



Fondata nel 1562

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Scienze Fisiologiche Biochimiche e Cellulari

Scuola di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Biotecnologie Molecolari e Cellulari

XXII Ciclo

Applicazione di Nanoparticelle Magnetiche di Fe_3O_4 per l'isolamento ed il rilevamento di proteina prionica patologica ovina (PrP^{Sc})

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Bruno Masala

Relatore:

Prof. Sergio Uzzau

Correlatore:

Dr. Ciriaco Ligios

Tesi di Dottorato di:

Dr.ssa Maria Giovanna Tilocca

Anno Accademico 2008/2009

*Scientist should be very reticent to accept new ideas.
99% of new ideas are wrong.*

Stanley B. Prusiner

ABSTRACT

Application of magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) for the isolation and detection of scrapie-affected brain derived pathological prion protein (PrP^{Sc}).

Early diagnosis in Spongiform Transmissible Encephalopathies (TSE) such scrapie in sheep and bovine spongiform encephalopathy in cow is critical in preventing the irreversible neuronal damage that leads to fatal *exitus*. All approved methods of diagnosis for TSE rely exclusively on detection of pathological prion protein (PrP^{Sc}), which is present in the brain of the clinically affected animals.

It is well known that metal nanoparticles could serve as potential support structure for biological material including proteins, peptides, enzymes and DNA. A range of different nanoparticles enhance the rate of fibrillation of amyloidogenic protein and adsorb on the surface already misfolded protein.

Here we describe that scrapie-affected sheep brain derived PrP^{Sc} is absorbed on the surface of magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) and completely removed from the aqueous solution, where it is diluted, by using a magnetic field. PrP^{Sc} absorbed on the nanoparticles surface was demonstrated by immunobiological assays.

These magnetic nanoparticles may, by modifying their surface with functional groups, be useful for early *in vivo* detection of PrP^{Sc} in body fluids.

INDICE

	Pag.
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Le malattie prioniche.....	1
1.1.1. Le TSE nell'uomo: cenni storici.....	2
1.1.2. Encefalopatia spongiforme bovina (BSE).....	5
1.1.3. Scrapie.....	5
1.1.4. Altre TSE.....	7
1.2. L'agente Eziologico: il Prione.....	7
1.3. Eziologia e basi genetiche delle TSE.....	15
1.4. Patogenesi.....	18
1.5. Infettività prionica.....	22
1.5.1. Liquidi biologici.....	22
1.5.2. Contaminazione ambientale.....	24
1.6. Stato dell'arte sulla diagnosi delle TSE.....	27
1.6.1. Tecniche convenzionali.....	27
1.6.2. Test rapidi <i>post mortem</i> per la diagnosi delle TSE.....	29
1.6.3. Validazione Europee.....	30
1.7. Le Nanotecnologie.....	33
1.7.1. Caratteristiche e proprietà dei nanomateriali.....	33
1.7.2. Potenziali applicazioni delle nanoparticelle magnetiche.....	39
1.7.3. Interazioni proteine-nanoparticelle: effetti sulla conformazione delle proteine leganti nanoparticelle.....	41
1.7.4. Il potenziale ruolo delle nanoparticelle magnetiche sulla fibrillazione delle proteine.....	43
2. SCOPO DEL LAVORO.....	45

3. MATERIALI E METODI.....	46
3.1. Sintesi e modificazione della superficie delle nanoparticelle magnetiche (NPM)..	46
3.2. Preparazione del campione biologico.....	47
3.3. Incubazione dei campioni con le NPM.....	49
3.4. Analisi e rilevazione della PrP ^{Sc}	51
4. RISULTATI.....	57
4.1. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione.....	57
4.2. Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR) e Diffrazione di Raggi X (XRD).....	58
4.3. Analisi delle proprietà magnetiche.....	59
4.4. Rilevazione della PrP ^{Sc} adsorbita sulle nanoparticelle magnetiche (NPM).....	60
4.4.1. Verifica della presenza di PrP ^{Sc} adsorbita sulle NPM mediante test ELISA Biorad.....	60
4.4.2. Verifica della presenza di PrP ^{Sc} adsorbita sulle NPM mediante test ELISA Idexx.....	61
4.4.3. Verifica della presenza di PrP ^{Sc} adsorbita sulle NPM in differenti isolati di scrapie.....	62
4.4.4. Valutazione dell'influenza di differenti tempi e temperature d'incubazione sulla cattura di PrP ^{Sc} mediante NPM.....	64
4.5. Limiti della rilevazione della PrP ^{Sc} legata alle NPM.....	65
4.6. Valutazione della capacità di recupero della PrP ^{Sc} mediante NPM.....	68
4.7. Modificazione della superficie delle NPM, mediante funzionalizzazione con ioni bivalenti Cu ²⁺ e Mn ²⁺ e analisi mediante ELISA e WB.....	70
4.8. Rilevazione della PrP ^{Sc} adsorbita sulle NPM in frazioni di latte sano mediante test ELISA BioRad.....	73

5. DISCUSSIONE.....	75
6. CONCLUSIONI.....	80
7. BIBLIOGRAFIA.....	81
 RINGRAZIAMENTI.....	 98

1. INTRODUZIONE

1.1. Le malattie prioniche

Le malattie prioniche, chiamate anche Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE) sono un gruppo di patologie neurodegenerative fatali, che interessano l'uomo e gli animali (Collinge, 2001). Questa condizione è strettamente associata alla deposizione dell'isoforma patologica (PrP^{Sc}) di una glicoproteina (PrP^C) a livello del sistema nervoso centrale (CNS) (Prusiner, 1998), causa di spongiosi del neuropilo e vacuolizzazione neuronale e alla base della formazione delle tipiche lesioni spongiformi. Tutte le TSE sono caratterizzate da un lungo periodo d'incubazione ed un decorso infausto (Fraser, 1976; Wells e McGill, 1992).

Le TSE infettanti per l'uomo conosciute fino ad oggi, comprendono la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) (Creutzfeld, 1920; Jacob, 1921), la Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) (Gerstmann, *et al.*, 1936), l'Insonnia Fatale Familiare (FFI) (Lugaresi *et al.*, 1986), il Kuru (Gajdusek e Zigas, 1957) e la nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Will *et al.*, 1996).

In ambito animale sono note la scrapie nelle pecore e nelle capre (Mc Gowan, 1922), l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) nei bovini (Wells *et al.*, 1987), l'encefalopatia spongiforme felina (FSE) (Pearson, 1992) del gatto e felini selvatici, la chronic wasting disease (CWD), la malattia da deperimento cronico nei cervi (Miller *et al.*, 2000) e l'encefalopatia trasmissibile del visone (TME) (Burger e Hartsough, 1965; Hartsough e Burger, 1965).

PATOLOGIA		SPECIE	EZIOLOGIA
Scrapie		Piccoli ruminanti	Acquisita (ingestione). Trasmissione orizzontale. Trasmissione verticale poco chiara.
Encefalopatia bovina (BSE)	spongiforme	Bovino	Ingestione alimenti contaminati
Encefalopatia bovina amiloidotica (BASE)	spongiforme	Bovino	Fonte sconosciuta
Chronic wasting disease		Cervidi	Acquisita (ingestione). Trasmissione orizzontale. Trasmissione verticale poco chiara.
Encefalopatia spongiforme felina (FSE)		Felini	Ingestione alimenti contaminati dall'agente della BSE
Encefalopatia spongiforme del visone		Visone	Acquisita (ingestione). Fonte sconosciuta.
Encefalopatia spongiforme degli ungulati esotici		Kudu, Nyala, Orice	Ingestione alimenti contaminati dall'agente BSE
Kuru		Uomo	Ingestione di alimenti contaminati.
Sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)		Uomo	Mutazione del gene <i>PRNP</i>
Insonnia fatale familiare		Uomo	Mutazione del gene <i>PRNP</i>
Insonnia sporadica fatale		Uomo	Fonte sconosciuta
Nuova variante malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD)		Uomo	Ingestione alimenti contaminati dall'agente BSE. Trasfusione con sangue infetto
Malattia di Creutzfeldt sporadica		Uomo	Sconosciuta. Mutazione somatica o conversione spontanea di PrP ^C in PrP ^{Sc}
Malattia di Creutzfeldt familiare		Uomo	Mutazione del gene <i>PRNP</i>
Malattia di Creutzfeldt iatrogena		Uomo	Esposizione accidentale a materiale infetto

Tabella 1.1: Principali encefalopatie spongiformi dell'uomo e degli animali (Di Guardo, 2002 modificato).

1.1.1. Le TSE nell'uomo: cenni storici

Già negli anni venti Creutzfeld (1920) e Jacob (1921) descrissero, indipendentemente l'uno dall'altro, quattro casi umani di una forma di encefalopatia rara, progressiva e fatale a decorso subacuto, caratterizzata istologicamente da degenerazione spongiforme, astrocitosi e astrogliosi. Successivamente la malattia, fu denominata Creutzfeldt Jacob Disease (CJD) in riferimento ai due neurologi.

Qualche anno dopo (1928), Gerstmann riportò dei casi che descrisse in seguito (Gerstmann *et al.*, 1936) con una forma di encefalopatia degenerativa familiare progressiva a decorso cronico, caratterizzata da una degenerazione spongiforme, gliosi e formazione di placche di sostanza amiloide, chiamata quindi, sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS).

L'ipotesi che la CJD potesse essere trasmissibile, cominciò a prendere piede solamente a partire dagli anni '60, sia in seguito a similitudini trovate con la scrapie, che dopo la scoperta del kuru, parola che nella lingua locale significa "brivido". Quest'ultima è una neuropatia degenerativa infettiva ad esito fatale, identificata in una popolazione della Papua Nuova Guinea (popolazione Fore) che praticava il cannibalismo rituale. Durante il rito funebre donne e bambini, cui era affidato il compito di preparare il cadavere, erano soliti cibarsi dell'encefalo. Questa era la ragione per cui i bambini e le donne erano maggiormente colpiti dal kuru (Gajdusek e Zigas, 1957). Fu William Hadlow, veterinario americano da tempo impegnato nello studio della scrapie, che nel 1959 rese nota la rassomiglianza isto-patologica tra la scrapie ed il kuru (Hadlow, 1959). Fu così abbandonata l'idea che si trattava di una malattia genetica, e si avviarono una serie di esperimenti per trasmettere il kuru agli animali. Nel 1966 la malattia fu trasmessa con successo allo scimpanzè (Gajdusek *et al.*, 1966). Negli stessi anni fu dimostrato che anche la CJD era trasmissibile allo scimpanzè, stabilendo la natura infettiva di questa malattia (Gibbs *et al.*, 1968).

Nella trasmissione di ciascuna patologia fu individuata una rimarcabile specificità di specie. Nel 1966 Pattison, in seguito ad inoculo di due differenti isolati di scrapie provenienti da capra in tre differenti specie (pecora, capra e topo), correlava la suscettibilità della malattia con la durata del periodo di incubazione tra le specie, dopo il primo passaggio di inoculo (Pattison, 1966). Questo effetto fu evidente anche tra specie affini come topo e criceto (Scott *et al.*, 1989).

Nel 1996, in seguito alla sconvolgente scoperta della trasmissione della BSE all'uomo dopo consumo di alimenti bovini infetti, venne identificata una nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Will *et al.*, 1996) in dieci pazienti nel Regno Unito ed in uno in Francia. Questi episodi si sono verificati in persone sorprendentemente giovani (età media 28 anni) e la durata della malattia era di circa 14 mesi, caratteristiche differenti rispetto a quelle dei casi sporadici di CJD, che, invece, si manifesta in pazienti d'età compresa fra 65 e 70 anni e con un decorso medio di 4-6 mesi. Inoltre, i sintomi ed i segni clinici erano molto differenti da quelli della forma classica. Le prime manifestazioni erano nella maggior parte dei casi rappresentate da quadri di tipo psichiatrico, secondo quanto riportato da Zeidler su 14 casi britannici (apatia, depressione, ansia associata a labilità emotiva, delusione, spesso associata ad allucinazioni, e talvolta insonnia) (Zeidler *et al.*, 1997). Evidenze biochimiche e istopatologiche confermano che il ceppo del prione appartenente alla nuova variante CJD, ha caratteristiche simili a quello proveniente dalla BSE confermando quindi la sua provenienza dalla specie bovina (Aguzzi e Weissman, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997).

In seguito emerse la possibilità concreta che la CJD potesse essere trasmessa per via iatrogena all'uomo. Centinaia di pazienti furono, infatti, infettati dopo interventi chirurgici di trapianto di organo, terapie ormonali e vaccinazioni (Will *et al.*, 2004). Inoltre, ulteriori studi riportano casi di trasmissione di CJD per via ematica dopo trasfusione (Peden *et al.*, 2004; Llewelyn *et al.*, 2004; Hewitt *et al.*, 2006). La trasmissione di prioni attraverso il sangue è stata ben documentata su modelli sperimentali di pecora (Hunter *et al.*, 2002).

L'Insonnia Fatale Familiare (FFI), invece, insorge nell'uomo in seguito a mutazioni del gene che codifica per la proteina prionica (*PRNP*). Fu scoperta nel 1974 dall'italiano Ignazio Roiter che studiava il caso di due donne appartenenti alla stessa famiglia che morirono apparentemente di insonnia; il primo caso, tuttavia, venne riportato nel 1984 da Lugaresi *et al.*, (1986). Alla FFI sono associati disturbi del sonno e di autarchia. I sintomi compaiono

insidiosamente a metà della vita adulta e progrediscono inesorabilmente fino al decesso. Il quadro isto-patologico è dato da spongiosi del neuropilo e vacuolizzazione neuronale nel tessuto nervoso centrale (SNC), con deposizione di placche di tipo amiloideo (Harris, 1999). Le malattie prioniche condividono importanti proprietà cliniche, neuropatologiche e biologiche con altre patologie amiloidee, come l'Alzheimer ed il Parkinson, ma la loro natura trasmissibile le distingue dagli altri disordini neurodegenerativi, i quali insorgono sia sporadicamente sia in seguito a mutazioni geniche (Price *et al.*, 1993).

1.1.2. Encefalopatia spongiforme bovina (BSE)

L'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) è una malattia neurodegenerativa ad esito fatale con un lungo periodo di incubazione (mediamente 5 anni), emersa nel decennio tra il 1980 e il 1990 nel Regno Unito (Wells *et al.*, 1987), coinvolse diversi paesi europei, diffondendosi successivamente anche in Canada, Stati Uniti e Giappone, con gravissime ripercussioni di natura economica, politica e sociale. Durante questo periodo, infatti, nel Regno Unito centinaia di migliaia di bovini giovani furono infettati e successivamente abbattuti, in seguito alla somministrazione di farine animali contaminate causando notevoli danni economici (Ryou, 2007).

1.1.3. Scrapie

Nel 1732 in Gran Bretagna è stata individuata una encefalopatia endemica degenerativa nella pecora (Mc Gowan, 1922) denominata scrapie. Essa era caratterizzata da alterazioni isto-patologiche simili a quelle delle altre TSE. Nel 1936 fu dimostrato che si trattava di una malattia trasmissibile in seguito a studi condotti sulle capre mediante inoculo intraoculare (Cuillè e Chelle, 1939). I sintomi principali sono variazioni comportamentali, atassia, tremori, scialorrea e prurito. Da alcuni studi è emerso che l'età in cui la malattia si manifesta è

prevalentemente tra i 2 ed i 5 anni (Hoinville, 1996). Nella pecora la PrP^{Sc} è rilevabile non solo nel SNC ma anche nel sistema linforeticolare (SLR) ed in numerosi altri tessuti extraneuronali, fra cui il tessuto muscolare (Andreoletti *et al.*, 2004), la placenta (Tuo *et al.*, 2001; Andreoletti *et al.*, 2002), le ghiandole salivari (Vascellari *et al.*, 2007), la mammella (Ligios *et al.*, 2005) ed il rene (Ligios *et al.*, 2007). La scrapie è diffusa in tutto il mondo eccetto alcuni paesi come Australia e Nuova Zelanda che sono ritenuti ufficialmente scrapie-free. Il primo caso in Italia è stato segnalato nel 1976 nella regione Piemonte (Cravero *et al.*, 1977), in seguito, tale patologia è stata descritta sporadicamente in diverse regioni, Sardegna inclusa (Ligios *et al.*, 1996).

A partire dal 1995, i piani di sorveglianza passiva ed attiva hanno permesso l'individuazione di 194 focolai di scrapie in Sardegna. La sorveglianza attiva è stata applicata attraverso il controllo dei soggetti morti in stalla e degli ovini regolarmente macellati a partire dal gennaio 2002.

La sorveglianza attiva ha permesso di controllare un numero di capi particolarmente elevato nella categoria dei "regolarmente macellati", al contrario, piuttosto basso in quella dei "morti in stalla", categoria considerata a rischio, poiché nella stessa è più probabile trovare ovini affetti da scrapie. In sintesi, dei 194 focolai, 95 sono stati diagnosticati grazie alla sorveglianza passiva, mentre 99 sono stati identificati grazie alla sorveglianza attiva, effettuata sui soggetti morti in stalla (70 focolai) e su capi regolarmente macellati (29 focolai) (Demontis, 2009).

1.1.4. Altre TSE

Altre fonti di prioni sono rappresentate dalla chronic wasting disease (CWD), malattia da deperimento cronico dei cervi e alci del Nord America (Belay *et al.*, 2004). L'eziologia e la modalità di trasmissione non sono state del tutto chiarite, tuttavia è noto che la CWD ha un'elevata efficienza nella trasmissione laterale tramite contatto o scambio di fluidi organici, mai osservata nelle altre malattie prioniche. E' stata anche ipotizzata una trasmissione da madre a figlio o dall'ambiente (Ryou, 2007).

La contaminazione degli alimenti fu causa di altre TSE, come l'encefalopatia spongiforme felina (FSE) che è stata identificata in primo luogo nel gatto, sebbene sia stata osservata anche in altre specie di felidi selvatici quali il puma, il ghepardo e la tigre. Il primo caso di FSE è stato riportato in Inghilterra nel 1990 e da allora sono stati segnalati diversi casi tutti attribuibili al consumo di alimenti contenenti scarti di macellazione di ruminanti affetti da BSE. Come tutte le TSE ha un lungo periodo di incubazione e un decorso progressivo e fatale. L'agente eziologico della FSE è plausibilmente il medesimo riscontrato nell'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE): da studi sperimentali si è visto, infatti, che inoculando materiale cerebrale affetto da FSE, questi sviluppavano sintomi nervosi e presentavano profilo istolesivo e glicotipo analogo a quello dell'agente della BSE (Iulini *et al.*, 2006).

1.2. L'agente eziologico: il Prione

Le insolite proprietà dell'agente infettivo iniziarono ad attirare l'attenzione dei ricercatori già dai primi anni 60, ma fu Stanley Prusiner nei primi anni 80, in seguito a studi pionieristici sulla natura dell'agente infettivo (Griffith, 1967; Alper *et al.*, 1967) a formulare la rivoluzionaria teoria della "*prion hypothesis*" (Prusiner, 1982). Secondo tale teoria l'agente infettivo, responsabile delle TSE nell'uomo e negli animali, era costituito esclusivamente da un singolo tipo di molecola proteica, denominata prione o PrP^{Sc} non conteneva alcun tipo di

acido nucleico (Harris, 1999). A differenza di altri agenti infettivi i prioni possiedono un'inusuale resistenza al trattamento con molti agenti chimici e fisici, comunemente usati per inattivare altri patogeni convenzionali come batteri funghi e virus (Prusiner, 1982). Alcuni esperimenti dimostrarono che omogenati di tessuto infetto, anche se trattati con agenti normalmente dannosi per gli acidi nucleici come radiazioni, UV, calore e nucleasi, mantennero la loro infettività, dimostrando la presenza dell'agente prionico (Alper *et al.*, 1967; Gibbs *et al.*, 1978; Prusiner, 1982). Lavori successivi resero evidente che la PrP^{Sc}, altro non era, che la forma alterata di una glicoproteina cellulare di membrana chiamata PrP^C (Horwich e Weissman, 1997; Prusiner, 1998; Prusiner *et al.*, 1998). Tale cambiamento conformazionale, con l'aumentato contenuto in foglietti β , conferiva alla PrP^{Sc} una particolare resistenza ai suddetti agenti chimici e fisici, una insolubilità relativa ai detergenti ed una parziale resistenza alla degradazione della proteinasi K (pK). Quest'ultima proprietà è stata utilizzata come marker diagnostico della malattia. Infatti, in condizioni definite la pK digerisce completamente la PrP^C, mentre la PrP^{Sc} dopo questo trattamento subisce un taglio approssimativamente di 70 residui nella porzione N-terminale lasciando un core pK-resistente di 27-30 kDa.

La proteina prionica cellulare, designata come PrP^C, è codificata dal gene *PRNP* (Hunter *et al.*, 1994), i loci cromosomici sono stati determinati in alcune specie (Iannuzzi *et al.*, 1998).

La presenza del gene ortologo della PrP^C in un certo numero di specie animali e nell'uomo, fa pensare che l'esistenza di tale gene sia antecedente alla speciazione dei mammiferi, in quanto la sua sequenza presenta un elevato grado di omologia (90%). Confrontando, invece, la sequenza aminoacidica delle PrP nell'ambito dei diversi primati, l'omologia era più elevata (maggiore del 95%) (Schatzl *et al.*, 1995). Quando la PrP umana era confrontata con quella dei marsupiali, l'omologia era invece relativamente più bassa (70%) (Windl *et al.*, 1995).

Infine, il grado di omologia era molto basso (~30%) quando il confronto veniva fatto con il pollo (Harris *et al.*, 1989; Gabriel *et al.*, 1992).

In tutte le specie studiate, l'*open reading frame* (ORF) della PrP, codifica per una proteina di ~250 aminoacidi. Il gene umano della PrP ha un singolo ORF, codificante una proteina composta da 253 residui aminoacidici, mentre la PrP^C matura è di 209 aminoacidi e presenta legami di-solfidici e residui glicosidici (Prusiner, 1998). Anche in altre specie animali, il gene *PRNP* è ampiamente espresso, con le concentrazioni più alte nelle cellule neuronali del cervello, anche se non limitate a quest'unica localizzazione (Chesebro *et al.*, 1985; Manson *et al.*, 1994; Oesch *et al.*, 1985).

La PrP^C matura è una sialoglicoproteina di 209 aminoacidi, normalmente attaccata alla superficie cellulare mediante ancoraggio al glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI).

La sequenza aminoacidica primaria e lo stato di modificazione in entrambe le isoforme della PrP^C e PrP^{Sc} sono identiche, tranne per la loro conformazione tridimensionale la quale si differenzia per le proprietà biochimiche e biofisiche in entrambe le isoforme (Figura 1.1).

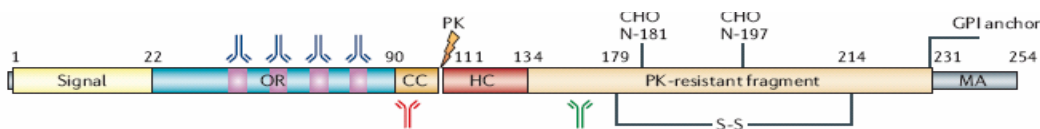


Figura 1.1: Rappresentazione della struttura primaria della proteina prionica cellulare con le modificazioni post-trascrizionali.

Nell'estremità N terminale è presente un peptide secretorio segnale (giallo), seguono le sequenze ripetute (octapeptide – blu), il sito di clivaggio della proteasi K (arancione), il core idrofobico (rosso), il frammento resistente al clivaggio della proteasi K (rosa). I numeri descrivono la posizione degli aminoacidi, S-S indica la presenza di ponti disolfuro, e nella porzione C terminale, GPI-MA il sito di ancoraggio alla membrana (Aguzzi e Heikenwalder, 2006).

La struttura secondaria della PrP^C, proposta da studi di risonanza magnetica nucleare (NMR), presenta 3 α -eliche e 2 β -sheets molto corti, con un dominio ripiegato (folded) tra i residui 90–231, ed una regione N-terminale flessibile che incorpora una serie di unità di octapeptidi ripetuti (James *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997).

Studi di spettrometria ad infrarossi (FTIR) e dicroismo circolare (DC) suggeriscono che la PrP è composta per il 40% di α -eliche e 3 % β -sheet, mentre la PrP^{Sc} è composta per il 30% di α -eliche e 40 % β -sheets, (Caughey *et al.*, 1991; Maissen *et al.*, 2001). L'incremento del contenuto in β -sheet, nella PrP^{Sc}, è dovuto alla transizione conformazionale della regione idrofobica (residui aminoacidici ~90-140) e ad una parte delle eliche nelle molecole di PrP^C (Figura 1.2).

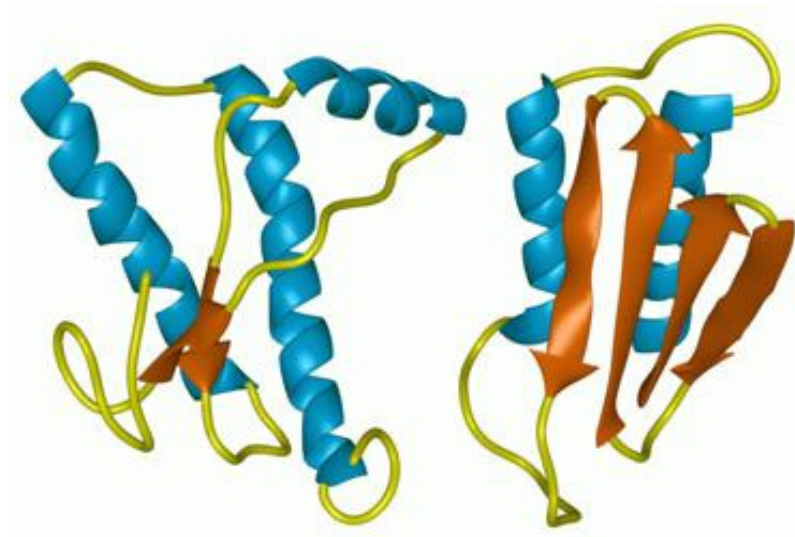


Figura 1.2: Modello della struttura terziaria della proteina prionica cellulare.

PrP^C con α -eliche (in blu), e la sua isoforma patologica con α -eliche e β -foglietti (arancione). (<http://www.ehu.sbs.soton.ac.uk>).

Questi eventi molecolari danno origine ad una molecola idrofobica e conferiscono resistenza alla digestione con proteinasi K (pK) (McKinley *et al.*, 1991). La regione della PrP^{Sc} alterata nella sua conformazione sembra essere formata da tratti ripetuti di corti β -sheet e aggregati che generano polimeri di PrP^{Sc}, i quali possono accrescersi ulteriormente in strutture altamente organizzate che prendono il nome di fibre o fibrille amiloidi (Govaerts *et al.*, 2004). Non è ancora chiaro se questi aggregati siano la causa del danno cellulare o un prodotto derivato nel corso del processo patologico della malattia.

