



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dottorato di ricerca in Scienze Infettivologiche e delle
Terapie immunologiche
XXI ciclo**

Tesi Sperimentale

**Ruolo delle Microvescicole nella propagazione
dell'infettività da prioni**

Coordinatore: ***Prof. Vincenzo Vullo***

Dottorando: ***Dott. Vincenzo Tasciotti***

Anno Accademico 2007/2008

INDICE

1	INTRODUZIONE	pag. 4
1.1	Cronistoria	
1.2	Natura biologica dei prioni	
1.3	Struttura della PrP ^C e della sua forma patologica PrP ^{Sc}	
1.4	Replicazione del prione	
1.5	Metabolismo e biosintesi della PrP ^C	
1.6	Funzione della PrP ^C	
1.7	La Neuroinvasione	
1.8	Caratteristiche dei microdomini	
1.9	Esosomi e microvescicole di membrana: diversa natura ed origine	
2	SCOPO DELLA RICERCA	pag. 43
3	MATERIALI E METODI	pag. 46
3.1	Colture cellulari	
3.2	Anticorpi	
3.3	Preparazione delle MVs da plasma libero da piastrine	
3.4	Isolamento di MVs ed esosomi dai sovranatanti di colture cellulari	
3.5	Isolamento ed analisi della frazione contenente Microdomini di membrana (GEM)	
3.6	Estrazione dei Gangliosidi e analisi mediante cromatografia su strato sottile (HPTLC)	
3.7	Immunomarcatura su lastra cromatografica TLC (Immunostaining)	
3.8	Microscopia elettronica	
3.9	Analisi della colocalizzazione di GM3 e PrP ^C sulla superficie	

cellulare mediante microscopia confocale laser a scansione

- 3.10 Analisi mediante Western blot
- 3.11 Esperimenti di Immunoprecipitazione
- 3.12 Analisi dell'infettività *in vitro*
- 3.13 Immuno-analisi: "Cell blotting"
- 3.14 Analisi dell'infettività *in vivo*

4 RISULTATIpag. 67

- 4.1 Distribuzione della PrP^C sulla membrana plasmatica di cellule linfoblastoidi CEM, mediante immunoelettromicroscopia e microscopia confocale laser.
- 4.2 Arricchimento della PrP^C nei microdomini di membrana.
- 4.3 Presenza di componenti del microdominio sulla membrana cellulare e su MVs rilasciate da cellule linfoblastoidi CEM, mediante immunoelettromicroscopia.
- 4.4 Associazione di PrP^C con GM3 mediante microscopia confocale laser
- 4.5 Presenza ed associazione della PrP^C e di componenti dei microdomini lipidici sulle MVs derivate da plasma umano.
- 4.6 Rilascio da parte di cellule neuronali di MVs che presentano PrP^C e componenti dei rafts .
- 4.7 Ruolo delle MVs secrete dalle cellule neuronali nella infettività da prioni

5 DISCUSSIONE.....pag. 94

6 BIBLIOGRAFIA.....pag.107

INTRODUZIONE

1.1 Cronistoria

Il dogma universalmente accettato secondo cui ogni agente patogeno dovesse contenere almeno una molecola di acido nucleico (DNA o RNA) sembrò vacillare improvvisamente nel 1982 quando fecero la loro comparsa nel novero delle “malattie infettive” quelle provocate dai Prioni.

Fu Stanley Prusiner a purificare per la prima volta da preparati di cervelli infettati dallo Scrapie, malattia neurodegenerativa che colpisce le pecore, una proteina parzialmente resistente alla digestione con proteasi (PrP^{Sc}), la cui concentrazione era proporzionale al titolo infettante del preparato. I risultati ottenuti lo condussero ad ipotizzare che la proteina isolata PrP 27-30 (27-30 kD) fosse il costituente fondamentale dell'agente infettivo che lui stesso chiamò “prione” (Prusiner S. B., 1982a; Prusiner S. B., 1998).

Le patologie da prioni sono malattie neurodegenerative degli animali e dell'uomo che presentano molte caratteristiche neuropatologiche ed epidemiologiche comuni. La presentazione clinica ed il coinvolgimento cerebrale possono, comunque essere estremamente variabili, soprattutto per quanto riguarda i tempi d'insorgenza dei segni clinici.

Furono Vincent Zigas e Carlton Gajdusek nel 1957 a descrivere per la prima volta il Kuru, una malattia neurologica che si era diffusa in forma epidemica a Papua, in Nuova Guinea, tra i membri della tribù Fore, in

seguito a pratiche cannibalistiche. Tale malattia, caratterizzata da grave atassia cerebellare, movimenti involontari e demenza, è scomparsa del tutto con la cessazione di queste pratiche, dimostrando così la trasmissibilità per via orale dell'infettività prionica nell'ambito della specie umana (Sorenson e Gajdusek, 1969; Zigas V., 1970).

Tale via di trasmissione tutt'oggi continua ad essere attivamente investigata soprattutto nelle cavie e nei primati (Segundo *et al.*, 2008).

Alla fine degli anni '50, William Hadlow, patologo veterinario americano, rilevò le somiglianze tra il Kuru e lo Scrapie. Quest'ultima è una neuropatologia degli ovini, a trasmissione orizzontale, conosciuta da almeno 250 anni che produce, oltre alla perdita della coordinazione motoria, anche un intenso prurito all'animale (Hadlow, 1959).

La trasmissibilità dello Scrapie era già stata dimostrata negli anni trenta, per cui, Hadlow suggerì di tentare sperimentalmente l'induzione del Kuru sui primati.

Sulla base di queste osservazioni, Carlton Gajdusek ed il microbiologo Clarence Gibbs nel 1963 inocularono in varie specie di primati, con modalità multiple, omogenati di encefalo ed altri organi di pazienti deceduti per Kuru. Dopo 18-24 mesi dall'inoculazione intracerebrale, i due ricercatori riuscirono a riprodurre i segni clinici della patologia umana in

alcuni scimpanzé. Due anni più tardi, l'esperimento fu ripetuto con successo utilizzando omogenato di encefalo di pazienti deceduti a causa della malattia di Creutzfeldt-Jacob (MCJ).

Questa malattia, descritta nel 1921, si presenta con demenza progressiva associata a mioclono. A questo sintomo principale, spesso si affiancano disturbi motori di tipo piramidale o extrapiramidale, segni e sintomi di disfunzioni cerebellari.

Gibbs e Gajdusek coniarono il termine di "Encefalopatie Spongiformi", per indicare la MCJ, il Kuru e lo Scrapie. Il loro ingresso nel novero delle malattie infettive è stato determinato con la dimostrazione della loro trasmissibilità (Gajdusek *et al.*, 1966; Gajdusek *et al.*, 1968; Gajdusek D. C., 1977).

Attuali ricerche hanno confermato che nelle cavie, sia il Kuru che la s-CJD presentano le medesime modalità di trasmissione (Wadsworth *et al.*, 2008).

Nel 1981 in questo gruppo di malattie fu inserita anche la malattia di Gerstmann Straussler-Scheinker (MGSS), descritta per la prima volta nel 1928, la cui caratteristica predominante è la degenerazione spinocerebellare, che determina nei pazienti problemi di coordinazione motoria e difficoltà di deambulazione.

Tutte le malattie neuropatologiche sopra descritte sono caratterizzate da una

degenerazione irreversibile del Sistema Nervoso Centrale (SNC) (Prusiner S.B., 1998), con marcata vacuolizzazione intracellulare dei neuroni (da cui deriva il termine di encefalopatie spongiformi), dovuto all'accumulo di placche, simili a quelle amiloidi di altre patologie neurodegenerative (Alzheimer), derivanti però dalla deposizione della forma anormalmente ripiegata della proteina prionica, tanto nel SNC, quanto esternamente ad esso (Thomzig *et al.*, 2006).

1.2 Natura biologica dei prioni

Nel corso di questo secolo diverse sono state le interpretazioni da parte del mondo scientifico riguardo al paradosso dei prioni. Inizialmente le malattie da prioni vennero considerate malattie da virus, in particolare da “virus lenti” (Gajdusek D. C., 1977), anche se al momento nessun microrganismo, è mai stato chiaramente associato a queste patologie. Esse sono caratterizzate da un periodo d'incubazione prolungato e si manifestano di solito in età avanzata con un decorso clinico breve ma progressivo, che conduce inevitabilmente al decesso.

Negli anni '60 si scoprì che l'agente responsabile dello Scrapie era estremamente resistente ai trattamenti che inattivano i virus e gli acidi

nucleici, come la formalina, le ribonucleasi, le deossiribonucleasi e le radiazioni ionizzanti, ma poteva essere inattivato da quelle sostanze che denaturano o degradano le proteine, come alcuni detergenti e gli acidi forti. Anche se il matematico J. Griffith, nel 1967 (Griffith J., 1967), ipotizzò per primo che l'agente responsabile dello Scrapie potesse essere una proteina, soltanto nel 1982 Stanley Prusiner fu in grado di purificare dai preparati di cervelli infettati dallo Scrapie, una proteina parzialmente resistente alla digestione con proteasi, la cui concentrazione era proporzionale al titolo infettante del preparato. I risultati ottenuti lo condussero ad ipotizzare che la proteina isolata PrP 27-30 (27-30 kD) fosse il costituente fondamentale dell'agente infettivo che lui stesso chiamò "prione" (Prusiner S. B., 1982a), acronimo per "particelle proteiche infettive" (*proteinaceous infectious particles*). Tale frammento proteico deriva in realtà dall'idrolisi della proteina prionica completa, correlata allo Scrapie o PrP^{Sc} 33-35.

Tale scoperta andava contro una delle più salde teorie della biologia molecolare, quella secondo cui, per essere infettante, una particella deve contenere almeno un acido nucleico; tuttavia motivava le caratteristiche di questi agenti infettivi non convenzionali ed in particolar modo l'assenza di risposta immunitaria o flogistica nell'ospite.

Il punto debole della teoria prionica è dato dall'esistenza di diversi ceppi di scrapie che implicano la necessità di una molecola informativa. Per

spiegare questo apparente paradosso sono state formulate due differenti teorie, la teoria virale e la teoria del virino. Entrambe postulano la presenza di una molecola informazionale, che potrebbe essere rappresentata dall'acido nucleico di un piccolo virus con caratteristiche non convenzionali, oppure da un acido nucleico legato ad una molecola protettiva dell'ospite, quale ad esempio la PrP^C.

Attualmente i dati finora ottenuti dalla letteratura di questi ultimi anni, sembrano sostenere l'ipotesi della "sola proteina" di Prusiner.

1.3 Struttura della PrP^C e della sua forma patologica PrP^{Sc}

Il gene che codifica per la PrP^C è presente in tutti i mammiferi e nell'uomo è definito PRNP, localizzato sul braccio corto del cromosoma 20, mentre nel topo è definito Prn-p, localizzato sul cromosoma 2 (Prusiner S. B., 1995).

È stato dimostrato che esiste un alto grado di conservazione del gene a livello filogenetico e questo fenomeno potrebbe spiegare il suo ruolo essenziale nel metabolismo cellulare. In realtà, la sua presenza non sembra essere necessaria per la crescita e lo sviluppo delle cellule normali, dal momento che i topi, con l'inattivazione del gene Prn-p, si sviluppano

normalmente e rimangono sani. Questa osservazione fa supporre che le malattie da prioni non derivino da un silenziamento della funzione della proteina prionica cellulare, ma piuttosto dall'accumulo della sua forma patologica PrP^{Sc} (Prusiner S. B., 1982b).

La PrP^C, costitutivamente espressa in tutte le cellule nucleate dei mammiferi, è presente nei soggetti sani a livello della membrana plasmatica di vari tessuti, anche se le più alte concentrazioni sono associate alle cellule nervose.

La proteina prionica cellulare è formata da 209 aminoacidi e presenta due siti N-glicosilati in prossimità dell'Asparagina 181 e dell'Asparagina 197. I gruppi oligosaccaridici sono localizzati in una particolare regione della proteina in cui si forma un legame covalente intramolecolare, ovvero un ponte disolfuro tra la Cisteina 179 e la Cisteina 214.

La glicosilazione, che ricordiamo essere una modificazione post-traduzionale realizzata nell'apparato del Golgi, ha diverse funzioni: stabilizzare la proteina, coinvolgimento nel riconoscimento molecolare e azione protettiva verso le proteasi.

Gli oligosaccaridi in esame proteggono una vasta regione della superficie della proteina prionica, dal momento che impediscono stericamente sia le interazioni intermolecolari (proteina-proteina) che le interazioni intramolecolari (residui aminoacidici da 1 a 90) (Rudd *et al.*, 2001).

La PrP^C è attaccata alla superficie cellulare mediante un'ancora costituita da glicosilfosfatidilinositolo (GPI) (Stahl *et al.*, 1987). Tale ancora è legata all'estremità carbossiterminale della proteina prionica in prossimità della Serina 231 e serve da giunzione flessibile, che permette alla proteina di interagire con molecole all'esterno della cellula. L'intera proteina, senza l'ancora glicolipidica, è localizzata nello spazio extracellulare.

Modelli molecolari indicano che il dominio C-terminale della PrP^C, che lega quest'ultima all'ancora GPI, dà luogo a diverse interazioni non covalenti tra la proteina e l'ancora.

Il cuore della struttura del glicosilfosfatidilinositolo è costituito da un'unità di fosfoetanolamina, a cui è legata l'estremità carbossi-terminale della proteina. Segue un'unità oligosaccaridica rappresentata da tre residui di mannosio, un residuo di glucosamina e da un residuo di inositolo. Il tutto è legato, mediante una molecola di glicerofosfato, a due catene di acido grasso per ancorare la proteina alla membrana.

Tuttavia, il ruolo dell'ancora e delle proteine legate al GPI rimane ancora da chiarire (Ikezawa, 2002).

Attraverso la risonanza magnetica nucleare (NMR) è stata chiarita la struttura tridimensionale della PrP^C di topo. Lo studio si è focalizzato sul dominio (121-131) della proteina prionica cellulare. Tale regione della proteina contiene 3 α -eliche e due filamenti β antiparalleli. Il ripiegamento

del polipeptide è stabilizzato da interazioni idrofobiche situate nel cuore della proteina che riguardano le catene laterali della seconda e terza α -elica e dei β -foglietti. La superficie della PrP^C è invece caratterizzata da una distribuzione irregolare di cariche positive e negative (Riek *et al.*, 1996).

Poiché la PrP^C nell'uomo è codificata da un gene, che contiene un solo esone, ne deriva che la PrP^{Sc} non si forma da un taglio alternativo dell'mRNA (RNA messaggero) che codifica per tale proteina. Infatti, le due forme proteiche, hanno lo stesso peso molecolare, la stessa sequenza aminoacidica, gruppi oligosaccaridici simili ed un'ancora glicolipidica. Tuttavia è possibile distinguerle per alcune caratteristiche: la PrP^{Sc} è associata con l'infettività a differenza della PrP^C, che invece viene completamente digerita tramite proteolisi con la proteasi K; la PrP^{Sc} viene digerita parzialmente, dando origine alla PrP 27-30.

Il peptide PrP 27-30 è in grado di polimerizzare dando luogo a fibrille simili a quelle amiloidi, che a loro volta sono in grado di organizzarsi in placche, presenti a livello cerebrale in numerose Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) tra cui l'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE). La resistenza all'azione della proteasi K della PrP^{Sc} è alla base del test attualmente in uso per la diagnosi della BSE, unitamente ad indagini di biologia molecolare ed immunistochimica su sezioni di tessuto nervoso.

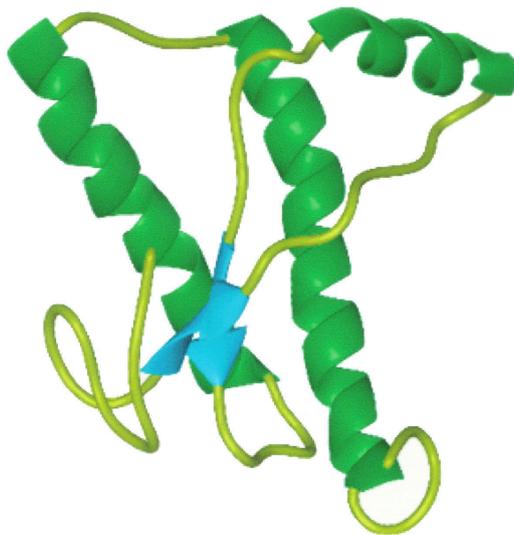
Dal punto di vista strutturale la differenza tra la proteina prionica cellulare e

quella patologica risiede esclusivamente nelle loro conformazioni tridimensionali; infatti il ripiegamento di una proteina che in genere è determinato da diversi ordini di fattori, quali la struttura primaria, insieme ad uno specifico ambiente chimico-fisico (pH, forza ionica, temperatura), influenzano le conformazioni della struttura secondaria (α -elica e β -foglietto) del polipeptide. Anche l'interazione con altre proteine (foldasi, chaperonine) determina altri specifici ripiegamenti del polipeptide primario, inclusa la formazione di ponti disolfuro (Kumar e Murali, 2008). Il ripiegamento della proteina può essere così alterato da una mutazione che sostituisca uno o più aminoacidi presenti in posizioni cruciali per la struttura della proteina, tanto da determinarne modificazioni conformazionali. Si ha così il passaggio dalla struttura ad α -elica a quella β -foglietto, estremamente stabile ai fini della funzione e resistente all'azione degradativa delle proteasi. Attraverso studi spettroscopici si può rilevare che: la PrP^{Sc} è per il 43% formata da foglietti- β e per il 30% da α -elica, mentre la PrP^c è per il 3% in foglietti- β e per il 42% da α -elica (Fig. 1). Inoltre, la PrP 27-30 possiede lo stesso alto contenuto in foglietti- β della proteina da cui deriva (PrP^{Sc}) (Riek *et al.*, 1996). Queste differenze strutturali sono alla base della differente sensibilità all'azione delle proteasi, poiché la ricchezza in strutture β rende la proteina prionica resistente

all'azione proteolitica, tranne che nel tratto aminoterminale.

Struttura terziaria

PrP^c



Struttura terziaria

PrP^{Sc}



Fig.1

Conformazioni tridimensionali della PrP^c e della PrP^{Sc}

1.4 Replicazione del prione

Due diversi studi genetici dimostrano che le particelle infettive sono prodotte dalla proteina prionica cellulare PrP^C. In uno di essi è stata osservata la malattia prionica in un topo transgenico che esprime la proteina prionica cellulare con una particolare sostituzione aminoacidica, omologa a quella presente nei pazienti affetti da GSS (Telling *et al.*, 1996).

Nella seconda modalità di studio l'importanza della proteina prionica cellulare PrP^C nel generare l'infettività è stata dimostrata direttamente in topi transgenici in cui è stato distrutto il gene che codifica per la proteina prionica endogena (Prn-p^{0/0}). In tali topi è rilevabile sia la loro resistenza alla malattia neurodegenerativa, che la loro incapacità di generare nuove particelle infettive (Prusiner *et al.*, 1993). Queste osservazioni suggeriscono che la proteina prionica cellulare assume una conformazione tridimensionale errata per la presenza della sua forma patologica (Havsteen, B. H., 2004).

Due distinti meccanismi sono stati proposti per spiegare la replicazione della proteina prionica patologica PrP^{Sc}.

Nel primo, la formazione della proteina prionica patologica, è un processo di polimerizzazione, nucleazione-dipendente (Horwich e Weismann, 1997), (Fig. 2A).

