica, denominata CC (*charge cluster*) (fig. 2.2).

La regione N-terminale, fino al residuo 120, non risulta strutturata, mentre il C-terminale è caratterizzato dalla presenza di una porzione globulare con tre α -eliche (H1, H2, H3) e un corto tratto a foglietto- β antiparallelo (S1, S2) [113] (fig. 2.2) stabilizzato da dei legami

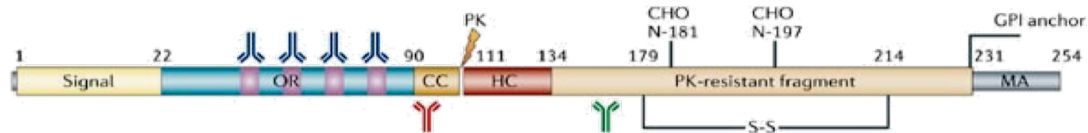


Figura 2.2: Rappresentazione schematica della proteina prionica cellulare. (Tratto e modificato da [121])

idrogeno. Tra i due residui di cisteina 179 e 214 è presente un ponte disolfuro che lega le eliche H2 e H3 stabilizzando la struttura terziaria della proteina.

La PrP^C viene espressa ubiquitariamente già negli stadi iniziali dell'embriogenesi e, nell'individuo adulto, risulta particolarmente abbondante nei neuroni, nelle cellule cardiache, nei muscoli e nel tessuto linfo-reticolare [2]. Essa viene sintetizzata a livello del reticolo endoplasmatico e attraversa l'apparato del Golgi prima di essere veicolata alla membrana plasmatica [114]. Dopo la sua sintesi, la proteina va incontro a processamento durante il quale si ha la rimozione del peptide segnale presente nella regione N-terminale, l'aggiunta dei due gruppi oligosaccaridici (facoltativa), la formazione dei ponti disolfuro e l'aggiunta dell'ancora GPI che permette la sua associazione con i *lipid rafts* della membrana plasmatica. Una volta raggiunta la superficie della cellula, la PrP^C può essere internalizzata o attraverso delle vescicole rivestite di clatrina oppure attraverso le *caveolae* [114, 115]. Non è del tutto noto quali siano i fattori che determinano la scelta dell'una o dell'altra delle vie di internalizzazione anche se potrebbe essere dovuto in parte al tipo cellulare o al microambiente della regione della membrana dove è localizzata la proteina [116]. E' stato anche proposto che l'endocitosi di PrP^C attraverso le vescicole di clatrina possa essere dovuta alla sua associazione con una proteina accessoria non ancora identificata ma che presenta un segnale per il reclutamento della clatrina [115]. Dopo essere stata internalizzata, la proteina prionica cellulare transita attraverso il compartimento endosomiale dal quale successivamente viene reciclata alla superficie cellulare o direzionata ai lisosomi per essere degradata [117]. La PrP^C si muove quindi ciclicamente dalla membrana plasmatica al compartimento endosomiale e viceversa [118] e queste osservazioni hanno fatto ipotizzare che il *trafficking* intracellulare della proteina prionica possa essere associato al *pathway* endosomiale della cellula coordinato dai *Multivesicular bodies* (MVBs) [119].

L'individuazione del percorso intracellulare della PrP^C è di fondamentale importanza per determinare i possibili meccanismi che intervengono nella replicazione del prione e nella sua diffusione. Studi recenti dimostrano che esosomi contenenti l'isoforma patologica della proteina sono in grado di mediarne il trasporto alle cellule adiacenti e di favorirne il contatto con la PrP^C, diventando un mezzo di infettività [120].

Nonostante i numerosi studi, il ruolo fisiologico di PrP^C rimane ancora sconosciuto. La

sequenza di PrP^C risulta altamente conservata durante l'evoluzione, specialmente in quelle regioni che codificano i domini flessibili della proteina. Ciò ha fatto ipotizzare che essa possa svolgere un'importante funzione fisiologica. La dimostrazione però che topi *knock out* (KO) per il gene *PRNP* non presentano alcun fenotipo letale né disfunzioni nello sviluppo embrionale o nella vita da adulti [88] dimostrano che essa non svolge alcuna funzione indispensabile per la vita dell'individuo.

L'identificazione dell'attività biologica della PrP^C è un passo fondamentale per la comprensione della patogenesi delle malattie da prioni, dato che l'alterazione della funzione che essa svolge nella cellula potrebbe giocare un importante ruolo nella patologia. Le ipotesi sul suo ruolo sono numerose: potrebbe essere coinvolta nell'immunoregolazione, nella via della trasduzione del segnale, nella protezione dagli stress ossidativi, nella trasmissione sinaptica, nei processi apoptotici oppure, vista la sua localizzazione extracellulare, agire da recettore [121].

E' stato dimostrato che la proteina prionica cellulare è particolarmente concentrata nel cervello, prevalentemente nei neuroni del cerebello, della corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nella medulla e nel talamo [122]. Un grande interesse da parte dei ricercatori è indirizzato a definire il ruolo fisiologico di PrP^C nei neuroni. E' stato ipotizzato che essa sia implicata nello sviluppo del sistema nervoso centrale dato che è in grado sia di legarsi alle molecole di adesione cellulare presenti nei neuroni, sia di agire da recettore [123]. Data la sua localizzazione a livello della membrana plasmatica, accoppiata con la tirosin-chinasi Fyn, PrP^C potrebbe agire da recettore in grado di intervenire nel trasferimento del segnale intracellulare [124]. Sempre a livello del sistema nervoso centrale, PrP^C interviene nella trasmissione sinaptica e nella riorganizzazione dei circuiti neuronali dell'ippocampo [125]. Altre funzioni fisiologiche interessate dalla PrP^C sono la regolazione dei ritmi circadiani [126], la memoria e lo sviluppo delle capacità cognitive [127, 128].

2.3 Il polimorfismo 129M/V

Nella sequenza aminoacidica della proteina prionica sono presenti due polimorfismi, 129M/V e 219E/K, che possono influenzare il fenotipo clinico dovuto alla presenza di una mutazione a carico del gene *PRNP*. Un ruolo particolarmente importante nella patogenesi delle TSE umane è svolto dalla presenza, in posizione 129, dei residui di metionina o valina. Pur non essendo di per se stesso patologico, questo polimorfismo può influenzare sia l'insorgenza che il decorso clinico di una specifica patologia nelle forme infettive, sporadiche o genetiche di TSE [54, 55, 56]. E' stato infatti ipotizzato che un residuo di valina in posizione 129 possa rendere la PrP maggiormente instabile, aumentando la sua tendenza ad assumere una

conformazione alterata [57]. Il maggior contenuto di regioni β -sheet che contraddistingue la PrP^{Sc} interessa infatti la regione della proteina prionica nella quale è presente il polimorfismo in posizione 129 e l'omozigosi in tale posizione è stata messa in relazione con la maggiore incidenza sia dei casi di CJD sporadica che della vCJD [28, 58]. Inoltre, esso influenza il fenotipo dovuto alla presenza della mutazione D178N, che può causare la comparsa di CJD o di IFF in associazione rispettivamente a V o M in posizione 129 [54]. Pur non essendoci un diretto contatto tra le regioni proteiche nelle quali sono localizzate M/V129 e D178N, sono presenti due legami idrogeno tra l'asparagina 178 e due regioni nella struttura a foglietto β , una delle quali è adiacente alla posizione 129. L'alterazione causata in questa regione dalla mutazione D178N si pensa possa essere modulata dalla natura del residuo aminoacidico presente in posizione 129, che quindi sarebbe in grado di causare l'una o l'altra delle due patologie [59]. L'interazione specifica tra le posizioni 129 e 178 evidenziate nella struttura NMR della proteina prionica sembrano confermare questa ipotesi e le osservazioni che il polimorfismo M/V129 non ha alcun effetto nella determinazione del fenotipo di TSE ereditarie associate ad altre mutazioni [59].

2.4 Il prione

Secondo la “*Protein Only Hypothesis*”, accettata dalla maggior parte dei ricercatori, l'agente eziologico delle TSE è una isoforma conformazionale della proteina prionica cellulare, il prione PrP^{Sc}.

Le due isoforme presentano la stessa struttura covalente e differiscono esclusivamente nella loro struttura tridimensionale. La teoria di Prusiner va perciò ad infrangere uno dei principali dogmi della biologia, che afferma che una sequenza aminoacidica può determinare una sola conformazione tridimensionale [129]. La principale differenza tra PrP^C e PrP^{Sc} risiede nella presenza nella prima di ampie regioni con strutture secondarie ad α -elica e nella seconda di una maggior quantità di strutture a foglietto- β (fig. 2.3), nonostante la sequenza aminoacidica del prione corrisponda esattamente, ad eccezione delle forme ereditarie di TSE, a quella codificata dal gene *PRNP* dell'ospite [94].

La transizione strutturale si accompagna a profondi cambiamenti nelle proprietà fisico-chimiche della proteina. Ad esempio, la differente conformazione del segmento che va dai 90 ai 125 residui aminoacidici, dove è presente il sito riconosciuto dalla proteinasi K, conferisce alla PrP^{Sc} la peculiare resistenza alla degradazione proteolitica, dato che il sito di taglio non ha più la struttura disordinata e accessibile all'enzima come nella PrP^C. Inoltre, il prione risulta insolubile e acquisisce la capacità di formare aggregati amiloidi [94].

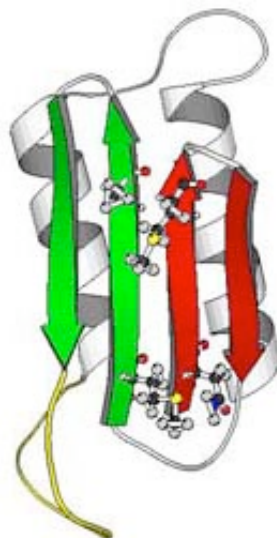


Figura 2.3: Schematizzazione della struttura del prione. (Tratto da <http://library.thinkquest.org>)

La struttura della proteina prionica cellulare è stata stabilita e ciò ha fornito importanti dati sull'influenza delle diverse regioni di PrP^C nel processo di conversione in PrP^{Sc}. In particolare, la sequenza aminoacidica che comprende i residui 165-171 mostra un'ampia variabilità nelle diverse specie, facendo ipotizzare che essa possa influenzare le interazioni intramolecolari specie-specifiche, forse agendo da sito di nucleazione nel processo di conversione [130]. Al contrario, la struttura della PrP^{Sc} deve ancora essere stabilita con precisione, dato che non è ancora stato possibile ottenere la proteina sufficientemente purificata per permettere degli studi strutturali ad alta risoluzione. Dai tentativi di purificazione del prione da cervelli di animali infetti si sono infatti ottenuti, fino ad oggi, gruppi eterogenei di aggregati di PrP^{Sc} non utilizzabili per la caratterizzazione mediante spettroscopia NMR o cristallografia ai raggi X [130]. Queste difficoltà sperimentali e la conseguente carenza di dati hanno fatto sì che gli studi si siano principalmente rivolti alla determinazione della struttura secondaria della proteina patologica. Mediante spettroscopia elettronica, è stato possibile caratterizzare gli aggregati di PrP^{Sc}, dimostrando una loro ampia variabilità morfologica che va dalla formazione di fibrille ordinate alla deposizione di aggregati amorfi [130]. Studi mediante dicroismo circolare hanno mostrato che il prione può presentare fino al 50% di strutture a foglietto- β antiparallele, mantenendo anche ampie regioni ad α -elica della PrP^C originale [131].

Nonostante l'assenza di dati ad alta risoluzione, sono stati proposti due modelli strutturali per la PrP^{Sc}. Il modello " β -elica", proposto da Cohen e collaboratori [132] studiando la PrP di criceto, ipotizza che i principali cambiamenti conformazionali che avvengono durante il processo di conversione da proteina prionica a prione interessino i residui 90-112 della se-

quenza aminoacidica (fig. 2.4i). Il foglietto- β formerebbe una regione a β -elica che interessa i residui 89-175 formando dei trimeri. I ponti disolfuro e la glicosilazione sarebbero esclusi dal core a β -elica, come pure non sarebbe interessata la porzione C-terminale della proteina, comprese le α -eliche 2 e 3 [132].

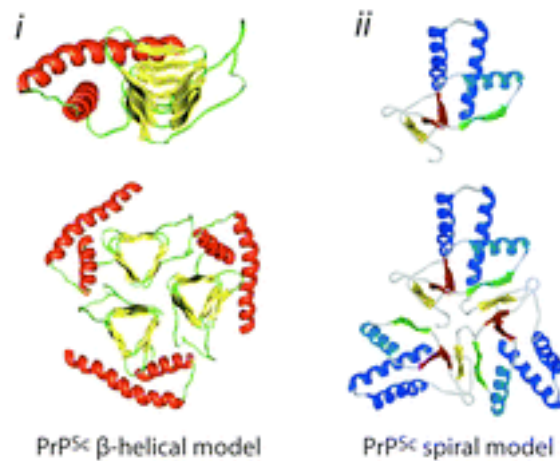


Figura 2.4: Modelli strutturali proposti per la PrP^{Sc}. i) Modello “ β -elica”; ii) modello “a spirale”. (Tratto e modificato da [134]).

Una ipotesi alternativa è stata proposta da DeMarco e Daggett [133]. Secondo questo modello “a spirale”, vi sarebbero quattro regioni a foglietto- β , denominate E1-E4, che interesserebbero i residui 116-164. A differenza di quanto previsto dal modello “ β -elica”, esse non andrebbero ad interessare in alcun modo le originali regioni ad α -elica, che rimarrebbero perciò inalterate rispetto a quelle native [133] (fig. 2.4ii).

Una peculiare caratteristica dei prioni è la presenza, nonostante la PrP risulti altamente conservata durante l’evoluzione, di diversi ceppi. Ognuno di essi è caratterizzato da tempi diversi di incubazione prima della comparsa della patologia, diversa distribuzione dei depositi nel cervello e dalla manifestazione di sintomi diversi [136]. Inoltre essi sono distinguibili per i diversi parametri biochimici che li caratterizzano come, ad esempio, il profilo di glicosilazione, di denaturazione e il diverso peso molecolare. Queste diversità tra i ceppi prionali sembrano essere dovute alla conformazione assunta dalla PrP^{Sc}, pur in assenza di una grande variabilità nella sequenza aminoacidica delle proteine.

Una importante conseguenza di ciò, è che solitamente il prione di una specie si trasmette ad una specie differente in maniera molto meno efficiente rispetto alla sua trasmissione intra-specie. E’ presente perciò una barriera di specie nella trasmissione dei prioni che solitamente impedisce che una specie ospite venga infettata da un prione esogeno [136]. In alcuni casi,

come nella comparsa della BSE in seguito all'utilizzo di farine animali di origine ovina e, nell'uomo, della vCJD, tale barriera è stata però superata con lo sviluppo di una nuova TSE.

2.5 Dalla proteina prionica al prione: il meccanismo di conversione

L'infezione da prioni è un evento del tutto particolare non soltanto perchè coinvolge una proteina infettiva, ma anche per i cambiamenti conformazionali della proteina che si verificano durante l'infezione.

La propagazione dei prioni, intrinsecamente legato al cambiamento conformazionale della proteina prionica cellulare nella sua isoforma patologica, è stata inizialmente descritta come dovuta ad un *refolding* eterodimerico [138]. Secondo questo modello, la PrP^C è meno stabile, dal punto di vista termodinamico, rispetto alla PrP^{Sc} ma la conversione spontanea da una forma all'altra è limitata dal punto di vista cinetico. Un passaggio cruciale nel meccanismo di conversione sarebbe la formazione di un eterodimero tra i due monomeri di PrP^C e PrP^{Sc}, con il secondo che agisce da stampo per promuovere il cambiamento conformazionale della proteina normale. Una cospicua quantità di PrP^C che si rileva negli aggregati isolati da cervelli di pazienti infetti presenta una struttura corrispondente a quella tipica della specie ospite [135]. Questo suggerisce che, durante il processo infettivo, il prione non replichi se stesso, bensì sia in grado di "insegnare" alla proteina prionica cellulare ad acquisire una struttura secondaria modificata [2, 136]. In altre parole, i prioni sembrano replicare loro stessi avvantaggiandosi della loro stretta similarità con la proteina normale e agendo da stampo sul quale la PrP^C dell'ospite si modifica divenendo una nuova molecola di PrP^{Sc}.

La capacità dell'isoforma patologica di formare aggregati causa il suo accumulo e il danno cellulare. Il meccanismo neurodegenerativo che si accompagna all'accumulo di PrP^{Sc} nel cervello rimane ancora da chiarire anche se vi sono sempre più evidenze sperimentali che indicano un possibile coinvolgimento della via apoptotica [137].

Ma qual è il sito nel quale le due proteine vengono in contatto e dove avviene il processo di conversione?

Studi recenti dimostrano che esosomi contenenti la PrP^{Sc} sono in grado di mediarne il trasporto nelle cellule adiacenti e di favorirne il contatto con la PrP^C [139]. Alla luce di queste osservazioni è stato ipotizzato che proprio a livello endosomiale venga favorita la conversione della proteina prionica in prione e che gli esosomi forniscano il mezzo di diffusione della PrP^{Sc} ad altri tessuti dell'ospite (fig. 2.6) [139]. La membrana esosomiale potrebbe rappresentare infatti un ambiente favorevole per il meccanismo di conversione e la forma-

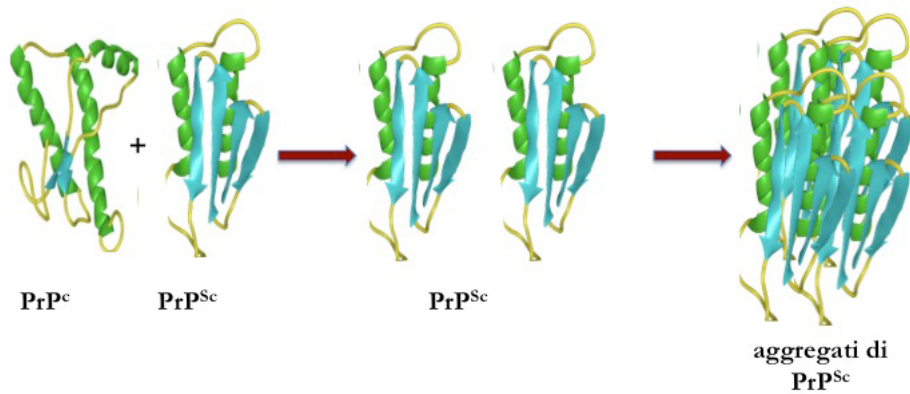


Figura 2.5: Meccanismo di conversione della proteina prionica cellulare nella sua isoforma patologica.

zione di fibre amiloidi [116]. E' stato proposto che il cambiamento conformazionale avvenga a bassi valori di pH, e quindi un possibile scenario potrebbe coinvolgere l'internalizzazione degli esosomi e la fusione con la loro membrana, attraverso un meccanismo simile al processo di fusione delle vescicole interne dei *Multivesicular bodies* che avviene nelle cellule dendritiche [116].

Tuttavia, nessuna evidenza sperimentale ha, fino ad oggi, fornito elementi certi in questo senso e l'esistenza di tali meccanismi rimane ancora solo un'ipotesi.

2.6 La via di infezione

Nonostante il sistema nervoso centrale sia il bersaglio principale dei prioni, una piccola quantità di PrP^{Sc} si replica e si accumula negli organi linfoidi secondari, quali linfonodi e milza, e nei tessuti periferici molto prima di comparire nel cervello [140, 141]. I prioni entrano nell'organismo perifericamente per via orale e successivamente si trasferiscono al tratto gastrointestinale, migrano nel sistema linforeticolare e qui propagano [142].

Una grande varietà di cellule specializzate, come ad esempio le cellule dendritiche follicolari, le cellule M e i linfociti B, sono implicate nell'ingresso, nella migrazione e nella propagazione dei prioni [136] ma la loro diffusione nel sistema linforeticolare non sembra ricoprire un ruolo fondamentale nel passaggio della PrP^{Sc} al SNC. I linfociti B si pensa forniscano una serie di chemochine e citochine in grado di attivare la proliferazione delle cellule follicolari dendritiche nelle quali la PrP^C è normalmente espressa, esposta in membrana e dove la replicazione del prione sembra notevolmente favorita [143].

L'innervazione di tipo simpatico degli organi linfoidi, suggerisce che il sistema nervoso autonomo sia il principale responsabile del trasporto dei prioni dagli organi periferici al

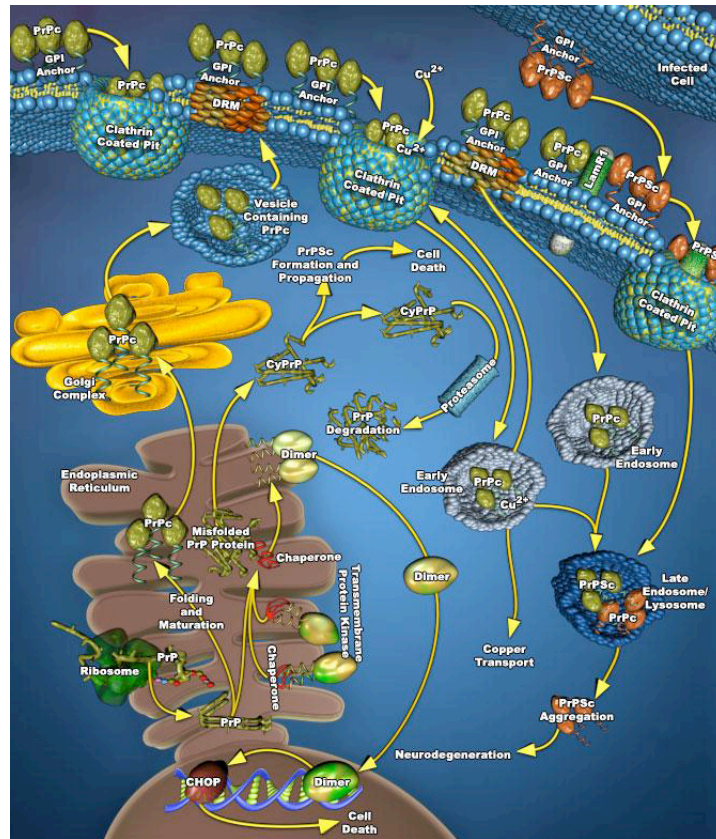


Figura 2.6: Trafficking intracellulare della PrP. (Tratto da www.appliedbiosystems.com)

sistema nervoso centrale[144]. Una volta raggiunto il SNC, la PrP^{Sc} è in grado di causare la morte delle cellule e il processo neurodegenerativo a livello del cervello.

Non è ancora chiaro come il prione, dopo il suo ingresso nel tratto gastrointestinale, attraversi l'epitelio intestinale, anche se alcune evidenze sperimentali fanno ipotizzare che ciò avvenga attraverso transitosi mediata dalle cellule M [134] (fig. 2.7A i), oppure transitosi ferritina-dipendente attraverso le cellule dell'epitelio intestinale (fig. 2.7A ii) o attraverso una via più diretta che coinvolge le cellule dendritiche (fig. 2.7A iii).

Mentre cellule fagocitiche come i macrofagi sembrano implicate nella degradazione della proteina (fig. 2.7A iv), le cellule dendritiche potrebbero guidare il prione alle cellule dendritiche follicolari (FDC) dove si ha un primo accumulo della PrP^{Sc} (fig. 2.7A v).

Una volta attraversata la parete intestinale e dopo un periodo di incubazione nei tessuti linfoidi come la milza, il prione raggiunge il SNC attraverso il sistema nervoso enterico. Ciò avviene in direzione retrograda lungo differenti nervi sia del sistema simpatico (come il nervo splanchnico) sia del parasimpatico (come il nervo vago) [145] (fig. 2.7B). È stato ipotizzato che il trasporto retrogrado e la propagazione della PrP^{Sc} lungo le fibre nervose possa avvenire

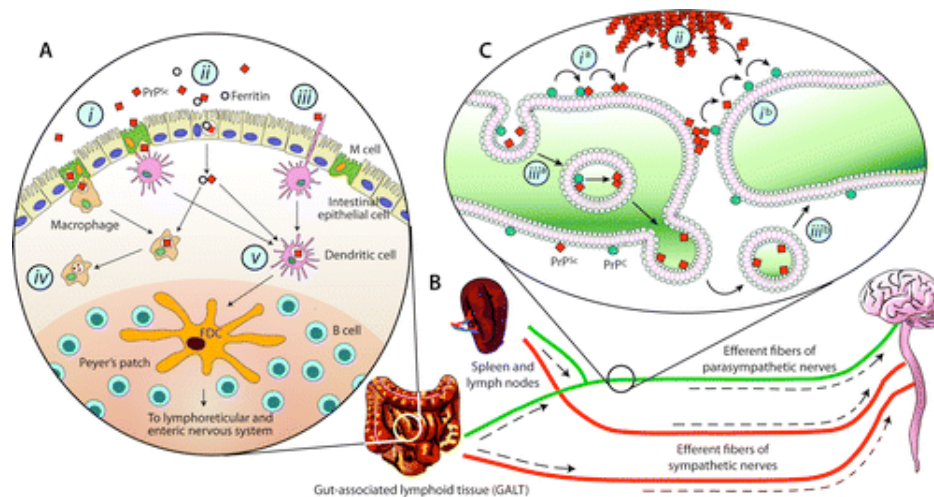


Figura 2.7: Rappresentazione schematica dell'ipotetica via seguita dalla PrP^{Sc} per raggiungere il CNS. A) Passaggio dal lume intestinale che si ipotizza possa avvenire secondo diversi meccanismi (indicati come i, ii, iii, iv, v); B) passaggio al sistema nervoso centrale; C) trasporto retrogrado e propagazione del prione lungo i nervi. (Tratto da [134])

o lungo la superficie cellulare (fig. 2.7C i^a e i^b) con un contatto diretto tra la proteina prionica cellulare e la forma patologica, attraverso il passaggio extracellulare di aggregati di proteina (fig. 2.7C ii), oppure attraverso un meccanismo mediato da vescicole (fig. 2.7C iii^a e iii^b) [145]. Una volta raggiunto il SNC, il prione causa l'infezione del tessuto cerebrale con la conseguente comparsa della caratteristica degenerazione spongiforme e l'attivazione degli astrociti.

Drosophila melanogaster come modello animale

L'utilizzo di organismi modello nella ricerca biologica non è certamente un fatto nuovo. La maggior parte delle nostre conoscenze dei processi fondamentali che intervengono nella regolazione genica derivano infatti da studi condotti su batteri, tanto da portare Jaques Monod ad affermare "Ciò che è vero per *Escherichia coli* è vero anche per l'elefante!".

Due importanti considerazioni sono alla base della possibilità di utilizzare nella ricerca medica organismi più semplici rispetto all'uomo. Prima di tutto, i più importanti processi biologici sono rimasti essenzialmente immutati durante l'evoluzione e perciò risultano altamente conservati tra uomo e organismi più semplici. In secondo luogo, questi processi possono essere rivelati e analizzati con più facilità in organismi semplici non dovendosi scontrare con la complessità dell'organismo uomo.

In che modo un modello animale come *Drosophila* può contribuire ad aumentare le nostre conoscenze delle malattie neurodegenerative umane?

Fino a 15 anni fa, la maggior parte dei neurologi e neurobiologi avrebbe risposto: "In nessun modo!" e questo non sarebbe poi stato così lontano dalla verità. I recenti progressi nella nostra comprensione delle basi molecolari delle malattie neurodegenerative da un lato, e della genetica del moscerino della frutta dall'altro, hanno reso possibile sviluppare modelli basati su *Drosophila* per approfondire le basi patofisiologiche dei disordini neurologici che affliggono l'uomo. Progressi considerevoli sono stati fatti anche nell'ambito dell'apprendimento, dei meccanismi della memoria e dei ritmi circadiani [152].

Gli studi condotti su *Drosophila* hanno modificato la nostra concezione delle relazioni evolucionistiche tra vertebrati e invertebrati. L'uomo e il moscerino della frutta condividono

numerose famiglie di geni in relazione sia alla loro funzione che alla struttura [146]. Come accennato in precedenza, fondamentale nell'utilizzo degli invertebrati come modelli di malattie neurodegenerative è il presupposto che i processi di base che sottendono alla biologia dell'uomo e di *Drosophila* siano conservati.

Ma quanto simili sono uomini e moscerini?

Alcune vie molecolari che portano allo sviluppo di un organismo complesso, come, ad esempio, la formazione degli assi del corpo, l'organogenesi, la formazione del sistema nervoso e il controllo della proliferazione cellulare, sono altamente conservate, nonostante la divergenza evolutiva tra il moscerino e l'uomo [147].

Certamente, ci sono anche importanti differenze tra questi due organismi che devono comunque essere ben tenute in considerazione quando si vuole sviluppare un modello di questo tipo. Ad esempio, i moscerini presentano un sistema circolatorio e processi cognitivi molto più semplici.

Un processo di interesse nell'uomo può essere studiato nel moscerino se può dare origine a manifestazioni che mostrano caratteristiche simili a quelle osservate nell'uomo stesso. Se ciò avviene, un approccio genetico di questo tipo può essere applicato per studiare quel determinato meccanismo patogenetico. Inoltre, possono essere generate mutazioni che lo interessano senza fare assunzioni a priori sui meccanismi che in esso sono coinvolti. Questo approccio genetico potenzialmente può contribuire ad chiarire un processo patogenetico e rende *Drosophila* un sistema modello importantissimo nell'ambito della neurobiologia.

Difetti dello sviluppo, quali le malformazioni mesenchimali associate alla sindrome di Saethre-Chotzen [148], la formazione di inclusioni intracellulari in malattie dovute alla presenza di ripetizioni di poliglutamine (poliQ) come l'atassia spino-cerebellare e la corea di Huntington [149], e la perdita di controllo della crescita cellulare conseguente a mutazioni a carico di geni soppressori di tumori [150], sono stati efficacemente analizzati utilizzando il moscerino della frutta.

I molti processi biologici di base condivisi dalla *Drosophila* e dall'uomo, in concomitanza con il completamento del sequenziamento dell'intero genoma del moscerino della frutta [151], forniscono gli elementi necessari per poter effettuare analisi sistematiche in *Drosophila* di geni che causano malattie umane.

In definitiva, quali sono le patologie umane più adatte ad essere studiate in questo organismo modello?

A questa domanda hanno cercato di dare una risposta Reiter e colleghi [147] grazie ad uno studio volto a definire un insieme di geni associati a malattie umane che meglio possono avvalersi delle analisi genetiche e molecolari che si possono condurre in *Drosophila*. Infatti, non tutti i geni sono adatti a questo tipo di studio. E' possibile che alcuni di essi, pur essendo

comuni al moscerino e all'uomo, non svolgono le stesse funzioni in questi due organismi. Se si considerano, ad esempio, quelli implicati nell'uomo in patologie del sangue, essi possono svolgere funzioni differenti nel moscerino, che possiede un sistema di emolinfa più semplice se paragonato al sangue dei vertebrati [147]. In altri casi, può verificarsi che dall'analisi incrociata delle sequenze geniche di *Drosophila* e uomo possano essere identificati geni nel moscerino che sembrano in relazione con geni implicati in patologie umane, ma che in realtà non sono dei veri ortologi, non essendo funzionalmente equivalenti.

Per stabilire se un gene svolga nei due organismi funzioni simili e se si tratti quindi di un valido candidato per l'utilizzo del modello *Drosophila*, bisogna considerare alcuni criteri di base. Innanzitutto ci devono essere evidenze chiare che il gene sia implicato nella patologia e che la sua funzione sia poco conosciuta [147]. Dallo studio di Reiter è emerso che la maggior parte dei geni adatti allo studio nel moscerino della frutta è alla base di malattie neurologiche e neurodegenerative. Ciò è spiegabile con l'elevata conservazione durante l'evoluzione della maggior parte dei processi della neurogenesi, quali i fattori implicati nell'accrescimento degli assoni verso il loro sito bersaglio, gli enzimi e i complessi molecolari implicati nella sintesi e nel rilascio dei neurotrasmettitori [163, 164].

3.1 I vantaggi del modello *Drosophila*

In alcune circostanze, la relativa semplicità di *Drosophila*, se paragonata con l'organizzazione del genoma umano, può rappresentare un vantaggio, come nel caso in cui si voglia applicare un'analisi genetica.

Uno dei più importanti aspetti nell'utilizzo degli invertebrati è che possono essere oggetto di numerose manipolazioni genetiche che risultano invece impossibili nei mammiferi.

Come accennato, i vantaggi di del moscerino come modello animale sono molteplici. Innanzitutto, tra gli invertebrati, presenta la massima omologia con il genoma umano.

Il genoma di *Drosophila* è relativamente di piccole dimensioni. Analisi comparative con il genoma umano hanno rivelato che all'incirca il 75% dei geni che nell'uomo causano malattia presentano un ortologo nel moscerino [159, 147]. Esistono inoltre numerosi modi per manipolare l'espressione genica in *Drosophila*, ad esempio creando moscerini *knock-down* per un gene di interesse oppure generando moscerini transgenici che esprimano le forme *wild type* oppure mutate di un gene-malattia, che risultano relativamente più semplici e più rapidi rispetto ai modelli di vertebrati.

Inoltre, i moscerini della frutta possono essere facilmente allevati in laboratorio, hanno un tempo di generazione breve (all'incirca 10 giorni), e di conseguenza permettono una rapida analisi genetica. Si tratta di un organismo la cui anatomia e i cui processi di sviluppo sono

noti e ben caratterizzati, il suo genoma è stato interamente sequenziato e si possono ottenere individui transgenici con una certa facilità. Nello studio di malattie neurodegenerative, caratteristica fondamentale è che, tra gli invertebrati, *Drosophila* presenta un sistema nervoso altamente evoluto, con un cervello costituito all'incirca da 10^5 neuroni, con assoni ben sviluppati, sinapsi, neurotrasmettitori e glia. Inoltre, i componenti di base del sistema nervoso, quali le proteine sinaptiche, i canali ionici e i neurotrasmettitori stessi, risultano altamente conservati [153]. Ad esempio il moscerino della frutta è stato utilizzato con successo per la determinazione dei precursori neurali e la loro specificazione [161], così come l'identificazione dei geni che regolano la determinazione della direzione di allungamento degli assoni [162].

Queste caratteristiche, alle quali si aggiunge la possibilità di utilizzare un'ampia gamma di tecniche molecolari e genetiche, fanno di *Drosophila* un efficace modello per lo studio delle malattie neurodegenerative umane. Le funzioni neuronali, come ad esempio la trasmissione sinaptica, e la sopravvivenza possono essere valutate nel moscerino, così come l'apprendimento e la memoria.

Un altro importante vantaggio che fa di *Drosophila* un valido modello, è la possibilità di controllare finemente nel moscerino l'espressione di un gene di interesse. Ad esempio è possibile introdurre nel moscerino un transgene, farlo esprimere in specifiche strutture determinando così se e quando ciò induce la comparsa di un fenotipo che riproduce quello della malattia umana [149]. Nel caso in cui si generino fenotipi dominanti, vi è una maggiore possibilità di identificare delle mutazioni che siano in grado di sopprimere o accentuare il fenotipo. Un simile approccio non richiede che vi siano a priori conoscenze sulle caratteristiche biochimiche o molecolari di questi geni, o che se ne conosca il meccanismo d'azione.

3.2 Costruire un modello animale di *Drosophila*

Il moscerino della frutta permette di applicare allo studio della funzione genica due tipi di strategie: “*forward-genetics*” e “*reverse-genetics*”.

La “*forward-genetics*” costituisce un efficace metodo per investigare un ampio spettro di processi biochimici. Nei moscerini vengono introdotte delle mutazioni che vengono successivamente selezionate sulla base del fenotipo che esse inducono. Se un mutante manifesta, ad esempio, un fenotipo neurodegenerativo, se ne ricerca l'omologo umano. Esso risulta infatti un plausibile candidato per essere implicato in un disturbo di questo tipo [149].

Nonostante questo approccio sia molto utilizzato per analizzare altri problemi biologici, non costituisce la strategia ideale per studiare le malattie neurodegenerative. Oltre 20 anni di studi di “*forward-genetics*” in *Drosophila* hanno infatti permesso di acquisire importanti

conoscenze sui meccanismi fondamentali dello sviluppo del sistema nervoso ma poche informazioni riguardanti questo tipo di patologie. In alternativa, si può utilizzare quella che viene definita la “*reverse-genetics*”. In questo caso, viene identificato l’omologo del moscerino di un gene implicato in una malattia umana e vengono studiati i fenotipi che risultano dalla sua alterata espressione. Questi fenotipi vengono generati riducendo, eliminando o sopprimendo l’omologo del gene patologico allo scopo di comprendere la funzione del suo prodotto proteico [146].

L’approccio maggiormente utilizzato per esaminare un gene-malattia in *Drosophila* è quello di generare una mutazione “*loss-of-function*” nel gene omologo nel moscerino. Storicamente, questo veniva ottenuto utilizzando, ad esempio, sostanze chimiche mutagene o elementi trasponibili che andavano a distruggere il gene di interesse [165]. Gli elementi trasponibili sono impiegati, in *Drosophila*, anche per generare individui transgenici: gli elementi P, tipici del genoma del moscerino, vengono utilizzati come veicolo per l’inserimento di un gene esogeno all’interno del genoma ospite [166]. Questa tecnica permette di generare numerose linee indipendenti di moscerini transgenici per ogni costrutto di interesse.

Se la proteina che causa la patologia di interesse ha un effetto dominante, un altro approccio che si può utilizzare è quello di far sovraesprimere il transgene. Inoltre, grazie al sistema di espressione binario UAS/GAL4 (paragrafo 5.1.3), il transgene può essere espresso in più tessuti oppure in piccoli gruppi di cellule specifiche [167]. Questa stessa tecnica viene anche utilizzata per sopprimere l’espressione di un gene endogeno mediante *RNA-interference* (RNAi) [168] grazie all’utilizzo di un costrutto che esprime una forcina di RNA a doppio filamento in grado di sopprimere la traduzione in proteina o degradare l’omologo mRNA in maniera tessuto-specifica o in una determinata fase dello sviluppo [169, 170].

Una volta che il modello di *Drosophila* è stato sviluppato, il fenotipo risultante può essere studiato approfonditamente andando a determinare a livello cellulare o molecolare il processo patogenetico di interesse. Inoltre, è possibile andare ad identificare degli interattori molecolari, aprendo le porte alla successiva caratterizzazione molecolare del processo e alla possibilità di sviluppare degli approcci terapeutici (fig. 3.1).

Il moscerino della frutta ben si presta anche allo studio per lo sviluppo di farmaci o per testare rapidamente quali di questi possono essere efficaci contro una determinata patologia. Infatti, è possibile generare rapidamente grandi numeri di moscerini tutti geneticamente identici che possono essere utilizzati per uno *screening* di farmaci [165].

Esistono comunque delle limitazioni quando si testano in *Drosophila* dei composti che potenzialmente potrebbero essere utilizzati per curare patologie neurodegenerative umane. Ad esempio, il moscerino della frutta non presenta una barriera emato-encefalica che nell’uomo può impedire che il farmaco raggiunga il cervello. Inoltre, il metabolismo del moscerino

non è identico a quello dei mammiferi e non causa una forte risposta infiammatoria che potrebbe contribuire all'aggravamento della malattia. In ogni caso, anche i modelli murini possono differire dall'uomo in alcuni aspetti critici [172, 173]. Come con ogni modello dove un gene viene sovraespresso utilizzando un promotore esogeno e/o forme tronche di proteine associate a malattie umane, esistono perciò delle limitazioni che bisogna tenere in considerazione.

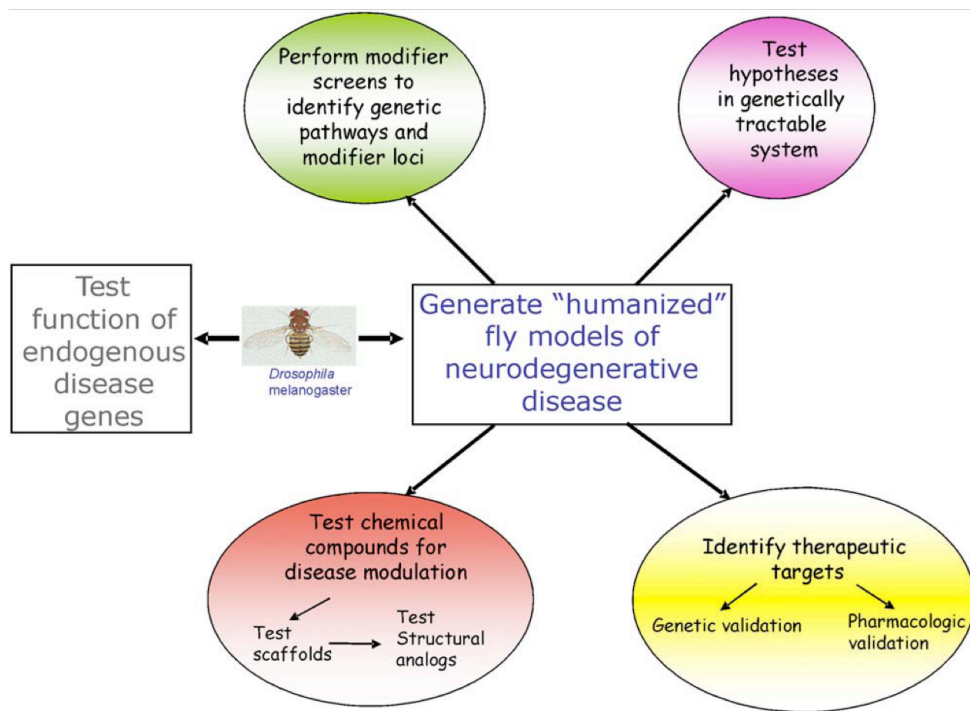


Figura 3.1: Rappresentazione schematica dell'applicazione di *Drosophila* allo studio di malattie neurodegenerative umane. (Tratto da [171])

Quando si vuole sviluppare un modello di *Drosophila* per lo studio di una malattia umana, bisogna inoltre avere ben presente che vi è il rischio che alcuni importanti fattori patogenetici siano specifici per i vertebrati e possano essere del tutto ignorati negli invertebrati. Ad esempio, disordini di natura immunologica, quale la sclerosi multipla, non possono essere studiati efficacemente nel moscerino della frutta [160]. Nonostante ciò, la maggior parte dei modelli di *Drosophila* sono in grado di riprodurre alcuni aspetti delle patologie umane anche se bisogna tenere a mente che le differenze tra gli invertebrati e i mammiferi rappresentano dei potenziali inconvenienti.

3.3 *Drosophila* come modello per lo studio di malattie neurodegenerative umane

Le malattie neurodegenerative umane comprendono un gruppo di patologie caratterizzate dalla progressiva perdita di specifiche popolazioni di neuroni che causa disabilità e molto spesso morte precoce. Pur trattandosi di malattie relativamente comuni e spesso altamente debilitanti, i meccanismi responsabili sono poco conosciuti e attualmente, per molte di esse, non esistono terapie efficaci.

La scoperta che disfunzioni e degenerazioni neuronali possono essere causate da mutazioni in singoli geni, ha aperto nuove opportunità per studiare i processi che sono alla base di queste malattie attraverso modelli cellulari *in vitro* o grazie alla generazione di animali transgenici che portano il gene che causa la patologia.

Negli ultimi anni sono stati identificati molti geni che causano malattie neurodegenerative di tipo ereditario, come la corea di Huntington, il morbo di Parkinson e di Alzheimer. Pur conoscendo i geni e i loro prodotti proteici, si sa ancora molto poco riguardo ai meccanismi di base che causano le disfunzioni neuronali e la morte delle cellule durante il decorso della malattia.

Facendo esprimere geni umani negli invertebrati, oppure studiando i geni omologhi in questi organismi modello, è stato possibile approfondire notevolmente le nostre conoscenze su questo gruppo di patologie. Il processo neurodegenerativo, oltre che nell'uomo, può avvenire anche in altri organismi per i quali sono a disposizione numerose tecniche genetiche e molecolari e che si presentano perciò come validi modelli sperimentali.

Anche se non ci si può aspettare che gli invertebrati siano in grado di riprodurre perfettamente tutti gli aspetti della patogenesi umana, vi sono numerose evidenze che avvalorano l'ipotesi che le risposte di base ai danni cellulari siano conservate [153]. Modelli transgenici utilizzati nello studio di queste malattie sviluppano una progressiva neurodegenerazione, spesso associata alla comparsa di inclusioni nucleari simili a quelle presenti nella patologia umana [146, 182].

Di seguito sono riportati alcuni esempi di studi riguardanti malattie neurodegenerative umane condotti con successo utilizzando *Drosophila* come modello animale.

3.3.1 *Drosophila* e malattie da poliglutamine

I disordini dovuti a ripetizioni di poliglutamine sono numerosi ma presentano uno stesso meccanismo patologico a livello molecolare: una espansione di un tratto poliglutaminico

che conferisce alla proteina proprietà tossiche che causano l'insorgenza di una progressiva disfunzione neuronale [174, 175, 176].

I geni che causano due distinte malattie da poliglutamine nell'uomo, la corea di Huntington e la malattia di Machado-Joseph, sono stati utilizzati per creare *Drosophilae* transgeniche. L'espressione di questi geni a livello dell'intero sistema nervoso del moscerino ha indotto la comparsa di fenotipi che richiamano strettamente le caratteristiche delle due patologie nell'uomo: una neurodegenerazione progressiva e la comparsa di aggregazioni delle forme mutate delle proteine all'interno del nucleo delle cellule [177, 178]. Inoltre, come avviene nell'uomo, in *Drosophila* si assiste ad una dipendenza diretta della gravità del fenotipo patologico dalla lunghezza del tratto di poliglutamine ripetute [149].

Nell'uomo, i disordini dovuti a poliglutamine vedono coinvolti soltanto il sistema nervoso, pur essendo le proteine generalmente espresse ubiquitariamente [174, 175, 176]. In *Drosophila*, dove è possibile direzionare l'espressione della proteina mutata in differenti tessuti, è stato visto che alcune cellule (compresi i neuroni) sono maggiormente sensibili alla proteina patologica rispetto ad altre [178].