Il meccanismo mediante il quale la PrP^C si trasforma nella PrP^{Sc} ed acquista le sue proprietà infettive non è ancora ben chiaro. Il cambiamento conformazionale avviene grazie ad un

processo post-traduzionale a livello del dominio caveolare (CLD) vicino alla superficie cellulare (Gorodinsky e Harris, 1995; Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). Tale meccanismo si basa su due teorie, quella del “refolding” (Figura 1.3 a) il cui modello propone che vi sia un’interazione tra la PrP^{Sc} esogena, che funziona da template per la PrP^C cellulare che è indotta a trasformarsi in ulteriore PrP^{Sc}. Invece, secondo nel modello del “seeding” (Figura 1.3 b) la PrP^C e la PrP^{Sc} sono in equilibrio costante fra di loro (Aguzzi *et al.*, 2001).

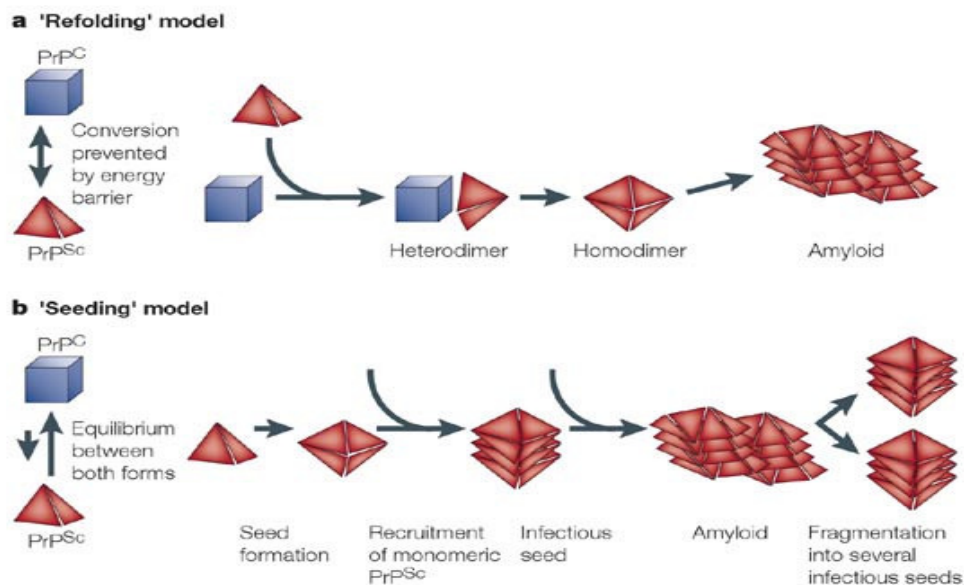


Figura 1.3: Formazione del prione infettivo.

Ci sono due modelli proposti su cui si basa la conversione della PrP^C in PrP^{Sc}. Quella del “refolding” il cui modello propone che vi sia un’interazione tra la PrP^{Sc} esogena e la PrP^C (a) ed il modello del “seeding” in cui la PrP^C e la PrP^{Sc} sono in equilibrio fra di loro (b) (Aguzzi *et al.*, 2001).

L’interazione di PrP^C con PrP^{Sc} è ottimale, quando le sequenze delle due isoforme sono le stesse come nel caso di trasmissione di prioni omologhi nell’ambito della stessa specie (Prusiner *et al.*, 1990). La trasmissione eterologa fra specie diverse richiede il “salto della barriera di specie” da parte del prione, laddove le sequenze delle due isoforme sono diverse (Scott *et al.*, 1997).

A livello cellulare, la PrP è sintetizzata nel citoplasma (Harris *et al.*, 2004) con una sequenza segnale nella porzione amino (N)-terminale di 23 aminoacidi, che ha la funzione di veicolare la catena polipeptidica neosintetizzata verso il reticolo endoplasmico (ER). Qui la PrP^C è sottoposta ad ulteriori processamenti e modificazioni post-traduzionali. Essi includono l'aggiunta di N-glicani (glicosilazione) del tipo ricchi di mannosio, in posizione Asn181 e Asn197 nella PrP umana, quindi, Asn180 e Asn196 nel criceto; la formazione di un singolo legame disolfuro, e l'attacco della porzione del GPI in seguito al taglio di peptide carbossi-terminale con una sequenza segnale idrofobica (C-ter 231-254) (Ermonval *et al.*, 2003).

La PrP è poi trasportata attraverso l'apparato del Golgi, dove, ad un ulteriore processamento dell'oligosaccaride N-terminale, consegue una glicosilazione modificata che include tipi di zuccheri complessi.

In seguito a tali modificazioni, la PrP è trasportata sulla superficie cellulare dove è ancorata a livello del GPI, in un microdominio resistente ai detergenti (Vey *et al.*, 1996). Da questo punto la PrP può essere liberata in seguito al taglio dell'ancoraggio del GPI sulla membrana, oppure internalizzata per endocitosi ciclica tra il compartimento endocitico e la superficie cellulare (Shyng *et al.*, 1993) (Figura 1.4).

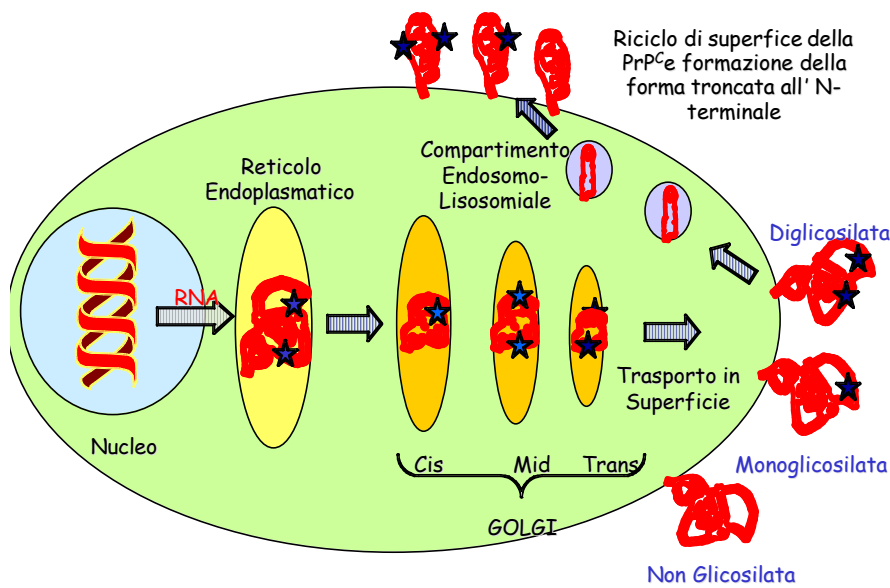


Figura 1.4: Sintesi della proteina prionica cellulare PrP^C (Zanusso, 2007).

E' stato dimostrato che nelle specie animali la PrP^C è sottoposta ad un clivaggio endoproteolitico, dando origine ad una forma troncata della porzione N-terminale della proteina. La PrP^C umana è sottoposta allo stesso clivaggio fra i residui aminoacidici 110–111, risultanti in un frammento carbossi-terminale approssimativamente di 17 kDa (C1) (Chen *et al.*, 1995). Analogamente anche la PrP^{Sc} è sottoposta al medesimo clivaggio tuttavia, il sito di clivaggio è prevalentemente N-terminale e risulta in un frammento leggermente più largo chiamato 'C2' (Yadavalli *et al.*, 2004)

Anche il ruolo della glicosilazione N-linked della PrP non è del tutto chiaro, nonostante la conservazione di entrambi i siti di glicosilazione N-linked in tutti i geni della PrP dei mammiferi analizzati suggeriscono che essa possiede un significato funzionale.

La glicosilazione della PrP è variabile, essa, infatti, risulta in a-, mono-, o specie diglicosilate, dipendente dal numero di siti di glicosilazione occupati con catene oligosaccaridiche (Figura 1.5).

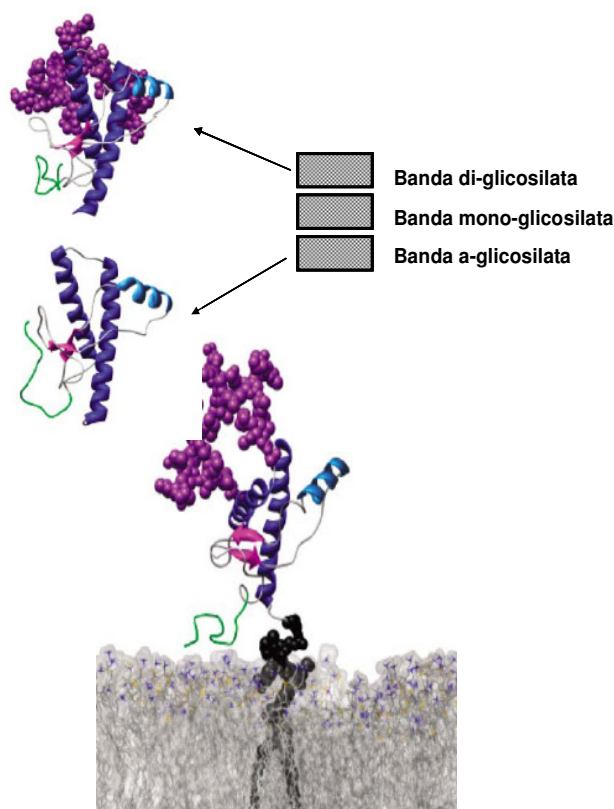


Figura 1.5. Modello molecolare di glicosilazione e ancoraggio alla membrana della PrP.

Proteina prionica con e senza gruppi di zuccheri con il corrispondente schema del profilo biochimico delle bande rispettivamente diglicosilata, monoglicosilata e non-glicosilata ottenuto mediante immunoblotting. Ancoraggio della PrP alla membrana plasmatica mediante il fosfatidil inositolo (GPI) (DeMarco e Daggett, 2005).

Questo fu dimostrato trattando la PrP^C e PrP^{Sc} con l'enzima N-Glycosidase F (PNGase F), il quale riduce la massa molecolare relativa della proteina in seguito alla rimozione del glicano legato al residuo di asparagine (Haraguchi *et al.*, 1989). Studi sulla PrP^C e PrP^{Sc} purificata da cervello di criceto Siriano, sia con un approccio biochimico, sia con la spettrometria di massa, hanno dimostrato che esistono di più di 50 catene di zuccheri differenti, le quali possono essere attaccate ai due siti di glicosilazione della PrP (Endo *et al.*, 1989; Rudd *et al.*, 1999). Inoltre, usando un approccio molto sensibile come lo spettrometro di massa, sono state identificate differenze nella glicosilazione per ciascun sito della PrP murina. I residui di

glicani legati su Asn 196 mostravano una proporzione più alta di glicani tri- o tetra- ramificati se confrontati con quelli di Asn al 180 (Stimson *et al.*, 1999).

Sono stati effettuati diversi studi volti a determinare la funzione della proteina prionica. Sebbene sia da confermare, sembra, che la PrP^C, possa giocare un ruolo fondamentale nell'attivazione linfocitaria (Cashman *et al.*, 1990), nella plasticità sinaptica (Maglio *et al.*, 2004), nella neuroprotezione, (Chiarini *et al.*, 2002; Sakaguchi *et al.*, 1996), nella trasduzione del segnale (Mouillet-Richard *et al.*, 2000) e nelle funzioni metaboliche associate a proprietà leganti il rame (Brown e Harris, 2002). Tuttavia, più recentemente, la PrP^C pare essere coinvolta nella differenziazione e neurogenesi delle cellule nervose (Steele *et al.*, 2006), così come nell'emopoiesi (Zhang *et al.*, 2006). Il suo ruolo fisiologico è ancora sicuramente ambiguo, così come il suo coinvolgimento nella patogenesi delle malattie prioniche, ma la sua espressione, è un pre-requisito per dimostrare la suscettibilità alla malattia prionica da parte dell'ospite (Prusiner *et al.*, 1990)

Diversi studi hanno chiaramente indicato che la malattia non può essere trasmessa in topi privi di PrP (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994; Sakaguchi *et al.*, 1996), infatti questi non sviluppano segni clinici della malattia. Al contrario, i tempi d'incubazione della malattia diventano più brevi, quando i prioni sono trasmessi in un topo transgenico con sopra espressione di PrP^C nel cervello, molto di più che nel wild-type (Fischer *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1989).

1.3. Etiologia e basi genetiche delle TSE

Le malattie prioniche sono classificate in spontanee, ereditarie ed acquisite a seconda che la fonte d'origine dei prioni sia esterna o interna all'ospite ricevente (Tabella 1.1).

Nelle forme acquisite, il contatto con il prione è causato da ingestione od esposizione di materiale infetto derivato da fonti omologhe o eterologhe (Prusiner, 2001). Infezioni da fonti

esterne di prioni inducono cambiamenti della conformazione nativa della proteina prionica cellulare PrP^C, normalmente espressa, guidando lo sviluppo di differenti TSE come la vCJD, il Kuru, la BSE, la FSE, l'EUE, CJD iatrogena.

Le forme spontanee di malattie prioniche, al contrario, derivano da cambiamenti interni, che comprendono eventi naturali di misfolding della proteina portando alle forme spontanee di CJD (sCJD) (Ryou, 2007).

Anche le forme ereditarie sono causate da fattori interni come mutazioni della linea germinale o somatica del gene *PRNP*, che inducono cambiamenti conformazionali della proteina cellulare nella forma patologica (Gambetti *et al.*, 2003). La presenza di mutazioni nel gene *PRNP*, rende la normale proteina cellulare più incline alla conversione verso la conformazione patologica, provocando le forme familiari della CJD, della GSS e della FFI.

La scrapie, invece, ha origine da una complessa interazione tra l'agente trasmissibile acquisito ed uno o più fattori genetici dell'ospite, correlati a diversi polimorfismi del gene *PRNP* che corrispondono alla parte C-terminale della proteina (Hunter *et al.*, 1992).

Sebbene nella pecora siano stati descritti oltre 25 differenti polimorfismi del gene *PRNP* (Goldmann *et al.*, 2005), solo le mutazioni ai codoni 136, 154 e 171 risultano essere strettamente correlate al carattere di suscettibilità/resistenza alla scrapie (Hunter, 1997). Il codone corrispondente al gene ancestrale è ritenuto essere ARQ (ARQ_{wildtype}) dove A indica l'aminoacido alanina, R l'arginina and Q la glutammina, codificati rispettivamente dai codoni 136, 154 and 171 (Goldmann *et al.*, 2005). La sostituzione dell'alanina (A) con la valina (V), al codone 136, aumenta la suscettibilità alla scrapie (Hunter *et al.*, 1994), la sostituzione di arginina (R) con l'istidina (H) al codone 154 è associata alla resistenza (Hunter, 1997), sebbene questa ultima affermazione non sia ancora universalmente accettata (Dawson *et al.*, 1998); la sostituzione di glutammina (Q) con l'istidina (H) al codone 171 non modifica la

suscettibilità alla scrapie, mentre quella di Q con R induce la resistenza (Baylis e Goldmann, 2004).

Tali sostituzioni danno origine a 5 diversi alleli: VRQ, ARQ, AHQ, ARH, ARR, i quali si possono combinare dando origine a 15 differenti genotipi correlati ad un diverso grado di suscettibilità/resistenza alla scrapie (Tabella 1.2). Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi sulla distribuzione degli alleli del gene della PrP nelle diverse razze ovine in tutto il mondo, da cui si è mostrato una notevole variabilità nell'ambito della distribuzione degli alleli nelle varie razze. Come per esempio nella razza Sarda e in tutte quelle razze che hanno una frequenza bassa o nulla dell'allele VRQ, il genotipo sensibile risulta essere ARQ/ARQ.

Da diversi studi condotti sulla relazione che esiste tra genotipo e grado di suscettibilità/resistenza alla scrapie, è scaturito che agli alleli ARQ, ARH e VRQ sono generalmente associati a suscettibilità all'infezione, mentre la presenza degli alleli ARR e AHQ è correlata a resistenza alla malattia (Baylis e Goldmann, 2004). Tuttavia, l'attribuzione del livello di rischio a ciascun genotipo ovino dipende, in parte, anche dalle caratteristiche dei ceppi circolanti (Morales *et al.*, 2007).

Per tale ragione, l'Unione Europea, sia con il Regolamento CE 260/2003 del 12 Febbraio 2003 sull'eradicazione delle TSE in ovini e caprini e sul commercio dei capi vivi, sia con la Decisione 2003/100 sui requisiti minimi per l'istituzione di programmi d'allevamento di ovini resistenti alle TSE, ha avviato l'attuazione di *Piani Di Selezione Genetica* per la resistenza alla scrapie. La genetica è stata, quindi, indicata come strumento per l'eradicazione della scrapie dai focolai di malattia nei diversi Stati Membri dell'Unione Europea. Recentemente, con il decreto N. 615/DecA/4 del 29 Aprile del 2009, è stato attuato un *Piano Regionale di lotta alle Encefalopatie Spongiformi*, basato sulla di selezione genetica degli ovini. Secondo il Piano, tutta la popolazione ovina regionale deve essere sottoposta al programma di selezione genetica mediante l'incremento della frequenza dell'allele ARR.

GENOTIPO	SUSCETTIBILITÀ
ARR/ARR	minima o nulla
ARR/ARH	genotipo raro. Si suppone suscettibilità scarsa
ARR/AHQ	genotipo raro. Si suppone suscettibilità scarsa
ARQ/ARR	suscettibilità scarsa
ARQ/ARQ	suscettibilità elevata
ARQ/AHQ	suscettibilità elevata
AHQ/AHQ	genotipo raro. Si suppone suscettibilità scarsa

Tabella 1.2: Suscettibilità genetica alla scrapie in ovini di razza sarda.

1.4. Patogenesi

I primi dati riferiti a studi di patogenesi della scrapie naturale nella pecora, risalgono al 1979 in seguito ad alcune ricerche di Hadlow (Hadlow *et al.*, 1979; Hadlow *et al.*, 1982). Dai primi studi sino ad oggi si è avuto modo di mettere insieme i pezzi di un grande puzzle e, anche se manca ancora qualche frammento, è possibile avere una chiara idea della via che l'agente della TSE percorre per dare origine alla malattia.

L'infezione dell'agente delle TSE in ovini e bovini avviene mediante la via orale: una volta rilasciato nell'ambiente viene acquisito durante il pascolo in ambienti contaminati (Dickinson, 1976; Brotherston *et al.*, 1968), sebbene scarificazioni della cute o tagli delle mucose sono suggerite come via alternativa d'infezione (Mohan *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 1993). Infatti, nel caso dei bovini, in seguito alla somministrazione di mangimi a base di carne ed ossa infetti da BSE si è avuta l'infezione (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith *et al.*, 1991).

Non è ancora ben noto, come l'agente della TSE attraversi la barriera della mucosa del tratto digerente dopo l'ingestione, ma ci sono tre possibili vie (Figura 1.6). La prima avviene attraverso le cellule M, cellule linfoepiteliali dell'intestino e delle tonsille, specializzate nel captare e trasportare macromolecole e particelle attraverso la barriera intestinale fino ai tessuti

sottostanti (Heppner *et al.*, 2001), come già dimostrato per altri patogeni (Neutra *et al.*, 1996). Nella seconda ipotesi, il passaggio del prione attraverso l'epitelio intestinale e può essere indipendente rispetto al suo trasporto. Tuttavia, potrebbe avvenire in seguito all'attività di enzimi digestivi, in grado di ridurre il prione in molecole più piccole capaci di attraversare la mucosa complessate con altre proteine come la ferritina e, successivamente, inglobate mediante endocitosi in strutture vescicolari (Mishra *et al.*, 2004). Infine, una terza possibile via potrebbe avvenire attraverso una inglobalizzazione per adsorbimento, ad opera di cellule dendritiche (Rescigno *et al.*, 2001a; Rescigno *et al.*, 2001b).

Dopo aver passato la barriera mucosa, la PrP^{Sc} si accumula nel tessuto linfatico associato all'intestino (GALT) e nelle placche del Peyer intestinali (Andréoletti *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2002). Tale accumulo di PrP^{Sc} nel GALT, che supporta l'ipotesi delle cellule M come via d'entrata, è rilevato a livello intracellulare, in un tipo di macrofagi presenti a livello del centro germinativo (tingible body macrophages – TBM) dei follicoli delle cellule B e nelle cellule follicolari dendritiche (FDC) (Andréoletti *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2000). Si pensa che la replicazione della PrP^{Sc} nel GALT sia cruciale per la successiva neuro-invasione (Bruce *et al.*, 2000; Mabbot *et al.*, 2000), anche se, l'assenza di replicazione non previene completamente la neuro-invasione stessa (van Keulen *et al.*, 1996). Nei bovini invece, la replicazione dell'agente della BSE nel tessuto linfatico è in sostanza assente (Iwata *et al.*, 2006; Terry *et al.*, 2003). Nonostante questo apparente basso coinvolgimento del sistema linfatico, la neuroinvasione si manifesta dopo un periodo d'incubazione relativamente lungo. Dopo la replicazione nel GALT, la PrP^{Sc} migra verso i linfonodi drenanti del GALT, quindi, nel caso delle tonsille, si sposta al linfonodo retrofaringeo, e per le placche del Peyer al linfonodo mesenterico (Andréoletti *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2002).

Nella specie ovina la trasmissione delle TSE è riportata anche attraverso il sangue (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002).

Il primo tessuto neurale in cui può essere dimostrata la presenza di PrP^{Sc} sia nelle pecore per la scrapie che nei bovini per la BSE, è il sistema nervoso enterico (ENS) (Andréoletti *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2000). L'infezione dell'ENS teoricamente potrebbe avvenire a diversi livelli. Dopo aver attraversato la barriera mucosa (attraverso le cellule M o l'epitelio intestinale), la PrP^{Sc} può venire a contatto con le fibre nervose dei plessi dell'ENS nella mucosa direttamente sotto l'epitelio dei villi (Jeffrey *et al.*, 2006). Tuttavia, è egualmente possibile che l'agente delle TSE possa infettare i plessi della sottomucosa dell'ENS dopo che essi sono stati trasportati dall'epitelio alle placche del Peyer nella sottomucosa.

L'agente della scrapie diffondendo cranialmente e caudalmente all'interno dell'ENS, coinvolge altre parti dell'intestino e dell'ENS.

Sebbene l'ENS sia capace di funzionare indipendentemente, esso è modulato dal SNC per mezzo dei nervi efferenti parasimpatici e simpatici, i cui nuclei sono localizzati rispettivamente nel nucleo motore del nervo vago (DMNV) del midollo allungato e nella colonna intermediolaterale del midollo spinale (IMLC) (Jenkins, 1978). Questi due nuclei risultano essere la porta d'entrata della PrP^{Sc} per il cervello ed il midollo spinale a partire dall'ENS (Hoffman *et al.*, 2007; van Keulen *et al.*, 2000). Da questi siti l'infezione si propaga nel SNC sia in direzione ascendente, che discendente e alla fine coinvolge l'intero asse neurale. Un'altra possibile via afferente al SNC potrebbe essere attraverso il sangue, durante la fase di infettività della scrapie (van Keulen *et al.*, 2000).

Nella BSE in condizioni naturali tutte le evidenze indicano che l'agente infettivo non si propaga orizzontalmente nell'ambiente attraverso qualsiasi secreto od escreto, oppure verticalmente attraverso la trasmissione materna (Curnow e Hau, 1996; Wrathall *et al.*, 2002). Al contrario, la scrapie è una malattia endemica, il che significa, che il suo agente patogeno è trasmissibile, tra pecore in condizioni naturali.

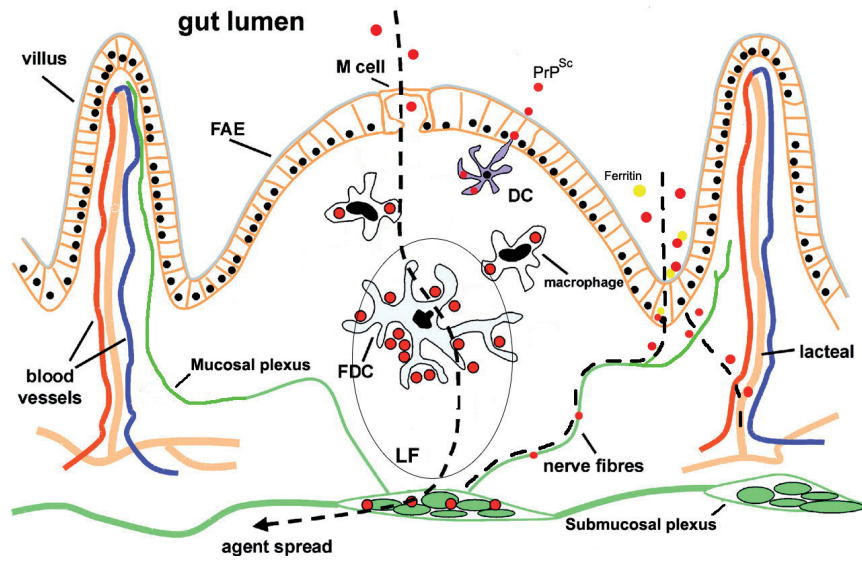


Figura 1.6: Possibile meccanismo di invasione da TSE.

Rappresentazione schematica delle possibili vie di attraversamento dell'epitelio intestinale e la successiva neuroinvasione dell'agente infettivo attraverso le vie nervose che connettono l'intestino al SNC (van Keulen *et al.*, 2008).

1.5. Infettività prionica

1.5.1. Liquidi biologici

Studi di epidemiologia suggeriscono che l'agente della scrapie si propaga orizzontalmente sia per contatto diretto tra gli animali o attraverso la contaminazione ambientale. Diversi studi dimostrano, infatti, che la placenta ha un ruolo nella trasmissione della scrapie nella pecora. Essa, infatti, una volta rilasciata dopo il parto e diffusa nell'ambiente, risulta infettiva, causando la trasmissione orizzontale della malattia (Dickinson *et al.*, 1974; Lacroux *et al.*, 2007).

Inoltre, la PrP^{Sc} è stata isolata nelle pecore a livello di tessuto linfatico ectopico in ghiandole salivari (Vascellari *et al.*, 2007), ghiandola mammaria (Ligios *et al.*, 2005) e reni (Ligios *et al.*, 2007), indicandone quindi una possibile presenza, rispettivamente nella saliva, latte ed urine, e quindi, un possibile ruolo nella trasmissione della malattia.

Poiché l'infettività da prioni non era mai stata segnalata nel latte, i prodotti lattiero-caseari, derivati da greggi colpiti da TSE, attualmente, entrano liberamente nella catena alimentare animale e umana. Solo di recente è stato riportato, per la prima volta, l'accumulo di PrP^{Sc} in follicoli linfatici adiacenti ai dotti del latte, di ghiandola mammaria, di pecore co-infettate da scrapie e mastite follicolare dovuta a Maedi-Visna virus (MVV) (Ligios *et al.*, 2005). Ciò nonostante, nessuno studio riporta l'effettiva presenza della PrP^{Sc} nel latte. Tuttavia, in un recente articolo scientifico Konold e collaboratori, hanno indagato sulla possibilità di trasmissione della scrapie da pecore agli agnelli attraverso il latte e il colostro (Konold *et al.*, 2008).

In questo studio, sono stati scelti agnelli con un genotipo suscettibile alla malattia (VRQ/VRQ), e sono stati allattati con latte e colostro da pecore con lo stesso genotipo, affette naturalmente da scrapie classica. I ricercatori hanno dimostrato che la scrapie classica era

naturalmente trasmessa da pecore con genotipo suscettibile ad agnelli con lo stesso genotipo attraverso latte e colostro.