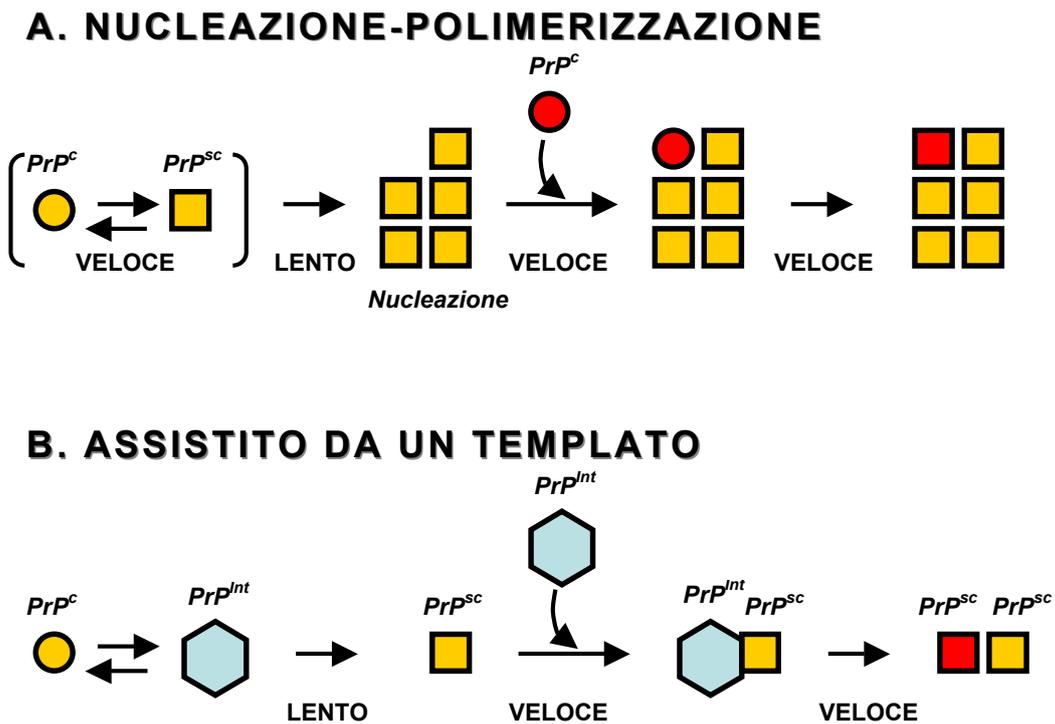
In assenza di aggregati preesistenti di proteina prionica patologica, la conversione tra PrP^{C} e PrP^{Sc} è reversibile, ma il monomero PrP^{Sc} risulta essere meno stabile di quello della PrP^{C} . Nel caso in cui sono presenti gli aggregati di proteina prionica patologica, questi promuoveranno la conversione della PrP^{C} nella sua forma patologica. Tale cambiamento conformazionale sarebbe in altre circostanze sfavorito.

Nel secondo modello proposto, la forma PrP^{Sc} risulta essere termodinamicamente più stabile, ma inaccessibile da un punto di vista cinetico (Horwich e Weismann, 1997). In questo caso, la PrP^{Sc} potrebbe promuovere il cambiamento strutturale, catalizzando il riarrangiamento della molecola di PrP^{C} o destabilizzando parzialmente l'intermedio che si forma durante il ripiegamento della proteina. In questo modello l'interconversione tra l'intermedio (stato di globulo fuso) e lo stato nativo della proteina (stato biologicamente attivo) è estremamente lento. La conversione comunque è drammaticamente accelerata se si lega una molecola proteica che catalizza il ripiegamento verso lo stato nativo.

Concludendo, la PrP^{Sc} si moltiplica in modo esponenziale, catalizzando il cambiamento della struttura tridimensionale della proteina prionica cellulare verso la conformazione patologica. Molti fattori ancora da studiare, come ad esempio le chaperonine, potrebbero essere coinvolte nel processo di conversione. Questo modello di replicazione si chiama

“replicazione assistita da un template” (Fig. 2B).

Secondo Prusiner, la prima molecola di PrP^{Sc} può avere origine esogena (infezione naturale o sperimentale), oppure derivare dalla conversione spontanea di una molecola endogena di PrP^C ; tale conversione è facilitata dalla presenza di particolari residui aminoacidici (mutazioni o polimorfismi).



Replicazione del prione illustrata attraverso i due modelli proposti

1.5 Metabolismo e biosintesi della PrP^C

Il gene umano della PrP^C, localizzato sul braccio corto del cromosoma 20, è chiamato PRNP (Parchi, 2001). Tale gene codifica per una proteina di 250 aminoacidi (209 in forma matura) contenente diverse regioni distinte: un peptide di segnale N-terminale, una serie ripetuta di 5 octapeptidi, un segmento centrale idrofobico ed una regione carbossi-terminale idrofobica che serve da segnale per l'aggiunta di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (Stahl *et al.*, 1987).

Dopo il processo di traduzione dell' mRNA ad opera dei ribosomi, la PrP^C va incontro ad una serie di modificazioni post-traduzionali (Prusiner *et al.*, 1998). Come tutte le altre proteine ancorate al GPI, la proteina prionica cellulare contiene inizialmente una sequenza N-terminale che dirige la catena nascente al Reticolo Endoplasmatico (RE) ed una sequenza idrofobica C-terminale lunga 20 o 30 residui aminoacidici. Questa regione idrofobica lega transitoriamente la proteina alla membrana del Reticolo Endoplasmatico. L'Etanolamina di un'unità GPI si attacca ad un peptide legato all'estremità luminale di questa regione C-terminale. Il peptide C-terminale viene rilasciato per produrre la proteina legata al GPI. Il ruolo della coda idrofobica sull'estremità carbossiterminale è quello di trattenere

la catena polipeptidica sulla membrana del RE, fino a quando non si verifica l'aggiunta del GPI. Successivamente la proteina passa dal RE al Golgi, dove vengono aggiunti gruppi oligosaccaridici nei vari siti e poi si muove verso la membrana plasmatica dove svolge la sua funzione fisiologica (Shyng *et al.*, 1993; Linden *et al.*, 2008).

La PrP^C, come la maggior parte delle proteine ancorate al GPI, non viene espressa uniformemente sulla membrana plasmatica, ma è presente in punti preferenziali definiti microdomini o “rafts” (Naslavsky *et al.*, 1997). Tali microdomini, presenti in tutti i tipi cellulari, sono porzioni specializzate della membrana plasmatica, notevolmente arricchite di glicosfingolipidi e colesterolo, caratterizzate dalla presenza di determinate proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (Simons e Ikonen, 1997).

La PrP^C, una volta espressa a livello della membrana, viene riciclata all'interno della cellula e sottoposta a clivaggio. Una parte della proteina troncata torna in superficie, mentre la rimanente raggiunge gli endosomi ed i lisosomi dove viene degradata. Molti studi dimostrano che la proteina prionica può essere endocitata mediante la formazione di vescicole rivestite da clatrina (Shyng *et al.*, 1994). Inizialmente molecole proteiche di clatrina si aggregano in una rete a forma di canestro sulla faccia citosolica della membrana plasmatica e con questo processo di associazione molecolare comincia a generarsi una vescicola. La dinamina, una piccola proteina

capace di legare il GTP, si aggrega in un anello intorno alla radice di ogni fossetta rivestita quando è già profondamente invaginata. Quando la dinamina idrolizza il suo GTP, cosa che sembra causare la contrazione dell'anello, la vescicola si distacca dalla membrana. La clatrina di per sé non interviene nella captazione di molecole specifiche da trasportare, ma questa funzione è espletata dalle adaptine, capaci sia di legarsi al rivestimento vescicolare, sia di intrappolare i recettori che legano le molecole da endocitare.

La proteina prionica, essendo ancorata al GPI, non presenta una coda citoplasmatica in grado di interagire direttamente con le componenti delle fossette rivestite da clatrina, inoltre, queste, non si formano a livello dei microdomini. Molti studi hanno rilevato che la proteina prionica, durante l'endocitosi, lascia il microdominio per entrare in una regione della membrana plasmatica, dove sono presenti le fossette di clatrina. Una spiegazione plausibile potrebbe essere quella secondo cui la proteina prionica si lega al dominio extracellulare del recettore della transferrina (TfR) che interagisce, attraverso il suo dominio citoplasmatico, con le componenti molecolari delle fossette rivestite da clatrina (Sunyach *et al.*, 2003). Numerosi risultati mostrano che la regione N-terminale della proteina prionica gioca un ruolo importante nel favorire l'endocitosi della proteina stessa, infatti una delezione dell'estremità N-terminale della

proteina riduce l'efficienza con cui le molecole vengono endocitate, attraverso il meccanismo clatrina-dipendente (Shyng *et al.*, 1995). La regione N-terminale è responsabile anche del legame con il rame ed è stato provato che è proprio tale ione a stimolare il meccanismo di endocitosi. In cellule di neuroblastoma, l'aggiunta di rame nel terreno di coltura in una quantità non tossica per la cellula, causa una rapida e reversibile endocitosi della PrP^C dalla superficie cellulare, suggerendo una possibile funzione della proteina prionica nel trasporto del rame all'interno della cellula (Pauly e Harris, 1998; Zamosa-Signoret *et al.*, 2008). Ulteriori studi si sono focalizzati sulla localizzazione della conversione della proteina prionica cellulare nella sua forma patologica. La formazione della PrP^{Sc} è stata arrestata sia mediante una particolare proteasi, la fosfatidilinositol fosfolipasi C (PIPLC), che rimuove le molecole proteiche ancorate alla superficie cellulare, sia incubando cellule infettate a 18°C per inibire la fusione tra endosoma e lisosoma. Quindi la PrP^{Sc} è sintetizzata a partire dalla PrP^C, sia sulla membrana plasmatica, sia a livello intracellulare dopo endocitosi (Caughey e Raymond, 1991). Tali osservazioni fanno pensare che le vescicole endocitiche siano coinvolte nel generare la forma patologica della proteina prionica, perciò l'inibizione dell'endocitosi, mediata da clatrina, potrebbe rappresentare una strategia terapeutica per bloccare la replicazione del prione (Shyng *et al.*, 1994), così come anche i

processi di esterificazione del colesterolo (Bate *et al.*, 2008)

1.6 Funzione della PrP^C

Si ipotizza che la proteina prionica cellulare possa agire da interruttore molecolare regolando diverse funzioni tra cui la comunicazione cellulare, il riconoscimento e la trasduzione del segnale.

Il gruppo di Charles Weissmann (Bueler *et al.*, 1993) dell'Università di Zurigo, ha dimostrato che i topi transgenici che non esprimono la PrP^C (topi Knock-out) si sviluppano normalmente e non mostrano deficit comportamentali significativi e, solo lievi alterazioni di funzionamento del sistema immunitario (Zamosa-Signoret *et al.*, 2008); è stato anche osservato che l'introduzione esogena di particelle infettive di PrP^{Sc} non son in grado di trasmettere la malattia.

Nel topo è presente un gene che codifica per una proteina (doppel o Dpl) ad elevato grado di omologia con la proteina prionica. E' stato ipotizzato che il prodotto di tale gene possa in qualche modo supplire l'assenza di PrP nei topi transgenici knock-out, sebbene in proposito vi siano pareri discordi (Mo *et al.*, 2001), soprattutto considerando che i topi knock-out per questo gene risultano essere perfettamente normali. Dpl non causa la replicazione dei prioni e la sovraespressione di tali proteine nel sistema nervoso centrale,

ed induce segni di neurodegenerazione assolutamente differenti da quelli presenti nelle malattie da prioni.

Studi di elettrofisiologia su ippocampi di topi transgenici, che non esprimono la proteina prionica cellulare (Malucci *et al.*, 2002), hanno mostrato che essi presentano un deficit nella trasmissione sinaptica mediato da recettori per il neurotrasmettitore GABA (Acido γ -aminobutirrico).

Gabison e collaboratori hanno rilevato che la PrP^C può legare una famiglia di proteine correlate all'eparina (Gabison *et al.*, 1993) e in tal modo inibire la conversione della PrP^C in PrP^{Sc}. L'eparina è un polianione solfato, strettamente correlato ai glicosaminoglicani cellulari, a loro volta associati alla PrP^{Sc} nelle placche amiloidi.

Tutti questi dati forniscono ad oggi un quadro decisamente incompleto sulla funzione fisiologica della PrP^C, anche se una nutrita serie di evidenze sperimentali testimonia una forte implicazione della PrP^C nel metabolismo e nell'omeostasi del rame, dello zinco e del manganese (Prince e Gunson, 1998; Kramer *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2001; Quaglio *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2001a; Wong *et al.*, 2001b; Lasmezas C. I., 2003; Rachidi *et al.*, 2003; Brazier, M.W., *et al.*, 2008). Diversi studi hanno dimostrato che la PrP^C può legare il rame in prossimità del suo dominio N-terminale, in una particolare regione costituita da una sequenza di 8 aa ripetuta in tandem (PHGGGWGQ). Probabilmente tale legame avviene attraverso l'effetto

chelante della Glicina/Istidina (PHGGGWGQ) (Stockel *et al.*, 1998).

Il rame potrebbe essere indispensabile per la stabilità conformazionale della proteina, oppure rendere la proteina prionica capace di rispondere allo stress ossidativo della cellula, regolando l'attività della superossido dismutasi (Cu/Zn SOD).

La superossido dismutasi, il principale enzima antiossidante, è un metallo enzima che contiene come cofattori una molecola di rame ed una di zinco, grazie alle quali converte il radicale superossido (O_2^-) in acqua ossigenata (H_2O_2) e ossigeno (O_2).

In numerosi lavori Brown e collaboratori hanno dimostrato una diminuzione dell'attività della SOD in colture di cellule cerebellari isolate da topi transgenici in cui il gene che codifica per la proteina prionica cellulare è stato inattivato. Questo risultato suggerisce che la PrP^C potrebbe regolare l'internalizzazione e l'incorporazione del rame nella SOD (Brown *et al.*, 1997; Brown e Besinger, 1998).

Altri risultati che sostengono tale teoria sono stati ottenuti utilizzando diversi tessuti (fegato, cuore, varie regioni del sistema nervoso centrale) isolati da topi normali e transgenici per il gene che codifica per la proteina prionica. In assenza della PrP^C si è rilevata, non solo una diminuzione dell'attività della SOD, ma anche dell'attività della catalasi e della ornitina decarbossilasi (Klamt *et al.*, 2001).

Il rame è fondamentale nelle risposte immunitarie, infatti è stato dimostrato che l'interleuchina 2 (IL-2) diminuisce in topi che hanno una dieta priva di rame (Lukasewycz e Prohaska, 1990). Molti studi hanno inoltre rilevato un ritardo nell'espressione del gene che codifica per l'IL-2 nei linfociti T di topi transgenici con il gene per la PrP^C silenziato. Questo risultato assegna alla PrP^C un ruolo fisiologico, che consiste nel trasferire rapidamente gli ioni rame nei linfociti T di topo (Kubosaki *et al.*, 2003).

Negli ultimi anni si sono accumulate una serie di evidenze sperimentali che chiamano in causa la PrP^C come fattore implicato nella regolazione del processo apoptotico. In un recente lavoro (Hachiya *et al.* 2005a) hanno messo in evidenza che l'aumentata espressione della PrP^C, in topi transgenici che sviluppano spontaneamente disfunzioni neurologiche in maniera dipendente dall'età, determinava un accumulo anomalo della proteina prionica cellulare a livello mitocondriale. Questa aberrante localizzazione era accompagnata dalla diminuzione dell'attività della manganese superossidodismutasi (Mn-SOD), dal rilascio del citocromo c nel citoplasma, dall'attivazione della caspasi-3 e dalla frammentazione del DNA, principalmente a livello dell'ippocampo.

Altri studi ottenuti mediante "real-time imaging" (Hachiya *et al.* 2005b) su cellule vive utilizzando un costrutto GFP-PrP, che conteneva una mutazione al codone 145 simile alla MGSS, metteva in evidenza una

abberrante localizzazione a livello mitocondriale in cellule di neuroblastoma murino N2a e HpL3-4. Inoltre, si poteva osservare un cambiamento nel potenziale di membrana mitocondriale, il rilascio del citocromo c nel citoplasma e frammentazione del DNA.

1.7 La Neuroinvasione

È molto probabile che la presenza del prione anche in sedi extracerebrali sia importante per la neuroinvasione: la ricerca si è perciò focalizzata su cellule, recettori e meccanismi cellulari coinvolti nel passaggio dei prioni da una localizzazione extracerebrale al cervello.

Impiantando in topi privi del gene PrP^C (topi knock-out per il gene della PrP^C, immuni dalla patologia da prioni) porzioni di cervello di topi transgenici che sovraesprimono la proteina prionica normale (topi PrP^C plus), essi sviluppano un'encefalopatia spongiforme localizzata, limitatamente alla porzione trapiantata: cioè il trapianto sviluppa la patologia, ma non il cervello dell'ospite (Brandner *et al.*, 1996); per di più, successivi esperimenti, oltre a confermare questi dati hanno dimostrato che la presenza della proteina prionica normale in sedi extracerebrali è necessaria per portare quella patologica dai siti di ingresso, al cervello (Blatter *et al.*, 1997). Il lungo periodo di incubazione caratteristico di tali

patologie potrebbe dipendere dalla moltiplicazione dei prioni in “serbatoi” all’interno dell’organismo; nel corso degli anni il possibile candidato è stato indicato soprattutto nel sistema linforeticolare (linfonodi, placche di Peyer). Si è subito ipotizzato che le cellule emopoietiche fossero i tipi cellulari coinvolti nel processo di trasferimento e propagazione dei prioni attraverso il sistema linforeticolare (Weissmann *et al.*, 2002). I topi knock-out con trapianto PrP^{Sc} positivo sono stati dapprima irradiati e in seguito sono state loro somministrate cellule emopoietiche staminali derivate dal fegato fetale di topi PrP^C plus: poiché queste cellule ricolonizzano il midollo osseo si è ottenuto un topo chimera, geneticamente PrP^C knock-out, con un trapianto di cellule neuroectodermali PrP^{Sc} positive e cellule emopoietiche staminali anche esse PrP^C positive. In seguito sono stati quindi introdotti i prioni per via intraperitoneale, ma si è potuto constatare l’assenza di fenomeni neuroinvasivi (Blatter *et al.*, 1997). Ulteriori ed approfonditi studi hanno portato a concludere che la neuroinvasione è un processo articolato in due tempi; durante la prima fase, definita di “linfoinvasione” il prione entra nel sistema linforeticolare e giunge ai centri germinativi di milza, linfonodi, tonsille e placche di Peyer. Nell’uomo in tale sede il prione rimane per anni, realizzando una malattia prionica periferica localizzata all’apparato linforeticolare, soltanto in seguito si realizza la fase di neuroinvasione vera e propria, quando cioè il

prione raggiunge il Sistema Nervoso Centrale. Per capire quale fosse la prima cellula a veicolare il prione sono stati utilizzati topi immunodeficienti per i linfociti B, o per i linfociti T, per entrambi o per le cellule follicolari dendritiche.

Qualunque alterazione genetica che impedisca la differenziazione terminale dei linfociti B è in grado di prevenire la neuroinvasione: i linfociti B sono dunque necessari affinché essa si verifichi (Klein *et al.*, 1997, Von Poser-Klein *et al.*, 2008). È possibile che il linfocita B riesca a legare il prione sulla superficie con un meccanismo indipendente dall'espressione della PrP^C sulla superficie del linfocita B stesso; tuttavia si pensa che i linfociti B producano un fattore di maturazione necessario ad un altro tipo cellulare fondamentale per la neuroinvasione: ovvero la cellula follicolare dendritica, cellula stromale che si trova a livello dei centri germinativi e la linfotossina beta, da cui la cellula follicolare dipende per il suo mantenimento (Montrasio *et al.*, 2000). La linfotossina beta è un trimero inserito sulla membrana cellulare dei linfociti B, ed il suo recettore si trova sulla membrana delle cellule follicolari dendritiche, ciò significa che la trasduzione del segnale avviene solo quando c'è contatto fra le due cellule.

A lungo si è ritenuto che le strutture responsabili del trasporto dei prioni a livello del Sistema Nervoso Centrale fossero i gangli spinali, oggi si ritiene che sia coinvolto principalmente il sistema nervoso simpatico, anche in

considerazione del fatto che l'innervazione di milza e linfonodi e tonsille è essenzialmente di natura simpatica. Studi approfonditi hanno confermato quest'ipotesi: la simpaticectomia ritarda notevolmente la malattia, sebbene non la prevenga completamente (Glatzel *et al.*, 2001).

Sono stati studiati topi transgenici che sovraesprimono il “Nerve Growth Factor”, e nei quali l'innervazione della milza è notevolmente superiore ai controlli. L'iperinnervazione simpatica accelera il decorso della malattia.

La principale via di penetrazione della proteina prionica è rappresentata dall'epitelio gastrointestinale: sulla base di alcune evidenze sperimentali si è giunti ad individuare quali possibili responsabili dell'ingresso dei prioni le cellule M, particolari cellule specializzate dell'epitelio gastrointestinale; esse catturano macromolecole dal versante luminale e le trasportano dalla parte basolaterale (Heppner *et al.*, 2001). Rimane però da chiarire in quale maniera avviene il passaggio della PrP^C dalla cellula follicolare dendritica alle terminazioni nervose simpatiche. Si è ipotizzato che possa essere implicato qualche meccanismo molecolare specifico piuttosto che il semplice trasporto passivo.

1.8 Caratteristiche dei microdomini

I microdomini o “rafts” sono particolari regioni della membrana plasmatica arricchite di glicosfingolipidi, (compresi gangliosidi e sfingomieline) e di

colesterolo (Fig.3), risultano, inoltre, insolubili in detergenti non ionici alle basse temperature.