Da studi *in vitro* è emerso che la proteina implicata nella corea di Huntington è substrato delle caspasi [179] e quindi è possibile una implicazione della via apoptotica nella neurodegenerazione che si riscontra in questa malattia. L'utilizzo del moscerino della frutta, del quale sono noti numerosi mutanti delle caspasi e di altri elementi che compongono la via apoptotica, permette di verificare con maggiore facilità e velocità questa ipotesi.

Per identificare nuovi geni in grado di modificare l'effetto tossico dei tratti poliglutaminici, sono stati generati numerosi modelli di *Drosophila* che ricapitolano le principali caratteristiche neuropatologiche. *Screening* genetici su questi modelli hanno permesso di identificare geni che mediano la tossicità del tratto poliglutaminico [180]. È stato visto, ad esempio, che la soppressione degli effetti tossici era effettiva per tratti di poli-Q di diversa lunghezza e in diversi tipi cellulari nei quali veniva fatto esprimere il gene *dmlf*. Si può supporre che *dmlf* agisca bloccando i siti di legame necessari per la formazione degli aggregati di poliglutamine [180].

L'identificazione dei geni e delle vie biochimiche che modificano la tossicità dei tratti poli-Q in *Drosophila* potrebbe portare alla identificazione di nuovi bersagli terapeutici. Questo è stato dimostrato mediante la soppressione della tossicità del tratto poliglutaminico nei moscerini grazie all'utilizzo di farmaci che inibiscono il processo di deacetilazione degli istoni coinvolti nella struttura dei cromosomi e nella trascrizione genica [181].

3.3.2 *Drosophila* e morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson è tra i più comuni disordini di tipo neurodegenerativo. Nonostante nel moscerino non sia presente il gene omologo a quello umano codificante l' α -sinucleina, l'espressione in *Drosophila* a livello neuronale sia della forma *wild type* che di quella mutata della proteina umana, induce la comparsa di un fenotipo che ricapitola quello della malattia nell'uomo [182, 183]. Infatti, nel moscerino compare una degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici che ha la caratteristica di essere progressiva e che causa fenotipi motori. Si osserva inoltre, dal punto di vista istopatologico, la comparsa di inclusioni citoplasmatiche simili ai corpi di Lewy [182, 184].

E' stato dimostrato che facendo sovraesprimere in *Drosophila* la proteina umana HSP70 si previene la morte dei neuroni dopaminergici associata all'espressione di α -sinucleina [183, 185] e che l'espressione di un mutante di HSP70 nel sito di legame con l'ATP, che induce un fenotipo dominante negativo, accelera la degenerazione, facendo anticipare l'insorgenza della neuropatologia. La tossicità dell' α -sinucleina può essere efficacemente bloccata nutrendo i moscerini con geldanamicina, un inibitore di HSP90, una proteina che funge da regolatore negativo nella risposta *heat-shock* [186].

Questi risultati hanno portato i ricercatori ad ipotizzare che HSP70 sia implicata nella patologia. Ciò sembra confermato anche dall'osservazione che nei cervelli di pazienti affetti da morbo di Parkinson è stata rilevata la presenza di questa proteina nei corpi di Lewy [153]. Gli studi condotti sul moscerino della frutta hanno permesso quindi di compiere passi avanti nella comprensione dei meccanismi patologici di questa malattia.

3.3.3 *Drosophila* e morbo di Alzheimer

Il morbo di Alzheimer è la causa principale di demenza senile ed è definito, dal punto di vista istopatologico, dalla perdita di neuroni alla quale si accompagna la comparsa di placche amiloidi extracellulari e di grovigli di fibrille intracellulari costituiti da aggregati di proteina TAU iperfosforilata.

A partire dalla fine degli anni '90 è stato sviluppato un modello di *Drosophila* per lo studio di questa malattia facendo esprimere nel moscerino le forme normali e mutate della proteina TAU umana [187]. Anche in questo caso, il modello riproduce numerose caratteristiche della malattia: una progressiva neurodegenerazione dipendente dall'età, la perdita di specifiche popolazioni di neuroni, morte precoce e accumulo a livello neuronale di aggregati di proteina TAU iperfosforilata [146, 165]. La neurodegenerazione inoltre appare in forma molto più grave nei moscerini che esprimono la forma mutata di TAU rispetto a quella normale.

3.3.4 *Drosophila* e paraplegie spastiche ereditarie

Le paraplegie spastiche ereditarie comprendono un gruppo di malattie molto eterogenee dal punto di vista genetico ma con la comune caratteristica di presentare la degenerazione dei motoneuroni nel tratto corticospinale e della colonna dorsale.

In *Drosophila* è stato recentemente identificato il gene omologo a *SPG4*, *dSpastina*, che nell'uomo codifica la proteina spastina, implicata in una di queste patologie. È stato dimostrato che, nel modello di moscerino, mutazioni *loss-of-function* a carico di *dSpastina* causano alterazioni a livello delle giunzioni neuromuscolari delle larve al III stadio di sviluppo, con bottoni sinaptici di dimensioni ridotte, accumulo di microtubuli stabilizzati e ridotto rilascio di neurotrasmettitori. Questi difetti a livello delle giunzioni sembrano essere la causa dei severi difetti di movimento e la ridotta durata della vita dei moscerini adulti [188, 189]. Il fenotipo patologico osservato, sia a livello delle giunzioni neuromuscolari che del comportamento, è stato dimostrato regredire dopo trattamento dei moscerini con vinblastina, un composto in grado di destabilizzare i microtubuli, facendo ipotizzare che spastina possa svolgere una funzione di regolatore negativo della stabilità di queste strutture [189]. Le osservazioni in *Drosophila* hanno di conseguenza aperto la porta ad una nuova strategia farmacologica per il trattamento di queste malattie.

3.4 *Drosophila* e malattie da prioni

Recentemente, Gavin e colleghi [190] hanno aggiunto alla lista delle specie utilizzate per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili anche *Drosophila melanogaster*, sviluppando un modello per la sindrome di Gerstmann-Strausser-Scheinker (GSS), una forma ereditaria di TSE umana. I ricercatori hanno generato moscerini transgenici trasformati con il gene murino codificante la proteina prionica di topo (M-PrP) sia nella forma *wild type* che recante la mutazione P101L, omologa alla mutazione P102L che nell'uomo causa GSS. L'espressione della forma mutata in *Drosophila* causa la comparsa di fenotipi alterati, assenti nei moscerini che esprimono la proteina prionica normale: disfunzioni motorie che si aggravano in dipendenza dell'età e ridotta durata di vita, 3-4 settimane contro le 8-10 settimane dei moscerini esprimenti la proteina *wild type*. Anche a livello larvale le *Drosophilae* esprimenti la M-PrP P101L mostrano difetti nel movimento quando questa è espressa a livello dell'intero sistema nervoso [190]. Inoltre, è stato dimostrato un progressivo accumulo della proteina alterata con la formazione di aggregati sia intra- che extra-cellulari cui si accompagna una patologia a livello cerebrale con la comparsa di vacuoli, fenotipi questi del tutto assenti nei moscerini che esprimono la M-PrP normale [190]. Andando ad analizzare

la resistenza al trattamento con proteinasi K (PK) delle due forme delle proteine prioniche espresse nei moscerini transgenici, Gavin e colleghi [190] hanno evidenziato che non si assiste all'aumento della presenza di proteina mutata resistente alla PK, forse dovuta ad una diversa conformazione assunta dalla M-PrP P101L. Nel modello di *Drosophila* per la PrP di topo, non si assiste perciò all'aumento di resistenza alla PK pur essendoci un accumulo di proteina alterata [190].

Scopo della tesi

Negli ultimi decenni sono stati identificati i geni responsabili di un numero crescente di neuropatologie. Tuttavia, il compito più difficoltoso è quello di attribuire a questi geni una funzione che consenta di comprendere il meccanismo molecolare che è alla base degli eventi patologici.

Tra tutte le malattie neurodegenerative, le malattie da prioni sono forse tra le più affascinanti dato che la natura dell'agente eziologico è ancora un argomento dibattuto, senza che vi siano prove scientifiche certe che avvalorino l'una o l'altra delle ipotesi proposte dai diversi ricercatori per spiegarne la natura infettiva.

Secondo la "*Protein Only Hypothesis*", avanzata da Prusiner all'inizio degli anni '80 del secolo scorso [1], l'evento centrale nello sviluppo di queste malattie è rappresentato dalla conversione della proteina prionica (PrP^{C}), normalmente presente nelle cellule, nella sua isoforma patologica (PrP^{Sc}) che possiede la sorprendente capacità di autoreplicarsi [1]. Tale modificazione conformazionale può avvenire in seguito ad un evento spontaneo, oppure essere mediata dalla presenza della isoforma patologica. Caso unico, nell'uomo questo fenomeno può essere dovuto anche a mutazioni a carico del gene *PRNP* codificante la proteina prionica.

Per poter contribuire al chiarimento della biologia dei prioni, del meccanismo patogenetico e del ruolo svolto dalle diverse mutazioni, nel presente lavoro di tesi ci siamo proposti di utilizzare *Drosophila melanogaster* come modello animale, utilizzando le numerose tecniche genetiche e molecolari che il moscerino della frutta consente di applicare.

Scopo del lavoro è quello da un lato di creare un nuovo modello animale per lo studio della funzione della PrP umana, sia normale che mutata, in modo da approfondire i processi neurodegenerativi alla base delle TSE, e dall'altro di utilizzare il moscerino della frutta per effettuare un rapido *screening* genetico delle diverse mutazioni note per poter determinare quelle che svolgono un ruolo preponderante nella patogenesi delle malattie. La mancanza di informazioni certe in tale ambito ha finora impedito, infatti, lo sviluppo di terapie efficaci per il loro trattamento, fatto al quale si potrà ovviare solamente una volta chiariti i meccanismi che sono alla base di queste patologie.

A tale scopo sono state scelte 3 tra le più note mutazioni in modo tale che fossero da un lato rappresentative delle tre forme familiari di TSE fino ad ora descritte (GSS, fCJD e IFF), e dall'altro che interessassero le diverse regioni della proteina, le porzioni N-, C- terminali e la regione intermedia: P102L (GSS), D178N/129M (IFF), D178N/129V (fCJD) e E200K (fCJD).

Le diverse forme di PrP saranno studiate attraverso un'analisi dettagliata dei fenotipi che si verranno a sviluppare nei moscerini in seguito alla loro espressione.

I risultati che si potranno ottenere permetteranno di tradurre in termini funzionali informazioni genetiche, e quindi di legare i risultati della ricerca di base con le aspettative della medicina clinica. In particolare, essi potranno fornire importanti informazioni sul ruolo svolto dalle singole mutazioni nel determinare la patogenesi delle TSE umane oltre che indicazioni utili per lo sviluppo di terapie efficaci per il loro trattamento. A differenza delle altre forme di malattie da prioni, non di natura ereditaria, i pazienti che presentano mutazioni patologiche possono essere identificati mediante analisi genetica. Risulta perciò importante riuscire a sviluppare farmaci efficaci che permettano, in questi pazienti, di iniziare il trattamento terapeutico prima che la malattia si manifesti in tutta la sua gravità.

5.1 Materiali

5.1.1 *Drosophila melanogaster*

(Phylum: Artropoda; classe: Insecta; sottoclasse: Pterygota; superordine: Endopterygota; ordine: Diptera)

Drosophila melanogaster, il comune moscerino della frutta, è un insetto dell'ordine dei ditteri. Presenta tre segmenti corporei, capo, torace e addome, rivestiti da una cuticola. Il capo porta due occhi composti piuttosto grandi e un paio di antenne. L'apparato boccale è costituito da una proboscide succhiatoria.

Il torace è costituito da protorace, mesotorace e metatorace, ciascuno dei quali porta un paio di zampe. Presenta una sola coppia di ali membranose e strette nel mesotorace, poiché le ali posteriori sono ridotte a muscoli bilanceri, detti alteri. Le ali sono delle espansioni cuticolari formate da epidermide, costituite da una doppia membrana contenente nervature di cuticola più spessa che servono ad irrobustirle.

Sull'addome sono presenti delle striature nere che possono essere utilizzate anche per la determinazione del sesso dell'individuo. I maschi infatti presentano una maggiore concentrazione di pigmento nero all'estremità posteriore rispetto alle femmine (fig. 5.1). Inoltre, la femmina è generalmente più grande e presenta un addome appuntito, mentre il maschio è più piccolo, con un addome arrotondato con all'estremità dei piccoli uncini copulatori.

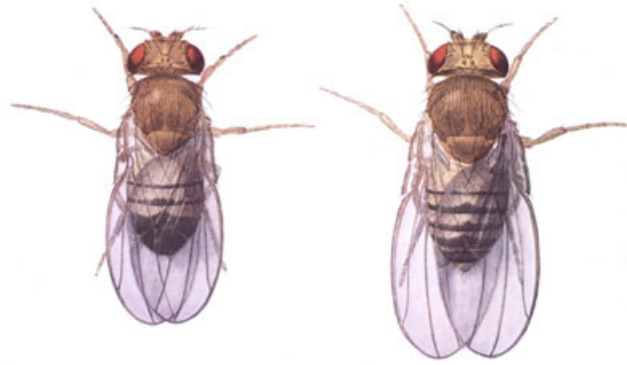


Figura 5.1: *Drosophila melanogaster*. A destra è rappresentata la femmina, a sinistra il maschio. (www.flymove.uni-muester.de)

La riproduzione del moscerino della frutta avviene rapidamente. Una singola coppia di *Drosophila* produce centinaia di uova e il ciclo vitale, di seguito descritto, dura all'incirca due settimane a 25°C.

5.1.2 Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*

Drosophila è un insetto ometabolo e va quindi incontro ad una metamorfosi completa nel corso dello sviluppo da uovo a insetto adulto.

L'uovo di *Drosophila* è un uovo a mosaico nel quale specifiche regioni sono determinate a divenire particolari strutture già durante i primi stadi dello sviluppo.

Lo sviluppo del moscerino della frutta viene suddiviso in quattro periodi:

1. *embriogenesi precoce*: comprende le prime 2,5-3 ore dopo la deposizione, dal momento in cui l'uovo viene fecondato fino allo stadio di cellularizzazione dell'embrione;
2. *embriogenesi tardiva*: dal completamento della cellularizzazione alla formazione della larva (all'incirca 20-22 ore dopo la fecondazione);
3. *stadio larvale*: dal momento in cui si sviluppa la larva fino allo stadio di pupa. Questo periodo di sviluppo è a sua volta suddiviso in tre distinte fasi successive. Il passaggio da uno stadio larvale ad un altro avviene per metamorfosi ed è regolato dall'ormone ecdisone;
4. *stadio di pupa*: inizia dal momento in cui la larva si impupa e si completa con lo sfarfallamento dell'adulto. Anche a questo livello, l'ormone principale che regola la metamorfosi ad adulto è l'ecdisone.

Lo sviluppo, dal momento della fecondazione dell'uovo alla formazione dell'adulto, dura all'incirca 10 giorni, pur essendo possibili piccole variazioni in dipendenza della temperatura esterna.

Embriogenesi precoce

Dopo la fecondazione, il nucleo dello zigote va incontro ad una serie di divisioni nucleari sincrone non seguite da citocinesi che avvengono nella parte centrale dell'uovo. Si viene di conseguenza a formare un sincizio con più nuclei che sono compresi in un unico citoplasma. Dopo la settima divisione, i nuclei iniziano a migrare alla periferia dell'uovo, nella zona pericorticale, dove le mitosi continuano anche se con un ritmo progressivamente più lento. Dopo la nona divisione mitotica, un gruppo di circa 40 nuclei migra verso il polo posteriore dell'uovo dove va a costituire le cellule polari dell'embrione che daranno origine alle cellule germinali dell'adulto. Uno dei primi eventi dello sviluppo è quindi la separazione delle future cellule germinali dal resto dell'embrione.

Dopo la formazione delle cellule polari, la membrana dell'uovo si ripiega all'interno tra i nuclei, fino a che ognuno di essi viene separato in una singola cellula. Questo processo forma il blastoderma cellulare, con tutte le cellule disposte in un singolo strato a rivestire la massa centrale ricca di tuorlo. Con la cellularizzazione si completa l'embriogenesi precoce e l'embrione entra nella fase successiva di embriogenesi tardiva. Le principali fasi dello sviluppo embrionale sono rappresentate in figura 5.2.

Time table of embryogenesis








	Stage	Time	Developmental events
	1-4	0:00 - 2:10 h	Cleavage
	5	2:10 - 2:50 h	Blastoderm
	6-7	2:50 - 3:10 h	Gastrulation
	8-11	3:10 - 7:20 h	Germ band elongation
	12-13	7:20 - 10:20 h	Germ band retraction
	14-15	10:20 - 13:00 h	Head involution and dorsal closure
	16-17	13:00 - 22:00 h	Differentiation

Figura 5.2: Principali fasi dello sviluppo embrionale di *Drosophila melanogaster*. (Tratto da www.flymove.uni-muester.de)

Embriogenesi tardiva

Immediatamente dopo il completamento della cellularizzazione, l'embrione entra nella fase di gastrulazione durante la quale si formano i tre foglietti germinali: ectoderma, mesoderma ed endoderma. La gastrulazione inizia con la crescita delle cellule lungo la linea centrale ventrale con formazione della banda mesodermica. Il solco mesodermico che ne deriva si estende per tutto l'embrione, dal polo anteriore a quello posteriore. Le sue estremità vanno successivamente incontro a invaginazione e ciò porta alla formazione dell'intestino larvale che si differenzierà nelle diverse componenti dell'apparato digerente.

Contemporaneamente alla formazione del solco ventrale, all'estremità anteriore dell'embrione si forma il solco cefalico che porterà alla separazione della testa dal resto del corpo. Dopo circa 8 ore di sviluppo, divengono chiaramente visibili i diversi segmenti che compongono l'embrione: tre toracici, otto addominali e uno terminale posteriore.

Stadio larvale

La larva di *Drosophila melanogaster* presenta 12 segmenti: un segmento cefalico, tre toracici e otto addominali. L'apertura buccale è situata ventralmente nel segmento cefalico e al suo interno sono alloggiato delle strutture cheratinose dette "uncini buccali" che vengono utilizzati per la raccolta del cibo. La parete del corpo è flessibile e sottile ed è formata da una cuticola esterna e da una epidermide interna. La maggior parte dei tessuti larvali è costituita da cellule poliploidi o da cellule con cromosomi politenici. Poiché le larve sono abbastanza trasparenti, alcuni organi interni possono essere osservati al microscopio ottico anche nella larva viva.

Oltre a queste strutture, la larva presenta dei gruppi di cellule chiamati "dischi imaginali" presenti a livello cefalico, e la loro controparte nei segmenti addominali, gli istoblasti, che rappresentano i primordi delle strutture dell'adulto (fig. 5.3). Queste strutture costituiscono i precursori degli organi dell'adulto. Nella larva sono presenti nove dischi imaginali (labiali, occhio-antenna, ali, altere, zampe ecc.) ognuno dei quali è costituito da un piccolo gruppo di cellule diploidi morfologicamente simili. Le prime cellule dei dischi imaginali compaiono durante l'embriogenesi avanzata ma formano i dischi veri e propri, distinti dagli altri tessuti e cellule, soltanto al primo stadio larvale.

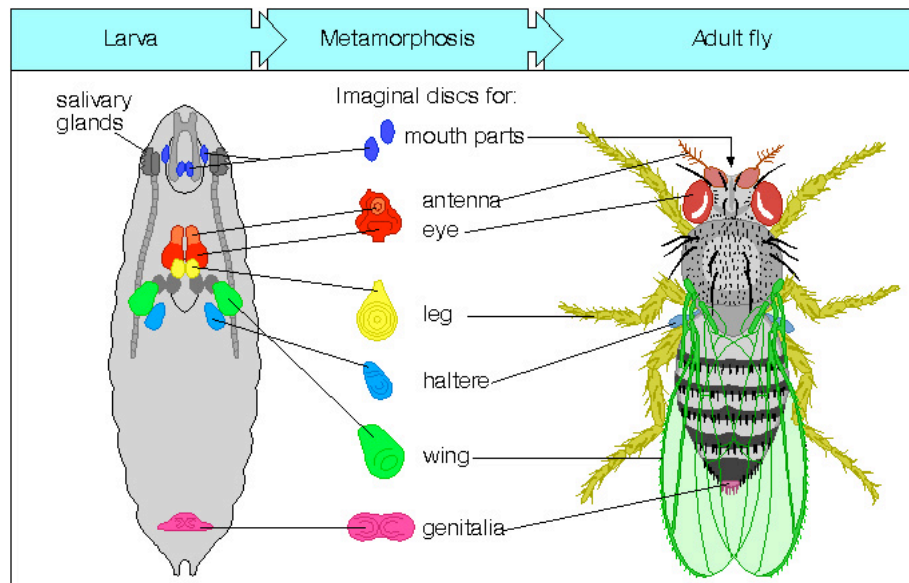


Figura 5.3: Dischi imaginali presenti nella larva al secondo stadio di sviluppo e loro trasformazione nelle strutture definitive dell'organismo adulto. (tratto da www.mun.ca)

Nel corso dello sviluppo, la larva non subisce grosse modificazioni, ad eccezione dell'aumento delle sue dimensioni, passando attraverso tre fasi successive. Le larve al I stadio subiscono la muta dopo circa 24 ore dalla schiusa e si trasformano in larve II stadio che si infossano nella pappa continuando a nutrirsi e a crescere di dimensioni. Attraverso una seconda muta diventano larve III stadio e, circa sette giorni dopo la schiusa, smettono di nutrirsi e risalgono le pareti del contenitore di coltura dove si richiuderanno in un involucro secreto dalle ghiandole salivari formando la pupa all'interno della quale avverrà la metamorfosi ad individuo adulto.

La pupa

L'ultimo stadio di sviluppo prima dello sfarfallamento dell'adulto è rappresentato dalla pupa. Durante questo stadio si assiste al differenziamento delle strutture larvali negli organi del moscerino adulto.

Mentre durante il periodo larvale era rimasta bloccata, nella pupa si assiste ad una intensa fase di proliferazione cellulare, specialmente a livello dei dischi imaginali.

Le definitive strutture dell'adulto si formano attraverso un processo di metamorfosi che viene finemente regolato dall'ormone ecdisone, durante il quale si assiste alla degenerazione di molte strutture larvali (ad esempio muscoli, ghiandole salivari e intestino) e la costruzione, a partire dai dischi imaginali, delle strutture definitive (fig. 5.3). Altre strutture, come il sistema nervoso centrale, vengono conservate anche se subiscono delle modificazioni.

Inizialmente la pupa è di colore bianco, poi diventa di colore giallo/bruno, in trasparenza iniziano ad essere evidenti gli occhi dell'adulto, quindi delle strutture di colore scuro che sono le ali ripiegate. Quando avviene la muta finale, dalla parte anteriore della pupa emerge un adulto completamente sviluppato che espande le ali pompando aria al loro interno.

Dopo circa 10 giorni dalla fecondazione, lo sviluppo a moscerino è completato (fig. 5.4).

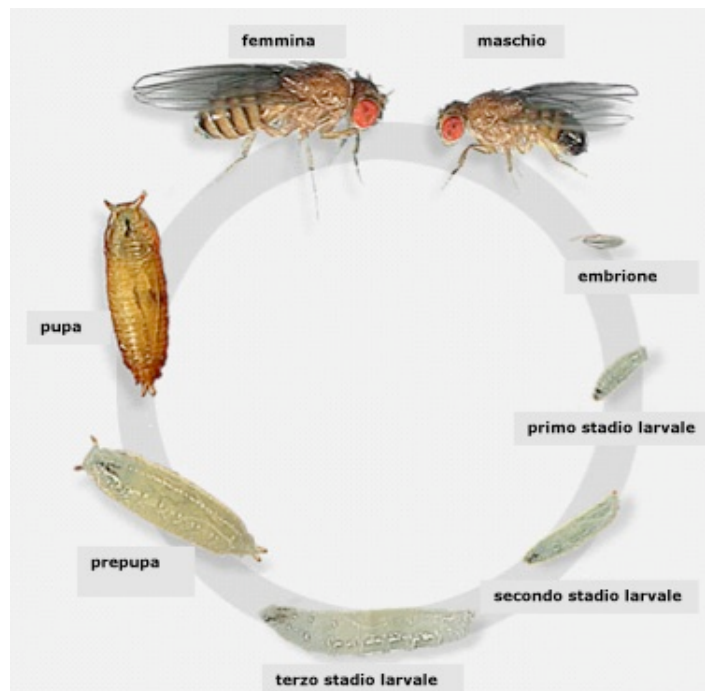


Figura 5.4: Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*. (Tratto e modificato da www.anatomy.unimelb.edu.au).

5.1.3 Il sistema UAS/GAL4 in *Drosophila melanogaster*

Per studiare la funzione di un gene, è utile essere in grado di controllarne l'espressione sia dal punto di vista temporale che spaziale.

Il sistema di espressione UAS/GAL4, identificato per la prima volta nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, costituisce un valido metodo applicabile a numerosi altri organismi per promuovere l'espressione ectopica di geni in maniera tessuto- e cellulo-specifica.

Il gene *gal4* codifica per un fattore di trascrizione di 881 a.a. che interviene nella regolazione dei geni indotti dal galattosio *gal10* e *gal1* [191, 192]. Numerosi studi hanno identificato e chiarito fin nei minimi particolari le interazioni di GAL4 con il DNA e l'attivazione della trascrizione da esso determinata [193]: GAL4 regola la trascrizione dei geni *gal1* e *gal10* legandosi direttamente a quattro siti di 17 bp in posizione adiacente a questi

loci [194]. Questi siti costituiscono la sequenza UAS (*Upstream Activating Sequence*), la cui funzione è simile a quella degli *enhancer* presenti negli eucarioti. UAS è essenziale per l'attivazione della trascrizione dei geni regolati da GAL4.

Nel 1988 Fischer e colleghi dimostrarono che l'espressione di GAL4 è in grado di attivare anche in *Drosophila* la trascrizione di un gene reporter posto sotto il controllo della sequenza UAS [195]. Questa attività non è limitata al moscerino della frutta ma è efficace anche in altri animali modello, quali topo [196] e zebrafish [197] come pure nei vegetali [198], purchè in presenza dell'elemento UAS.

La caratteristica fondamentale che permette l'utilizzo del sistema binario UAS/GAL4 in *Drosophila* è la mancanza di suoi effetti tossici sul moscerino [167]. Questo metodo si basa sulla generazione di moscerini transgenici nei quali l'espressione del gene di interesse è posta sotto il controllo della sequenza UAS. In tali condizioni perciò, la trascrizione del gene richiede la presenza di GAL4 e quindi l'assenza di questo elemento nella linea transgenica lo mantiene silente. Per attivarne la trascrizione, questi moscerini devono essere incrociati con *Drosophilae* che esprimono GAL4, dette linee *driver-Gal4*. I due componenti del sistema vengono mantenute in linee di moscerini separate, mentre la progenie risultante esprimerà il transgene secondo il pattern dipendente dal promotore della linea *driver-Gal4* utilizzata (fig. 5.5).

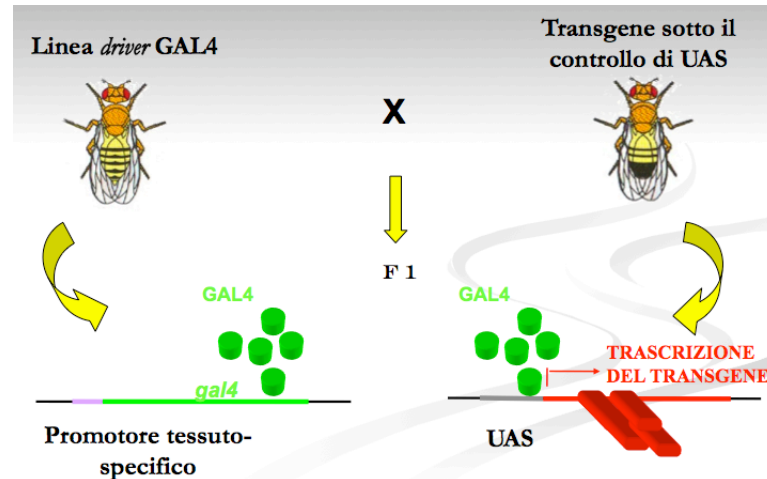


Figura 5.5: Sistema di espressione binaria UAS/GAL4 in *Drosophila melanogaster*.

5.1.4 Mezzo nutritivo per *Drosophila melanogaster*

Gli individui di *Drosophila melanogaster* sono stati allevati in laboratorio, all'interno di contenitori monouso in plastica con tappo di gommapiuma o cotone, utilizzando un mezzo nutritivo costituito da:

- agar 1,2% (p/v) (MP Biomedicals)
- zucchero semolato da cucina 4,4% (p/v)
- estratto di lievito 4,4% (p/v) (MP Biomedicals)

in acqua potabile. Il mezzo nutritivo viene cotto al microonde. Raggiunta l'ebollizione, la pappa viene fatta sobbollire per circa 20 minuti, mescolando di tanto in tanto, e successivamente lasciata raffreddare in agitazione. Raggiunta la temperatura di circa 37°C viene aggiunto l'antifungino Nipagina (methyl 4-hydroxybenzoate, Sigma-Aldrich) 0,1% (p/v) preventivamente sciolto in etanolo 70% (v/v). Il mezzo nutritivo viene infine aliquotato negli appositi contenitori (fig. 5.6).



Figura 5.6: Contenitori per il mantenimento in laboratorio di *Drosophila melanogaster*.

I moscerini sono stati mantenuti trasferendo periodicamente gli adulti in contenitori con mezzo nutritivo fresco. La frequenza dei trasferimenti dipende soprattutto dalla temperatura di mantenimento, approssimativamente una volta la settimana a 23°C.

5.1.5 Linee di *Drosophila melanogaster* utilizzate

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzate le seguenti linee di *Drosophila melanogaster* disponibili allo *stock center* di Bloomington [155]:

- Linea w^{118} : ceppo caratterizzato dall'allele recessivo *white*⁻ (w^-) dovuto ad una delezione del locus *white* che conferisce la colorazione bianca dell'occhio. Tale gene infatti è coinvolto nella distribuzione dei pigmenti ommocromo (marrone) e pteridina (rosso) presenti negli occhi composti degli individui adulti.

- Linea bilanciata: $w^{1118}/Dp(1;Y)y^+$; $CyO/nub^1 b^1 noc^{Sco} It^1 stw^3$; $MKRS/TM6B, Tb^1$. Linea bilanciata che presenta i seguenti marcatori cromosomici: *CyO*, fenotipo “ali arricciate” (fig. 5.7a, b); *Sco*, fenotipo “assenza di alcune setole”; *MKRS*, fenotipo “setole corte” (fig. 5.7c, d) e *TM6b*, fenotipo “setole a ciuffi”. Tutti questi marcatori cromosomici risultano letali in omozigosi.



Figura 5.7: Linea bilanciata di *Drosophila melanogaster*. a, b) *CyO*, marcatore morfologico del II cromosoma (fenotipo “ali arricciate”); c, d) *MKRS*, marcatore morfologico del III cromosoma (fenotipo “setole corte”).

- Linea *driver actina-Gal4*: $y^1 w^*$; $P\{Act5C-GAL4\}25FO1/CyO, y^+$. Ceppo nel quale la sequenza *gal4* è controllata dal promotore *actina*, ed è quindi espressa ubiquitariamente in tutte le cellule dell’organismo.
- Linea *driver elav-Gal4*: $P\{w[+mW.hs]=GawB\}elav[C155]$. In questo ceppo la sequenza *gal4* è posta sotto il controllo del promotore *embrionic lethal abnormal vision* (*elav*), gene espresso nel sistema nervoso di *Drosophila* in modo generalizzato.

- Linea *driver d42-gal4*: w*; P{w[+mW.hs]=GawB}D42. Ceppo che esprime la sequenza *gal4* a livello dei motoneuroni, poichè posta sotto il controllo del promotore *d42* specifico per queste cellule nervose.

5.1.6 Ceppi batterici utilizzati

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate colture batteriche *E. coli* dei ceppi:

- **DH5 α** [F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻] (Invitrogen)
- **TOP10F'** F⁻ {*lacI^q* Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* (Invitrogen)

Le colture batteriche sono state fatte crescere a 37°C in agitazione in terreno liquido Luria Bertani (NaCl 1% (p/v) (Becton-Dickinson), Bacto-Tryptone 1% (p/v) (Becton-Dickinson), Bacto-Yeast extract 0,5% (p/v) (Becton-Dickinson), oppure a 37°C in terreno solido Luria Bertani, Bacto-agar 1,5% (p/v) (Becton-Dickinson). In base alle necessità, il terreno di crescita è stato addizionato di ampicilline (Sigma) alla concentrazione finale di 100 μ g/ml.

5.1.7 Colture cellulari utilizzate

In questo lavoro sono state utilizzate colture primarie di linfociti umani. Le cellule sono state isolate a partire da sangue periferico proveniente da donatori sani e fornito dal Centro Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. I linfociti sono stati coltivati in fiasche T75 (Corning) in presenza del terreno di crescita RPMI 1640 (Gibco) addizionato al 10% con FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco) inattivato al calore. Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C con il 5% di CO₂.

5.1.8 Plasmidi

I plasmidi utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati i seguenti:

- **pCR2.1-TOPO** (Invitrogen). Il plasmide è basato sul sistema TOPO TA cloning (Invitrogen) per il clonaggio *one-step* di frammenti di PCR. Il vettore viene fornito linearizzato con una sequenza poliT alle due estremità 3' e 5' e legato covalentemente all'enzima Topoisomerasi I del Vaccinia virus (Tyr274). In presenza di un gruppo ossidrilico in 5' di un prodotto di PCR, l'enzima rilasciato catalizza la formazione di un legame fosfodiesterico con l'estremità 3' del vettore. L'inserimento del frammento di PCR è facilitato dall'allineamento del poliA sporgente alla sua estremità 3' con il poliT presente in 5' del vettore. Nella stessa regione è presente il sito di policlonaggio. Il plasmide contiene un'origine di replicazione fagica, f1 ori, ed una batterica, pUC ori, ed i geni per la resistenza all'ampicillina e alla kanamicina per la selezione dei cloni batterici trasformati (fig. 5.8).

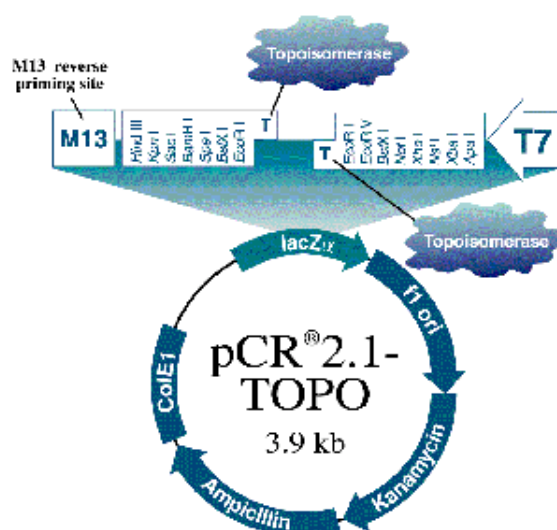


Figura 5.8: Plasmide pCR2.1-TOPO. (Tratto da www.invitrogen.com)

- **p π 25.7wc**. Plasmide *helper* contenente la sequenza codificante la trasposasi fiancheggiata da due elementi P (fig. 5.9). Esso viene normalmente utilizzato nella generazione di *Drosophila* transgeniche poichè favorisce l'integrazione del plasmide contenente la sequenza di interesse nel genoma ricevente. Questo plasmide presenta una delezione nella regione 3' dell'elemento P che non interferisce con la trascrizione del gene codificante la trasposasi e allo stesso tempo impedisce la sua integrazione nel genoma del moscerino.

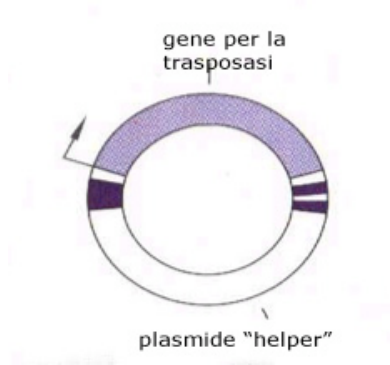


Figura 5.9: Rappresentazione schematica del plasmide *helper* pπ25.7wc.

- **pUAST.** Vettore di espressione comunemente utilizzato negli esperimenti di transgenesi in *Drosophila melanogaster* poichè contiene: i) due elementi P del moscerino della frutta che fungono da veicolo per il trasferimento di geni all'interno del genoma ricevente; ii) l'allele selvatico *white* (*w+*) che funge da marcatore negli individui transgenici conferendo la colorazione rossa agli occhi; iii) la sequenza UAS che permette la regolazione dell'espressione del trasgene inserito mediante l'utilizzo del sistema binario UAS/GAL4 (fig. 5.10).

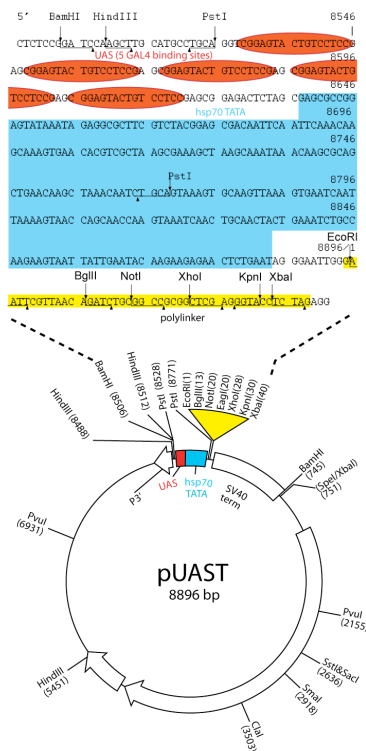


Figura 5.10: Plasmide pUAST. (Tratto da www.gurdon.cam.ac.uk)

- **pDK101_{white}**. Plasmide che permette la sintesi di DNA a singolo filamento. Contiene al suo interno i promotori per la sintesi *in vitro* di RNA. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato per preparare la sonda per gli esperimenti di ibridazione *in situ* poichè al suo interno è stata clonata la sequenza *white*. Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Prof. Costa del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova (fig. 5.11).

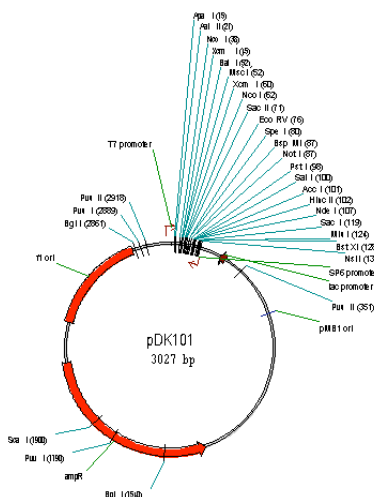


Figura 5.11: Plasmide pDK101. (Tratto da www.genomex.com)

5.1.9 Oligonucleotidi

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una serie di primer, opportunamente disegnati, le cui sequenze sono riportate in tabella 5.1.

5.2 Metodi

5.2.1 Isolamento di linfociti da sangue periferico

I linfociti sono stati isolati da sangue periferico proveniente da donatore sano fornito dal Centro Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

Il sangue periferico è stato diluito 1:2 in PBS (*Phosphate Buffered Saline*, NaCl 150mM, tampone sodio fosfato 10mM, pH 7.2), e l'isolamento delle cellule è stato ottenuto mediante centrifugazione in gradiente di Ficoll-plaque Plus (Amersham Bioscience) a 1700 rpm per 45 minuti. Il Ficoll, copolimero di saccarosio ed epicloridina a bassa densità, consente la sedimentazione di granulociti ed eritrociti e l'isolamento delle cellule bianche del sangue

Primer	sequenza nucleotidica 5'-3'	Tm (°C)
HPrP wt F	tcagtcattatggcgaac	55
HPrP wt R	gaccttctcatcccactat	58
HPrP P102L F	tcagtgaacaagctgagtaagccaaaaac	72.4
HPrP P102L R	gtttttggcttactcagctgttccactga	72.4
HPrP D178N F	acaactttgtgcacaaactgcgtcaatatca	73.5
HPrP D178N R	tgatattgacgcagttgtgcacaaaagttgt	73.5
HPrP E200K F	gggagaacttcaccagaccgacgtaaga	74.6
HPrP E200K R	tctaacgtcggctctggtgaagttctccc	74.6
HPrP M129V F	gccttggcggctacgtgctgggaagtcca	86.1
HPrP M129V R	tggcacttcccagcagtagccgccaaggc	86.1
HPrP RT F	acaactttgtgcacgactgc	64.0
HPrP RT R	tggagaggagaagaggacca	64.0
UAS F	ctttctcgttatcccc	54
RP49 169	atcggttacggatcgaacaa	57
RP49 333	gacaatctccttgcgttct	58
β -actina F	tcaccacactgtgccatctacga	62
β -actina R	cagcggaaaccgctcattgccaatgg	62
M13 F	gtaaaacgacggccag	50.0
M13 R	caggaaacagtatgac	50.0

Tabella 5.1: Oligonucleotidi utilizzati e loro principali caratteristiche.

che formano un anello all'interfaccia tra Ficoll e solventi. Dopo la separazione, la frazione cellulare di interesse è stata prelevata, sottoposta a successivi lavaggi in PBS e risospesa in terreno di crescita RPMI 1640 supplementato al 10% con FBS precedentemente inattivato al calore. Le cellule sono state quindi seminate in fiasche T75 (Corning) ed poste per 2 ore in incubatore a 37°C con il 5% di CO₂ in modo da consentire l'adesione delle cellule monocito-macrofagiche alla plastica della fiasca di coltura. Le cellule non aderenti, rappresentate dai linfociti, sono state prelevate, centrifugate a 900 rpm per 10 minuti e, dopo alcuni lavaggi in PBS, il pellet cellulare è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA totale.

5.2.2 Estrazione di RNA da linfociti

Per estrarre l'RNA totale dai linfociti umani è stato utilizzato il kit *RNeasy Mini* (Qiagen), basato sull'utilizzo di colonne ad alta affinità costituite da un gel di silice e che permettono la purificazione di RNA di dimensioni maggiori di 200 b.

I linfociti sono stati lisati utilizzando un tampone contenente guanidina isotiocianato in grado di inattivare le RNasi presenti nei campioni, e β -mercaptoetanolo, in modo tale da ridurre i ponti disolfuro. Dopo l'aggiunta di etanolo 70% (v/v), il lisato cellulare è stato

trasferito in colonna ed è stato centrifugato a 13000 rpm per 15 secondi. Dopo gli opportuni lavaggi utilizzando i tamponi forniti nel kit, l'RNA è stato eluito dalla colonna in 30 μ l di acqua addizionata con DEPC (diethyl pirocarbonato).

5.2.3 Estrazione di RNA da *Drosophila melanogaster*

Per estrarre l'RNA totale da *Drosophila melanogaster* è stato utilizzato il reagente TRI-ZOL (Invitrogen), soluzione monobasica costituita da fenolo e guanidina isotiocianato in grado di inattivare le RNasi presenti. L'estrazione è stata effettuata a partire da 6 moscerini adulti, i tessuti dei quali sono stati omogenizzati in 200 μ l di TRIZOL. Successivamente, è stato aggiunto il reagente fino al volume finale di 1 ml e la sospensione è stata centrifugata a 1300 rpm per 10 minuti a 4°C. Al surnatante sono stati quindi aggiunti 200 μ l di cloroformio e i campioni sono stati nuovamente centrifugati al 1300 rpm per 15 minuti a 4°C in modo da permettere la formazione di tre fasi separate: sul fondo una fase rosa di fenolo-cloroformio contenente il DNA, una interfase contenente le proteine e una fase sovrastante contenente l'RNA. Quest'ultima è stata prelevata e trasferita in una provetta pulita. Si è proceduto quindi alla precipitazione dell'RNA aggiungendo 700 μ l di isopropanolo. La sospensione è stata centrifugata a 1300 rpm per 10 minuti a 4°C e il surnatante eliminato. Dopo aver aggiunto 1 ml di etanolo 70% (v/v), si è centrifugato a 1300 rpm per 10 minuti a 4°C e si è nuovamente eliminato il surnatante. Il sedimento di RNA è stato risospeso in 30 μ l di acqua sterile priva di RNasi e addizionato di 1U di DNasi (Roche) in presenza di un tampone contenente MgCl₂ 7mM. I campioni sono stati incubati per 1 ora a 37°C e cui ha fatto seguito l'inattivazione dell'enzima DNasi attraverso l'incubazione per 5 minuti a 65°C.

L'RNA ottenuto è stato aliquotato e conservato a -80°C.

5.2.4 Estrazione di DNA da *Drosophila melanogaster*

Il protocollo adottato per l'estrazione di DNA genomico da *Drosophila melanogaster* è quello riportato da Gloor e Engels [154].

Un singolo individuo adulto è stato posto in una provetta Eppendorf ed omogenato in presenza di 50 μ l di tampone di estrazione (Tris-HCl 10mM pH 8.2; EDTA 2mM; NaCl 25mM), avendo cura di frantumare con il puntale i tessuti e rilasciando progressivamente i 50 μ l di tampone. Dopo una breve centrifugazione a 13000 rpm per far precipitare sul fondo i tessuti, è stato aggiunto 1 μ l di Proteinasi K (PK, 10 mg/ml, Roche), in modo da degradare le proteine presenti. Dopo aver incubato i campioni a 37°C per circa 1 ora, la PK è stata inattivata per 5 minuti a 70°C.

I campioni di DNA sono stati conservati a -20°C.

5.2.5 PCR

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse è stata utilizzata la tecnica di amplificazione a catena della polimerasi (PCR). In generale, sono state preparate le miscele di reazione come segue:

- 5 µl tampone 10x (Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 500mM, MgCl₂ 15mM)
- 4 µl dNTPs mix 2.5mM
- 1 µl oligonucleotide senso 10µM
- 1 µl oligonucleotide anti-senso 10µM
- 0.2 µl AmpliTaq Gold 5U/µl (Applied Biosystems) oppure *Pfu Ultra* (Stratagen)
- 100 ng DNA
- acqua deionizzata fino al volume finale di 50 µl

In genere sono stati effettuati 30 cicli di amplificazione in termociclatore (Mastercycler, Eppendorf), comprendenti una fase di denaturazione a 94°C, una di appaiamento degli oligonucleotidi alla temperatura richiesta da questi ultimi e una di elongazione a 72°C. Nel caso si sia utilizzata la *Taq Pfu Ultra* ad alta fedeltà, quest'ultima fase è stata condotta a 68°C.