Non è stato tuttavia possibile concludere se, colostro e latte risultassero infettivi. Inoltre, la maggior parte delle pecore donatrici erano asintomatiche all'inizio della lattazione, mentre alcune di queste hanno sviluppato i sintomi clinici dopo.

Era invece chiaro, che, il latte di pecore donatrici asintomatiche trasmetteva la malattia, dimostrando che ovini clinicamente sani, che avevano incubato la scrapie classica potevano diffondere gli agenti causali delle TSE attraverso il latte (Konold *et al.*, 2008).

Un'altra fonte di dati relativi alla PrP^{Sc} e alla presenza dell'infettività del latte sono stati resi noti da un gruppo di ricercatori francesi (Lacroux *et al.*, 2008). Lo studio, condotto in Francia su un gregge di scrapie naturale, confermava e rafforzava precedenti le evidenze (Ligios *et al.*, 2005), identificando la presenza di PrP^{Sc} nei dotti lattiferi, nel lume degli acini mammari e nei tipici follicoli ectopici linfatici da infezione di Maedi-Visna virus (MVV) di pecore con scrapie classica appartenenti a differenti genotipi (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ e VRQ/VRQ) (Lacroux *et al.*, 2008). Inoltre, supportando gli studi di Konold, hanno dimostrato che la scrapie classica può essere trasmessa da una pecora con genotipo sensibile a topi transgenici attraverso il colostro ed il latte. In particolare, hanno rilevato che sia il colostro che tutte le parti del latte (lipidica, caseine e pellet cellulare) erano in grado di trasmettere la malattia. Invece, in tutte le pecore donatrici, la PrP^{Sc} è stata rilevata nella ghiandola mammaria solo quando erano presenti i follicoli ectopici da infezione MVV, mentre, l'infettività del latte era rilevata in pecore con ghiandola mammaria istologicamente sana. I livelli d'infettività riportati per litro di latte erano equivalenti a quelli trovati in 0,01-0,1 grammi di materiale cerebrale proveniente da una pecora allo stadio terminale della malattia. Tuttavia, l'infettività trovata in un litro di latte di pecora dovrebbe essere comparabile all'infettività che può essere

trovata in circa 0,5 grammi di tessuto linfonodale proveniente da una pecora nello stato di incubazione della scrapie da 5 mesi o più (Lacroux *et al.*, 2008).

L'infettività è stata accertata anche nelle urine provenienti da individui con infiammazione renale cronica (Seeger *et al.*, 2005). Recenti studi, condotti su topini transgenici esprimenti la PrP dei cervi ed inoculati con urine e saliva di cervi con CWD, supportavano l'infettività prionica negli stessi liquidi (Haley *et al.*, 2009). Da questo si evince che l'infettività prionica secreta nelle urine potrebbe giocare un ruolo essenziale nella trasmissione orizzontale delle TSE naturali. Tale evidenza, indica dunque, un potenziale rischio di trasmissione derivata da ormoni provenienti da urine animali o altri medicinali (Gregori *et al.*, 2008).

1.5.2. Contaminazione ambientale

E' stato dimostrato che l'infettività è adsorbita ed immobilizzata anche dai minerali del suolo (Johnson *et al.*, 2006), che risultano essere infettanti in seguito ad esposizione orale fino a 29 mesi più tardi (Seidel *et al.*, 2007). I primi studi sull'infettività ambientale e sulla relazione suolo-prione risalgono ai primi anni 70. Questi studi ipotizzavano la possibilità che l'infettività potesse perdurare nel tempo (Pattison e Jones, 1967). Solo poco più tardi fu fatto il primo semplice esperimento in cui si valutava l'infettività residua di un campione di suolo in cui era stato interrato per oltre tre anni un cervello infetto da scrapie ovina (Brown e Gajdusek, 1991). Tuttavia, il primo studio sistematico risale al 2006, quando alcuni Autori (Leita *et al.*, 2006) misero in evidenza la tenacia con cui la proteina prionica cellulare e la sua isoforma infettiva si legano a suoli agricoli differenti per caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche trattati e non con porzioni di cervello infetto da scrapie. Studi successivi hanno cercato di approfondire le dinamiche di interazione, spiegando anche le modalità chimico-fisiche di interazione forte che potrebbe essere all'origine della persistenza del prione nel suolo. In un articolo pubblicato nel 2006, alcuni ricercatori dell'Università del Wisconsin a

Madison (Johnson *et al.*, 2006) spiegano che alcuni tipi di terreno possono fungere da riserva ambientale naturale di infettività prionica, contribuendo alla naturale trasmissione delle TSE, fondamentalmente a causa della capacità della proteina prionica di interagire con i comuni minerali del suolo. Tale caratteristica è stata dimostrata studiando l'interazione e l'adsorbimento della PrP^{Sc} ad alcuni minerali quali il quarzo, la montmorillonite e la caolinite. I terreni argillosi contenenti montmorillonite permettono a queste proteine di conservarsi. Normalmente le proteine che si depositano al suolo si degradano rapidamente, ma la montmorillonite presente in diverse argille caolinitiche ha mostrato un'affinità particolare per i prioni che, grazie ad essa, riescono a conservarsi integri, mantenendo la loro capacità infettiva. Studi sul comportamento dell'adsorbimento della PrP^{Sc} su minerali come montmorillonite, caolinite e quarzo mostrano che l'adsorbimento dipende dalla proprietà della superficie di carica dei minerali (Johnson *et al.*, 2006).

Grande rilevanza assumono la funzione delle argille nel veicolare l'infettività. Molti gruppi si sono cimentati nell'analizzare il carattere biochimico dell'interazione proteina prionica con le argille (Revault *et al.*, 2005). Tuttavia, la gran parte degli studi trascurava lo studio sulla componente organica del suolo, matrice molto complessa, elemento indispensabile per capire la dinamica di interazione tra suolo e prione (Polano *et al.*, 2008). Oggi sussiste la prova d'infettività del materiale adsorbito utilizzando sia saggi in vitro come le Standard Scrapie Cell Assay (SSCA) (Genovesi *et al.*, 2007), sia utilizzando saggi biologici su criceto Siriano (Johnson *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2007). L'utilizzo dei saggi biologici sembra oggi il metodo più semplice ed attendibile per valutare la presenza o l'assenza dell'infettività in diversi suoli (Genovesi *et al.*, 2007).

Seidel, ha recentemente dimostrato, dopo aver simulato la contaminazione del suolo con l'ausilio di lisimetri mediante utilizzo di isolati di scrapie, che l'infettività può rimanere associata al terreno per più di 21 mesi, comprovando la possibile circolazione del prione

anche nelle acque di scolo (Seidel *et al.*, 2007). Questo risultato è fortemente rilevante perché conferma la preoccupazione riguardo all'assunto che il terreno sia un possibile veicolo di diffusione delle malattie prioniche come postulavano gli studi pionieristici di Brown e Gajdusek (1991).

Accanto ai lavori che cercano di spiegare se sussista o no il pericolo d'infettività, esistono diverse linee di ricerca che vogliono determinare con maggiore dettaglio i cambiamenti strutturali che sono determinati dal rapporto suolo-prione. Per comprendere a fondo la dinamica della proteina nel suolo è necessario analizzare il comportamento della proteina nelle condizioni più reali possibili. Capire l'interazione tra le singole componenti del terreno e la proteina è il primo passo per convalidare o confutare teorie sulla diffusione dell'epidemia, ma anche per trovare accorgimenti atti a limitarne la diffusione. Per dimostrare la presenza di prioni nel suolo esistono in letteratura diversi protocolli; quella maggiormente accettata, come già accennato, si basa sulla capacità di replicare i prioni utilizzando un particolare ceppo di cellule (Genovesi *et al.*, 2007). Per comprendere la complessa relazione suolo e prioni vi è l'esigenza di trovare nuove vie per test diagnostici sempre più affidabili e realistici. La relazione suolo-prione ed il rischio ambientale ad esso associato risulta essere oramai accettata dalla comunità scientifica nonostante sussista la necessità di ulteriori studi atti a delucidare i meccanismi che ci potranno permettere di comprendere modi per rallentare o capire meglio i rischi alla salute umana (Polano e Leita, 2008).

1.6. Stato dell'arte sulla diagnosi delle TSE

In seguito all'emergenza della BSE, la diagnosi delle malattie prioniche divenne tema rilevante per la salute pubblica e l'economia e si rese necessario sviluppare nuove tecniche diagnostiche. Infatti, sia per l'uomo sia per gli animali, la diagnosi di malattie prioniche è basata unicamente sull'analisi dei sintomi clinici e della diagnosi *post mortem*.

1.6.1. Tecniche convenzionali

Tecniche istologiche e immunoistologiche

L'analisi istologica è il metodo di riferimento per la diagnosi clinica. Essa è effettuata in seguito ad una colorazione con ematossilina-eosina delle lesioni tipiche di TSE, quali spongiosi, astrogliosi e placche amiloidi presenti essenzialmente nel SNC (Fraser, 1976). Questa analisi è molto specifica in quanto permette l'osservazione diretta delle lesioni caratteristiche della malattia, anche se è meno sensibile di altre tecniche (Gavier-Widen *et al.*, 2005; Wells e Wilesmith, 1995). La sensibilità dell'osservazione microscopica del campione può essere potenziata da tecniche immunoistochimiche (IHC), che utilizzano anticorpi anti-PrP per rilevare l'accumulo di PrP^{Sc} nei depositi amiloidi (van Keulen *et al.*, 1996; van Keulen *et al.*, 1995). L'efficienza di queste tecniche dipende molto dalla preparazione del campione e dalla natura dell'anticorpo usato. Nonostante, questi metodi siano poco rapidi per l'analisi di routine, risultano a tutt'oggi eccellenti per la conferma di diagnosi. Tali tecniche, sono inoltre utilizzate con ottimi risultati su campioni del sistema linforeticolare (SLR), quali tonsille, linfonodi e placche del Peyer, anche per la diagnosi preclinica di scrapie nelle pecore (Andréoletti *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 1996), nella CWD (Spraker *et al.*, 2002) e in altre malattie caratterizzate da accumulo di PrP^{Sc} nel SLR, durante la fase preclinica. Le stesse

osservazioni sono state riportate per la diagnosi della vCJD. In uno studio retrospettivo su altre 8000 tonsille e appendici ciecali mediante l'esame IHC, è stato identificato un caso di vCJD in Gran Bretagna, in una persona senza apparenti segni clinici (Hilton *et al.*, 2002; Hilton *et al.*, 2004).

Test di infezione sperimentale

Il metodo più sensibile e specifico per la diagnosi della TSE è indiscutibilmente l'infezione sperimentale di animali da laboratorio. L'animale da laboratorio (generalmente topi, criceti o arvicole) può essere infettato, mediante inoculo intra-cerebrale (IC) o per via orale (OS), con un omogenato preparato da un tessuto infetto. Dopo il periodo di incubazione caratteristico per ogni specie si ha la manifestazione dei sintomi della malattia, quindi la morte dell'animale. Nella fase successiva il tessuto nervoso della cavia è esaminato mediante l'uso di tecniche classiche (istologia, IHC, Western Blot) per evidenziare la presenza di PrP^{Sc}.

Recentemente, in seguito all'utilizzo di topi transgenici che iperesprimono il gene *PRNP*, è stato possibile incrementare significativamente l'efficienza della trasmissione e accorciato i tempi d'incubazione (Simmons *et al.*, 2008). L'infezione sperimentale, tuttavia, presenta tempi lunghi per un'applicazione diagnostica di routine.

Western blotting

Il Western blotting (WB) è una tecnica diagnostica utilizzata per la detection della PrP^{Sc} dagli estratti di tessuto, nota già dal 1986 (Bendheim e Bolton, 1986). Questa tecnica sfrutta la proprietà della PrP^{res} di avere una parziale resistenza all'azione enzimatica di proteasi, come la proteinasi K (pK). Tale resistenza, invece, non è caratteristica della PrP^{sen} che è completamente digerita a seguito del trattamento. L'isolamento della sola PrP^{res} è invece fondamentale per effettuare una corretta diagnosi mediante WB. La tecnica prevede quindi l'omogenizzazione del tessuto, la precipitazione e denaturazione della PrP mediante riscaldamento del campione in presenza di sodio dodecildolfato (SDS), infine l'analisi con

elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). Le proteine, dopo la migrazione, sono trasferite su un supporto solido, come il polivinilidene fluoruro (PVDF) o la nitrocellulosa, quindi rilevate con anticorpi specifici diretti contro particolari epitopi della proteina di interesse. La specificità del WB deriva dal fatto che nella fase finale la PrP si evidenzia in base al tipico profilo elettroforetico di tre glicoforme, sottoforma di tre bande, che sono caratterizzate da un pattern molecolare distinguibile in base alla grandezza ed intensità di ciascuna banda. Inoltre, in seguito alla proteolisi da pK, per via della parziale degradazione della porzione N-terminale della proteina, si ha una variazione del peso molecolare che può essere dimostrata da uno shift nella massa molecolare da 33-35 kDa (PrP^{sen}) a 27-30 kDa (PrP^{res}) (Buschmann *et al.*, 1998). In alcuni casi, può essere eseguita una reazione con differenti anticorpi diretti contro la regione N-terminale della PrP, per identificare il profilo molecolare di diversi ceppi prionici (Stack *et al.*, 2006; Stack *et al.*, 2002).

1.6.2. Test rapidi *post mortem* per la diagnosi delle TSE

In conformità alle disposizioni della normativa Europea [Regolamento (CE) n. 999, 22 maggio 2001 del Parlamento Europeo e del Consiglio e successive modifiche] sulla prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili negli animali, è previsto uno screening sui bovini e ovini morti in stalla, un controllo di tutti i bovini regolarmente macellati di età superiore ai 48 mesi e solo una parte degli ovini regolarmente macellati di età superiore ai 18 mesi viene controllata. Il controllo è effettuato nei laboratori autorizzati mediante i cosiddetti test rapidi.

I test rapidi, analogamente al WB, si basano su principi di immunobiochimica per il riscontro della proteina prionica patologica associata all'infezione (PrP^{Sc}) mediante l'uso di anticorpi monoclonali.

Non tutti i test menzionati di seguito possiedono caratteristiche adatte allo screening, e non possono essere automatizzati. Dopo il 1996, in seguito all'emergenza della BSE, e al fatto di un possibile contagio per l'uomo, emerse la necessità concreta di sviluppare test diagnostici di routine innovativi e rapidi, da applicare su tutti i capi prima del loro ingresso nella catena alimentare o nel il circuito industriale, al fine di garantire la sicurezza della carne bovina. Emerse, quindi una nuova generazione di test diagnostici, definiti "test rapidi", basati sull'immuno-biochimica, per la rilevazione della PrP^{Sc}, unica molecola ad essere identificata come marker attendibile di TSE.

In quasi tutti i test rapidi sviluppati, questa distinzione è basata sulle proprietà biochimiche delle due forme della proteina. La maggior parte dei test utilizza la parziale resistenza della PrP^{Sc} alla degradazione da proteasi. Altri test si basano sulle proprietà di aggregazione della PrP^{Sc}, quando viene estratta con particolari detergenti. E' importante notare che l'uso dei detergenti per l'estrazione della PrP (PrP^C o PrP^{Sc}) è indispensabile per la detection, in quanto le strutture delle membrane, se non opportunamente eliminate, ne impedirebbero l'isolamento. Questo è generalmente eseguito trattando il tessuto durante la preparazione dell'omogenato con uno o più detergenti. Infine, tutti i test rapidi includono un passaggio nel quale la PrP^{res} è denaturata, affinché gli anticorpi possano riconoscere gli epitopi linearizzati della stessa PrP.

1.6.3. Validazione Europee

Nel maggio del 1999, la Commissione Europea ha validato, sotto restrittive condizioni, tre test: Enfer Technology Ltd (Newbridge, Ireland), Prionics (Zurich, Switzerland) e CEA (Saclay, France), idonei per un rapido sviluppo industriale.

Il test Prionics usa un format industrializzato di Western Blotting, che permette l'analisi su larga scala (Schaller *et al.*, 1999; Oesch *et al.*, 2000) ed è stato il primo test rapido usato negli studi epidemiologici, prima in Svizzera, dopo in Francia (Calavas *et al.*, 2001). Il test

diagnostico sviluppato da CEA nel 1998, è un altro esempio di test rapido basato su un convenzionale approccio immunoenzimatico (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Questo test è ora prodotto da BioRad (Hercules, CA, USA, TeSeE tests). Nel primo step del test, la PrP^{Sc} è selettivamente purificata con l'uso della pK, quindi precipitata mediante centrifugazione e denaturata. Nel secondo step, la PrP^{res} è rilevata mediante un sistema detto "a sandwich" con l'utilizzo di due anticorpi monoclonali (Grassi *et al.*, 2000), tale sistema fornisce anche un dato di quantificazione relativa in seguito ad una reazione spettrofotometrica. L'Enfer Technology Ltd ha sviluppato un sistema ELISA (Moynagh e Schimmel, 1999) nel quale la PrP^{Sc} è direttamente immobilizzata su un supporto solido in presenza di pK, denaturata, e quindi rilevata mediante un anticorpo policlonale diretto contro un epitopo della PrP.

La validazione di questi tre test è stata condotta su più di 1300 campioni di tessuto nervoso provenienti da 300 animali nello stadio clinico della malattia (Regno Unito) e 1000 animali non infetti (Nuova Zelanda). In seguito, omogenati di cervello sono stati diluiti per testare la sensibilità analitica dei test (Moynagh e Schimmel 1999). Un quarto test (Wallac, Bucks, UK), avendo dato risultati insoddisfacenti, è stato rivalutato in un diverso format nel 2001. Al contrario, i test Enfer Technology, Prionics e CEA hanno mostrato una sensibilità e una specificità del 100% in diversi di studi. Un lavoro successivo ha dimostrato che il test CEA e la sua versione industriale sviluppata da BioRad, avevano una sensibilità paragonabile a quella dei test di inoculo intracerebrale in topi RIII convenzionali (Deslys *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2000). Essi inoltre presentavano una sensibilità tale da identificare la presenza di PrP^{res} nel tessuto nervoso anche prima della comparsa segni clinici (Arnold *et al.*, 2007; Grassi *et al.*, 2001).

Nel 2002 e nel 2004, quindici nuovi test sono stati valutati dal *Directorate General for Health and Consumer Protection* con un procedimento simile, sebbene fosse su un numero minore di

campioni [report scientifico dell'European Food Safety Authority (EFSA), 2002 e 2004] (Grassi *et al.*, 2008).

Oggi, tutti test condotti sul bestiame sono generalmente BioRad, Prionics, IDEXX, ed Enfer. Qualcuno di questi test è stato usato anche per la CWD nei cervidi e nei ruminanti selvatici (Hibler *et al.*, 2003). Dal 2002 al 2004, cinque test validati per la diagnosi *post mortem* di BSE, sono stati provvisoriamente approvati per la diagnosi *post mortem* di TSE nei piccoli ruminanti: TeSeE (BioRad), TSE Kit (Enfer), CDI-5 (In-Pro), Prionics-Check LIA e Prionics-Check Western (entrambi Prionics). Tra il 2004 e il 2005, la Commissione Europea ha valutato nove test per l'applicazione ai piccoli ruminanti, e ne ha raccomandato otto di questi: TeSeE e TeSeE sheep/goat (BioRad), TSE post-mortem test (IDEXX), Prionics Check Western SR e Prionics-Check LIA SR (entrambi Prionics), Enfer TSE test Version 2.0 (Enfer), CDI-5 (In-Pro), Institut Pourquier Scrapie ELISA test (Institut Pourquier). E' da notare, tuttavia, che solo i primi tre di questi, effettivamente, erano in grado di rilevare la scrapie atipica (Nor98) in campioni di tessuto nervoso. In pratica, ad oggi, quasi tutti i test sui piccoli ruminanti sono condotti con i sistemi BioRad, Prionics, IDEXX ed Enfer.

A livello nazionale i campioni risultati positivi alla PrP^{Sc} dai test rapidi vengono confermati dai laboratori del Centro di Referenza per le Encefalopatie Spongiformi (CEA) dell'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta mediante test Western blot.

1.7. Le Nanotecnologie

1.7.1. Caratteristiche e proprietà dei nanomateriali

Le nanoscienze, considerate il punto di incontro di discipline come la fisica quantistica, la chimica supramolecolare, la scienza dei materiali, la biologia molecolare, costituiscono ormai una realtà affermata nella ricerca scientifica. Le nanotecnologie, ancora nella fase iniziale del loro sviluppo, puntano a sfruttare e ad applicare i metodi e le conoscenze derivanti dalle nanoscienze e, facendo riferimento ad un insieme di tecnologie e processi che richiedono un approccio multidisciplinare, consentono la creazione, la manipolazione controllata e l'utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri (nm).

In virtù del fatto che i componenti e le funzioni dei sistemi biologici esistono ed avvengono in scala nanometrica, è stato inevitabile che le nanotecnologie abbiano trovato larga applicazione nell'ambito delle scienze della vita dando origine alla nanobiotecnologie (Alivisatos, 2004; Cao, 2005; Jain, 2005).

L'enorme interesse verso i nanomateriali è legato alle loro peculiari proprietà chimico-fisiche che ne spiegano le ampie potenzialità applicative; i sistemi in scala nanometrica presentano una sorta di via di mezzo tra le proprietà di bulk del materiale (tipiche del materiale allo stato massivo, scala di misura da microscopiche a macroscopiche) e le dimensioni tipiche molecolari (inferiore al nanometro o di pochi nanometri).

Queste proprietà dipendono principalmente da due effetti caratteristici: un deciso incremento della superficie d'interfaccia e l'effetto quantico (quantum effect).

L'incremento della superficie d'interfaccia relativamente al volume nei nanomateriali può essere spiegato considerando che l'interfaccia ha proprietà diverse da quelle del materiale allo stato massivo. L'incremento della superficie di interfaccia influenza notevolmente le

applicazioni nelle quali il rapporto superficie attiva-volume diventa determinante. Per quel che concerne l'effetto quantico, quando si scende a dimensioni nanometriche, le proprietà ottiche, magnetiche ed elettriche cambiano radicalmente.

Riducendo le dimensioni, fino a raggiungere quelle tipiche nanometriche dei cosiddetti clusters, a causa del basso numero di atomi presenti nel cluster medesimo e del suo volume ridotto, nella struttura elettronica si manifesta una discretizzazione dei livelli energetici (quantizzazione), che dipende dalle dimensioni del cluster, fenomeno denominato "quantum size effect" dalle quali dipendono caratteristiche del tutto nuove discordanti con quelle tipiche del materiale a dimensioni ordinarie.

Per le dimensioni nanometriche questi sistemi possono interagire facilmente con le biomolecole presenti sulla superficie e all'interno delle cellule (recettori, acidi nucleici, fattori di trascrizione ed altre proteine di segnale) spesso in modo tale da non alterarne il profilo e le proprietà (Bogunia-Kubik e Sugisaka, 2002; Xu *et al.*, 2004).

Queste proprietà hanno creato nuove opportunità per l'applicazione dei nanomateriali nella ricerca biomedica, clinica e diagnostica e stanno alla base della sensibilità e specificità maggiore rispetto a molti metodi bioanalitici convenzionali.

Essi sono particolarmente utili come agenti di contrasto per l'Imaging in Risonanza Magnetica (MRI), la tomografia computerizzata e l'ultrasonografia (Lee *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2005).

Il termine nanomateriali include un'ampia varietà di sistemi che differiscono per la composizione (organica o inorganica), la forma (per es. tubulare, sferica) e le proprietà (es. ottiche, magnetiche, elettrochimiche) ed i più diffusi ed utilizzati sono liposomi, dendrimeri, nanoparticelle polimeriche, ceramiche, magnetiche, micelle polimeriche, nanotubi al carbonio e quantum dot (Figura 1.7).

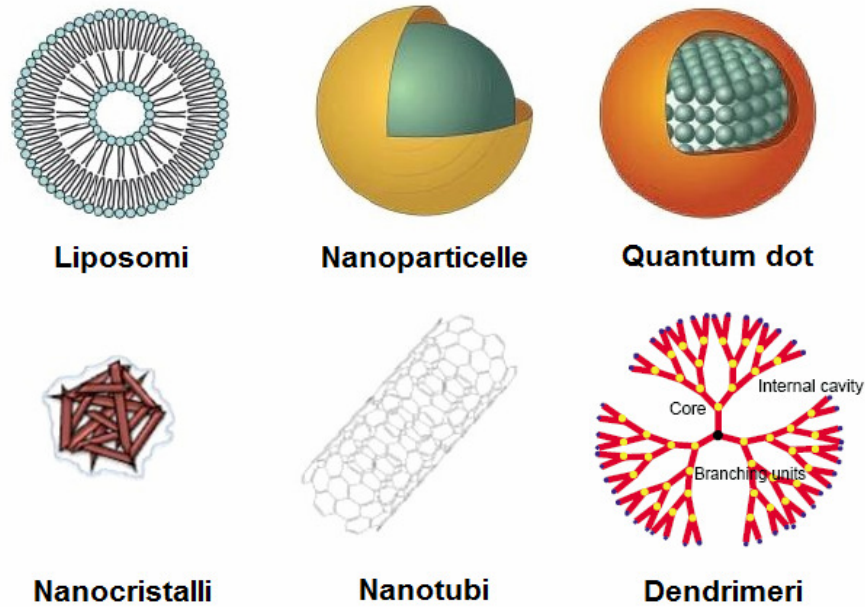


Figura 1.7: Rappresentazione schematica di diversi nanomateriali.

I liposomi sono vescicole di natura organica costituite da lipidi strutturati in un doppio strato (principalmente fosfolipidi e sfingolipidi) delimitanti uno o più compartimenti acquosi. Sono classificati sulla base delle loro diverse e più rilevanti caratteristiche rappresentate dalle dimensioni e dal numero di strati lipidici in multilamellari (con dimensioni tra 500 e 5000 nm, contenenti diversi strati lipidici), oligolamellari (dimensioni tra 200 e 800 nm e ridotto numero di lamelle) ed unilamellari (50-100 nm con un unico doppio strato lipidico).

La natura anfifilica dei liposomi permette il trasporto di sostanze idrofiliche intrappolate all'interno della loro fase acquosa e sostanze idrofobiche disciolte nel doppio strato.

Le caratteristiche strutturali dei bilayer liposomiali sono del tutto simili a quelle delle membrane biologiche con eccellenti proprietà di penetrazione e diffusione e per questo motivo i liposomi sono utilizzati come modelli di membrana per studiare in vitro fenomeni biologici, talvolta molto complessi, che avvengono in vivo (Torchilin, 2005).

I dendrimeri, sono sistemi polimerici organici sintetici, altamente ramificati (dimensioni <15 nm), con un'architettura stratificata costituita da un core centrale, una regione centrale e numerosi gruppi terminali che determinano le caratteristiche dei dendrimeri.

I gruppi terminali offrono un'ampia superficie funzionalizzabile con agenti terapeutici e molecole per il targeting specifico. Inoltre, i dendrimeri mostrano intrinseche proprietà per le quali sono ampiamente impiegati come “scaffold” per la rigenerazione tissutale (Lee *et al.*, 2005).

Le micelle polimeriche si formano mediante autoassemblaggio di copolimeri a blocchi che in soluzione acquosa si organizzano in uno strato esterno idrofilico e un core interno idrofobico.