I lipidi contenuti nei rafts sono organizzati in maniera molto ordinata e compatta rispetto all'architettura della restante membrana plasmatica, in cui i lipidi possono muoversi liberamente attraverso diffusioni laterali. La forte coesione tra le molecole è dovuta ad interazioni idrofobiche che coinvolgono i residui degli acidi grassi saturi dei principali costituenti lipidici ed inoltre è aumentata dall'elevata presenza di colesterolo. La particolare organizzazione dei microdomini restringe pertanto l'accesso alla maggior parte delle proteine integrali di membrana (Simons e Ikonen, 1997).

Tali porzioni di membrana sono dette GEM (*Glycosphingolipid-Enriched Microdomains*), ovvero microdomini arricchiti in glicosfingolipidi.

I gangliosidi (glicosfingolipidi acidi), componenti ubiquitari delle membrane cellulari di tutti i vertebrati (Wiegandt H., 1982), sono stati proposti come marcatori di queste strutture di membrana. Essi sono particolarmente abbondanti nel tessuto nervoso e nella materia grigia, dove sono stati inizialmente isolati, e corrispondono a circa 1/10 del contenuto totale dei fosfolipidi. Poiché sono presenti solo nello strato esterno della membrana, in questa regione, corrispondono a 1/5 dei fosfolipidi presenti (Tettamanti *et al.*, 1980). Per quanto riguarda la loro struttura, i gangliosidi

sono caratterizzati dalla presenza di residui di acido sialico. Tra questi il più abbondante nel sistema nervoso risulta essere l'acido N-acetilneuramico (*NeuNAc*), mentre l'acido N-glicolilneuramico (*NeuNGc*) è largamente distribuito nei tessuti extraneurali (Leeden e Yur, 1987). I residui di acido sialico sono legati alla catena oligosaccaridica neutra mediante un legame di tipo alfa-chetosidico. Tale catena è costituita normalmente da glucosio, galattosio, N-acetilglucosamina, N-acetilgalattosamina e più raramente da fucosio. La porzione saccaridica è legata a sua volta al ceramide con un legame betaglicosidico. Il ceramide è formato da un acido grasso che si lega con legame carbamidico al gruppo-NH₂ della sfingosina (un aminoalcol insaturo a 18 atomi di carbonio con un doppio legame fra C4 e C5, un gruppo aminico in C2 e 2 gruppi ossidrilici in C1 e C3).

I gangliosidi del cervello contengono una miscela di acidi grassi a 18 o a 20 atomi di carbonio, dove il maggior costituente è l'acido stearico. Nei tessuti diversi dal SNC è contenuta invece una miscela variabile di acidi grassi a 16 e a 24 atomi di C (Leeden e Yur, 1987). La porzione ceramidica dei gangliosidi presenta un elevato carattere di rigidità, sia in seguito ad interazioni di tipo idrofobico, che ad interazioni di tipo idrofilico. La presenza del gruppo amidico planare e del doppio legame della sfingosina facilita la disposizione parallela delle due catene alifatiche (Pascher I., 1976). I gangliosidi vengono sintetizzati ad opera di glicosiltransferasi di

membrana soprattutto nell'apparato del Golgi e poi trasferiti alla membrana plasmatica mediante trasporto vescicolare (Van Meer G., 1993). La formazione di raggruppamenti sulla membrana è un processo dipendente dalla percentuale dei gangliosidi rispetto ai fosfolipidi di membrana e dalla presenza di sostanze capaci di favorire legami crociati, quali cationi bivalenti. Al di sotto di una certa concentrazione, definita critica e in assenza di sostanze condensanti, il raggruppamento o "*cluster*" risulta essere termodinamicamente sfavorito, essendo esso sempre in equilibrio con i monomeri mobili di gangliosidi; al di sopra della concentrazione critica, ed in presenza di sostanze condensanti, il "*cluster*" è termodinamicamente stabile e tende a formarsi spontaneamente. Per i gangliosidi la concentrazione critica è raggiunta quando sono in concentrazione tale da rappresentare almeno l'1,5% dei fosfolipidi presenti (Sharom e Grant, 1978). Quando la molecola gangliosidica si integra sulla membrana plasmatica la porzione idrofilica e la porzione idrofobica sono determinanti nel conferirle un orientamento ben preciso. La porzione idrofilica si pone a contatto con l'ambiente extracellulare e svolge un ruolo importante nell'interazione con altre molecole e nel riconoscimento cellulare. La porzione idrofobica s'inserisce nel doppio strato lipidico ed è responsabile della trasduzione dei segnali all'interno della cellula. Ogni cellula esprime una caratteristica composizione gangliosidica, differente sia

dal punto di vista qualitativo che quantitativo, che può variare in corso di differenziamento e maturazione cellulare (Hakomori S., 1981). Per quanto riguarda i diversi tipi cellulari, quali granulociti, monociti e linfociti del sangue periferico, è stato dimostrato che il ganglioside della latto-serie, sialosil esaosilceramide, è abbondante nei granulociti e meno nei monociti e linfociti. In particolare, il GM3 (monosialoganglioside) è il ganglioside maggiormente rappresentato nei linfociti e nei monociti di sangue periferico (72%), mentre è presente in minore quantità nei granulociti (Kiguchi *et al.*, 1990). La complessità della molecola gangliosidica e il comportamento chimico-fisico (porzione idrofobica, porzione idrofilica, etc.), consentono a queste molecole di poter interagire con differenti sostanze esterne, perciò è possibile che siano coinvolti nel meccanismo di adesione cellulare, in quanto molte proteine che prendono parte a questo processo si trovano in zone ricche di gangliosidi.

All'interno dei microdomini di membrana (Kiguchi *et al.*, 1990), oltre alle proteine ancorate al GPI, possiamo trovare proteine specifiche, come il recettore EGF-R (recettore del fattore di crescita epiteliale) con dominio tirosin-chinasico, proteine G monomeriche (Ras) ed eterodimeriche, tirosin-chinasi, appartenenti alla famiglia Src (Lck, Fyn) e la protein-chinasi C (PKC) (Parolini *et al.*, 1999), implicate nella trasduzione del segnale (Sargiacomo *et al.*, 1993); per questo motivo tali regioni specializzate della

membrana vengono chiamate domini di glicosignolazione.

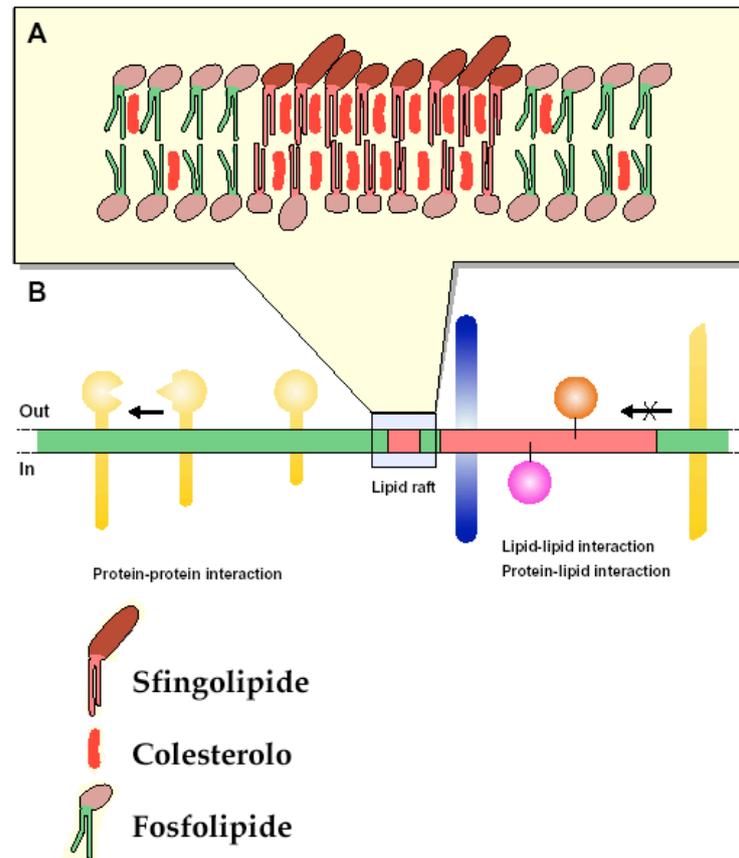


Fig. 3
Struttura del microdominio

1.9 Esosomi e microvescicole di membrana: diversa natura ed origine

Le cellule eucariotiche scambiano con l'ambiente esterno dei segnali (citochine, chemochine, nutrienti e proteine) attraverso l'uptake e la

secrezione di un complesso network di membrane. Usando questi compartimenti, le cellule ricevono macromolecole dall'ambiente esterno (endocitosi) o, rilasciano proteine e carboidrati di nuova sintesi (esocitosi).

Quest'ultima via, può dipendere o meno dallo ione calcio intracellulare e, ciò, consente di distinguere due distinti meccanismi di esocitosi: la forma costitutiva e, quella regolata.

In particolare, tale seconda forma di rilascio è indispensabile per i processi di segnalazione che intervengono tra i neuroni, attraverso il rilascio di vescicole sinaptiche che inducono trasmissione degli impulsi nervosi.

Tra le altre forme di esocitosi annoveriamo la fusione dei corpi multivescicolari (MVB) con la membrana plasmatica e successivo rilascio del loro carico (esosomi) nell'ambiente esterno.

A tale proposito cominciò ad essere introdotto il concetto di esosoma. Tale vescicola, non derivante dalla membrana plasmatica, è stata descritta per la prima volta allo scopo di chiarire il processo di “shedding” del recettore della transferrina, durante la maturazione dei reticolociti (de Gassart *et al.*, 2003). Gli esosomi hanno una particolare morfologia e composizione biochimica, che riflette la loro origine endosomiale; infatti il passaggio chiave nella formazione dei MVB, dai late-endosomi, è il processo di invaginazione inversa.

Durante tale processo, la membrana che circonda gli endosomi tardivi si invagina nel suo stesso lumen, e determina un continuo arricchimento di vescicole interne (Keller *et al.*, 2006) (fig. 4). Il loro diametro varia tra 50–90 nm (Fevrier e Raposo, 2004; Alais *et al.*, 2008). Viste le loro piccole dimensioni, l'identificazione di tali strutture è possibile unicamente mediante immunoelettromicroscopia.

Il processo di rilascio degli esosomi dalle cellule comporta la fusione di endosomi multivescicolari, con un processo analogo alla secrezione dei granuli secretori. La disponibilità di esosomi altamente purificati ha permesso la loro analisi proteomica (Fevrier *et al.*, 2004) che può riflettere un importante ruolo biologico svolto nelle patologie tumorali, nella regolazione sia positiva che negativa del sistema immunitario, nel riciclo e smaltimento di proteine di membrana, nello scambio di materiale genetico attraverso micro-mRNA (Valadi *et al.*, 2007) e, nella maturazione degli spermatozoi durante la migrazione negli epididimi (Keller *et al.*, 2006; Johnstone R. M., 2006). Negli ultimi anni, la ricerca sugli esosomi è stata stimolata dalla scoperta che anche cellule presentanti l'antigene (APC) come i linfociti B e le cellule dendritiche secernono esosomi durante il processo di esocitosi; inoltre, sembrano essere funzionalmente rilevanti poiché possono stimolare la proliferazione delle cellule T *in vitro* e, indurre una risposta immunitaria anti-tumorale *in vivo* (Raposo *et al.*, 1996;

Zitvogel *et al.*, 1998, Thery *et al.*, 2002). Recentissime evidenze sperimentali consentono di affermare che tali strutture, derivate dalla placenta di donne in stato di gravidanza, sono in grado anche di favorire il processo di privilegio immunitario del feto verso la madre, attraverso la soppressione dell'attività dei linfociti T materni mediata da esosomi contenenti FAS-L (Keller *et al.*, 2006).

Esosomi derivati da cellule dendritiche contengono molecole MHC di classe I e II, proteine G trimeriche, proteine citoscheletriche, annessina, integrine, protein chinasi della famiglia Src (Lyn) e tipici marcatori di microdomini, come CD55, CD58, CD59 (Fevriér e Raposo, 2004; Martinez *et al.*, 2005). Anche la proteina Rab 11, che è stata osservata nella linea cellulare eritroleucemica K562, risulta implicata nel processo di biosintesi degli esosomi. Per le altre proteine menzionate è ipotizzato un ruolo nei processi di fusione, adesione o nella degradazione lisosomiale delle proteine di membrana. Nel corso degli ultimi anni sono stati ottenuti numerosi dati riguardo al fatto che gli esosomi possano essere strutture implicate nella comunicazione intercellulare. È stata, inoltre, analizzata la presenza di microdomini lipidici (Rafts) sulla membrana di esosomi rilasciati da reticolociti di ratto (de Gassart *et al.*, 2003). In particolare, studi biochimici hanno messo in evidenza un rapporto colesterolo/fosfolipidi simile a quello della membrana plasmatica delle

cellule da cui derivano ed inoltre è stata evidenziata la presenza del ganglioside GM1, noto come marcatore di microdomini lipidici.

Recentemente, sono state riportate evidenze sperimentali che dimostrano la presenza di strutture membranose differenti per struttura e dimensione dagli esosomi. Tali microvescicole (MVs), vengono rilasciate sia *in vivo*, nel plasma e nei vari fluidi corporei (urina, liquido ascitico, fluido amniotico), sia *in vitro*, dalle colture cellulari tumorali (Dignat-George *et al.*, 2004). La loro caratterizzazione è ancora in fase di studio. Le dimensioni variano tra 100-1000 μm e, l'origine è diversa, derivando direttamente da un processo di rilascio (“*blebbing*”) della membrana (Sabatier, F. *et al.* 2002; Joop, K., *et al.*, 2001). Diversi studi, infatti, hanno documentato il rilascio delle microvescicole da diversi tipi cellulari (endoteliali, leucociti, piastrine) nel sangue. La loro concentrazione risultava essere aumentata nei casi di patologie conclamate quali la Sindrome di Anticorpi Antifosfolipidi (APS), Lupus Eritematoso (LES), Diabete di I e II tipo e nelle disfunzioni vascolari (Martinez *et al.*, 2005) o anche dopo trattamento *in vitro* con fattore di necrosi tumorale (TNF). Poiché tali strutture membranose posseggono marcatori molecolari tipici delle cellule dalle quali derivano, è stato possibile discriminarne l'origine. In individui sani la concentrazione maggiore di microvescicole nel sangue è rilasciata dalle piastrine. Tale

situazione è mutata nei pazienti con sindromi vascolari, aterosclerosi, diabete di I tipo, dove sono essenzialmente le cellule endoteliali a rilasciarne una maggiore quantità. Inoltre, in individui con HIV, le microvescicole sono rilasciate soprattutto dai leucociti. Tali evidenze sostengono l'ipotesi dell'azione paracrina delle microvescicole, essendo esse, vettori informativi tra le cellule del sangue e quelle della parete vascolare; inoltre, i dati evidenziano un loro importante coinvolgimento nelle patologie da ipercoagulazione, essendo esse stesse potenziali induttori dell'espressione del fattore tissutale (TF) su cellule monocitiche (Sabatier *et al.*, 2002; Joop *et al.*, 2001).

Microvescicole ed esosomi possono legare le proteine GPI, tra cui la proteina prionica, e, nell'ottica delle patologie da Prioni, risultano essere importanti veicoli capaci di favorire la diffusione da cellula a cellula della PrP costitutivamente espressa (PrP^c) e, della sua isoforma patologica PrP^{sc} durante il processo di neuroinvasione.

Nel corso delle nostre indagini abbiamo incentrato l'attenzione sulle MVs derivate dai mezzi di coltura di cellule di neuroblastoma murino (Neuro-2a) e, isolate attraverso metodiche di centrifugazione differenziale. Tali elementi sono stati analizzati mediante microscopia elettronica, al fine di osservarne struttura e dimensioni, in Immunoblot e FACS analisi (citofluorimetria), per analizzarne biochimicamente la composizione; tali

indagini sono state condotte anche su linee cellulari della stessa natura ma, non esprimenti il gene PRNP (Neuro-2a PrP Knock-out) o, alternativamente, sulla linea cellulare sperimentalmente infettata con la isoforma patologica della proteina prionica (RML- Neuro-2a PK1).

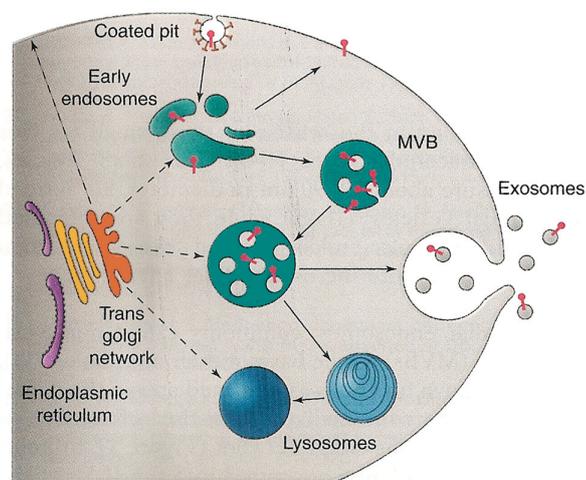


Fig. 4
Rappresentazione schematica del rilascio di esosomi, nell'ambiente extracellulare, attraverso la fusione delle vescicole MVB con la membrana plasmatica.

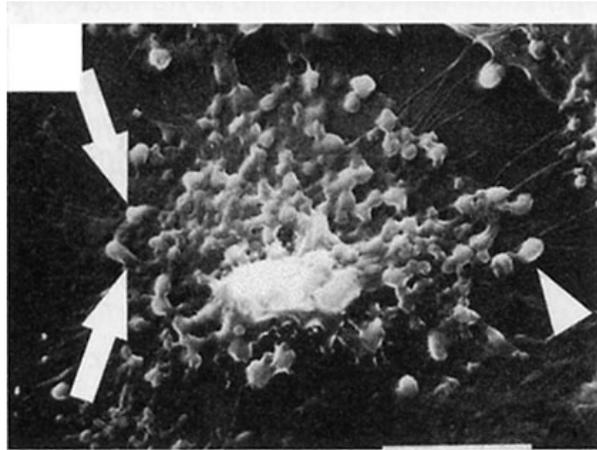


Fig. 5

Immunolettromicroscopia di mirovescicole rilasciate da cellule endoteliali in corso di apoptosi (freccie).

SCOPO DELLA RICERCA

La proteina prionica, come già riportato, è una glicoproteina legata sulla superficie cellulare di neuroni e altre cellule mediante un ancoraggio al glicosilfosfatidilinositolo (GPI) o “*GPI linkage*” (Stahl *et al.*, 1987).

Così come altre “*GPI-anchored proteins*”, la maggior parte della PrP^C di cellule nervose è distribuita nei microdomini lipidici di membrana. Alcuni studi suggeriscono che il metabolismo della PrP^C in generale e la formazione di PrP^{Sc} nelle cellule nervose sia regolata dai microdomini (Naslavsky *et al.*, 1999). Inoltre, una marcata deplezione di colesterolo, lipide particolarmente rappresentato nei microdomini, induce una diminuita sintesi di PrP^{Sc} e rallenta la degradazione di PrP^C (Taraboulos *et al.*, 1995).

La maggior parte degli studi sulla proteina prionica sono stati condotti su tessuto cerebrale e linee cellulari di origine tumorale, mentre pochi sono i dati relativi all’espressione ed alla funzione della PrP^C in cellule normali.

La PrP^C è stata riscontrata in linfociti umani (Cashman *et al.*, 1990) dove la sua espressione aumentava in conseguenza dell’attivazione delle cellule T (Li *et al.*, 2001). Sebbene il sistema immune dell’ospite sembri giocare un ruolo nella patogenesi delle malattie da prioni in modelli animali (Fraser e Dickinson, 1970; Klein *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2001), il meccanismo tramite il quale il sistema immune dell’ospite partecipa alla propagazione di PrP^{Sc} non è conosciuto. Recentemente, sono stati identificati sia in linfociti umani che su cellule di neuroblastoma murino,

microdomini di membrana plasmatica, caratterizzati da un arricchimento di glicosfingolipidi, di tirosin-chinasi della famiglia Src, di isoforme della protein-chinasi C (PKC) e di proteine ancorate al GPI.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di:

- Verificare la presenza della PrP^C in esosomi e microvescicole derivanti da sangue periferico mediante Immunoblot ed analisi citofluorimetrica;
- Valutare la possibile associazione tra PrP^C e gangliosidi nelle microvescicole di membrana e la possibile presenza di protein chinasi appartenenti alla famiglia Src (Fyn);
- Analizzare la distribuzione della proteina prionica mediante immunoelettromicroscopia;
- Verificare la capacità delle cellule di neuroblastoma murino, Neuro-2a, di rilasciare MVs nel mezzo di coltura;
- Valutare la capacità delle MVs derivate dalla linea cellulare sperimentalmente infettata, Neuro-2a PK1, di trasmettere l'infettività da prioni sia *in vivo* che *in vitro*.