Per denaturare il DNA ed attivare la polimerasi, i 30 cicli di amplificazione sono stati preceduti da una ulteriore incubazione della miscela di reazione a 94°C per 4 minuti.

I prodotti di PCR sono stati caricati in gel di agarosio 1% (p/v) in tampone TBE 1x (Tris-borato 0.009M; EDTA 1mM) utilizzando gli opportuni marcatori di peso molecolare in modo da verificarne le corrette dimensioni, il Marker VII (0.25 µg/ml) e/o il Marker II (0.25 µg/ml, Roche).

5.2.6 RT-PCR

Gli RNA estratti sia da linfociti umani che dai moscerini della frutta sono stati retrotrascritti a cDNA mediante RT-PCR.

Per retrotrascrivere gli RNA è stata utilizzata la trascrittasi inversa (RT) del Virus della Leucemia Murina di Moloney (MoMLV) che agisce in presenza di ioni magnesio. La reazione è stata allestita come di seguito descritto:

- 5 µg RNA
- 5 µl tampone di reazione 10x (Tris-HCl 10mM pH 8.3, KCl 50mM)
- 11 µl MgCl₂ 25mM
- 10 µl dNTPs 500 µM per dNTP
- 2 µl esanucleotidi 10 µM
- 1 µl inibitore dell'RNasi
- 1,3 µl MoMLV
- acqua deionizzata fino al volume finale di 50 µl.

Tutti i reagenti utilizzati sono Applied Biosystems.

La reazione di retrotrascrizione è stata condotta nel termociclatore Mastercycler (Eppendorf) impostando il seguente programma:

25°C 10 minuti

42°C 50 minuti

95°C 5 minuti.

Per valutare la corretta retrotrascrizione dell'RNA e la qualità del cDNA ottenuto, è stata allestita una reazione di PCR in modo da amplificare un gene il gene costitutivamente espresso in tutti i tipi cellulari, utilizzando gli specifici oligonucleotidi (vedi tabella 5.1). Nel caso dell'RNA estratto da linfociti umani è stato amplificato il cDNA codificante l'actina (β -actina F/R) mentre per quello proveniente da *Drosophila melanogaster* il cDNA del gene ribosomiale RP49 (RP49 169/333).

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica in gel di agarosio 1% (p/v) in tampone TBE 1x utilizzando gli opportuni marcatori di peso molecolare Marker VIII e/o Marker VII (Roche).

I cDNA ottenuti sono stati conservati a -20°C.

5.2.7 Mutagenesi sito-specifica

Per introdurre nella sequenza codificante H-PrP le mutazioni di interesse, è stata utilizzata la tecnica di mutagenesi sito-specifica *in vitro*. Questa metodica permette di modificare la sequenza nucleotidica di un segmento di DNA in una determinata e ben specifica posizione avvalendosi della tecnica di PCR. Per introdurre la mutazione di interesse vengono utilizzati

due oligonucleotidi specifici uguali ma disegnati ognuno su di un filamento di DNA e che contengono nella loro sequenza la mutazione desiderata (tabella 5.1). A partire da questa coppia di oligonucleotidi si forma, *in vitro*, attraverso l'amplificazione mediante PCR, un nuovo plasmide completo contenente la sostituzione nucleotidica di interesse.

La reazione è stata allestita come di seguito riportato:

- 5 μ l tampone di reazione 10x
- 50 ng DNA plasmidico stampo
- 2.5 μ l oligonucleotide senso 20mM
- 2.5 μ l oligonucleotide non senso 20mM
- 4 μ l dNTPs mix 2.5mM
- 2.5U *Pfu Ultra Taq* Polimerasi
- acqua deionizzata fino al volume finale di 50 μ l

Il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

95°C 30 secondi

55°C 1 minuti

68°C 2 minuti

per 12 cicli ai quali sono seguiti

94°C 1 minuto

55°C 1 minuto

72°C 10 minuti

Dopo l'amplificazione del DNA plasmidico, sono state aggiunte 10U dell'enzima Dpn I e i campioni sono stati incubati a 37°C per 1 ora. Questo enzima viene utilizzato poichè è in grado di digerire il DNA utilizzato come stampo per l'amplificazione ma non quello sintetizzato durante la reazione *in vitro* poichè agisce specificatamente su sequenze completamente metilate G^{Me6}ATC.

Al termine della digestione, 5 μ l della miscela di reazione sono stati utilizzati per trasformare cellule batteriche *E. coli*, ceppo DH5 α , secondo il protocollo descritto nella sottosezione 5.2.12. Una volta purificato il DNA plasmidico mediante "mini preparazioni", i campioni sono stati sequenziati per verificare se la mutazione desiderata fosse stata effettivamente introdotta.

5.2.8 Real-Time PCR

Per quantificare i livelli di espressione del transgene nelle diverse linee di moscerini a nostra disposizione abbiamo utilizzato la tecnica Real-Time PCR. Le differenze quantitative di partenza dei vari campioni sono state normalizzate grazie all'analisi comparata del transgene di interesse (target) e di un gene *housekeeping*, il cui livello di espressione è costante tra i campioni. Negli esperimenti in *Drosophila* come *housekeeping* viene normalmente utilizzato il gene ribosomiale RP49.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il colorante "Sybr Green" (Applied Biosystem) come fluoroforo. Questa molecola è un intercalante che, a contatto con il DNA, subisce un cambiamento conformazionale che ne aumenta la fluorescenza. L'amplificazione è stata condotta utilizzando lo strumento ABIPRISM 7700 *Sequence Detector* (Applied Biosystems), dotato di un fluorimetro che registra la fluorescenza dei campioni al variare del numero di cicli.

In una reazione tipica, il prodotto di PCR raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione. Poiché sono necessari numerosi cicli affinché l'amplificato sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in corrispondenza del quale la quantità di fluorescenza assume un valore statisticamente significativo rispetto al rumore di fondo è chiamato ciclo soglia (valore Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, ragion per cui un confronto tra i valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare le concentrazioni dell'acido nucleico di interesse. Le curve di Melting, che seguono il completamento della procedura, forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri di oligonucleotidi o di amplificato aspecifico.

La miscela di reazione utilizzata è stata la seguente:

- 12,5 µl Sybr Green Master Mix 2x (Applied Biosystem)
- 0,5 µl primer F 10 µM
- 0,5 µl primer R 10 µM
- 2 µl cDNA
- acqua priva di DNasi fino al volume finale di 25 µl.

Le coppie di primer utilizzate per gli esperimenti sono state HPrP RT F/R e RP49 169/333 (vedi tabella 5.1). Il termociclatore è stato programmato nel seguente modo:

10 minuti 95°C

seguiti da 40 cicli:

30 secondi 95°C

30 secondi 60°C

45 secondi 72°C

Al fine di ottenere le curve di Melting, lo strumento è stato programmato come segue:

2 minuti 95°C

20 secondi 60°C

2 minuti 95°C

impostando il tempo impiegato per passare dai 60°C ai 95°C a 19:59 minuti.

5.2.9 Restrizioni enzimatiche

Le reazioni di restrizione enzimatica del DNA sono state condotte utilizzando gli opportuni enzimi (Biolabs) nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima, in genere a 37°C, per il tempo richiesto dalla quantità di acido nucleico da digerire e dalla quantità di enzima utilizzato.

Al termine della digestione, i campioni sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica in gel di agarosio in presenza degli opportuni marcatori di peso molecolare noto, quali il Marker VII (0.25 µg/ml) e il Marker II (0.25 µg/ml) (Roche).

5.2.10 Preparazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico in grande scala ("maxi-prep") è stato estratto dal ceppo DH5α di *E. coli* trasformato con il plasmide di interesse, mediante lisi alcalina e purificato con il "QIAGEN Endo-free Plasmid kit" basato sull'utilizzo di una colonna a scambio ionico. Con questo procedimento, il DNA plasmidico si lega alla resina presente all'interno della colonna e viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare mediante successivi lavaggi utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina. Il DNA plasmidico viene quindi eluito dalla colonna per mezzo di un tampone ad alta concentrazione salina e concentrato mediante precipitazione con etanolo 70% (v/v) e isopropanolo.

Nel caso di preparazioni plasmidiche in piccola scala ("mini-prep") è stato utilizzato il metodo della lisi alcalina modificato per piccoli volumi di coltura batterica (3 ml)[156]. Il DNA

ottenuto in seguito alla precipitazione in etanolo 95% (v/v) è stato risospeso in tampone TE (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 1mM pH 8) contenente RNasi pancreatica alla concentrazione di 20 µg/ml (Roche).

La quantità e la purezza dell'acido nucleico sono state determinate mediante lettura allo spettrofotometro (Biophotometer, Eppendorf) alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al massimo di assorbimento, utilizzando cuvette al quarzo aventi un cammino ottico di 0,1 cm. La presenza di eventuali contaminazioni proteiche è stata rilevata tramite la lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 280 nm, alla quale il legame peptidico presenta il suo picco di assorbimento. Sono state considerate "pure" le preparazioni per le quali il rapporto A_{260}/A_{280} era compreso tra 1,8 e 2,0.

Il DNA ottenuto è stato sottoposto a controllo mediante restrizione enzimatica e successiva migrazione elettroforetica in gel di agarosio 1% (p/v) in tampone TBE 1x e sequenziamento nucleotidico.

5.2.11 Tecniche di clonaggio

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate due diverse strategie di clonaggio.

a) Subclonaggio nel vettore pCR2.1-TOPO

Per ottenere i diversi costrutti per generare i moscerini transgenici è stato utilizzato un vettore intermedio per clonare il cDNA codificante HPrP *wild type* e da utilizzare negli esperimenti di mutagenesi sito-specifica.

L'RNA totale estratto dai linfociti umani è stato utilizzato per ottenere la sequenza codificante la proteina prionica umana mediante RT-PCR. A tale scopo sono stati disegnati gli opportuni oligonucleotidi innesco (HPrP *wt* F/R, tabella 5.1) in grado di amplificare l'intera sequenza di interesse utilizzando la Taq polimerasi ad alta fedeltà *Pfu Ultra*. Poichè tale polimerasi non aggiunge alle estremità 3' del prodotto di PCR le code di poliA necessarie (vedi sottosezione 5.1.8) al termine dei cicli di amplificazione, sono state aggiunte 5U di *AmpliTaq Gold* polimerasi e si è lasciato agire la *Taq* per 10 minuti a 72°C.

Le corrette dimensioni del prodotto di PCR sono state controllate mediante elettroforesi in gel di agarosio in presenza dell'opportuni marcatori di peso molecolare.

4 µl dell'amplificato sono stati quindi utilizzati per allestire la ligazione utilizzando il vettore linearizzato e la soluzione salina forniti dal kit TOPO TA. Dopo un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, 2 µl del prodotto di ligazione sono stati utilizzati per trasformare cellule batteriche *E.coli* TOP10F' come descritto nella sottosezione 5.2.12.

Le colonie resistenti all'ampicillina sono state incubate in 3 ml di terreno LB liquido, in presenza di antibiotico, per circa 7 ore. La presenza dell'inserito all'interno del DNA plasmidico ottenuto dalle mini-preparazioni (sottosezione 5.2.10) è stata verificata mediante restrizione enzimatica e successiva elettroforesi in gel di agarosio. Inoltre, per escludere l'introduzione di mutazioni da parte della Taq polimerasi, i cloni ottenuti sono stati controllati mediante sequenziamento nucleotidico (sottosezione 5.2.13).

b) Clonaggio nel vettore pUAST

Per il clonaggio delle sequenze codificanti HPrP *wild type* e contenenti le mutazioni di interesse introdotte mediante mutagenesi sito-specifica, è stata utilizzata una strategia di clonaggio che prevedeva l'ottenimento dei frammenti di DNA mediante restrizione enzimatica. Al termine della reazione di restrizione, i campioni e il plasmide pUAST sono stati caricati in gel di agarosio in presenza degli opportuni marcatori di peso molecolare. I frammenti di DNA di interesse sono stati escissi dal gel ed eluiti utilizzando il kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN). Questo metodo si basa sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame specifico degli acidi nucleici, in presenza di un tampone ad alta concentrazione salina, alla membrana di silice-gel presente nella colonna a scambio ionico. Le impurità, quali sali, agarosio ed etidio bromuro, non sono trattenute dalla membrana di silice ed il DNA così purificato viene eluito utilizzando un tampone ad alta forza ionica.

Per inserire le sequenze codificanti le varie forme di H-PrP nel vettore pUAST sono state allestite le reazioni di ligazione in presenza della DNA ligasi del batteriofago T4 (4×10^5 U/ml, Biolabs), capace di catalizzare *in vitro* la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo fosfato in 5' ed il gruppo idrossilico in 3' delle estremità adiacenti. Le reazioni sono state condotte in un volume finale di 10 μ l e incubate per 1 ora a 16°C. Al termine di tale periodo, l'intero prodotto di ligazione è stato utilizzato per la trasformazione di batteri *E.coli* DH5 α come descritto nella sottosezione 5.2.12.

I costrutti contenenti il frammento di interesse sono stati individuati seguendo lo stesso procedimento descritto nella sezione precedente: le colonie resistenti all'ampicillina sono state incubate in 3 ml di terreno LB liquido, in presenza di antibiotico, per circa 7 ore e la presenza dell'inserito è stata verificata mediante restrizione enzimatica e successiva elettroforesi in gel di agarosio.

5.2.12 Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi e i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per trasformare cellule di *E. coli*, ceppo DH5 α o TOP10F', rese artificialmente competenti mediante la tecnica del

cloruro di calcio.

Le colonie batteriche sono state fatte crescere per circa 12 ore a 37°C in 3 ml di terreno LB liquido contenente MgCl₂ 15mM e in assenza di antibiotico. Una volta raggiunta la densità ottica pari a 0.4 alla lunghezza d'onda di 600 nm, la coltura è stata raffreddata rapidamente in ghiaccio per interrompere la crescita batterica e le cellule sedimentate per centrifugazione a 3500 rpm a 4°C per 15 minuti. I batteri sono quindi stati risospesi in una soluzione fredda contenente MnCl₂-4H₂O 10mM, CaCl₂ 50mM, MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] 10mM pH 6.3, centrifugati nuovamente e risospesi nella stessa soluzione addizionata di glicerolo al 15% (v/v). I batteri competenti sono stati aliquotati e conservati a -80°C.

La trasformazione batterica è stata condotta addizionando ad una aliquota di batteri competenti (50µl) il DNA plasmidico di interesse (100-300 ng) oppure i prodotti delle reazioni di ligazione. Dopo aver incubato la miscela in ghiaccio per 30 minuti, i campioni sono stati sottoposti a *shock* termico attraverso l'esposizione a 42°C per 1 minuto. I batteri sono quindi stati nuovamente incubati in ghiaccio per qualche minuto e quindi seminati in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina (50 µg/ml). Le piastre sono state mantenute a 37°C per circa 12 ore in modo da selezionare i batteri trasformati.

5.2.13 Sequenziamento di acidi nucleici.

Oltre all'analisi mediante restrizione enzimatica, le sequenze clonate all'interno degli opportuni plasmidi sono state controllate mediante sequenziamento.

Per ogni campione è stata allestita una reazione di amplificazione impiegando il kit “*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems), basato sul metodo di Sanger modificato [157]. Tale kit contiene i 4 deossinucleotidi trifosfato (ddNTPs) coniugati specificatamente con un cromoforo, i deossinucleosidi trifosfato, l'Ampli*Taq* DNA polimerasi e il tampone di reazione. La reazione è stata allestita in un volume finale di 20 µl in presenza di :

3.2 pmol del primer innesco

2 µl miscela del kit

4µl tampone di reazione 5x (Tris-HCl 200mM, pH 9.0; MgCl₂ 5mM)

200-500 ng DNA plasmidico.

La reazione è stata condotta in un termociclatore (Mastercycler, Eppendorf) impostando 30 cicli di amplificazione, dove ogni ciclo presenta le seguenti caratteristiche:

95°C 30 secondi

50°C 10 secondi

60°C 4 minuti

Il prodotto di reazione è stato precipitato in presenza di 1/10 (v/v) sodio acetato 3M pH 4.6 e 2 volumi di etanolo 95% (v/v). I campioni sono stati rispospesi in acqua e caricati nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Il sequenziatore utilizza il metodo di separazione su gel capillare ed i frammenti di DNA vengono analizzati da un rivelatore che converte la diversa fluorescenza emessa dai cromofori eccitati, corrispondenti ai diversi ddNTPs terminatori, in un picco di colore diverso. Il risultato finale consiste perciò ad un profilo densitometrico di picchi fluorescenti.

5.2.14 Allestimento degli incroci per l'identificazione degli individui transgenici

Gli individui transgenici necessari allo studio sono stati generati mediante microiniezione dei costrutti ottenuti in embrioni di *Drosophila melanogaster*.

Ogni singolo adulto sviluppatosi dagli embrioni microiniettati è incrociato con individui appartenenti al ceppo *w¹¹¹⁸* che presentano tutti un fenotipo “occhio bianco”. Dopo circa due settimane dal primo accoppiamento iniziano a schiudere gli adulti della generazione F1 dei quali è stata osservata la pigmentazione dell'occhio. Tutti gli individui con occhi bianchi sono stati scartati essendo l'occhio rosso il marcatore che permette di identificare l'integrazione del plasmide contenente il transgene.

Gli individui con occhio rosso (*w⁺*) sono stati quindi incrociati tra di loro in modo da ottenere linee indipendenti di moscerini transgenici, ognuna delle quali è la progenie di un singolo individuo trasformato ottenuto dalla microiniezione.

5.2.15 Caratterizzazione delle linee transgeniche

A) Allestimento degli incroci per la localizzazione cromosomica dell'inserto e per il bilanciamento del transgene

Il corredo cromosomico di *Drosophila melanogaster* è costituito da quattro coppie di cromosomi, con una coppia eteromorfa nei maschi (XX o XY, II, III, IV). Il cromosoma IV è caratterizzato da dimensioni molto inferiori rispetto agli altri, quindi la probabilità che il costrutto microiniettato si integri al suo interno è molto bassa. Sono perciò stati allestiti gli incroci per evidenziare l'eventuale inserzione del plasmide negli autosomi II e III.

Gli individui transgenici *w⁺* (fenotipo “occhio rosso”) ottenuti dalla microiniezione sono stati incrociati con una linea di *Drosophila* recante dei marcatori cromosomici specifici, letali in omozigosi, detta linea “bilanciatrice” (fig. 5.7). Dai nati della generazione F1

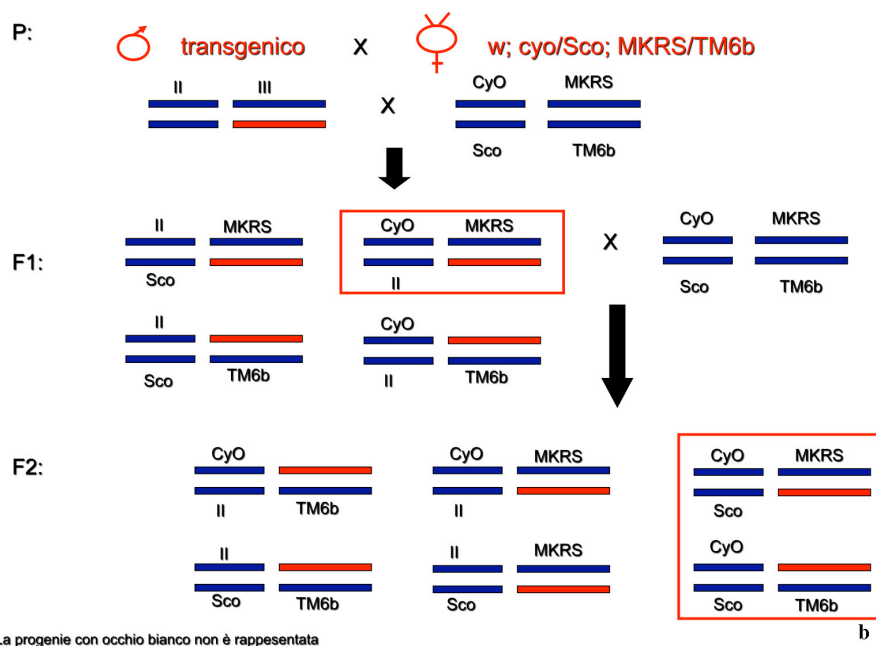
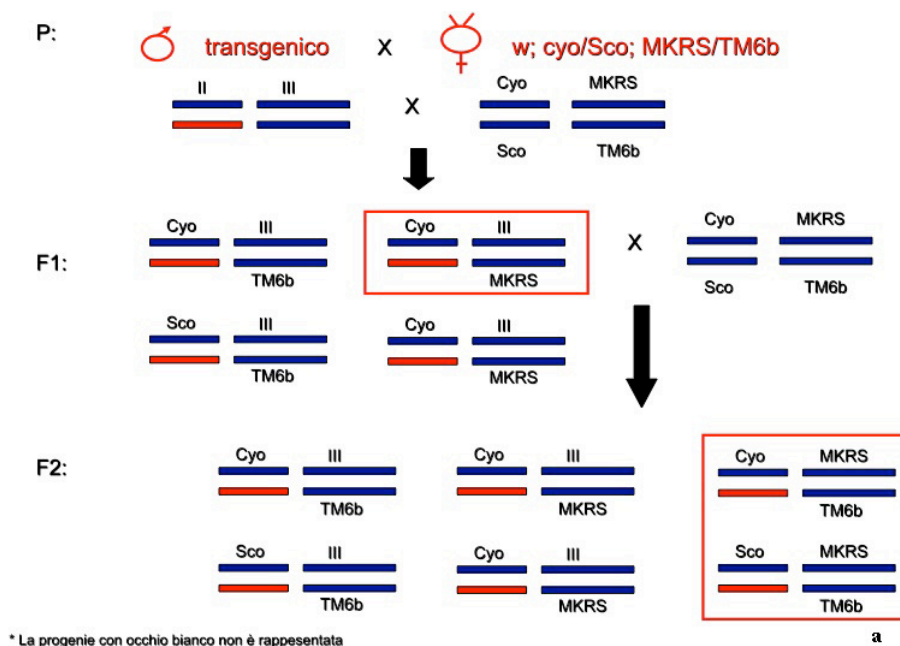


Figura 5.12: Schema degli incroci allestiti per la mappatura cromosomica del transgene. (a) Inserzione del plasmide nel cromosoma II; (b) inserzione del plasmide nel cromosoma III.

sono stati scelti gli individui $w+$ (occhio rosso per la presenza del transgene), *CyO* (*curly*, marcatore morfologico del II cromosoma, produce un fenotipo “ali arricciate”) e *MRKS* (marcatore morfologico del III cromosoma, produce un fenotipo “setole corte”) che vengono nuovamente incrociati con gli individui della linea bilanciatrice (fig. 5.12).

Il cromosoma nel quale si è inserito il plasmide è stato determinato osservando il fenotipo degli individui adulti della generazione F2 nata da quest’ultimo incrocio come di seguito descritto.

a- *Inserzione nel cromosoma II*: se l’inserzione del plasmide è avvenuta nel cromosoma II, gli individui della generazione F2 con fenotipo $w+$ non presenteranno mai contemporaneamente fenotipo *CyO* e *Sco* (marcatore morfologico del cromosoma II, produce un fenotipo “assenza di alcune setole”), e tra questi vengono selezionati quelli con fenotipo $w+$, *CyO*, *MRKS* e *TM6b* (marcatore morfologico del cromosoma III, produce un fenotipo “setole a ciuffi”) (fig. 5.12a). Tutti gli individui presentano perciò i fenotipi occhio rosso, ali arricciate, setole corte e a ciuffi.

b- *Inserzione nel cromosoma III*: se l’inserzione del plasmide è avvenuta nel cromosoma III, gli individui della generazione F2 con fenotipo $w+$ non presenteranno mai contemporaneamente fenotipo *MRKS* e *TM6b*, essendo entrambi dei marcatori di questo cromosoma. Tra questi vengono selezionati quelli con fenotipo $w+$, *CyO*, *Sco* e *MRKS* (fig. 5.12b). Tutti i moscerini presentano perciò occhio rosso, ali arricciate, setole corte e assenti in alcune regioni del dorso.

Per generare linee stabili nelle quali ad ogni generazione i moscerini hanno tutti lo stesso genotipo, femmine vergini e maschi della generazione F2 sono stati incrociati tra di loro.

B) Caratterizzazione delle linee transgeniche mediante ibridazione *in situ*

Per identificare il numero delle inserzioni del plasmide microiniettato e determinare con precisione la posizione dell’inserito in ogni linea transgenica indipendente ottenuta, è stato impiegato il metodo di ibridazione *in situ*, in combinazione con tecniche di immunocitochimica, su cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*.

a- Preparazione dei vetrini.

I vetrini coprioggetto sono stati trattati con una soluzione a base di silani (Sigma-Aldrich). Essi, lavati con etanolo 95% e lasciati asciugare all’aria, sono stati immersi per due volte nella soluzione di silicone e infine riposti in contenitori al riparo dalla polvere. Questo trattamento è essenziale per evitare l’adesione del materiale citologico ai vetrini coprioggetto durante la preparazione dei cromosomi politenici.

Per quanto riguarda i vetrini portaoggetto, dopo un accurato lavaggio con un detergente e abbondanti risciacqui con acqua distillata, sono stati immersi in una soluzione di gelatina 0.1% (v/v) e cromoallume 0.01% (v/v) e lasciati asciugare per una notte al riparo dalla polvere. La gelatinizzazione dei vetrini portaoggetto è un requisito essenziale per l'adesione su di essi del materiale citologico.

b- *Preparazione dei cromosomi politenici di Drosophila melanogaster.*

Per allestire i preparati da analizzare sono state utilizzate cellule provenienti dalle ghiandole salivari larvali di individui trasformati. Esse infatti presentano dei nuclei con un'organizzazione particolare derivata dal fatto che, durante lo sviluppo larvale, i cromosomi omologhi si appaiano e vanno incontro ad una serie di cicli replicativi senza che avvengano né mitosi né citodieresi. Di conseguenza, si vengono a formare dei cromosomi con un elevato grado di politenizzazione, ciascuno dei quali presenta un'ampiezza di circa 3-5 μm (fig. 5.13).

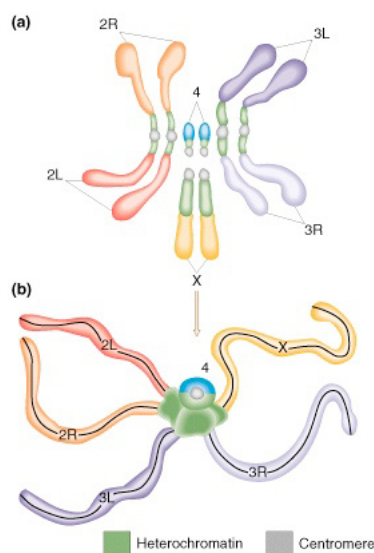


Figura 5.13: Rappresentazione schematica dei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*. a) Coppie di cromosomi; b) cromosoma politenico. (Tratto e modificato da www.mun.ca/biology/brain)

Nella preparazione dei cromosomi politenici sono state utilizzate larve al tardo III stadio (pre-pupale), in corrispondenza del quale essi raggiungono il massimo delle loro dimensioni. Le larve al III stadio si sviluppano circa una settimana dopo la deposizione delle uova (a 20°C) e sono facilmente isolabili in quanto emergono dal terreno nutritivo nel quale sono vissute fino a quel momento e iniziano ad arrampicarsi sui bordi dei contenitori di coltura.

Le larve isolate sono state dissezionate in acido acetico 45% (v/v) ponendo un ago da dissezione sulla parte posteriore della larva e un secondo ago appena al di sotto dell'apparato buccale. I due aghi sono quindi stati tirati in direzione opposta in modo tale da estrarre dalla

parte anteriore le ghiandole salivari che sono state isolate dagli altri tessuti e ripulite dai corpi grassi (fig. 5.14).

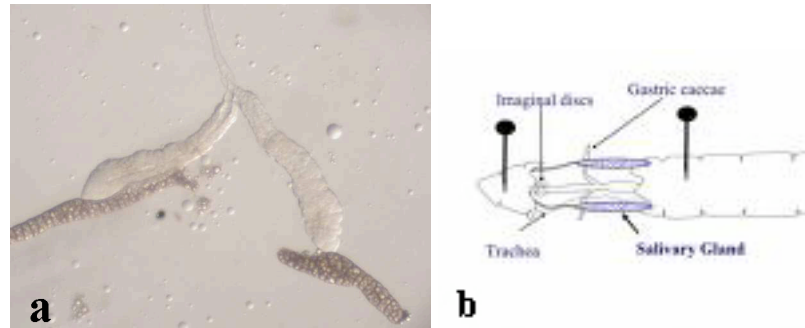


Figura 5.14: a) Ghiandole salivari di larve di *Drosophila melanogaster* al III stadio di sviluppo; b) schema raffigurante la procedura di estrazione. (Tratto da www.faculty.ucr.edu)

Successivamente, le ghiandole sono state poste in una goccia di acido acetico 45% (v/v) su di un vetrino coprioggetto ricoperto di silicone. Su di esso è stato quindi appoggiato un vetrino portaoggetto gelatinizzato e, utilizzando una matita, sono stati inferti delicatamente dei leggeri colpi con la punta prima lungo i lati del coprioggetto e poi radialmente, dal centro verso la periferia. Questa operazione causa la rottura delle cellule, la separazione dei singoli nuclei e la distensione dei bracci cromosomici. Successivamente è stata esercitata una pressione verticale direttamente sul vetrino in modo tale da appiattire i cromosomi. Per poter poi staccare facilmente il vetrino coprioggetto facendo leva con una lametta, il preparato è stato congelato in azoto liquido. Infine, il vetrino portaoggetto contenente i cromosomi politenici è stato immerso in etanolo 95% per 5 minuti in modo da disidratare il materiale citologico.

Per gli esperimenti di ibridazione *in situ* sono stati scelti i preparati nei quali i cromosomi non risultavano rifrangenti, bensì caratterizzati da una buona distensione e un bandeggio ben distinguibile al microscopio ottico.

c- Preparazione del DNA utilizzato come sonda negli esperimenti di ibridazione in situ.

La sonda utilizzata come *reporter* dell'avvenuta inserzione negli esperimenti di ibridazione *in situ* è stata ottenuta impiegando come stampo in cDNA del gene *white* presente nel vettore pUAST.

Per ottenere il cDNA di interesse sono stati digeriti 20 µg del plasmide pDK101*white* utilizzando gli enzimi di restrizione *Sma*I e *Xba*I. I prodotti della digestione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio e, una volta separate le due bande, quella corrispondente al cDNA *white*, di circa 1.8 kb, è stata escissa e il cDNA purificato utilizzan-

do il kit per l'estrazione da gel d'agarosio (Qiagen). Il cDNA da utilizzare è stato diluito alla concentrazione finale di 100 ng/ μ l.

d- *Marcatura della sonda.*

La sonda da utilizzare negli esperimenti è stata marcata con digossigenina, uno steroide estratto da *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*, uniche fonti naturali note di tale composto. La digossigenina si trova legata covalentemente a nucleotidi uridina incorporati nel DNA sonda per via enzimatica, attraverso la tecnica di marcatura "random priming". Avvenuta l'ibridazione *in situ*, la sonda marcata viene rilevata con tecniche di immunocitochimica impiegando anticorpi anti-digossigenina coniugati a sistemi di visualizzazione (fosfatasi alcalina o fluorescenza).

Per la marcatura della sonda si è proceduto secondo il metodo di Shmidt [199], utilizzando il DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche) secondo il protocollo seguente:

- 1 μ g di DNA 100 ng/ μ l disciolto in 10 μ l di acqua milliQ e denaturato per 5 minuti a 95°C;
- 2 μ l di miscela di esanucleotidi (0.5M Tris-HCl; 0.1M MgCl₂; 1mM Ditiotreitolo (DTT); 2 mg/ml BSA; 62.5 U/ml esanucleotidi);
- 2 μ l di DIG-DNA labeling mixture (1mM dATP; 1mM dCTP; 1mM dGTP; 0.65mM dTTP; 0.35mM DIG-UTP);
- 2U di enzima Klenow;
- acqua milliQ fino ad un volume finale di 20 μ l.

Dopo breve centrifugazione, la miscela di reazione è stata incubata a 37°C per tutta la notte.

Il giorno successivo, la reazione è stata interrotta operando una nuova denaturazione a 95°C per 10 minuti e sono stati aggiunti SSC 20x (NaCl 3M; citrato di sodio 300mM; pH 7.0) e SDS 10% (p/v) alle concentrazioni finali 5x e 0.1% rispettivamente.

e- *Verifica della marcatura della sonda mediante dot-blot.*

La marcatura della sonda e la sua concentrazione sono state stimate mediante dot-blot, confrontando il campione con il DNA marcato di controllo a concentrazione nota pari a 5ng/ μ l fornito dal kit di marcatura. Sono state preparate aliquote di diluizione 1, 1:5, 1:10; 1:20 e 1:40 sia per il DNA sonda che per il controllo positivo, ed una aliquota non diluita di DNA non marcato da utilizzare come controllo negativo. Dopo denaturazione a 95°C per

5 minuti, i campioni sono stati disposti in gocce da 1 μ l ciascuna su di una membrana in nylon e fatte asciugare per 30 minuti a 80°C. In seguito la membrana è stata bagnata con tampone maleico (acido maleico 100mM; NaCl 150mM, pH 7.5) e incubata prima in tampone di bloccaggio (siero di latte 1% (p/v) in tampone maleico) per 30 minuti, poi per altri 30 minuti in anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina (1:5000 in tampone di bloccaggio). Dopo due successivi lavaggi di 10 minuti in tampone maleico, la membrana è stata equilibrata con tampone Tris-HCl 1M ed infine incubata per 30 minuti al buio con la soluzione contenente il substrato colorante. La fosfatasi alcalina metabolizza i substrati NBT (nitroblutetrazolio 10% (p/v) in dimetilformammide, Roche) e BICP (bromocloroindolofosfato 10% (p/v) in dimetilformammide, Roche) contenuti nella soluzione colorante producendo un precipitato blu-violetto facilmente visibile dove l'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di enzima presente.

f- *Ibridazione in situ*.

L'ibridazione *in situ* consente di determinare la localizzazione di specifiche sequenze di DNA grazie all'utilizzo di apposite sonde ad esse complementari. Si è proceduto secondo tre fasi principali:

1- Denaturazione dei cromosomi politenici.

I vetrini con i cromosomi politenici sono stati disidratati mediante immersione dei vetrini stessi in etanolo 95% (v/v) per 5 minuti e successivamente incubati in SSC 2x a 75°C per 30 minuti. Questa fase serve ad evitare perdite di DNA che possono avvenire durante il successivo processo di denaturazione. Si è proceduto quindi ad una graduale disidratazione dei cromosomi prima in etanolo 70% e successivamente in etanolo 95% (v/v) per 5 minuti ciascuno. I cromosomi sono stati denaturati in NaOH 0.07N pH 12.5 per 3 minuti e in seguito gradualmente disidratati nuovamente in etanolo 70% e successivamente in etanolo 95% (v/v) per 5 minuti ciascuno.

2- Ibridazione.

La sonda da utilizzare negli esperimenti è stata inizialmente denaturata a 90°C per 5 minuti e, su ogni vetrino, ne sono stati aggiunti 7 μ l in corrispondenza del materiale citologico. Successivamente, un vetrino coprioggetto è stato posto sulla goccia di sonda e sigillato sul portaoggetto con colla UHU-extra per evitare la disidratazione dei campioni. I vetrini sono stati messi ad incubare in una cameretta umida a 68°C per 4 ore e 30 minuti.

3- Immunosaggio.

Il segnale di ibridazione è stato evidenziato mediante immunocitochimica a fluorescenza. Al termine dell'incubazione con la sonda marcata, sono stati sollevati i coprioggetto ed i vetrini sono stati immersi prima in tampone maleico per circa 1 minuto e poi in tampone di bloccaggio per 30 minuti. Successivamente si è effettuata una incubazione a 37°C per

30 minuti con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fluoresceina (20 µg/µl diluito in tampone di bloccaggio) al riparo dalla luce. Dopo due lavaggi in tampone maleico di 15 minuti ciascuno, i preparati sono stati colorati con bromuro di etidio alla concentrazione di 0.5 mg/ml in “*antifade*” (Roche). Tale mezzo di inclusione colora i cromosomi e limita il decadimento della fluorescenza.

4- Osservazione al microscopio.

I preparati sono stati analizzati al microscopio confocale Leica DM IRBE SP2.

5- Mappatura degli inserti.

Per localizzare i segnali di ibridazione corrispondenti agli inserti del plasmide microiniettato, i preparati sono stati analizzati per confronto con le mappe citologiche standard dei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*, messe a punto da Bridges [200] e con le fotografie ottenute da Lefevre [201].

Nel moscerino della frutta i cromosomi politenici sono uniti a livello dei centromeri in una struttura di eterocromatina, detta cromocentro, dalla quale si dipartono i cinque bracci maggiori di lunghezza molto simile: il cromosoma X, i bracci sinistro e destro dei cromosomi II (2L e 2R) e III (3L e 3R) e un sesto braccio molto piccolo, il cromosoma IV. Ciascun braccio dei cromosomi X, II e III è suddiviso in 20 regioni, il cromosoma IV in 2 soltanto. Le regioni sono numerate come segue:

- da 1 a 20 per il cromosoma X;
- da 21 a 40 per il braccio 2L;
- da 41 a 60 per il braccio 2R;
- da 61 a 80 per il braccio 3L;
- da 81 a 100 per il braccio 3R;
- 101 e 102 per il cromosoma IV.

Ogni regione viene a sua volta suddivisa in 6 sottoregioni indicate con una lettera dalla A alla F e, all'interno di queste, vengono numerate le bande.

La posizione dell'inserto viene determinata dal numero di cromosoma, dal braccio, dalla regione e dalla sottoregione nella quale viene individuato. Su ogni braccio dei diversi cromosomi si trovano inoltre dei punti di riconoscimento peculiari, dovuti alla presenza di “puff”,

cioè dei tratti rigonfi che corrispondono a zone di attiva trascrizione, o di altre caratteristiche morfologiche, spesso definite da una particolare nomenclatura [200, 201].

Molto utili per la mappatura possono essere anche i “punti deboli” dei cromosomi politenici. Bridges [200] identificò un certo numero di regioni nelle quali i cromosomi appaiono più sottili ed in corrispondenza delle quali possono verificarsi rotture durante la preparazione dei vetrini. I punti deboli sono dovuti in genere ad una ridotta politenizzazione locale [202]. Le regioni ove sono localizzati i più importanti di essi sono riportati in tabella 5.2.

X	3C, 11°, 19E
2L	35E, 36C, 39D, 40F
2R	53C
3L	64C, 75C
3R	89E, 98C

Tabella 5.2: Regioni cromosomiche nelle quali sono presenti punti deboli dei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*.

C) Verifica dell'integrità dell'inserito nelle linee transgeniche mediante PCR su singolo individuo

Per determinare se nelle diverse linee transgeniche ottenute dalla microiniezione l'inserzione del plasmide all'interno del genoma ospite era avvenuta correttamente e senza perdite di materiale genico dovute, ad esempio, a possibili riarrangiamenti in prossimità dell'estremità P del costrutto, sono state condotte delle amplificazioni di DNA da singolo individuo, impiegando gli specifici oligonucleotidi UAS F/HPrP wt R (tabella 5.1).

Per le PCR di controllo è stata utilizzata la seguente miscela di reazione:

- 5 μ l buffer 10x
- 4 μ l dNTPs 2.5mM
- 1 μ l primer UAS F 10 μ M
- 1 μ l primer HPrP wt R 10 μ M
- 0.3 μ l *Taq* Gold 5U/ μ l (Applied Biosystems)
- 100 ng DNA genomico
- acqua milliQ fino al volume finale di 50 μ l.

Il profilo termico utilizzato è stato il seguente:

95°C per 5 minuti

seguiti da 35 cicli:

95°C per 1 minuto

50°C per 1 minuto

72°C per 1 minuto

e infine da

72°C per 10 minuti

I prodotti di amplificazione e gli opportuni marcatori di peso molecolare (Roche) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio 1% (p/v) in tampone TBE 1x.

5.2.16 Allestimento degli incroci per l'analisi dell'espressione del transgene

Condizione essenziale per poter seguire popolazioni sperimentali di *Drosophila melanogaster* è di poter disporre di femmine vergini, quindi nate da poche ore. Questo perchè le femmine possono conservare per diversi giorni lo sperma dei maschi con i quali si sono accoppiate e, se non trovano condizioni favorevoli per la deposizione delle uova, possono trattenere anche gli embrioni. Gli individui neonati sono distinguibili per le dimensioni maggiori, il colore bianco della cuticola e, a volte, per le ali ancora arricciate.

Per promuovere l'espressione del transgene nelle linee di moscerini trasformati è stato utilizzato il sistema di espressione binaria UAS/GAL4 precedentemente descritto nella sottosezione 5.1.3. Gli incroci sono stati allestiti tra le linee di moscerini transgenici e le linee *driver-Gal4* a nostra disposizione (sezione 5.1.5). In tal modo è stato possibile studiare i fenotipi dovuti all'espressione della proteina prionica sia *wild type* che mutata in compartimenti e tempi ben definiti.

5.2.17 Test di mortalità

Il test di mortalità ha l'obiettivo di evidenziare se e a quale stadio di sviluppo l'espressione di un transgene di interesse produce un fenotipo letale nei moscerini trasformati.

Le linee di *Drosophilae* transgeniche sono state incrociate con le opportune linee *driver-Gal4*. I moscerini sono stati lasciati a deporre per circa 24 ore su di un apposito piastrellino contenente il mezzo nutritivo. Al termine di questo periodo, tutte le uova deposte sono state

contate al microscopio ottico. Successivamente, le larve sviluppatesi sono state trasferite nei contenitori di coltura per consentire loro di completare la crescita. Seguendo ogni fase dello sviluppo, sono state contate in successione prima le larve, poi le pupe ed infine i moscerini adulti, separandoli per classe genotipica. In questo modo è possibile stabilire in quale fase lo sviluppo di *Drosophila* è eventualmente interrotto e, di conseguenza, in quale fase l'espressione del transgene causa un fenotipo letale. Inoltre, analizzando i moscerini nati, è possibile determinare se siano rispettate le classi genotipiche previste secondo le leggi della segregazione di Mendel. Per ciascuna linea transgenica, ogni deposizione è stata eseguita in triplicato.

5.2.18 Analisi della vitalità

Per verificare se l'espressione del transgene vada ad interferire con la normale durata di vita dei moscerini, 100 maschi e 100 femmine di un giorno di età per ogni genotipo da analizzare sono stati suddivisi ponendo 6 individui adulti per ogni tubo di coltura in presenza del mezzo nutritivo. I campioni sono stati mantenuti in ambiente costante, alla temperatura di 23°C e in condizioni di 12 ore di luce e 12 ore di buio.

I moscerini sono stati osservati registrando giornalmente il numero degli individui morti e i sopravvissuti sono stati trasferiti settimanalmente in nuovi tubi di coltura. Le conte giornaliere sono proseguite fino alla morte di tutti gli individui di controllo privi dell'espressione dei transgeni.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando tre linee indipendenti per H-PrP *wild type* o recanti le diverse mutazioni che esprimessero il transgene sia a livello panneuronale (*driver elav-Gal4*) che a livello dei soli motoneuroni (*driver d42-Gal4*) e i rispettivi controlli.

5.2.19 Osservazione del fenotipo

Dopo aver allestito gli incroci tra le *Drosophilae* trasformate e le opportune linee *driver-Gal4*, in modo da promuovere l'espressione tessuto-specifica del transgene, è stato valutato se ciò inducesse la comparsa di un fenotipo anormale negli individui della generazione F1. A tal fine i moscerini nati dagli incroci sono stati osservati giornalmente per evidenziare la comparsa di eventuali alterazioni del comportamento rispetto ai controlli.

5.2.20 Analisi dell'attività locomotoria in *Drosophila melanogaster*

Per studiare le difficoltà nel movimento evidenziate dei moscerini che esprimono le diverse forme di H-PrP sono stati utilizzati specifici test comportamentali. In particolare, sono state analizzate l'attività locomotoria, i ritmi circadiani e la periodicità di questi ultimi.

Le analisi sono state condotte in collaborazione con il Prof. Costa del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

Preparazione dei tubicini per il monitoraggio dell'attività locomotoria

I tubicini di vetro (lunghezza 6.5 cm, diametro 4 mm) precedentemente puliti con alcool, vengono riempiti ad una estremità con il mezzo nutritivo, per una profondità di circa 2-2.5 cm, quantità sufficiente a garantire la sopravvivenza degli individui per almeno un mese. Questa operazione si compie immergendo i tubi in un recipiente contenente uno strato di medium. Una volta solidificatosi il nutrimento, i tubicini vengono sigillati ad una estremità con del parafilm.

Maschi adulti di *Drosophila melanogaster* che presentano i genotipi di interesse, sono stati anestetizzati con CO₂ e, tramite l'ausilio di un pennellino, sono stati inseriti individualmente all'interno dei tubi. L'estremità aperta è stata chiusa utilizzando un piccolo tappino di gommapiuma.

Misurazione dell'attività locomotoria

Gli individui sono stati mantenuti in termostati dove è stato instaurato un ciclo luce:buio di 12 ore ciascuno (*Light:Dark* 12:12 o LD).

La periodicità del ritmo dell'attività locomotoria è stata misurata nelle seguenti condizioni sperimentali: 3 giorni di buio costante (DD) e 7 giorni LD 12:12.

Registrazione dell'attività locomotoria

Nonostante negli ultimi vent'anni siano stati sviluppati diversi sistemi di registrazione dell'attività locomotoria di *Drosophila melanogaster*, il monitor comunemente più utilizzato nei laboratori di ricerca è il Trikinetics Inc. (Waltham, MA USA): il *Drosophila Activity Monitoring System (DAMSystem)*. Questo strumento permette non solo di registrare l'attività locomotoria ma anche di misurare, grazie ad appositi sensori, importanti parametri ambientali come luce, temperatura e umidità. Le schede di registrazione (*DAM2 Drosophila*

Activity Monitor, fig. 5.15) contengono ciascuna 32 tubini dove vengono posti singolarmente gli individui adulti. Esse sono collegate tramite appositi cavi al computer deputato alla programmazione dell'esperimento, alla registrazione ed al periodico immagazzinamento dei dati.