Le nanoparticelle polimeriche sono sistemi solidi colloidali biodegradabili che consistono di macromolecole di dimensioni nanometriche (Brigger *et al.*, 2002).

Le nanoparticelle inorganiche possono avere varia composizione chimica (metalli e ossidi di metalli), sono caratterizzate da proprietà del tutto nuove (per es. magnetiche, ottiche, fluorescenti, elettroniche) e da una superficie facilmente funzionalizzate che stanno alla base delle notevoli applicazioni di questi sistemi come biosensori e target diagnostici (White e Rosi, 2008; Tallury *et al.*, 2008).

I quantum dot sono nanocristalli (2–10 nm), in altre parole, aggregati di molecole, semiconduttori colloidali fluorescenti. Il loro core centrale consiste nella combinazione di elementi dei gruppi II-VI (CdSe, CdTe, CdS, PbSe e ZnSe) o III-V (GaAs, GaN, InP and InAs) della tavola periodica o altri semiconduttori e possono essere sintetizzati in differenti colori mediante uno stretto controllo delle loro dimensioni; spesso i quantum dot sono rivestiti da uno “shell” di ZnS che ne aumenta la foto stabilità e conferisce un'eccezionale resistenza anche alla degradazione chimica.

I quantum dot hanno la caratteristica di assorbire la luce bianca rimettendola pochi nanosecondi dopo; questa luce è strettamente dipendente dalle dimensioni e dalla composizione dei nanocristalli e varia nello spettro dall'ultravioletto fino al visibile. Per queste proprietà rappresentano degli eccellenti sistemi impiegati come agenti di contrasto per l'imaging e come sonde nei saggi in vitro (Medintz *et al.*, 2005).

Tra le nanoparticelle magnetiche, in particolare quelle con caratteristiche superparamagnetiche, consistono di nanocristalli di 10-20 nm con un core costituito prevalentemente da ossidi di ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e sono denominate con l'acronimo SPION (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles).

Tali sistemi sono ampiamente utilizzati per l'eccellente biocompatibilità in quanto il Fe viene di norma riutilizzato e riciclato da parte delle cellule utilizzando i normali processi per il metabolismo del ferro (Arruebo *et al.*, 2007).

Ciò che rende così interessanti e promettenti queste particelle per le applicazioni in biomedicina è legato proprio alle loro caratteristiche chimico fisiche e alle proprietà magnetiche che di seguito sono brevemente spiegate.

In base alla struttura elettronica posseduta, i materiali sono caratterizzati da differenti proprietà magnetiche e da una diversa interazione con campi magnetici esterni classificati in diamagnetici, paramagnetici e ferromagnetici.

La suscettività magnetica χ è una stima dell'efficienza della risposta della magnetizzazione M del materiale ad un campo magnetico esterno H (definita come $\chi = \delta M / \delta H$), è una grandezza adimensionale e può essere rappresentata per mezzo di diagrammi M vs. H che raffigurano le curve di isteresi magnetica. L'area compresa all'interno della curva rappresenta l'energia necessaria per invertire la magnetizzazione. M_s è la magnetizzazione di saturazione, che si ottiene, quando tutti gli spin sono allineati rispetto al campo esterno; H_c è la coercitività, vale a dire l'intensità di campo che deve essere applicata per portare a zero la magnetizzazione residua del campione (Figura 1.8).

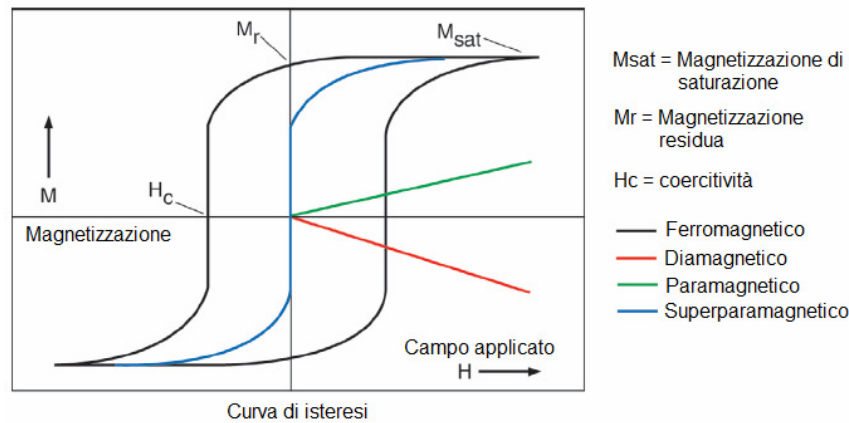


Figura 1.8. Curva di isteresi di materiali ferromagnetici, diamagnetici, paramagnetici e superparamagnetici.

I materiali diamagnetici hanno tutti gli elettroni appaiati, quindi, una magnetizzazione netta risultante nulla; in presenza di un campo magnetico esterno, essi si polarizzano in senso opposto al campo applicato e ne vengono debolmente respinti, essendo caratterizzati da una piccola suscettività magnetica negativa.

I materiali ferromagnetici possiedono elettroni spaiati e presentano un'elevata suscettività magnetica positiva. Tutte le volte che sono immersi in un campo magnetico esterno, questi materiali diventano a loro volta dei magneti perché l'effetto del campo magnetico è quello di orientare i momenti magnetici propri delle molecole parallelamente alla direzione del campo stesso. Essi conservano per un certo tempo la magnetizzazione indotta da un campo magnetico esterno anche quando questo è rimosso. Questa proprietà si mantiene solo sotto ad una certa temperatura detta temperatura di Curie, sopra la quale il materiale si comporta come paramagnetico.

I materiali paramagnetici hanno elettroni spaiati, quindi un campo magnetico esterno induce una magnetizzazione netta nel campione che non viene però conservata dopo la rimozione del campo magnetico esterno, perché disturbato continuamente dall'agitazione termica.

Il superparamagnetismo è un fenomeno per il quale materiali magnetici possono esibire un comportamento simile al paramagnetismo anche a temperature inferiori alla temperatura di Curie. Questo è un fenomeno che avviene su dimensioni di scala ridotta nel caso di materiali,

per i quali l'energia necessaria per cambiare la direzione del momento magnetico delle particelle è comparabile con l'energia termica del reticolo. In queste condizioni, la percentuale di particelle che invertono casualmente l'orientamento magnetico diviene significativa.

Per le applicazioni biomediche, al fine di prevenirne l'aggregazione, ottimizzarne la selettività d'azione e prevenirne in particolare l'inattivazione da parte del sistema dei macrofagi, le SPION frequentemente sono rivestite con molecole di destrano o polietilenglicole (PEG).

1.7.2. Potenziali applicazioni delle nanoparticelle magnetiche

La loro stabilità dal punto di vista chimico e le proprietà magnetiche le rendono ottimi marker biomolecolari, come anche, eccellenti agenti di contrasto nell'imaging in risonanza magnetica (MRI). Sono inoltre buoni candidati alla funzionalizzazione della superficie per target attivi e per la diagnosi *in vitro* ed *in vivo*, infine per la separazione magnetica di biomolecole da miscele di reazione quando necessario (Lu *et al.*, 2007).

Questi sistemi sono, infatti, altamente biocompatibili e, grazie alla loro limitata dimensione, riescono a penetrare in profondità nei tessuti, superare la membrana plasmatica delle cellule e a raggiungere target specifici. Inoltre costituiscono eccellenti supporti strutturali per l'ancoraggio di materiali biologici quali proteine, anticorpi, enzimi e DNA (Koneracka *et al.*, 1999, Kouassi e Irudayaraj, 2006a; Kouassi *et al.*, 2007).

Tra queste in particolare, le nanoparticelle di ossidi di ferro, presentano buone proprietà superparamagnetiche, sono stabili dal punto di vista chimico, hanno un'elevata area superficiale e possono essere facilmente direzionate mediante campi magnetici esterni (Kouassi e Irudayaraj, 2006b). Questi sistemi possono trovare applicazione nella risonanza magnetica imaging, nella separazione magnetica di biomolecole da miscele di reazione quando necessario e nel drug delivery. Inoltre, la loro superficie può essere facilmente modificata mediante ligandi specifici per la cattura e la separazione di proteine e altre

biomolecole (Lu *et al.*, 2007; Minard-Basquin *et al.*, 2005; del Campo *et al.*, 2005) (Figura 1.8.).

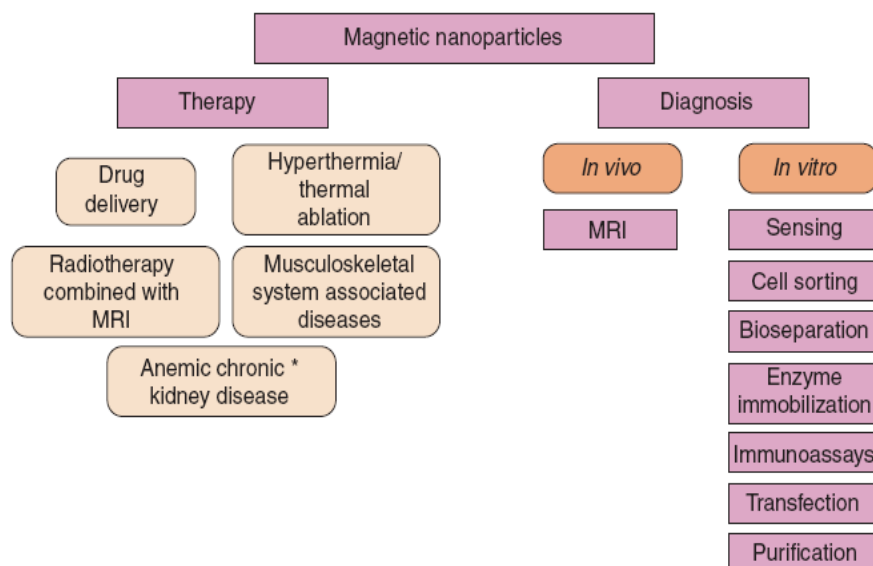


Figura 1.9: Potenziali applicazioni delle nanoparticelle magnetiche.

Recenti studi sui nanobiomateriali, indicano un crescente interesse nello sviluppo di nanoparticelle per la detection delle proteine-misfolding e la prevenzione ed il trattamento di alcune patologie ad esse correlate (Kogan *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2006).

Tali sistemi hanno dimostrato una notevole capacità di interferire nel processo di fibrillazione di alcune proteine in funzione delle proprietà della superficie d’interfaccia delle nanoparticelle quali la carica e il rapporto superficie attiva/volume. Varie tipologie di nanoparticelle (derivati acrilammidici, ossido di Cerio, quantum dots e nanotubi al carbonio) sono in grado di promuovere l’assemblaggio in vitro di proteina in fibrille amiloidi favorendo i processi di nucleazione (Linse *et al.*, 2007).

Inoltre, nanoparticelle metalliche (per esempio oro e palladio sono state usate per la metallizzazione in fibrille di peptidi sintetizzati, da 12 residui aminoacidici (Fu *et al.*, 2003; Reches *et al.*, 2006).

1.7.3. Interazioni proteine-nanoparticelle: effetti sulla conformazione delle proteine leganti nanoparticelle

Il ruolo chiave delle interazioni proteine-nanoparticelle in nanomedicina ed in nanotossicologia è emerso recentemente con lo sviluppo del concetto di nanoparticelle-proteine “corona”. Questo strato dinamico delle proteine (e di altre biomolecole) viene adsorbito alla superficie delle nanoparticelle, immediatamente dopo esserne venute a contatto. Nell’ambito dei biomateriali rimangono numerose questioni aperte riguardo alle nanoparticelle. L’adsorbimento di proteine sulla superficie delle nanoparticelle è altamente selettivo, sommato al fatto che queste possono localizzarsi in compartimenti subcellulari, determina uno straordinario impatto sull’interazione delle nanoparticelle/proteine e sulla fisiologia cellulare (Lynch e Dawson, 2008).

Le proteine sono costituite da catene di aminoacidi la cui esatta sequenza determina la forma, la struttura e la funzione della proteina. Le unità principali della struttura secondaria della proteina sono le α -eliche e i β -foglietti, e il riarrangiamento tridimensionale di queste costituisce la struttura terziaria della proteina stessa. La conformazione nativa di una proteina è strettamente controllata dalla complementarità di forma dei residui idrofobici che permettono l’impacchettamento in un core (Word *et al.*, 1999). Le proteine sono tuttavia marginalmente stabili perché le interazioni che governano la struttura nativa sono controbilanciate da una larga perdita di entropia associata al passaggio da una largo insieme di stati ad un più limitato set di conformazioni come pure da interazioni elettrostatiche presenti nella conformazione nativa (Kumar e Nussinov, 2001). In questo modo, l’interazione con una

superficie può facilmente distruggere la conformazione nativa e dunque, la funzione della proteina. Questo fenomeno è alla base dell'impatto biologico delle nanoparticelle. L'effetto della superficie chimica dei biomateriali sul processo di adsorbimento delle proteine è stato oggetto di grande interesse per molti anni. L'adsorbimento delle proteine ai vari materiali è stato ampiamente studiato e si è visto che fattori come interazioni elettrostatiche, interazioni idrofobiche e interazioni chimiche specifiche giocano un ruolo importante. L'assorbimento di proteine su vari adsorbenti sintetici è stato esaminato in differenti condizioni di pH e concentrazioni proteiche, ed in molti casi il meccanismo di adsorbimento è stato attribuito ad interazioni fondamentalmente di tipo elettrostatico (Arai e Norde, 1990). Più recentemente, differenti combinazioni di nanoparticelle e proteine sono state studiate usando diverse tecniche di risonanza come la surface plasmon resonance (SPR), la cromatografia (gel filtration) e la spettrometria di massa (Cedervall *et al.*, 2007a; Cedervall *et al.*, 2007b). Il legame di queste proteine sembra guidato dall'entropia come il risultato del rilascio dei legami dell'acqua, dalla superficie delle nanoparticelle, che porta ad una riduzione dell'entropia delle proteine che è compensata in maniera considerevole dall'incremento dell'entropia delle molecole di acqua, senza comportare cambiamenti conformazionali della proteina. Questo è stato confermato mediante spettroscopia a dicroismo circolare (CD) e mediante SPR.

La funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle con peptidi costituisce un approccio in forte crescita per sviluppare sistemi di studio e di controllo delle interazioni delle stesse con le proteine. (Aubin-Tam e Hamad-Schifferli, 2005; You, 2008).

I metodi comunemente utilizzati per lo studio dell'interazione delle nanoparticelle con le proteine, sono la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), isothermal titration calorimetry (ITC), SPR, DC, spettrometria di massa e spettroscopia a fluorescenza (Norde and Giacomelli, 2000; Cedervall *et al.*, 2007a; Cedervall *et al.*, 2007b). Promettenti applicazioni

delle nanoparticelle includono l'incremento della stabilità della proteina nei confronti della degradazione enzimatica e l'aumento dell'attività di enzimi mediante immobilizzazione sulla superficie.

E' stato dimostrato, infatti, che per alcuni enzimi adsorbiti sulle nanoparticelle in particolari condizioni di pH e temperatura, si ottiene un netto miglioramento della performance in termini di attività e selettività e della stabilità (Palocci *et al.*, 2007). L'abilità di migliorare la stabilità proteica interfacciando le stesse con nanomateriali potrebbe trovare numerosi campi d'applicazione, dal design alla diagnostica, come sensori e nel drug delivery (Asuri *et al.*, 2007).

1.7.4. Il potenziale ruolo delle nanoparticelle magnetiche sulla fibrillazione delle proteine

Le proteine amiloidogene sono un gruppo di proteine che si aggregano in determinate condizioni per formare strutture altamente insolubili chiamate "fibrille" le quali precipitano a formare placche. Questi aggregati sono coinvolti in diverse condizioni patologiche a decorso progressivo ed irreversibile (misfolding delle proteine), come il morbo di Alzheimer, il Parkinson ed encefalopatie spongiformi trasmissibili. Recentemente è stato riportato che nanoparticelle di diversa composizione (polimerica, di ossido di cerio, nanotubi al carbonio e quantum dots rivestiti con polietilenglicole (PEG) sono in grado di aumentare la velocità di fibrillazione della proteina amiloidogena β -2-microglobulina (Linse *et al.*, 2007). Un lavoro più recente di Bellezza (Bellezza *et al.*, 2007) suggerisce che interazioni della mioglobina (Mb) con nanoparticelle di zirconia inducono un significativo riarrangiamento nella struttura della proteina stessa, con in particolare, la perdita della struttura secondaria (α -eliche). Altre strutture di dimensioni nell'ordine dei nanometri sembrano indurre la fibrillazione delle proteine come per esempio i dendrimeri che interagiscono e perturbano la conformazione di polipeptidi, con particolare efficienza nei confronti delle strutture amiloidi. Vari dendrimeri

cationici hanno mostrato di possedere proprietà disgregative verso prioni aggregati, e sono quindi capaci di rimuovere molecole di prioni nello stato patologico (PrP^{Sc}) da cellule di neuroblastoma infettate da PrP^{Sc} e da omogenati di cervello contenenti PrP^{Sc} (Heegaard *et al.*, 2007). Tuttavia gli stessi dendrimeri hanno effetti variabili sulla stabilità di differenti proteine, suggerendo che non agiscono come generici denaturanti, ma piuttosto esercitano il loro effetto mediante specifiche interazioni con siti specifici di ciascuna proteina.

Gli effetti delle nanoparticelle magnetiche di magmite sulla formazione di fibrille di insulina, (come modello di proteina amiloidogena) sono state oggetto di studio di un gruppo di ricercatori israeliani (Skaat *et al.*, 2008). Questo studio descrive la sintesi e la caratterizzazione di nanoparticelle magnetiche assemblate selettivamente alle fibrille di insulina umana e la successiva rimozione della proteina dalla fase acquosa. Lo studio è stato in seguito esteso ad altre proteine amiloidogeniche coinvolte nell'Alzheimer, come la proteina fibrillare A β (40), la quale era marcata selettivamente con nanoparticelle magnetiche fluorescenti. Tale sistema ibrido era in grado di marcare selettivamente la proteina e di essere rimossa mediante campo magnetico, fruttando la combinazione della fluorescenza e del campo magnetico come sistema di rilevamento e rimozione della placche amiloidi nella diagnosi precoce (Skaat *et al.*, 2009).

2. SCOPO DEL LAVORO

I sistemi attualmente disponibili consentono esclusivamente una diagnosi *post mortem* delle malattie prioniche, e risulta pertanto di particolare interesse sviluppare test che ne consentano una diagnosi precoce. L'esigenza di un tale sistema è dettata anche dalle recenti scoperte sull'infettività prionica dei fluidi corporei, quali latte, urine, saliva, etc., in alcune TSE degli animali domestici e selvatici.

Numerosi studi evidenziano l'affinità tra le proteine amiloidogeniche, inclusa la proteina prionica e le nanoparticelle magnetiche di natura ferrosa, utilizzando, quasi esclusivamente, proteine ricombinanti in sistemi *in vitro*.

Sulla base di queste evidenze, l'obiettivo del presente lavoro è stato focalizzato sullo sviluppo di un modello sperimentale per la cattura della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) in fluidi biologici.

A tale scopo, sono state sintetizzate e caratterizzate nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro ed è stata valutata la loro capacità di cattura della proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) presente nel tessuto nervoso ovino di animali affetti da scrapie, allo stadio clinico terminale della malattia.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Sintesi e modificazione della superficie delle nanoparticelle magnetiche (NPM)

Le nanoparticelle magnetiche (NPM) sono state sintetizzate dalla Dr.ssa Vanna Annunziata Sanna, presso i laboratori della Prion Diagnostica di Porto Conte Ricerche –Alghero.

La sintesi delle nanoparticelle magnetiche (NPM) è stata condotta mediante il metodo della coprecipitazione di ioni ferrosi e ferrici in ambiente alcalino.

Le NPM sono state ottenute in dispersione acquosa ad una concentrazione di 8,30 mg/ml (p/v) e conservate a temperatura ambiente. Una parte della sospensione è stata liofilizzata ed utilizzata per le successive caratterizzazioni.

La superficie delle NPM è stata modificata mediante dispersione delle NPM in soluzioni 0,1M di solfato di rame CuSO_4 e solfato di manganese MnSO_4 (Sigma), per 30 minuti circa.

Le NPM sono state separate magneticamente e lavate 5 volte con acqua deionizzata per rimuovere l'eccesso di ioni non adsorbiti sulla superficie.

Caratterizzazione delle NPM

La morfologia e le dimensioni delle NPM sono state studiate mediante Microscopia Elettronica in Trasmissione (TEM), utilizzando lo strumento Zeiss M109; i campioni sono stati preparati depositando una goccia di sospensione diluita di nanoparticelle su una griglia rivestita di carbonio (400- mesh), e lasciando evaporare il solvente. La struttura è stata determinata mediante le tecniche di Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR) e Diffrazione di Raggi X (XRD). Gli spettri IR sono stati acquisiti tra 4000 e 400 cm^{-1} con lo strumento Nicolet Nexus sui campioni essiccati a 60°C ed inglobati in pastiglie di KBr (1% p/p). I dati acquisiti dall'analisi XRD con strumento Bruker D8 Advance, sono stati elaborati mediante il metodo Rietveld con un MAUD software.

Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle sono state misurate mediante un magnetometro SQUID (modello MPMS 5T).

3.2. Preparazione del campione biologico

Il nostro studio è stato eseguito su campioni di tessuto nervoso provenienti da ovini di razza Sarda affetti da scrapie e sacrificati allo stadio clinico terminale. La presenza di scrapie è stata determinata mediante Western blotting seguendo procedure convenzionali nel laboratorio di Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili dell'Istituto Zooprofilattico di Sassari. Da 5 campioni di pecore scrapie positivi con genotipo ARQ/ARQ e 3 campioni scrapie negativi con genotipo ARR/ARR, è stato prelevato l'obex a livello del tronco encefalico (Tabella 3.1).

Scrapie Status					
Scrapie positivi			Scrapie negativi		
Numero interno	ID capo	Genotipo	Numero interno	ID capo	Genotipo
C1	#1	ARQ/ARQ	C6	#28	ARR/ARR
C2	#5	ARQ/ARQ	C7	#14	ARR/ARR
C3	#8	ARQ/ARQ	C8	M-242336	ARR/ARR
C4	L48	ARQ/ARQ			
C5	B5566	ARQ/ARQ			

Tabella 3.1. Elenco dei campioni utilizzati nelle prove con il corrispondente status clinico, genotipo, identificativo capo (ID) e numero interno del laboratorio, col quale sono indicati i campioni esaminati nel corso del lavoro.

Le prove sperimentali sono state quindi condotte su campioni ottenuti disperdendo il tessuto nervoso infetto in soluzioni di PBS e in campioni di latte, preparati come di seguito descritto.

Tessuto nervoso in PBS

L'organo fresco (1gr di tessuto cerebrale) è stato omogenato in 5 ml di PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma) al 20% (w/v) concentrazione finale in provette tipo PrioCLIPTM/Prypcon (Prionics) con omogenizzatore Prio Genizer TM (Prionics).

Al fine di evitare il deterioramento dei campioni, con fasi di congelamento e scongelamento l'omogenato di ciascun campione è stato diviso in aliquote da 50 µl ciascuna e conservato a -20°C.

I campioni da utilizzare per la valutazione della capacità delle nanoparticelle di catturare PrP^{Sc} sono stati preparati come segue: 12,5 µl dell'omogenato al 20% (2,5 mg equivalenti di tessuto nervoso proveniente dai vari capi scrapie positivi) sono stati dispersi in 1, 5, 10, 30, 50, 100 e 200 ml di PBS.

Le prove di ottimizzazione del protocollo di incubazione, sono state condotte incubando il campione a tempi e temperature differenti: 1 ora a 20°C e over night a 4°C in agitazione orbitale.

Per la verifica dei limiti di rilevazione della PrP^{Sc} legata alle NPM 12,5 µl dell'omogenato al 20% (2,5 mg equivalenti di tessuto nervoso proveniente dai vari capi scrapie positivi) sono stati dispersi in 5 ml di PBS e poi diluiti serialmente in base due fino ad ottenere un soluzione con 0,018 mg di tessuto nervoso.

Recupero della PrP^{Sc} mediante centrifugazione

Per valutare la quantità di PrP^{Sc} totale recuperata dai campioni non trattati con NMP, gli omogenati dei campioni scrapie positivi sono stati preparati come descritto in precedenza: 2,5 mg equivalenti di tessuto nervoso omogenato sono stati dispersi in 5 ml di PBS addizionato di 50 µl in tampone di omogeneizzazione (0.01 M tris HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA pH 8,

1% Triton x 100, 0.5% sodio deossicolato) e direttamente centrifugati a 30,000g/30min/4°C (centrifuga MIKRO 22R refrigerata, Hettich).

Tessuto nervoso in latte: frazionamento e preparazione dei campioni di latte

Un campione di latte è stato raccolto da una pecora scrapie-free di razza Sarda (ARR/ARR).

Un'aliquota di latte intero di 24 ml è stata centrifugata a 2,000g/30min/4°C (centrifuga MIKRO 22R refrigerata, Hettich), ottenendo tre frazioni: la frazione lipidica (circa il 10-15%), quella proteica o interfase sierica contenente caseina, ed infine una frazione cellulare costituita da un pellet. La frazione lipidica è stata prelevata e risospesa (1: 2) in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).

La frazione sierica, è stata pretrattata con EDTA (Sigma-Aldrich) 0,5 M, pH 8 (5 mM v/v), diluita con PBS (1: 2) e omogenata uniformemente in agitazione continua per 20 minuti. Il pellet cellulare è stato lavato due volte con PBS e centrifugato a 1,200g/5min/4°C (centrifuga MIKRO 22R refrigerata, Hettich) al fine di eliminare residui della fase proteica, e risospeso in 5 ml di PBS.

A ciascuna delle tre frazioni sono stati aggiunti 2,5 mg di tessuto nervoso, proveniente da un omogenato scrapie-positivo (C5). Le tre fasi contenenti tutte la PrP^{Sc} esogena, sono state a questo punto trattate con le nanoparticelle secondo il protocollo di incubazione e lavorate in maniera indipendente.

3.3. Incubazione dei campioni con le NPM

I campioni di tessuto nervoso preparati come descritto in PBS e/o latte, sono stati trattati aggiungendo aliquote di 300 µl di sospensioni di nanoparticelle magnetiche a concentrazione 8,30 mg/ml, e di seguito incubati in diverse condizioni: (I) over night a 4°C in agitazione orbitale; (II) 1 ora a 20°C, in agitazione orbitale (agitatore Polymax 2040, Heidolph).

Le NPM sono state quindi raccolte dalla soluzione in PBS e dalle varie frazioni di latte (fase lipidica, interfase proteica e pellet cellulare), mediante applicazione di un magnete (Magnetic Separator, Invitrogen) sulla parete della provetta come mostrato in figura 3.1.