Gli ultimi punti in particolare sono volti allo scopo di indagare il possibile ruolo degli esosomi e/o delle microvescicole nella propagazione della forma infettiva della proteina prionica, PrP^{Sc}.

MATERIALI E METODI

3.1. Colture Cellulari

Cellule linfoblastoidi umane CEM (Foley *et al.*, 1965) sono state coltivate in terreno di coltura RPMI 1640 (Invitrogen Italia srl, Milano, Italia), contenente 10% di siero fetale bovino inattivato (FCS, 10%), penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml), a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Le linea cellulare Neuro-2a di derivazione murina (American Type Culture Collection ATCC CCL 131) è stata coltivata in Dulbecco's Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen Italia srl, Milano, Italia), supplementato con 10% di siero fetale bovino inattivato (FCS), 4mM L-Glutamina (Sigma Chem.Co, St Louis, MO) e antibiotici 200 U/ml di penicillina e 0,2 mg/ml di streptomina, a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Le cellule Neuro-2a PK1 e (RML)-infettate Neuro-2a PK1 (Klohn *et al.*, 2003) sono state mantenute in Opti-MEM (Invitrogen, Germania) supplementate con 10% di siero fetale di capra (FCS), 4mM L-Glutamina ed antibiotici 200 U/ml di penicillina e 0,2 mg/ml di streptomina. Le colture sono state mantenute ad una temperatura di 37° C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

3.2. Anticorpi

Anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4 (Prionics, Svizzera).

Immunoglobulina anti-mouse coniugata all'oro colloidale (Biocell, UK).

Anticorpo monoclonale anti-PrP SAF 32 (SPI Bio, Italia). Anticorpo policlonale anti-PrP (C-20), anticorpo policlonale anti-PrP PE (C-20 PE), anticorpo policlonale anti-Fyn (FYN3), anticorpo policlonale anti Flotillina 2, anticorpo policlonale anti-tsg 101 (M-19) sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anticorpo monoclonale anti-GM2 e anti-GM3 (Kotani *et al.*, 1992) sono stati acquistati dalla Seikagaku (Corp. Chou-ku, Tokio, Japan). Subunità beta della tossina colerica HRP-coniugata (HRP-CTxB), anti-mouse IgG coniugate con HRP (anti-mouse IgG-HRP), anti-mouse IgM coniugato con HRP (anti-mouse IgM-HRP), anti-rabbit IgG coniugate con HRP (anti-rabbit IgG-HRP), Anti-goat IgG coniugata con HRP (anti-goat IgG-HRP), immunoglobuline da siero di capra con specificità irrilevante (IgG irrilevante), anticorpo monoclonale anti-GAP43 sono stati acquistati da Sigma Chem. Co, (St Louis, MO, USA).

IgG con specificità irrilevante derivante da siero di capra coniugato a B-PE (goat IgG B-PE irrilevante) sono state acquistate da ICN Biomedicals (Milano, Italia).

Anticorpo monoclonale anti-Alix IgG1 3A9 è stato acquistato da (Cell Signaling, USA).

3.3 Preparazione delle MVs da sangue periferico.

Per la preparazione del plasma privo di piastrine, 5 ml di sangue periferico sono stati prelevati con prelievo e posti all'interno di un apposito tubo contenente 0,129 M di citrato sodio. Le MVs sono state separate dal sangue intero, entro l'ora successiva al prelievo, attraverso due cicli di centrifugazioni differenziali: 15 min a 1500 x g, seguito da 1 min di decantazione a 13000 x g per rimuovere i residui di piastrine o dei frammenti cellulari di taglia simile (Dignat-George *et al.*, 2004).

Cinquanta µl di plasma sono state marcate con 2 µg di anticorpo anti-PrP (C-20 PE) a 4°C. L'intensità di fluorescenza è stata valutata attraverso analisi con citofluorimetro IL Coulter Co ulter Electronics, Hialeah, FL, USA) e confrontato con cinquanta µl di plasma, marcato con anticorpo con specificità irrilevante anti-goat IgG B-PE. La distribuzione delle dimensioni

delle MVs era compresa tra 0,1 e 1 μm ; le MVs sono state misurate secondo i parametri di forward scatter e 90° side scatter, utilizzando come standard beads da 0,8 μm di latex polystirene (Sigma, St Louis, MO, USA). Per distinguere eventuali residui di piastrine nel nostro campione, abbiamo paragonato la preparazione di MVs con una preparazione arricchita di piastrine, marcate con anticorpo monoclonale anti-CD41 (dato non mostrato).

In un esperimento parallelo, le MVs separate attraverso ultracentrifugazione a 20000 x g, sono state risospese in 50 μl di sample buffer e, analizzate in Western blot (Towbin *et al.*, 1992), usando l'anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4, e dunque l'anti-mouse IgG-HRP come secondario, l'anti-Fyn (FYN3) e l'anti-rabbit IgG-HRP come secondario, ed infine l'anti-Flotillina 2 seguito da marcatura con l'anti-goat IgG-HRp.

Immunoreattività è stata analizzata attraverso reazione di chemiluminescenza utilizzando il sistema di detezione ECL Western blocking (Amersham Biosciences).

3.4 Isolamento di MVs ed esosomi dai sovranatanti delle cellule in coltura

Le cellule Neuro-2a, Neuro-2a PK1 e CEM ($2-4 \times 10^7$) sono state coltivate per 2-3 giorni prima dell'isolamento delle MVs seguendo il protocollo di separazione attraverso centrifugazione differenziale (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2002; They *et al.*, 2001). I detriti cellulari sono stati rimossi attraverso due passaggi consecutivi a 4500 x g per 5 min a RT. I sovranatanti vengono sottoposti a centrifugazione a 20000 x g per 1 ora a 4°C. Le MVs sono state lavate in PBS o in Opti-MEM (Invitrogen, Germania), pellettate e dunque risospese in Opti-MEM per gli esperimenti di infezione *in vitro* o, alternativamente, in PBS per gli esperimenti di infezioni *in vivo*; una quota delle MVs viene sottoposta a lisi in appropriato tampone [20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% deossicolato di sodio, 0,5% SDS] per condurre l'analisi in immunoblot.

Esosomi sono stati separati dai sovranatanti precedentemente usati per separare le MVs attraverso ultracentrifugazione a 100000 x g 1 ora a 4°C. Successivamente gli esosomi vengono lavati in PBS, risedimentati e dunque lisati in appropriato tampone di lisi, già descritti in precedenza.

3.5 Isolamento ed analisi della frazione contenente Microdomini di membrana (GEM)

Le frazioni GEM sono state ottenute da cellule CEM, secondo la metodica descritta da Rodgers e Rose (Rodgers e Rose, 1996). Brevemente, 2×10^8 di cellule sono state risospese in 1 ml di tampone di lisi contenente Triton-X-100 1% (detergente non ionico), Tris-HCl 100 mM [pH 7.5], NaCl 150 mM, acidoetilendiaminotetracetico (EDTA) 5 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, ortovanadato di sodio (Na_3VO_4) 1 mM e 75 U di aprotinina.

La sospensione cellulare così ottenuta è stata poi sottoposta ad omogenizzazione mediante Dounce (10 colpi). Il lisato è stato quindi centrifugato per 5 minuti a $1300 \times g$ al fine di eliminare i nuclei ed i detriti cellulari.

Il sovranatante è stato sottoposto ad un gradiente lineare di saccarosio (5-40%) e centrifugato a $200.000 \times g$ per 16-18 ore a 4°C con un rotore SW41 (Beckman Ins, Palo Alto, CA). Dopo aver centrifugato, il gradiente è stato frazionato e sono state raccolte 11 frazioni, di 1ml ciascuna, partendo dalla sommità della provetta. Le frazioni 5-6 contengono i microdomini di membrana. Tutti i passaggi descritti sono stati effettuati ad una temperatura compresa tra 0° e 4°C .

La quantità di proteina in ciascuna frazione è stata valutata mediante metodo spettrofotometrico (BIORAD “*Protein Assay*” Lab. GmbH, Monaco, Germania).

Ciascuna frazione è stata poi analizzata tramite Immunoblot con anticorpo policlonale di capra, appartenente alla classe delle IgG, diretto contro la proteina prionica cellulare (anti-PrP C-20 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

3.6 Estrazione dei Gangliosidi e analisi mediante cromatografia su strato sottile (HPTLC)

Gli immunoprecipitati con anti-PrP (C-20) o alternativamente le microvescicole sono stati sottoposti ad estrazione gangliosidica, mediante il metodo descritto da Svennerholm e Fredman (Svennerholm e Fredman, 1980). In breve, gli immunoprecipitati e le microvescicole sono stati estratti due volte in cloroformio: metanolo: acqua (4:8:3) (v:v:v) e quindi sottoposti a partizione di Folch con ulteriore aggiunta di acqua, così da ottenere un rapporto finale cloroformio: metanolo: acqua pari a 1:2:1,4.

La “fase superiore”, contenente i glicosfingolipidi polari, è stata purificata dai sali e dai contaminanti di basso peso molecolare, utilizzando delle

colonne in silice Supelclean LC-18 (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) in base al metodo illustrato da Williams e McCluer (Williams e McCluer, 1980).

I glicosfingolipidi eluiti sono stati portati a secco in corrente d'azoto e separati mediante cromatografia su strato sottile ad elevata prestazione "*High-Performance-Thin-Layer-Chromatography*" (HPTLC), usando lastre in gel di silice per HPTLC (Merck, Darmstadt, Germania).

Come sistema eluente è stata utilizzata una miscela di cloroformio: metanolo: KCl 0,25% (5:4:1) (v:v:v) e come standards di riferimento sono stati utilizzati gangliosidi purificati: monosialoganglioside GM1 e GM3, disialoganglioside GD1a e GD1b e trisialoganglioside GT1b (Sigma Chem.Co, St Louis, MO).

Dopo la corsa, le lastre sono state fatte asciugare all'aria ed i gangliosidi sono stati visualizzati mediante reazione colorimetrica con il resorcinolo, colorante specifico per l'acido sialico, evidenziando bande in blu porpora (Svennerholm, 1957).

3.7 Immunomarcatura su lastra cromatografica TLC (Immunostaining)

Alternativamente i glicosfingolipidi, estratti come descritto precedentemente, sono stati separati mediante cromatografia su strato sottile (HPTLC), usando lastre di alluminio ricoperte di silice (20x20) (Merck, Darmstadt, Germania) e come sistema eluente cloroformio: metanolo: 0,25% KCl idrato (5:4:1) (v:v:v).

La lastra è stata plastificata in una soluzione di poli-isobutil-metacrilato sciolto in esano allo 0,5% per 90 secondi, per evitarne il distacco della silice.

Successivamente, la lastra è stata asciugata all'aria ed incubata in soluzione bloccante (albumina 3% in tampone fosfato PBS) per 1 ora a temperatura ambiente; in seguito è stata incubata per 1 ora con la subunità B della tossina colerica (CTx B) coniugata con perossidasi (50 ng/ml), il cui ligando è rappresentato dal monosialoganglioside GM1, presente e arricchito nei microdomini (Sigma Chem. Co, St Louis, MO). Alternativamente la lastra è stata immunomarcata con 2 µg/ml di anticorpo murino monoclonale anti-GM2 e, anti-GM3 GMR6, (Seikagaku Corp. Chuo-ku, Tokyo, Giappone) e successivamente con anticorpo secondario anti-IgM, murino, coniugato con perossidasi (Sigma). L'immunoreattività

è stata valutata mediante chemiluminescenza “ECL” (Amersham, Buckinghamshire, UK).

3.8 Microscopia elettronica

Le MVs vengono isolate come descritto precedentemente e risospese nell'appropriato volume di Opti-MEM. I campioni fatti assorbire su una griglia al nickel, vengono abbondantemente lavati in acqua e marcati con Uranyl-acetato (5 mg/ml), per 10 secondi a temperatura ambiente.

I campioni vengono sezionati ed esaminati al microscopio elettronico (Zeiss, Germania).

Le cellule linfoblastoidi CEM sono incubate con anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4 o con anti-GM3 per 1 ora a +4 °C; vengono successivamente lavate in PBS e fissate con gluteraldeide 2% per 1 ora a 4°C, lavate e marcate con immunoglobuline di topo marcate con oro colloidale (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Svezia) per tre ore a 4°C.

Le cellule vengono trattate, dopo la fissazione, dapprima con tetrossido di osmio 1% in tampone Veronal acetato, pH 7.4, per 2 ore a 4°C e, successivamente marcate con Uranyl acetato (5 mg/ml), disidratato in acetone e fissate su Epon 812. I campioni sono stati sezionati ed esaminati

al microscopio elettronico (Philips CM10, Eindhoven, Olanda).

Le cellule Neuro-2a PK1 sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4 per 1 ora a 4°C; dopo lavaggio in PBS vengono fissate in paraformaldeide 1% per 1 ora a 4°C, ed infine marcate con immunoglobuline di topo coniugate ad oro colloidale per 3 ore a 4°C.

Le cellule sono state sottoposte, dopo fissazione, a trattamento in gluteraldeide 2,5% per 45 min a temperatura ambiente e dunque in tetrossido di osmio 1% in tampone Veronal acetato, pH 7.4, per 2 ore a 4°C, marcate con uranil-acetato (5 mg/ml), disidratate in acetone e fissate su Epon 812. I campioni vengono sezionati ed esaminati al microscopio elettronico (Zeiss, Germania).

3.9 Analisi della colocalizzazione di GM3 e PrP^C sulla superficie cellulare mediante microscopia confocale laser a scansione

Le cellule linfoblastoidi CEM sono state incubate con un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina prionica cellulare (20µg/ml), (6H4 Prion Italia, MI, Italia) per 1 ora a 4°C. Dopo diversi lavaggi in tampone fosfato (PBS), le cellule sono state incubate per 45 minuti a 4°C con anti-

IgG murine coniugate con fluoresceina isotiocianato (FITC) (Sigma, St Louis, MO, USA). Dopo 3 ulteriori lavaggi in PBS, le cellule sono state fissate con formaldeide 4% in PBS per 30 minuti a 4°C ed incubate per la doppia fluorescenza con 20µg/ml di anticorpo monoclonale murino anti-GM3 (GMR6) (Kotani *et al.*, 1992) per 1 ora a 4°C, seguito da anti-IgM murine coniugate con Texas Red (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) per 45 minuti a 4°C. Infine, le cellule sono state lavate 3 volte in PBS e risospese in glicerolo/Tris-Hcl, pH 9.2.

Le immagini sono state acquisite mediante microscopio confocale a scansione laser LEICA, dotato di laser a ioni di argon. I fluorocromi FITC e Texas Red sono stati eccitati a 488 nm e 518 nm rispettivamente. Le immagini sono state raccolte a 512 x 512 pixels, processate e filtrate in modo da ridurre al minimo il rumore di fondo.

3.10 Analisi Western blot

Le cellule vengono staccate mediante tampone [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% sodio deossicolato, 0,5% SDS]. I lisati sono pellettati a 20000 x g per 10' a 4°C e i sovranatanti sono trasferiti in tubi puliti da microfuge.

La concentrazione proteica dei lisati cellulari, delle MVs e degli esosomi (preparati come descritto in precedenza) è stata determinata attraverso analisi Bradford come raccomandato dalle indicazioni della casa (Roth, Germania).

Ottanta μg di proteine totali da ogni lisato cellulare e, 20 μg di proteine da MVs od esosomi sono stati sottoposti a migrazione elettroforetica in un gel di SDS-poli-acrilammide al 12%.

Alcuni campioni sono stati sottoposti a digestione con Proteinasi K (Roche diagnostic NL, Germania) prima di realizzare l'analisi in immunoblot.

In particolare 250 μg di lisato cellulare e 20 μg di preparazione di MVs sono stati digeriti per 1 ora a 37°C con concentrazioni crescenti di proteinasi (da 0,1 μg a 0,3 μg per arrivare infine a 1 μg).

L'attività digestiva dell'enzima è stata interrotta attraverso il trattamento con fenil-metil-sulfonil-fluoride 1 mM (PMFS, Sigma, Germania).

Le proteine sono state trasferite su membrana PVDF (Immobilion-P; Millipore, USA) attraverso trasferimento con semi-dry blotting. La membrana è stata sottoposta a blocco con TBST/ latte 5% (Tris-buffered saline/0,05% Tween 20/ 5% di latte a bassa concentrazione di grassi) e, in seguito, incubata con l'appropriato anticorpo primario diluito in TBST/ latte 1% in tampone costituito da Tris-buffered saline/0,05% Tween 20/ 1%

di latte a bassa concentrazione di grassi (per la marcatura della PrP con anti-PrP SAF 32 o anti-PrP 6H4; anti GAP43; anti-flotillina-2; anti-Fyn FYN3; anti-Alix 3A9; anti-tsg 101 [M-19]), per tutta la notte a 4°C.

Dopo lavaggi in TBST, le membrane sono incubate per 1 ora con gli appropriati anticorpi secondari coniugati alla perossidasi, diluiti nello stesso tampone descritto precedentemente. Le bande sono state visualizzate mediante ECL (Amersham Pharmacia, Germania).

3.11 Esperimenti di Immuprecipitazione

L'immunoprecipitazione di PrP^C è stata eseguita secondo il procedimento descritto da Mutoh ed altri (Mutoh *et al.*, 1995). In breve, le MVs derivate da plasma sanguigno e, quelle separate dalla linea cellulare Neuro-2a sono state lisate in appropriato tampone (20 mM HEPES, pH 7.2, 1% Nonidet P-40, 10% glicerolo, NaF 50 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM e 75 U di aprotinina). Dopo preclearing realizzato aggiungendo proteina A (20% in tampone di lisi) coniugata con sfere di acrilico per 2 ore a 4°C in continua agitazione, il sovrinatante è stato immunoprecipitato con anticorpo policlonale anti-PrP C-20 per 2 ore a 4°C (2µg/ml di soluzione contenete le proteine). Successivamente è stata

aggiunta la proteina A coniugata con sfere di acrilico (50% in tampone di lisi) per 1 ora a 4°C. Il contenuto dei tubi è stato poi centrifugato e lavato tre volte in soluzione lisante a 10000 x g per 2 minuti a 4 °C. L'immunoprecipitato è stato suddiviso in due aliquote. La prima è stata sottoposta ad estrazione dei gangliosidi secondo la metodica messa a punto da Svenerholm e Fredman (Svenerholm e Fredman, 1980). I glicosfingolipidi eluiti sono stati portati a secco in corrente di azoto e sottoposti a cromatografia su strato sottile ad elevata performance (HPTLC) su lastra di alluminio ricoperta di gel di silice 60 (20x20) (Merck, Darmstadt, Germania).

La cromatografia è stata realizzata in cloroformio:metanolo:0,25% soluzione acquosa di KCl (5:4:1) (v:v:v). La lastra è stata immunomarcata per 1 ora a temperatura ambiente con HRP-CTxB o, alternativamente, con anti-GM2 IgM o anti-GM3 IgM e quindi con l'anticorpo secondario anti-mouse IgM-HRP. L'immunoreattività è stata analizzata sfruttando la reazione di chemiluminescenza usando il sistema di detezione ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK). Alternativamente l'immunoprecipitato è stato soggetto ad analisi in Western blot attraverso l'utilizzo dell'anticorpo anti-Fyn FYN3 seguito da trattamento con l'anti-rabbit IgG-HRP.

Gli Immunoprecipitati sono stati controllati in Western blot, usando l'anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4.

3.12 Analisi di infettività *in vitro*

Cellule non infettate N2a PK1 sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti 24 ore prima dell'infezione. Le MVs sono state separate sia da cellule della linea appena menzionata (MVs^{non/inf}), che da cellule infettate-MRL Neuro-2a PK1 (MVs^{inf}), e risospese in Opti-MEM. Le MVs sono state incubate 48 ore con le cellule non infette Neuro-2a PK1.

Lisati RML e omogenati di cervelli mock (1% w/v omogenati) sono stati inclusi come controlli positivo e negativo.

L'infezione da prioni è stata valutata rilevando la presenza della PrP^{sc} attraverso analisi con la metodica di cell blotting.

3.13 Immuno-analisi: “*cell blotting*”

Le cellule sono state coltivate su vetrino coprioggetto (Roth, Germania) non a confluenza, lavate in PBS, e poste a contatto del tampone di lisi [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0,5% sodio deossicolato, 0,5%

Triton X-100] dove era stata precedentemente inumidita la membrana di nitrocellulosa (Hybond-C-Extra, Amersham, Germania), posta su un foglio di carta da filtro inumidito.

La membrana viene processata come descritto da Klohn (Klohn *et al.*, 2003).

Dapprima le membrane sono asciugate all'aria, i coprioggetti sono attentamente rimossi e le membrane sono incubate in una soluzione contenente Proteinasi K (5 µg/ml in tampone di lisi) per 90 min a 37°C.