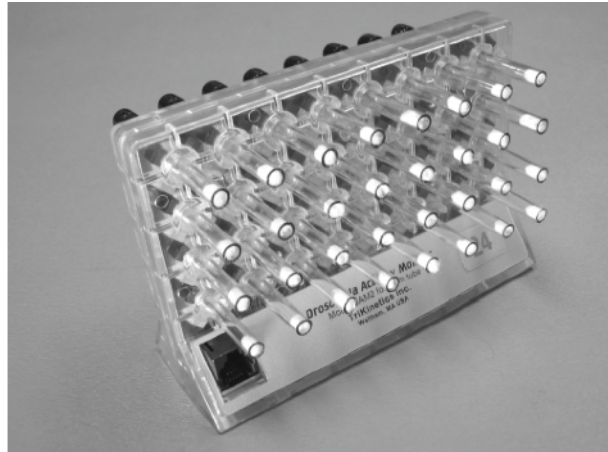


Figura 5.15: DAM2 *Drosophila* activity monitor.

Ogni singolo individuo è monitorato da un *emitted-detector* a raggi infrarossi e quindi l'attività locomotoria può essere stimata come numero di eventi in cui il raggio è interrotto a causa del passaggio del moscerino lungo il tubino. I circuiti di calcolo monitorano in continuazione l'attività in tutti i 32 canali e, ad intervalli regolari che possono variare da 1 secondo ad un'ora, inviano il calcolo totale dell'attività al *DAM System Software* nel computer per l'immagazzinamento dei dati [203].

Per ogni genotipo di interesse, sono stati analizzati 32 individui maschi giunti vivi al termine dell'esperimento. Le femmine, anche se vergini, non sono state selezionate poiché possono deporre uova che disturbano l'esperimento.

I dati acquisiti rappresentano l'attività svolta dai singoli individui in quel determinato lasso di tempo. Per le analisi condotte in questo lavoro, per ogni esperimento sono stati utilizzati bin di 5 minuti.

Analisi della fase di picco serale

I dati file *.OUT sono stati processati utilizzando un programma specifico in modo da ottenere gli attogrammi, metodo grafico utilizzato per osservare nel complesso l'attività locomotoria di *Drosophila* (fig. 5.16). Ogni attogramma consente di confrontare, per ogni giorno di esperimento, l'attività locomotoria di ogni singolo individuo attraverso una rappresentazione in due grafici: i) un grafico "grezzo" ottenuto dai dati originali dell'attività

locomotoria; ii) un grafico “lisciato” proveniente dall’analisi degli stessi dati, privati dei picchi di attività e frequenza più elevati. In questo modo viene favorita l’osservazione dei picchi di attività principali (picco mattiniero e picco serale) e il determinarne la fase (ritmico/aritmico). Attraverso una finestra di controllo che appare con l’apertura del programma, viene inoltre stabilita la durata del giorno e della notte, graficamente visualizzate attraverso barre grigie nel primo caso, nere nel secondo. Per facilitare l’interpretazione, gli attogrammi vengono rappresentati riportando due volte l’attività di ogni giorno di registrazione, escluso il primo. Questo metodo, definito *double plotted*, permette di comparare l’attività di un giorno con quella del successivo sia in senso orizzontale che verticale (fig. 5.16).

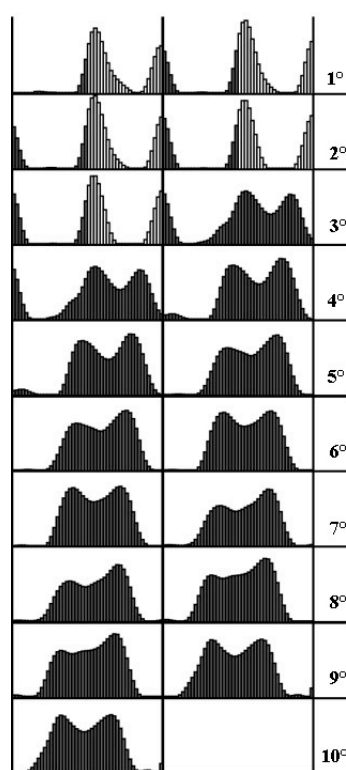


Figura 5.16: Esempio di attogramma della registrazione di 10 giorni dell’attività locomotoria di un singolo individuo di *Drosophila melanogaster* sottoposto a 3 giorni di L:D 12:12 seguiti da 7 giorni di D:D. Le bande grigie indicano il periodo di luce, quelle nere il periodo di buio.

Analizzando gli attogrammi sono stati esclusi dalle successive analisi gli individui morti durante l’esperimento o poco prima del suo termine.

I dati raccolti per ogni genotipo sono stati sottoposti ad una analisi della varianza (Test ANOVA) utilizzando il programma Statistica (Statsoft Inc.).

Analisi della periodicità dell'attività locomotoria

I dati di attività locomotoria registrati dal software Trikinetics e raccolti in un file *Excel*, mediante l'impiego di un software specifico sono stati sottoposti a due analisi statistiche atte a rilevare la presenza di periodicità: l'autocorrelazione e l'analisi spettrale CLEAN [158].

L'autocorrelazione evidenzia se il numero di eventi ottenuti in due momenti separati da un certo intervallo di tempo sono correlati. In questa analisi quindi, se si considera un intervallo di 1 bin di tempo (5 minuti), i dati ottenuti al bin 1 vengono correlati a quelli ottenuti al bin 2, quelli al bin 2 con quelli al bin 3 e così via, per tutte le ore di registrazione e dovranno mostrare il più alto coefficiente di correlazione possibile. I coefficienti di correlazione ottenuti possono essere rappresentati graficamente in un correlogramma in funzione dei diversi intervalli di tempo (fig. 5.17). In tale grafico si può evidenziare che il coefficiente varia in modo ciclico, mostrando dei picchi in corrispondenza dei valori massimi. Inoltre, in esso è anche indicata una linea orizzontale che rappresenta il limite di confidenza o significatività, al di sotto della quale i dati vanno rigettati. I picchi riscontrati all'interno di questo intervallo e al di sopra della linea di significatività sono considerati attendibili.

Il metodo CLEAN si basa invece sull'analisi spettrale di Fourier, ottenuta con l'algoritmo CLEAN [158]. Questo tipo di analisi si pone l'obiettivo di cercare delle regolarità cicliche nella serie di dati, partendo dal presupposto che essa contenga una certa ciclicità. A questo scopo, la serie di dati ottenuta sperimentalmente viene scomposta in un numero ridotto di funzioni sinusoidali, quali seno e coseno.

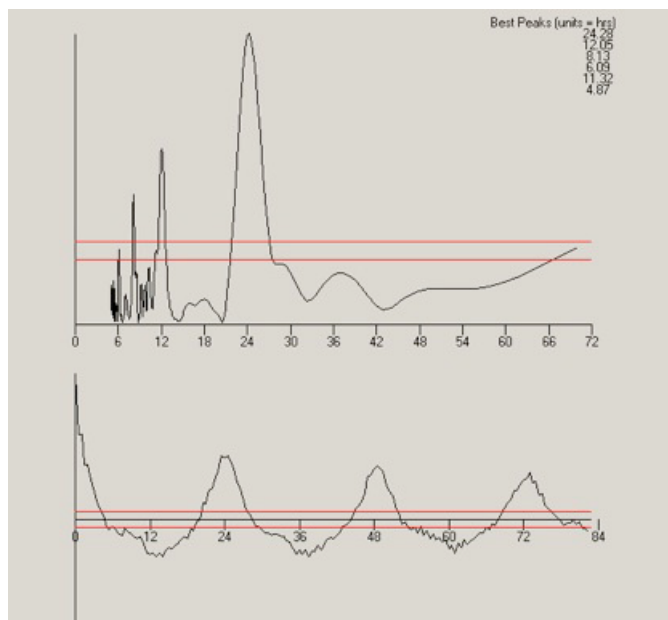


Figura 5.17: Rappresentazione di un grafico ottenuto mediante l'analisi spettrale, utilizzando l'algoritmo CLEAN (sopra) e di un grafico ottenuto applicando il metodo dell'autocorrelazione (sotto).

In figura 5.17 è rappresentato un grafico di un'analisi condotta con il CLEAN. I picchi che compaiono nel grafico ottenuto dall'analisi rappresentano le componenti spettrali con valore maggiore e la loro periodicità viene indicata in base al grado di significatività (fig.5.17). Le due linee orizzontali rappresentano i limiti di significatività del 95% (linea tratteggiata) e del 99% (linea punteggiata). Il "range" per stimare la ritmicità circadiana in un individuo adulto di *Drosophila melanogaster* è stato stabilito tra le 18 e le 32 ore.

L'attività locomotoria delle *Drosophilae* viene considerata ritmica quando entrambe le analisi sono positive per la presenza di periodicità e, di conseguenza, ne è stato valutato il periodo (τ). In caso contrario, il moscerino viene considerato aritmico.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il test di analisi della varianza ANOVA, impiegando il programma Statistica (Statsoft Inc.).

5.2.21 Inclusioni in paraffina

Per poter valutare eventuali alterazioni dovute all'espressione di H-PrP a carico del sistema nervoso centrale nelle *Drosophilae* transgeniche, gli individui adulti con espressione panneuronale del transgene oppure le loro sole teste sono stati inclusi in paraffina e sezionate al microtomo.

Poichè il moscerino della frutta presenta uno strato esterno di chitina, si è reso necessario effettuare un trattamento con chitinasi per rimuovere tale rivestimento.

Dopo aver anestetizzato con CO₂ i moscerini, sono state asportate circa 15 teste per ogni campione che sono state raccolte in una Eppendorf. Nel caso invece degli individui interi, si è inizialmente asportata l'estremità dell'addome con l'utilizzo di un bisturi, in modo da permettere l'ingresso dei diversi reagenti utilizzati durante l'inclusione.

Di seguito sono riportati i diversi passaggi del protocollo da noi utilizzato:

- fissazione in formaldeide 4% (p/v) per almeno 2 ore;
- 2 lavaggi in PBS in blanda agitazione ciascuno di 10 minuti;
- trattamento con chitinasi: 2 lavaggi con HEPES buffer 0.2M pH 7.4, ciascuno di 15 minuti e successiva incubazione con chitinasi 0.7 µg/ml a 37°C per tutta la notte;
- 3 lavaggi in PBS in blanda agitazione, ognuno da 10 minuti;
- decalcificazione in EDTA 0.5M pH 8 per 4/5 ore in blanda agitazione;
- 3 lavaggi in PBS ciascuno di 10 minuti in blanda agitazione.

Per l'inclusione in paraplast è stato utilizzato il sistema automatizzato presente nel laboratorio del Prof. Altavilla, presso il Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali dell'Università di Padova.

Taglio e colorazione dei campioni

Le sezioni sono state ottenute utilizzando un microtomo rotativo (Leica). Il blocchetto di paraffina contenente le teste dei moscerini è stato fissato su un supporto metallico e posizionato sul morsetto del microtomo. Sono state effettuate sezioni seriali di 7 μm che sono state adagiate su una goccia d'acqua posta su di un vetrino portaoggetto precedentemente trattato con polilisina in modo da favorire l'adesione delle sezioni. I preparati sono stati lasciati ad asciugare su una piastra riscaldata a 25°C per circa 3 ore.

Le sezioni da analizzare al microscopio ottico sono state colorate con ematossilina/eosina secondo il protocollo di seguito riportato.

a- Sparaffinatura delle sezioni:

xilolo 15 minuti

etanolo 100% (v/v) 5 minuti

etanolo 95% (v/v) 3 minuti

etanolo 80% (v/v) 3 minuti

acqua distillata 3 minuti

b- Colorazione dei nuclei:

ematossilina 1-2 minuti

acqua di fonte 15 minuti

c- Colorazione del citoplasma:

eosina 40 secondi

lavaggio veloce in acqua distillata

d-Disidratazione e chiarificazione:

etanolo 80% (v/v) 1 minuto

etanolo 95% (v/v) 3 minuti

etanolo 100% 5 minuti

xilolo 15 minuti

I vetrini sono stati infine montati con la resina Eukitt (Sigma) a base di xilolo ed osservati al microscopio ottico.

Il presente progetto di ricerca mira a sviluppare e validare un nuovo modello animale per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili di natura ereditaria che, fino ad oggi, rappresentano una peculiarità dell'uomo. L'utilizzo di *Drosophila melanogaster* per lo studio delle TSE potrebbe rivelarsi un efficace modello da utilizzare da un lato per studiare la funzione della PrP umana (H-PrP), sia normale che mutata, e, dall'altro, per effettuare un rapido *screening* genetico delle principali mutazioni associate alle tre forme di tali patologie (GSS, fCJD e IFF).

Un modello animale basato sul moscerino della frutta risulta notevolmente vantaggioso dato che questo organismo è ben conosciuto e sono state sviluppate numerose tecniche genetiche e molecolari che si possono utilizzare. Certamente non ci si può aspettare che *Drosophila* rispecchi esattamente ciò che avviene nell'uomo, ma il suo utilizzo per un rapido *screening* genetico potrebbe fornire indicazioni importanti su quali mutazioni svolgono un ruolo preponderante nello sviluppo di queste malattie. I risultati che si otterranno potranno essere utilizzati non soltanto per approfondire le conoscenze sulla biologia dei prioni e sul ruolo svolto dalle diverse mutazioni ma anche per direzionare futuri studi su modelli murini più vicini all'uomo.

Mediante ricerche nel database del progetto genoma di *Drosophila* [204] è stato possibile verificare che il moscerino della frutta non presenta un gene omologo a *PRNP*, che nell'uomo codifica la proteina prionica cellulare. Per questo motivo, nel nostro studio si è reso necessario generare *Drosophilae* transgeniche in grado di esprimere sia le PrP^{Sc} umane recanti le mutazioni scelte, sia la proteina cellulare PrP^C da utilizzare come controllo. E' stato infatti

dimostrato che l'introduzione transgenica in *Drosophila* di forme patologiche di geni umani spesso genera fenotipi che ricordano la malattia nell'uomo [149, 182, 187].

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili sono delle patologie neurodegenerative. Per questo motivo la nostra attenzione si è concentrata sui possibili effetti dell'espressione delle diverse H-PrP a livello del sistema nervoso dei moscerini. Avvalendosi del sistema binario di espressione ectopica UAS/GAL4, nei diversi esperimenti è stata promossa in *Drosophila* l'espressione tessuto-specifica o cellulo-specifica dei transgeni a livello pan-neuronale oppure nella sottopopolazione di cellule nervose rappresentata dai motoneuroni.

6.1 Identificazione e clonaggio del cDNA codificante H-PrP

A partire dai linfociti umani isolati da sangue periferico, fornito dal Centro Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova, è stato estratto l'RNA totale presente nelle cellule.

L'RNA ottenuto è stato retrotrascritto, mediante RT-PCR, in cDNA utilizzando degli oligonucleotidi degenerati. Per valutare la corretta retrotrascrizione dell'RNA e la qualità del cDNA ottenuto, è stata allestita una reazione di PCR in modo da amplificare il gene costitutivamente espresso β -actina, grazie a specifici oligonucleotidi (β -actina F/R) (tab. 5.1).

Utilizzando come stampo il cDNA retrotrascritto è stato amplificato, mediante PCR usando gli opportuni oligonucleotidi innesco H-PrP *wt* F/R (tab. 5.1), il cDNA codificante la proteina prionica cellulare umana. Il frammento ottenuto, di circa 800 bp, è stato subclonato nel vettore pCR2.1 TOPO e l'inserimento del cDNA è stato verificato mediante restrizione enzimatica con l'enzima *EcoRI* che riconosce le sequenze poste ai due lati del punto di inserzione del frammento di PCR.

Il clonaggio nel vettore pCR2.1 TOPO non è direzionato. Il corretto inserimento della sequenza in orientamento 5'-3' è stato verificato mediante restrizione enzimatica attraverso l'impiego degli enzimi *SmaI* e *HindIII*. Il primo infatti riconosce un sito di restrizione a 116 bp del cDNA di *PRNP*, mentre *HindIII* agisce su di una sequenza presente all'interno del sito di policlونaggio del vettore. Sulla base dei profili di restrizione ottenuti, sono stati selezionati gli opportuni cloni da utilizzare nei successivi esperimenti.

Per verificare che non fossero state introdotte mutazioni indesiderate dalla *Taq* polimerasi durante la fase di amplificazione, i cloni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento utilizzando gli oligonucleotidi M13F/R (tab. 5.1) che si appaiano a specifiche sequenze presenti nel vettore, a monte e a valle del sito di clonaggio.

Dalle sequenze nucleotidiche ottenute è inoltre stato possibile analizzare il codone codificante l'aminoacido in posizione 129 della sequenza proteica. In tale posizione infatti è presente un polimorfismo che, pur non essendo di per se stesso patogenetico, può influenzare il fenotipo clinico prodotto dalla mutazione D178N. Tale mutazione può infatti causare fCJD se associata alla valina in 129 oppure IFF se in questa posizione si trova un residuo di metionina. Nel cDNA *PRNP* ottenuto, la sequenza presenta il codone codificante un residuo di metionina 129.

Una volta verificata l'assenza di mutazioni indesiderate, la sequenza *PRNP* è stata utilizzata per i successivi esperimenti di mutagenesi sito-specifica.

6.2 Mutagenesi sito-specifica e clonaggio nel vettore pUAST

Per generare un valido modello animale per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili familiari, sono state scelte tre tra le più note mutazioni a carico del gene che codifica la proteina prionica cellulare umana, in modo tale che fossero da un lato rappresentative delle tre forme familiari di TSE fino ad ora descritte (GSS, fCJD e IFF), e dall'altro che interessassero le diverse regioni della proteina: le porzioni N-, C- terminali e la regione intermedia (tab. 6.1).

Mutazione	TSE associata	Posizione
P102L	GSS	N-termini
D178N/129M	IFF	intermedia
D178N/129V	fCJD	intermedia
E200K	fCJD	C-termini

Tabella 6.1: Mutazioni introdotte nella sequenza codificante H-PrP *wt*.

Utilizzando come stampo il plasmide pCR2.1 TOPO H-PrP^C *wt*, sono state introdotte, mediante mutagenesi sito-specifica, le mutazioni di interesse, impiegando gli opportuni oligonucleotidi disegnati: H-PrP *wt* F/R, H-PrP P102L F/R, H-PrP D178N F/R e H-PrP E200K F/R (tab. 5.1).

Dato che nel cDNA di *PRNP* è presente in posizione 129 il codone codificante per un residuo di metionina, il clone nel quale è stata introdotta la mutazione D178N, è stato sottoposto ad un ulteriore esperimento di mutagenesi sito-specifica per introdurre, in corrispondenza di tale codone, la mutazione che porta alla codifica di un residuo di valina. Grazie all'uso

degli opportuni primer H-PrP M129V F/R (tab. 5.1), è stata così ottenuta anche la sequenza codificante il prione umano D178N/129V associato alla fCJD.

Dopo aver verificato mediante sequenziamento che le mutagenesi fossero avvenute correttamente e non fossero state introdotte mutazioni non desiderate in seguito ad errori della *Taq* polimerasi, i cDNA scelti per ogni mutazione e la sequenza H-PrP^C *wt* utilizzata come stampo sono stati clonati nel vettore pUAST. Questo vettore viene normalmente usato in *Drosophila* per la creazione di linee transgeniche poichè contiene, oltre all'attivatore UAS, due elementi P che permettono l'inserimento del transgene nel genoma ricevente e il marcatore *white* (*w*⁺) che consente l'immediato riconoscimento degli individui trasformati conferendo all'occhio il colore rosso.

Per ottenere i costrutti da utilizzare nella transgenesi, sia i plasmidi pCR2.1 TOPO H-PrP che il vettore pUAST sono stati sottoposti a restrizione enzimatica mediante l'impiego della coppia di enzimi *NotI* e *KpnI* e i frammenti ottenuti sono stati usati per allestire le reazioni di ligazione.

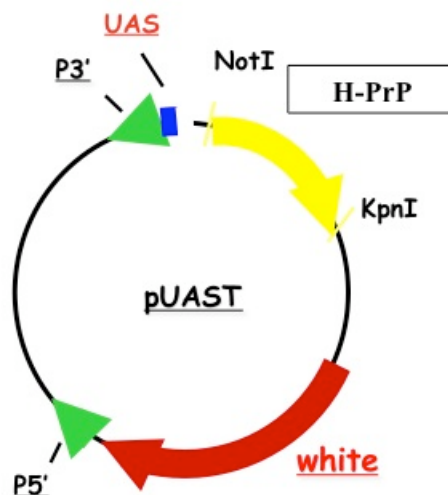


Figura 6.1: Clonaggio delle diverse forme di H-PrP nel vettore pUAST per la transgenesi in *Drosophila melanogaster*.

Una volta ottenuti i costrutti contenenti le sequenze codificanti la proteina prionica cellulare e i diversi prioni umani, i plasmidi sono stati utilizzati negli esperimenti di microiniezione per generare le *Drosophilae* transgeniche.

6.3 Generazione e caratterizzazione degli individui transgenici

Mediante microiniezione degli embrioni di *Drosophila melanogaster* appartenenti al ceppo *w¹¹¹⁸* con i costrutti che codificano la H-PrP^C *wt* o recanti le mutazioni P102L (GSS), D178N/129M (IFF), D178N/129V (fCJD) e E200K (fCJD), sono state ottenute le diverse linee transgeniche indipendenti necessarie allo studio. La microiniezione è stata eseguita dalla ditta BestGene Inc. [205].

Affinchè l'inserimento dei plasmidi mediato dagli elementi P possa avvenire con successo, gli embrioni devono essere microiniettati al polo posteriore entro un'ora e mezza dalla fecondazione. In questo momento infatti si vengono a formare le cellule polari che daranno origine ai gameti dell'adulto. Dato che il transgene va quindi ad inserirsi nelle cellule germinali, non è possibile discriminare gli individui trasformati nelle *Drosophilae* originatesi dagli embrioni sopravvissuti alla microiniezione, ma soltanto nella loro progenie. Per questo motivo, ogni singolo individuo sviluppatosi è stato incrociato con individui appartenenti al ceppo *w¹¹¹⁸* che presentano una pigmentazione dell'occhio bianca. Nei moscerini della generazione F1 nata da questi incroci è stato possibile selezionare gli individui trasformati osservando la colorazione dell'occhio, essendo il colore rosso (*w⁺*) il marcatore che permette di identificare gli animali che presentano l'inserzione del plasmide.

Il numero di linee trasformate ottenute per ogni costrutto microiniettato è riportato nella tabella 6.2.

H-PrP	Numero linee transgeniche
<i>wt</i>	8
P102L	8
D178N/129M	9
D178N/129V	10
E200K	10

Tabella 6.2: Linee transgeniche di *Drosophila melanogaster* ottenute mediante microiniezione.

6.3.1 Mappatura cromosomica dell'inserito

In ognuna delle linee transgeniche ottenute è stata mappata la presenza del plasmide nel genoma dei moscerini, andando a stabilire innanzitutto in quale cromosoma esso si sia inserito.

Gli individui appartenenti alle 45 linee a disposizione sono stati incrociati con la “linea bilanciatrice” di genotipo w ; CyO/Sco ; $MKRS/Tm6b$, caratterizzata dalla presenza di specifici marcatori cromosomici, letali in omozigosi (paragrafo 5.2.15A).

Nella generazione F1 nata da questi incroci sono stati selezionati gli individui che presentavano il fenotipo “occhio rosso”, che indica la presenza del transgene, e due marcatori cromosomici: CyO (*curly*, marcatore morfologico del II cromosoma, produce un fenotipo “ali arricciate”) e $MKRS$ (marcatore morfologico del III cromosoma, produce un fenotipo “setole corte”). Per determinare l’esatto cromosoma di inserzione, questi individui F1 sono stati nuovamente incrociati con la linea bilanciatrice e, nella generazione F2, sono stati analizzati i fenotipi delle diverse classi genotipiche nate. Nel caso in cui l’inserzione del plasmide sia avvenuta nel cromosoma II, gli individui della generazione F2 con fenotipo $w+$ non presenteranno mai contemporaneamente entrambi i marcatori di tale cromosoma CyO e Sco (marcatore morfologico del cromosoma II, produce un fenotipo “assenza di alcune setole”), e tra questi sono stati selezionati quelli con fenotipo $w+$, CyO , $MKRS$ e $TM6b$ (marcatore morfologico del cromosoma III, produce un fenotipo “setole a ciuffi”): occhi rossi, ali arricciate, setole corte e a ciuffi (fig. 5.12a). Se l’inserzione del plasmide è avvenuta nel cromosoma III, gli individui della generazione F2 con fenotipo $w+$ non presenteranno mai contemporaneamente i suoi marcatori e quindi è assente il fenotipo $MKRS/TM6b$. Tra i possibili genotipi sono stati selezionati i moscerini con fenotipo $w+$, CyO , Sco e $MKRS$: occhio rosso, ali arricciate, assenza di alcune setole che si presentano più corte (fig. 5.12b).

Per ottenere linee transgeniche stabili, cioè all’interno delle quali tutte le future generazioni presenteranno lo stesso genotipo dei genitori di partenza, gli individui $w+$, H-PrP/ CyO ; $MKRS/Tm6b$ oppure $w+$, CyO/Sco ; H-PrP/ $MKRS$ ottenuti nella progenie F2 sono stati incrociati tra loro.

La localizzazione cromosomica del transgene nelle 45 linee di *Drosophila* trasformate è riportata nella tabella 6.3.

6.3.2 Verifica dell’integrità dell’inserito

Per promuovere l’espressione ectopica di un transgene in maniera tessuto-specifica in *Drosophila* trasformate utilizzando il vettore pUAST, viene utilizzato il sistema binario UAS/GAL4 (paragrafo 5.1.3). La trascrizione del gene di interesse richiede la presenza di Gal4 e quindi l’assenza di questo elemento nelle linee transgeniche lo mantiene silente fino a che non vengono incrociate con specifiche linee *driver*-Gal4.

La mappatura cromosomica dell’inserito precedentemente descritta non fornisce alcuna informazione sull’espressione effettiva di H-PrP nei moscerini trasformati. L’inserito potrebbe

6.3. Generazione e caratterizzazione degli individui transgenici

H-PrP	Linea transgenica	Localizzazione cromosomica	Marcatore cromosomico
<i>wt</i>	3A	II e III	<i>CyO</i> , <i>MKRS</i>
<i>wt</i>	3B	III	<i>MKRS</i>
<i>wt</i>	3C	II	<i>CyO</i>
<i>wt</i>	3D	III	<i>MKRS</i>
<i>wt</i>	3E	III	<i>MKRS</i>
<i>wt</i>	3F	II	<i>CyO</i>
<i>wt</i>	3G	III	<i>MKRS</i>
<i>wt</i>	3H	III	<i>MKRS</i>
P102L	2A	III	<i>MKRS</i>
P102L	2B	II	<i>CyO</i>
P102L	2C	II	<i>CyO</i>
P102L	2D	II	<i>CyO</i>
P102L	2E	II	<i>CyO</i>
P102L	2F	III	<i>MKRS</i>
P102L	2G	III	<i>MKRS</i>
P102L	2H	II	<i>CyO</i>
D178N/129M	4A	II	<i>CyO</i>
D178N/129M	4B	II	<i>CyO</i>
D178N/129M	4C	II	<i>CyO</i>
D178N/129M	4D	II	<i>CyO</i>
D178N/129M	4E	II	<i>CyO</i>
D178N/129M	4F	II e III	<i>CyO</i> , <i>MKRS</i>
D178N/129M	4G	III	<i>MKRS</i>
D178N/129M	4H	III	<i>MKRS</i>
D178N/129M	4I	II	<i>CyO</i>
D178N/129V	5A	III	<i>MKRS</i>
D178N/129V	5B	II	<i>CyO</i>
D178N/129V	5C	III	<i>MKRS</i>
D178N/129V	5D	II	<i>CyO</i>
D178N/129V	5E	III	<i>MKRS</i>
D178N/129V	5F	II	<i>CyO</i>
D178N/129V	5G	III	<i>MKRS</i>
D178N/129V	5H	II	<i>CyO</i>
D178N/129V	5I	II	<i>CyO</i>
D178N/129V	5L	III	<i>MKRS</i>
E200K	1A	II	<i>CyO</i>
E200K	1B	III	<i>MKRS</i>
E200K	1C	II	<i>CyO</i>
E200K	1D	III	<i>MKRS</i>
E200K	1E	II	<i>CyO</i>
E200K	1F	II	<i>CyO</i>
E200K	1G	II	<i>CyO</i>
E200K	1H	III	<i>MKRS</i>
E200K	1I	II	<i>CyO</i>
E200K	1L	III	<i>MKRS</i>

Tabella 6.3: Linee transgeniche ottenute, loro denominazione e mappatura cromosomica. II = secondo cromosoma; III= terzo cromosoma; *CyO* = “ali arricciate”; *MKRS* = “setole a ciuffi”.

non essere integro dato che, in seguito all'inserzione nel genoma ricevente, potrebbe aver subito fenomeni di ricombinazione o delezione dovuti, ad esempio, a possibili riarrangiamenti in prossimità degli elementi P che andrebbero ad impedire, una volta attivata, la sua corretta espressione.

Per caratterizzare approfonditamente le linee di *Drosophila* transgeniche ottenute mediante microiniezione, sono stati condotti degli esperimenti volti a verificare l'effettiva integrità dell'inserto. Da un singolo individuo appartenente ad ognuna delle 45 linee a disposizione, è stato estratto il DNA genomico. Utilizzando gli opportuni primer UAS F/H-PrP *wt* R (tab. 5.1), è stata amplificata, mediante PCR, la regione che comprende la sequenza UAS e il transgene inserito all'interno del sito di clonaggio.

In tutte le linee di moscerini trasformati è stato possibile amplificare correttamente tale regione. Questo risultato indica quindi l'integrità degli inserti nelle *Drosophilae* a nostra disposizione. Ciò permette di supporre che in ognuna di esse sarà possibile, utilizzando il sistema UAS/GAL4, promuovere l'espressione della sequenza codificante le diverse H-PrP e che, nel caso la proteina non fosse rilevabile in alcune di esse, ciò non può essere attribuito a fenomeni che hanno danneggiato il transgene durante la sua inserzione nel genoma ricevente.

6.3.3 Caratterizzazione delle linee transgeniche mediante ibridazione *in situ*

L'inserimento del plasmide contenente in cDNA codificante le diverse forme di H-PrP nel corredo cromosomico di *Drosophila melanogaster* è mediato dalla presenza di due elementi P che fiancheggiano il sito di policlonaggio. Si tratta perciò di un evento del tutto casuale e il plasmide può inserirsi non soltanto in qualsiasi punto del genoma ricevente, ma anche in un numero di copie variabile, ipoteticamente da 1 a n. Per questo motivo, per caratterizzare le linee transgeniche a nostra disposizione, abbiamo condotto degli esperimenti di ibridazione *in situ* in combinazione con tecniche di immunocitochimica (paragrafo 5.2.13). Un approccio di questo tipo ci ha permesso di determinare sia l'esatto numero di inserzioni avvenute in ogni linea di *Drosophila* a nostra disposizione, sia la loro esatta posizione all'interno del cromosoma.

Dalle ghiandole salivari estratte da larve al III stadio di sviluppo, sono stati isolati i caratteristici cromosomi politenici. Questi cromosomi sono uniti a livello dei centromeri in una struttura, il cromocentro, dalla quale si dipartono cinque bracci maggiori di lunghezza simile (cromosomi X, II, III) e un braccio più corto (cromosoma IV), ognuno suddiviso in regioni, sottoregioni e bandeggi (paragrafo 5.2.13e). Per localizzare i segnali di ibridazione corri-

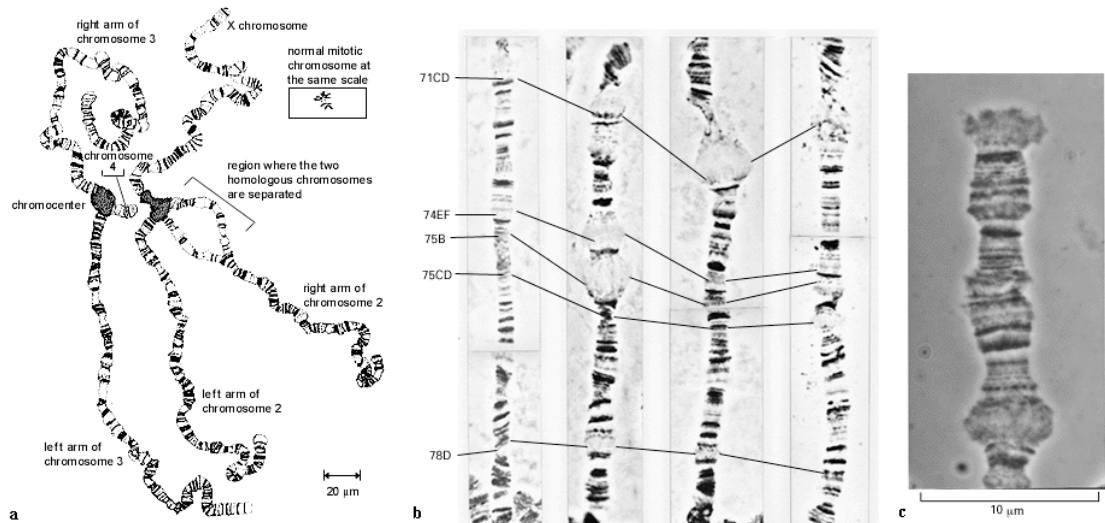


Figura 6.2: a) Rappresentazione schematica delle diverse regioni presenti nei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster* (tratto da <http://kc.njnu.edu.cn>); b) mappe citologiche dei cromosomi politenici (tratto da [200]); c) particolare di una regione del cromosoma.

spondenti agli inserti, i cromosomi trattati sono stati confrontati con le mappe citologiche standard [200, 201] (fig. 6.2).

Per gli esperimenti di ibridazione *in situ* è stato impiegato come sonda il cDNA *white*. Tale sequenza è infatti presente nel plasmide pUAST utilizzato per la transgenesi e può perciò fungere da sequenza *reporter* dell'avvenuta inserzione (fig. 6.3).

I risultati ottenuti per ognuna delle 45 linee di *Drosophila melanogaster* transgeniche a disposizione sono riportati in tabella 6.4.

Come si può osservare dai dati riportati nella tabella, le diverse linee di moscerini transgenici presentano un numero di inserzioni diverso, sia per quanto riguarda le linee trasformate con plasmidi codificanti forme diverse di H-PrP, sia per quelle trasformate con lo stesso costrutto.

Questi risultati, pur attesi data la casualità dell'evento di inserzione mediato da trasposoni, rivestono una notevole importanza. Volendo sviluppare un valido modello per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili, queste differenze potrebbero risultare di grande interesse dato che non è ancora stato chiarito se le malattie da prioni possono insorgere o essere caratterizzate da un fenotipo più o meno grave in relazione alla quantità di proteina presente nei soggetti affetti. Inoltre, alcuni ricercatori sostengono che già la sovraespressione della proteina prionica cellulare è in grado di causare la comparsa della malattia [206, 207].

La presenza di un numero differente di inserzioni del plasmide rilevata mediante ibrida-

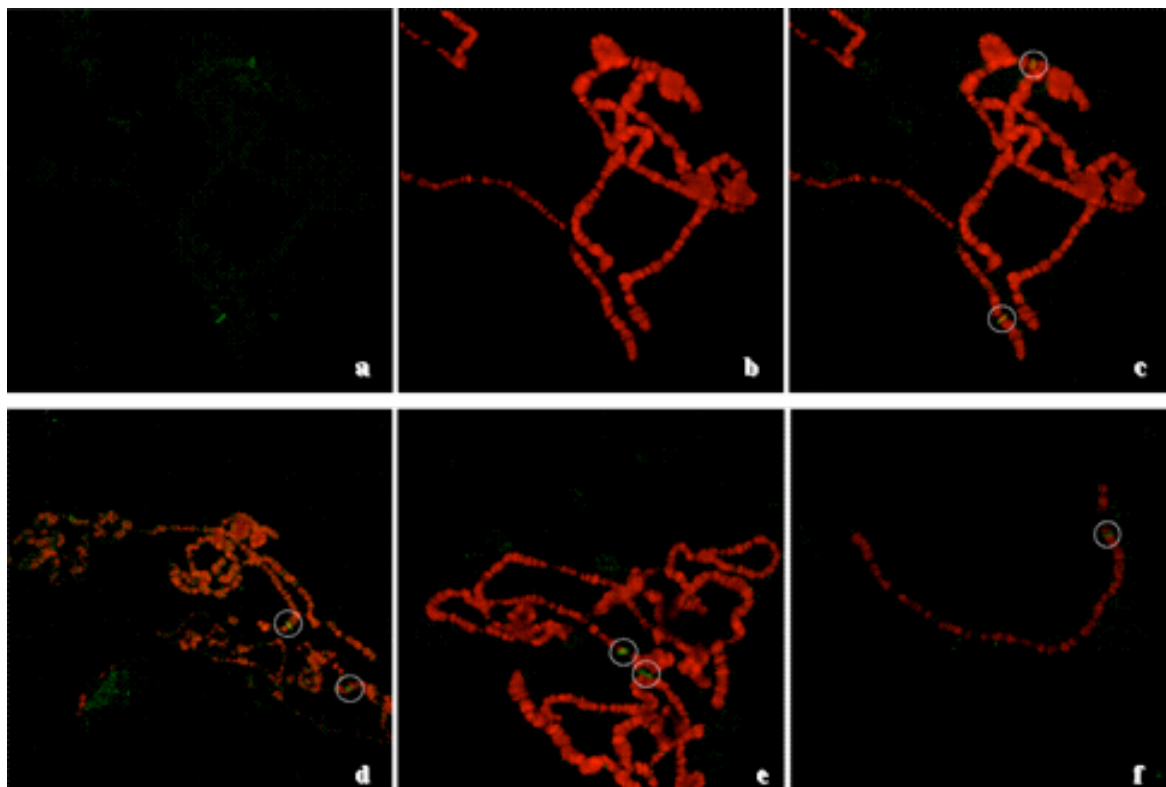


Figura 6.3: Esempi di ibridazione *in situ* su cromosomi politenici estratti da moscerini trasformati per le diverse forme di H-PrP. I cerchi evidenziano i punti di inserzione del plasmide. a) Segnale di ibridazione; b) colorazione con etidio bromuro; c) sovrapposizione delle immagini a e b; d, e, f) altri esempi di ibridazione *in situ*.

6.3. Generazione e caratterizzazione degli individui transgenici

H-PrP	Linea transgenica	Numero di inserzioni del plasmide pUAST
wt	3A	2
wt	3B	3
wt	3C	4
wt	3D	2
wt	3E	2
wt	3F	1
wt	3G	1
wt	3H	1
P102L	2A	1
P102L	2B	1
P102L	2C	3
P102L	2D	2
P102L	2E	1
P102L	2F	1
P102L	2G	2
P102L	2H	3
D178N/129M	4A	2
D178N/129M	4B	1
D178N/129M	4C	4
D178N/129M	4D	3
D178N/129M	4E	1
D178N/129M	4F	1
D178N/129M	4G	2
D178N/129M	4H	1
D178N/129M	4I	1
D178N/129V	5A	1
D178N/129V	5B	2
D178N/129V	5C	1
D178N/129V	5D	4
D178N/129V	5E	2
D178N/129V	5F	3
D178N/129V	5G	1
D178N/129V	5H	3
D178N/129V	5I	2
D178N/129V	5L	1
E200K	1A	3
E200K	1B	1
E200K	1C	1
E200K	1D	1
E200K	1E	1
E200K	1F	1
E200K	1G	1
E200K	1H	2
E200K	1I	2
E200K	1L	2

Tabella 6.4: Numero di inserzioni del plasmide pUAST H-PrP nel genoma di *Drosophila melanogaster*.

zione *in situ* non è però sufficiente per affermare che linee nelle quali vi sono più copie di inserzioni presentino un maggiore livello di espressione della proteina, come pure che allo stesso numero di copie corrisponda la stessa quantità di proteina espressa. Può accadere infatti, data la casualità dell'evento di inserzione, che il plasmide si sia integrato in particolari punti del genoma ricevente nei quali potrebbero essere presenti degli elementi in grado di fungere da repressori/attivatori della trascrizione, oppure in una regione non trascritta.

Per poter scegliere quindi le linee da utilizzare nei successivi esperimenti si è reso necessario valutare, mediante Real-Time PCR, i reali livelli di espressione della proteina prionica umana, sia *wt* che recante le diverse mutazioni.

6.4 Valutazione dei livelli di espressione di H-PrP in *Drosophila melanogaster*

Data l'importanza che la quantità di proteina patologica presente nell'individuo potrebbe svolgere nello sviluppo delle TSE, sono stati valutati, utilizzando la tecnica Real-Time PCR, i livelli di espressione delle diverse forme di H-PrP nelle linee indipendenti di moscerini trasformati.

Per promuovere la trascrizione del transgene, normalmente silente nelle linee trasformate, è stato utilizzato il sistema di espressione binario UAS/GAL4.

Per ottenere il massimo livello di proteina nell'individuo, sono stati allestiti gli incroci tra i moscerini trasformati con i diversi costrutti appartenenti alle 45 linee a disposizione e quelli della linea *driver act-Gal4* nella quale quest'ultimo è posto sotto il controllo del promotore actina e presenta quindi un'espressione ubiquitaria. Nella generazione F1 nata da questi incroci non è stato osservato alcun individuo di genotipo H-PrP/*act-Gal4* e che presenta quindi la proteina prionica cellulare o il prione espressi in tutte le cellule dell'organismo. Inoltre non sono state osservate pupe non schiuse sulle pareti dei tubi da coltura. Queste osservazioni fanno supporre che l'espressione ubiquitaria delle diverse forme di H-PrP induca la comparsa di un fenotipo letale ad una precoce fase dello sviluppo, a livello embrionale o larvale.

Vista l'impossibilità di ottenere moscerini che esprimessero H-PrP in tutti i tessuti, per ottenere gli individui necessari per gli esperimenti di Real-Time PCR, sono stati allestiti gli incroci tra le 45 linee transgeniche e la linea *driver pan-neuronale elav-Gal4*. Nella generazione F1 nata da questi incroci sono stati selezionati, sulla base dei marcatori cromosomici presenti, i moscerini che esprimevano la H-PrP^C e H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K a livello dell'intero sistema nervoso. L'espressio-

ne pan-neuronale non ha perciò indotto la comparsa di un fenotipo letale nè ha, almeno apparentemente, interferito con il normale sviluppo degli individui.

A partire da 6 individui per ogni genotipo è stato estratto l'RNA totale e, mediante RT-PCR, esso è stato retrotrascritto in cDNA usando degli oligonucleotidi degenerati. Come controllo di retrotrascrizione, ogni cDNA ottenuto è stato utilizzato come stampo per amplificare, mediante PCR, il cDNA RP49, che codifica una proteina ribosomiale costitutivamente espressa in *Drosophila*. Per allestire la reazione sono stati impiegati gli oligonucleotidi RP49169/333 (tab. 5.1).

Una volta verificata l'avvenuta retrotrascrizione, è stato possibile valutare i livelli di espressione di H-PrP mediante Real-Time PCR. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, per ognuna delle linee di moscerini trasformati a disposizione, a partire da tre estrazioni indipendenti di RNA. Per l'amplificazione sono state utilizzate le coppie di oligonucleotidi H-PrP RT F/R e RP49 169/333 (tab. 5.1). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al livello di espressione del transgene in una linea scelta come riferimento.

I livelli di espressione delle diverse H-PrP nelle linee di *Drosophila* transgeniche sono riassunti nei grafici riportati nella figura 6.4.

Come si può osservare in figura, le quantità di H-PrP^C *wt* e H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K presenti nei moscerini variano notevolmente, sia tra le linee trasformate con lo stesso plasmide, sia tra quelle trasformate con costrutti diversi.

Alla luce di questi risultati, sono state selezionate 4 linee, per ciascuna H-PrP, da utilizzare negli esperimenti. In particolare, delle 4 linee, 3 presentano un livello di espressione paragonabile mentre la quarta è caratterizzata dal massimo livello di espressione ottenuto per quella specifica H-PrP. Negli esperimenti successivi, sarà perciò possibile confrontare gli eventuali fenotipi ottenuti sia i) in linee di moscerini che esprimono la stessa forma di H-PrP a livelli paragonabili, sia ii) in linee di *Drosophilae* esprimenti forme diverse di H-PrP ma con livelli di espressione simili, che iii) linee che esprimono la stessa H-PrP ma a livelli diversi. In questo modo potrà inoltre essere verificato se l'eventuale fenotipo osservato sia correlato alla quantità di ciascuna forma della proteina umana presente nell'organismo.

Le linee selezionate sono riportate nella tabella 6.5.