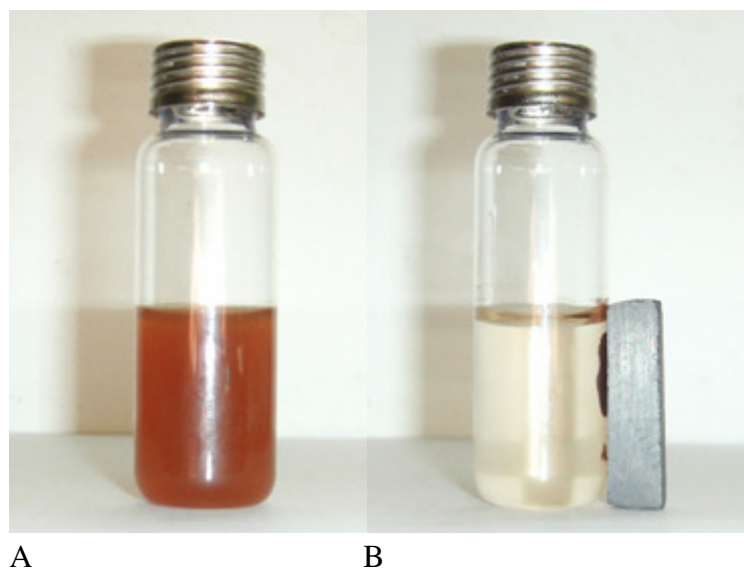


Figura 3.1: Tessuto nervoso scrapie positivo/NPM disperso nel tampone PBS prima (A) e dopo l'applicazione del campo magnetico (B).

Il pellet solido di NPM è stato isolato dalla soluzione, che per convenzione è stata chiamata fase liquida (FL) del campione. La frazione solida delle NPM di ciascun campione è stata lavata con 1 ml di PBS e centrifugata a 300g/20°C/2min (centrifuga Megafuge 1.0 R Benchtop Centrifuge, Heraeus), e di seguito incubata in stufa a secco (UM 400, Memmert) over night a 60°C per una completa disidratazione.

Dopo l'essiccamento, le NPM sono state risospese nei buffer di omogeneizzazione per la successiva analisi mediante i test di Western Blot ed ELISA per la ricerca della PrP^{Sc}. Le fasi liquide ottenute dopo separazione magnetica sono state centrifugate a 30,000g/30min/4°C (centrifuga MIKRO 22R refrigerata, Hettich), al fine di recuperare PrP^{Sc} non legata alle NPM.

I pellet ottenuti per centrifugazione delle fasi liquide, sono stati risospesi nei buffer di

omogeneizzazione per la successiva analisi mediante i test di Western Blot ed ELISA per la ricerca della PrP^{Sc}.

3.4. Analisi e rilevazione della PrP^{Sc}

Le NPM recuperate dopo separazione magnetica e le rimanenti frazioni liquide sono state analizzate mediante due differenti test ELISA (ELISA HerdChek Idexx e TeSeE™ Sheep/Goat Biorad) e il test Western blot per la ricerca della PrP^{Sc}.

Test ELISA HerdChek Idexx

Il test ELISA IDEXX HerdChek Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen è un saggio immunoenzimatico (EIA) a cattura di antigene per l'individuazione dell'isomero conformazionale anomalo della proteina prionica (PrP^{Sc}) nei tessuti cerebrali (preferibilmente l'obex) *post mortem* di bovini o piccoli ruminanti (pecore o capre) affetti da encefalopatia spongiforme bovina (BSE) o scrapie. Questo kit utilizza un metodo esclusivo concesso in licenza da Microsens Biotechnologies (Londra, Regno Unito) che consente l'identificazione dei prioni anomali grazie ad un legante specifico per la PrP^{Sc}, immobilizzato sulla superficie della piastra di cattura dell'antigene.

Le NPM e le rispettive fasi liquide recuperate sono state opportunamente mescolate con il diluente per piastra e trasferite nella piastra di cattura contenente l'antigene specifico per la PrP^{Sc}. Doppi pozzetti sono stati inoltre riservati per i controlli negativo e positivo del test. La piastra è stata incubata per 60 minuti in agitazione lenta (200±100 rpm) a temperatura ambiente e di seguito lavata 6 volte con 350 µl di soluzione di lavaggio indicata come 1 nel kit e contenente Sali.

I primi 2 lavaggi sono stati eseguiti manualmente per favorire il completo recupero delle NPM dal pozzetto, gli altri con il sistema di lavaggio automatizzato (lavatore per piastre ELISA Columbus, Tecan).

La piastra è stata in seguito reincubata distribuendo in ciascun pozzetto 100 µl di tampone di condizionamento per 10±1 minuti, successivamente rimosso e lavato 3 volte con 350 µl di soluzione 2 fornita nel kit.

La piastra è lasciata incubare 50 minuti a temperatura ambiente per favorire la reazione dell'antigene con un anticorpo specifico per la PrP, coniugato con la perossidasi di rafano (HRPO). Dopo incubazione è stato aggiunto il substrato per la perossidasi, lasciato agire per 15 minuti al buio, fino a sviluppare una colorazione correlata alla quantità di PrP^{Sc} catturata.

La piastra è stata letta automaticamente con un lettore di micropiastra (Tecan Sunrise) alla lunghezza d'onda di 450 nm (A_{450}) e una di riferimento (A_{REF}) di 620 nm-650 nm. Il programma Magellan 6 è stato utilizzato per calcolare tutti i relativi cut off.

Calcolo e interpretazione dei risultati

Affinché l'analisi possa essere considerata valida, la media del controllo negativo (NCx) deve corrispondere ad un valore $A_{450} - A_{REF}$ inferiore a 0,150 e la media del controllo positivo (PCx) deve avere un valore $A_{450} - A_{REF} \geq 0,400$.

L'interpretazione dei risultati basati sui valori di assorbanza dei campioni viene fatta calcolando il valore limite di cut off che per piccoli ruminanti è uguale alla media di NCx + 0,180. Se la differenza $A_{450} - A_{REF}$ è inferiore al valore limite, il campione è considerato negativo dal test, se è superiore o uguale al valore limite è classificato positivo.

Test TeSeE™ Sheep/Goat Biorad

L'analisi per la ricerca della PrP^{Sc} è stata condotta con un secondo test immunoenzimatico, il test ELISA TeSeE™ sheep/goat. Tale determinazione comprende due procedure di reazione mediante utilizzo di un kit per la purificazione del campione (Kit di Purificazione TeSeE™ sheep/goat) e uno di rilevazione (Kit di Rilevazione TeSeE™ sheep/goat). Nella procedura di purificazione, la PrP^{Sc} legata alle NPM è stata selettivamente purificata mediante il trattamento di 250 µl di proteinasi K (pK) ricostituita in ciascuna microprovetta, dopo opportuna omogeneizzazione (con il tampone fornito dal kit) è incubata in blocco riscaldante a 37±2°C per 10 ±1 minuti.

Ciascun campione è stato aggiunto di 250 µl di tampone di precipitazione e centrifugato a 15,000g/7min/20°C (microcentrifuga serie 5415-D, Eppendorf). Il sopranatante è stato completamente rimosso e in seguito, al pellet rimanente del campione è stato aggiunto il tampone di solubilizzazione (25 µl) e denaturato a 100°C per 5±1 minuti.

Per la procedura di rilevazione, i campioni purificati, sono stati diluiti con 125 µl di diluente e aliquotati in piastre da microtitolazione, nella quale l'anticorpo monoclonale primario era già legato. La piastra è stata dunque incubata per 75±15 minuti a 37±2°C. Si è quindi proceduto con tre cicli di buffer di lavaggio, fornito al kit, mediante sistema di lavaggio automatico per piastre (Immuno Wash 1575, BioRad) e successiva rimozione delle NPM; il primo lavaggio è stato eseguito manualmente per favorire il completo recupero delle NPM dal pozzetto. Per rilevare la PrP^{Sc} nella piastra è stato distribuito l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi e lasciata incubare a 60±15 minuti.

La piastra è stata successivamente lavata con altri tre cicli di buffer di lavaggio e reincubata con la soluzione di rivelazione al buio e a temperatura ambiente per 30±5 minuti. Una soluzione d'arresto è stata usata per bloccare la reazione di sviluppo cromatico ed è stata

quindi determinata la densità ottica in lettura bicromatica a 450 nm -620 nm mediante lettore per piastre ELISA (Microplate Reader 680, BioRad).

Calcolo e interpretazione dei risultati.

Il calcolo della densità ottica (OD) media del controllo negativo, è dato dalla media dei quattro valori negativi. La densità ottica di ciascun controllo negativo deve essere inferiore a 0,100. Il calcolo del valore soglia è pari alla media dei valori negativi addizionato a 0,140. La media delle densità ottiche dei controlli positivi deve essere superiore o uguale a 0,800 (OD). Sono stati considerati negativi tutti i valori sotto la soglia della media dei controlli negativi (valore soglia = 0,160).

Western Blotting (WB)

Il campione biologico preparato e trattato con NPM, come descritto in precedenza, è stato sottoposto ad analisi per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'utilizzo del test Western Blot. Tutti i campioni sono stati risospesi, in tampone di omogeneizzazione (0.01 M tris HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 1% Triton x 100, 0.5% sodio deossicolato).

Digestione con Proteinasi K: ogni campione omogenato è stato sottoposto a digestione in termoblocco per 60 minuti a 49°C con 100 µg/ml di proteinasi K (Roche). Al termine della digestione l'attività della proteinasi K è stata interrotta mediante denaturazione con Fluoruro di fenilmetansulfonile (PMSF). I campioni sono stati quindi centrifugati a 30,000g per 30 minuti a 4°C, ed i pellet risospesi in loading buffer, denaturati a 95°C.

Elettroforesi: successivamente i campioni sono stati caricati su gel Nu-Page 12% bis-tris e sottoposti ad elettroforesi in SDS Page. La corsa elettroforetica è stata eseguita ad un potenziale elettrico costante di 70-90 V per 90 minuti.

Blotting e rivelazione immunologica: al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrane polivinilidene fluoruro (PVDF, Millipore 0.45 µm) mediante applicazione di un voltaggio pari a 150 V per 1 ora.

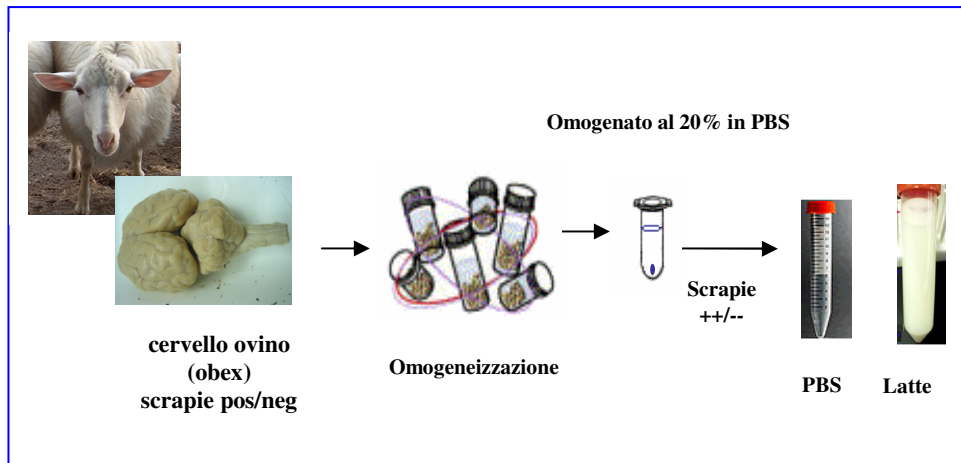
La presenza di PrP^{Sc} è stata rilevata mediante incubazione overnight a temperatura di 4°C in condizioni statiche con l'anticorpo monoclonale P4 (R-Biopharm), diluito 1:20,000. Al termine dell'incubazione la membrana è stata sottoposta a vari lavaggi in TBS Tween (10 mM Tris HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20), ed incubata con l'anticorpo secondario (Dako) anti-IgG di mouse coniugato con fosfatasi alcalina, diluito 1:5,000, per 40 minuti a temperatura ambiente in agitazione continua.

La membrana di PVDF è stata di seguito lavata più volte in TBS-T, incubata in buffer di chemiluminiscenza per 8 minuti e con il substrato CDP-Star per 1 – 3 minuti.

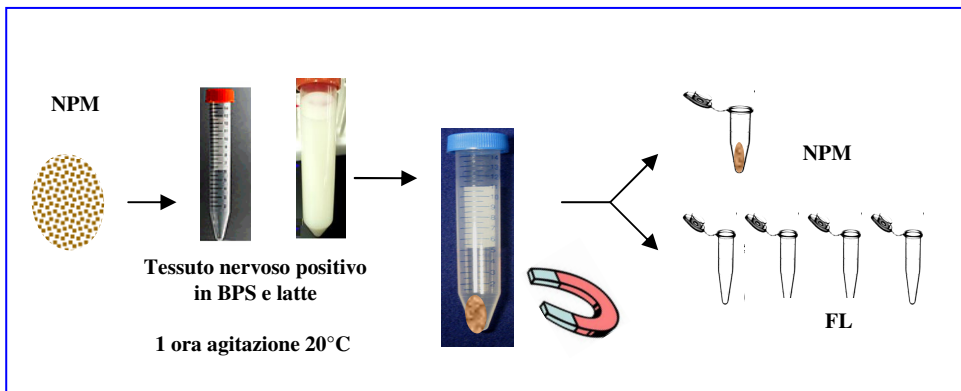
Le bande proteiche sono state rilevate mediante impressione della lastra autoradiografica per 5 – 20 minuti.

La figura 3.2 riassume i passaggi di preparazione e incubazione dei campioni con le NMP e la successiva rilevazione della PrP^{Sc} legata alle NPM.

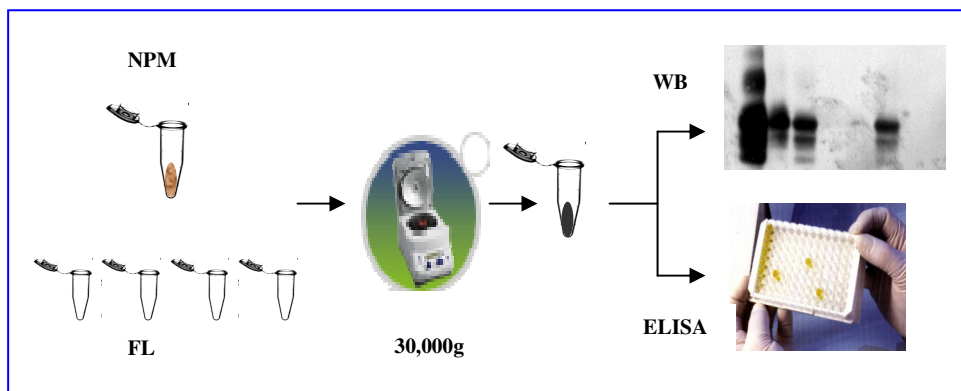
Figura 3.2. Schema riassuntivo delle fasi di preparazione e incubazione del campione e successivo rilevamento della PrP^{Sc} con i test immunobiochimici.



A. Preparazione dei campioni di tessuto nervoso in buffer e latte.



B. Incubazione del campione con le NPM e separazione mediante magnete.



C. Precipitazione della PrP^{Sc} mediante centrifugazione e rilevazione con ELISA e WB.

4. RISULTATI

4.1. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione

L'immagine TEM delle NPM (figura 4.1) ha dimostrato che le nanoparticelle magnetiche hanno forma sferica e dimensioni di circa $16,6 \pm 1,14$ nm. Le dimensioni calcolate rappresentano la media di circa 100 nanoparticelle.

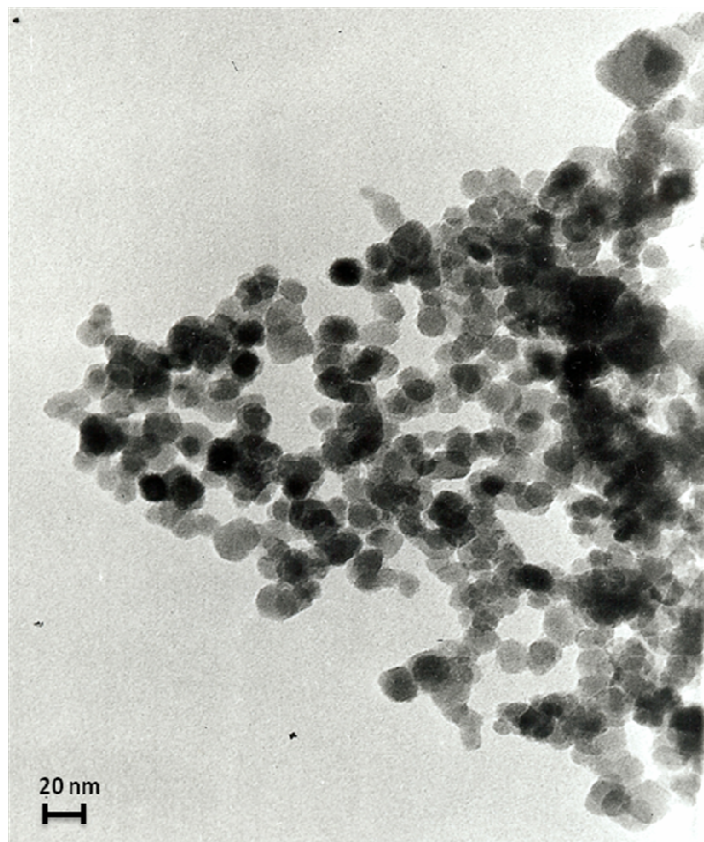


Figura 4.1: Fotografia al TEM delle nanoparticelle magnetiche.

4.2. Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR) e Diffrazione di Raggi X (XRD)

Lo spettro FT-IR delle NPM (figura 4.2) è caratterizzato dalla presenza di un'ampia banda oltre 3250 cm^{-1} e intorno a 1600 cm^{-1} , dovute alla vibrazione di stretching degli -OH presenti e alla vibrazione di bending H-O-H dell'acqua assorbita sulla superficie, rispettivamente. L'ampio picco a 576 cm^{-1} corrisponde allo stretching vibrazionale del legame Fe-O.

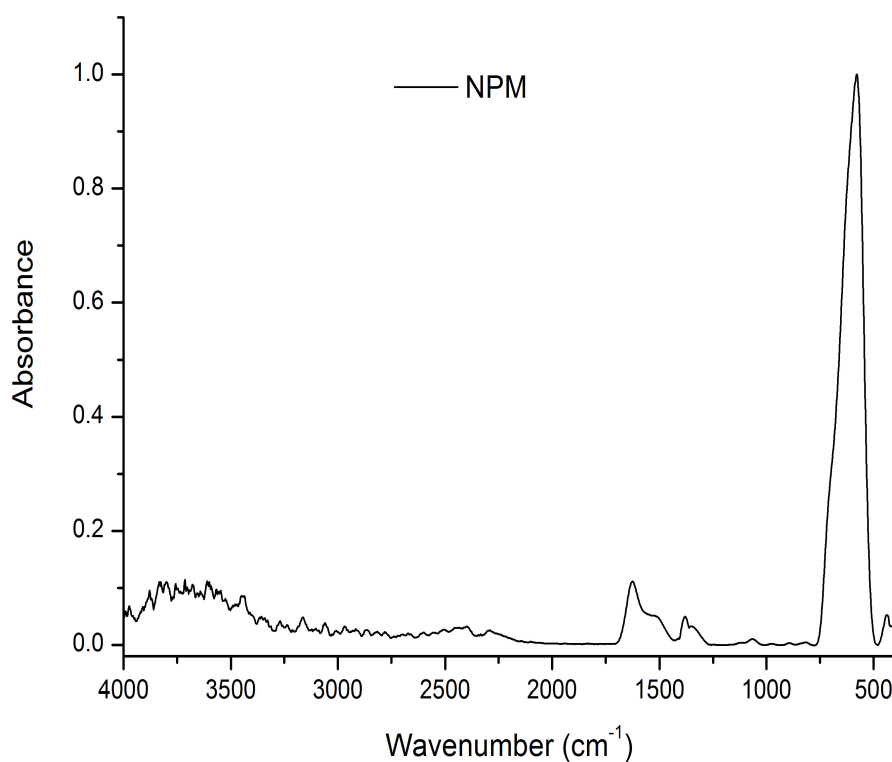


Figura 4.2: Spettro di assorbimento FTIR delle nanoparticelle magnetiche.

La struttura cristallina delle nanoparticelle magnetiche è stata analizzata mediante diffrazione a raggi X ed il pattern XRD ottenuto è riportato in figura 4.3.

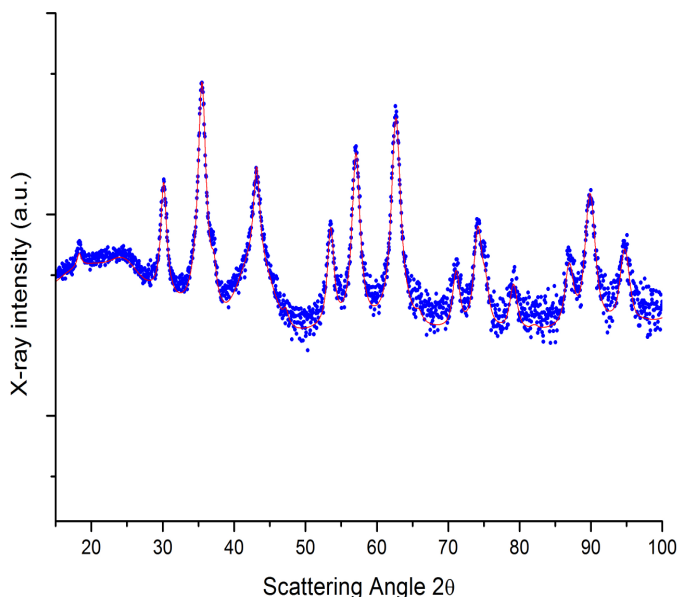


Figura 4.3: Pattern XRD delle nanoparticelle magnetiche.

Tutti i picchi di diffrazione ottenuti per le NPM possono essere attribuiti a caratteristiche fasi dell'ossido di ferro rappresentate dalla maghemite, ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o magnetite (Fe_3O_4). Le dimensioni medie del cristallite calcolate risultano pari a 15 ± 2 nm. Tali risultati confermano che la procedura di sintesi utilizzata non porta alla formazione di altre fasi indesiderate come ematite cristallina ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o idrossidi di Fe.

4.3. Analisi delle proprietà magnetiche

Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle sono state studiate mediante un magnetometro sottoponendole ad un campo magnetico d'intensità compresa tra ± 60 kOe e alla temperatura di 5K. La figura 4.4 conferma che la curva d'isteresi relativa alle NPM preparate, presenta il

caratteristico profilo dei materiali superparamagnetici, con valori di magnetizzazione elevati che raggiungono 76 emu/g.

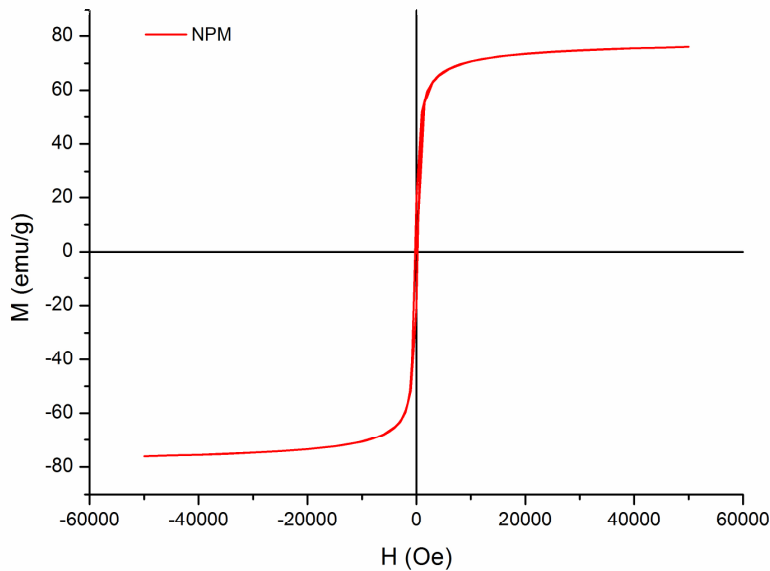


Figura 4.4: Curva di isteresi relativa alle prove di magnetizzazione delle NPM.

4.4. Rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle nanoparticelle magnetiche (NPM)

4.4.1. Verifica della presenza di PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM mediante test ELISA BioRad

La PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM è rilevata con il test ELISA BioRad da diversi volumi di buffer PBS (1, 5, 10, 30, 50, 100, 200 ml) contenenti la stessa quantità di tessuto nervoso (2,5 mg) scrapie positivo (C5).

Nella figura 4.5 sono riportati i valori di OD relativi al cut off delle NPM recuperate e della rimanente fase liquida correlata ai diversi volumi di PBS usati, il confronto con la PrP^{Sc} recuperata mediante centrifugazione e un controllo scrapie negativo.

Per i diversi volumi utilizzati, i valori di densità ottica (OD), sono risultati variabili, ma tutti nettamente superiori al cut off (OD 0,151), confermando la presenza di PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM, mentre il campione scrapie negativo di controllo (C8) non esibisce nessuna positività. E' importante notare che per le rispettive fasi liquide i valori di OD ottenuti sono inferiori al cut off, ad indicare che la PrP^{Sc} non è presente in tali frazioni. Il recupero totale della PrP^{Sc} mediante centrifugazione, esibisce un valore di OD maggiore a quello delle NPM.

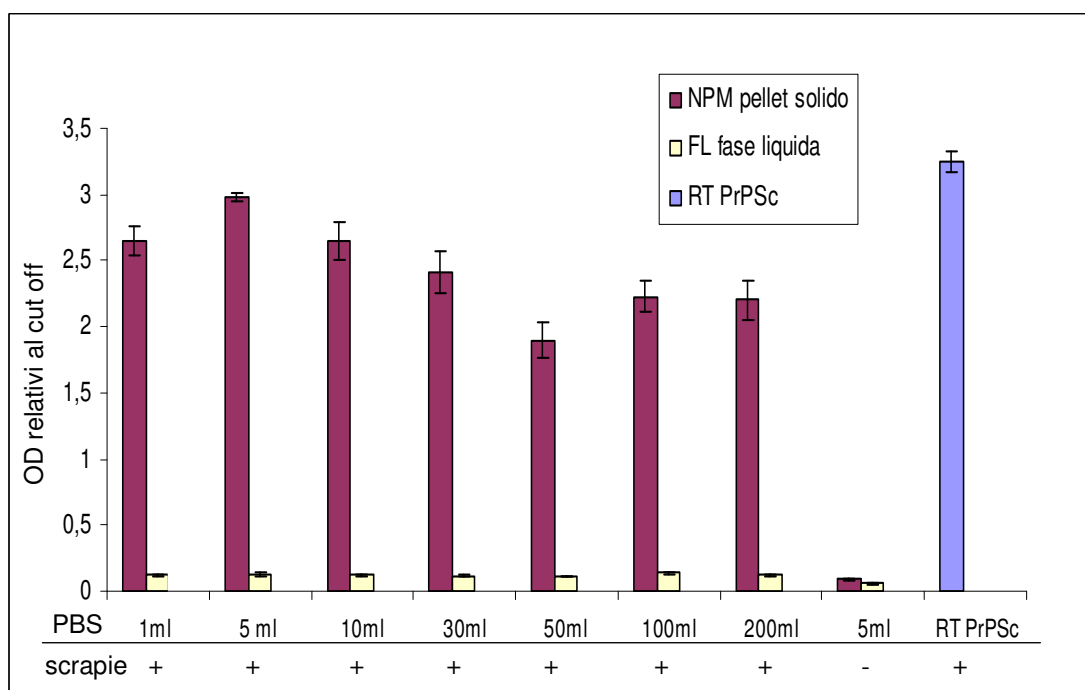


Figura 4.5: Rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM, mediante ELISA BioRad.