Dopo due lavaggi in acqua distillata, la digestione con proteinasi K è interrotta con l'aggiunta alle membrane di una soluzione contenente 2 mM di PMSF mantenendole per 10' a temperatura ambiente. Infine le membrane sono trattate con guanidinio tiocianato 3 M in tampone di Tris-HCl (pH8.0) per 10 min. Vengono effettuati numerosi lavaggi in acqua distillata, e le membrane sono processate per riscontrare la presenza della PrP^c/PrP^{sc} attraverso l'uso dell'anticorpo monoclonale 6H4, come descritto in precedenza.

3.14 Analisi dell'infettività *in vivo*

Le MVs sono isolate sia dalle cellule non infette che dalle RML-Neuro2a PK1 infette, come precedentemente descritto, ed infine risospese in 0,2 ml di PBS. Le cellule Neuro-2a PK1 non infette ed infette, vengono raccolte e risospese in 1 ml di PBS.

Si sottopongono le cellule e le MVs a cinque cicli consecutivi di congelamento e scongelamento; viene determinata la concentrazione delle proteine mediante il metodo di Bradford e, il contenuto viene aggiustato a 10 µg/30 µl di volume finale, mediante l'aggiunta di PBS/ BSA 5%.

Diverse diluizioni di omogenato di cervello di topo RML (Rocky Mountain Laboratory), infettato con il "sottotipo" Scrapie [passaggio 5.0, 1×10^8 LD₅₀/ml 10% di omogenato di cervello] (Prinz *et al.*, 2004), diluito in PBS/BSA 5% sono state usate come controllo positivo, mentre l'omogenato di cervello mock era incluso come controllo negativo.

Trenta microlitri di ogni campione sono stati somministrati intracerebralmente a gruppi di 4 topi tga20 (Fisher *et al.*, 1996).

La malattia è stata diagnosticata negli animali quando non meno di tre dei seguenti sintomi sono stati osservati: tendenza dei topi alla chiusura dei piedi e delle zampe posteriori, quando venivano risospesi dalla coda; coda plastica (particolare forma di rigidità della coda); diminuzione

dell'attività motoria; andatura sbilanciata, disorientazione; leggera paresi degli arti ed atassia.

Venivano determinati i tempi di insorgenza degli stati terminali della patologia e, veniva calcolato il titolo d'infettività attraverso l'uso della relazione: $y = 11.45 - 0.088x$, dove y è il log LD₅₀/ml di omogenato, e la x è uguale al tempo d'incubazione fino agli stati terminali, espresso in giorni.

La presenza della isoforma della proteina prionica resistente alle proteasi (PrP^{sc}) era ricercata nei cervelli attraverso digestione con proteinasi K (20 µg/ml, 30 min, 37°C) seguito da analisi in Western Blot.

RISULTATI

4.1. Distribuzione della PrP^C sulla membrana plasmatica di cellule linfoblastoidi CEM, mediante immunoelettromicroscopia e microscopia confocale laser

Allo scopo di verificare se la PrP^C possa essere presente nei microdomini lipidici, è stata analizzata la distribuzione della proteina prionica sulla membrana plasmatica in una linea cellulare linfoblastoide umana CEM, mediante microscopia confocale e immunoelettromicroscopia.

L'analisi confocale laser ha evidenziato un'espressione eterogenea e una distribuzione in "clusters" della proteina prionica cellulare (Fig. 6A), suggerendo l'esistenza di GEM (microdomini) arricchiti in PrP^C.

Successivamente per meglio analizzare la distribuzione della PrP^C sulla membrana plasmatica, le cellule, dopo essere state fissate e marcate con anti-PrP e incubate con proteina A coniugata con oro colloidale, sono state processate per la microscopia elettronica convenzionale. L'analisi immunoelettromicroscopica ha confermato un'espressione eterogenea di PrP^C con distribuzione in piccoli "clusters" sia sui microvilli che nella porzione non villosa della membrana plasmatica (Fig.6B).

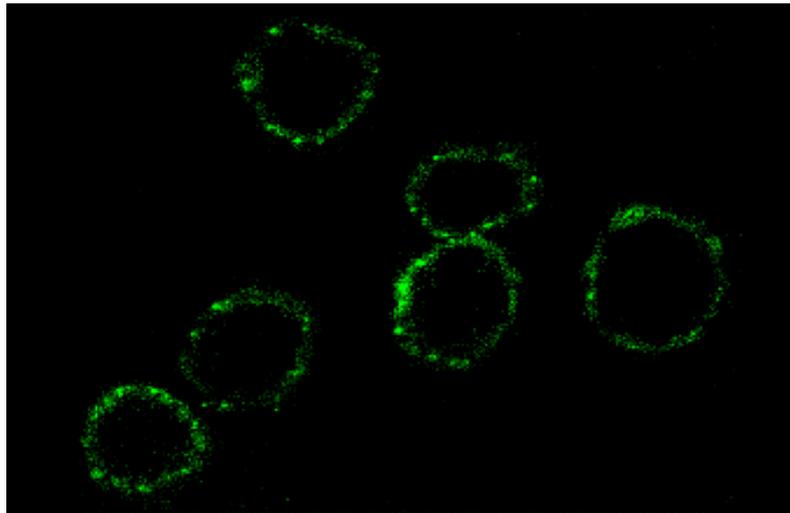
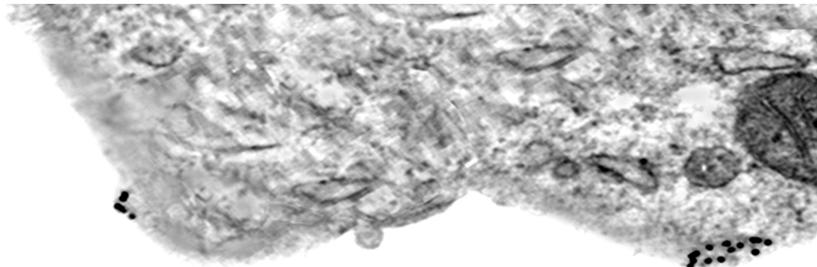


Fig.6A

Distribuzione della proteina prionica cellulare mediante microscopia confocale laser.

La marcatura con anti-PrP^C mostra una tipica distribuzione a cluster sulla membrana plasmatica di cellule di origine linfoblastoide (CEM).



0.25 μ m

Fig.6B

Distribuzione della proteina prionica cellulare, mediante immunoelettromicroscopia.

La marcatura con oro colloidale si localizza in piccoli “cluster” ed è presente sia sui microvilli che nella porzione non villosa della membrana plasmatica.

4.2 Arricchimento della PrP^C nei microdomini di membrana

E' stato inoltre analizzato l'arricchimento della proteina prionica nelle frazioni GEM di cellule linfoblastoidi, ottenute mediante gradiente lineare di saccarosio. L'arricchimento è stato quantificato mediante analisi densitometrica. I risultati ottenuti evidenziano che la proteina prionica è arricchita nelle frazioni Triton-insolubili 5 e 6, corrispondenti ai microdomini della membrana plasmatica cellulare nel nostro sistema di rilevamento. Tuttavia la proteina è stata evidenziata, seppur in minor misura, anche nelle frazioni Triton-solubili (frazioni 10-11) (Fig. 7), confermando che la PrP^C è presente prevalentemente, ma non esclusivamente, nei microdomini di membrana.

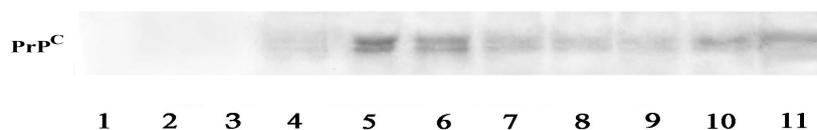


Fig.7

Distribuzione della PrP^C su frazioni di gradiente di saccarosio ottenute da CEM

Le cellule sono state lisate in tampone di lisi e il lisato è stato sottoposto ad analisi su gradiente di saccarosio. Dopo la centrifugazione il gradiente è stato frazionato ed ogni frazione è stata analizzata mediante Immunoblot con anti-PrP C-20.

4.3 Presenza di componenti del microdominio sulla membrana cellulare e su MVs rilasciate da cellule linfoblastoidi CEM e cellule linfocitarie, mediante immunoelettromicroscopia.

Allo scopo di verificare se componenti del microdominio possano essere presenti su microvescicole rilasciate da vari tipi cellulari, è stata analizzata su queste la distribuzione del GM3 (marcatore specifico dei microdomini) mediante immunoelettromicroscopia.

Le cellule, sono state marcate con anti-GM3 e incubate con proteina A coniugata con oro colloidale e successivamente processate per la microscopia elettronica convenzionale. L'analisi immunoelettromicroscopica ha confermato un'espressione eterogenea di GM3 con distribuzione in piccoli "clusters" sia sui microvilli che nella porzione non villosa della membrana plasmatica cellulare sia, su microvescicole rilasciate dalle cellule (Fig.8).

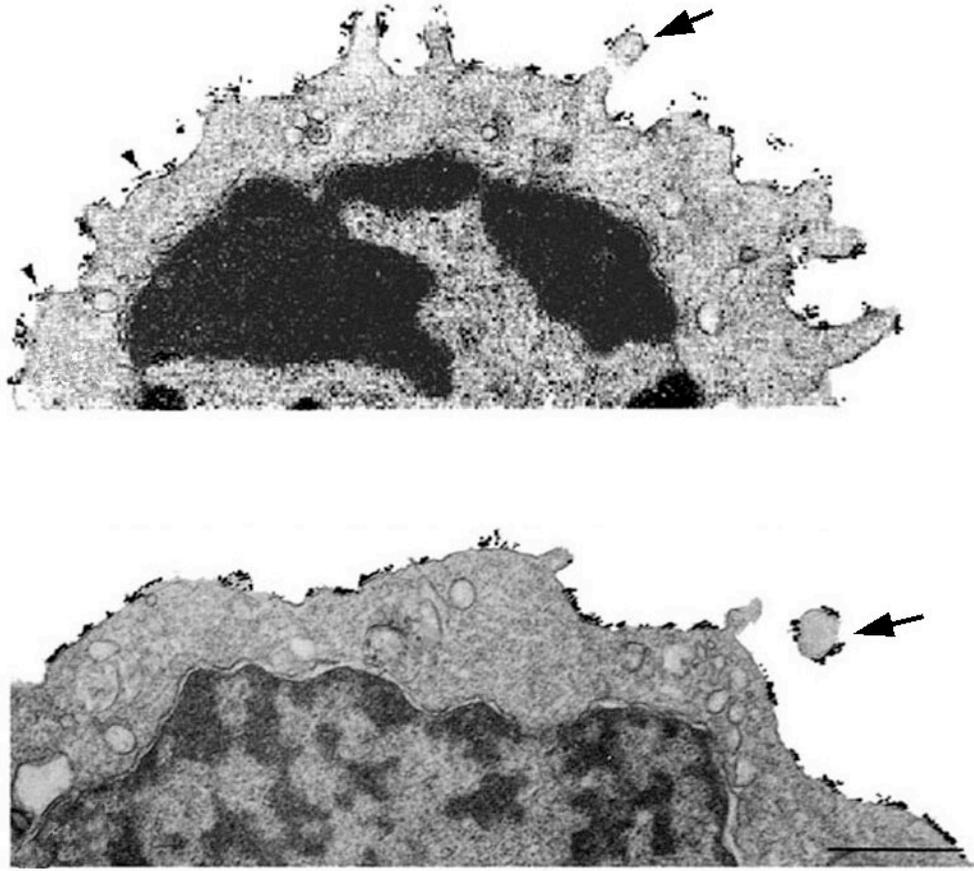


Fig.8

Distribuzione del GM3, mediante immunoelettromicroscopia

La marcatura con oro colloidale si localizza in piccoli “cluster” ed è presente sia sui microvilli che nella porzione non villosa della membrana plasmatica. Inoltre, la freccia mette in evidenza una microvescicola rilasciata dalla cellula marcata con oro colloidale.

4.4 Associazione di PrP^C con GM3 su cellule linfoblastoidi CEM mediante microscopia confocale laser

Allo scopo di definire la possibile associazione tra PrP^C ed il ganglioside GM3, è stata analizzata la loro distribuzione sulla membrana plasmatica, mediante microscopia confocale laser.

Le cellule CEM sono state marcate con anticorpo monoclonale anti-GM3, dal momento che il GM3 è il principale costituente gangliosidico di tali cellule e può essere considerato un marcatore dei microdomini (Kiguchi *et al.*, 1990; Garofalo *et al.*, 2002).

La doppia marcatura di PrP^C (Fig. 9A) e GM3 (Fig. 9B) ha evidenziato una distribuzione della marcatura a “clusters” sulla membrana plasmatica cellulare. L’immagine ottenuta, sovrapponendo le due marcature, mostra aree di colore giallo che corrispondono ad una quasi totale colocalizzazione (Fig. 9C).

I risultati sopra descritti indicano, dunque, che le molecole PrP^C tendono a localizzarsi prevalentemente, ma non esclusivamente, nelle regioni di membrana arricchite in gangliosidi.

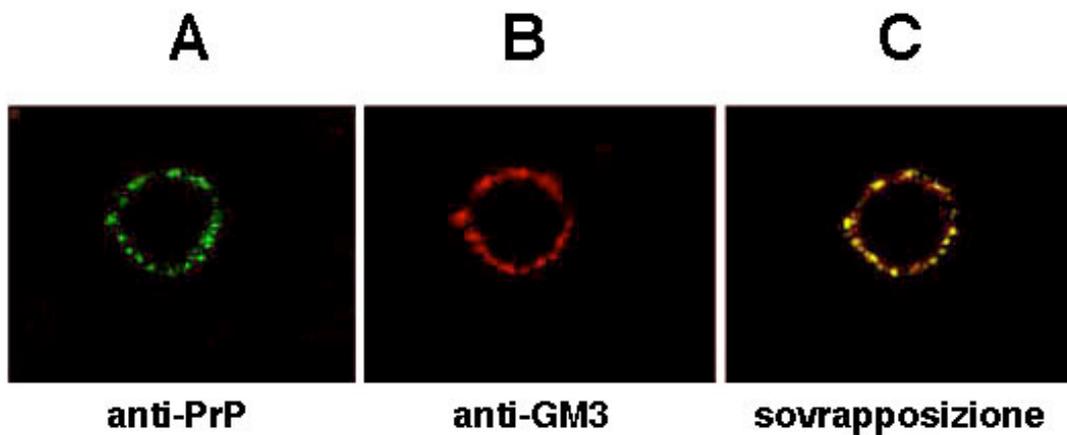


Fig.9

Analisi confocale laser di PrP^C/GM3 sulla membrana plasmatica di cellule linfoblastoidi CEM

Le cellule sono marcate con anti-PrP (6H4) seguita dall'aggiunta di anti-IgG murine FITC. Dopo tre lavaggi in PBS le cellule sono state marcate con anti-GM3 (GMR6) seguita dall'aggiunta di anti-IgM murine coniugate con Texas Red.

A: cellule linfoblastoidi CEM marcate con anti-PrP (6H4) (verde).

B: cellule linfoblastoidi CEM marcate con anti-GM3 (GMR6) (rosso).

C: doppia marcatura con anti-PrP (verde) e anti-GM3 (rosso). Le aree di colocalizzazione sono evidenziabili in giallo.

4.5 Presenza ed associazione della PrP^C e di componenti dei microdomini lipidici sulle MVs derivate da cellule linfoblastoidi.

Le MVs sono normali costituenti nel plasma sanguigno, secrete dai leucociti, eritrociti, piastrine e cellule endoteliali (Martinez *et al.*, 2005); ciò è stato verificato nei precedenti risultati sperimentali condotti sulla linea

cellulare linfoblastoide CEM. La distribuzione della proteina prionica sulla membrana, mostrava un' inequivocabile distribuzione in piccoli "cluster" simile a quella osservata per lo specifico marcatore dei rafts lipidici di membrana GM3, attraverso marcatura con anticorpo monoclonale anti-GM3 GMR6 (fig.10).

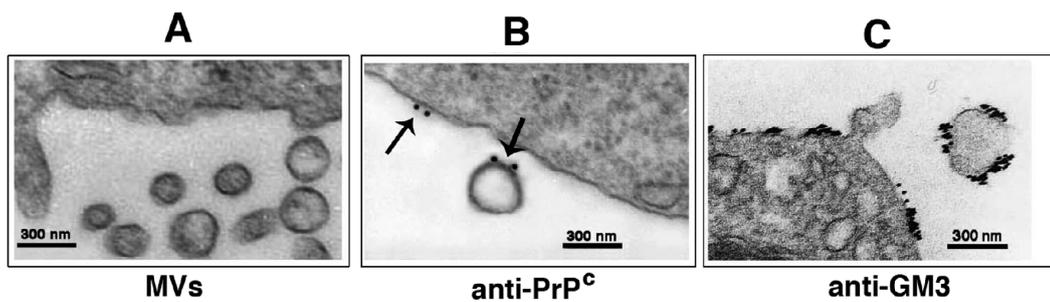


Fig.10

Immuno-elettro-microscopia su MVs di PrP^C e GM3.

A: MVs da cellule CEM.

B: Immunolabeling of PrP^C on CEM plasma membranes and derivate MVs.

C: Immunolabeling of GM3 on CEM plasma membranes and derivate MVs

4.6 Presenza della PrP^C su MVs derivate da sangue periferico

Per investigare la presenza della PrP^C su MVs derivanti da plasma ottenuto da donatore sano, le microparticelle sono state isolate attraverso metodica di centrifugazione differenziale su preparazioni di plasma libero da piastrine. La presenza è stata dapprima confermata attraverso immunoblot analisi attraverso l'uso dell'anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4, come dimostrato dalla figura 11A.

La presenza della PrP^C è stata confermata anche dall'analisi citofluorimetrica attraverso marcatura delle MVs mediante lo specifico anticorpo anti-PrP C-20 PE come osservabile nella figura successiva 11B.

Queste evidenze confermano la presenza della proteina sulla membrana delle MVs derivate da plasma umano.

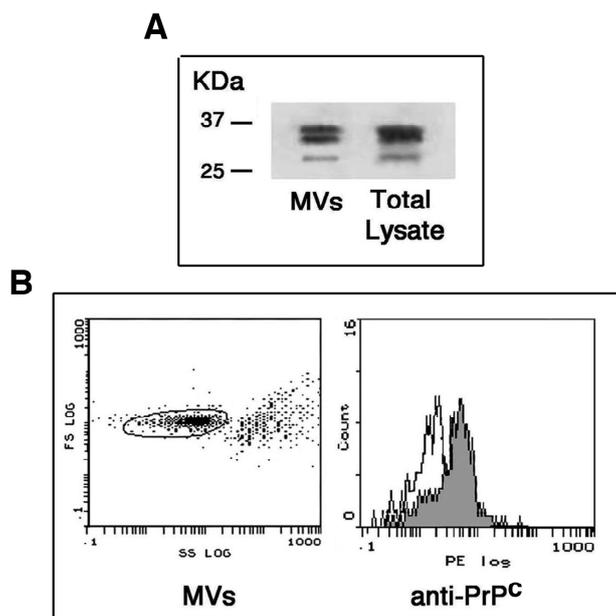


Fig. 11

Espressione della PrP^C in MVs.

MVs ottenute da plasma umano sono state analizzate per la presenza di PrP^C.

A: Analisi Western blot con anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4 of MVs paragonato a lisato di cellule del sangue.

B: Analisi citofluorimetrica con anti-PrP (C-20 PE).

Sinistra: MVs misurate sulla base di parametri forward e side scatter usando come standard beads di polystirene 0.8 μ m.

Destra: MVs marcate con anti-PrP PE (C-20 PE) e IgG PE con specificità irrilevante.

4.7 Evidenza dei componenti dei raft nelle MVs da plasma umano

Come altre proteine legate con ancora GPI alla membrana, la PrP^c e la sua forma patologica PrP^{Sc} sono localizzate in microdomini arricchiti in glicosfingolipidi acidi, i rafts lipidi di membrana di cellule di origine neuronale e linfocitiche (Mattei *et al.*, 2002; Naslavsky *et al.*, 1999; Vey *et al.*, 1996). In particolare in tali porzioni specializzate della membrana, la PrP^c associa strettamente con i gangliosidi e con molecole di trasduzione del segnale, come la protein chinasi p59Fyn (Mouillet-Richard *et al.*, 2000) e NCAM (Niethammer *et al.*, 2002; Santuccione *et al.*, 2005). Inoltre, l'associazione della PrP^c appena descritta è indispensabile per la sua conversione nella forma infettiva resistente alle proteasi PrP^{Sc} (Naslavsky *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 2002; Masserini *et al.*, 1999).