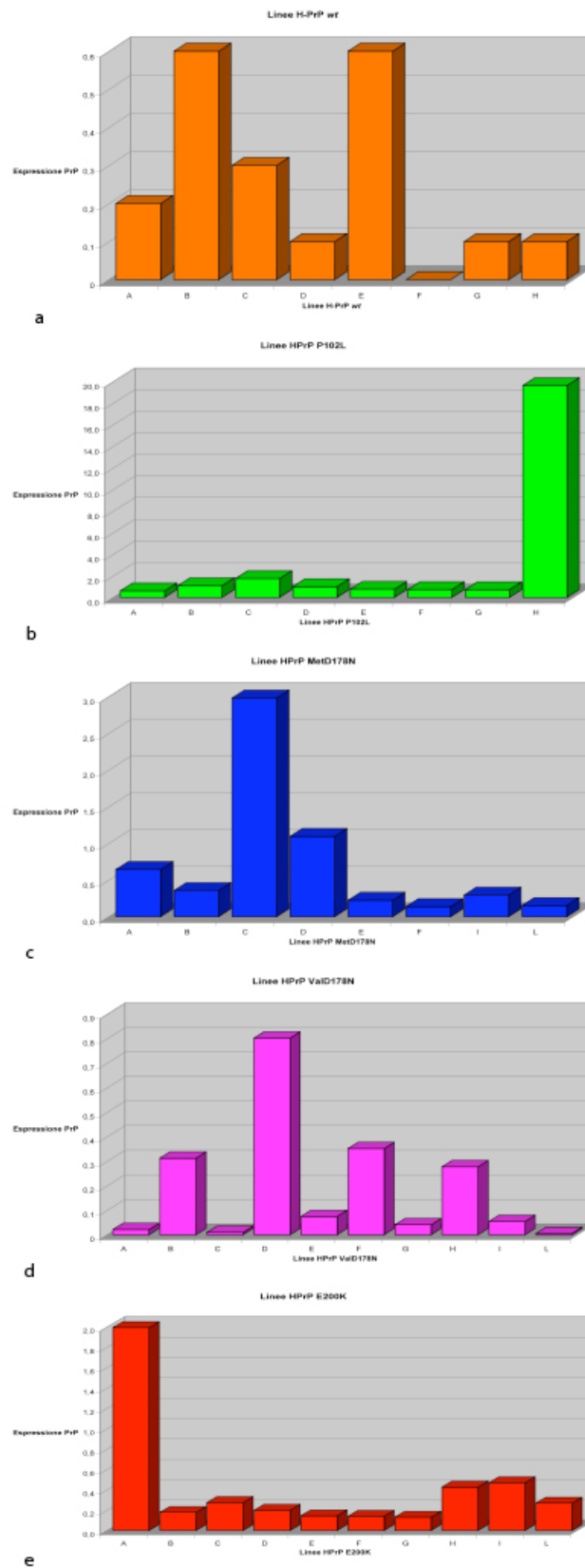


Figura 6.4: Livelli di espressione di H-PrP nelle 45 linee indipendenti di *Drosophila* transgeniche. a) H-PrP^C wt; b) H-PrP^{Sc} P102L; c) H-PrP^{Sc} D178N/129M; d) H-PrP^{Sc} D178N/129V; e) H-PrP^{Sc} E200K.

H-PrP	Linea scelta
H-PrP <i>wt</i>	3D, 3E, 3G, 3H
H-PrP P102L	2A, 2F, 2G, 2H
H-PrP D178N/129M	4A, 4B, 4C, 4I
H-PrP D178N/129V	5B, 5D, 5F, 5H
H-PrP E200K	1A, 1H, 1I, 1L

Tabella 6.5: Linee di moscerini transgenici scelte in base ai livelli di espressione di H-PrP.

6.5 Effetti fenotipici dell'espressione di H-PrP in *Drosophila melanogaster*

6.5.1 Analisi della letalità

Per analizzare nel dettaglio se l'espressione di H-PrP^C *wt* e H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K causi un fenotipo letale e, nel caso ciò si verificasse, a che livello dello stadio dello sviluppo dei moscerini avvenga, sono stati allestiti gli incroci tra le linee transgeniche selezionate (tab. 6.5) e le linee *driver act-Gal4* (ubiquitaria), *elav-Gal4* (pan-neuronale) e *d42-Gal4* (specificata per i motoneuroni). Inoltre, come controllo sono stati allestiti gli incroci tra le linee *driver-Gal4* e le linee transgeniche selezionate, con individui appartenenti al ceppo *w¹¹¹⁸*, in modo da ottenere gli individui di controllo privi dell'espressione della proteina.

I moscerini di ciascun incrocio sono stati lasciati a deporre per 24 ore su di un apposito piastrellino contenente il mezzo nutritivo. Al termine di tale periodo, sono state effettuate le conte degli embrioni e, successivamente, delle larve, delle pupe e, infine, degli individui adulti, suddivisi in base alla loro classe genotipica. In tal modo è stato possibile seguire tutte le fasi dello sviluppo del moscerino e rilevare in quale di esse l'espressione della proteina causa eventualmente la morte degli individui. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ciascun incrocio allestito.

Nel caso dell'espressione ubiquitaria utilizzando il *driver act-Gal4*, i risultati ottenuti hanno confermato quanto era già stato osservato in precedenza: l'espressione in tutti i tessuti del moscerino sia di H-PrP^C *wt* che delle forme patologiche H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K induce un fenotipo letale. Negli adulti della generazione F1 nata da questi incroci non sono mai stati osservati individui appartenenti alla classe genotipica H-PrP/*act-Gal4*. Dalle conte effettuate è stato possibile stabilire che la letalità si manifesta durante lo sviluppo embrionale del moscerino. Si assiste infatti ad una drastica riduzione del numero delle larve (circa 200 per ogni deposizione) ri-

spetto a quello degli embrioni (circa 700), mentre non vi sono significative variazioni tra il numero di larve, pupe ed adulti.

Nel caso in cui il transgene sia stato espresso a livello pan-neuronale utilizzando la linea *driver elav-Gal4*, è stato osservato un tasso di mortalità nella fase embrionale di circa il 20%, passando mediamente, nelle 3 repliche per ognuno degli incroci allestiti, da circa 700 embrioni a 550 larve in ogni deposizione. Questa diminuzione si è mantenuta pressochè costante in tutti gli esperimenti di letalità condotti, indipendentemente da quale proteina umana fosse espressa. Ciò non sembra comunque essere imputabile all'espressione delle diverse forme di H-PrP poichè un risultato analogo è stato ottenuto negli esperimenti di controllo. Questa conclusione è stata confermata dal fatto che, osservando gli individui adulti della F1 nata dagli incroci allestiti, le percentuali rilevate per ogni classe genotipica rispecchiano quelle attese secondo le leggi della segregazione di Mendel.

Risultati analoghi a quelli ottenuti con il *driver elav-Gal4* sono stati ottenuti nel caso degli esperimenti condotti utilizzando il *driver d42-Gal4* in grado di promuovere l'espressione del transgene a livello dei soli motoneuroni.

Nella tabella 6.6 sono riassunti i risultati ottenuti negli esperimenti di analisi della letalità.

H-PrP	<i>act-Gal4</i>	<i>elav-Gal4</i>	<i>d42-Gal4</i>
<i>wt</i>	letale (embrione)	vitale	vitale
P102L	letale (embrione)	vitale	vitale
D178N/129M	letale (embrione)	vitale	vitale
D178N/129V	letale (embrione)	vitale	vitale
E200K	letale (embrione)	vitale	vitale

Tabella 6.6: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti negli esperimenti per valutare la comparsa di un fenotipo letale nelle *Drosophilae* che esprimono le diverse forme di H-PrP.

Alla luce di questi risultati, tutti gli esperimenti successivi sono stati condotti promuovendo l'espressione della proteina prionica e dei prioni umani a livello pan-neuronale e/o nei soli motoneuroni.

6.5.2 Analisi della vitalità

Per verificare se l'espressione delle diverse forme di H-PrP, pur non inducendo la comparsa di un fenotipo letale, vada ad interferire con la normale durata di vita dei moscerini, sono stati condotti degli esperimenti di "vitalità". Le *Drosophilae*, in condizioni naturali, sono insetti che vivono all'incirca 80-90 giorni.

Per ottenere gli individui da analizzare negli esperimenti, sono stati allestiti gli incroci tra le linee transgeniche scelte e le linee *driver elav-Gal4* e *d42-Gal4*. Nella generazione F1, sono stati selezionati i moscerini di genotipo H-PrP/*driver-Gal4*.

Come controllo sono stati allestiti gli incroci tra le linee *driver-Gal4* e le linee transgeniche, e individui del ceppo *w1118*. Tra i nati da questi incroci, sono stati selezionati gli individui *driver-Gal4/w1118* e H-PrP/*w1118*, privi perciò dell'espressione del transgene. Tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando tre linee indipendenti per la H-PrP^C *wt* e per le sue forme mutate H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K e i rispettivi controlli.

100 maschi e 100 femmine di un giorno di età di ognuno dei genotipi da analizzare, per un totale di 6200 individui, sono stati suddivisi ponendo 6 moscerini adulti per ogni tubo da coltura in presenza del mezzo nutritivo. I tubi sono stati mantenuti in un termostato in condizioni costanti di temperatura e umidità, e in un regime di luce:buio di 12:12 ore. I campioni sono stati monitorati registrando giornalmente il numero degli individui morti e i sopravvissuti sono stati trasferiti settimanalmente in nuovi tubi. Le conte giornaliere sono proseguite fino alla morte di tutti i moscerini di controllo.

Come si può osservare in figura 6.5, nel caso dell'espressione di H-PrP a livello dell'intero sistema nervoso dei moscerini, sia la proteina prionica cellulare umana che le sue forme mutate causano una riduzione dell'aspettativa di vita delle *Drosophilae*, se paragonate ai rispettivi controlli. Si può notare inoltre, osservando le curve di sopravvivenza dei maschi e delle femmine all'interno della stessa popolazione che in tutti i casi analizzati queste ultime vivono più a lungo rispetto ai primi, pur mantenendo un andamento della curva paragonabile.

Dall'analisi statistica dei campioni analizzati (riportata in didascalia delle figure) le differenze tra i gruppi campione e i corrispondenti controlli è risultata essere significativa.

L'osservazione dei moscerini che esprimono H-PrP^C *wt* ha evidenziato che sia i maschi (fig. 6.5a) che le femmine (fig. 6.5b) muoiono nel giro di 40 giorni, con il 50% degli individui deceduti dopo circa 18 giorni, mentre la durata di vita dei controlli è di 75 giorni nel caso di H-PrP^C *wt/w1118* e di circa 60 per gli individui *elav-Gal4/w1118* (fig. 6.5a, b). Il 50% degli animali di controllo di entrambi i genotipi muore intorno ai 40 giorni di età, vivendo all'incirca il doppio rispetto ai campioni che esprimono la proteina prionica cellulare umana.

I moscerini che esprimono il prione H-PrP^{Sc} P102L, che nell'uomo è associato alla GSS, muoiono precocemente se paragonati ai corrispondenti controlli. Il 50% dei maschi di *Drosophila* muore nel giro di circa 9 giorni (fig. 6.5c), presentando perciò un fenotipo più grave rispetto a quelli che esprimono la proteina prionica cellulare *wt*. La quasi totalità del campione muore nel giro di circa 20 giorni, pur essendoci alcuni, rari individui, definiti *escapers*, che sopravvivono fino al raggiungimento dei 62 giorni di età. Le femmine H-PrP^{Sc}

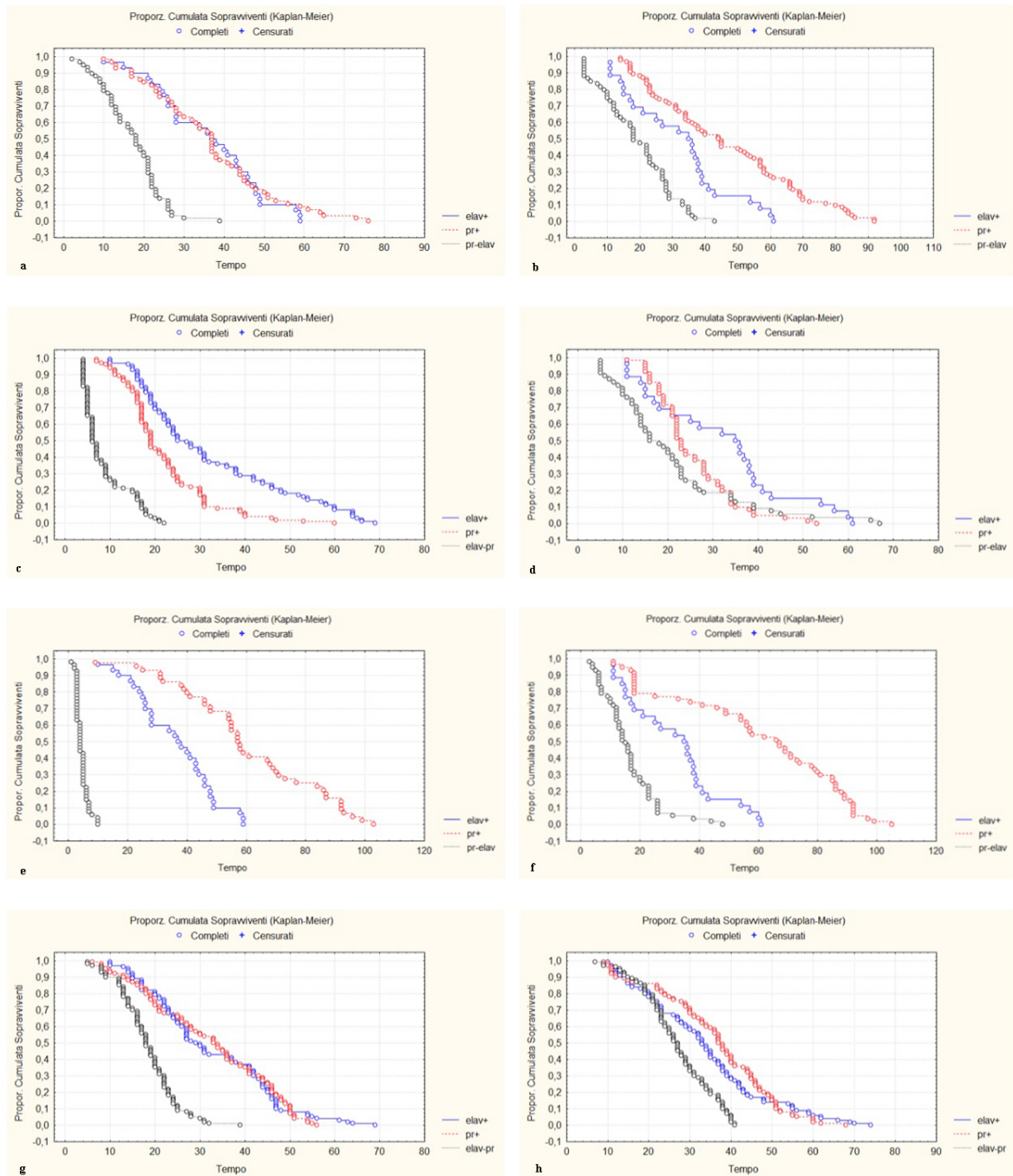


Figura 6.5: Curve di vitalità di *Drosophila melanogaster* nel caso dell'espressione pan-neuronale delle diverse forme di H-PrP. a) maschi H-PrP^C wt (chi quadro 60.96; $p < 0.0001$); b) femmine H-PrP^C wt (chi quadro 55.72; $p < 0.0001$); c) maschi H-PrP^{Sc} P102L (chi quadro 69.33; $p < 0.0001$); d) femmine H-PrP^{Sc} P102L (chi quadro 15.35; $p < 0.001$); e) maschi H-PrP^{Sc} D178N/129M (chi quadro 99.88; $p < 0.00001$); f) femmine H-PrP^{Sc} D178N/129M (chi quadro 65.75; $p < 0.00001$); g) maschi H-PrP^{Sc} E200K (chi quadro 72.47; $p < 0.00001$); h) femmine H-PrP^{Sc} E200K (chi quadro 38.77; $p < 0.00001$). In ogni grafico sono riportati in nero gli individui H-PrP/*elav*-Gal4 mentre in rosso e in blu le due popolazioni di controllo *elav*-Gal4/*w1118* e H-PrP/*w1118* rispettivamente.

P102L/*elav*-Gal4 risentono meno dell'espressione del prione rispetto al gruppo dei maschi: il 50% degli individui muore a circa 15 giorni dallo sfarfallamento dell'adulto e l'intera popolazione non sopravvive oltre i 50 giorni (fig. 6.5d). Questo gruppo di campioni mostra inoltre un andamento della curva di vitalità paragonabile a quella dei controlli. Gli individui H-PrP^{Sc} P102L/*w1118*, privi dell'espressione del prione umano, vivono circa 40-50 giorni, con il 50% degli individui deceduti dopo i primi 20, mentre i controlli *elav*-Gal4/*w1118* sopravvivono all'incirca 60 giorni.

Questo effetto dell'espressione pan-neuronale della H-PrP sull'aspettativa di vita dei moscerini risulta particolarmente drastico nel caso delle *Drosophilae* che esprimono la mutazione D178N/129M (fig. 6.5e, f), associata nell'uomo all'insonnia familiare fatale. In questo caso infatti, tutti e 100 i moscerini maschi di ogni linea, per un totale perciò di 300 individui, muoiono nel giro di 10 giorni, con il 50% degli individui deceduti nei primi 5 giorni di esperimento (fig. 6.5e). Pur mantenendo un fenotipo grave, con il 50% della popolazione deceduto dopo i primi 15 giorni, le femmine H-PrP^{Sc} D178N/129M/*elav*-Gal4 sopravvivono fino ai 30 giorni di età, con alcuni *escapers* che muoiono a 50 giorni (fig. 6.5f). Gli individui appartenenti ai gruppi di controllo vivono fino a 100 giorni nel caso di H-PrP^{Sc} D178N/129M/*w1118* e circa 60 giorni nel caso di *elav*-Gal4/*w1118*, non discostandosi dal comportamento dei moscerini in natura.

L'espressione del prione E200K, che nell'uomo causa la forma familiare della malattia di Creutzfeldt-Jacob, induce morte precoce nei moscerini transgenici ma ciò avviene in misura minore rispetto alle altre forme mutate di H-PrP e rispecchia un andamento simile a quello indotto dalla proteina prionica *wt*. Inoltre, le curve di sopravvivenza dei maschi (fig. 6.5g) e delle femmine (fig. 6.5h) presentano un andamento del tutto paragonabile: l'intera popolazione muore intorno ai 40 giorni con il 50% degli individui che in entrambi i casi non supera i 18 giorni di età. I gruppi di controllo vivono all'incirca 70 giorni.

Attualmente sono in corso gli esperimenti di vitalità per valutare il fenotipo indotto dall'espressione pan-neuronale del prione umano H-PrP^{Sc} D178N/129V, associato anch'esso alla forma familiare della malattia di Creutzfeldt-Jacob.

Una volta registrati gli effetti dell'espressione delle proteine di interesse a livello dell'intero sistema nervoso, gli stessi esperimenti sono stati condotti promuovendone l'espressione limitatamente ai motoneuroni, utilizzando il *driver* *d42*-Gal4. Anche in questo caso sono stati monitorati giornalmente un totale di 6200 individui, suddivisi tra i campioni H-PrP/*d42*-Gal4 e gli opportuni controlli H-PrP/*w1118* e *d42*-Gal4/*w1118*.

In figura 6.6 sono riportate le curve di vitalità ottenute. Ad una prima analisi si può notare che l'espressione di H-PrP nei motoneuroni causa in alcuni casi una riduzione della durata di vita dei moscerini, anche se l'effetto è meno drastico rispetto all'espressione a livello

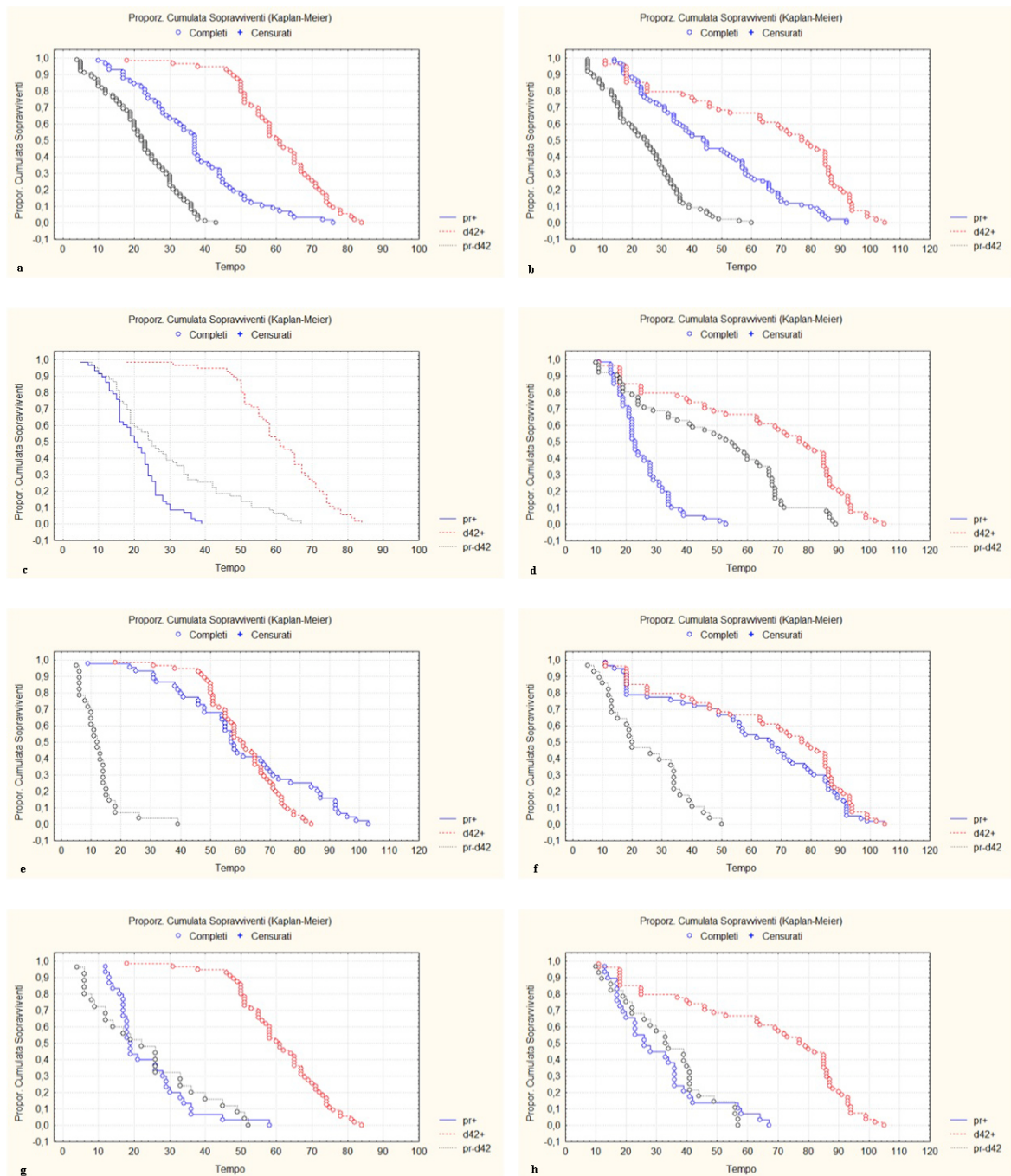


Figura 6.6: Curve di vitalità di *Drosophila melanogaster* nel caso dell'espressione delle diverse forme di H-PrP nei motoneuroni. a) maschi H-PrP^C wt (chi quadro 115.76; $p < 0.0001$); b) femmine H-PrP^C wt (chi quadro 75.25; $p < 0.0001$); c) maschi H-PrP^{Sc} P102L (chi quadro 95.57; $p < 0.0001$); d) femmine H-PrP^{Sc} P102L (chi quadro 49.77; $p < 0.001$); e) maschi H-PrP^{Sc} D178N/129M (chi quadro 61.92; $p < 0.00001$); f) femmine H-PrP^{Sc} D178N/129M (chi quadro 33.93; $p < 0.001$); g) maschi H-PrP^{Sc} E200K (chi quadro 71.51; $p < 0.0001$); h) femmine H-PrP^{Sc} E200K (chi quadro 32.787; $p < 0.0001$). In ogni grafico sono riportati in nero gli individui H-PrP/*d42*- mentre in rosso e in blu le due popolazioni di controllo *d42*-Gal4/*w1118* e H-PrP/*w1118* rispettivamente.

dell'intero sistema nervoso, mentre in altri non sembra avere nessun effetto.

L'espressione di H-PrP^C *wt* in questa popolazione di cellule nervose causa una lieve riduzione della durata di vita dei moscerini sia maschi (fig. 6.6a) che femmine (fig. 6.6b), con il 50% degli individui che va incontro a morte prematura nel giro di 20 giorni. Le curve di sopravvivenza seguono un andamento simile a quello evidenziato negli individui H-PrP^C *wt/elav-Gal4* e, tra i due gruppi di campioni separati in base al sesso, non si evidenziano delle differenze di rilievo (fig.6.6a, b).

Al contrario di quanto rilevato utilizzando la linea *driver* pan-neuronale, l'espressione del prione H-PrP^{Sc} P102L nei motoneuroni non sembra avere alcun effetto sulla sopravvivenza dei moscerini, sia maschi (fig. 6.6c) che femmine (fig. 6.6d). Come si può osservare in figura, le curve di sopravvivenza delle *Drosophilae* H-PrP^{Sc} P102L/*d42-Gal4* si collocano in una posizione intermedia tra quelle delle due popolazioni di controllo (fig. 6.6c, d). Questo risultato sembra indicare che i motoneuroni non siano la sottopopolazione di cellule nervose maggiormente implicata, in *Drosophila melanogaster*, nella diminuzione dell'aspettativa di vita dei moscerini osservata in precedenza e associata alla mutazione P102L.

Nel caso dell'espressione di H-PrP^{Sc} D178N/129M, si osserva una significativa riduzione dell'aspettativa di vita delle *Drosophilae* transgeniche, pur essendo anche in questo caso meno drastica rispetto alla sua espressione nell'intero sistema nervoso (fig. 6.6e, f). Il 50% dei moscerini H-PrP^{Sc} D178N/129M/*d42-Gal4* maschi vive all'incirca 13 giorni (fig. 6.6e), approssimativamente tre volte più a lungo di quelli che esprimono la proteina a livello pan-neuronale. Anche le differenze tra i campioni maschi e quelli femmina sono meno pronunciate rispetto al caso precedente. La curva di sopravvivenza delle *Drosophilae* femmina inoltre non si discosta marcatamente da quella rilevata nel caso dell'espressione della proteina nell'intero sistema nervoso (fig. 6.5f): il 50% degli individui muore nei primi 15 giorni di esperimento. A differenza delle femmine H-PrP^{Sc} D178N/129M/*elav-Gal4*, in questo caso risulta però maggiore il numero di moscerini che raggiungono i 40-50 giorni di età. Gli organismi di controllo, anche in questo caso, mostrano una durata di vita del tutto paragonabile a quella degli animali in condizioni naturali, vivendo all'incirca 90-100 giorni.

L'espressione del prione E200K a livello dei soli motoneuroni non interferisce con l'aspettativa di vita dei moscerini. Sia nei maschi (fig. 6.6g) che nelle femmine (fig. 6.6h) la curva di sopravvivenza mostra un andamento simile a quello della popolazione di controllo H-PrP^{Sc} E200K/*w1118*, con il 50% degli individui che non sopravvive oltre i 30 giorni (fig. 6.6d) e il 100% dei campioni H-PrP^{Sc} E200K/*d42-Gal4* morto a circa 60 giorni dallo sfarfallamento dell'adulto.

Al momento sono in corso le valutazioni della vitalità delle *Drosophilae* che esprimono nei motoneuroni il prione H-PrP^{Sc} D178N/129V.

Nel loro complesso, i risultati ottenuti indicano che l'espressione pan-neuronale delle diverse forme di H-PrP causa morte precoce nel moscerino della frutta rispetto ai controlli e la rapidità dei decessi è in relazione alla forma espressa. L'espressione delle proteine nei motoneuroni induce un fenotipo attenuato e, in alcuni casi, non interferisce con la durata di vita dei moscerini.

Si può quindi escludere che il fenotipo osservato sia dovuto alla semplice espressione nell'organismo della proteina esogena. Mutazioni diverse, a parità di livello di espressione delle proteine, inducono infatti fenotipi più o meno gravi e ciò sembra fornire una prima indicazione della validità del modello di *Drosophila melanogaster* per lo studio delle TSE familiari.

6.5.3 Osservazione del fenotipo comportamentale

Per valutare se l'espressione della H-PrP^C *wt* e delle sue forme mutate H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K causi anomalie nel comportamento dei moscerini, sono stati monitorati a lungo termine gli individui adulti nei quali è stata promossa l'espressione delle diverse proteine sia a livello pan-neuronale che nei soli motoneuroni.

Per ottenere gli individui da osservare sono stati allestiti gli incroci tra le 4 linee transgeniche scelte e le linee *driver elav-Gal4* e *d42-Gal4*. Nella generazione F1, sono stati selezionati i moscerini di genotipo H-PrP/*driver-Gal4*. Come controllo sono stati allestiti gli incroci tra le linee *driver-Gal4* e le linee transgeniche con individui del ceppo *w1118* e, tra i nati da questi incroci, sono stati selezionati i moscerini *driver-Gal4/w1118* e H-PrP/*w1118*, privi dell'espressione del transgene.

I campioni sono stati osservati giornalmente fino alla morte ed è stata valutata la comparsa di eventuali comportamenti che differissero dai controlli.

Alla nascita, le *Drosophilae* esprimenti a livello dell'intero sistema nervoso sia la H-PrP^C *wt* che le sue forme mutate (genotipo H-PrP/*elav-gal4*) non mostrano alcun fenotipo patologico e presentano un comportamento del tutto normale, paragonabile a quello dei moscerini di controllo (fig. 6.7). Gli individui tendono continuamente a risalire lungo le pareti del tubo di coltura, si muovono velocemente e riescono agevolmente a girarsi e rialzarsi quando cadono.

Dopo pochi giorni dallo sfarfallamento dell'adulto, iniziano a riscontrarsi i primi effetti fenotipici di rilievo. Mentre i moscerini H-PrP^C *wt/elav-Gal4* continuano a manifestare un comportamento normale, paragonabile a quello dei controlli, i moscerini che esprimono nell'intero sistema nervoso le forme mutate della proteina prionica umana mostrano delle

anomalie: riduzione della velocità dei movimenti, difficoltà nel risalire il tubino in cui sono allevate e perdita della capacità di volare (fig. 6.7).

Con il trascorrere dei giorni, questi moscerini manifestano un progressivo aggravamento delle caratteristiche fenotipiche prima descritte: sempre maggiore difficoltà nel risalire il tubo di coltura e nel girarsi quando cadono sul dorso, evidente lentezza dei movimenti, addome ricurvo, tendenza a saltare di scatto da una parte all'altra del recipiente e a sfregarsi in continuazione le zampe anteriori, posteriori e le ali. Successivamente, gli individui sembrano perdere il controllo dei movimenti delle zampe con manifestazione di tremori e perdita dell'equilibrio (fig. 6.7).

Con l'invecchiamento, si osserva un drastico peggioramento delle disfunzioni locomotorie: totale incapacità di movimento, forti tremori delle zampe, tendenza a cadere sul dorso e impossibilità di girarsi e di rialzarsi, strofinamento continuo delle zampe anteriori e posteriori, del capo e delle ali, e, infine, morte precoce caratterizzata da capo proteso verso il basso e addome fortemente contratto (fig. 6.7).

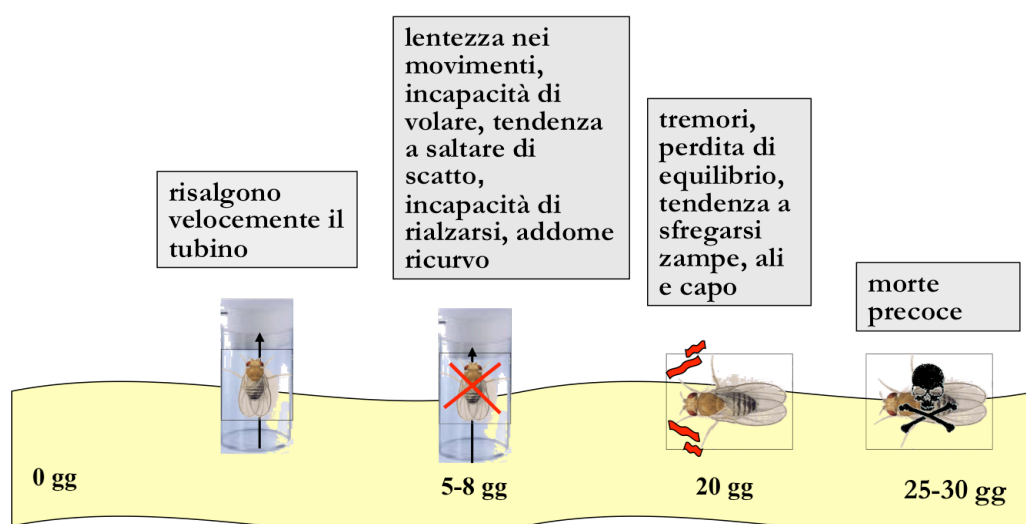


Figura 6.7: Rappresentazione schematica dei fenotipi comportamentali osservati in seguito all'espressione pan-neuronale delle diverse forme di H-PrP. Come esempio è riportata la progressione temporale dei moscerini che esprimono H-PrP^{Sc} E200K.

L'osservazione dei moscerini H-PrP^{Sc} D178N/129M/*elav*-Gal4 evidenzia un aumento dell'attività dei moscerini nei primi giorni di vita, nonostante il palese tremore a livello delle zampe che sembrano "incontrollabili", seguito da un rapido aggravamento delle loro condizioni e morte molto precoce, nel giro di pochi giorni. Anche questi individui presentano, al momento della morte la postura descritta in precedenza, con il capo abbassato e l'addome fortemente ricurvo.

Fatto rilevante, queste prime osservazioni in condizioni di espressione pan-neuronale delle diverse forme di H-PrP hanno permesso di stabilire che: i) mutazioni differenti, pur inducendo un fenotipo simile, promuovono una progressione più o meno rapida; ii) la mutazione D178N/129M (IFF) causa un aumento dell'attività dei moscerini seguita da un rapido aggravamento morte precocissima, all'incirca dopo 7-10 giorni dalla nascita; iii) le tre mutazioni P102L (GSS), D178N/129V (fCJD) e E200K (fCJD) hanno tempi di progressione del fenotipo patologico simile; iv) i moscerini che esprimono la H-PrP^C *wt* mostrano anch'essi delle alterazioni comportamentali ma in maniera molto più lieve, con difficoltà di movimento, del volo e tremori delle zampe meno accentuati rispetto alle *Drosophilae* che esprimono le sue forme mutate. In questi individui si assiste inoltre ad un decorso della sintomatologia molto più lento.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti osservando le *Drosophilae* che esprimono H-PrP nei soli motoneuroni. Per indurre l'espressione dei transgeni in questa sottopopolazione di cellule nervose, sono stati allestiti gli incroci tra le linee di moscerini trasformati e la linea *driver d42-Gal4*. Anche in questo caso, parallelamente sono stati allestiti gli incroci con il ceppo di moscerini *w1118* in modo da ottenere gli individui di controllo privi dell'espressione di H-PrP. I nati nella generazione F1 sono stati separati in base al loro genotipo e osservati giornalmente fino alla morte.

Gli effetti fenotipici indotti dall'espressione delle proteine umane si sono dimostrati simili a quelli osservati in precedenza anche se caratterizzati da un fenotipo più attenuato e ad un aggravamento dei sintomi più lento.

Come già osservato nel caso dell'espressione pan-neuronale di H-PrP, le diverse mutazioni, se paragonate tra loro, hanno indotto una progressione del fenotipo più o meno rapida, con i moscerini di genotipo H-PrP^{Sc} D178N/129M/*d42-Gal4* che presentano i sintomi più gravi e caratterizzati da un aggravamento più rapido. Le *Drosophilae* che esprimono a livello dei motoneuroni H-PrP^C *wt* e H-PrP^{Sc} E200K mostrano lievi alterazioni del comportamento e dell'attività locomotoria, se paragonati a quelli esprimenti le forme mutate della proteina.

E' importante notare che, in tutti i casi analizzati, le linee caratterizzate da livelli di espressione maggiore presentano un fenotipo più grave rispetto alle linee con un livello più basso e che, a parità di quantità della stessa proteina, i moscerini che esprimono i prioni P102L e D178N/129V mostrano un comportamento paragonabile tra loro.

Di particolare interesse è il fatto che il tipo di sintomatologia osservata e il suo andamento in dipendenza dell'età sembrano riprodurre l'evoluzione delle encefalopatie spongiformi trasmissibili nei mammiferi, fornendo ulteriori indicazioni sulla validità del modello animale.

6.5.4 Analisi dell'attività locomotoria e dei ritmi circadiani

a) Analisi dell'attività locomotoria

Alla luce dei risultati ottenuti osservando giornalmente i moscerini, che chiaramente indicano la comparsa di fenotipi motori e comportamentali nelle *Drosophilae* che esprimono le diverse forme della proteina prionica umana, sono stati condotti degli esperimenti volti ad analizzare nel dettaglio le alterazioni osservate, mediante l'impiego di specifici test comportamentali.

Gli esperimenti per l'analisi dell'attività locomotoria e della ritmicità circadiana sono stati condotti in collaborazione con il Prof. Costa, del Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova, utilizzando il sistema di registrazione *Trickinetics Drosophila Activity Monitoring System (DAMSystem)* disponibile nel laboratorio (paragrafo 5.2.20). Questo sistema permette di registrare il numero di passaggi di ciascun individuo attraverso un *emitted-detector* a raggi infrarossi e quindi l'attività locomotoria viene stimata come numero di eventi in cui il raggio è interrotto a causa del passaggio del moscerino.

Per ottenere gli individui da analizzare sono stati allestiti gli incroci tra le 4 linee scelte di moscerini trasformati con H-PrP^C *wt* e le forme mutate H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K, e gli individui delle linee *driver* pan-neuronale *elav-Gal4* (fig. 6.8) o specifica per i motoneuroni *d42-Gal4* (fig. 6.9). Parallelamente sono stati allestiti gli incroci di controllo con il ceppo *w1118*. Nella generazione F1 nata da questi incroci, sono stati selezionati 32 individui maschi adulti con genotipo H-PrP/*elav-gal4*, H-PrP/*d42-Gal4* e i rispettivi controlli H-PrP/*w1118*, *elav-Gal4/w1118* e *d42-Gal4/w1118*, per un totale di 1984 moscerini. Le femmine, anche se vergini, non sono state selezionate poiché possono deporre uova che potrebbero disturbare l'esperimento.

Gli individui, raggiunta l'età di 4-5 giorni, sono stati posti individualmente all'interno di appositi tubi e sono stati mantenuti in condizioni costanti di umidità e temperatura all'interno di un termostato. Le condizioni sperimentali utilizzate, per quanto riguarda il ciclo luce:buio, hanno previsto 3 giorni di buio costanti (DD), seguiti da 7 giorni di luce:buio (LD) 12:12. Questo al fine di determinare, oltre all'attività locomotoria vera e propria, anche la periodicità del ritmo di tale attività. Sono state analizzate le registrazioni dei movimenti effettuati dai moscerini per tutti e 10 i giorni di esperimento e, in figura, sono riportati i dati ottenuti in 3 giorni di LD 12:12.

Come si può osservare in figura 6.8, in condizioni di L:D 12:12, i moscerini di controllo mostrano un profilo di attività locomotoria bimodale caratterizzato da due picchi rispettivamente prima dell'alba e prima del buio, separati da un periodo di inattività, definito "sie-

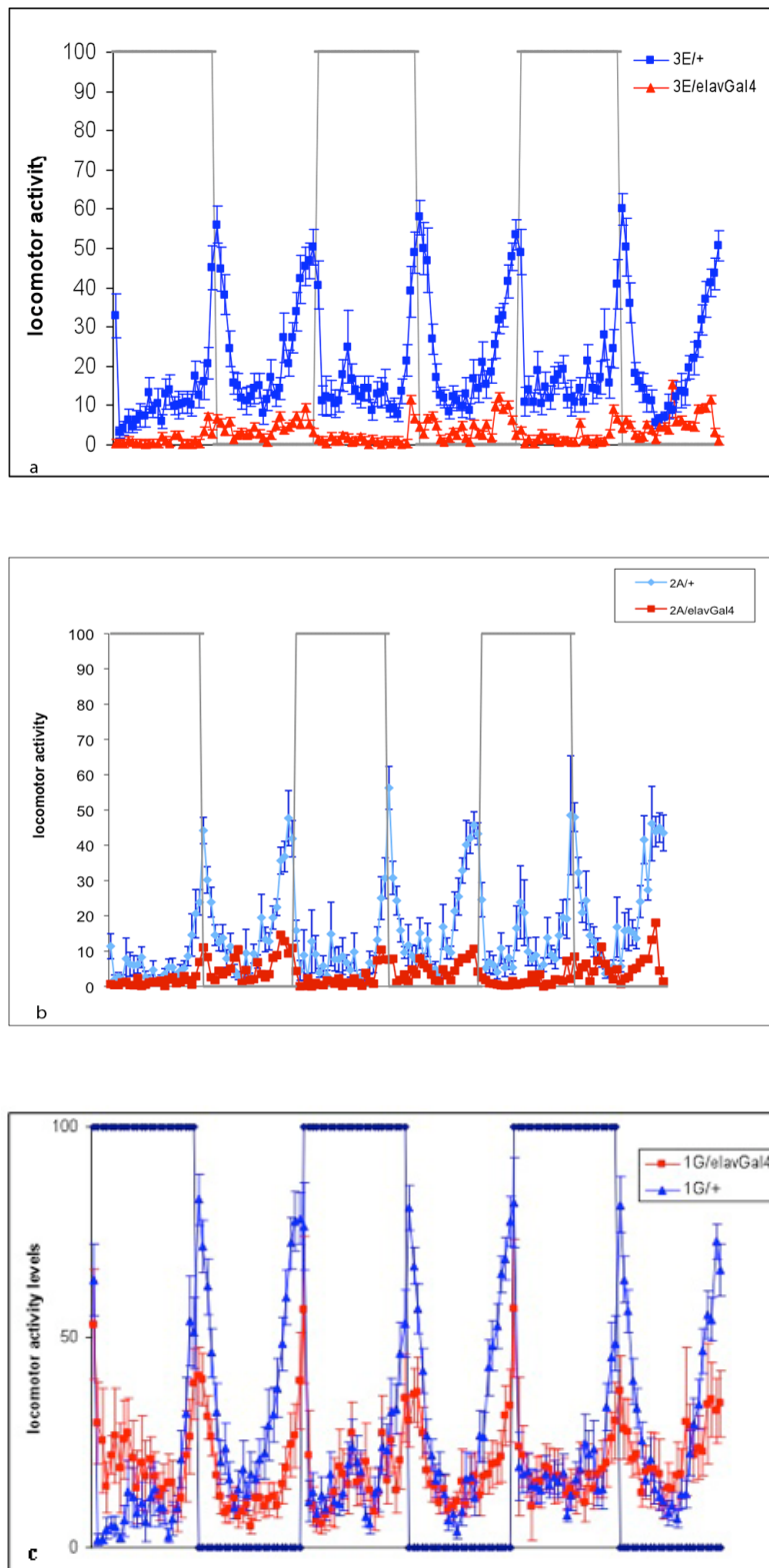


Figura 6.8: Rappresentazione schematica dei risultati ottenuti negli esperimenti di valutazione dell'attività locomotoria delle *Drosophilae* che esprimono le diverse forme di H-PrP a livello dell'intero sistema nervoso e dei rispettivi controlli. a) H-PrP^{wt}; b) H-PrP^{Sc} P102L; c) H-PrP^{Sc} E200K. La barra grigia sovrastante indica le 12 ore notturne, la sua assenza indica invece le 12 ore diurne.

sta", durante le ore centrali del giorno. I picchi di attività rappresentano dei periodi che le *Drosophilae* normalmente utilizzano per cibarsi e per accoppiarsi con maggiore frequenza.

L'espressione pan-neuronale della proteina prionica umana *wt* (fig. 6.8a) e del prione che presenta la mutazione P102L (fig. 6.8b) associata, nell'uomo, alla GSS, causa una severa alterazione dell'attività locomotoria dei moscerini. Se paragonati ai rispettivi controlli, essi mostrano una minore attività sia nelle ore notturne (indicate in figura dalla sovrastante barra grigia) che nelle ore diurne (prive della barra). A fronte di una minore capacità di movimento, i moscerini presentano comunque dei deboli picchi di attività che precedono l'alba e il crepuscolo, mantenendo, seppur notevolmente attenuato, l'andamento bimodale precedentemente descritto. Durante le ore di buio, i moscerini che esprimono sia H-PrP^C *wt* (fig. 6.8a) che H-PrP^{Sc} P102L (fig. 6.8b) mostrano, rispetto ai controlli, un calo della loro attività locomotoria, con un minor numero di passaggi attraverso l'*emitted-detector* a raggi infrarossi.

Le *Drosophilae* che esprimono in tutto il sistema nervoso il prione E200K (fCJD), inizialmente presentano un aumento della loro attività locomotoria durante le ore di buio nel primo giorno di registrazione in condizioni di L:D 12:12 (fig. 6.8c). Negli altri giorni di esperimento, la frequenza dei loro movimenti appare più simile a quella dei controlli, con un profilo di attività delle due popolazioni che risulta sovrapponibile per larga parte del giorno. In tale profilo è inoltre chiaramente distinguibile un andamento bimodale, contraddistinto dai due tipici picchi. Come si può notare in figura 6.8c, pur se presenti, gli aumenti di attività che precedono l'alba e il tramonto sono rappresentati da un picco di minore altezza rispetto ai controlli e leggermente spostato nel tempo. I moscerini H-PrP^{Sc} E200K/*elav-Gal4* presentano un'anticipazione del picco mattutino e un ritardo in quello serale. Inoltre, seppur in maniera attenuata, manifestano una diminuzione dei loro movimenti.

Non è stato possibile analizzare l'attività locomotoria dei moscerini che esprimono a livello dell'intero sistema nervoso la mutazione D178N/129M, associata nell'uomo alla IFF, dato che la popolazione muore precocemente (nel giro di 4-5 giorni) e quindi nessun individuo è arrivato vivo alla fine dell'esperimento.

Attualmente è inoltre in corso l'elaborazione dei dati di attività locomotoria registrati per i moscerini H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD).

L'attività locomotoria è stata analizzata, nelle stesse condizioni sperimentali, anche nei moscerini che esprimono H-PrP^C *wt*, le forme mutate H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K e gli opportuni controlli, a livello della sola popolazione dei motoneuroni, utilizzando la linea *driver d42-Gal4*. I risultati ottenuti sono riportati in figura 6.9.