L'istogramma rappresenta le risposte relative al cut off (OD 0,151) delle NPM (viola) e della rimanente fase liquida (FL) (giallo) dopo rimozione con il magnete dai campioni scrapie positivi (+) e negativo (-). In blu è riportata la PrP^{Sc} totale (RT PrP^{Sc}) recuperata mediante centrifugazione da 5 ml di PBS. I valori riportati risultano dalla media±DS del campione analizzato in doppio.

4.4.2. Verifica della presenza di PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM mediante test ELISA Idexx

Sulla base dei risultati precedenti, la capacità di recupero della PrP^{Sc} con le NPM, mediante test ELISA Idexx, è stata valutata selezionando volumi di PBS pari a 1, 5 e 10 ml contenuti di 2,5 mg di tessuto nervoso scrapie positivo (C5) (figura 4.6). Il test conferma la capacità di recupero di PrP^{Sc} dalle soluzioni in PBS da parte delle NPM, esibendo valori di OD simili per tutti e tre i volumi analizzati, quindi, con efficienza di recupero della PrP^{Sc} pressoché

omogenea. Analogamente ai risultati ottenuti al test Biorad le fasi liquide risultano negative, mentre, il recupero totale della PrP^{Sc} mediante centrifugazione esibisce valori confrontabili a quelli relativi alle NPM.

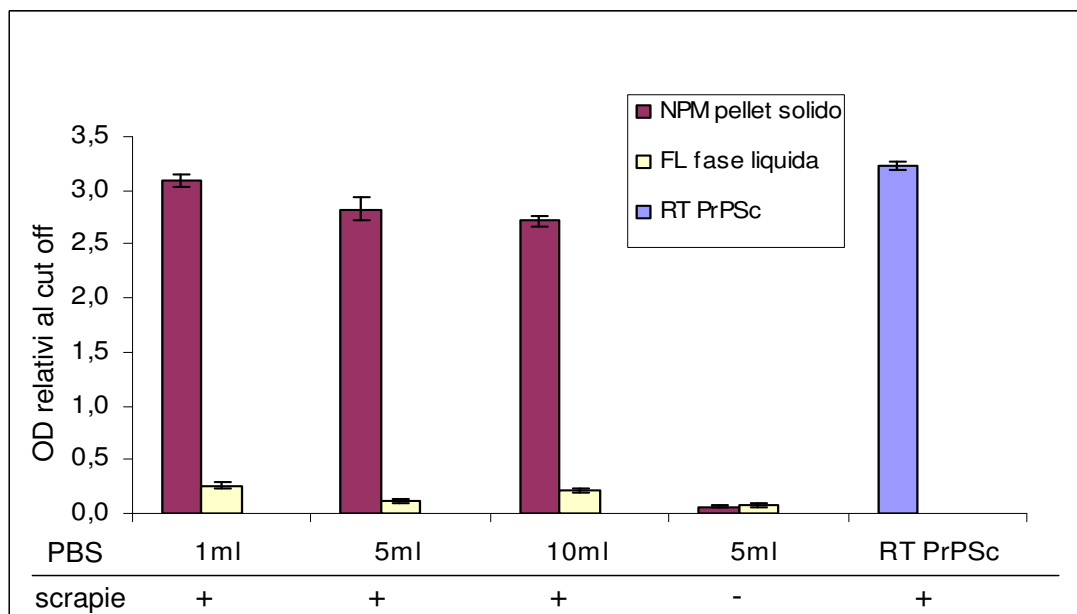


Figura 4.6: Rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM, mediante ELISA Idexx.

L'istogramma rappresenta le risposte relative al cut off (DO 0,209) delle NPM (viola) e della rimanente fase liquida (FL) (giallo) dopo rimozione con il magnete dai campioni scrapie positivi (+) e negativo (-). In blu è riportata la PrP^{Sc} totale (RT PrP^{Sc}) recuperata mediante centrifugazione da 5 ml di PBS. I valori riportati risultano dalla media±DS del campione analizzato in doppio.

4.4.3. Verifica della presenza di PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM in differenti isolati di scrapie

Allo scopo di verificare l'attività delle NPM su campioni provenienti da diversi animali affetti da scrapie, il test ELISA Idexx è stato eseguito su tre differenti campioni scrapie positivi (C1, C2 e C3) e uno scrapie negativo di controllo (C6) utilizzando una concentrazione di tessuto nervoso di 2,5 mg in 5 ml di PBS.

Per ciascun campione è riportato nella figura 4.7 il confronto tra la PrP^{Sc} recuperata mediante centrifugazione e le quantità recuperate dalle NPM e dalle fasi liquide rispettivamente. In tutti i campioni trattati, i valori di OD ottenuti dall'analisi dei pellet NPM presentano positività

superiori al cut off (OD 0,217) e risultano confrontabili con i rispettivi valori di recupero totale della PrP^{Sc}.

L'analisi eseguita sulla fase liquida, sottoposta a centrifugazione per il recupero della PrP^{Sc} non legata, mostra valori di OD inferiori al cut off per i campioni C1 e C3, mentre per il campione C2 i valori di OD sono leggermente superiori al cut off (OD 0,320), sebbene siano da considerarsi negativi alti per i parametri del test. Inoltre, anche in questa prova il campione scrapie negativo di controllo (C6) non esibisce nessuna positività.

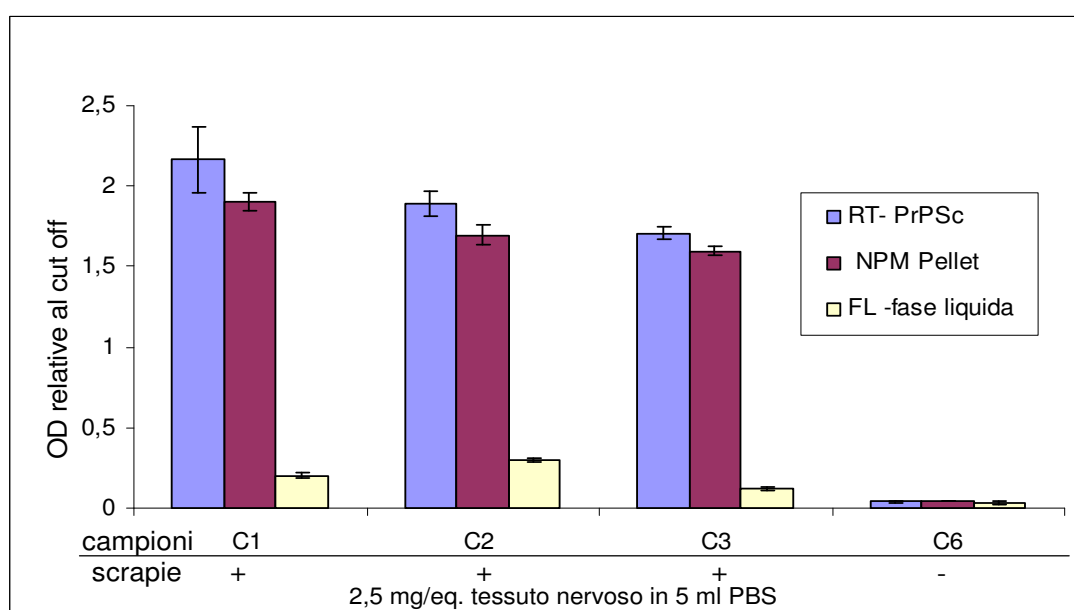


Figura 4.7: Rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM in tre differenti campioni di tessuto nervoso.

L'istogramma rappresenta le risposte relative al cut off (OD 0,217) delle NPM (viola) e della rimanente fase liquida (FL) (giallo) dopo rimozione con il magnete. I valori di OD relativi alle NPM recuperate mediante magnete dai tre campioni positivi, mostrano positività superiori al cut off, rispetto al controllo negativo. In blu è riportata la PrP^{Sc} totale (RT PrP^{Sc}) recuperata mediante centrifugazione per ciascun campione da 5 ml di BPS. I valori riportati risultano dalla media±DS del campione analizzato in doppio.

Gli stessi campioni sono stati analizzati mediante WB ed i risultati sono riportati nella figura 4.8. Il pattern elettroforetico relativo alle NPM dei tre campioni diversi di tessuto nervoso, mostra il caratteristico profilo molecolare (tra i 30 e 21 kD) della PrP^{Sc} di ciascun isolato di cervello scrapie positivo. Nelle rispettive fasi liquide è invece ben visibile solo la banda

relativa alla rimanente proteinasi, a seguito della digestione dei campioni con proteinasi K, che dimostra la negatività della frazione analizzata.

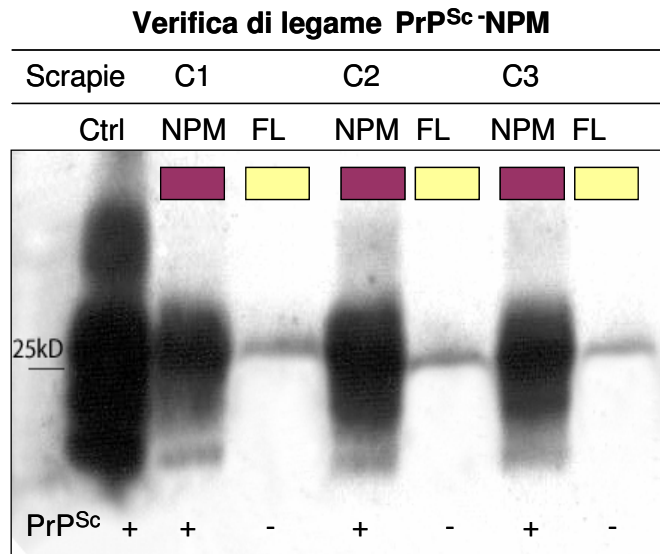


Figura 4.8: Rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM in tre differenti campioni di tessuto nervoso, mediante Western Blot (WB).

Rilevazione di PrP^{Sc} legata alle NPM mediante test WB da tre campioni scrapie positivi (C1, C2, C3) dopo analisi di pellet NPM (viola) e fasi liquide (FL) (giallo). Nell'immagine sono rappresentati i pattern elettroforetici della proteina prionica (PrP^{Sc} +) rilevata dalle NPM per ciascun campione. Le fasi liquide non mostrano il pattern molecolare tipico del prione (PrP^{Sc}-). Controllo standard positivo, non incubato con le NPM (Ctrl Scr+); Tutti i campioni sono stati digeriti con proteinasi K (pK +).

4.4.4. Valutazione dell'influenza di differenti tempi e temperature d'incubazione sulla cattura di PrP^{Sc} mediante NPM

Due campioni scrapie positivi (C4 e C5) e un campione scrapie negativo (C7) (2,5 mg tessuto nervoso), ciascuno diluito in 5 ml di PBS, sono stati incubati con le NPM over night a 4°C e 1 ora a 20°C in agitazione orbitale prima della separazione delle NPM con il magnete. Come mostrato in figura 4.9 i valori di OD dei pellet NPM dei campioni C4 e C5 mostrano positività superiori al cut off (OD 0,209) e non risultano differenze rilevanti dai diversi protocolli impiegati. Questi risultati suggeriscono pertanto che il tempo e la temperatura non sono parametri che influenzano in maniera sostanziale il comportamento e l'attività delle NPM.

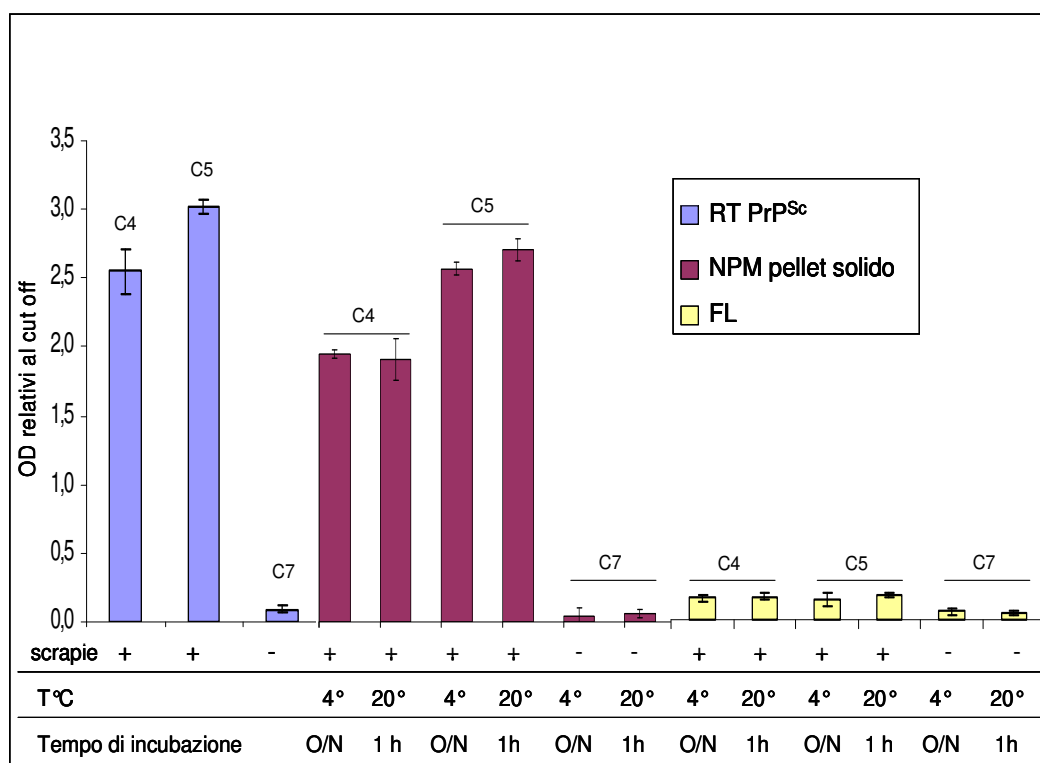


Figura 4.9: PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM è rilevata a tempi e temperature di incubazione differenti, mediante test ELISA Idexx.

L'istogramma rappresenta le risposte relative al cut off (OD 0,209) dei pellet NPM (viola) e della fase liquida (FL) (giallo) dopo rimozione con il magnete per ciascun campione positivo (C4 e C5) per il negativo (C7); temperatura d'incubazione (T°C) e il tempo di incubazione: over night (O/N) e 1 ora (1h). In blu è riportata la PrP^{Sc} totale (RT PrP^{Sc}) recuperata mediante centrifugazione per ciascun campione da 5 ml di PBS. I valori riportati risultano dalla media±DS del campione analizzato in triplo.

4.5. Limiti della rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM

Per valutare i limiti della rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM i test sono stati eseguiti utilizzando concentrazioni scalari di omogenato di tessuto nervoso proveniente da due cervelli ovini con scrapie (C1 e C5) con il sistema ELISA Biorad, ELISA Idexx e Western blot (WB). Per il sistema ELISA (Idexx e Biorad) sono state testate concentrazioni tessuto nervoso da 2,5 a 0,037 mg in 5 ml di PBS.

Dai risultati del test ELISA Idexx (figura 4.10a) si osserva un comportamento analogo tra i due diversi campioni C1 e C5 utilizzati e caratterizzato da una correlazione proporzionale tra i valori di OD ottenuti e le concentrazioni di tessuto nervoso impiegate.

La PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM è stata rilevata con valori di OD superiori al cut off (OD 0,220) fino alla concentrazione di 0,075 mg, mentre a 0,037 mg di tessuto nervoso, i valori sono al limite del cut off. In tutte le soluzioni esaminate, la fase liquida rimasta, dopo la separazione magnetica delle NPM, è negativa alla presenza di PrP^{Sc}

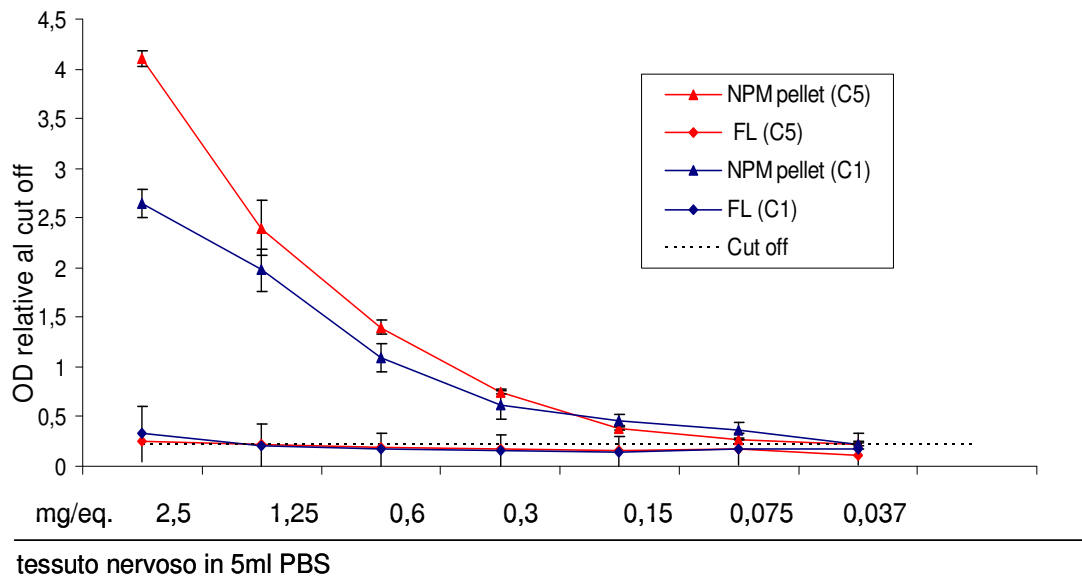


Figura 4.10a: La PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM è rilevata in soluzioni di PBS con quantità scalari di tessuto nervoso infetto (2,5 mg - 0,037 mg), mediante test ELISA Idexx.

Il grafico mostra le OD rilevate per i due campioni nell'analisi delle NPM (C5 triangolo rosso, C1 quadrato blu) alle differenti concentrazioni. I valori di OD relativi alla fase liquida (FL) per ciascun campione (C5 triangolo rosso, C1 quadrato blu) sono sotto il cut off OD 0,220 (linea nera tratteggiata). I valori riportati risultano dalla media±DS del campione analizzato in triplo.

Analogamente, la stessa prova condotta mediante test ELISA Biorad (figura 4.10b), mostra che i valori di OD relativi al segnale della PrP^{Sc}, rilevato dalle NPM decrescono al diminuire della concentrazione usata e risultano superiori al cut off fino alla concentrazione di 0,075 mg, mentre a 0,037 mg di tessuto nervoso, sono al limite del cut off. In tutte le soluzioni esaminate, la fase liquida rimasta, dopo la separazione magnetica delle NPM, è negativa alla presenza di PrP^{Sc}.

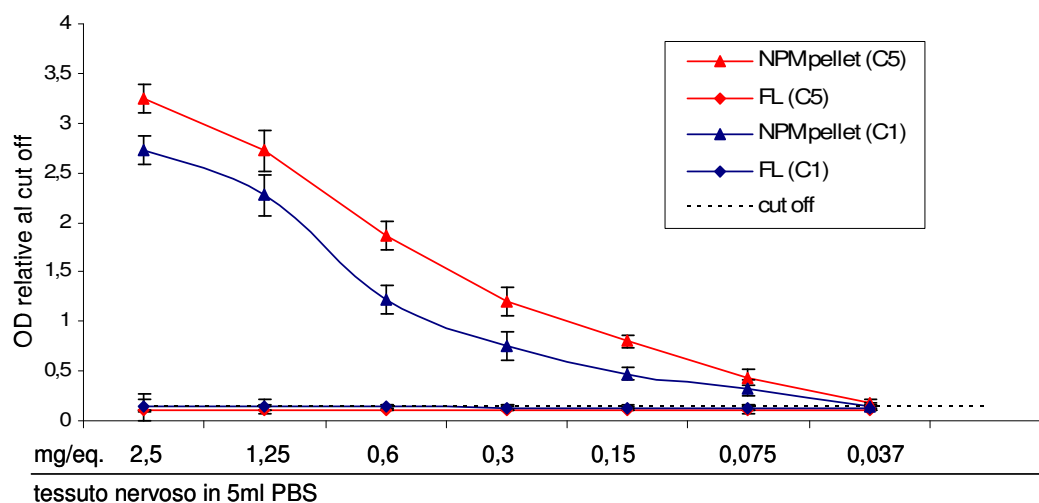


Figura 4.10b: La PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM è rilevata in soluzioni di PBS con quantità scalari di tessuto nervoso infetto (2,5mg - 0,037mg), mediante test ELISA BioRad.

Il grafico mostra le OD rilevate per i due campioni nell'analisi delle NPM (C5 triangolo rosso, C1 quadrato blu) alle differenti concentrazioni. I valori OD relativi alla fase liquida (FL) per ciascun campione (C5 triangolo rosso, C1 quadrato blu) sono sotto il cut off OD 0,151 (linea nera tratteggiata). I valori riportati risultano dalla media±DS del campione analizzato in triplo.

Come illustrato in figura 4.11, l'analisi al WB conferma la capacità delle nanoparticelle di legare e catturare PrP^{Sc} in soluzioni di PBS contenenti quantità di tessuto nervoso fino a 0,018 mg. Il pattern elettroforetico relativo alle NPM mostra il caratteristico profilo molecolare (tra i 30 e 21 kD) della PrP^{Sc}, mentre nelle rispettive fasi liquide è invece ben visibile solo la banda relativa alla rimanente proteinasi che ne conferma la negatività.

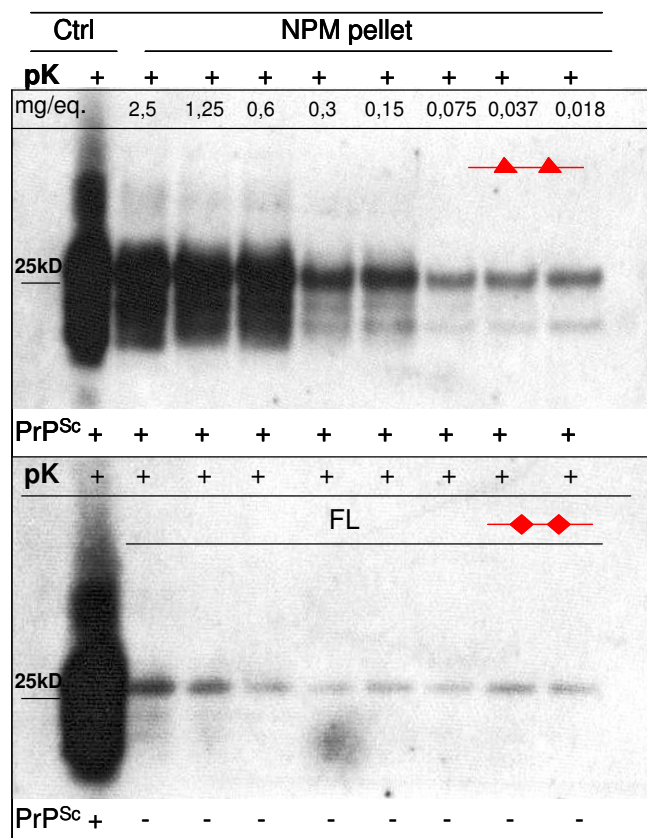


Figura 4.11: La PrP^{Sc} adsorbita alle NPM è rilevata in soluzioni di PBS con quantità scalari di tessuto nervoso infetto (2,5mg - 0,018mg), mediante Western Blot.

Nell'immagine sono rappresentati i pattern elettroforetici della proteina prionica (PrP^{Sc}+) rilevata dalle NPM dal campione (triangolo rosso relativo al campione C5). Le fasi liquide (FL) (rombo rosso relativo al campione C5) non mostrano il pattern molecolare tipico del prione (PrP^{Sc}-). Controllo positivo, non incubato con le NPM (Ctrl Scr+); Tutti i campioni sono stati digeriti con proteinasi K (pK +).

4.6. Valutazione della capacità di recupero della PrP^{Sc} mediante NPM

Per valutare la capacità di recupero della PrP^{Sc} dopo trattamento con NPM sono stati utilizzati tre differenti isolati di scrapie (C1, C2 e C5). La PrP^{Sc} recuperata dalla soluzione di PBS dopo separazione magnetica è stata comparata con quella recuperata mediante centrifugazione. Come osservato nelle precedenti prove, anche in questo caso in tutti i campioni, i valori di OD relativi alle NPM risultano inferiori a quelli rilevati dai campioni centrifugati (Figura 4.12a).

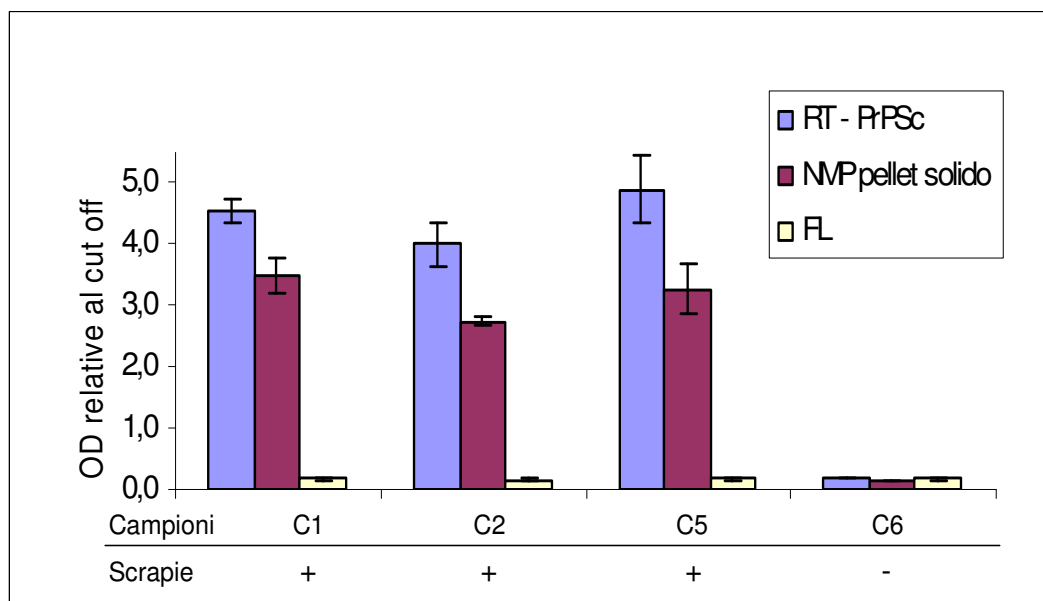


Figura 4.12a: La PrP^{Sc} recuperata mediante NPM e per centrifugazione.

Tre campioni scrapie positivi (C1, C2, C3) sono stati analizzati per la presenza di PrP^{Sc} legata alle NPM e recuperata mediante centrifugazione. L'istogramma mostra le OD relative alla PrP^{Sc} isolata dalle NPM (PrP^{Sc}-NPM) (viola) e per mezzo della centrifugazione (RT indica il recupero totale di PrP^{Sc} mediante centrifugazione) (blu). I valori sono risultati superiori al cut off (0,221) in entrambe le analisi, con OD più elevate nei campioni centrifugati, rispetto alle NPM, nonostante l'analisi delle fasi liquide (FL) (giallo), dopo separazione magnetica, risultino negative. I valori riportati risultano dalla media \pm DS del campione analizzato in triplo.