E' stato precedentemente documentato il rilascio di proteine attraverso il processo di shedding degli esosomi (Fevrier *et al.*, 2004; De Gassart *et al.*, 2003; Faure *et al.*, 2006) enfatizzando la presenza di ambienti di membrana esosomiale associabile alla natura tipica dei rafts lipidici di membrana, suggerendo ulteriormente che tali porzioni possono essere dei punti chiave da cui può avvenire il rilascio di tali strutture.

Avendo precedentemente dimostrato che la PrP^c associa strettamente con i gangliosidi GM1 e GM3 a livello dei rafts lipidici della membrana plasmatica di cellule linfocitarie (Mattei *et al.*, 2002; Mattei *et al.*, 2004), abbiamo verificato la presenza di tali elementi sulla membrana di MVs derivanti dal plasma di donatori sani. I glicosfingolipidi acidi venivano sottoposti ad immunomarcatura attraverso anticorpo monoclonale anti-GM3 GMR6 (fig.12A) per evidenziare il GM3 e, la subunità beta della tossina colerica che si lega specificatamente al GM1 (fig.12B) (Heyningen S. Van., 1974). Come osservato in figura 12 entrambe le marcature risultavano chiaramente positive. Poichè la protein chinasi p59Fyn così come la proteina flotellina-2 sono stati indicati come specifici componenti dei raft, che potrebbero eventualmente associarsi alla PrP^c (Baron *et al.*, 2002; Mattei *et al.*, 2004; Slaughter *et al.*, 2003; Stuermer *et al.*, 2004), abbiamo analizzato la presenza di entrambe le proteine succitate su MVs derivanti da plasma umano. L'analisi in Western blot ha confermato la presenza di una banda di positività intorno ai 59 kDa, peso molecolare proprio della proteina p59Fyn, riscontrata attraverso l'anticorpo policlonale anti-Fyn (fig. 12C) e, una banda intorno ai 42 kDa, peso molecolare tipico della proteina flotillina-2, verificato mediante l'anticorpo policlonale anti-flotillina-2 (fig.12D).

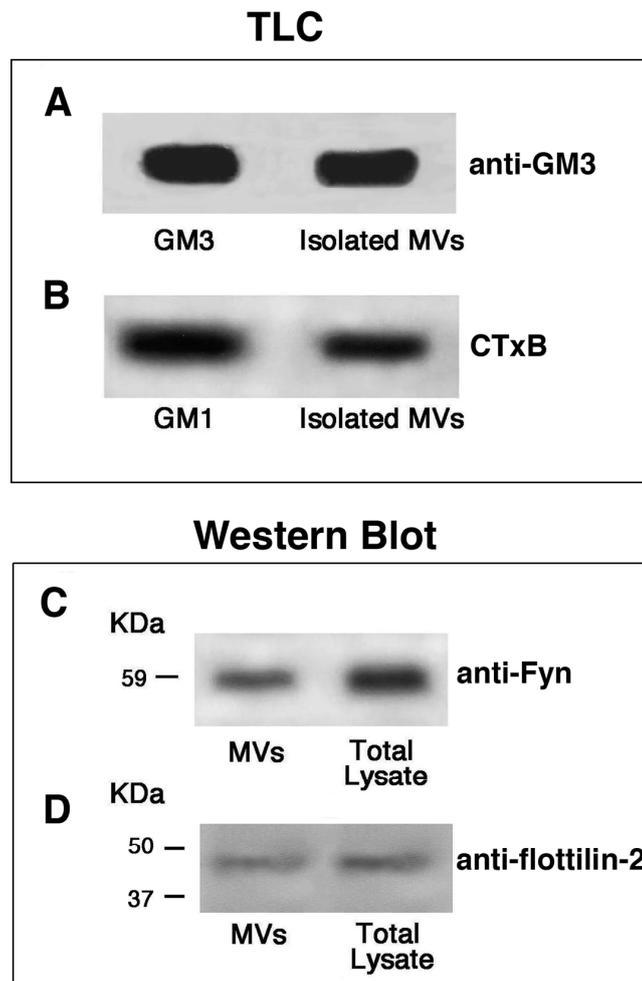


Fig.12

Evidenza di componenti dei raft nelle MVs da plasma umano.

MVs ottenute da plasma umano soggette ad estrazione di gangliosidi, analizzate attraverso TLC immunostaining.

A: immunoreattività di anti-GM3, seguito da marcatura con anti-mouse IgM coniugato alla perossidasi;

B: reattività della HRP-CTxB.

MVs ottenute da plasma umano sono analizzate in Western blot usando l'anticorpo anti-Fyn (FYN3) (C), e l'anti-flotillina-2 (D).

4.8 Associazione della PrP^C con gangliosidi e con p59Fyn chinase.

La diretta associazione sulle MVs della PrP^C con i gangliosidi e con la protein chinasi p59Fyn è stata analizzata mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione seguito sia da TLC immunostaining per la detezione dei gangliosidi (fig.13A-B) o, con l'immunoblotting convenzionale per la conferma della presenza di p59Fyn, come è possibile riscontrare nella fig.13C. Questi risultati suggeriscono che i componenti dei raft associano strettamente sulla membrana micro vescicolare con la proteina prionica quasi a formare un complesso di glicosegnalazione.

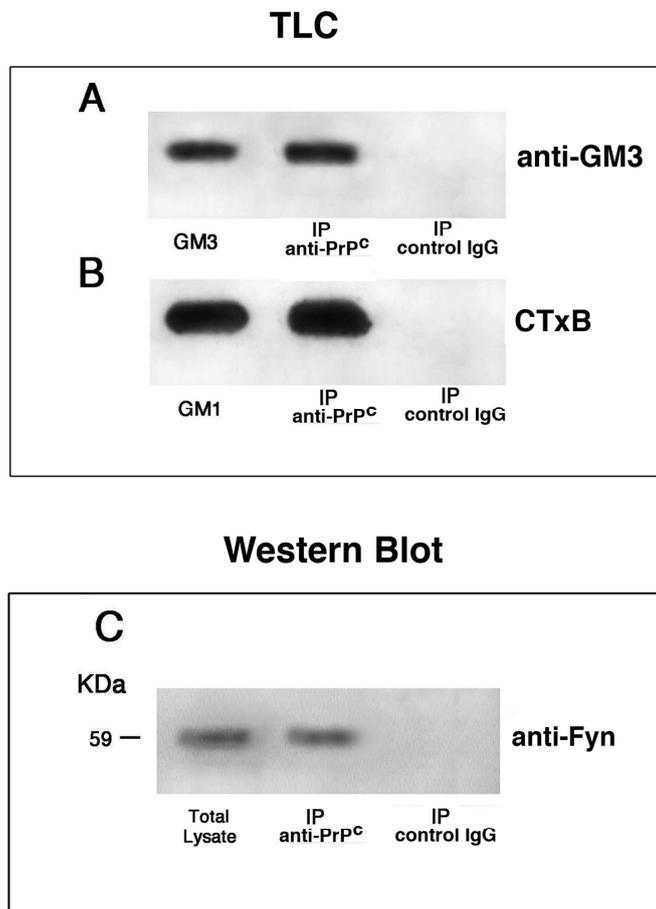


Fig 13

Co-immunoprecipitazione della PrP^C e dei gangliosidi o, p59Fyn chinase.

MVs derivanti da plasma umano sono immunoprecipitate con anti-PrP (C-20). Gli immunoprecipitati sono sottoposti a estrazione dei gangliosidi e analizzati attraverso TLC immunostaining o Western Blot con anticorpo policlonale anti-Fyn(FYN3).

- A:** reattività di anti-GM3 GMR6 con standard GM3, immunoprecipitato di PrP^C e immunoprecipitato con IgG a specificità irrilevante.
- B:** reattività di CTxB perox with standard GM1, immunoprecipitato di PrP^C e immunoprecipitato con IgG di specificità irrilevante.
- C:** Analisi Western blot con anti-Fyn(FYN3) di lysato totale, immunoprecipitato PrP^C e immunoprecipitato con IgG di specificità irrilevante.

4.9 Rilascio da parte di cellule neuronali di MVs che presentano PrP^c e componenti dei rafts .

Allo scopo di determinare se le cellule neuronali potessero rilasciare MVs derivanti dalla membrana plasmatica e, per verificare se tali strutture contenessero PrP^c in associazione a componenti dei raft lipidici di membrana, abbiamo isolato le MVs dai sovranatanti di cellule neuronali murine in coltura (Neuro-2a) e, dai sovranatanti del sottotipo (Neuro-2a PK1) (Klöhn *et al.*, 2003). La metodica di separazione era basata su un protocollo che prevedeva una serie di centrifugazione differenziali (forza centrifuga via via più intensa).

Le MVs derivanti dalla membrana plasmatica erano ottenute attraverso centrifugazione con una forza centrifuga corrispondente a 20000 x g, abbastanza elevata, ma non sufficiente a far precipitare anche gli esosomi.

L'analisi al microscopio elettronico dei preparati ha confermato la presenza delle MVs, spesso sotto forma di aggregati, ma per la maggior parte con una taglia variabile tra 0,1 ed 1 µm, taglia compatibile a quella di altri elementi microvescicolari derivanti da altre linee cellulari (Ratajczak *et al.*, 2006). La presenza della PrP^c confermata su entrambe le linee neuronali murine (Neuro-2a e Neuro-2a PK1) (fig. 14). In particolare, l'analisi al microscopio elettronico di sezioni ultrasottili di cellule Neuro-2a PK1 ha

confermato l'inequivocabile distribuzione della PrP^c sia sulla membrana plasmatica cellulare che su quella delle MVs.

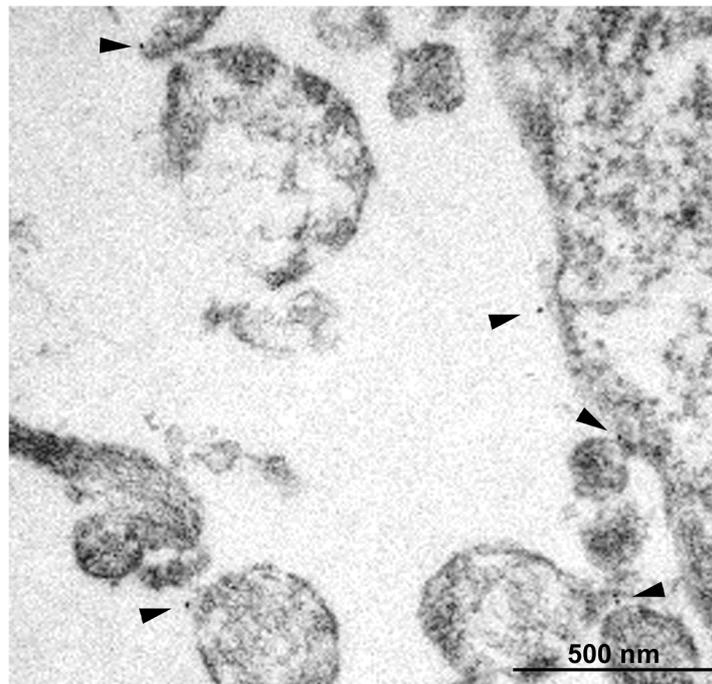


Fig. 14

Immuno-elettro-microscopia di MVs derivanti da cellule neuronali murine Neuro-2a.

Allo scopo di escludere la presenza di elementi contaminanti (esosomi) nei preparati di microvescicole, sono stati valutati in esperimenti di immunoblot i livelli d'espressione di due proteine citoplasmatiche, Alix e Tsg 101, entrambe identificati come markers d'identificazione degli esosomi (They *et al.*, 2001; Geminard *et al.*, 2004). I segnali ottenuti nei preparati arricchiti di MVs erano più bassi di quelli osservati nelle frazioni arricchite

di esosomi (dato non mostrato).

Avendo in precedenza verificato che le MVs derivanti da plasma umano contenevano componenti dei raft lipidici come la flotillina-2, i gangliosidi e, la proteina prionica, abbiamo analizzato la presenza di queste componenti nelle MVs derivate dalle cellule Neuro-2a attraverso analisi cromatografica su strato sottile (TLC) seguito da immunomarcatura o alternativamente con l'analisi in immunoblot. In precedenti esperimenti era stato verificato che il maggior costituente gangliosidico delle cellule Neuro-2a era il GM2; pertanto l'estratto dei glicosfingolipidi acidi derivanti dalle MVs era immunomarcato con uno specifico anticorpo monoclonale anti-GM2. Come si evince dalla figura 16, la presenza del ganglioside GM2 risultava fortemente positivo.

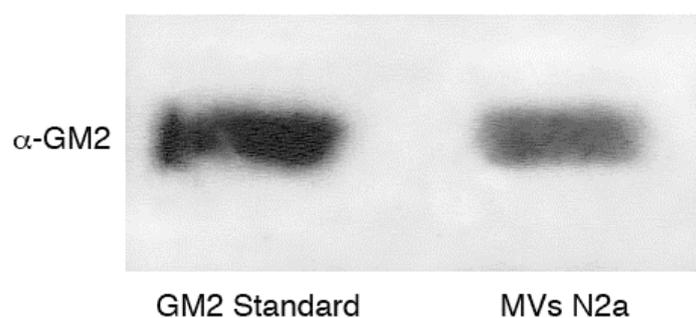


Fig. 15

Analisi gangliosidica di MVs derivanti da Neuro-2a.

MVs derivanti dalle cellule Neuro-2a sottoposte a estrazione dei gangliosidi e analizzate in TLC immunostaining.

Reattività dell'anticorpo monoclonale anti-GM2 GMR6 con standard GM2.

Inoltre le stesse MVs contenevano anche i marcatori proteici flotillina-2 e GAP43, una specifica proteina neuronale che si lega ai raft attraverso estremità N-terminale acetilata (fig. 16).

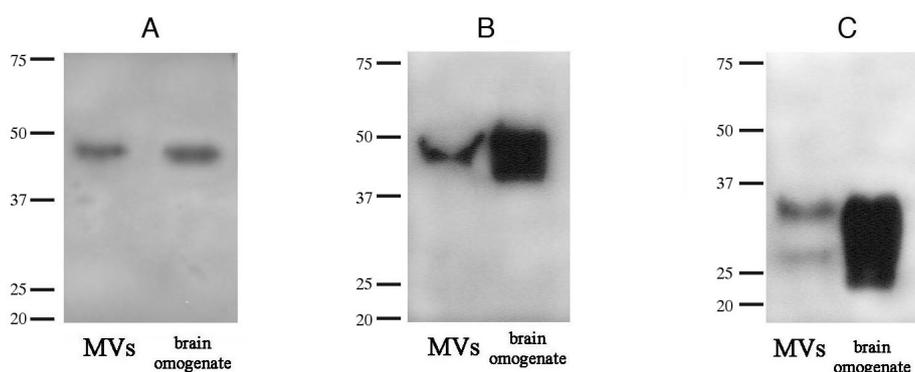


Fig. 16

Evidenza dei componenti dei raft e PrP^C nelle MVs derivanti da Neuro-2a.

MVs ottenute da Neuro-2a sono analizzate in Western blot usando differenti anticorpi.

A: reattività con anti-Flotillina-2;

B: reattività con anti-GAP-43;

C: reattività con anti-PrP SAF-32.

L'estratto totale di cervello derivante da topi "wild type" è stato incluso come controllo positivo.

Poiché i gangliosidi sono stati considerati essere componenti di un complesso di segnalazione nei rafts lipidici (Geminard *et al.*, 2004),

abbiamo voluto confermare la presenza dell'effettiva associazione della PrP^c con il ganglioside GM2 nelle MVs derivanti dalle cellule Neuro-2a. Pertanto abbiamo immunoprecipitato la PrP^c utilizzando un anticorpo policlonale anti-PrP C-20. L'immunoprecipitato è stato sottoposto a metodica di estrazione dei glicosfingolipidi acidi e, successivamente ad analisi cromatografica su strato sottile (TLC-immunostaining), utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-GM2.

I risultati ottenuti, riportati nella figura 17, evidenziano l'associazione della PrP^c con il ganglioside GM2 sui raft presenti nelle MVs. La qualità dell'immunoprecipitato era verificata attraverso analisi Western blot con l'anticorpo monoclonale anti-PrP 6H4. Inoltre, nei campioni di controllo dell'immunoprecipitato, utilizzando immunoglobuline con specificità irrilevante, sotto le stesse condizioni sperimentali, non riportava livelli evidenziabili di gangliosidi.

Questi risultati indicano chiaramente che le cellule neuronali rilasciano attivamente Mvs in aggiunta agli esosomi (Faure *et al.*, 2006). Le MVs secrete contengono componenti dei raft lipidici, suggerendo che anche nel SNC può avvenire la trasmissione di informazioni molecolari attraverso tali strutture/elementi.

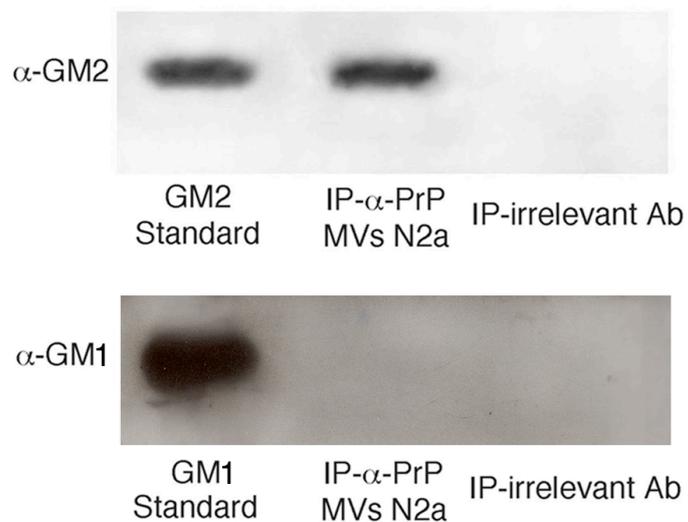


Fig.17

Co-immunoprecipitazione di PrP^C e gangliosidi.

MVs derivanti da cellule Neuro-2a sono immunoprecipitate con anti-PrP (C-20). Gli immunoprecipitati sono sottoposti ad estrazione dei gangliosidi e analizzati in TLC immunostaining.

- A:** reattività dell'anti-GM2 GMR6 con lo standard GM2, immunoprecipitato di PrP^C e, immunoprecipitato con IgG di specificità irrilevante.
- B:** reattività della CTxB perox con lo standard GM1, immunoprecipitato di PrP^C e immunoprecipitato con IgG di specificità irrilevante.

4.7 Ruolo delle MVs secrete dalle cellule neuronali nella infettività da prioni

Allo scopo di analizzare se le cellule neuronali infettate da prioni potessero rilasciare MVs che presentano l'isoforma patologica della proteina prionica (PrP^{Sc}) e, dunque, infettività da prioni, abbiamo isolato le MVs dai sovranatanti di cellule infette in coltura (RML-Neuro-2a PK1). Abbiamo verificato la presenza della PrP^{Sc} attraverso immunoblot analisi e, ulteriormente verificato il potenziale infettivo di tali strutture in esperimenti di trasmissione *in vitro* ed *in vivo*.

La valutazione della presenza della PrP^{Sc} era possibile attraverso trattamento di digestione enzimatica dei preparati, utilizzando la proteinasi K (PK). Difatti, l'isoforma PrP^{Sc}, anormalmente ripiegata, risulta parzialmente resistente al trattamento con PK, mentre l'isoforma cellulare della proteina (PrP^C) viene completamente degradata dallo stesso trattamento (Prusiner *et al.*, 1982c). Come osservato in fig. 18, le MVs derivate dalle cellule infette, possiedono l'isoforma PK resistente (PrP^{Sc}) e, i livelli riscontrati nelle MVs purificate erano più elevati di quelli derivanti dalle cellule parentali (fig. 18), suggerendo un arricchimento della PrP^{Sc} nella membrana delle microvescicole. In esperimenti di controllo, erano state separate le MVs da cellule non-infette (Neuro-2a PK1) e, come ci si

aspettava, non presentavano la PrP^{Sc}, confermando la specificità del rilascio dalle cellule neuronali infette.