Il profilo di attività dei moscerini nel caso dell'espressione di H-PrP in queste cellule

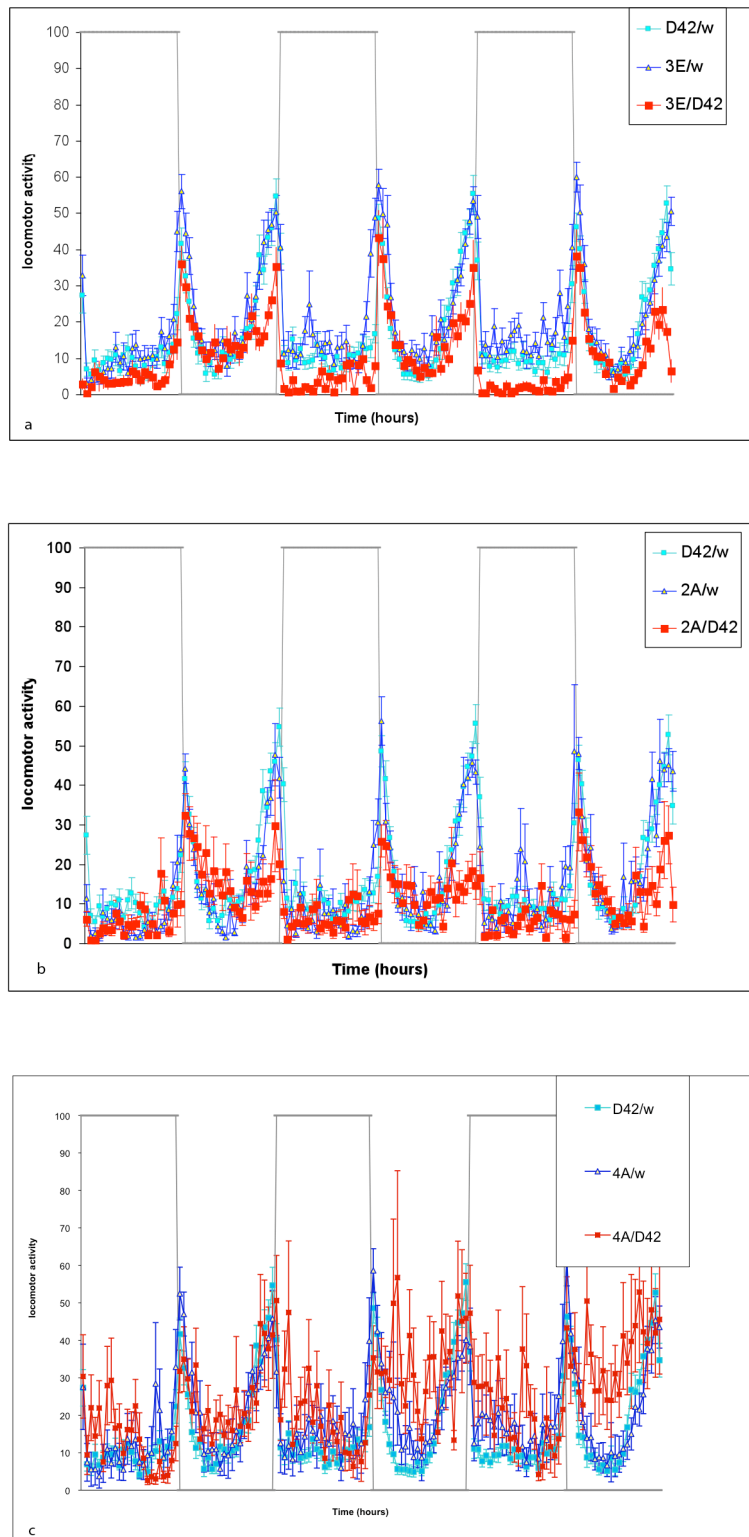


Figura 6.9: Rappresentazione schematica dei risultati ottenuti negli esperimenti di valutazione dell'attività locomotoria delle *Drosophilae* che esprimono le diverse forme di H-PrP a livello motoneuroni e dei rispettivi controlli. a) H-PrP^{C wt}; b) H-PrP^{Sc} P102L; c) H-PrP^{Sc} D178N/129M. La barra grigia sovrastante indica le 12 ore notturne, la sua assenza indica invece le 12 ore diurne.

nervose si discosta da quello ottenuto in precedenza. Gli effetti dell'espressione della H-PrP^C *wt* (fig. 6.9a) e di H-PrP^{Sc} P102L (GSS) (fig. 6.9b) sono molto meno evidenti rispetto ai fenotipi dovuti all'attivazione dei transgeni a livello dell'intero sistema nervoso. I moscerini, nei primi 10 giorni di vita, non presentano alterazioni così pronunciate della loro attività locomotoria e mantengono una chiara e tipica attività bimodale.

Come rappresentato in figura 6.9a, le *Drosophilae* H-PrP^C *wt/d42-Gal4* hanno un profilo di attività paragonabile a quello dei controlli H-PrP^C *wt/w118* e *d42-Gal4/w118* durante le ore di luce, mentre si assiste ad una diminuzione dei loro movimenti durante la notte e che progressivamente diviene sempre minore.

I moscerini che esprimono il prione P102L nei motoneuroni sembrano risentire meno della presenza nelle loro cellule della proteina esogena e il loro profilo di attività locomotoria è paragonabile a quello dei controlli durante tutti e tre i giorni di registrazione (fig. 6.9b).

Un risultato molto interessante è stato ottenuto facendo esprimere nei motoneuroni il prione umano H-PrP^{Sc} D178N/129M, che nell'uomo è associato all'insonnia familiare fatale. Come si può notare osservando il grafico riportato in figura 6.9c, i moscerini che esprimono questa mutazione manifestano un effetto opposto rispetto a quello evidenziato nel caso di H-PrP^C *wt* e H-PrP^{Sc} P102L. Essi infatti sono contraddistinti da un rilevante aumento dell'attività locomotoria sia durante il giorno che durante le ore notturne, risultando ipercinetici. In queste *Drosophilae* si assiste inoltre, con il trascorrere dei giorni, ad un continuo aumento della quantità di movimento. È importante notare la mancanza di riposo che contraddistingue questi moscerini: essi continuano a muoversi in maniera molto pronunciata anche durante le 12 ore di buio. Come si evince dal grafico in figura 6.9c, il profilo di attività locomotoria presenta un andamento nel quale non sono più chiaramente distinguibili i caratteristici picchi di movimento prima dell'alba e del crepuscolo.

Analizzando l'attività totale dei moscerini, indicata nella tabella 6.7, si può chiaramente notare il comportamento opposto dei moscerini che presentano nei motoneuroni H-PrP^C *wt* e H-PrP^{Sc} P102L da un lato e H-PrP^{Sc} D178N/129M dall'altro. Nelle prime due popolazioni il numero di passaggi attraverso l'*emitted-detector* è minore rispetto ai corrispondenti controlli, con un calo che si accentua durante le 12 ore di buio, mentre i moscerini H-PrP^{Sc} D178N/129M/*d42-Gal4* mostrano un picco di attività locomotoria, con un aumento significativo dei movimenti che si mantiene durante tutte le 24 ore, sia in condizioni di luce che di buio.

Queste osservazioni sembrano indicare che le *Drosophilae* transgeniche che esprimono la mutazione D178N/129M associata alla IFF perdono anch'esse, come avviene nell'uomo, la regolazione delle fasi veglia/sonno e questo potrebbe essere alla base della morte precocissima evidenziata negli esperimenti di vitalità precedentemente descritti.

Genotipo	Attività totale nelle 24 ore	Attività totale notturna	Attività totale diurna
H-PrP^C wt/d42-Gal4	473 ± 46	94 ± 16	379 ± 34
H-PrP ^C wt/w1118	977 ± 73	381 ± 35	596 ± 48
H-PrP^{Sc} P102L/d42-Gal4	510 ± 81	147 ± 28	363 ± 64
H-PrP ^{Sc} P102L/w1118	723 ± 69	228 ± 37	495 ± 38
H-PrP^{Sc} D178N/129M/d42-Gal4	1200 ± 167	443 ± 62	757 ± 116
H-PrP ^{Sc} D178N/129M/w1118	993 ± 54	367 ± 32	596 ± 28
d42-Gal4/w1118	792 ± 53	273 ± 23	520 ± 34

Tabella 6.7: Valori dell'attività locomotoria totale in *Drosophilae* che esprimono H-PrP nei motoneuroni. I valori indicano la media dei passaggi effettuati attraverso l'*emitted-detector* durante le 24 ore, le 12 ore di buio e le 12 ore di luce.

Sono ancora in corso le analisi dei dati ottenuti nelle registrazioni dei movimenti dei moscerini che esprimono nei motoneuroni i prioni umani H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K, entrambe associate alla forma familiare della malattia di Creutzfeldt-Jacob.

b) Analisi dei ritmi circadiani

Per verificare il possibile effetto delle diverse forme di H-PrP sul ritmo circadiano dell'attività locomotoria dei moscerini, i dati ottenuti con il sistema di registrazione DAMSystem sono stati utilizzati per analizzare l'andamento della periodicità di tale attività. Sono state analizzate *Drosophilae* che esprimono H-PrP^C wt, H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M, H-PrP^{Sc} D178N/129V, H-PrP^{Sc} E200K sia nell'intero sistema nervoso che nei soli motoneuroni e gli opportuni controlli.

L'attività locomotoria, assieme alla schiusa pupale, rappresenta il comportamento ritmico circadiano di *Drosophila* meglio conosciuto. Essa è costituita dall'alternarsi di fasi di attività ed inattività dell'adulto in precisi momenti del giorno. L'individuo tende a volare, a ricercare cibo e ad accoppiarsi durante il giorno, mentre tende a "dormire", rispondendo poco agli stimoli sensoriali e regolando l'omeostasi, durante la notte [208, 209]. In condizioni di regime luce:buio di 12 ore ciascuno (LD 12:12), l'attività locomotoria ha una distribuzione bimodale, come descritto in precedenza, ed è confinata prevalentemente nelle ore di luce. In condizioni di buio costante, la bimodalità è normalmente meno marcata e l'attività è maggiormente distribuita all'interno del giorno soggettivo.

Inizialmente sono stati analizzati gli individui adulti nei quali è stata promossa l'espressione di H-PrP nell'intero sistema nervoso e i corrispondenti controlli. Nei campioni è stata analizzata la periodicità dell'attività locomotoria in condizioni di buio costante DD mantenuto per tre giorni, condizione nella quale gli individui selvatici mantengono comunque la tipica ritmicità dei movimenti.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 6.8.

Genotipo	% AR	% R	tau (ore)	ds
H-PrP^C wt/elav-Gal4	90	10	24.10	0.63
H-PrP ^C wt/w1118	10	90	23.73	0.65
H-PrP^{Sc} P102L/elav-Gal4	95	5	23.97	/
H-PrP ^{Sc} P102L/w1118	17	83	24.95	0.92
H-PrP^{Sc} D178N/129M/elav-Gal4	90	10	23.99	/
H-PrP ^{Sc} D178N/129M/w1118	13	87	24.24	0.63
H-PrP^{Sc} D178N/129V/elav-Gal4	25	75	24.39	1.29
H-PrP ^{Sc} D178N/129V/w1118	17	83	24.33	0.74
H-PrP^{Sc} E200K/elav-Gal4	70	30	24.15	0.68
H-PrP ^{Sc} E200K/w1118	16	84	23.45	0.36
elav-Gal4/w1118	11	89	24	0.68

Tabella 6.8: Periodicità dell'attività locomotoria misurata in *Drosophilae* con espressione pan-neuronale di H-PrP e nei rispettivi controlli. AR= aritmico; R= ritmico; tau= periodicità; ds= deviazione standard.

La popolazione H-PrP^C wt/elav-Gal4 presenta il 90% degli individui con un andamento aritmico mentre il 10% mantiene la ritmicità tipica dei moscerini in condizioni naturali. La periodicità avviene con un valore tau di 23.67 ore, cioè si ripete in questo intervallo di tempo. Per quanto riguarda il gruppo dei controlli H-PrP^C wt/w1118 e elav-Gal4/w1118, nella quasi totalità dei casi mostrano un andamento ritmico, con un valore tau di 23.73 e 24 ore rispettivamente.

I moscerini che esprimono le forme mutate della proteina prionica umana mostrano un comportamento disomogeneo se paragonati tra loro.

Un drastico effetto sui ritmi circadiani dell'attività locomotoria è indotto dall'espressione pan-neuronale dei prioni H-PrP^{Sc} P102L (GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF): il 95% degli individui nel primo caso e il 90% nel secondo manifestano delle alterazioni nella ritmicità circadiana dei movimenti, con un valore di tau pari a 23.97 e 23.99 ore. I loro controlli si mantengono invece, per l'83 e 87% rispettivamente, con un profilo ritmico.

Il fenotipo indotto dall'espressione della proteina H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) appare attenuato e soltanto il 25% degli individui segue un comportamento aritmico discostandosi dai controlli che mantengono, nell'87% dei casi, la tipica ritmicità circadiana dei movimenti. La periodicità appare essere di 23.99 ore nel gruppo campione e di circa 24 ore nei controlli.

Il prione H-PrP^{Sc} E200K (fCJD), quando presente in tutto il sistema nervoso dei moscerini, induce un'attività locomotoria aritmica in buona parte degli individui analizzati, con

solo il 30% degli adulti che mantiene il comportamento tipico delle *Drosophilae* selvatiche. Anche in questo caso, la maggioranza della popolazione di controllo (84%) risulta ritmica.

Nel loro complesso, le analisi effettuate indicano un chiaro effetto dell'espressione pan-neuronale delle diverse forme della proteina prionica umana, dato che H-PrP^C wt, H-PrP^{Sc} P102L e H-PrP^{Sc} D178N/129M rendono oltre il 90% degli individui aritmici. Il prione H-PrP^{Sc} E200K sembra indurre un fenotipo attenuato, pur in presenza della maggior parte della popolazione priva del tipico ritmo circadiano nell'attività locomotoria. Infine, la proteina H-PrP^{Sc} D178N/129V non sembra causare alterazioni di rilievo, dato che la popolazione campione presenta un comportamento paragonabile a quello dei corrispondenti controlli.

Le stesse analisi in condizioni di buio costante per tre giorni sono state condotte anche sui moscerini nei quali è stata promossa l'espressione di H-PrP nei soli motoneuroni utilizzando la linea *driver d42-Gal4*. Come si può osservare dai dati riportati nella tabella 6.9, ad eccezione delle *Drosophilae* che esprimono H-PrP^{Sc} D178N/129M, nelle quali oltre il 96% degli individui perdono la ritmicità circadiana dei loro movimenti, la presenza di H-PrP^C wt, H-PrP^{Sc} P102L nei motoneuroni induce un fenotipo attenuato. Queste due popolazioni si suddividono all'incirca in una metà di individui aritmici e l'altra metà che mantiene invece la circadianità dell'attività locomotoria.

Genotipo	% AR	% R	tau	ds
H-PrP^C wt/d42-Gal4	54	46	24.10	0.43
H-PrP ^C wt/w1118	30	70	24.60	0.96
H-PrP^{Sc} P102L/d42-Gal4	66	33	23.99	0.38
H-PrP ^{Sc} P102L/w1118	17	83	24.95	0.92
H-PrP^{Sc} D178N/129M/d42-Gal4	96	4	22.26	/
H-PrP ^{Sc} D178N/129M/w1118	31	69	24.24	1.03
<i>d42-Gal4/w1118</i>	10	90	24.39	0.47

Tabella 6.9: Periodicità dell'attività locomotoria in *Drosophilae* che esprimono H-PrP nei motoneuroni e nei rispettivi controlli. AR= aritmico; R= ritmico; tau= periodicità; ds= deviazione standard.

Ancora una volta quindi, i risultati ottenuti sembrano indicare che i motoneuroni causano un fenotipo meno pronunciato nelle *Drosophilae* H-PrP/d42-Gal4, ad eccezione dei moscerini che esprimono la forma mutata D178N/129M, associata nell'uomo alla IFF. Ciò fa supporre che effettivamente questa popolazione di cellule nervose possa essere implicata, almeno nel moscerino della frutta, nello sviluppo del fenotipo patologico associato a tale mutazione.

Attualmente è in corso l'elaborazione dei dati ottenuti dalla registrazione dei movimenti degli individui H-PrP^{Sc} D178N/129V/d42-Gal4 e H-PrP^{Sc} E200K/d42-Gal4.

6.5.5 Analisi delle sezioni istologiche dei cervelli

Le osservazioni riportate in precedenza descrivono l'insorgenza, nelle *Drosophilae* che esprimono le diverse PrP umane, di alterazioni a livello comportamentale che sembrano ricapitolare la sintomatologia e la progressione tipica delle encefalopatie spongiformi trasmissibili nei mammiferi.

Per verificare se i fenotipi patologici descritti in precedenza (difficoltà di volo, di deambulazione, di controllo dei movimenti delle zampe ecc. che portano alla morte precoce degli individui), e il loro aggravamento in dipendenza dell'età siano dovuti ad un progressivo fenomeno neurodegenerativo e/o a spongiosi a livello cerebrale, sono state condotte delle analisi istologiche sui cervelli dei moscerini.

La inclusioni in paraffina e l'allestimento delle sezioni istologiche degli individui adulti e/o delle sole teste sono state eseguite in collaborazione con il Prof. Altavilla, presso il Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali dell'Università di Padova, avvalendosi di un sistema automatizzato disponibile nel laboratorio.

Il moscerino della frutta presenta una cuticola esterna costituita da chitina e ciò ha reso necessario un lavoro preliminare per la modifica e la messa a punto del protocollo normalmente utilizzato per le inclusioni. Per permettere ai diversi agenti utilizzati di penetrare efficacemente all'interno degli individui e di raggiungere così tutti i tessuti, le *Drosophilae* intere sono state inizialmente dissezionate a livello dell'addome. Inoltre, il rivestimento di chitina ha reso necessario un trattamento dei campioni con l'enzima chitinasi, in grado di digerire la cuticola dell'animale e quindi di permettere la penetrazione della paraffina. All'incubazione enzimatica è poi seguito un trattamento con EDTA, che favorisce l'eliminazione dei cristalli di calcio. Infatti, a livello degli occhi composti degli insetti, sono presenti dei cristalli di carbonato di calcio che potrebbero rovinare la lama di taglio e, di conseguenza, rigare le sezioni.

Per la messa a punto del protocollo sono state eseguite diverse prove su moscerini di controllo, in modo da ottenere delle sezioni che non presentassero artefatti dovuti all'inclusione, variando sia i tempi di fissazione che di trattamento con l'enzima chitinasi. Più precisamente, sono state testate le quattro tempistiche di seguito riportate:

1. fissazione in formaldeide 4% per 2 ore, trattamento con chitinasi per 5 ore;
2. fissazione in formaldeide 4% per tutta la notte, trattamento con chitinasi per 5 ore;
3. fissazione in formaldeide 4% per 2 ore, trattamento con chitinasi per tutta la notte;
4. fissazione in formaldeide 4% per tutta la notte, trattamento con chitinasi anch'esso per tutta la notte.

Per ognuno di questi protocolli sono stati inclusi e sezionati 10 individui adulti, per un totale di 40 moscerini. Nei primi due casi, il trattamento con chitinasi per 5 ore si è dimostrato insufficiente, non permettendo di ottenere delle buone sezioni. Il materiale presentava infatti al suo interno delle fratture, che indicavano una mancata penetrazione del mezzo di inclusione Paraplast. Inoltre, il taglio dei campioni rovinava facilmente la lama del microtomo rigando le sezioni. I due protocolli nei quali il trattamento con chitinasi è proseguito per tutta la notte hanno invece consentito l'ottenimento di buone sezioni, nelle quali è possibile distinguere chiaramente le differenti strutture presenti nella testa dei moscerini.

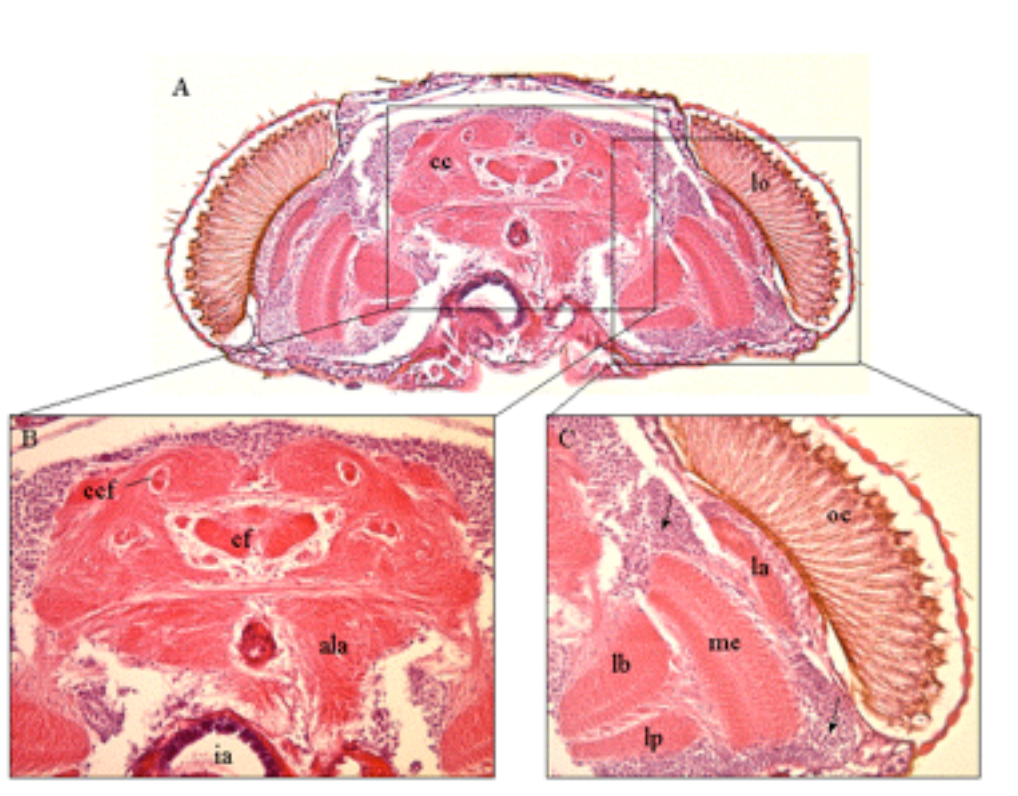


Figura 6.10: a, b, c) Sezioni istologiche della testa di un adulto di *Drosophila* di controllo, priva dell'espressione del transgene, a 25 giorni di età. cc = corpo centrale; lo = lobo ottico; cf= corpi fungiformi; ccf= calici dei corpi fungiformi; ala= area del lobo antennale; ia= intestino anteriore; oc= occhio; la= lamina; me= medulla; lb= lobula; lp= lobula plate. Le frecce indicano alcuni nuclei colorati con eosina. d) rappresentazione schematica delle diverse strutture presenti nel cervello di *Drosophila melanogaaster* (Tratto da <http://brain.biologie.uni-freiburg.de>).

Alla luce di questi risultati, il protocollo scelto prevede la fissazione in formaldeide 4% per 2 ore (per consentire tempi di inclusione più rapidi e pari qualità) e trattamento con chitinasi per tutta la notte.

Per verificare l'eventuale presenza di alterazioni e/o spongiosi cerebrali e, in caso positivo, se le eventuali lesioni si aggravano in dipendenza dell'età degli individui, sono stati analizzati

moscerini adulti che esprimono in tutto il sistema nervoso H-PrP^C *wt*, le forme mutate H-PrP^{Sc} P102L (GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF), H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) e H-PrP^{Sc} E200K (fCJD) e gli opportuni controlli, a tempi di invecchiamento diversi.

Sono stati allestiti gli incroci tra le 20 linee di *Drosophilae* transgeniche scelte e la linea *driver elav-Gal4*. Come negli esperimenti già descritti, per ottenere gli opportuni controlli sono stati allestiti gli incroci tra i moscerini trasformati con H-PrP e della linea *driver-Gal4* con quelli del ceppo *w1118*. Dai nati nella generazione F1 sono stati collezionati gli individui di genotipo H-PrP/*elav-Gal4*, H-PrP/*w1118* e *elav-Gal4/w1118*.

Per monitorare la natura progressiva degli eventuali fenomeni neurodegenerativi, gli individui sono stati fissati ai tempi di invecchiamento riportati in tabella 6.10. Ad ogni tempistica, sono state incluse e sezionate le teste di 10 animali per ogni genotipo, per un totale di 1960 campioni.

H-PrP/ <i>elav-Gal4</i>	Età (giorni)
<i>wt</i>	3, 10, 17, 25, 30
P102L	3, 10, 17, 20
D178N/129M	1, 3, 7, 10
D178N/129V	1, 7, 10, 18
E200K	3, 10, 17, 25, 30

Tabella 6.10: Tabella riassuntiva delle tempistiche seguite per le inclusioni delle *Drosophilae* che esprimono a livello pan-neuronale H-PrP. Gli stessi tempi sono stati seguiti anche nel caso dei corrispondenti controlli.

Le *Drosophilae* che esprimono la H-PrP^C *wt* presentano i primi fenomeni di neurodegenerazione attorno ai 15-17 giorni di età (fig. 6.11a, b, c). Inizialmente le lesioni interessano maggiormente la regione del lobo delle antenne e si presentano simmetriche, ad entrambi i lati del cervello. Con l'invecchiamento, i danni tissutali si aggravano e, attorno ai 30 giorni, si presentano diffuse su pressochè tutto il tessuto cerebrale del moscerino (fig. 6.11c, e, f).

Nei campioni provenienti da moscerini H-PrP^{Sc} P102L/*elav-Gal4* si assiste alla comparsa di vacuolizzazione cerebrale più precocemente rispetto ai campioni che esprimono la forma normale della proteina prionica umana, quando i moscerini hanno all'incirca 10 giorni di età (fig. 6.12). Le lesioni appaiono diffuse nel tessuto cerebrale e presentano una distribuzione simile a quella descritta per H-PrP^C *wt*.

I cervelli delle *Drosophilae* che esprimono H-PrP^{Sc} D178N/129M mostrano delle lesioni del tessuto cerebrale già alla nascita (fig. 6.13a). Ad un giorno di età è infatti possibile notare la comparsa di regioni prive di neuroni e tali alterazioni risultano localizzate nei due lobi delle antenne. La vacuolizzazione del tessuto si aggrava molto rapidamente, dato che

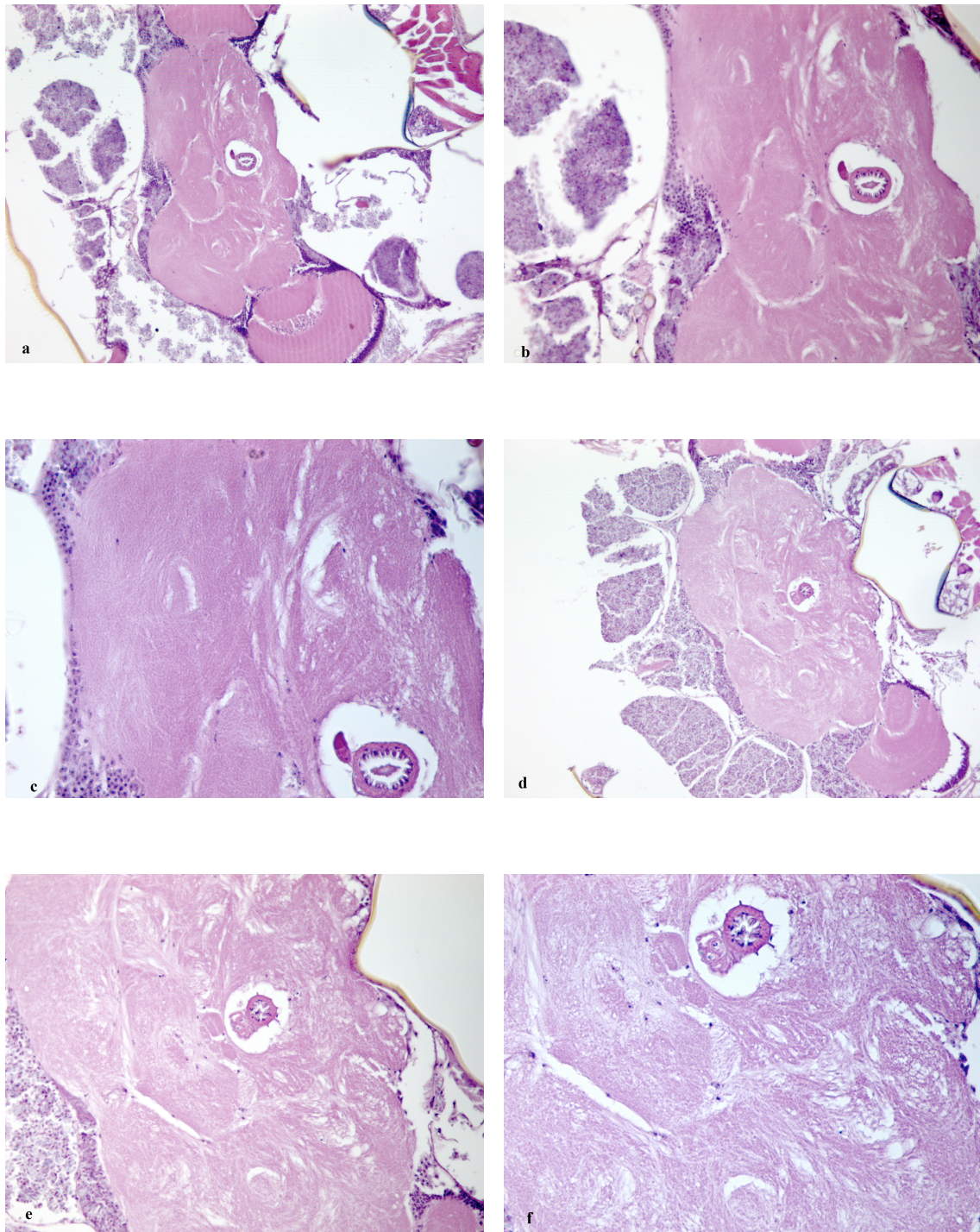


Figura 6.11: Sezioni istologiche di cervelli di *Drosophila* che esprimono a livello pan-neuronale H-PrP^C wt. a, b, c) 17 giorni; d, e, f) 30 giorni di età.

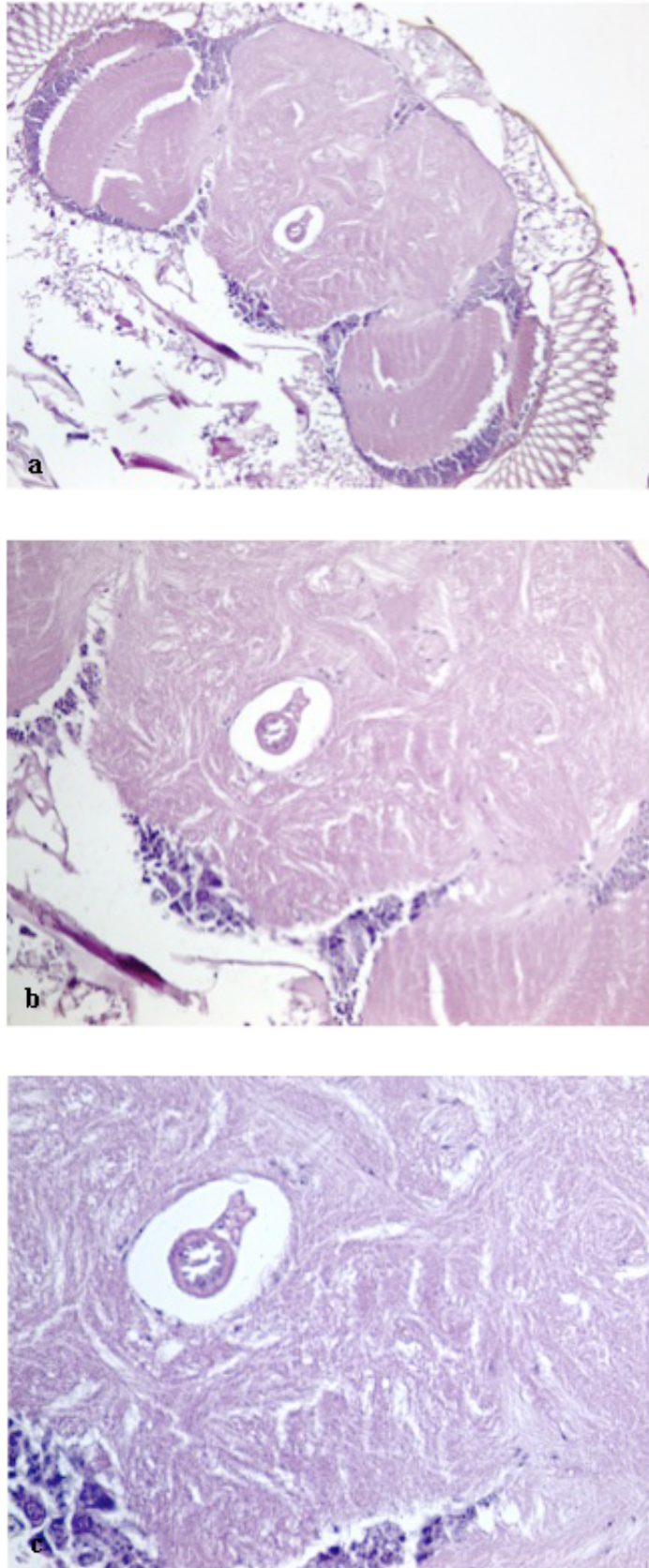


Figura 6.12: a, b, c) Sezioni istologiche dei cervelli di *Drosophilae* che esprimono a livello pan-neuronale H-PrP^{Sc} P102L a 10 giorni di età.

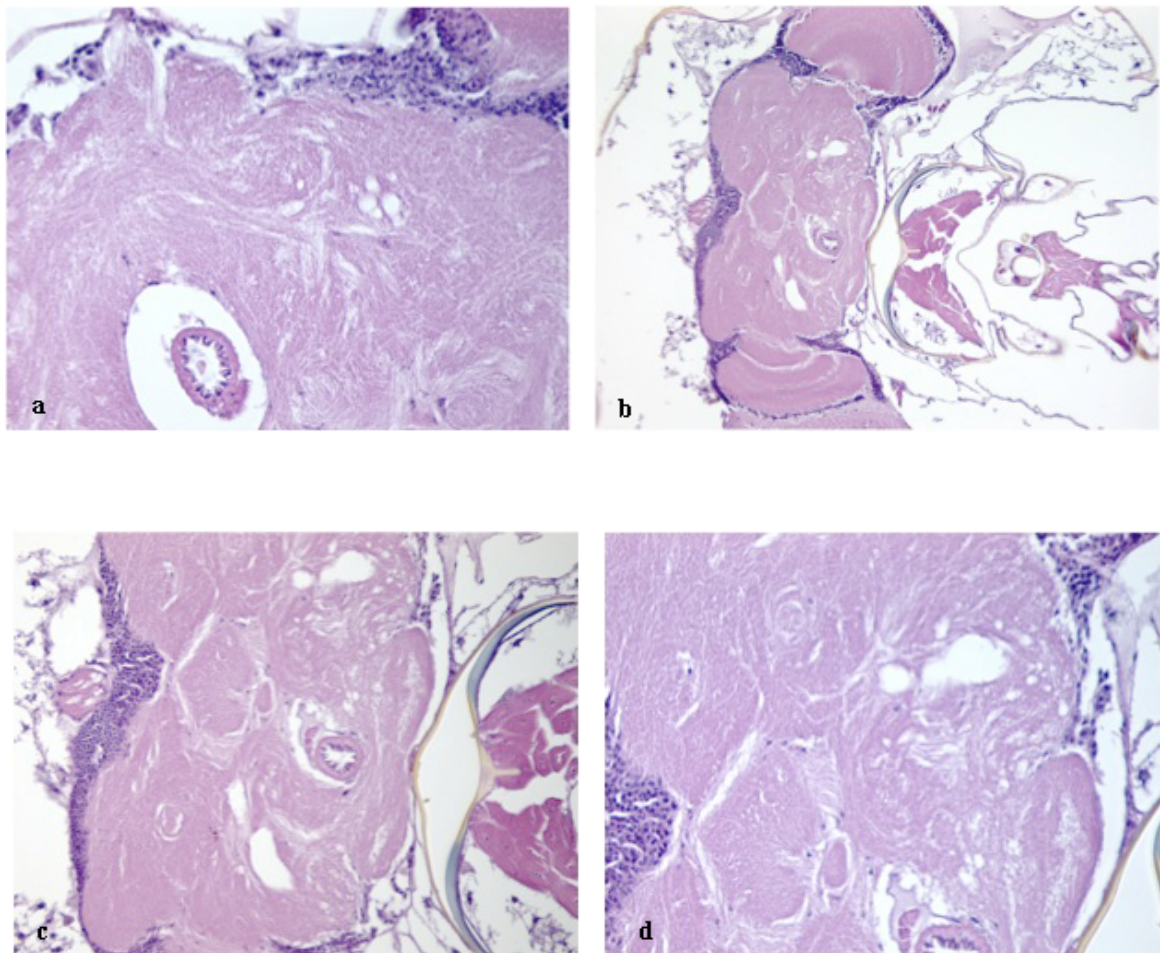


Figura 6.13: Sezioni istologiche dei cervelli di *Drosophila* che esprimono a livello pan-neuronale H-PrP^{Sc} D178N/129M all'età di a) 1 giorno; b, c, d) 3 giorni.

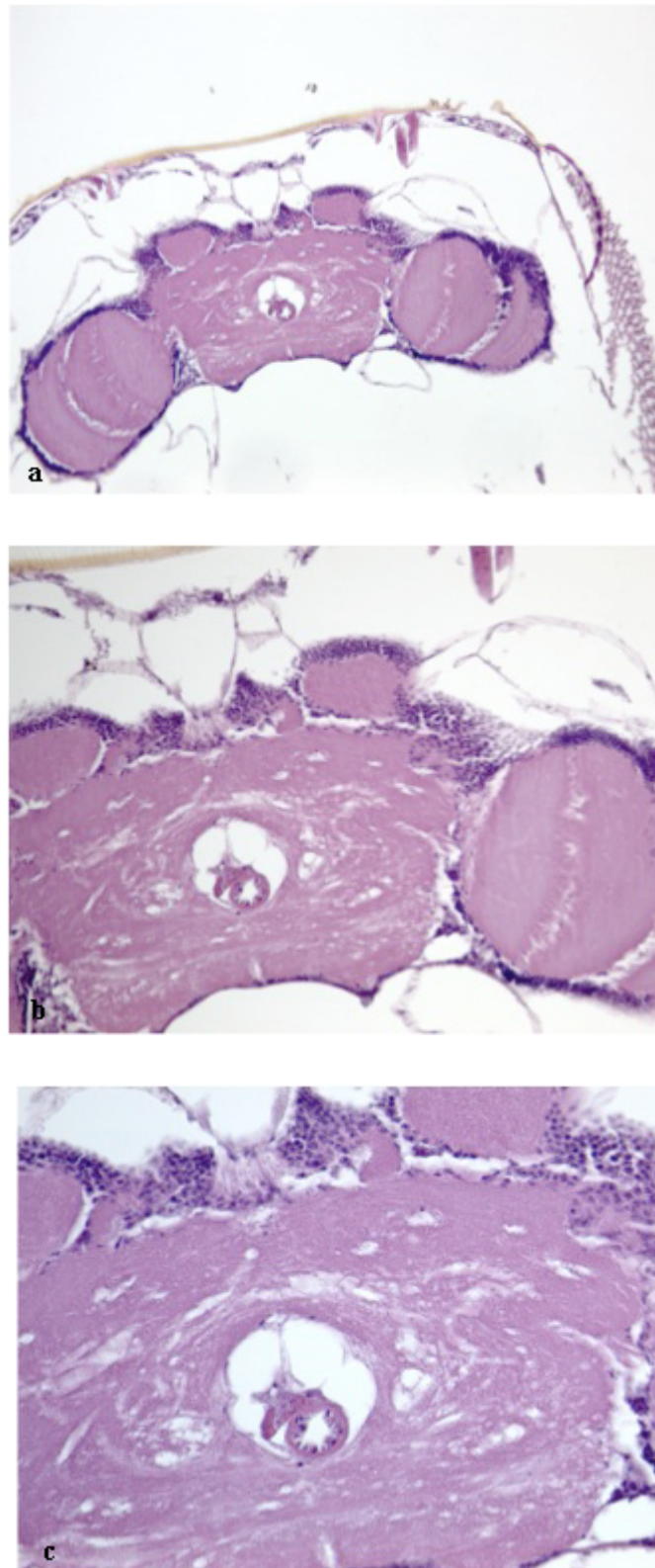


Figura 6.14: a, b, c) Sezioni istologiche dei cervelli di *Drosophila* che esprimono a livello pan-neuronale H-PrP^{Sc} D178N/129V a 10 giorni di età.

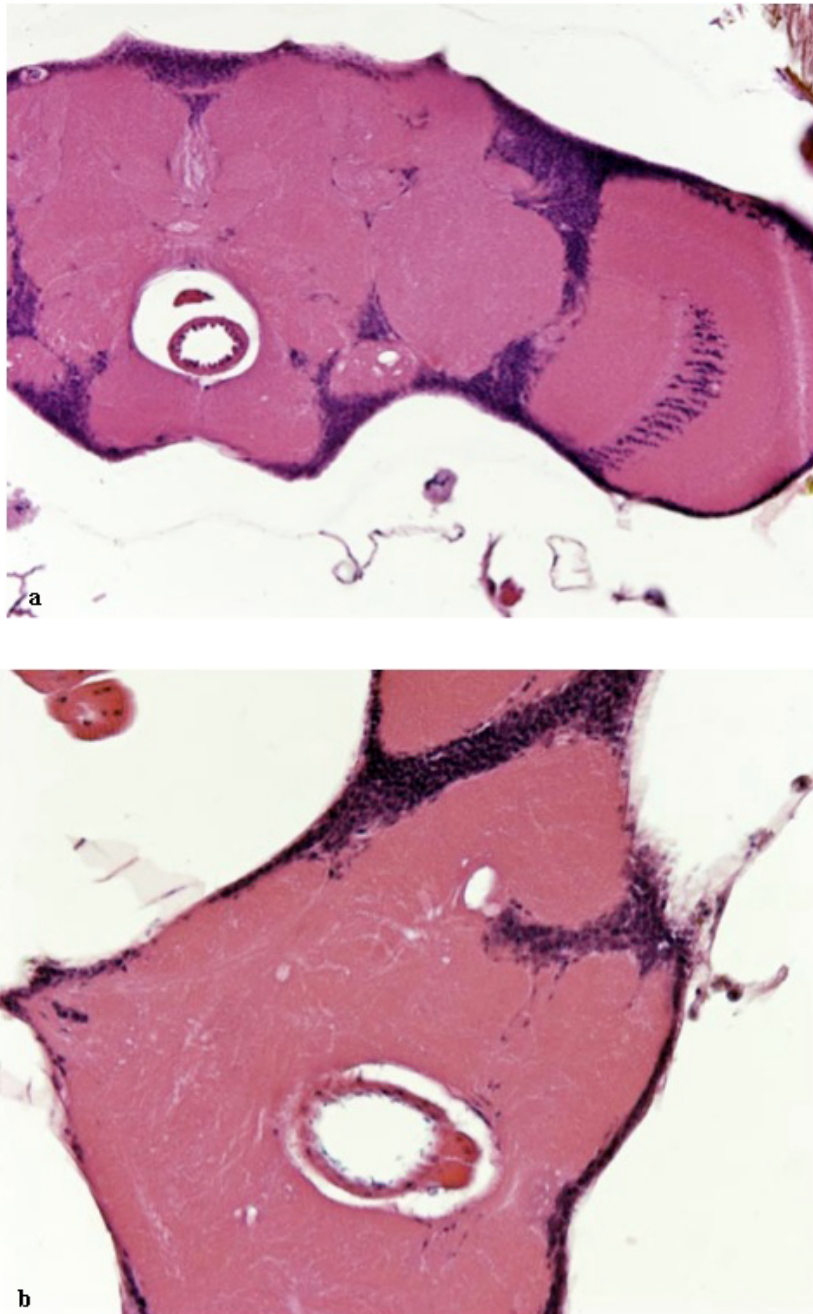


Figura 6.15: a, b) Sezioni istologiche dei cervelli di *Drosophila* che esprimono a livello pan-neuronale H-PrP^{Sc} E200K all'età di 10 giorni.

già dopo tre giorni dallo sfarfallamento, gli adulti presentano ampie zone del tessuto cerebrale in cui risultano assenti le cellule nervose (fig. 6.13b, c, d). La regione maggiormente interessata risulta il lobo delle antenne, ad entrambi i lati del cervello. Il fenotipo indotto dal prione D178N/129M appare più localizzato e non causa la comparsa di lesioni diffuse come evidenziato in precedenza nei moscerini che esprimono la H-PrP^C *wt* (fig. 6.11) o H-PrP^{Sc} P102L (fig. 6.12).

L'analisi delle sezioni ottenute dai moscerini che esprimono la mutazione D178N in associazione con la valina in posizione 129 ha fornito dei risultati interessanti. Se si paragonano i profili dei danni tissutali nei due casi H-PrP^{Sc} D178N/129M/*elav*-Gal4 (fig. 6.13) e H-PrP^{Sc} D178N/129V/*elav*-Gal4 (fig. 6.14) si può notare come essi interessino regioni cerebrali differenti. Inoltre, nel caso della mutazione che nell'uomo è associata alla fCJD le lesioni appaiono più diffuse, interessando non soltanto i lobi delle antenne ma anche ampie regioni del corpo cerebrale. Inoltre, la morte neuronale causata dalla mutazione D178N/129V sembra coinvolgere un numero minore di cellule. Come si può notare in figura 6.14, le regioni vacuolizzate sono meno estese rispetto a quelle associate da D178N/129M, nonostante le *Drosophilae* abbiano un'età maggiore (10 giorni contro i 3 dei moscerini in figura 6.13).

Le sezioni istologiche dei cervelli di moscerini che esprimono la proteina mutata E200K hanno evidenziato danni tissutali meno gravi rispetto agli altri campioni analizzati. A 10 giorni di età le lesioni si presentano molto localizzate e interessano la sola regione dei lobi antennali (fig. 6.15). Il rimanente tessuto cerebrale appare integro, indicando un fenotipo molto attenuato rispetto a quello indotto non soltanto dalle altre forme di H-PrP^{Sc} ma anche rispetto a quello dovuto all'espressione della proteina prionica cellulare.