Partendo dall'evidenza che la quantità di PrP^{Sc} recuperata con le NPM è risultata sempre inferiore a quella ottenuta con il metodo della centrifugazione diretta e comunque nelle rispettive fasi liquide non era presente la PrP^{Sc}, si è pensato di recuperare le NPM analizzate e sottoporle ad un ulteriore test ELISA Idexx.

I valori di OD ottenuti dalla seconda rilevazione riportati in figura 4.12b sono risultati notevolmente superiori al cut off (OD 0,206) per tutti i campioni analizzati suggerendo pertanto che durante la prima analisi il recupero della PrP^{Sc} non sia stato effettivamente completo.

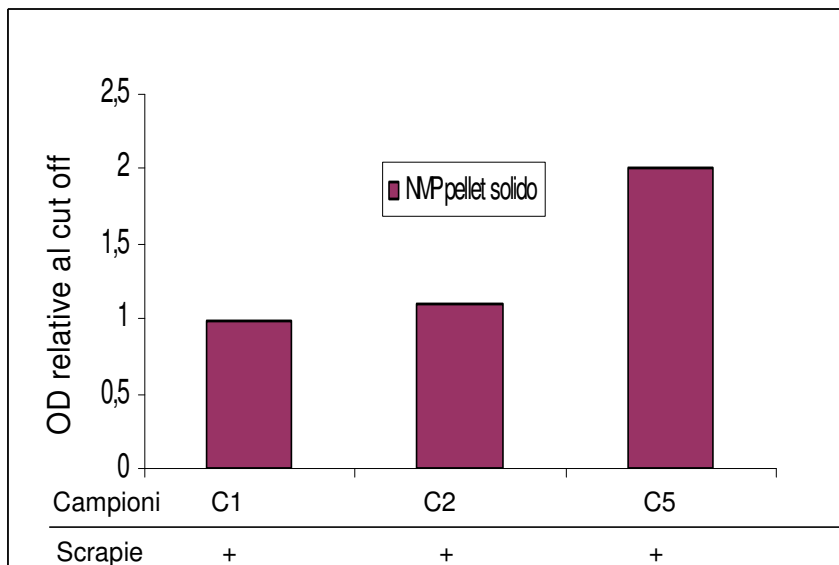


Figura 4.12b: PrP^{Sc} adsorbita alle NPM e rilevata degli stessi campioni (C1, C2 e C5) in una seconda analisi con test ELISA Idexx.

L'istogramma mostra le positività alla PrP^{Sc}, rilevate dalle NPM dei campioni testati nella prova precedente e rianalizzati al test ELISA con valori di assorbanza superiori al cut off (OD 0,219).

4.7. Modificazione della superficie delle NPM, mediante funzionalizzazione con ioni bivalenti Cu²⁺ e Mn²⁺ e analisi mediante ELISA e WB

Recenti dati di letteratura hanno confermato un'elevata affinità della proteina prionica nei confronti di diversi metalli di transizione, in particolare Cu, Mn, Zn e Ni, che sembra avere un ruolo essenziale anche nel promuovere la conversione conformazionale della proteina dall'isoforma cellulare a quella patologica (Zhu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005).

E' risultato pertanto interessante indagare il comportamento delle NPM utilizzate in questo studio in seguito a modifica della loro superficie con alcuni di questi ioni (Cu e Mn).

L'analisi della PrP^{Sc} adsorbita sulle NPM funzionalizzate sulla superficie con gli ioni bivalenti Cu²⁺ e Mn²⁺ (indicate come NPM-Cu e NPM-Mn), è stata eseguita su un campione di cervello scrapie positivo (C5). Il campione è stato preparato a concentrazioni scalari di tessuto (da 2,5 a 0,3 mg) in 5 ml di PBS e testato, dopo trattamento con NMP non

funzionalizzate, NPM-Cu e NPM-Mn, mediante ELISA Idexx. I risultati, riportati in figura 4.13, mostrano che per tutte le NPM utilizzate, i valori di OD risultano sopra il cut off (OD 0,268) per tutte le concentrazioni di tessuto e diminuiscono proporzionalmente al diminuire delle stesse concentrazioni.

Inoltre, i valori di OD sono superiori nelle NPM funzionalizzate con Cu, mentre non si osservano sostanziali differenze tra le NPM e NPM-Mn.

L'analisi delle fasi liquide ottenute dopo la rimozione delle NPM, evidenzia l'assenza di PrP^{Sc} con valori di OD inferiori al cut off.

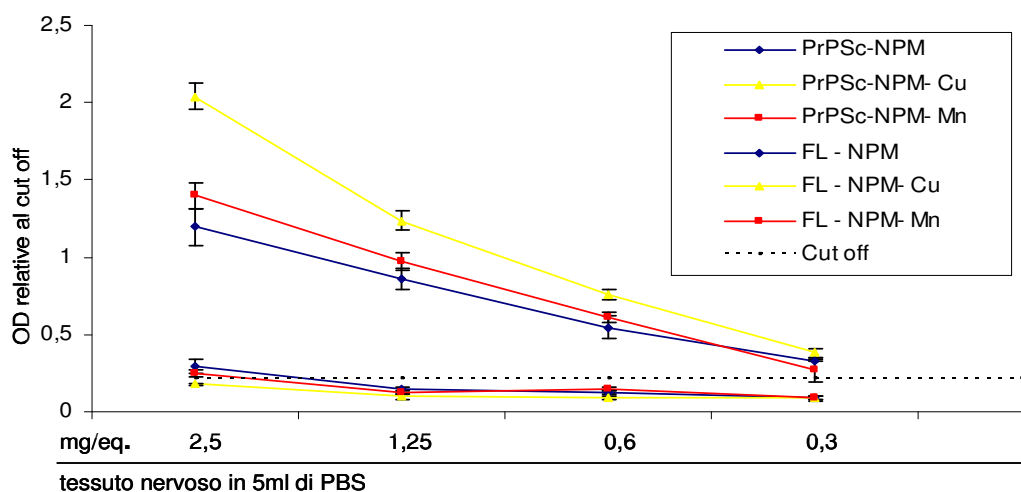


Figura 4.13: PrP^{Sc} rilevata nelle NPM modificate, mediante funzionalizzazione con ioni bivalente (Cu²⁺ e Mg²⁺).

Risultati dell'analisi delle NPM non modificate (rombo blu), NPM funzionalizzate con Cu (triangolo giallo) e NPM con Mn (quadrato rosso) a diverse concentrazioni di tessuto nervoso; cut off (OD 0,268 linea nera tratteggiata) e delle rispettive fasi liquide (FL). I dati sono riportati come media±DS di ciascun campione analizzato in triplo.

Il campione C5 contenente 2,5 mg di tessuto nervoso trattato con le NPM, NPM-Cu e NPM-Mn, è stato analizzato col test WB ed i risultati sono riportati in figura 4.14.

I pattern elettroforetici relativi alle NPM utilizzate evidenziano la presenza della PrP^{Sc} come dimostrato dalle bande comprese tra i 30 e 21 kD, caratteristica delle proteina.

L'intensità di segnale ottenuta evidenzia un recupero maggiore della PrP^{Sc} nel caso delle NPM che diminuisce nelle NPM-Cu e NPM-Mn rispettivamente.

Nelle rispettive fasi liquide è invece ben visibile solo la banda relativa alla rimanente proteinasi che ne conferma la negatività.

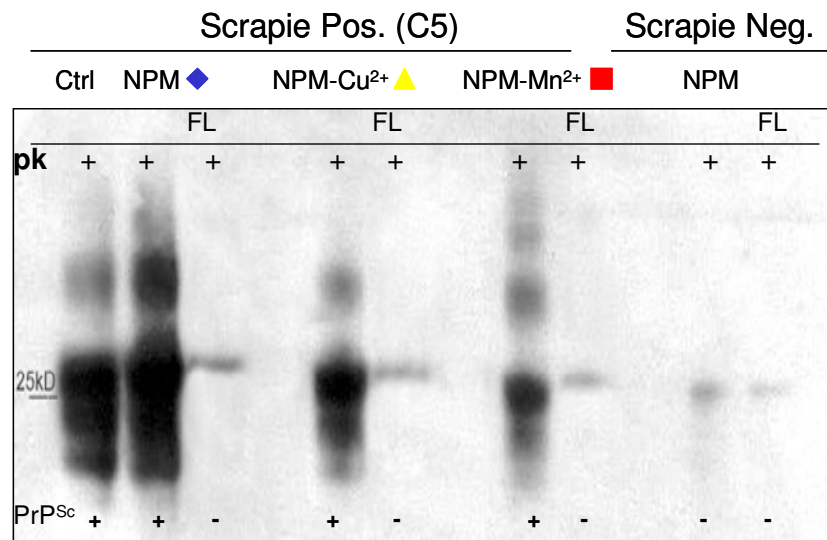


Figura 4.14: PrP^{Sc} rilevata nelle NPM modificate, mediante funzionalizzazione con ioni bivalente (Cu²⁺ - Mg²⁺) con Western Blotting (WB).

Pattern elettroforetici relativi alla PrP^{Sc} (PrP^{Sc}+) rilevata incubando un campione positivo (C5) a concentrazione di 2,5 mg di tessuto nervoso con NPM non funzionalizzate (rombo blu) ed NPM funzionalizzate con ioni bivalenti Cu²⁺ (triangolo giallo) e Mg²⁺ (quadrato rosso), e le rispettive fasi liquide (FL, PrP^{Sc}-). Il campione negativo di controllo non mostra il profilo elettroforetico della proteina prionica e controllo standard positivo, non incubato con le NPM (Ctrl Scr+); Tutti i campioni sono stati digeriti con proteinasi K (pK +).

4.8. Rilevazione della PrP^{Sc} adsorbita sulla NPM in frazioni di latte sano mediante test ELISA BioRad

Per studiare il comportamento delle NPM in termini di cattura della PrP^{Sc} da matrici più complesse sono state condotte delle prove preliminari su un campione di latte (24 ml) proveniente da una pecora scrapie-free addizionato di 2,5 mg di tessuto nervoso scrapie positivo.

Il tessuto nervoso è stato aggiunto in quantità uguali alle tre frazioni di latte previamente separate (grasso, interfase proteica e pellet cellulare) che sono state trattate ciascuna con le NPM ed analizzate con test ELISA BioRad.

Come riportato nella figura 4.15, i valori di OD relativi alle NPM recuperate dalla frazione lipidica risultano circa 5 volte inferiori rispetto a quelli ottenuti dalla rispettiva fase liquida.

Un comportamento diverso è evidente dall'analisi delle NPM recuperate dalle frazioni interfase proteica e pellet cellulare in cui si osserva che i valori di OD risultano rispettivamente 5 e 4 volte maggiori delle relative fasi liquide, sebbene in queste ultime siano rilevabili positività determinanti la presenza di PrP^{Sc}, con valori di OD 0,648 interfase, OD 0,589 pellet cellulare, più prossimi al cut off.

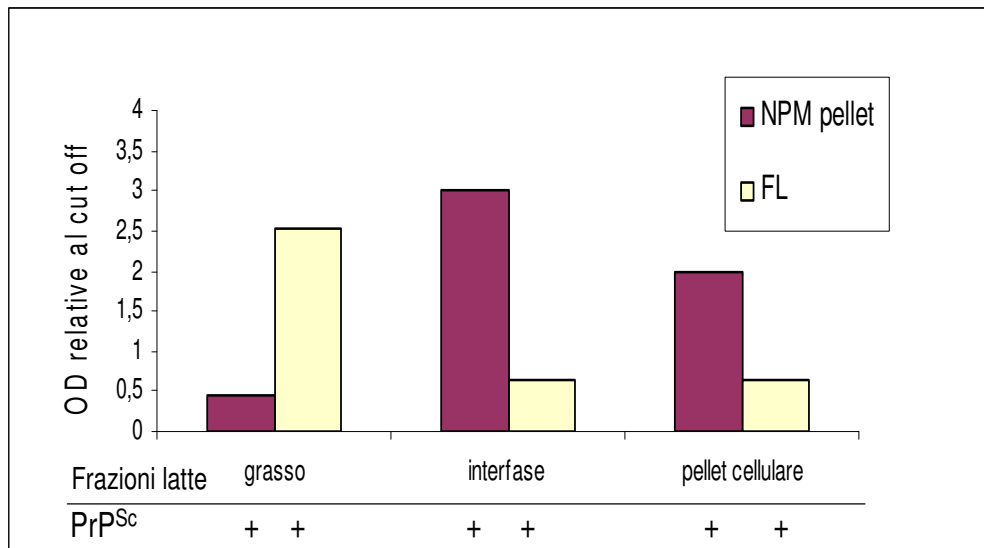


Figura 4.15: PrP^{Sc} legata alle NPM, rilevata nelle frazioni di latte.

Campione scrapie positivo (C4) incubato con le NPM (viola) a concentrazione di 2,5 mg di tessuto nervoso opportunamente disperse in frazioni del latte (grasso, interfase e pellet cellulare) precedentemente preparate (vedi Materiali e Metodi) e relative fasi liquide (FL) (giallo).

5. DISCUSSIONE

In questo studio è stata dimostrata la capacità delle nanoparticelle magnetiche di Fe_3O_4 di catturare PrP^{Sc} , proveniente da campioni di tessuto nervoso scrapie positivo, diluiti in tampone fosfato (PBS) e in una matrice biologica complessa come il latte.

Infatti, le nanoparticelle, dopo dispersione in soluzioni contenenti omogenato di cervello con scrapie e separazione mediante magnete, sono risultate associate alla PrP^{Sc} .

La positività delle NPM isolate è stata confermata mediante diversi test immunobiochimici (ELISA e WB), mentre le rispettive frazioni liquide dalle quali sono state allontanate le nanoparticelle, sono risultate negative alla PrP^{Sc} .

La capacità delle nanoparticelle di catturare la PrP^{Sc} è risultata indipendente dal volume di buffer utilizzato, con efficienze pressoché simili per variazioni di volumi consistenti (da soluzioni di 1 a 200 ml di PBS) (Figure 4.5 e 4.6).

Tale fenomeno è stato ulteriormente riprodotto e confermato su campioni di tessuto nervoso proveniente da differenti ovini affetti da scrapie (Figure 4.7 e 4.8).

E' stato inoltre dimostrato che la variazione di alcuni parametri impiegati nelle procedure di analisi, come la temperatura ed il tempo di incubazione, non produce effetti rilevanti sulla capacità delle NPM di catturare la PrP^{Sc} (Figura 4.9).

La funzionalizzazione della superficie delle NMP con metalli di transizione, in particolare Cu, porta ad un miglioramento dell'efficienza di cattura della PrP^{Sc} rispetto alle NMP non modificate (Figura 4.13).

In diversi studi è stato riportato che la capacità delle nanoparticelle di legare proteine e di interferire nel processo di fibrillazione di alcune di loro (Lynch e Dawson, 2008) è strettamente dipendente da una serie di parametri quali, dimensioni (Vertegel *et al.*, 2004), morfologia (Liu *et al.*, 2007), proprietà della superficie (come carica e rapporto superficie attiva/volume) e proprietà magnetiche (Rocchiccioli-Deltcheff *et al.*, 1987).

Il potenziale utilizzo di nanomateriali nei settori biomedico e diagnostico è stato proposto anche per patologie causate da proteine-misfolded. Kogan *et al.* (2006) hanno dimostrato che il calore dissipato da nanoparticelle d'oro, dopo trattamento con microonde di debole intensità, produce una massiva disaggregazione di placche amiloidi formate da proteina beta ($A\beta$), coinvolta nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD).

Ji e collaboratori (2006) invece hanno utilizzato i quantum dot luminescenti di CdSe/ZnS (QDs) per osservare la morfologia delle fibre amiloidi degli stessi peptidi coinvolti nell'AD e studiarne vari passaggi del processo di aggregazione fibrillare.

Più recentemente è stata dimostrata la capacità di dendrimeri funzionalizzati in superficie con cationi, di interferire nei processi di fibrillazione e disgregare le molecole di PrP^{Sc} formatesi in cellule di neuroblastoma infette o contenute in omogenati di cervello di topo infetto da ceppi di scrapie (RML) (Heegaard *et al.*, 2007).

Il legame di nanoparticelle magnetiche (γ -Fe₂O₃) con le fibrille di insulina, neosintetizzate mediante procedimenti chimici, sono state oggetto di studio di un gruppo di ricercatori israeliani (Skaat *et al.*, 2008) che hanno descritto la sintesi e la caratterizzazione di nanoparticelle magnetiche ed il loro effetto sulla rimozione di fibrille di insulina umana, dimostrando l'affinità del nanomateriale nei confronti delle proteine misfolded.

Più recentemente gli stessi autori (Skaat *et al.*, 2009) hanno valutato l'applicazione a scopo diagnostico di nanoparticelle magnetiche opportunamente funzionalizzate con fluorocromi (Congo red, rodamina isotiocianato) per evidenziare il peptide $A\beta$ (40) coinvolto nell'Alzheimer.

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi, utilizzando un protocollo sperimentale che, diversamente dai precedenti studi, è stato condotto su materiale biologico (tessuto nervoso) proveniente da animali affetti da TSE, confermano il legame tra le nanoparticelle magnetiche

e la PrP^{Sc}. Questo dato ribadisce e rafforza le precedenti ipotesi applicative delle nanoparticelle magnetiche in campo diagnostico (Skaat *et al.*, 2008; Skaat *et al.*, 2009).

E' interessante notare che il legame tra le nanoparticelle e le proteine amilodogeniche, è stato finora indagato soltanto in volumi di soluzione notevolmente inferiori rispetto a quelli da noi utilizzati e mai superiori ad 1 ml (Skaat *et al.*, 2009).

Considerati nel loro insieme i risultati di questa tesi dimostrano che la capacità delle nanoparticelle di catturare la PrP^{Sc} è mantenuta e non varia considerevolmente, anche quando le NPM sono disperse in volumi fino a 200 ml.

Inoltre, il possibile utilizzo delle nanoparticelle magnetiche ai fini diagnostici è stato qui verificato valutando il loro limite di rilevabilità di PrP^{Sc}; la capacità delle NPM di catturare la PrP^{Sc} è stata, infatti, confermata anche nei campioni contenenti le più basse quantità di tessuto nervoso corrispondenti a 0,037 mg e 0,018 mg, rispettivamente con il test ELISA (Figure 4.10a-b) e con il test WB (Figura 4.11).

Altro aspetto importante sulle proprietà delle nanoparticelle da noi utilizzate riguarda la capacità delle stesse di rilasciare la PrP^{Sc} catturata ai diversi sistemi di rilevamento usati (ELISA e WB).

Le strategie utilizzate per i legami tra proteine e nanoparticelle sono riconducibili fondamentalmente a quattro diverse tipologie: a) adsorbimento elettrostatico, b) coniugazione con ligandi presenti sulla superficie delle NPM, c) coniugazione a piccole molecole che funzionano da cofattori e sono riconosciuti e legati dalle proteine ed infine d) coniugazione diretta sulla superficie della nanoparticella (Aubin-Tam e Hamad-Schifferli, 2008).

I risultati ottenuti in questo studio sembrano suggerire che le NPM utilizzate possano interagire con la PrP^{Sc} mediante dei processi di adsorbimento riconducibili a interazioni di tipo elettrostatico, idrofobiche o chimiche di natura non covalente.

Infatti, la caratteristica delle nanoparticelle di rilasciare la PrP^{Sc} dalla loro superficie sia a ligandi di natura congofilica (Test ELISA IDEEX) che ad anticorpi anti-PrP (ELISA Biorad e WB) che si legano alla PrP^{Sc}, fanno escludere l'esistenza di legami di tipo irreversibile e più forti rispetto a quelli citati, come per es. il legame covalente, e rafforza la possibile applicabilità delle NPM in protocolli diagnostici.

Le NPM hanno dimostrato di possedere un'elevata capacità di catturare la PrP^{Sc} presente nel medium nel quale sono disperse e, come osservato, continuano a rilasciare la PrP^{Sc} anche dopo una seconda esposizione al sistema ELISA, assicurando un recupero confrontabile a quello ottenuto mediante la centrifugazione diretta (Figure 4.12a-b). Il rilascio incompleto ottenuto dopo la prima analisi potrebbe essere correlato al fatto che le condizioni operative impiegate non assicurano alle NPM di interagire nella maniera più ottimale con gli anticorpi, e suggeriscono pertanto la necessità di ottimizzare ulteriormente i protocolli usati.

La modificazione della superficie delle NPM con diversi metalli di transizione, in particolare Cu, ha prodotto un miglioramento della capacità di catturare la PrP^{Sc} con il test ELISA (Figura 4.13), diversamente al WB il recupero maggiore della PrP^{Sc} è associato alle NPM non funzionalizzate. Tale efficienza di recupero diminuisce nelle NPM-Cu e NPM-Mn rispettivamente (Figura 4.14).

Queste preliminari osservazioni incoraggiano ad indagare ulteriori modifiche e funzionalizzazioni della superficie delle NPM al fine di migliorare l'efficacia dell'adsorbimento/legame tra nanoparticelle e PrP^{Sc}.

In numerosi studi è stata, infatti, dimostrata l'esistenza nella proteina prionica di particolari siti caratterizzati da un'elevata affinità verso metalli divalenti di transizione il cui legame è in grado di indurre modifiche strutturali e funzionali della proteina stessa (Giese *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008).

Alla luce dei risultati ottenuti in questo studio, si può ipotizzare che le nanoparticelle magnetiche possano avere un'interessante applicabilità diagnostica qualora sia necessario testare fluidi biologici contenenti una bassa concentrazione di PrP^{Sc}, come ad esempio il latte (Lacroux *et al.*, 2008).

A questo proposito, i test preliminari condotti sul latte hanno dimostrato che le NPM sono in grado di adsorbire la PrP^{Sc} contenuta in tessuto nervoso infetto diluito nell'interfase proteica e nel pellet cellulare e, sebbene con minore efficienza, anche nella frazione lipidica (Figura 4.15).

6. CONCLUSIONI

Le nanoparticelle magnetiche di Fe_3O_4 sono capaci di adsorbire, trattenere e rilasciare dalla loro superficie PrP^{Sc} proveniente da matrice biologica. Il risultato del nostro studio, suffragato da una bibliografia ormai corposa, rafforza e rende più credibile lo sviluppo di un sistema diagnostico basato su nanomateriali capace di catturare la proteina prionica da fluidi biologici. A questo proposito, il presente studio è il primo a sperimentare tale tecnologia su matrici biologiche quale il latte, confermando la capacità delle nanoparticelle ad adsorbire la PrP^{Sc} anche in questi sistemi.

Ulteriori sviluppi di questo lavoro potranno essere indirizzati verso l'indagine di nuove modificazioni e funzionalizzazioni della superficie delle NPM, con altri ioni metallici o diversi gruppi funzionali, che potrebbero rendersi utili per migliorare l'adsorbimento della PrP^{Sc} .

7. BIBLIOGRAFIA

Aguzzi A and Weissmann C. (1996). Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. *Nature*. 383: 666–667.

Aguzzi A and Heikenwalder M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nature Reviews. Microbiology* Volume 4 October 765.

Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser P. (2001). Prions: health scare and biological challenge. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:118-126.

Alivisatos AP. (2004). The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol.* 22: 47-52.

Alper T, Cramp WA, Haig DA and Clarke MC. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*. 214: 764-766.

Andréoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 81: 3115–3126.

Andréoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Lafond-Benestad S, Elsen JM, Schelcher F. (2002). PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe to lamb transmission. *J Gen Virol.* 83: 2607-2616.

Andréoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbière F, Ferré P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F. (2004). PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med.* 10(6): 591-3.

Arai T and Norde W. (1990). The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. Adsorption from single protein solutions. *Colloids and Surfaces.* 51 (17): 1-15.

Arnold ME, Ryan JB, Konold T, Simmons MM, Spencer YI, Wear A. (2007). Estimating the temporal relationship between PrP^{Sc} detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle. *J. Gen. Virol.* 88: 3198–3208.

Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaria J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday.* 2 (3): 22-32.

Asuri P, Karajanagi SS, Vertegel AA, Dordick JS, Kane RS. (2007). Enhanced stability of enzymes adsorbed onto nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7: 1675-1678

Aubin-Tam ME and Hamad-Schifferli K. (2005). Gold nanoparticle-cytochrome C complexes: the effect of nanoparticle ligand charge on protein structure. *Langmuir* 20; 21(26):12080-4.

Aubin-Tam ME, Hamad-Schifferli K (2008). Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. *Biomed Mater.* 3 (3): 034001.

Baylis M and Goldmann W. (2004). The Genetics of scrapie in sheep and Goats. *Curr Mol Med.* 4: 385-396.

Belay E, Maddox R, Williams E, Miller M, Gambetti P and Schonberger L. (2004). Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 977-984.

Bellezza F, Cipiciani A, Quotadamo MA, Cinelli S, Onori G, Tacchi S. (2007). Structure, stability, and activity of myoglobin adsorbed onto phosphate-grafted zirconia nanoparticles. *Langmuir* 23: 13007–13012.

Bendheim PE, Bolton DC. (1986). A 54-kDa normal cellular protein may be the precursor of the scrapie agent protease-resistant protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2214–2218. *Biochim. Biophys. Acta* 1724: 367-374.

Bogunia-Kubik K, Sugisaka M. (2002). From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems.* 5: 123–138;

Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 631-651.

Brotherston JG, Renwick CC, Stamp JT, Zlotnik I. (1968). Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *J. Comp. Path.* 78: 9–17.

Brown LR and Harris DA. (2002). The prion protein and copper: What is the connection?. pp. 103-113. In E. J. Massaro (ed.), *Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology*. Humana Press, Totowa, NJ

Brown P, Gajdusek DC. (1991). Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet.* 2; 337(8736):269-70.

Bruce ME, Brown KL, Mabbott NA, Farquhar CF, Jeffrey M. (2000). Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol. Today* 21: 442–446.

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

Bueler H, Fisher M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M and Weissmann C. (1992). Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature.* 356: 577-582

Burger D, Hartsough GR. (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis.* Oct; 115(4):393-9.

Buschmann TK, Bodemer W, and Groschup MH. (1998). Cellular Prion Proteins of Mammalian Species Display an Intrinsic Partial Proteinase K Resistance. *Biochemical and biophysical research communications* 253: 693–702 .

Calavas D, Ducrot C, Baron T, Morignat E, Vinard J-L, Biacabe A-G, Madec J-Y, Bencsik A, Debeer S, Eliazsewicz M. (2001). Prevalence of BSE in western France by screening cattle at risk: preliminary results of a pilot study. *Vet. Rec.* 149: 55–56.

Cao YC. (2005). Preface. *Talanta.* 67: 437-447.

Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascak RJ, Bolton DC and Bendheim PE. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell.* 61: 185-192.

Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF and Caughey WS. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 30: 7672-7680.

Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. (2007a). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci.* 13; 104 (7): 2050-5.

Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggård T, Donnelly SC, Cagney G, Linse S, Dawson KA. (2007b). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46 (30): 5754-6.

Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P and Autilio-Gambetti L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.* 270: 19 173–19 180.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, Garon C and Haase A. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature.* 315: 331-333.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR and Linden R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 21: 3317- 3326.

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

Cravero G, Guarda F, Dotta U, Guglielmino R. (1977). *La Clinica Veterinaria* 100: 1-14.