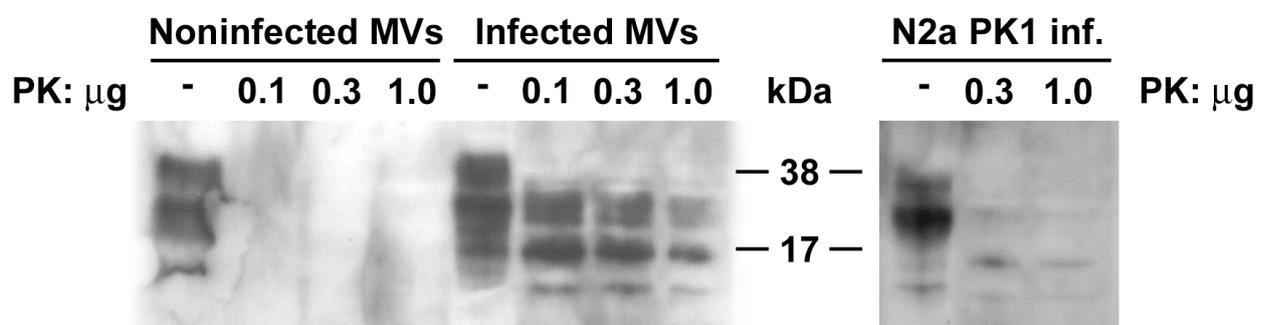


Fig.18

Cellule neuronali infettate da Prioni, rilasciano MVs che presentano PrP^{Sc}.

Pannello sinistro: Detezione di PrP^{Sc} in MVs isolate dai sovrantanti di coltura in cellule Neuro-2a PK1 non-infettate da prioni e infettate . Venti μ g di proteine totali do MVs isolate sono digerite con PK. PrP^{Sc} è riscontrata in maniera specifica nelle MVs rilesciate dalle cellule infettate ma noin dalle N2a PK1 non-infettate.

Pannello destro: Detezione della PrP^{Sc} nelle Neuro-2a PK1 infettate. Duecentocinquanta μ g di proteine totali derivanti da lisato cellulare sono digerite con PK. La presenza dell'isoforma PK-resistente era trattata con quote crescenti di proteinasi K ed analizzata con l'anticorpo monoclonale 6H4.

A seguito di tale evidenza sperimentale, abbiamo condotto un esperimento per valutare la capacità infettante delle MVs *in vitro*. A tal fine abbiamo realizzato una co-coltura di cellule non-infette Neuro-2a PK1 con MVs isolate dai sovranatanti di cellule infette (RML-Neuro-2a PK1); parallelamente, sono stati preparati dei campioni di controllo dove la co-coltura era costituita da MVs e cellule non-infette.

Come ci si aspettava, attraverso una verifica analitica in Cell Blot, era evidenziata una amplificazione *de novo* dell'infettività, dovuta alla presenza di PrP^{Sc}, che si manteneva per più di tre mesi nella coltura cellulare (fig 19).

La conversione della PrP^c endogena nella isoforma patologica PrP^{Sc}, associata alla patologia, era trovata unicamente nelle co-culture di cellule Neuro-2a PK1 e MVs separate da cellule infette, e non nelle co-culture con MVs da cellule non-infette (fig. 19).

La replicazione della proteina infettiva nelle cellule, si manteneva per più di trenta passaggi dopo l'infezione, dimostrando che la trasmissione dei prioni, dipendente dalle MVs, generava una infezione persistente nelle cellule "recipienti" di neuroblastoma, escludendo in tal modo l'evenienza di una possibile contaminazione da PrP^{Sc} dipendente dall'inoculo iniziale.

Allo scopo di confermare l'associazione dell'infettività da prioni con le MVs derivate dalla membrana cellulare e, per determinare il "titolo

infettivo”, abbiamo realizzato un esperimento *in vivo*, nel quale sono state inoculate MVs da cellule infette e, come controlli, MVs da cellule non-infette o lisati cellulari, intracerebralmente in topi indicatori “tga20” (Fischer *et al.*, 1996). Veniva determinato il tempo d’incubazione che intercorreva prima dello sviluppo degli stadi terminali della patologia da scrapie e, il titolo infettivo, ottenuto rapportando il tempo d’incubazione stesso ad una curva di calibrazione (TABELLA I). Tutti i topi indicatori sviluppavano i segni clinici della patologia da prioni ad ognuna delle tre diluizioni utilizzate come inoculo e derivanti dalla separazione di MVs dai sovrantanti di coltura di cellule infette (RML-Neuro-2a PK1) ma, nessuna delle cavie, sviluppava la patologia quando veniva inoculata con MVs derivanti dai sovrantanti di cellule non-infette. Ciò confermava che unicamente le MVs^{Inf} erano in grado di trasferire l’infettività sia *in vitro* che *in vivo* e, indicava altresì, che il titolo infettivo fosse più elevato nelle MVs rispetto a quello associato alle cellule da cui venivano rilasciate (TABELLA I). Dalla tabella si evince anche che le MVs sono leggermente meno infettive dell’omogenato “crudo” di cervello derivante da animali infetti, usato come controllo positivo d’inoculo: infatti, i topi che venivano testati con una diluizione di 10^{-2} di RML (corrispondenti a 10 µg di proteine totali derivanti da cervello), sviluppavano i segni clinici della patologia leggermente più precocemente rispetto ai topi testati con le MVs.

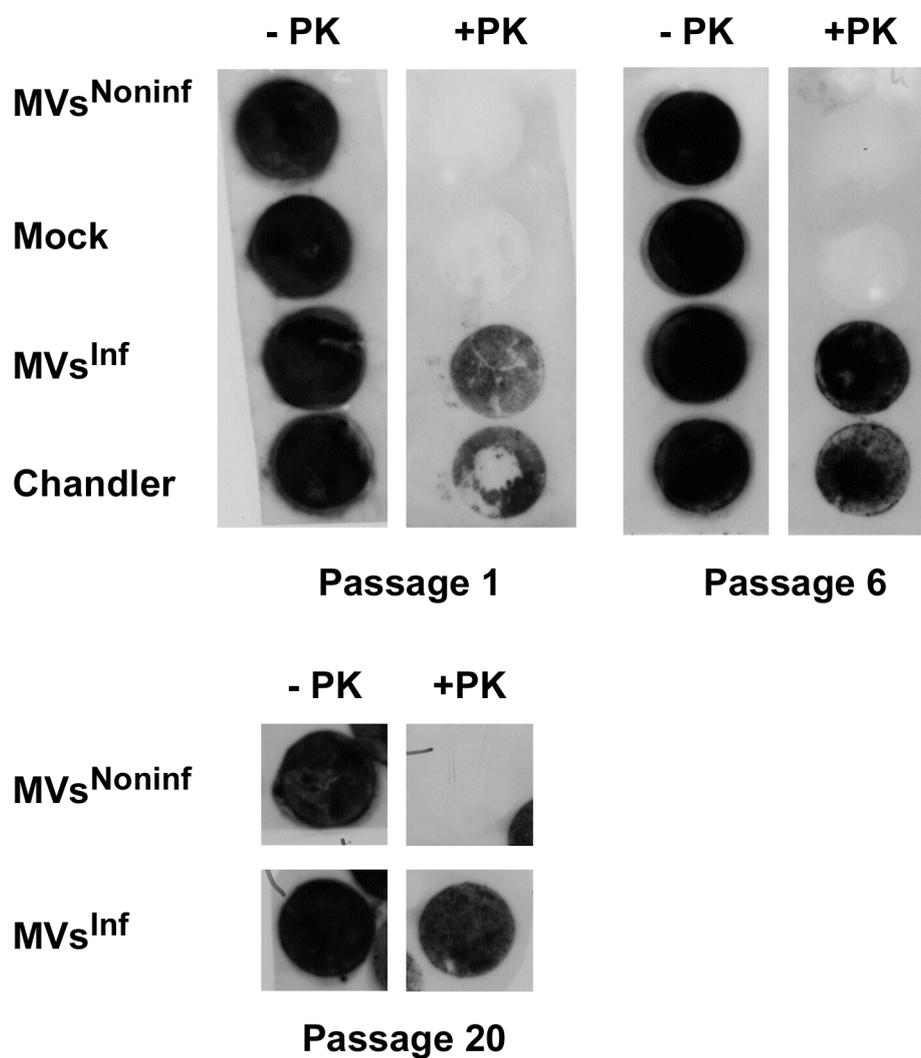


Fig. 20

Transmission *in vitro* dell'infettività da prioni attraverso MVs che trasportano PrP^{Sc}.

L'analisi Cell blot riscontra l'infezione *de novo* delle cellule Neuro2a PK1 IIs a diversi passaggi. Le Neuro2a PK1 sono state incubate con MVs isolate da cellule non-infette (MVs^{Noninf}), o da cellule infettate (MVs^{Inf}). Le infezioni Mock e Chandler sono state incluse come controlli negativo e positivo, rispettivamente. Un incremento tempo-dipendente dei livelli di PrP^{Sc} viene riscontrata dopo trattamento con PK.

Tabella I

Inoculum	Indicator mice succumbing to scrapie	Scrapie death Days (mean +/- STDEV)	Estimated infectivity titres (log LD₅₀/ml)
Mock 10⁻⁴	0/4	>150	<1.5
RML 10⁻⁴	4/4	78±2	4.6
RML 10⁻²	4/4	68±2	5.5
RML 6x10⁻²	4/4	64±2	5.8
MVs^{Noninf}	0/4	>150	<1.5
MVs^{Inf}	4/4	68±2	5.5
Neuro-2a PK1 cells	0/4	>150	<1.5
Neuro-2 a PK1 inf. cells	4/4	76±6	4.8

MVs che trasportano la PrP^{Sc} trasmettono la patologia ai topi *Tga20*.

Topi “indicatori” *Tga20* sono stati inoculati intracerebralmente con 30 µl (10 µg proteine totali) di lisati cellulari e MVs o con 30 ml of different diluizioni d’omogenato di cellule infette da RML. Animals inoculati con Mock strain sono stati inclusi come controllo negativo. Viene determinato il tempo d’incubazione prima dello sviluppo delle fasi finali della patologia da scrapie. La relazione è la seguente: $y = 11.45 - 0.088 x$, dove y è il log LD₅₀/ml d’omogenato e x è il tempo d’incubazione in giorni fino agli stadi finali della patologia.

Questa relazione è usata per calcolare il “titolo” d’infettività.

DISCUSSIONE

Questa ricerca dimostra che la proteina prionica è presente nei microdomini di membrana delle cellule linfocitarie T, in associazione con componenti lipidiche dei rafts, dove interagisce anche con molecole implicate nella trasduzione del segnale di attivazione; si localizza inoltre su microvescicole presenti nel sangue periferico, rilasciate da vari tipi cellulari nei diversi stati di attivazione od apoptosi (Sabatier *et al.*, 2002).

Poiché il sistema immune dell'ospite gioca un ruolo importante nella patogenesi delle malattie da prioni (Fraser e Dickinson, 1970; Klein *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2001), nella prima parte di questa ricerca è stata analizzata la distribuzione della proteina prionica in cellule linfoblastoidi T umane. L'analisi immunoelettromicroscopica ha rivelato che le particelle di oro colloidale, corrispondenti alla proteina prionica cellulare, erano distribuite in piccoli "clusters" sulla membrana plasmatica. Queste osservazioni sono in accordo con quelle riportate in recenti studi sulle cellule nervose (Ford *et al.*, 2002), che hanno descritto aree della membrana plasmatica in cui la PrP^C è altamente concentrata.

Per meglio definire la distribuzione della PrP^C nelle cellule linfocitarie, sono stati quindi eseguiti esperimenti mediante immunofluorescenza indiretta in doppia marcatura per verificare l'associazione della proteina prionica con i microdomini di membrana o "rafts", porzioni specializzate della membrana plasmatica implicate nella trasduzione di segnali tirosino-

chinasici. Dal momento che i gangliosidi rappresentano costituenti fondamentali dei microdomini, essendo anche coinvolti nella trasduzione di segnali sia di tipo stimolatorio che di tipo inibitorio (Hakomori *et al.*, 1998), è stata analizzata l'associazione di molecole di PrP^C con molecole gangliosidiche. I nostri risultati hanno mostrato una colocalizzazione tra PrP^C e GM3 o GM1 sulla superficie cellulare delle cellule linfoblastoidi. Questo dato indica l'esistenza di microdomini di membrana arricchiti in PrP^C. L'analisi in microscopia confocale a scansione ha confermato sulla superficie di cellule linfoblastoidi la presenza di microdomini arricchiti in GM3, dove le molecole di PrP^C erano principalmente, ma non esclusivamente colocalizzate con il ganglioside.

Esperimenti successivi, volti ad approfondire il tipo di interazione esistente tra PrP^C e GM3 all'interno dei microdomini, hanno dimostrato che la PrP^C era presente nelle frazioni Triton-insolubili corrispondenti ai rafts della membrana plasmatica cellulare e che associa con i gangliosidi.

Sebbene non sia stato ancora chiarito il preciso meccanismo attraverso il quale tali molecole si leghino alla PrP^C studi precedenti riferiscono un'elevata affinità tra specifiche proteine della membrana plasmatica cellulare e i gangliosidi; fra queste vanno ricordate l'associazione della subunità A di Trk con il GM1 nelle cellule di feocromocitoma (Mutoh *et al.*, 1995), del corecettore CD4 con il GM3 nei linfociti (Sorice *et al.*, 1997; Sorice *et al.*,

2000) e della proteina di trasduzione ZAP-70 con il GM3 nelle cellule T attivate (Garofalo *et al.*, 2002). Interazioni ganglioside-proteina con un'elevata e specifica affinità sono state descritte in diversi tipi cellulari. Sebbene il meccanismo sia ancora poco chiaro, queste interazioni sembrano avere un ruolo nella regolazione della trasduzione di importanti segnali intracellulari (Hakomori *et al.*, 1998). Nel loro insieme quindi questi dati dimostrano la presenza di PrP^C nei microdomini di membrana, suggerendone un ruolo nella traduzione del segnale.

D'altra parte, è noto che le cellule gliali vengono stimulate dalla proteina prionica ad attivare una trasduzione del segnale intracellulare tirosin-chinasi dipendente (Combs *et al.*, 1999). Ciò porta ad un rilascio transitorio del Ca²⁺, che ha come conseguenza l'attivazione della PKC e della tirosin-chinasi Ca²⁺-sensibile (Kourie, 2001). La natura del ligando di PrP^C responsabile della generazione del segnale non è stato ancora chiarito.

Dopo aver dimostrato l'associazione della PrP^C con i gangliosidi, si è voluto pertanto stabilire un possibile ruolo della proteina prionica nella trasduzione del segnale. Studi su cellule nervose hanno evidenziato l'associazione della PrP^C con una protein-chinasi della famiglia Src (Fyn) mediata dalla caveolina 1 (Mouillet-Richard *et al.*, 2000).

Le nostre ricerche hanno evidenziato che la PrP^C colocalizza e associa con Fyn in cellule linfocitarie, come mostrato in microscopia confocale laser e

mediante esperimenti di coimmunoprecipitazione.

Dal momento che le cellule di origine linfocitaria risultano prive di caveolina 1 (Fra *et al.*, 1994), i nostri risultati suggeriscono che questa associazione possa essere mediata dal GM3.

Sulla base di precedenti osservazioni che hanno identificato componenti dei “rafts” in microvescicole liberate prevalentemente da cellule tumorali, un ulteriore argomento di indagine è stato quello di verificare la presenza della PrP^C su esosomi o su microvescicole ottenute da sangue periferico di donatori sani. Nonostante le promettenti ipotesi applicative e funzionali delle microvescicole, il significato fisiologico di queste ultime non è ancora completamente chiaro. Le MVs sono normali costituenti presenti nel plasma, secrete dai leucociti, dalle cellule endoteliali, dalle piastrine e dagli eritrociti (Martinez *et al.*, 2005)., E’ stato osservato che solo un terzo della PrP^C è associata alle cellule del sangue, mentre i restanti due terzi sono presenti nel plasma (MacGregor *et al.*, 1999). Precedenti dati hanno verificato la presenza della PrP^C sulla membrana degli esosomi rilasciati nel sangue dalle piastrine attivate.

In questo panorama si inserisce l’ipotesi che gli esosomi o, più in generale, microvescicole rilasciate da vari tipi cellulari, possano funzionare da veicolo per la trasmissione di patogeni. Come riportato da Pornillos (Pornillos *et al.*, 2002), i retrovirus, in particolare HIV, sarebbero in grado

di indirizzare la biogenesi di endosomi diretti alla superficie cellulare e da qui dare inizio al processo di fusione esocitaria.

A questo proposito, una delle principali novità di questa ricerca è la dimostrazione della presenza di PrP^C sia in esosomi derivanti da cellule linfocitarie sia in microvescicole presenti nel sangue periferico di donatori sani. Il ruolo funzionale di tali strutture è ancora largamente sconosciuto m, molte evidenze sperimentali mostrano come le MVs, derivanti dai raft lipidici di membrana, potrebbero essere coinvolte nel rilascio di specifiche piattaforme dove si concentrano specifiche proteine destinate alla secrezione extracellulare. Ciò suggerisce che esse possano partecipare in una varietà di processi che vanno dall'adesione intercellulare, all'induzione della risposta cellulare.

Poichè abbiamo verificato che la PrP^C è presente nei microdomini lipidici di cellule linfoblastoidi CEM (Mattei *et al.*, 2002), dove associa strettamente con i gangliosidi GM1 e GM3 e, con altre proteine di trasduzione del segnale (p59Fyn), abbiamo dapprima analizzato attraverso microscopia elettronica la distribuzione della PrP^C sulle MVs derivanti dai linfociti umani. Tale tecnica sperimentale ha altresì permesso di osservare come tale proteina fosse distribuita sulla membrana cellulare, a formare piccoli "cluster", osservabili anche sulla membrana delle MVs da esse derivanti; del resto, è stato dimostrato che il sangue ed il plasma di animali

sperimentalmente infettati con TSE possono trasmettere l'infezione attraverso la trasfusione.

I nostri dati confermano ed estendono queste osservazioni, mostrando la presenza della PrP^c nelle MVs separate dal plasma umano.

Un altro aspetto interessante è stato quello di dimostrare la presenza di gangliosidi nelle medesime strutture. Infatti sulle MVs, non solo la PrP^c ma anche la proteina di trasduzione del segnale p59Fyn, così come i gangliosidi GM1 e GM3 sono stati co-immunoprecipitati con la PrP^c, dimostrando che tutto il complesso di segnalazione può essere rilasciato nelle MVs. La presenza di lipidi associati a complessi di segnalazione, suggerisce un potenziale ruolo per queste microparticelle, nella comunicazione cellulare, attraverso i processi di rilascio e fusione.

E' stato precedentemente osservato che le cellule neuronali rilasciano esosomi che contengono un gran numero di lipidi e proteine, comprese tipiche proteine neuronali come la GluR2/3, subunità del recettore del glutammato, la molecola di adesione L1 e, la PrP^c.

Nel nostro studio abbiamo verificato per la prima volta che anche le cellule neuronali rilasciano MVs contenenti PrP^c.

L'analisi al microscopio elettronico di preparazioni di MVs, ha dimostrato la presenza di vescicole con diametro variabile tra 100 nm e 1 µm. In questo studio abbiamo dimostrato la presenza della PrP^c nelle cellule

neuronal murine (Neuro-2a e Neuro-2a PK1), attraverso analisi in immunoblot; inoltre l'indagine attraverso microscopia elettronica in cellule Neuro-2a PK1, ha rivelato la distribuzione della PrP^c sulle MVs, simile a quella osservata sulla membrana plasmatica.

L'eterogeneità delle molecole di PrP^c è attribuita principalmente ai vari rapporti di N-glicosilazione su residui di asparagina (Endo *et al.*, 1989; Somerville e Ritchie, 1990).

La mobilità elettroforetica della PrP^c associata alla membrana delle MVs non si sovrappone a quella della PrP^c derivante dalle cellule, suggerendo che sulle MVs, la PrP^c deriva dalla completa processazione e maturazione della proteina durante il processo di rilascio (shedding) delle microvescicole.

In un recente lavoro è stato descritto un nuovo "pathway" di processazione che coinvolge modificazioni all'estremità N-terminale della PrP^c e la selezione di distinte glico-isoforme prima della incorporazione negli esosomi (Vella *et al.*, 2007).

Allo stesso modo occorrerebbe condurre una più dettagliata analisi allo scopo di verificare se un possibile "pathway" di processazione venga seguito anche dalla PrP^c che si trova incorporata sulle MVs derivanti dalla membrana plasmatica.

Noi abbiamo ulteriormente verificato sulla linea di derivazione murina

Neuro-2a la presenza di componenti dei rafts lipidici, così come della protein chinasi p59Fyn, della flotillina, e del ganglioside GM2.

Tale stretta associazione delle componenti dei raft e della PrP^c sulla membrana delle MVs suggerisce che tali elementi sono richiesti durante la formazione delle MVs nelle cellule neuronali.

Del resto, l'origine neuronale delle MVs è stata confermata attraverso la rilevazione della proteina di membrana assonale GAP-43, proteina neuronale che si lega ai rafts attraverso i residui acetilati all'estremità N-terminale.