Attualmente sono in corso le osservazioni delle numerose sezioni istologiche ottenute. Dai primi vetrini analizzati si possono però trarre delle indicazioni importanti: i) le sezioni dei cervelli ottenute a partire da moscerini che esprimono sia H-PrP^C *wt* che le forme mutate H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129V e H-PrP^{Sc} E200K a tre giorni dalla nascita non presentano dalle alterazioni di rilievo nel tessuto cerebrale, se paragonate ai controlli; ii) nei cervelli degli individui H-PrP^{Sc} D178N/129M si evidenziano invece delle lesioni già alla nascita, che si manifestano con la comparsa di ampie regioni prive di cellule nervose; iii) con il trascorrere dei giorni, si assiste alla comparsa di lesioni, in tempi differenti e gravità più o meno importante a seconda della proteina espressa.

Sono inoltre in corso gli esperimenti di immunohistochimica per verificare se alle lesioni che compaiono a livello cerebrale si accompagna, così come avviene nell'uomo, la deposizione di proteina alterata a formare fibrille e/o placche di natura amiloide.

Drosophila melanogaster: modello *in vivo* per lo studio delle TSE ereditarie?

Le malattie da prioni, dette anche encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), comprendono un gruppo di malattie neurodegenerative a progressione fatale che colpiscono l'uomo e altre specie di mammiferi, quali ovini, bovini, cervidi, visoni e felini.

Tutte queste patologie hanno la caratteristica comune di presentare lunghi periodi di incubazione seguiti da una patologia cronica a carico del sistema nervoso che porta invariabilmente alla morte dell'individuo affetto. Esse sono contraddistinte dalla comparsa di vacuolizzazione cerebrale, astrocitosi, gliosi e deposizione di una glicoproteina a formare fibrille e placche di natura amiloide, simili a quelle che caratterizzano la neurodegenerazione del morbo di Alzheimer.

La natura dell'agente infettivo e il suo meccanismo di propagazione è ancor oggi uno degli argomenti più controversi della biologia.

Secondo la teoria attualmente accettata dalla maggior parte dei ricercatori che si occupano di queste malattie, la "*Protein Only Hypothesis*" [1], l'agente responsabile delle TSE è una proteina, il prione (PrP^{Sc}), che possiede la sorprendente capacità di replicarsi autonomamente. Esso rappresenta l'isoforma patologica di una proteina normalmente presente nelle cellule e, in particolare, nei neuroni, denominata proteina prionica cellulare (PrP^{C}). Le due isoforme sono identiche a livello della struttura primaria ma differiscono in quella tridimensionale. La "*Protein Only Hypothesis*" va quindi ad infrangere uno dei dogmi centrali della biologia, affermando che una stessa sequenza aminoacidica può determinare più di una

struttura tridimensionale. Inoltre, per la prima volta, identifica una proteina come un agente infettante in grado di autoreplicarsi.

La principale differenza tra PrP^C e PrP^{Sc} risiede nella struttura delle loro regioni C-terminali. La proteina prionica cellulare presenta ampie regioni con strutture secondarie ad α -elica mentre in PrP^{Sc} vi è una maggiore quantità di strutture a foglietto- β .

L'evento centrale nello sviluppo delle TSE è rappresentato dalla conversione della PrP cellulare nella sua isoforma patologica secondo un meccanismo "a stampo" attraverso il quale la PrP^{Sc} promuove, mediante un processo autocatalitico, il cambiamento conformazionale della PrP^C che assume anch'essa la struttura alterata. L'accumulo a livello neuronale dei prioni causa la morte cellulare anche se non è ancora stato chiarito se ciò avvenga per apoptosi, lisi, a causa della tossicità degli aggregati o per una minor resistenza agli stress.

Nell'uomo, le malattie da prioni sono presenti in tre forme: i) sporadica, in seguito ad un cambiamento conformazionale spontaneo della proteina normale attraverso un meccanismo che deve ancora essere delucidato (sCJD); ii) infettiva, dovuta al meccanismo di conversione strutturale mediato dalla presenza di PrP^{Sc} (*kuru*, vCJD); iii) ereditaria, trasmessa come carattere autosomico dominante associato a mutazioni a carico del gene *PRNP* che codifica la proteina prionica cellulare (GSS, IFF e fCJD).

Il presente lavoro di tesi rientra in un progetto che, mediante studi *in vivo* su *Drosophila melanogaster*, mira ad approfondire la conoscenza della biologia della proteina prionica e della sua forma patologica, con particolare riferimento alle forme ereditarie di TSE, che rappresentano una peculiarità dell'uomo. L'utilizzo del moscerino della frutta come un valido modello animale per lo studio di malattie che affliggono l'uomo, in particolare neurodegenerative, è già ampiamente consolidato [149, 150, 174, 189]. Alla base di questo approccio, vi è l'ampia conservazione, sia dal punto di vista strutturale che funzionale, di numerose famiglie di geni [146]. Inoltre, alcune vie fondamentali per lo sviluppo di un organismo complesso sono altamente conservate e, quando esse vengono danneggiate, si osservano, in questi due organismi, difetti e alterazioni molto simili.

Poichè l'analisi del database del progetto genoma di *Drosophila melanogaster* [204] ha indicato che nel moscerino della frutta non è presente un gene omologo a *PRNP*, che codifica la proteina prionica cellulare, la prima parte del lavoro è stata finalizzata alla generazione e alla caratterizzazione delle linee di animali transgenici in grado di esprimere la PrP umana sia nella sua forma *wild type* (H-PrP^C *wt*) che caratterizzata dalla presenza di alcune delle mutazioni associate alle TSE ereditarie (H-PrP^{Sc}). Successivamente, la nostra attenzione si è focalizzata sull'analisi degli eventuali fenotipi causati dall'espressione delle proteine a livello del sistema nervoso del moscerino, analizzando letalità, durata della vita, comportamento ed eventuali fenomeni neurodegenerativi associati.

7.1 Generazione e caratterizzazione degli individui transgenici

Recentemente, Gavin e colleghi [190] hanno dimostrato la validità di *Drosophila* come animale modello per lo studio delle malattie da prioni. Questi ricercatori hanno generato moscerini transgenici in grado di esprimere la proteina prionica di topo (M-PrP) recante la mutazione P101L, corrispondente alla sostituzione aminoacidica P102L che nell'uomo è associata alla GSS. In questo modello, i fenotipi ottenuti promuovendo l'espressione di M-PrP P101L a livello dei neuroni colinergici ricordano quelli della malattia umana: disfunzioni locomotorie, morte precoce, accumulo della proteina mutata in dipendenza dell'età, deposizione di aggregati intracellulari di M-PrP P101L e vacuolizzazione cerebrale.

Questo studio ha fornito una solida base al nostro progetto che mira a sviluppare un modello di *Drosophila melanogaster* per lo studio delle TSE ereditarie umane generando moscerini in grado di esprimere la proteina prionica umana sia *wt* che mutata. In questo modo ci siamo posti nelle condizioni di far esprimere ai moscerini i prioni associati alle diverse malattie, e non la proteina di topo nella quale è stata introdotta una mutazione corrispondente a quella presente nell'uomo [190].

Le malattie da prioni di natura ereditaria rappresentano una peculiarità dell'uomo e fino ad ora non sono state riscontrate in nessun altro mammifero affetto da TSE. Il nostro modello si pone perciò in una condizione più simile a quanto avviene in natura, generando animali che esprimono la proteina mutata presente nell'uomo e non un artefatto dovuto all'introduzione della stessa in una sequenza proteica che in natura non la presenta. Sarà interessante notare se nei due modelli di *Drosophila* vi siano delle differenze e ciò potrà fornire delle indicazioni anche sulle eventuali diversità tra la proteina prionica umana e di topo.

Un'altra differenza di rilievo tra i due studi è la scelta delle mutazioni. Nel nostro progetto abbiamo analizzato i fenotipi dovuti all'espressione di 3 diverse mutazioni e questo approccio potrebbe fornire indicazioni sia sul ruolo che esse svolgono nella patogenesi delle TSE, sia sull'influenza del polimorfismo in posizione 129 in associazione alla mutazione D178N. In questa posizione della sequenza aminoacidica possono infatti essere presenti o un residuo di metionina (M) o uno di valina (V). Anche se tale polimorfismo non è di per se stesso patogenetico, esso è in grado di influenzare il fenotipo clinico dovuto alla presenza della mutazione D178N. Nel caso infatti che essa sia presente associata alla metionina in posizione 129, l'individuo sviluppa l'insonnia familiare fatale, mentre in presenza di un residuo di valina 129 insorgerà la malattia di Creutzfeldt-Jacob [54].

Per generare un valido modello animale per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili familiari, abbiamo ritenuto utile scegliere 3 mutazioni in modo che fossero rap-

presentative delle tre forme familiari di TSE fino ad ora descritte (GSS, fCJD e IFF) e che interessassero le diverse regioni della proteina: le porzioni N-, C- terminali e la regione intermedia.

Nella prima parte del lavoro abbiamo quindi clonato e mutagenizzato il cDNA di *PRNP* ottenendo i diversi costrutti necessari per generare i moscerini transgenici. Mediante microiniezione degli embrioni di *Drosophila melanogaster*, sono stati introdotti nel corredo cromosomico dei moscerini della frutta i plasmidi codificanti H-PrP^C *wt*, H-PrP^{Sc} P102L (associata alla GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF), H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) e H-PrP^{Sc} E200K (fCJD).

In seguito alla trasformazione mediata da elementi P, sono state ottenute 45 linee indipendenti di moscerini transgenici e in ognuna di esse è stata effettuata la mappatura cromosomica dell'inserto. Innanzitutto è stato stabilito, attraverso un approccio di genetica formale mendeliana, il cromosoma e nel quale è avvenuta l'inserzione. Questo ha permesso di ottenere delle linee stabili, nelle quali cioè tutte le generazioni di moscerini presentano lo stesso genotipo, senza il rischio di perdere, nel tempo, l'inserto. Successivamente, mediante ibridazione *in situ* sui cromosomi politenici estratti da larve al III stadio di sviluppo, sono stati determinati l'esatta posizione e il numero di copie dei plasmidi all'interno del cromosoma ricevente.

L'inserzione del plasmide nel genoma di *Drosophila* non avviene in maniera sequenza-specifica, poichè è mediato dalla presenza nel vettore di trasposoni, detti elementi P. Data la casualità del processo, il numero di copie del plasmide che vanno ad inserirsi nel corredo cromosomico dei moscerini delle diverse linee può essere molto variabile. Nel nostro caso, è stato determinato che si va da linee nelle quali è presente una singola copia del plasmide ad altre con più copie, fino ad un massimo di 4. La presenza di un numero differente di inserzioni del plasmide non è però sufficiente per affermare che a più copie di inserzioni corrisponda effettivamente una maggiore quantità della proteina presente, come pure che allo stesso numero di inserti corrisponda uno stesso livello di espressione della proteina. Può accadere infatti, data la casualità dell'evento di inserzione, che il plasmide si sia integrato in particolari punti del genoma ricevente nel quale potrebbe essere presente un elemento in grado di fungere da repressore/attivatore della trascrizione, oppure in una regione non trascritta.

Una volta caratterizzate dal punto di vista genetico le linee di moscerini trasformati, in ognuna di esse sono stati determinati, mediante Real-Time PCR, i reali livelli di espressione di H-PrP.

7.2 Valutazione dei livelli di espressione di H-PrP in *Drosophila melanogaster*

E' ancora ampiamente discusso se le malattie da prioni siano dovute esclusivamente alla presenza della isoforma patologica della proteina o se la PrP^C, quando sovraespressa, possa di per se stessa causare l'insorgenza della patologia [206, 207].

Nel nostro modello animale è stato quindi interessante andare a determinare l'effettivo livello di espressione delle diverse forme di H-PrP nelle linee di moscerini trasformati da utilizzare negli esperimenti. In questo modo è stato possibile stabilire se *Drosophilae* caratterizzate da uno stesso livello di espressione di H-PrP presentino un fenotipo simile e se vi sia una correlazione tra la gravità del fenotipo osservato e la quantità di proteina presente.

Gli esperimenti di Real-Time PCR hanno evidenziato che i livelli di espressione di H-PrP^C *wt*, H-PrP^{Sc} P102L (associata alla GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF), H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) e H-PrP^{Sc} E200K (fCJD) possono variare notevolmente nei moscerini trasformati, sia tra le linee che esprimono lo stesso transgene sia tra le linee che esprimono transgeni diversi. Questi risultati, pur se prevedibili data la causalità dell'evento di inserzione del plasmide nel genoma ricevente, assumono un importante valore nel caso dello studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili. In queste malattie infatti, come detto in precedenza, la quantità di proteina presente nell'individuo affetto potrebbe rivestire un ruolo primario nello sviluppo della patologia, per quanto riguarda sia la proteina prionica cellulare, che i diversi prioni oggetto dello studio.

Alla luce di questi risultati, sono state selezionate 4 linee di *Drosophila melanogaster* per ognuna delle diverse forme di H-PrP da utilizzare negli esperimenti successivi in modo che: i) tra i gruppi trasformati con un diverso transgene vi fosse un livello di espressione paragonabile; ii) all'interno di ogni gruppo vi fossero sia linee con livelli di espressione tra loro paragonabili sia la linea con il livello più alto.

Questo ha permesso di analizzare i risultati degli esperimenti di espressione di H-PrP valutando se:

- 1) moscerini con livelli di espressione paragonabili si comportano allo stesso modo;
- 2) l'espressione della proteina *wt* causa lo stesso fenotipo delle forme mutate che esprimono lo stesso livello di H-PrP;
- 3) la sovraespressione delle diverse proteine promuove l'insorgenza di un fenotipo più grave
e, infine, se
- 4) mutazioni diverse associate alle tre forme di TSE familiari inducono un fenotipo diverso anche nel moscerino, andando ad interessare, ad esempio come avviene nell'uomo, regioni

diverse del cervello.

7.3 Effetti fenotipici dell'espressione di H-PrP in *Drosophila melanogaster*

Avvalendoci del sistema di espressione binario UAS-GAL4, sono stati allestiti gli incroci per promuovere l'espressione delle diverse forme di H-PrP.

Il prodotto proteico del gene *gal4* regola, in lievito, la trascrizione dei geni *gal1* e *gal10* legandosi a una specifica sequenza UAS (*Upstream Activating Sequence*) costituita da quattro siti di 17 bp in posizione adiacente a questi loci. È stato dimostrato che anche in *Drosophila melanogaster* l'espressione di GAL4 è in grado di attivare la trascrizione di un transgene posto sotto il controllo di UAS [167, 195]. Questo metodo si basa sulla generazione di moscerini transgenici nei quali l'espressione del gene di interesse è posta sotto il controllo della sequenza UAS. In tali condizioni perciò, la trascrizione del gene richiede la presenza di GAL4 e quindi l'assenza di questo elemento nella linea transgenica lo mantiene silente. Per attivarne la trascrizione, questi moscerini devono essere incrociati con *Drosophilae* che esprimono GAL4, dette linee *driver-Gal4*. I due componenti del sistema vengono mantenuti in linee di moscerini separate, mentre la progenie risultante esprimerà il transgene secondo il pattern dipendente dal promotore della linea *driver-Gal4* utilizzata.

Poichè le encefalopatie spongiformi trasmissibili familiari rientrano nel più ampio gruppo delle malattie neurodegenerative umane, la nostra attenzione si è concentrata sui possibili fenotipi indotti dalla presenza di H-PrP a livello del sistema nervoso dei moscerini, utilizzando specifiche linee *driver-Gal4*.

Per ottenere moscerini che esprimessero in maniera tessuto- e/o cellulo-specifica i transgeni, sono state utilizzate diverse linee *driver-gal4*: *act-gal4*, nella quale quest'ultimo è controllato dal promotore *actina* ed è quindi espresso ubiquitariamente, *elav-Gal4*, che promuove un'espressione generalizzata nel sistema nervoso del moscerino della frutta, e *d42-Gal4*, che esprime *gal4* a livello dei soli motoneuroni di *Drosophila*.

Sono stati perciò allestiti, di volta in volta, gli incroci tra le 4 linee di moscerini trasformati per ognuna delle diverse forme di H-PrP, e le linee *driver-Gal4* scelte. Inoltre, per ottenere le popolazioni di controllo prive dell'espressione delle proteine, in ogni esperimento sono stati di volta in volta incrociati i moscerini transgenici e le opportune linee *driver-Gal4* con individui appartenenti al ceppo *w1118*.

7.3.1 Analisi della letalità

Volendo sviluppare un modello animale per lo studio delle TSE ereditarie facendo esprimere nel moscerino della frutta delle proteine esogene, è necessario verificare se l'espressione della proteina prionica cellulare umana induca o meno delle alterazioni nello sviluppo e/o nel comportamento delle *Drosophilae*, in modo da stabilire se gli eventuali fenotipi patologici riscontrati siano dovuti alla semplice espressione di una proteina non endogena o se siano effettivamente dovuti all'una o l'altra delle mutazioni studiate.

Innanzitutto, è stato valutato se l'espressione della proteina, sia normale che mutata, interferisse con i normali processi di sviluppo dei moscerini inducendo un fenotipo letale. A tal fine sono state effettuate delle conte in successione di embrioni, larve, pupe e individui adulti ottenuti da singole deposizioni degli incroci allestiti. Gli adulti sono stati suddivisi, alla nascita, in base alla loro classe genotipica e i valori ottenuti sono stati confrontati con quelli attesi secondo le leggi della segregazione di Mendel.

Negli esperimenti di valutazione della mortalità utilizzando la linea *driver* ubiquitaria *act-Gal4*, in nessuna delle popolazioni F1 analizzate è stato possibile isolare individui nei quali la proteina prionica cellulare o i prioni fossero presenti in tutte le cellule dell'organismo. Il drastico calo del numero degli embrioni rispetto a quello delle larve (mentre si mantiene pressochè costante quello di larve, pupe e adulti) ha permesso di stabilire inoltre che il fenotipo letale si manifesta a questo stadio di sviluppo. Sia la proteina normale che le forme patologiche, se espresse ubiquitariamente nel moscerino della frutta, si comportano allo stesso modo, bloccandone lo sviluppo ad una fase precoce, già allo stadio embrionale.

Per spiegare questo risultato possono essere avanzate due ipotesi principali. La letalità potrebbe essere dovuta alla quantità di proteina presente. Non essendoci, in *Drosophila melanogaster*, un gene omologo a *PRNP*, la proteina prionica risulta essere del tutto sconosciuta in questo organismo e potrebbe essere tollerata al di sotto di un certo valore soglia. Nel caso dell'espressione ubiquitaria dei transgeni, questo potrebbe essere superato e le proteine risulterebbero tossiche per i moscerini. Un'altra possibile spiegazione è che le diverse forme di H-PrP, proprio perchè esogene, potrebbero andare ad interferire con i normali processi di sviluppo di *Drosophila*, anche quando presente in maniera tessuto- o cellulo-specifica.

Per verificare se la presenza delle proteine umane causino letalità anche se presenti in limitate e ben specifiche regioni dell'organismo, sono stati analizzati i fenotipi indotti dall'espressione pan-neuronale, utilizzando la linea *driver elav-Gal4*, o nei soli motoneuroni, mediante il *driver d42-Gal4*.

In caso di comparsa di un fenotipo letale embrionale analogamente a quanto si verifica nel caso dell'espressione ubiquitaria delle proteine, ciò sarebbe imputabile al solo fatto che si va

ad esprimere nel moscerino una proteina esogena umana, indipendentemente dalla presenza di mutazioni. In questo caso, ovviamente, *Drosophila* non rappresenterebbe un valido modello applicabile allo studio di queste patologie, a differenza di quanto avviene per numerose altre malattie neurodegenerative umane.

Nel caso dell'espressione pan-neuronale di H-PrP^C wt, H-PrP^{Sc} P102L (GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF), H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) e H-PrP^{Sc} E200K (fCJD), non è stata osservata una interferenza significativa nello sviluppo del moscerino della frutta da parte delle proteine esogene espresse nell'intero sistema nervoso. La differenza tra il numero degli embrioni e quello delle larve contate nelle diverse prove può infatti essere dovuta alla naturale mortalità che interviene nelle prime fasi dello sviluppo, alla presenza di un cospicuo numero di uova non fecondate e, in parte, ad un fenomeno di competizione. Infatti, il numero elevato di embrioni (circa 700) depositi su piastrellino di dimensioni contenute (60 mm) può aver causato la morte di una parte di essi. I risultati ottenuti negli incroci di controllo avvalorano questa ipotesi, dato che hanno prodotto risultati analoghi. Inoltre, l'osservazione degli individui adulti, separati per classe genotipica, non ha evidenziato delle discrepanze con i valori attesi, per le diverse classi, secondo le leggi della segregazione di Mendel.

Poiché le TSE comprendono un gruppo di malattie neurodegenerative, e visto il fenotipo letale indotto dall'espressione ubiquitaria di H-PrP, nel prosieguo dello studio l'attenzione è stata focalizzata sugli effetti della presenza della proteina prionica cellulare umana e dei diversi prioni a livello del sistema nervoso dei moscerini. Negli esperimenti sono state utilizzate perciò le opportune linee *driver-Gal4* per promuovere l'espressione a livello dell'intero sistema nervoso (*elav-Gal4*) e/o nella specifica sottopopolazione dei motoneuroni (*d42-Gal4*).

7.3.2 Analisi della vitalità

Dopo aver valutato un eventuale fenotipo letale dovuto alla presenza di H-PrP, è stato verificato se le proteine vadano ad influenzare, in positivo o in negativo, la durata di vita delle *Drosophilae* transgeniche.

100 maschi e 100 femmine di un giorno di età, per ognuno dei genotipi da analizzare, sono stati monitorati registrando giornalmente il numero degli individui morti e le conte sono proseguite fino alla morte di tutti i moscerini di controllo.

Le curve di vitalità ottenute nel caso dell'espressione pan-neuronale delle diverse forme della proteina prionica hanno mostrato una diminuzione dell'aspettativa di vita dei moscerini H-PrP/*elav-Gal4* rispetto ai controlli.

L'espressione della proteina prionica cellulare *wt* e del prione E200K (fCJD) inducono la comparsa di un fenotipo simile, con il 50% dei moscerini che non superano i 18 giorni di età. Inoltre, nelle due popolazioni di campioni, separate in base al sesso, non si nota una rilevante differenza tra il gruppo dei maschi e quello delle femmine. Le *Drosophilae* che presentano H-PrP^{Sc} P102L e H-PrP^{Sc} D178N/129M nell'intero sistema nervoso risentono maggiormente della presenza delle proteine, mostrando una morte precoce. Il 50% moscerini che esprimono la mutazione P102L associata alla GSS muore nel giro di circa 9 giorni, vivendo circa la metà rispetto alle popolazioni H-PrP^C *wt/elav-Gal4* e H-PrP^{Sc} E200K/*elav-Gal4*. Un fenotipo ancora più grave si manifesta nel caso del prione D178N/129M, che causa nell'uomo l'insonnia familiare fatale: il 50% degli individui non supera i 5 giorni di esperimento. Inoltre, in questi due gruppi campione, si nota che la popolazione di femmine vive più a lungo rispetto ai maschi, raggiungendo all'incirca il doppio di età.

I risultati ottenuti negli esperimenti condotti promuovendo l'espressione dei transgeni nei soli motoneuroni indicano che, nel complesso, le proteine presenti limitatamente a questa sottopopolazione di cellule nervose inducono la comparsa di un fenotipo più attenuato o, in alcuni casi, del tutto assente.

Le curve di sopravvivenza dei moscerini H-PrP^C *wt/d42-Gal4*, sia maschi che femmine, non mostrano un andamento che si discosta da quello ottenuto con l'espressione pan-neuronale della proteina: il 50% di entrambi i gruppi campione non supera i 18-20 giorni di età.

Per quanto riguarda invece le *Drosophilae* H-PrP^{Sc} P102L/*d42-Gal4* e H-PrP^{Sc} E200K/*d42-Gal4*, la presenza dei prioni nei motoneuroni non causa una riduzione dell'aspettativa di vita dei moscerini, rispetto alle popolazioni di controllo. I moscerini che esprimono il prione P102L, sia maschi che femmine, si pongono in una posizione intermedia tra i due gruppi di controllo, con il 50% degli individui che muore nel giro di circa 25 giorni nei primi e 50 giorni nelle seconde. Pur non presentando, se paragonati alle popolazioni prive dell'espressione del transgene, morte precoce, viene comunque mantenuta la differenza della durata di vita tra i rappresentanti dei due sessi.

I moscerini che presentano nei motoneuroni H-PrP^{Sc} E200K, mutazione associata nell'uomo alla forma familiare della Creutzfeldt-Jacob, presentano le curve di vitalità con un andamento pressochè sovrapponibile a quello della popolazione di controllo H-PrP^{Sc} E200K/*w1118*. Il 50% dei maschi muore a 20 giorni di età, mentre le femmine raggiungono all'incirca i 40 giorni.

Il fenotipo più grave indotto dalla presenza della proteina nei motoneuroni si manifesta nei moscerini H-PrP^{Sc} D178N/129M/*d42-Gal4*, analogamente a quanto evidenziato con l'espressione pan-neuronale di H-PrP. Pur vivendo più a lungo, questo gruppo di moscerini

presenta morte precoce, sia rispetto ai propri controlli che alle popolazioni che presentano le altre forme di H-PrP. Il 50% dei maschi non sopravvive oltre i 13 giorni di esperimento, vivendo all'incirca tre volte di più rispetto a quanto evidenziato con l'espressione pan-neuronale. Per quanto concerne le femmine, il 50% degli individui vive all'incirca 20 giorni, non discostandosi in maniera significativa dal risultato ottenuto quando il prione è presente nell'intero sistema nervoso.

La differenza nel comportamento tra i maschi e le femmine della stessa popolazione non è imputabile alla presenza delle proteine umane, ma rispecchia il normale andamento della vitalità in condizioni naturali, come confermato dal comportamento dei gruppi controllo.

Nel loro complesso, i risultati ottenuti dagli esperimenti di vitalità forniscono alcune importanti indicazioni. Innanzitutto, i moscerini che esprimono le diverse forme della proteina umana nell'intero sistema nervoso, mostrano morte precoce, analogamente a quanto avviene nei mammiferi affetti da TSE. Inoltre, fatto rilevante, i fenotipi manifestati dai moscerini, a parità di quantità di proteina presente, differiscono in relazione alla forma di H-PrP espressa nell'organismo.

La presenza di H-PrP nei motoneuroni mostra un minore effetto sulla vita dei moscerini. Anche in questo caso, i risultati indicano la comparsa di un fenotipo più o meno grave, o addirittura assente, in relazione alla forma della proteina presente.

L'analisi delle curve di sopravvivenza sembra indicare che i motoneuroni non siano implicati, in *Drosophila*, nello sviluppo di un fenotipo patologico causato dalle mutazioni P102L e E200K, che nell'uomo causano rispettivamente GSS e fCJD. Al contrario, questa popolazione di neuroni sembra svolgere un importante ruolo nella comparsa del fenotipo alterato indotto dalla presenza del prione D178N/129M, associato alla IFF.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dall'osservazione dei moscerini che esprimono la proteina prionica cellulare *wt*, essi sembrano indicare che, nei moscerini, la sovraesposizione della H-PrP^C sia in grado di indurre la comparsa di un fenotipo patologico, come ipotizzato da alcuni ricercatori che si occupano delle encefalopatie spongiformi trasmissibili utilizzando modelli murini [206, 207].

Questi risultati rivestono una fondamentale importanza per la validazione del nostro modello animale per le TSE ereditarie, dato che ci permettono di escludere che la morte precoce dei moscerini sia da imputare alla semplice espressione in *Drosophila melanogaster* di una proteina esogena. La proteina prionica cellulare e i diversi prioni, a parità di livello di espressione, inducono la comparsa di fenotipi più o meno gravi e ciò fornisce una prima indicazione della validità del modello proposto.

7.3.3 Osservazione del fenotipo comportamentale

Nei mammiferi affetti da TSE, la patologia è caratterizzata, oltre a morte precoce, dalla comparsa di manifestazioni cliniche che interessano non soltanto le capacità cognitive degli individui ma anche il comportamento, con sintomi quali difficoltà nella deambulazione e tremori, che progrediscono con l'età portando, nel tempo, ad una infermità pressochè totale.

Per verificare se anche in *Drosophila* si manifestino alterazioni di questo tipo e caratterizzate da una degenerazione progressiva, individui adulti che esprimono H-PrP^C wt, H-PrP^{Sc} P102L (GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF), H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) e H-PrP^{Sc} E200K (fCJD) nell'intero sistema nervoso e/o nei motoneuroni, sono stati monitorati giornalmente fino alla morte, in modo da poter osservare l'insorgenza e l'evoluzione nel tempo di eventuali fenotipi patologici.

In entrambi i casi considerati, l'espressione di H-PrP induce nei moscerini la comparsa di un comportamento anomalo rispetto agli opportuni controlli.

Alla nascita, le *Drosophilae* mostrano un comportamento del tutto normale se paragonato a quello dei moscerini privi di H-PrP, ma, nel giro di pochi giorni appare evidente una progressiva difficoltà nella deambulazione seguita dalla graduale perdita della capacità di volare. Col trascorrere dei giorni si assiste ad una sempre maggiore difficoltà nel risalire il tubo di coltura e nel girarsi quando cadono sul dorso, evidente lentezza dei movimenti, addome ricurvo, tendenza a saltare di scatto da una parte all'altra del recipiente e a sfregarsi in continuazione le zampe anteriori, posteriori e le ali. Successivamente, gli individui sembrano perdere il controllo dei movimenti delle zampe con manifestazione di tremori e perdita dell'equilibrio. Con l'invecchiamento, si osserva un drastico peggioramento fino alla totale incapacità di movimento, forti tremori delle zampe, tendenza a cadere sul dorso e impossibilità di girarsi e di rialzarsi, strofinamento continuo delle zampe anteriori e posteriori, del capo e delle ali, e, infine, morte precoce caratterizzata da capo proteso verso il basso e addome fortemente contratto.

I moscerini che esprimono H-PrP^{Sc} D178N/129M mostrano un iniziale aumento della loro attività, saltano e si muovono di scatto all'interno del tubo di coltura. Ad esso seguono forti tremori delle zampe, mostrando fenotipo più grave e a progressione più rapida che porta alla morte degli individui nel giro di pochi giorni, confermando i dati attenuati dagli esperimenti di vitalità.

Per quanto riguarda le *Drosophilae* che esprimono la forma *wild type* della proteina prionica umana, esse mostrano un fenotipo molto attenuato rispetto alle popolazioni che esprimono le forme mutate della proteina: le alterazioni locomotorie insorgono ad una età più avanzata, sono molto meno gravi e caratterizzate da una lenta progressione, se paragonate ai moscerini

H-PrP^{Sc}/driver-Gal4.

Come evidenziato negli esperimenti di vitalità, anche nell'osservazione del comportamento si evidenzia un fenotipo attenuato nel caso dell'espressione delle proteine a livello dei soli motoneuroni, rispetto a quella pan-neuronale.

E' interessante notare come i moscerini perdano progressivamente la capacità di controllo dei movimenti delle zampe, presentando tremori e perdita dell'equilibrio, manifestazioni queste che ricordano i segni clinici descritti nei mammiferi affetti da TSE, e come la sintomatologia osservata peggiori in dipendenza dell'età.

Un'altra importante osservazione è che le linee caratterizzate da un più alto livello di espressione di H-PrP manifestano un fenotipo più grave e a progressione più rapida se paragonate a quelle caratterizzate da un livello più basso, indicando una possibile correlazione tra la gravità dei sintomi e il livello di espressione delle forme mutate di H-PrP.

I risultati ottenuti dalla semplice osservazione dei moscerini, nel loro complesso confermano quanto osservato in precedenza: i) mutazioni differenti, pur portando all'insorgenza di alterazioni patologiche simili, inducono un fenotipo e una progressione più o meno rapida; ii) i moscerini H-PrP^{Sc} D178N/129M/driver-Gal4 (IFF) manifestano un aumento della loro attività seguito da un peggioramento più rapido delle loro condizioni che li porta a morte già nei primi giorni di osservazione; iii) le mutazioni P102L (GSS), D178N/129V (fCJD) e E200K (fCJD) inducono nei campioni tempi di progressione del fenotipo patologico simili; iv) i moscerini che esprimono la H-PrP^C *wt* mostrano alterazioni comportamentali più lievi rispetto alle *Drosophilae* che esprimono le mutazioni e con un aggravamento molto più lento; v) il tipo di sintomatologia osservata e il suo andamento in dipendenza dell'età sembrano riprodurre l'evoluzione delle encefalopatie spongiformi trasmissibili nei mammiferi, fornendo ulteriori indicazioni sulla validità del modello animale.

7.3.4 Analisi dell'attività locomotoria e dei ritmi circadiani

Vista la comparsa di un fenotipo patologico dovuto alla presenza di H-PrP nel sistema nervoso dei moscerini che causa importanti alterazioni dell'attività locomotoria, i fenotipi osservati sono stati analizzati nel dettaglio grazie a specifici test comportamentali.

Negli insetti, l'attività locomotoria è implicata, direttamente o indirettamente, in numerosi comportamenti, quali, ad esempio, il corteggiamento, la ricerca del cibo e l'esplorazione dell'ambiente, e che sono coordinati a livello del sistema nervoso centrale. In condizioni naturali, il moscerino della frutta si "sveglia" poco prima dell'alba, quando inizia a muoversi, ad alimentarsi, ad interagire con gli altri individui e ad accoppiarsi. Questi comportamenti continuano all'incirca fino a metà giornata, dopodichè gli insetti riducono la loro attività

entrando in un periodo definito di “siesta”. Nel tardo pomeriggio, prima del tramonto, essi iniziano un nuovo periodo di intensi movimenti seguiti dal riposo notturno. In questa descrizione semplificata della tipica giornata di un moscerino, la caratteristica principale è la distinzione tra momenti di attività e riposo. In queste condizioni, il ritmo circadiano dell'attività locomotoria è considerato rappresentativo della ritmicità di tutte le attività che l'individuo svolge.

Sono stati sviluppati numerosi sistemi per registrare i movimenti delle *Drosophilae*. Nei nostri esperimenti è stato utilizzato il *Drosophila Activity Monitoring System (DAMSystem)* che permette di valutare l'attività locomotoria dei moscerini come numero di passaggi di un individuo attraverso un raggio ad infrarossi. Questo sistema di monitoraggio rappresenta comunque una semplificazione dell'attività del moscerino poichè non fornisce alcuna informazione riguardante la locomozione *per se*, che dovrebbe comprendere anche una valutazione della velocità e della direzione del movimento.

Nei nostri esperimenti sono stati analizzati 30 maschi appartenenti ad ognuna delle tre linee scelte per ogni forma di H-PrP, nei quali è stata promossa l'espressione delle proteine nell'intero sistema nervoso o nei motoneuroni. Le condizioni sperimentali hanno previsto la registrazione dell'attività locomotoria per 3 giorni di buio completo (DD) seguiti da 7 giorni ad un regime di luce:buio (LD) 12:12. Le registrazioni effettuate nel periodo di LD hanno permesso di studiare i profili dei movimenti dei moscerini, mentre i dati ottenuti in condizioni di DD sono stati analizzati per determinare la periodicità dell'attività locomotoria.

In condizioni LD, i moscerini di controllo presentano un andamento bimodale dell'attività locomotoria, caratterizzato dalla presenza di due picchi di attività, prima dell'alba e del tramonto, separati da un lungo periodo di “siesta”.

Sono stati analizzati i moscerini che esprimono H-PrP^C wt, H-PrP^{Sc} P102L, H-PrP^{Sc} D178N/129M e H-PrP^{Sc} E200K nell'intero sistema nervoso.

Il primo risultato di rilievo ottenuto è stata l'impossibilità di analizzare i moscerini che esprimono la mutazione D178N/129M (IFF) poichè nessun moscerino vive sufficientemente a lungo da permettere la registrazione dei suoi movimenti. Per quanto riguarda invece le popolazioni H-PrP^C wt/*elav-Gal4* e H-PrP^{Sc} P102L/*elav-Gal4* (GSS), esse mostrano, se paragonate ai corrispondenti controlli, una diminuzione dell'attività locomotoria. Pur mantenendo un debole profilo bimodale, si assiste ad una diminuzione dei movimenti durante le ore di luce che si accentua durante il buio, quando i moscerini appaiono pressochè immobili.

Le *Drosophilae* che esprimono il prione E200K (fCJD), dopo un iniziale leggero calo dell'attività locomotoria, si assestano su un andamento paragonabile a quello dei controlli, con un debole anticipo e ritardo nella comparsa del picco di attività rispettivamente prima dell'alba e del tramonto. Questi risultati indicano che, come già osservato in precedenza, la mu-

tazione E200K ha solo deboli effetti sul normale comportamento dei moscerini, a differenza di quanto avviene per gli altri prioni oggetto dello studio.

Un risultato molto interessante è stato ottenuto analizzando i fenotipi dei moscerini che esprimono le proteine limitatamente ai motoneuroni.

Le *Drosophilae* H-PrP^C *wt/d42*-Gal4 e H-PrP^{Sc} P102L/*d42*-Gal4 mostrano un profilo di attività paragonabile a quello dei rispettivi controlli, pur con una minore quantità di movimenti durante le ore notturne, con il prione P120L che sembra aver solo deboli effetti nel comportamento dei moscerini transgenici. Ancora una volta, in accordo con quanto evidenziato negli esperimenti di vitalità e di osservazione del fenotipo, l'espressione a livello dei motoneuroni induce la comparsa di un fenotipo attenuato rispetto a quella pan-neuronale.

Un risultato del tutto opposto è stato ottenuto invece con le *Drosophilae* D178N/129M/*d42*-Gal4. Questi moscerini mostrano un rilevante aumento dell'attività locomotoria durante tutte le 24 ore, con un numero di passaggi attraverso il raggio a infrarossi che cresce con il passare dei giorni. Nel profilo di movimento di questi moscerini non è più distinguibile l'andamento bimodale, sono assenti i tipici due picchi giornalieri di attività come pure sono assenti il periodo di "siesta" e, fatto rilevante, il riposo notturno: le *Drosophilae* appaiono sempre ipercinetiche e insonni. Questo comportamento probabilmente può essere alla base della morte precocissima di questi moscerini. È da sottolineare come il fenotipo indotto dal prione D178N/129M ricordi la condizione di insonnia, indicando che il modello di moscerino della frutta sembra essere valido e in grado di ricapitolare le principali alterazioni patologiche che contraddistinguono questa forma di TSE nell'uomo.

Analizzando la ritmicità dell'attività locomotoria in condizioni di DD, condizione nella quale i campioni di controllo mantengono un comportamento ritmico, si nota che i moscerini transgenici H-PrP/*elav*-Gal4 perdono, in circa il 90% degli individui analizzati, tale ritmicità. Un'eccezione è rappresentata dalla popolazione D178N/129V/*elav*-Gal4 (fCJD), nella quale il 75 % dei moscerini risulta ritmico, con un andamento paragonabile a quello dei controlli. Altra osservazione che conferma ancora una volta i dati ottenuti in precedenza è il debole effetto indotto dall'espressione del prione E200K (fCJD): gli individui perdono la ritmicità della loro attività locomotoria ma in percentuale minore rispetto a quelli che presentano le altre forme di H-PrP.

I dati ottenuti dall'analisi dell'espressione delle proteine nei soli motoneuroni, ha ancora una volta confermato un fenotipo meno marcato, con all'incirca la metà degli individui H-PrP^C *wt/d42*-Gal4 e H-PrP^{Sc} P102L/*d42*-Gal4 che si comportano in maniera aritmica. Anche in questo caso, molto interessante risulta il fenotipo aritmico presente nel 96% dei moscerini che esprimono il prione D178N/129M. L'aumento dell'attività locomotoria di queste *Drosophilae* e l'assenza di periodi di riposo causano la perdita della ritmicità dei movimenti cui si

accompagna morte precoce.

E' interessante notare che tutti i risultati ottenuti negli esperimenti sembrano indicare un maggiore coinvolgimento dei motoneuroni nell'insorgenza del fenotipo patologico associato alla mutazione D178N/129M rispetto agli altri casi studiati. Tra le diverse H-PrP^{Sc} analizzate, la proteina mutata E200K sembra invece coinvolgere solo marginalmente questa popolazione di cellule neuronali.

7.3.5 Analisi delle sezioni istologiche dei cervelli

Per poter valutare se effettivamente i fenotipi patologici osservati siano imputabili, a livello cerebrale, alla comparsa di vacuolizzazione/spongiosi o, più in generale, a fenomeni neurodegenerativi, è stato messo a punto un protocollo di inclusione in paraffina degli adulti e/o delle sole teste di *Drosophila melanogaster*.

I campioni sono stati collezionati a tempi di invecchiamento diversi, in modo da poter monitorare l'eventuale comparsa di fenomeni neurodegenerativi e/o il loro aggravamento in dipendenza dell'età.

Nel complesso, quello che si evince dall'analisi delle sezioni fino ad ora effettuata è che, all'età nella quale i moscerini iniziano a manifestare le prime alterazioni del comportamento, con riduzione della velocità nei movimenti e difficoltà a risalire il tubino, a livello istologico compaiono delle lesioni dovute alla morte delle cellule neuronali. A confermare la possibile natura patologica della vacuolizzazione, si può osservare che essa è presente simmetricamente, interessando la stessa regione ai due lati del cervello del moscerino. Inoltre, dall'osservazione delle sezioni dei cervelli a tempi di invecchiamento maggiori, quando i moscerini iniziano a manifestare difficoltà nel risalire il tubino, nel girarsi quando cadono sul dorso, lentezza dei movimenti, addome ricurvo, tendenza a saltare di scatto, i danni istologici diventano più evidenti.

Le *Drosophilae* che esprimono la proteina prionica cellulare, presentano anch'esse fenomeni di degenerazione neuronale ma, a differenza di quanto avviene nel caso dei moscerini che esprimono le sue forme mutate, essa insorge a tempi maggiori di invecchiamento e, attorno ai 30 giorni di età, interessa l'intero tessuto cerebrale. Anche all'osservazione e all'analisi dei fenotipi motori, questi individui presentavano la comparsa dei fenotipi patologici ad un'età più avanzata.

I diversi prioni umani espressi nell'intero sistema nervoso dei moscerini inducono la comparsa di fenotipi che appaiono, ancora una volta, più o meno gravi e con una progressione più o meno rapida, in relazione alla mutazione presente nella sequenza aminoacidica.

Nelle *Drosophilae* H-PrP^{Sc} P102L/*elav*-Gal4 (GSS) la vacuolizzazione si presenta diffusa in tutto il tessuto a partire dai 10 giorni di età, mentre gli individui D178N/129M/*elav*-Gal4 (IFF) mostrano delle lesioni già al momento dello sfarfallamento dell'adulto. Ad un giorno di età nei moscerini appaiono delle lesioni a livello dei lobi antennali ed esse si aggravano molto rapidamente, con la comparsa, a tre giorni, di ampie zone prive di cellule nervose. A differenza di quanto osservato negli altri campioni, le lesioni appaiono localizzate e non inducono la comparsa di un fenotipo diffuso in tutto il tessuto. Nei moscerini che esprimono il prione D178N/129V (fCJD), i fenomeni neurodegenerativi interessano regioni differenti rispetto a quelle danneggiate dalla presenza di D178N/129M. Esse appaiono più diffuse, interessando non soltanto i lobi delle antenne ma anche ampie regioni del corpo cerebrale, e sembrano coinvolgere un numero minore di neuroni. Sarà quindi molto interessante analizzare in maniera approfondita le altre sezioni provenienti da entrambe queste popolazioni di moscerini, per andare a valutare nel dettaglio le differenze indotte dall'espressione delle due proteine, la cui unica differenza risiede nel residuo aminoacidico presente in corrispondenza del polimorfismo in posizione 129.

L'analisi delle sezioni di cervelli ottenute dai moscerini che esprimono H-PrP E200K (fCJD) conferma i risultati ottenuti negli esperimenti precedentemente descritti poichè sono presenti danni tissutali meno gravi rispetto agli altri campioni e limitati ai soli lobi antennali. Il rimanente tessuto cerebrale appare integro, indicando un fenotipo molto attenuato rispetto a quello indotto non soltanto dalle altre forme di H-PrP^{Sc} ma anche rispetto a quello dovuto all'espressione della proteina prionica cellulare.

Attualmente sono in corso le osservazioni delle altre sezioni istologiche ottenute.

Dai primi vetrini analizzati si possono però trarre delle indicazioni importanti: i) le sezioni dei cervelli ottenute a partire da moscerini che esprimono sia H-PrP^C *wt* che le forme mutate H-PrP^{Sc} P102L (GSS), H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD) e H-PrP^{Sc} E200K (fCJD) a tre giorni dalla nascita non presentano delle alterazioni di rilievo nel tessuto cerebrale, se paragonate ai controlli; ii) nei cervelli degli individui H-PrP^{Sc} D178N/129M si evidenziano invece delle lesioni già alla nascita, che si manifestano con la comparsa di ampie regioni prive di cellule nervose; iii) con il trascorrere dei giorni, si assiste alla comparsa di lesioni, in tempi differenti e gravità più o meno importante a seconda della proteina espressa; iv) l'aggravamento della vacuolizzazione cerebrale progredisce in dipendenza dell'età dei moscerini.

Non è ancora stato possibile stabilire se le lesioni presenti nei cervelli siano dovute a veri e propri fenomeni di spongiosi cerebrale oppure a "semplice" vacuolizzazione anche se sono in corso di approfondimento le analisi delle sezioni in modo da poter discriminare tra queste due possibilità.

Sarà infine molto interessante verificare se alle lesioni che compaiono a livello cerebrale

si accompagna, così come avviene nell'uomo, la deposizione di proteina alterata a formare fibrille e/o placche di natura amiloide, grazie agli esperimenti di immunoistochimica che sono attualmente in corso.

Nel loro complesso, i risultati ottenuti permettono di trarre alcune conclusioni in relazione a quanto presente in letteratura sul modello di *Drosophila melanogaster* per lo studio delle malattie da prioni ereditarie.

I moscerini transgenici che esprimono la proteina umana, sia *wt* che mutate, presentano alcune differenze rispetto a quanto ottenuto dallo studio di Gavin e colleghi [190]. Infatti, i moscerini che esprimono la M-PrP *wt* non presentano alcun fenotipo alterato rispetto ai controlli, a differenza da quanto avviene nel nostro caso, dove ad essere presente è la proteina prionica cellulare umana. In tutti i nostri esperimenti infatti, la presenza di H-PrP^C *wt* induce la comparsa di un fenotipo patologico, seppur in maniera attenuata rispetto a quello causato dai prioni studiati.