Creutzfeldt HG. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol.Psychiatr.* 57: 1-18.

- Cuille J and Chelle PL.** (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *C R Seances Acad Sci.* 208: 1058-1160
- Curnow RN and Hau CM.** (1996). The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. *Vet. Rec.* 138: 407–408.
- Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD and Hunter N.** (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Information Group. Vet Rec.* 142: 623-625.
- del Campo A, Boos D, Spiess HW, Jonas U.** (2005). Surface modification with orthogonal photosensitive silanes for sequential chemical lithography and site-selective particle deposition. *Angew Chem Int Ed Engl.* 25; 44(30): 4707-12.
- DeMarco ML and Daggett V.** (2005). Local environmental effects on the structure of the prion protein. *Comptes Rendus Biologies* 328: 847-862.
- Demontis F.** (2009). Tesi di specializzazione in sanità animale, allevamento e produzioni zootecniche: “*La scrapie in Sardegna: epidemiologia descrittiva e studio dei fattori di rischio*”. Università degli studi di Teramo, Anno Accademico 2008/2009.
- Deslys JP, Comoy E, Hawkins S, Simon S, Schimmel H, Wells G, Grassi J and Moynagh J.** (2001). Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature* 409: 476–478.
- Di Guardo G, Marcato PS.** (2002). Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili; In: Marcato PS “*Patologia Sistemica Veterinaria*”, Bologna, Edagricole-Il Sole 24 Ore, 1302-1311.
- Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC.** (1974). Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol.* 84:19–25.
- Dickinson AG.** (1976). Scrapie in sheep and goats, in: Kimberlin R.H. (Ed.), *Slow virus diseases of animals and man. North Holland Publishing Company, Amsterdam, the Netherlands.* 209–241.
- Endo T, Groth D, Prusiner SB and Kobata A.** (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry.* 28: 8380–8388.
- Ermonval M, Mouillet-Richard S, Codogno P, Kellermann O, Botti J.** (2003). Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie.* 85: 33–45
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A and Weissmann C.** (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 15: 1255-1264.
- Fraser H.** (1976). The pathology of a natural and experimental scrapie. *Front. Biol.* 44: 267–305.

Fu XY, Wang Y, Huang LX, Sha YL, Gui LL, Lai LH, Tang YQ. (2003). Assemblies of metal nanoparticles and self-assembled peptide fibrils - Formation of double helical and single-chain arrays of metal nanoparticles. *Adv Mater.* 15: 902-906. Links

Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M and Prusiner SB. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9097–9101.

Gajdusek DC. and Zigas V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N. Engl. J. Med.* 257: 974-978.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers MP. (1966). Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.

Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P and Chen SG. (2003). Sporadic and familial CJD: Classification and characterisation. *Br. Med. Bull.* 66: 213-239.

Gavier-Widen D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 509–527.

Genovesi S, Leita L, Sequi P, Andrighetto I, Sorgato MC, Bertoli A. (2007). Direct detection of soil-bound prions. *PLoS One.* Oct 24; 2(10):e1069.

Gerstmann J, Strausler E, Scheinker I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Ges Neurol.Psychiatr.* 154: 736-762.

Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC and Latarjet R. (1978). Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 6268-6270.

Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM and Matthews WB. (1968). Creutzfeldt-Jacob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161: 388-389.

Giese A, Levin J, Bertsch U, and Kretzschmar H. (2004). Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 1240–1246.

Goldmann W, Baylis M, Chihota C, Stevenson E and Hunter N. (2005). Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications from breeding programmes. *J Appl Microbiol.* 98: 1294-1302.

Gorodinsky A and Harris DA. (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J. Cell Biol.* 129: 619–627.

Govaerts C, Wille H, Prusiner SB and Cohen FE. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed β - helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8342- 8347.

Grassi J, Comoy E, Simon S, Creminon C, Frobert Y, Trapmann S, Schimmel H, Hawkins SA, Moynagh J. (2001). Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.* 149: 577–582.

Grassi J, Creminon C, Frobert Y, Fretier P, Turbica I, Rezaei H, Hunsmann G, Comoy E, and Deslys J P. (2000). Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch. Virol. Suppl.* 16: 197–205.

Grassi J, Maillet S, Simon S, Morel N. (2008). Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet. Res.* 39(4):33.

Gregori L, Kovacs GG, Alexeeva I, Budka H, and Rohwer RG. (2008). Excretion of Transmissible Spongiform Encephalopathy Infectivity in Urine *Emerging Infectious Diseases.* 14 (9): 1406-1412.

Griffith JS. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature.* 215: 1043- 1044.

Hadlow WJ. (1959). Scrapie and Kuru. *Lancet.* 2:289-90.

Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect.Dis.* 146:657–664.

Hadlow WJ, Race RE, Kennedy RC, Eklund CM. (1979). Natural infection of sheep with scrapie virus. in: S.B. Prusiner, W.J. Hadlow (Eds.), *Slow transmissible diseases of the nervous system.* New York, USA. 3–12.

Haley NJ, Seelig DM, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA (2009). Detection of CWD Prions in Urine and Saliva of Deer by Transgenic Mouse Bioassay. *PLoS ONE* 4 (3): e4848. doi:10.1371/journal.pone.0004848.

Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarantino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, Lycke E, Kobata A and Prusiner SB. (1989). Asparagine-linked glycosylation of the Scrapie and cellular prion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 274: 1–13.

Harris DA, Falls DL, Walsh W and Fischbach GD. (1989). Molecular cloning of an acetylcholine receptor-inducing protein. *Soc. Neurosci.* 15: 70-7.

Harris DA, Peters PJ, Taraboulos A, Lingappa V, DeArmond SJ and Prusiner SB. (2004). Cell biology of prions, pp. 483-544. In Prusiner SB (ed.), *Prion Biology and Diseases*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Harris DA. (1999). Cellular biology of prion disease. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.12. No 3: 429-444.

Hartsough GR, Burger D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis.* Oct; 115(4):387-92.

- Heegaard PMH, Boas U, Otzen DE.** (2007). Dendrimer effect on peptide and protein fibrillation. *Macromol. Biosci.* 7: 1047-59.
- Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP, Aguzzi A.** (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nat. Med.* 7: 976-977.
- Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG.** (2006). Three reported cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission following transfusion of labile blood components. *Vox Sang.* 91(3):221-30.
- Hibler CP, Wilson KL, Spraker TR, Miller MW, Zink RR, DeBuse LL, Andersen E, Schweitzer D, Kennedy JA & other authors** (2003). Field validation and assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting chronic wasting disease in mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 311-319.
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Slide KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P.** (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature.* 389: 448-450.
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Penney M, Ritchie D, Ironside JW.** (2002). Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *BMJ* 325: 633-634.
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW.** (2004). Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J. Pathol.* 203: 733-739.
- Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH.** (2007). Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* 88:1048-1055.
- Hoinville LJ.** (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15(3): 857-852.
- Horwich AL and Weissman JS.** (1997). Deadly conformation-protein misfolding in prion disease. *Cell.* 89: 499-510.
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N and Bostock C J.** (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet.* 356: 999-1000
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F.** (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol.* 83(11): 2897-905.
- Hunter N, Foster JD and Hope J.** (1992). Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. *Vet. Rec.* 130: 389-392.

Hunter N, Goldmann W, Smith G and Hope J. (1994). The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch. Virol.* 137: 171-177.

Hunter N. (1997). PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol.* 5: 331-334.

Iannuzzi L, Palomba R, Di Meo GP, Perucatti A, Ferrara L. (1998). Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 81(3-4): 202-4

Iulini B, Caramelli M, Canalone C, Castagnaro M, Mandara MT, Ligios C, Loria GR, Cantile C. (2006). Sorveglianza della FSE in Italia. Aspetti neuropatologici in gatti clinicamente sospetti. *Il progresso veterinario* n 10/15: 443-445.

Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T. (2006). Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan, Jpn. *J. Infect. Dis.* 59: 100–107.

Jain KK. (2005). The role of nanobiotechnology in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 10, (21): 1435-1442.

Jakob A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Ges Neurol.Psychiatr.* 64: 147-228.

James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB and Cohen FE. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 10086-1009183.

Jeffrey M, Gonzalez L, Espenes A, Press CM, Martin S, Chaplin M, Davis L, Landsverk T, MacAldowie C, Eaton S, McGovern G. (2006). Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J. Pathol.* 209: 4–14.

Jenkins TW. (1978). The autonomic nervous system, in: Functional mammalian neuroanatomy. Lea & Febiger, Philadelphia, USA 146–165.

Ji XJ, Naistat D, Li CQ, Orbulescu J, Leblanc RM. (2006). An alternative approach to amyloid fibrils morphology: CdSe/ZnS quantum dots labelled -amyloid peptide fragments A (31-35), A (1-40) and A (1-42). *Colloid Surf B:Biointerfaces*; 50: 104-111. Links

Johnson CJ, Pedersen JA, Chappell RJ, McKenzie D, Aiken JM. (2007). Oral transmissibility of prion disease is enhanced by binding to soil particles. *PLoS Pathogens* 3 (7): e93.

Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA. (2006). Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathogens* 2 (4): 296-302 (e32). doi: 10.1371/journal.ppat.0020032.

Kim NH, Choi JK, Jeong BH, Kim JI, Kwon M S, Carp RI, and Kim YS. (2005). Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrP^C to PrP^{res}. *FASEB J.* 19: 783–785.

Kogan MJ, Bastus NG, Amigo R, Grillo-Bosch D, Araya E, Turiel A, Labarta A, Giralt E, Puntès VF. (2006). Nanoparticle mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett.* 6: 110-115. Links

Koneracka' M, Kokcansky' P, Antalík M, Timko M, Ramchand CN, Lobo D, Mehta R, Upadhyay RV. (1999). Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *J Magn Mater.* 201:427-430.

Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, Simmons HA. (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res.* 8: 4:14.

Kouassi GK, Irudayaraj J. (2006a). A nanoparticle-based immobilization assay for prion-kinetics study. *J. Nanobiotechnology.* 4:8. 10.1186/1477-3155.

Kouassi GK, Irudayaraj J. (2006b). Magnetic and gold-coated magnetic nanoparticles as a DNA sensor. *Anal Chem.* 78(10): 3234-41.

Kouassi GK, Wang P, Sreevatan S, Irudayaraj J. (2007). Aptamer-mediated magnetic and gold-coated magnetic nanoparticles as detection assay for prion protein assessment. *Biotechnol Prog.* (5): 1239-44.

Kumar S and Nussinov R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (9): 1216 - 1233.

Lacroux C, Corbiere F, Tabouret G, Lugan S, Costes P, Mathey J, Delmas JM, Weisbecker JL, Foucras G, Cassard H, Elsen JM, Schelcher F, Andréoletti O. (2007). Dynamics and genetics of PrP^{Sc} placental accumulation in sheep. *J. Gen. Virol.* 88:1056–1061.

Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J, Lugan S, Corbiere F, Cassard H, Costes P, Bergonier D, Weisbecker JL, Moldal T, Simmons H, Lantier F, Feraudet-Tarisse C, More N, Schelcher F, Grassi J, Andreoletti O. (2008). Prions in Milk from Ewes Incubating Natural Scrapie. *PLoS Pathogens* 4 (12):e1000238.

Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, and Szoka FC. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nat. Biotechnol.* 23: 1517-1526.

Lee JK, Huh YM, Jun YW, Seo JW, Jang JT, Song HAT. (2007). Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultrasensitive molecular imaging. *Nat. Med.* 13, 95-99.

Leita L, Fornasier F, De Nobili M, Bertoli A, Genovesi S, and Sequi P. (2006). Interactions of prion proteins with soil. *Biology and Biochemistry.* 38 (7):1638-1644.

Ligios C, Cancedda MG, Margalith I, Santucci C, Madau L, Maestrale C, Basagni M, Saba M, Heikenwalder M. (2007). Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS ONE* 12: 2(9): 259.

Ligios C, Depalmas S, Agrimi U, Di Guardo G, Eleni C, Bitti G, Cardone F, Pocchiari M. (1996). Prima segnalazione di scrapie in Sardegna: rilievi clinici, epidemiologici e patologici. Convegno Federaciòn Mediterrànea de Sanitat y Producciòn de Ruminantes, 319-323- Murcia –Spain.

Ligios C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, Maestrale C, Cancedda MG, Madau L, Aguzzi A. (2005). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nature Medicine*, 11:1137- 1138, (IF: 28.878 2005).

Linse S, Cabaleiro-Lago C, Xue WF, Lynch I, Lindman S, Thulin E, Radford SE, Dawson KA. (2007). Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*.104: 8691-8696. Links

Liu H, Tian Y and Deng Z. (2007). Morphology-dependent electrochemistry and electrocatalytical activity of cytochrome c. *Langmuir* 23: 9487–94

Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J and Will RG. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*. 363: 417-421.

Lu AH, Salabas EL, Schuth F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (8): 1222–1244.

Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*. Oct 16; 315(16): 997-1003.

Lynch I and Dawson KA. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*. 3: 40-47 Review.

Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME. (2000). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat.Med.* 6: 719–720.

Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR and Ramirez OA. (2004). Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Mol. Brain Res.* 131: 58-64.

Maissen M, Roeckl C, Glatzel M, Goldmann W and Aguzzi A. (2001). Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. *Lancet*. 357: 2026-2028.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I and Hope J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8: 121-127.

McGowan JP. (1922). Scrapie in sheep. *Journal of Agriculture* 5: 365–375.

McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A and Prusiner SB. (1991). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol.* 65(3): 1340-1351

Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER and Mattoussi H. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* 4: 435–446.

Miller MW, Williams ES, McCarty CW, Spraker TR, Kreeger TJ, Larsen CT, Thorne ET. (2000). Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *J. Wildl. Dis.* 36:676-90.

Minard-Basquin C, Kügler R, Matsuzawa NN, Yasuda A. (2005). Gold-nanoparticles-assisted oligonucleotides immobilization for improved DNA detection. *IEEE Proc-Nanotechnol.* 152: 97-103.

Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou WQ, Mishra R, Li R, Chen SG, Gambetti P, Fujioka H, Singh N. (2004). Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J. Neurosci.* 24: 11280–11290

Mohan J, Brown KL, Farquhar CF, Bruce ME, Mabbott NA. (2004). Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *J. Dermatol. Sci.* 35:101–111.

Morales R, Abid K and Soto C. (2007). The prion strain phenomenon: Molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta.* 1772(6): 681–691.

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM and Kellermann O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science.* 289: 1925-1928.

Moynagh J and Schimmel H. (1999). Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature* 400:105.

Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 275–300.

Norde W and Giacomelli CE. (2000). BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states *J. Biotechnol.* 79 (3): 259-268.

Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandeveld M, Moser M. (2000). Application of prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch. Virol. Suppl.* 16:189–195.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB and Weissmann C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 40: 735-746.

Palocci C, Chronopoulou L, Venditti I, Cernia E, Diociaiuti M, Fratoddi I, Russo M.V. (2007). Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules*. 8 (10): 3047–3053.

Pattison IH. (1965). Scrapie in the Welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec.* 20; 77(47):1388-90.

Pattison IH. (1966). The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of goat scrapie agent. *Res. Vet. Sci.* 7: 207-212.

Pattison IH and Jones KM. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet. Rec.* 80: 2-9.

Pearson GR, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ, Hope J, Chong A, Higgins RJ, Scott AC, Wells GA. (1992). Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Vet Rec.* Oct 3; 131(14):307-10.

Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE and Ironside JW. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*. 364: 527-529.

Polano M, Anselmi C, Leita L, Negro A, De Nobili M. (2008). Organic polyanions act as complexants of prion protein in soil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7; 367(2):323-9.

Polano M, Leita L. (2008). Suolo- prione: una nuova emergenza. *Biologi Italiani* (4): 23-26.

Price DL, Borchelt DR and Sisodia SS. (1993). Alzheimer disease and the prion protein disorders: amyloid β -protein and prion protein amyloidoses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6381-6384

Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirinda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D and DeArmond SJ. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*. 63: 673–686.

Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. (1998). Prion protein biology. *Cell* 93: 337–348.

Prusiner SB. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 216: 136-144.

Prusiner SB. (1989). Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol*. 43:345–374.

Prusiner SB. (1998). Prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95: 13363-13383.

Prusiner SB. (2001). Shattuck Lecture: Neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J. Med.* 344: 1516-1526.

Reches M and Gazit E. (2006). Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes. *Nat Nanotechnol*. 1: 195-200. Links

- Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi Castagnoli P.** (2001a). Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology*. 204: 572–581.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi Castagnoli P.** (2001b). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2: 361–367
- Revault M, Quiquampoix H, Baron MH, & Noinville S.** (2005). Fate of prions in soil: trapped conformation of fulllength ovine prion protein induced by adsorption on clays. *Biochim.Biophys. Acta* 1724: 367-374.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R and Wuthrich K.** (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature*. 382: 180-182.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R and Wuthrich K.** (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, PrP (23–231). *FEBS Lett.* 413: 282–288.
- Rocchiccioli-Deltcheff C, Franck R, Cabuil V and Massart R.** (1987). Surfacted ferrofluid: Interactions at the surfactantmagnetic iron oxide interface. *J. Chem. Res. (S)* 5: 126–7
- Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, Dwek RA.** (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 96: 13 044–13 049.
- Ryou C.** (2007). Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. *J Microbiol. Biotechnol.* 17 (7): 1059-1070.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T and Noda T.** (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*. 380: 528-531.
- Sakamoto JH, Smith BR, Xie B, Rokhlin SI, Lee SC, Ferrari M.** (2005). The molecular analysis of breast cancer utilizing targeted nanoparticles based ultrasound contrast agents. *Technol. Cancer Res. Treat.* 4 (6): 626-636.
- Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M.** (1999). Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol.* 98: 437–443.
- Schatzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE and Prusiner SB.** (1995). Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 245: 362–374.

Scott JR, Foster JD, Fraser H. (1993). Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease. *Vet. Microbiol.* 34:305–309.

Scott M, Foster D, Miranda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D and Prusiner SB. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 59: 847-857.

Scott M., Foster D, Miranda C, Serban D, Coufa F, Walchli M, TorchiaM, Groth D, Carson G, DeArmond SJ, Westaway D and Prusiner SB. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 59: 847-857.

Scott M, Safar J, Telling G, Nguyen O, Groth D, Torchia M, Koehler R, Tremblay P, Walther D, Cohen FE, DeArmond SJ and Prusiner SB. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14279–14284

Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N, Kranich J, Schwarz P, Gaspert A, Seifert B, Miele G, Aguzzi A. (2005) Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science.* 310: 324–6.

Seidel B, Thomzig A, Buschmann A, Groschup MH, Peters R, Beekes M, Terytze K. (2007). Scrapie agent (strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS One.* 9; 2(5):e435. DOI: 10.1371/journal.pone.0000435

Shyng SL, Huber MT and Harris DA. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268: 15 922–15 928.

Simmons MM, Spiropoulos J, Hawkins SAC, Bellworthy SJ, Tongue SC. (2008). Approaches to investigating transmission of spongiform encephalopathies in domestic animals using BSE as an example. *Vet. Res.* 39:34.

Skaat H and Margel S. (2009). Synthesis of fluorescent-maghemite nanoparticles as multimodal imaging agents for amyloid- β fibrils detection and removal by a magnetic field. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386: 645–649.

Skaat H, Sorci M, Georges B, Margel S. (2008). Effect of maghemite nanoparticles on insulin amyloid fibril formation: selective labeling, kinetics, and fibril removal by a magnetic field. *J. Biomed. Mat. Res.* A doi:10.1002/jbm.a.32232.

Spraker TR, O'Rourke KI, Balachandran A, Zink RR, Cummings BA, Miller MW, Powers BE. (2002). Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 3–7.

Stack M, Chaplin MJ, Clark J. (2002). Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1),

bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol.* 104: 279–286.

Stack M, Jeffrey M, Gubbins S, Grimmer S, Gonzalez L, Martin S. (2006). Monitoring for bovine spongiform encephalopathy in sheep in Great Britain, 1998–2004. *J. Gen. Virol.* 87: 2099–2107.

Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S and Macklis JD. (2006). Prion protein (PrP^C) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3416–3421.

Stimson E, Hope J, Chong A and Burlingame AL. (1999). Sitespecific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry.* 38 4885–4895.

Tallury P, Payton K, Santra S. (2008). Silica based multimodal/multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing applications. *Nanomedicine* 579–592.

Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L and Prusiner SB. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibits formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129: 121–132.

Terry LA, Marsh S, Ryder SJ, Hawkins SA, Wells GA, Spencer YI. (2003). Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 152: 387–392.

Torchilin VP. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 145–160.

Tuo W, Zhuang D, Knowles DP, Cheevers WP, Sy MS, ÓRourke KI. (2001). PrP^C and PrP^{Sc} at the fetal–maternal interface. *J. Biol. Chem.* 276: 18229–182.

van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1228–1231.

van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den BM, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. (1995). Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet. Pathol.* 32: 299–308.

van Keulen LJM, Bossers A, van Zijderveld F. (2008). TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet. Res.* 39:24.

van Keulen LJM, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch. Virol. Suppl.* 16: 57–71.

van Keulen LJM, Vromans MEW, van Zijderveld FG. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* 110: 23–32.

Vascellari M, Nonno R, Mutinelli F, Bigolaro M, Di Bari MA, Melchiotti E, Marcon S, D'Agostino C, Vaccai G, Conte M, De Grossi L, Rosone F, Giordani F. and Agrimi U. (2007). PrP^{Sc} in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol.* 81(9): 4872–4876.

Vertegel AA, Siegel RW and Dordick JS. (2004). Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* 20: 6800–7

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A and Prusiner SB. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14945–14949.

Wells GA e McGill IS. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res. Vet. Sci.* 53:1-10. Review.

Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec.* 31; 121(18):419-420

Wells GA, Wilesmith JW. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 5: 91–103.

White KA, Rosi NL. (2008). Gold nanoparticle-based assays for the detection of biologically relevant molecules. *Nanomedicine.* 3(4): 543-553.

Wilesmith JW, Ryan JBM, Atkinson MJ. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128: 199–203.

Wilesmith JW, Wells GAH, Cranwell MP, Ryan JBM. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123: 638– 644.

Will RG, Alpers MP, Dormont D and Schonberger LB. (2004). Infectious and sporadic prion diseases, pp. 629-671. In S. B. Prusiner (ed.), *Prion Biology and Diseases*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A e. Smith PG. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925.

Windl O, Dempster M, Estibeiro P and Lathe R. (1995). A candidate marsupial PrP gene reveals 2 domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene.* 159: 181–186.

Word JM, Lovell SC, LaBean TH, Taylor HC, Zalis ME, Presley BK, Richardson JS, Richardson DC. (1999). Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms. *J Mol Biol.* 285(4): 1711-33.

Wrathall AE, Brown KFD, Sayers AR, Wells GAH, Simmons MM, Farrelly SSJ, Bellerby P, Squirrell J, Spencer YI, Wells M, Stack MJ, Bastiman B, Pullar D, Scatcherd J, Heasman L, Parker J, Hannam DAR, Helliwell DW, Chree A, Fraser H.

(2002). Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet. Rec.* 150: 365–378.

Xu XH, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ. (2004). Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry* 43: 10400–10413.

Yadavalli R, Guttmann RP, Seward T, Centers AP, Williamson RA and Telling C. (2004). Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrP^{Sc} modulates scrapie prion propagation. *J. Biol. Chem.* 279: 21 948–21 956.

You CC, Agasti SS, Rotello VM. (2008). Isomeric control of protein recognition with amino acid- and dipeptide-functionalized gold nanoparticles. *Chem. Eur. J.* 14: 143-150.

Zanusso PL. Corso di Neuropatologia ASL. 14-15 giugno 2007, Sassari.

Zeidler M, Johnstone EC, Bamber RWK, Dickens CM, Fischer CJ, Francis AF, Goldbeck R, Higgs R, Johnson-Sabine EC, Lodge GJ, McGarry P, Mitchell S, Tarlo L, Turner M, Ryley P, Will RG. (1997). New variant Creutzfeldt Jacob disease: psychiatric feature. *The Lancet.* 350: 908-910.

Zhang CC, Steele AD, Lindquist S and Lodish HF. (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their selfrenewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2184-2189.

Zhu F, Davies P, Thomsett AR, Kelly SM, Tranter GE, Hecht L, Isaacs NE, Brown DR and Barron LD. (2008). Raman optical activity and circular dichroism reveal dramatic differences in the influence of divalent copper and manganese ions on prion protein folding. *Biochemistry* 47: 2510–2517.

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo intenso percorso formativo desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutte le persone che, in modi diversi, hanno contribuito alla realizzazione e alla stesura di questa tesi. I miei più sentiti ringraziamenti vanno:

- al Dr. Ligios, per il coordinamento scientifico di questo progetto di Dottorato, per l'analisi e la rielaborazione di tutti i dati raccolti, per la continua disponibilità e prontezza nei chiarimenti e suggerimenti, per la rilettura critica di tutti i capitoli della tesi e per avermi consentito di crescere scientificamente nel suo gruppo di ricerca, fornendomi tutti gli strumenti per svolgere al meglio la mia ricerca. Inoltre, è stato per me notevole il sostegno e l'incoraggiamento personale offertomi durante questo percorso, dettato dalle doti umane che lo contraddistinguono.
- al Prof. Sergio Uzzau, va un ringraziamento particolare per avermi scrupolosamente seguito in qualità di Tutor in questo percorso formativo, contribuendo con serietà e criticità alla mia crescita professionale, supportando con disponibilità e obbiettività la mia ricerca con i suoi preziosi suggerimenti e consigli.
- alla Dr.ssa Vanna Sanna, che ha contribuito attivamente al progetto di ricerca occupandosi in prima persona di tutta la parte relativa alla sintesi e caratterizzazione delle nanoparticelle utilizzate nelle prove di questa tesi. Soprattutto, la ringrazio per la criticità mostrata nell'analisi dei dati, per le opinioni e suggerimenti riguardanti i concetti fondamentali per me spunto di ottime riflessioni.
- alla Dr.ssa Cinzia Santucci per il supporto tecnico scientifico, per la disponibilità e pazienza che mi ha dedicato durante l'intera esperienza di dottorato, gli insegnamenti, gli incoraggiamenti, i consigli e al tempo stesso gli apprezzamenti per quanto realizzato. La ringrazio inoltre per la cura e professionalità con cui ha contribuito alle revisioni del lavoro.
- al Prof. Massimo Basagni per avermi dato la possibilità di svolgere questo Dottorato fornendomi i fondi per la borsa di studio, credendo profondamente in questo progetto di studio. Lo ringrazio inoltre per avermi offerto la possibilità di entrare a far parte di un grande gruppo di ricerca.
- al Capo Dipartimento, la Dr.ssa Cristiana Patta e a tutti i colleghi gli agenti tecnici, i tecnici, i biologi e i veterinari del laboratorio di Istopatologia Generale e Patologia e Diagnostica delle TSE, dell'Istituto Zooprofilattico di Sassari, che mi hanno fatto sentire parte integrante di questo dipartimento e nello specifico di questo laboratorio.
- alle ditte Idexx e Biorad che hanno creduto nel mio progetto supportandomi gratuitamente la ricerca con i loro kit, contribuendo alla realizzazione di questi risultati.
- e per ultimo, ma non meno importante, a mio marito, che con pazienza e amore mi ha sempre sostenuto e incoraggiata, credendo sempre in me senza riserve.