Confrontando i fenotipi che si manifestano in seguito all'espressione di M-PrP P101L e i diversi prioni umani, si evidenziano le stesse alterazioni del comportamento e dell'attività locomotoria, rappresentate, in entrambi i casi, da incapacità di volare, difficoltà nella deambulazione, continuo sfregamento di ali e antenne. Anche la progressione in dipendenza dell'età e la morte precoce accomunano i due modelli di *Drosophila* sviluppati per lo studio delle TSE familiari.

I due studi sembrano indicare la validità dei modelli per l'analisi delle forme mutate di PrP, mentre le due proteine *wt* sembrano presentare delle differenze sostanziali che nel caso della PrP di topo non altera in nessun modo il normale svolgimento della vita dei moscerini, mentre alterazioni, seppur di minore entità rispetto ai prioni, sono imputabili alla presenza della forma umana della proteina normale.

Per validare il nostro modello animale, si rende necessario il confronto con le patologie umane che in esso si vogliono studiare. A fornire una solida base a quanto da noi supposto, vi è l'osservazione che il modello di *Drosophila* sviluppato in questo lavoro mima i sintomi associati alle TSE umane sotto molti aspetti. Innanzitutto, i pazienti affetti da queste patologie e i moscerini H-PrP manifestano gravi disfunzioni locomotorie e morte precoce. In secondo luogo, il peggioramento dei sintomi e dei fenomeni di vacuolizzazione cerebrale si appaiono essere in dipendenza dell'età [210].

In numerosi modelli di *Drosophila melanogaster* per lo studio di malattie neurodegenerative umane, la neurodegenerazione che si manifesta è associata a fenomeni di vacuolizzazione [187].

Sarà perciò interessante andare a stabilire se, nel caso delle lesioni dovute all'espressione di H-PrP, esse siano invece dovute a vera e propria spongiosi.

Un altro aspetto che stiamo approfondendo sono le differenze esistenti, come sembrano indicare alcuni dati preliminari presentati, tra i fenotipi indotti dall'espressione delle due proteine H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF) e H-PrP^{Sc} D178N/129V (fCJD), nel tentativo di contribuire al chiarimento del ruolo del polimorfismo presente naturalmente in posizione 129 della sequenza aminoacidica della proteina prionica cellulare.

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi rientra in un progetto che, mediante studi *in vivo* su *Drosophila melanogaster*, mira ad approfondire la conoscenza della biologia della proteina prionica cellulare e della sua forma patologica, con particolare riferimento alle forme ereditarie di TSE che rappresentano una peculiarità dell'uomo.

Nel loro complesso, i risultati ottenuti in questo lavoro indicano che:

1. il modello animale di *Drosophila melanogaster* sviluppato per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili di tipo familiare umane sembra essere valido. I fenotipi osservati infatti possono essere attribuiti all'espressione delle diverse forme di H-PrP e non alla semplice presenza nel moscerino della frutta di una proteina esogena. I risultati ottenuti mostrano l'insorgenza di un diverso fenotipo indotto dalla presenza delle proteine, manifestando alterazioni più o meno gravi in dipendenza dalla mutazione espressa;
2. i fenotipi comportamentali osservati sembrano riprodurre nei moscerini le principali manifestazioni cliniche tipiche dei mammiferi, con particolare evidenza per la mutazione D178N/129M associata, nell'uomo, all'insonnia familiare fatale;
3. all'osservazione diretta del comportamento patologico sembrano corrispondere fenomeni di vacuolizzazione a livello cerebrale (spongiosi?) e pare che tali lesioni peggiorino il dipendenza dell'età dei moscerini;

4. a differenza di quanto avviene nei moscerini transgenici M-PrP [190], l'espressione della proteina prionica cellulare umana induce la comparsa di un fenotipo patologico, seppur attenuato rispetto a quello associato ai prioni. Questi risultati sembrano da un lato avvalorare le ipotesi avanzate da numerosi ricercatori secondo le quali la sovraespressione dell'PrP *wt* sarebbe in grado di causare la malattia [206, 207], e dall'altro indicare l'esistenza di alcune differenze importanti tra le proteine *wt* umana e murina [190];
5. H-PrP^{Sc} P102L (GSS) sembra anch'essa non interferire in maniera rilevante con la normale vita dei moscerini quando espressa nei motoneuroni rispetto alla sua presenza a livello dell'intero sistema nervoso, facendo ipotizzare che altre popolazioni di cellule nervose siano maggiormente coinvolte nello sviluppo dei fenotipi patologici osservati nelle *Drosophila* H-PrP^{Sc} P102L/*elav-Gal4*;
6. i moscerini che esprimono H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF) sembrano perdere la regolazione delle fasi veglia/sonno, indicando quindi *Drosophila melanogaster* come un buon modello per lo studio del ruolo svolto da questa mutazione nella patogenesi dell'insonnia familiare fatale;
7. dai primi risultati ottenuti, sembra che il polimorfismo in posizione 129 svolga anche nel modello sviluppato nel moscerino della frutta, un ruolo importante nel determinare l'insorgenza della patologia associata alla mutazione D178N. Le *Drosophila* che esprimono H-PrP^{Sc} D178N/129M (IFF) o H-PrP^{Sc} D178N/129V mostrano infatti, nelle analisi fino ad ora eseguite, notevoli differenze per quanto riguarda la gravità dei fenotipi indotti sia a livello comportamentale che nei fenomeni neurodegenerativi ad essi associati;
8. il prione E200K (fCJD) induce l'insorgenza di deboli fenotipi, a livello comportamentale, locomotorio e istopatologico, soprattutto quando esso è presente nei soli motoneuroni. I risultati ottenuti sembrano indicare un minor coinvolgimento di queste cellule nervose nello sviluppo delle alterazioni osservate e associate alla proteina H-PrP^{Sc} E200K;
9. per ognuna della H-PrP studiate, linee che esprimono livelli di proteina paragonabili mostrano un comportamento simile sia quando essa è presente nell'intero sistema nervoso sia nei soli motoneuroni;
10. in tutti i casi analizzati, sembra essere presente una correlazione tra la quantità di proteina presente nel tessuto e la gravità del fenotipo da essa prodotto. Se si para-

gona infatti la sintomatologia osservata in associazione alle diverse H-PrP, linee che esprimono livelli di proteina più alti inducono la comparsa di alterazioni più gravi e caratterizzate da una progressione più rapida.

Questi risultati forniscono delle solide basi per il prosieguo dello studio, *in vivo*, di queste patologie utilizzando come del modello animale *Drosophila melanogaster*. Essi infatti indicano nel moscerino della frutta un importante e rapido mezzo per approfondire i meccanismi che sono alla base delle encefalopatie spongiformi trasmissibili di natura ereditaria, come già avviene per numerose altre malattie neurodegenerative umane.

Bibliografia

- [1] Prusiner S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216: 136-144.
- [2] Prusiner S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13363-13383.
- [3] Griffith J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature (London)*, 215: 1043-1044.
- [4] McGowan J.P. (1922). Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.*, 5: 365-375.
- [5] Cuille J. and Chelle P.L. (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *C.R. Seances Acad. Sci.* 208: 1058-1116.
- [6] Gordon W.S. (1946). Louping ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet. Rec.*, 58: 516-520.
- [7] Peden A.H. and Ironside J.W. (2004). Pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Folio Neuropathol.*, 42 (suppl. A): 85-91.
- [8] Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCurdie L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H. and Bostock C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389: 498-501.
- [9] Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C.L., Gowland I. and Collinge J. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389: 448-450.
- [10] Collinge J. (1997). Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.*, 6(10): 1699-1705.

- [11] Lugaresi E., Medori R., Montagna P., Baruzzi A., Cortelli P., Lugaresi A., Tinuper P., Zucconi M. and Gambetti P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.*, 315: 997-1003.
- [12] Galassi R., Morreale A., Montagna P., Gambetti P. and Lugaresi E. (1992). Fatal familial insomnia: neuropsychological study of a disease with thalamic degeneration. *Cortex*, 28: 175-187.
- [13] Medori R., Tritschler H.J., LeBlanc A., Villare F., Manetto V., Chen H.Y., Xue R., Leal S., Montagna P. and Cortelli P. et al. (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with mutation at codon 178 of the prion gene. *N. Engl. J. Med.*, 336: 444-449.
- [14] Collinge J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and their molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24: 519-550.
- [15] Wadsworth J.D., Hill A.F., Beck J. and Collinge J. (2003). Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br. Med. Bull.*, 66: 241-254.
- [16] Collinge J. (2005). Molecular neurology of prion disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 76: 906-919.
- [17] Budka H., Aguzzi A., Brown P., Brucher J.M., Bugiani O., Gullotta F., Haltia M., Hauw J.J., Ironside J.W., Jellinger K., Kretschmar H.A., Lantos P.L., Masullo C., Schlote W., Tateishi J. and Weller R.O. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol.*, 5: 459-466.
- [18] Legname G., Baskakov L.V., Nguyen D., Reisner D., Choen F.E., DeArmond S.J. and Prusiner S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, 305: 673-676.
- [19] Kristiansen M., Messenger M.J., Klohn P.C., Brandner S., Wadsworth J.D., Collinge J. and Tabrizi S.J. (2005). Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase-activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 280: 38851-38861.
- [20] Mead S., Stumpf M.P., Whitfield J., Beck J.A., Poulter M., Campbell T., Uphill J., Goldstein D., Alpers M., Fisher E.M. and Collinge J. (2003). Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kuru-like epidemics. *Science*, 300: 640-643.
- [21] Collinge J. and Palmer M.S. (1997). Prion Diseases. *Oxford Univ. Press, Oxford*.

- [22] Alpers M.P. (1987). Epidemiology and clinical aspects of kuru. In: Prusiner S.B. McKinley (Eds.). Prions: novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. Academic Press, San Diego, pp. 451-465.
- [23] Collinge J., Whitfield J., McKintosh E., Beck J., Mead S., Thomas D.J. and Alpers M.P. (2006). Kuru in the 21st century - an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet*, 367: 2068-2074.
- [24] Brown P., Cathala F., Raubertas R.F., Gajdusek D.C. and Castaigne P. (1987). The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-years investigation in France and review of the world literature. *Neurology*, 37: 895-904.
- [25] Collins S.J., Sanchez-Juan P., Masters C.L. Klug G.M., van Duijn C., Poleggi A., Pocchiari M., Almonti S., Cuadrado-Corrales N., Pedro-Cuesta J., Budka H., Gelpi E., Glatzel M., Tolnay M., Hewer E., Zerr I., Heinemann U., Kretschmar H.A., Jansen G.H., Olsen E., Mitrova E., Alperovitch A., Brandel J.P., Mackenzie J., Murray K. and Will R.G. (2006). Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 129: 2278-2287.
- [26] Wadsworth J.D., Joiner S., Linehan J.M., Cooper S., Powell C., Mallison G., Buckell J., Gowland I., Asante E.A., Budka H., Brandner S. and Collinge J. (2006). Phenotypic heterogeneity in inherited prion disease (P102L) is associated with different propagation of protease-resistant wild-type and mutant prion protein. *Brain*, 129: 1557-1569.
- [27] Collinge J., Palmer M.S. and Dryden A.J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337: 1441-1442.
- [28] Palmer M.S., Dryden A.J., Hughes J.T. and Collinge J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 352: 340-342.
- [29] Windl O., Dempster M., Estibeiro J.P., Lathe R., De Silva R., Esmonde T., Will R., Springbett A., Campbell T.A., Slide K.C.L., Palmer M.S. and Collinge J. (1996). Genetic basis of Creutzfeldt-Jacob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutation and allelic variation in the *PRNP* gene. *Hum. Genet.*, 98:259-264.
- [30] Wadsworth J.D. and Collinge J. (2007). Update on human prion disease. *Bioch. Bioph. Acta*, 1772: 598-609.

- [31] Budka H. (2003). Neuropathology of prion disease. *Br. Med. Bull.*, 66: 121-130.
- [32] Bell J.E., Gentleman S.M., Ironside J.W., McCardle L., Lantos P.L., Doey L., Lowe J., Fergusson J., Luther P., McQuaid S. and Allen I.V. (1997). Prion protein immunocytochemistry - U.K. five centre consensus report. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 23: 26-35.
- [33] Lee H.S., Brown P., Cervenakova L., Garruto R.M., Alpers M.P., Gajdusek D.C. and Goldfarb L.G. (2001). Increased susceptibility to kuru of carriers of the *PRNP* 129 methionine/methionine genotype. *J. Infect. Dis.*, 183: 192-196.
- [34] Collinge J., Sidle K.C. L., Meads J., Ironside J. and Hill A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature*, 383: 685-690.
- [35] Asante E.A., Linehan J.M., Desbruslais M., Joiner S., Gowland I., Wood A., Welch J., Hill A.F., Lloyd S.E., Wadsworth J.D.F. and Collinge J. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.*, 21: 6358-6366.
- [36] Collinge J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jacob disease. *Lancet*, 354: 317-323.
- [37] Knight R. (2006). Creutzfeldt-Jacob disease: a rare cause of dementia in elderly persons. *Clin. Infect. Dis.*, 43: 340-346.
- [38] Spencer M.D., Knight R. and Will R.G. (2002). First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jacob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. *BMJ*, 324: 1479-1482.
- [39] Brown P., Preece M.A. and Will R.G. (1992). Friendly fire in medicine: hormones, homografts and Creutzfeldt-Jacob disease. *Lancet*, 340: 24-27.
- [40] Brown P., Preece M.A., Brandel J.P., Sato T., McShane L., Zerr I., Fletcher A., Will R.G., Pocchiari M., Cashman N.R., D'Aignaux J.H., Cervenakova L., Fradkin J., Schonberger L.B. and Collins S.J. (2000). Iatrogenic Creutzfeldt-Jacob disease at the millenium. *Neurology*, 55: 1075-1081.
- [41] Belay E.D. (1999). Trasmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 283-314.

- [42] Heath C.A., Barker R.A., Esmonde T.F., Harvey P., Roberts R., Trend P., Head M.W., Smith C., Bell J.E., Ironside J.W., Will R.G. and Knight R.S. (2006). Dura mater-associated Creutzfeldt-Jacob disease: experience from surveillance in the UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 77: 880-882.
- [43] Gambetti P., Kong Q., Zou W., Parchi P. and Chen S.G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br. Med. Bull.*, 66: 213-139.
- [44] Kovacs G.G., Trabattoni G., Hainfellner J.A., Ironside J.W., Knight R.S. and Budka H. (2002). Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *J. Neurol.*, 249: 1567-1582.
- [45] Riek R., Wider G., Billeter M., Hornemann S., Glockshuber R. and Wuthrich K. (1998). Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 11667-11672.
- [46] Mead S. (2006). Prion disease genetics. *Eur. J. Hum. Genet.*, 14: 273-281.
- [47] Muramoto T., DeArmond S.J., Scott M.R., Telling F.E., Cohen F.E. and Prusiner S.B. (1997). Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an α -helix. *Nat. Med.*, 3: 750-755.
- [48] Hegde R.S., Mastrianni J.A., Scott M.R., DeFea K.A., Tremblay P., Torchia M., DeArmond S.J., Prusiner S.B. and Lingappa V.R. (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, 279: 827-834.
- [49] Collinge J., Owen F., Poulter M., Leach M., Crow T.J., Rossor M.N., Hardy J., Mullan M.J., Janota I. and Lantos P.L. (1990). Prion dementia without characteristic pathology. *Lancet*, 336: 7-9.
- [50] Collinge J., Brown J., Hardy J., Mullan M.J., Rossor M.N., Baker H., Rossor M.N., Baker H., Crow T.J., Lofthouse R., Poulter M., Ridley R., Owen F., Bennet C., Dunn G., Harding A.E., Quinn N., Doshi B., Roberts G.W., Honavar M., Janota I. and Lantos P.L. (1992). Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion: II. Clinical and pathological features. *Brain*, 115: 687-710.
- [51] Kretzschmar H.A. (1999). Molecular pathogenesis of prion disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 249: Suppl. 3 III/56-III/63.

- [52] Mastrianni J.A., Nixon R., Layzer R., DeArmond S.J. and Prusiner S.B. (1997). Fatal sporadic insomnia (FSI): fatal familial insomnia (FFI) phenotype without a mutation of the prion protein (PrP) gene. *Neurology*, 48: A296.
- [53] Montagna P., Gambetti P., Cortelli P. and Lugaresi E. (2003). Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol.*, 2: 167-176.
- [54] Goldfarb L.G., Petersen R.B., Tabaton M., Brown P., Leblanc A.C., Montagna P., Cortelli P., Julien J., Vital C., Pendelbury W.W., Haltia M., Wills P.R., Hauw J.J., McKeever P.E., Monari L., Scrank B., Swergold G.D., Gambetti L., Gajdusek D.C., Lugaresi E. and Gambetti P. (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jacob disease - Disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 258: 806-808.
- [55] Young K., Jones C.K., Piccardo P., Lazzarini A., Golbe L.I., Zimmerman T.R., Dickson D.W., McLachlan D.C., Hysop P., Lennox A., Perlman S., Vinters H.V., Hodes M.E., Dlouhy S. and Ghetti B. (1995). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with the *PRNP* P102L mutation and valine at codon 129 of *PRNP* in previously unreported patients. *Neurology*, 45: 1127-1134.
- [56] Young K., Clark H.B., Piccardo P., Dlouhy S.R. and Ghetti B. (1997). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with the *PRNP* P102L mutation and valine at codon 129. *Mol. Brain Res.*, 44: 147-150.
- [57] Miyazono M., Kitamoto T., Doh-ura K., Iwaki T. and Tateishi J. (1992). Creutzfeldt-Jacob disease with codon 129 polymorphism (Valine): a comparative study of patients with codon 102 point mutation or without mutations. *Neuropathology*, 84: 349-354.
- [58] Prusiner S.B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278: 245-250.
- [59] Koradi R., Billeter M. and Wuthrich K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.*, 14: 51-55.
- [60] Hsiao K., Baker H.F., Crow T.J., Poulter M., Owen F., Terwillinger J.D., Westaway D., Ott J. and Prusiner S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant related to Gerstmann-Straussler Syndrome. *Nature*, 338: 342-345.
- [61] Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J. and Prusiner S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 83: 79-90.

- [62] Hainfellner J.A., Brantner-Inthaler S., Cervenakova L., Brown P., Kitamoto T., Tateishi J., Diringer H., Liberski P.P., Regele H., Feucht M., Mayr N., Wessely P., Summer K., Seitelberger F. and Budka H. (1995). The original Gerstmann-Straussler-Scheinker family of Austria: divergent clinicopathological phenotypes but constant PrP genotype. *Brain Path.*, 5: 201-211.
- [63] Kitamoto T., Amano N., Terao Y., Nakazato Y., Isshiki T., Mizutani T. and Tateishi J. (1993). A new inherited prion disease (PrP-P105L mutation) showing spastic paraparesis. *Ann. Neurol.*, 34: 808-813.
- [64] Yamada M., Itoh Y., Fujigasaki H., Naruse S., Kaneko K., Kitamoto T., Tateishi J., Otomo E., Hayakava M., Tanaka J., Matsushita M. and Miyatake T. (1993). A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neurology*, 43: 2723-2724.
- [65] Itoh Y., Yamada M., Hayakava M., Shozawa T., Tanaka J., Matsushita M., Kitamoto T., Tateishi J. and Otomo E. (1994). A variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease carrying codon 105 mutation with codon 129 polymorphism of the prion protein gene: a clinicopathological study. *J. Neurol. Sci.*, 127: 77-86.
- [66] Mastrianni J.A., Curtis M.T., Oberholtzer J.C., DaCosta M.M., DeArmond S., Prusiner S.B. and Garbern J.Y. (1995). Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology*, 45: 2042-2050.
- [67] Tranchant C., Sergeant N., Wattez A., Mohr M., Warter J.M. and Delacourte A. (1997). Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 63: 240-246.
- [68] Brown P., Goldfarb L.G., Kovanen J., Haltia M., Cathala F., Sulima M., Gibbs Jr. C.J. and Gajdusek D.C. (1992). Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jacob disease associated with the codon-178Asn PRNP mutation. *Ann. Neurol.*, 31: 282-285.
- [69] Brown P., Goldfarb L.G., Gibbs Jr. C.J. and Gajdusek D.C. (1991). The phenotypic expression of different mutations in transmissible familial Creutzfeldt-Jacob disease. *Eur. J. Epidemiol.*, 7: 469-476.
- [70] Petersen R.B., Tabaton M., Berg L., Schrank B., Torack R.M., Leal S., Julien J., Vital C., Deleplanque B., Pendlebury W.W., Drachmann D., Smith T.W., Martin J.J., Oda

- M., Montagna P., Ott J., Autilio-Gambetti L., Lugaresi E. and Gambetti P. (1992). Analysis of the prion protein gene in thalamic dementia. *Neurology*, 42: 1859-1863.
- [71] Medori R. and Tritschler H.J. (1993). Prion protein gene analysis in three kindreds with Fatal Familial Insomnia (FFI): codon 178 mutation and codon 129 polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 53: 822-827.
- [72] Reder A., Mednick A., Brown P., Spire J., Van Cauter E., Wollmann R., Cervenakova L., Goldfarb L.G., Garay A., Ovsiew F., Gajdusek D.C. and Roos R. (1995). Clinical and genetic studies of fatal familial insomnia. *Neurology*, 45: 1068-1075.
- [73] Parchi P., Castellani R., Cortelli P., Montagna P., Chen S.G., Petersen R.B., Manetto V., Vnencak-Jones C.L., Mclean M.J., Sheller J.R., Lugaresi E., Autilio-Gambetti L. and Gambetti P. (1995). Regional distribution of protease-resistant prion protein in fatal familial insomnia. *Ann. Neurol.*, 38: 21-29.
- [74] Kitamoto T., Ohta M., Dohura K., Hitoshi S., Terao Y. and Tateishi J. (1993). Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jacob disease or Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 191: 709-714.
- [75] Hitoshi S., Nagura H., Yamanouchi H. and Kitamoto T. (1993). Double mutations at codon 180 and codon 232 of the *PRNP* gene in an apparently sporadic case of Creutzfeldt-Jacob disease. *J. Neurol. Sci.*, 120: 208-212.
- [76] Dlouhy S.R., Hsiao K., Farlow M.R., Foroud T., Conneally P.M., Johnson P., Prusiner S.B., Hodes M.E. and Ghetti B. (1992). Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nat. Genet.*, 1: 64-67.
- [77] Hsiao K., Dlouhy S.R., Ghetti B., Farlow M.R., Cass C., Da Costa M., Conneally P.M., Hodes M.E. and Prusiner S.B. (1992). Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nat. Genet.*, 1: 68-71.
- [78] Mirra S., Young K., Gearing M., Jones R., Evatt P., Piccardo P. and Ghetti B. (1997). Coexistence of prion protein (PrP) amyloid, neurofibrillary tangles, and Lewy bodies in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with prion gene (*PRNP*) mutation F198S. *Brain Path.*, 7: 1379.
- [79] Young K., Piccardo P., Dlouhy S., Bugiani O., Tavaglioni F. and Ghetti B. (1999). The human genetic prion disease. From: Prions: Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK., pp. 139-175.

- [80] Brown P., Gibbs C.J., Rodgers-Johnson P., Asher D.M., Sulima M.P., Bacote A., Goldfarb L.G. and Gajdusek D.C. (1994). Human spongiform encephalopathy: the National Institute of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.*, 35: 513-529.
- [81] Brown P. (1992). The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Rev. Neurol.*, 145: 317-327.
- [82] Young K., Picardo P., Kish S.J., Ang L.C., Dlouhy S.R. and Ghetti B. (1998). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (GSS) with a mutation at prion protein (PrP) residue 212. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 57: 518.
- [83] Hoque M.Z., Kitamoto T., Furukawa H., Muramoto T. and Tateishi J. (1996). Mutation in the prion protein gene at codon 232 in Japanese patients with Creutzfeldt-Jacob disease: a clinicopathological, immunohistochemical and transmission study. *Acta Neuropathol.*, 92: 441-446.
- [84] DeArmond S.J. and Prusiner S.B. (1995). Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am. J. Pathol.*, 146: 785-811.
- [85] 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.
- [86] Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M.P., Kent S.B., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E. and Weissmann C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40: 735-746.
- [87] Scott M., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Waelchli M., Torchia M., Groth D., Carlson G., DeArmond S.J., Westaway D. and Prusiner S.B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, 59(5): 847-857.
- [88] Bueler H.R., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Aguet M. and Weissmann C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356: 577-582.
- [89] Bueler H.R., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M. and Weissmann C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73: 1339-1347.
- [90] Cho H.J. (1976). Is the scrapie agent a virus? *Nature*, 262: 411-412.

- [91] 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.
- [92] Kimberlin R.H. (1982). Scrapie agent: prions or virinos? *Nature*, 297: 107-108.
- [93] Weissmann C. (2005). Birth of a prion: spontaneous generation revisited. *Cell*, 122: 165-168.
- [94] Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Choen F.E. and Prusiner S.B. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of scrapie prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10962-10966.
- [95] 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.
- [96] Chesebro B. (1998). BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*, 279: 42-43.
- [97] Soto C. and Castilla J. (2004). The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat. Med.*, 10 Suppl.: S63-S67.
- [98] Lasmezas C.I., Deslys J.P., Robain O., Jaegly A., Berigue V., Peyrin J.M., Fournier J.G., Hauw J.J., Rossier J. and Dormont D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 275: 402-405.
- [99] Hill A.F., Joiner S., Linehan J., Desbruslais M., Lantos P.L. and Collinge J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 10248-10253.
- [100] 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.
- [101] Narang H. (2002). A critical review of the nature of spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp. Biol. Med.*, 227: 4-19.
- [102] Weiss S., Proske D., Neumann M., Groschup M.H., Kretzschmar H.A., Famulok M. and Winnacker E.L. (1997). RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J. Virol.*, 71: 8790-8797.

- [103] Derrington E., Gabus C., Leblanc P., Chnaidermann J., Grave L., Dormont D., Swietnicki W., Morillas M., Marck D., Nandi P. and Darlix J.L. (2002). PrPC has nucleic acid chaperoning properties similar to the nucleocapsid protein of HIV-1. *C.R. Acad. Sci. III*, 325: 17-23.
- [104] Deleault N.R., Lucassen R.W. and Supattapone S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 425: 7171-720.
- [105] Soto C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 49-60.
- [106] Miller G. (2009). Neurodegeneration. Could they all be prion diseases? *Science*, 326(5958): 1337-1339.
- [107] Prusiner S.B. and Hsiao K.K. (1994). Human prion diseases. *Ann. Neurol.*, 35: 385-395.
- [108] Pastore A. and Zagari A. (2007). A structural overview of the vertebrate prion proteins. *Prion*, 1(3): 185-197.
- [109] Rudd P.M., Endo T., Colominas C., Groth D., Wheeler S.F., Harvey D.J., Wormald M.R., Serban H., Prusiner S.B., Kobata A and Dwek R.A. (1999). Glycosylation differences between the normal and the pathogenetic prion protein isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 13044-13049.
- [110] Rudd P.M., Wormald M.R., Wing D.R., Prusiner S.B. and Dwek R.A. (2001). Prion glycoprotein: structure, dynamics and roles for the sugars. *Biochemistry*, 40: 3759-3766.
- [111] Parchi P., Capellari S., Zanusso G., Neena S., Gambetti P. and Petersen R.B. (1999). Inherited prion disease: molecular pathology and cell models. In: Prions: molecular and cellular biology, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, pp. 67-86.
- [112] Millhauser G.L. (2007). Copper and the prion protein: methods, structure, function and disease. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58: 299-320.
- [113] Wuthrich K. and Rick R. (2001). Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv. Protein Chem.*, 57: 55-82.

- [114] Campana V., Sarnataro D. and Zurzolo C. (2005). The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol.*, 15: 102-111.
- [115] Harris D.A. (2003). Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br. Med. Bull.*, 66: 71-85.
- [116] Porto-Carreiro I., Fevrier B., Paquet S., Vilette D. and Raposo G. (2005). Prion and exosomes: from PrP^C trafficking to PrP^{Sc} propagation. *Blood Cells Mol. Dis.*, 35(2): 143-148.
- [117] Peters P.J., Mironov A. Jr., Peretz D., van Donselaar E., Leclerc E., Erpel S., DeArmond S.J., Burton D.R., Williamson R.A., Vey M. and Prusiner S.B. (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol.*, 162: 703-717.
- [118] Harris D.A. (1999). Cell biological studies of prion protein. *Curr. Iss. Mol. Biol.*, 1(2): 65-76.
- [119] Fevreir B., Vilette D., Archer F., Loew D., Faigle W., Vidal M., Laude H. and Raposo G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(26): 9683-9688.
- [120] Fevrier B., Vilette D., Laude H. and Raposo G. (2005). Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic*, 6(1): 10-17.
- [121] Aguzzi A. and Heikenwalder M. (2006). Pathogenesis of prion disease: current status and future outlook. *Nat. Rev., Microbiol.*, 4(10): 765-775.
- [122] McLennan N.F., Rennison K.A., Bell J.E. and Ironside J.W. (2001). In situ hybridization analysis of PrP mRNA in human CNS tissues. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 27: 373-383.
- [123] Mange A., Milhavet O., Umlauf D., Harris D. and Lehmann S. (2002). PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. *FEBS Letters*, 514: 159-162.
- [124] Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Leplanche J.L., Lehmann S., Lounay J.M. and Kellerman O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science*, 289(5486): 1925-1928.
- [125] Colling S.B., Khana M., Collinge J. and Jeerys J.G. (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res.*, 755: 28-35.

- [126] Tobler I., Gaus S.E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P.A. and Manson J.C. (1996). Altered circadian rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 380(6575): 639-642.
- [127] Coitinho A.S., Roesler R., Martins V.R., Brentani R.R. and Izquierdo I. (2003). Cellular prion protein ablation impairs behaviour as a function of age. *Neuroreport*, 14: 1375-1379.
- [128] Criado J.R., Sanchez-Alavez M., Conti B., Giacchinno 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 reconstruction of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.*, 19 (1-2): 255-265.
- [129] Anfinsen C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181: 223-230.
- [130] Moore R.A., Taubner L.M. and Priola S.A. (2009). Prion protein misfolding and disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19(1): 14-22.
- [131] Han S. and Hill A.F. (2008). Analysis of PrP conformation using circular dichroism. *Methods Mol. Biol.*, 459: 145-159.
- [132] Govaerts C., Willie H., Prusiner S.B. and Choen F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 8342-8347
- [133] DeMarco M.L. and Daggett V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 2293-2298.
- [134] Cobb N.J. and Surewicz W.K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanism. *Biochemistry*, 48: 2574-2585.
- [135] Fornai F., Ferrucci M., Gesi M., Bandettini di Poggio A., Giorgi F.S., Biagioni F. and Paparelli A. (2006). A hypothesis on prion disorders: are infectious, inherited and sporadic causes so distinct? *Brain Res. Bull.*, 69(2): 95-100.
- [136] Ryou C. (2007). Prion and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(7): 1059-1070.
- [137] Sirkorska B. (2004). Mechanism of neuronal death in transmissible spongiform encephalopathies. *Folia Neuropathol.*, 42 Suppl. B: 89-95.

- [138] Prusiner S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252: 1515-1522.
- [139] Fevrier B. and Raposo G. (2005). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16(4): 415-421.
- [140] Fraser H. and Dickinson A.G. (1970). Pathogenesis of scrapie in mouse: the role of the spleen. *Nature*, 226: 462-463.
- [141] Kimberlin R.H. and Walker C.A. (1979). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J. Comp. Pathol.*, 89: 551-562.
- [142] Aguzzi A. and Heikenwalder M. (2005). Prions, cytokines and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity*, 22: 145-154.
- [143] Kitamoto T., Muramoto T., Mohri S., Doh-Ura K. and Tateishi J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jacob disease. *J. Virol.*, 65(11): 6292-6295.
- [144] Race R., Oldstone M. and Chesebro B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of the prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J. Virol.*, 74: 828-833.
- [145] Heikenwalder M., Julius C. and Aguzzi A. (2007). Prions and peripheral nerves: a deadly rendezvous. *J. Neurosci. Res.*, 85: 2714-2725.
- [146] Muquit M.K. and Feany M.B. (2002). Modelling neurodegenerative disease in *Drosophila*: a fruitfly approach? *Nat. Neurosci.*, 3: 237-243.
- [147] Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M. and Bier E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequence in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 11(6): 1114-1125.
- [148] Howard T.D., Paznekas W.A., Green E.D., Chiang L.C., Ma N., Ortiz de Luna R.I., Garcia Delgado C., Gonzales-Ramos M., Kline A.D. and Jabs E.W. (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat. Genet.*, 15: 36-41.
- [149] Fortini M.E. and Bonini N.M. (2000). Modelling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet.*, 16(4): 161-167.

- [150] Potter C.J., Turenchalk G.S. and Xu T. (2000). *Drosophila* in cancer research: an expanding role. *Trends Genet.*, 16: 33-39.
- [151] Flybase (1999). The Flybase database of the *Drosophila* Genome Project and community literature. The Flybase Consortium.
- [152] Sang T.K. and Jackson G.R. (2005). *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. *NeuroRx*, 2(3): 438-446.
- [153] Driscoll M. and Gerstbrein B. (2003). Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat. Genet.*, 4: 181-194.
- [154] Gloor G. and Engels W. (1990). Single-fly DNA preps for PCR. *Drosophila Inf. Newslett.*, 1: 1-2.
- [155] <http://flystocks.bio.indiana.edu>
- [156] Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [157] Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12): 5463-5467.
- [158] Zordan M.A., Benna C. and Mazzotta G. (2007). Monitoring and analyzing *Drosophila* circadian locomotor activity. *Methods Mol. Biol.*, 362: 67-81.
- [159] Fortini M.E., Skupski M.P., Boguski M.S. and Hariharan I.K. (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J. Cell. Biol.*, 150: F23-F29.
- [160] Jeibmann A. and Paulus W. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 10: 407-440.
- [161] Hassan B.A. and Bellen H.J. (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.*, 14: 1852-1865.
- [162] Dickson B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*, 298: 1959-1964.
- [163] Salzberg A. and Bellen H.J. (1996). Invertebrate versus vertebrate neurogenesis: variations on the same theme? *Dev. Genet.*, 18: 1-10.

- [164] Wu M.N. and Bellen H.J. (1997). Genetic dissection of synaptic transmission in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: 624-630.
- [165] Cauchi R.J. and Van den Heuvel M. (2006). The fly as a model for neurodegenerative diseases: is it worth the jump? *Neurodegenerative Dis.*, 3: 338-356.
- [166] Rubin G.M. and Spradling A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vector. *Science*, 218: 348-353.
- [167] Brand A.H. and Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118: 401-415.
- [168] Hannon J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894): 244-251.
- [169] Hammond S.M., Caudy A.A. and Hannon G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.*, 2: 110-119.
- [170] Ma Y., Creanga A., Lum L. and Beachy P.A. (2006). Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature*, 443: 359-363.
- [171] Marsh J.L. and Thompson L.M. (2006). *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron*, 52: 169-178.
- [172] Xie W. and Evans R.M. (2002). Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J. Biol. Chem.*, 276: 37739-37742.
- [173] Willson T.M. and Kliewer S.A. (2002). PXR, CAR and drug metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1: 259-266.
- [174] Prince D.L., Sisodia S.S. and Borcheit D.R. (1998). Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science*, 282: 1079-1083.
- [175] Paulson H.L. (1999). Protein fate on neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am. J. Hum. Genet.*, 64: 339-345.
- [176] Perutz M.F. (1999). Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 58-63.
- [177] Jackson G.R., Selecker I., Dong X., Yao X., Arnheim N., Faber P.W., MacDonald M.E. and Zipursky S.L. (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration in *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*, 21: 633-642.

- [178] Warrick J. M., Paulson H.L., Gray-Board G.L., Bui Q.T., Fischbeck K.H., Pittman R.N. and Bonini N.M. (1998). Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93: 939-949.
- [179] Wellington C.L., Ellerby L.M., Hackam A.S., Margolis R.L., Trifiro M.A., Singaraja R., McCutcheon K., Salvesen G.S., Propp S.S., Bromm M., Rowland K.J., Zhang T., Rasper D., Roy S., Thornberry N., Pinsky L., Kakizuka A., Ross C.A., Nicholson D.W., Bredesen D.E. and Hayden M.R. (1998). Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.*, 273: 9158-9167.
- [180] Kazemi-Esfarajani P. and Benzer S. (2002). Suppression of polyglutamine toxicity by a *Drosophila* homolog of myeloid leukemia factor 1. *Hum. Molec. Gen.*, 11: 2657-2672.
- [181] Steffan J.S., Bodai L., Pallos J., Poelman M., McCampbel M., Apostol B.L., Kazantsev A., Schmidt E., Zhu Y.Z. and Greenwald M. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, 413: 739-743.
- [182] Feany M.B. and Bender W.W (2000). A *Drosophila* model in Parkinson's disease. *Nature*, 404: 394-398.
- [183] Auluk P.K., Chan H.Y., Trojanowski J.Q., Lee V.M. and Bonini N.M. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, 295: 865-868.
- [184] Lu B. (2009). Recent advances in using *Drosophila* to model neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 14(8): 1008-1020.
- [185] Wu Y.R., Wang C.K., Chen C.M., Hsu Y., Lin S.J., Fung H.C., Chang K.H. and Lee-Chen G.J. (2004). Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Hum. Genet.*, 114: 236-241.
- [186] Auluk P.K. and Bonini N.M. (2002). Pharmacological prevention of Parkinson's disease in *Drosophila*. *Nature Med.*, 8: 1185-1186.
- [187] Wittmann C.W., Wszolek M.F., Shulman J.M., Salvaterra P.M., Lewis J., Hutton M. and Feany M.B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*, 293: 711-714.

- [188] Sherwood N.T., Sun Q., Xue M., Zhang B. and Zinn K. (2004). *Drosophila* Spastin regulates synaptic microtubule networks and is required for normal motor function. *PLoS Biol.*, 2: e429.
- [189] Orso G., Martinuzzi A., Rossetto M.G., Sartori E., Feany M.B. and Daga A. (2005). Disease-related phenotypes in a *Drosophila* model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine. *J. Clin. Invest.*, 115: 2968-2971.
- [190] Gavin B.A., Dolph M.J., Deleault N.R., Geoghegan J.C., Khurana V., Feany M.B., Dolph P.J. and Supattapone S. (2006). Accelerated accumulation of misfolded prion protein and spongiform degeneration in a *Drosophila* model of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *J. Neurosci.*, 26: 12408-12414.
- [191] Launghon A., Driscoll R., Wills N. and Gerstelnd R.F. (1984). Identification of two proteins encoded by the *Saccaromyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol. Cell Biol.*, 4(2): 268-275.
- [192] Launghon A. and Gerstelnd R.F. (1984). Primary structure of the *Saccaromyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol. Cell Biol.*, 4(2): 260-267.
- [193] Ptashne M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, 335(6192): 683-689.
- [194] Giniger E., Varnum S.M. and Ptashne M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, 40(4): 767-774.
- [195] Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T. and Ptashne M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332: 853-856.
- [196] Ornitz D.M., Moreadith R.W. and Leder P. (1991). Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(3): 698-702.
- [197] Scheer N. and Campos-Ortega J.A. (1999). Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev.*, 80(2): 153-8.
- [198] Ma J., Przibilla E., Hu J., Bogorad L. and Ptashne M. (1988). Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature*, 334(6183): 631-3.
- [199] Herrin D.L. and Schmidt G.W. (1988). Rapid, reversible staining of Northern blots prior to hybridization. *Biotechnology*, 6: 196-199.

- [200] Bridges C. B. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.*, 26: 60-64.
- [201] Lefevre G. Jr. (1976). A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Ed. M. Ashburner & E. Novitski, London, New York and San Francisco: Academic Press, pp. 31-66.
- [202] Lifschytz E. (1983). Sequence replication and banding organization in the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 164(1): 17-34.
- [203] <http://www.trikinetics.com>
- [204] <http://flybase.bio.indiana.edu>
- [205] <http://www.thebestgene.com>
- [206] Westaway D., DeArmond S.J., Cayetano-Canlas J., Groth D., Foster D., Yang S.L., Torchia M., Carlson G.A. and Prusiner S.B. (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*, 76(1): 117-129.
- [207] Huang S., Liang J., Zheng M., Li X., Wang P., Vanegas D., Wu D., Chakraborty B., Hays A.P., Chen K., Chen S.G., Booth S., Cohen M., Gambetti P. and Kong Q. (2007). Inducible overexpression of wild-type prion protein in the muscles leads to a primary myopathy in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(16): 6800-6805.
- [208] Shaw P.J., Cirelli C., Greenspan R.J. and Tononi G. (2000). Correlates of sleep and walking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287: 1834-1837.
- [209] Hendricks J.C., Finn S.M., Panckeri K.A., Chavkin J., Williams J.A., Sehgal A. and Pack A.I. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, 25: 129-138.
- [210] Sasaki K., Doh-ura K., Furuta A., Nakashima S., Morisada Y., Tateishi J. and Iwaki T. (2003). Neuropathological features of a case with schizophrenia and prion protein gene P102L mutation before onset of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Acta Neuropathol.*, 106: 92-96.

Articoli *in extenso*

- Bergonzini V., Calistri A., Salata C., Del Vecchio C., Sartori E., Cristina Parolin and Giorgio Palù (2009). Nef and cell signaling transduction: a possible involvement in the pathogenesis of human immunodeficiency virus-associated dementia. *J. Neurovirol.*, 20: 1-11. (I.F. 1.858)
- Sartori E., Salata C., Calistri A., Palù G. and Parolin C. (2009). News and views from the 8th annual meeting of the Italian Society of Virology. *J Cell Physiol.*; 219(3):797-799. (I.F. 4.313)
- Salata C., Curtarello M., Calistri A., Sartori E., Sette P., de Bernard M., Parolin M.C., Palù G. (2009). vOX2 glycoprotein of Human Herpesvirus 8 modulates human primary macrophages activity. *J. Cell. Physiol.*, 219(3):698-706. (I.F. 4.313)

Comunicazioni a Congressi

- Sartori E., Sandrelli F., Licitra F., Calistri A., Cancellotti E., Lanza C., Parolin C., Altavilla G., Costa R. and Palù G. Development of a *Drosophila melanogaster* model for the study of human inherited prion diseases. In: 9th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2009)
- Carli I, Tibaldi E, Sartori E., Calistri A, Del Vecchio C, Palù G, Brunati A and C. Parolin. Effect of the expression of influenza A virus NS1 protein in human and avian

- cell lines. In: 9th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2009)
- Toffoletto M., Salata C., Sartori E., Parolin C., Del Vecchio C., Calistri A. and Palù G. Strategies for the optimization of influenza virus vaccine production. In: 9th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2009)
 - Sartori E., Licitra F., Calistri A., Cancellotti E., Altavilla G., Lanza C., Costa R., Sandrelli F., Parolin M.C. and Palù G. Development of a *Drosophila melanogaster* model for the study of human inherited prion diseases. In: III International Symposium on The New Prion Biology: basic science, diagnosis and therapy. (Venezia, aprile 2009).
 - Comin A., Calistri A., Sette P., Salata C., Sartori E., Parolin C., Campadelli-Fiume G. and Palù G. Role of late domains in herpes simplex virus type 1's tegument proteins. In: 8th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2008)
 - Sette P., Calistri A., Gianni T., Westra E., Salata C., Sartori E., Palù G. , Campadelli-Fiume G., Parolin C. Role of MVBs and ubiquitin in HSV-1 life cycle. In: 8th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2008)
 - Sartori E., Carli I., Asnicar S., Calistri A., Palù G. and Parolin M.C.. Identification of new cellular partners of the avian influenza virus NS1 protein. In: 8th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2008)
 - Salata C., Curtarello M., Calistri A., Sartori E., Parolin C. and Palù G. vOX2 glycoprotein of Human Herpesvirus 8 modulates human primary macrophages activity In: 8th National Congress of the Italian Society of Virology. (Orvieto, settembre 2008)
 - Salata C., Curtarello M., Calistri A., Sartori E., Parolin C. and Palù G. vOX2 glycoprotein of Human Herpesvirus 8 affects human macrophage activity. In: 33rd International Herpesviruses Workshop (Estoril, luglio/agosto 2008)
 - Cancellotti E., Plinston C., Hennion R., Sartori E., Calistri A., Palù G., Manson J.C. and Barron R.M. Microglia cells are the replication site for some prion strains and can control amyloid plaques toxicity in transmissible spongiform encephalopathies. 7th National Congress of the Italian Society of Virology (Orvieto, giugno 2007)

Comunicazioni orali su invito

- Convegno “Malattie Neurodegenerative e Virus”. “*Drosophila melanogaster* come modello per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili.” 14-15 settembre 2009, Villa Contarini, Piazzola sul Brenta (PD)
- Convegno di presentazione dell’attività di ricerca dei dottorandi del XII ciclo della Macroarea 4 (Medicina e Chirurgia). “Generazione di un modello di *Drosophila melanogaster* per lo studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili ereditarie”. 21 ottobre 2008, Archivio Antico – Palazzo del Bo, Padova.

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Giorgio Palù per avermi dato la possibilità di sviluppare questa ricerca presso il Dipartimento di Istologia, Micorbiologia e Biotecnologie Mediche e, soprattutto, per aver sempre fortemente creduto in questo progetto.

Un grazie anche alla Prof.ssa Parolin per il costante supporto anche nei momenti di difficoltà e per aver accettato di avventurarsi nel “meraviglioso” mondo delle *Drosophilae* e ai miei due “angeli custodi” Dott.ssa Calistri e Dott. Salata, sui quali ho sempre potuto contare.

Un ringraziamento al Prof. Costa e alla Dott.ssa Sandrelli del Dipartimento di Biologia, per il contributo allo sviluppo del progetto e i preziosi consigli; al Prof. Altavilla e al Sig. Cristiano Lanza, del Dipartimento di Scienze Medico Diagnostiche e Terapie Speciali per il lavoro svolto, la disponibilità e i suggerimenti.

Infine volevo ringraziare il mio “correttore” di bozze privato nonché sherpa, il Dott. Matteo Nadai, per l’aiuto costante.