Il crescente interesse verso la presenza della PrP^c nelle MVs è dipendente dal potenziale ruolo di queste microparticelle nella propagazione delle patologie da prioni. Recentemente, è stato messo in evidenza il rilascio della PrP^c e della forma infettiva PrP^{Sc} in associazione con esosomi derivanti da cellule epiteliali (cellule Rov), da cellule neurogliali (cellule Mov), e da cellule nervose (cellule GT1-7) (Fèvrier e Raposo, 2004; Vella *et. al.* 2007).

Ciò suggerisce che gli esosomi che trasportano la forma infettiva della proteina prionica possano costituire un meccanismo di trasmissione intercellulare d'infettività in aggiunta al documentato contatto cellula-cellula.

Infatti, è stato osservato che entrambe le forme della proteina prionica PrP^c

-PrP^{Sc} sono presenti nei sovranatanti derivanti da cellule in coltura, in forma di secrezione associata agli esosomi che, possono essere di per sè infettivi, sia *in vivo* che *in vitro* (Fèvrier e Raposo, 2004; Vella *et. al.* 2007).

Le nostre ricerche confermano ed estendono le osservazioni appena citate perchè mostrano per la prima volta che, cellule neuronali, stabilmente infettate, esprimenti costitutivamente PrP^{Sc}, rilasciano MVs dalla membrana plasmatica, come se tali strutture fossero “trasportatori” della isoforma patologica della proteina prionica e, dunque, dell’infettività.

Abbiamo a tal fine esaminato le MVs derivanti dai sovranatanti delle colture della linea cellulare Rocky Mountain Laboratory (RML) Neuro2a PK1, sperimentalmente infettate con la PrP^{Sc}. In maniera molto sorprendente abbiamo notato come il livello di PrP^{Sc} presente nelle MVs purificate, era più elevato di quello osservato nella linea cellulare parentale, suggerendo un arricchimento della isoforma alterata della proteina prionica in associazione con la membrana delle MVs.

Da questa osservazione scaturiscono pertanto due ipotesi riguardanti sia la modalità di legame della PrP^{Sc}, associata a livello dei microdomini lipidici di membrana, mediante il legame della sua àncora GPI (propria anche della forma normale della proteina prionica) e, la seconda, che vuole evidenziare il ruolo preponderante dei rafts lipidici di membrana nella

formazione delle stesse MVs. A conferma delle nostre osservazioni vi è l'evidenza sperimentale ottenuta attraverso la purificazione delle MVs derivanti da cellule Neuro-2 PK1 non-infette, che rilasciano unicamente MVs contenenti PrP^c, ma non la forma anomala della proteina, confermando la specificità del rilascio della proteina potenzialmente infettiva, solamente dalle cellule infette.

Il potenziale ruolo delle MVs nella trasmissione dell'infettività da prioni è stata analizzata sia *in vitro* che *in vivo* su modelli animali. Il nostro studio dimostra come tali strutture siano validi veicoli per il trasferimento dell'infettività, contribuendo sia al meccanismo di diffusione che a quello di traffico intercellulare. Infatti, unicamente le MVs separate dai mezzi di coltura delle cellule infette, e non quelle derivanti dalle non infette, erano capaci di iniziare una nuova amplificazione di prioni in cellule di neuroblastoma “recipienti”, non infette.

Nei nostri esperimenti abbiamo verificato come l'infettività si mantenesse nella coltura cellulare per più di 30 passaggi, susseguenti al primo contatto, generando in tal modo un'infezione persistente. Ipoteticamente la conversione della PrP^c costitutivamente espressa dalle cellule “recipienti”, poteva essere una conseguenza del contatto con le MVs che trasportavano la PrP^{Sc}.

Alternativamente, le MVs catturate dalle cellule bersaglio potrebbero

fondersi con la superficie cellulare od essere internalizzate attraverso una modalità non ancora chiarita, che induce un cambiamento conformazionale della PrP^c sulla superficie cellulare o in compartimenti endocitici. Inoltre, esperimenti condotti *in vivo* su topi trasgenici (tga20) che over-esprimono la forma murina della PrP^c, sono altamente suscettibili a sviluppare la malattia da prioni, qualora infettati attraverso micro-iniezione intracranica di MVs purificate dai sovranatanti delle cellule infette Neuro-2a PK1, mantenute in coltura. La stessa capacità infettiva non si verificava se venivano iniettate MVs derivanti dai sovranatanti di cellule non infette.

Queste nuove evidenze sperimentali suggeriscono che le MVs derivanti dalla membrana plasmatica delle cellule infettate da prioni possono partecipare attivamente al traffico intercellulare della PrP^{Sc} e contribuire alla trasmissione di prioni infetti. Si può ulteriormente postulare che le MVs agiscono come carriers d'infettività durante il processo di neuroinvasione e giocare un ruolo chiave nella propagazione dei prioni infetti tra neurone e neurone, contribuendo in tal modo al processo patogenetico della malattia.

In conclusione, i nostri dati dimostrano per la prima volta la presenza della PrP^c nelle MVs *in vivo*, nel plasma umano, suggerendo che queste strutture possano essere coinvolte nei meccanismi di diffusione paracrina ed endocrina della proteina e possano anche contribuire alla trasmissione delle

patologie da prioni, mediante trasfusione di sangue.

BIBLIOGRAFIA

Alais, S., Simoes, S., Baas, D., Lehmann, S., Raposo, G., Darlix, J. L., Leblanc, P. (2008). Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol. Cell.* 100 : 603-15.

Baron, G. S., Wehrly, K., Dorward, D. W., Chesebro, B., and Caughey, B. (2002). Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *Embo J.* 21:1031-1040.

Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., Reza, R., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M. Z. (2002). Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 30:450-459.

Bate, C., Tayebi, M., Williams, A. (2008). Cholesterol esterification reduces the neurotoxicity of prions. *Neuropharmacology.* 54 :1247-53.

Blatter, T., Brandner, S., Raeber, A. J., Klein, M. A., Voigtlander, T., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1997). PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature.* 389: 69-73.

Brandner, S., Raeber, A. J., Sailer, A., Blatter, T., Fischer, M., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein PrP^C is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 13148-13151.

Brazier, M.W., Davies, P., Player, E., Marken, F., Viles, J.H., Brown, D.R. (2008). Manganese binding to the prion protein. *J. Biol. Chem.* 283:12831-9.

Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., Von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westway, D. and Kretzschmar, H. A. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* 390: 684-687.

Brown, D. R. and Besinger, A. (1998). Prion expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* 334: 423-429.

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Auet, M. and Weissman, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.*

73: 1339-1347.

Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. and Bendheim P. E. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*. 61: 185-192.

Caughey, B. and Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease-and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266: 18217-18223.

Combes, V., Simon, A.C., Grau, G.E., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F., Mutin, M., Sanmarco, M., Sampol, J., Dignat-George, F. (1999). In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Inv.* 104: 93-102.

Combs, C. K., Johnson, D. E., Cannady, S. B., Lehman, T. M. and Landreth, G. E. (1999). Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *J. Neurosci.* 19: 928-939.

De Gassart, A., Gèminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 102: 4336-4344.

Dignat-George, F., Camoin-Jau, L., Sabatier, F., Arnoux, D., Anfosso, F., Bardin, N., Veit, V., Combes, V., Gentile, A., Moal, V., Sanmarco, M., Sampol J. (2004). Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complication of the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* 91: 667-673.

Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B., and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*. 28:8380-8388.

Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., *et al.* (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* 31:642-648.

Février, B. and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16: 415-421.

Février, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 9683-9688.

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.

Foley, G. E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A. and McCarthy, R. E. (1965). Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*. 18: 522-529.

Ford, M. J., Burton, L. J., Li, H., Graham, C. H., Frobert, Y., Grassi, J., Hall, S. M. and Morris R. J. (2002). A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience*. 111: 533-551.

Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. and Parton R. G. (1994). Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveole. *J. Biol. Chem*. 269: 30745-30748.

Fraser, H. and Dickinson, A. G. (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*. 226: 462-463.

Gabison, R., Meiner, Z., Halimi, M. and Bem-Sasson, S. A. (1993). Heparine-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J. Cell. Physiol*. 157: 319-325.

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. and Alper, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*. 209: 794-796.

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Asher, D. M. and David, E. (1968). Transmission of experimental Kuru to the spider monkey. *Science*. 162: 693-694.

Gajdusek, D. C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru. *Science*. 197: 943-960.

Garofalo, T., Lenti, L., Longo, A., Misasi, R., Mattei, V., Pontieri, G. M.,

Pavan, A. and Sorice, M. (2002). Association of GM3 with Zap-70 induced by T cell activation in plasma membrane microdomains. GM3 as a marker of microdomains in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 277: 11233-11238.

Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic.* 5:181-193.

Glatzel, M., Heppner, F. L., Albers, K. M. and Aguzzi, A. (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron.* 31: 25-34.

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

Hachiya, N.S., Yamada, M., Watanabe, K., Jozuka, A., Ohkubo, T., Sano, K., Takeuchi, Y., Kozuka, Y., Sakasegawa, Y., Kaneko, K. (2005a). Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrP^C) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrP^C. *Neuroscience Letter* 374: 98-103.

Hachiya, N.S., Watanabe, K., Kawabata, M.Y., Jozuka, A., Kozuka, Y., Sakasegawa, Y., Kaneko, K. (2005b). Prion protein with Y145STOP mutation induces mitochondria-mediated apoptosis and PrP-containing deposit in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 894-899.

Hadlow, W. J. (1959). Scrapie and Kuru. *Lancet.* 2: 289-290.

Hakomori, S. (1981). Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 733-764.

Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S. and Prinetti, A. (1998). New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain", a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology.* 8: 11-19.

Havsteen, B. H. (2004). Control of the pathogenic conformational change of the prion protein by an attractor of low order. *J. Theor. Biol.* 231: 39-48.

Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J. P. and Aguzzi, A. (2001). Transepithelial prion transport

by M cells. *Nat. Med.* 7: 976-977.

Heyningen S. Van. (1974). Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* 183:656-657.

Horwich, A. L. and Weismann, J. S. (1997). Deadly conformations-protein misfolding in prion disease. *Cell.* 89: 499-510.

Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored proteins. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 409-417.

Johnstone, R. M. (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 36: 315-321.

Joop, K., Berckmans, R.J., Nieuwland, R., Berkhout, J., Romijn, F.P., Hack, C.E., Sturk, A. (2001). Microparticles from patient with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanism. *Thromb. Haemost.* 85: 810-820.

Keller, S. Sanderson, M. P., Stoeck, A., Altevogt, P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* 107: 102-108.

Kiguchi, K., Henning-Chubb, C. B. and Huberman, E. (1990). Glycosphingolipid patterns of peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes are cell specific. *J. Biochem.* 107: 8-14.

Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Conte da Frota, M. L., Walz, R., Andrades, M. E., Da Silva, E. G., Brentani, R. R., Izquierdo, I. and Fonseca Moreira, J. C. (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1137-1144.

Klein, M. A., Frigg, R. Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M. and Aguzzi A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature.* 390: 687-690.

Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat. Med.* 4: 1429-1433.

Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carrol, M. C., Verbeek, J. S., Borro, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H. and Aguzzi, A. (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* 7: 488-492.

Klöhn, P.C., Stoltze, L., Flechsig, E., Enari, M., Weissmann, C. (2003). A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 11666-71.

Kotani, M., Ozawa, H., Kawashima, I., Ando, S. and Tai, T. (1992). Generation of one set of monoclonal antibodies specific for a pathway ganglio-series gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* 1117: 97-103.

Kourie, J. I. (2001). Mechanisms of prion-induced modifications in membrane transport properties: implications for signal transduction and neurotoxicity. *Chem. Biol. Interac.* 138: 1-26.

Kramer, M. L., Kratzing, H. D., Schmidt, B., Romer, A., Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S. and Ketzschmar H. (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem.* 276: 16711-16719.

Kubosaki, A., Nishimura-Nasu, Y., Nishimura, T., Yusa, S., Sakudo, A., Saeki, K., Matsumoto, Y., Itohara, S. and Onodera, T. (2003). Expression of normal cellular prion protein (PrP^C) on T lymphocytes and the effect of copper ion: analysis by wild type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 810-813.

Kumar, R., Murali, P. (2008). Modeling and analysis of prion dynamics in presence of a chaperone. *Math. Biosci.* 213: 50-55.

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

Lasmezas, C. I. (2003). Putative functions of PrP(C). *Br. Med. Bull.* 66: 61-70.

Leeden, R. W. and Yur, K. (1987). Gangliosides: structure, isolation and analysis. *Methods Enzymol.* 138: 139-145.

Li, R., Liu, D., Zanusso, G., Liu, T., Fayen, J. D., Huang, J. H., Petersen, R. B., Gambetti, P. and Sy, M. S. (2001). The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell. Immunol.* 207: 49-58.

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

Lukasewycz, O. A. and Prohaska, J. R. (1990). The immune response in copper deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 587: 147-159.

MacGregor, I., Hope, J., Barnard, G., Kirby, L., Drummond, O., Pepper, D., Hornsey, V., Barclay, R., Bessos, H., Turner, M., Prowse, C. (1999) Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox. Sang.* 77: 88-96.

Malucci, G. R., Ratte, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G. and Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 21: 202-210.

Martinez, M.C., Tesse, A., Zobairi, F., Andriantsitohaina, R. (2005). Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: 1004-1009.

Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Gizzi, C., Mascellino, M. T., Dolo, V., Pontieri, G. M., Sorice, M., and Pavan, A. (2002). Association of cellular prion protein with gangliosides in plasma membrane microdomains of neural and lymphocytic cells. *Neurochem. Res.* 27:743-749.

Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganelli, V., Lucania, G., Pavan, A., Sorice, M. (2004). Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Letters.* 560:14-18.

Martins, V. R., Mercadante, A. F., Cabral, A. I. B., Freitas, A. R. O. and Castro, R.M.R. (2001). Insights into physiological function of cellular prion protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 585-595.

Masserini, M., Palestini, P., and Pitto, M. (1999). Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J. Neurochem.* 73:1-11.

Mo, H., Moore, R. C., Cohen, F. E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P. E. and Dyson H. J. (2001). Two different neurodegenerative diseases caused by two proteins with similar structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 2352-2357.

Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M. A., Mackay, F., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science.* 288: 1257-1259.

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

Mutoh, T., Tokuda, A., Miyada, T., Hamaguchi, M. and Fujiki, N. (1995). Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 5087-5091.

Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. and Taraboulos, A. (1997). Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* 272: 6324-6331.

Naslavsky N., Shmeeda, H., Friedlander, G., Yanai, A., Futerman, A.H., Barenholz, Y., and Taraboulos A. (1999). Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J. Biol. Chem.* 274: 20763-20771.

Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., and Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* 157:521-532.

Parchi, P. (2001). Le malattie da prioni nell'uomo. *Le Scienze.* 393: 50-57.

Parolini, I., Topa, S., Sorice, M., Pace, A., Ceddia, P., Montesoro, E., Pavan, A., Lisanti, M. P., Peschle, C. and Sargiacomo, M. (1999). Phorbol-ester-induced disruption of the CD4-Lck complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. Involvement of

the translocation of activated protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* 274: 14176-14187.

Parton, R. G. (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 155-166.

Pascher, I. (1976). Molecular arrangements in sphingolipids conformation and hydrogen binding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 433-451.

Pauly, P. C. and Harris, D. A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 273: 33107-33110.

Peche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., Cuturi, M.C. (2003). Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic-cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation.* 76: 1503-1510.

Pornillos, O., Garrus, J.E., Sundquist, W.I. (2002). Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* 12: 569-579.

Prince, R. C. and Gunson, D. E. (1998). Prions are copper-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 23: 197-198.

Prinz, M., Montrasio, F., Furukawa, H., van der Haar, M. E., Schwarz, P., Rulicke, T., Giger, O. T., Hausler, K. G., Perez, D., Glatzel, M., and Aguzzi, A. (2004). Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J. Neurosci.* 24:5974-5981.

Prusiner, S. B. (1982a). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 216: 136-144.

Prusiner, S. B. (1982b). Research on Scrapie. *Lancet.* 2: 494-495.

Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A., and Martinez, H. M. (1982c). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* 11:353-358.

Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L. and DeArmond, S. J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production

- of anti-PrP antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 10608-10612.
- Prusiner, S. B. (1995). Le malattie da prioni. *Le Scienze*. 319: 22-30.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 13363-13383.
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. and Cohen, F. E. (1998). Prion protein biology. *Cell*. 93: 337-348.
- Quaglio, E., Chiesa, R. and Harris, D. A. (2001). Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* 276: 11432-11438.
- Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P., Arlotto, M., Riondel, J., Laude, H., Lehmann, S. and Favier, A. (2003). Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J. Biol. Chem.* 278: 9064-9072.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 20:1487-1495.
- 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.
- Rodgers, W. and Rose, J. K. (1996). Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J. Cell. Biol.* 135: 1515-1523.
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. and Dwek, R. A. (2001). Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry*. 40: 3759-3766.
- Sabatier, F., Roux, V., Anfosso, F., Camoin, L., Sampol J., Dignat-George, F. (2002). Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 99: 3962-3970.

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* 169:341-354.

Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M. P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 122: 789-807.

Segundo, F. D., Sevilla, N., Gutierrez, J.P., Brun A. (2008). Altered lymphocyte homeostasis after oral prion infection in mouse. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122: 204-215.

Sharom, F. J. and Grant, C. W. (1978). A model for ganglioside behaviour in cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 507: 280-293.

Shyng, S. L., Huber, M. T. and Harris, D. A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268: 15922-15928.

Shyng, S. L., Heuser, J. E. and Harris, D. A. (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell. Biol.* 125: 1239-1250.

Shyng, S. L., Moulder, K. L., Lesko, A. and Harris, D. A. (1995). The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 270: 14793-14800.

Simak, J., Holada, K., D'Agnillo, F., Janota, J., Vostal, G.J. (2002). Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma. *Trasfusion.* 42: 334-342.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387: 569-572.

Slaughter, N., Laux, I., Tu, X., Whitelegge, J., Zhu, X., Effros, R., Bickel, P., Nel, A. (2003). The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implication for T-cell activation. *Clin. Immunol.* 108:138-151.

Somerville, R. A., and Ritchie, L. A. (1990). Differential glycosylation of the protein (PrP) forming scrapie-associated fibrils. *J. Gen. Virol.* 71: 833-839.

Sorenson, E. R. and Gajdusek, D. C. (1969). Nutrition in the Kuru region. I. Gardening, food handling, and diet of the Fore people. *Acta trop.* 26: 281-330.

Sorice, M., Parolini, I., Sansolini, T., Garofalo, T., Dolo, V., Sargiacomo, M., Tai, T., Peschle, C., Torrisi, M. R. and Pavan, A. (1997). Evidence for the existence of ganglioside-enriched plasma membrane domains in human peripheral lymphocytes. *J. Lipid Res.* 38: 969-980.

Sorice, M., Garofalo, T., Misasi, R., Longo, A., Mikulak, J., Dolo, V., Pontieri, G. M. and Pavan, A. (2000). Association between GM3 and CD4-Lck complex in human peripheral blood lymphocytes. *Glycocon. J.* 17: 247-252.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. and Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell.* 51: 229-240.

Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry.* 37: 7185-7193.

Stuermer, C.A., Langhorst, M.F., Wiechers, M.F., Legler, D.F., Von Hanwehr, S.H., Guse, A.H., Plattner, H. (2004). PRPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *Faseb J.* 18:1731-1733.

Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M. W. and Morris, R. (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 22: 3591-3601.

Svennerholm, L. (1957). Quantitative estimation of sialic acid: colorimetric resorcinol-hydrochloridric acid method. *Biochim. Biophys. Acta.* 24: 604-611.

Svennerholm, L. and Fredman, P. (1980). A procedure for the quantitative

isolation of brain gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta.* 617: 97-109.

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

Telling, G. C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J. and Prusiner, S.B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Gene Dev.* 10: 1736-1750.

Tettamanti, G., Preti, A., Cestaio, B., Venerando, B., Lombardo, A., Guidoni, R. and Sonnino, S. (1980). Gangliosides, neuraminidase and sialyltransferase at the nerve endings. *Adv. Exp. Med. Biol.* 125: 263-281.

They, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166:7309-7318.

Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Kratzel, C., Mai, J., and Beekes, M. (2004). Preclinical deposition of pathological prion protein PrP^{Sc} in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J. Clin. Investig.* 113: 1465-1472.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 24:145-149.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., Lotvall J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 654-659.

Van Meer, G. (1993). Transport and sorting of membrane lipids. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 661-673.

Vella, L., Sharples, R., Lawson, V., Masters, C., Cappai, R., and Hill, A. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J. Pathol.* 211:582-590.

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

Von Poser-Klein, C., Flechsig, E., Hoffmann, T., Schwarz, P., Harms, H., Bujdoso, R., Aguzzi, A., Klein, M. A. (2008). Alteration of B-cell subsets enhances neuroinvasion in mouse scrapie infection. *J. Virol* 82: 3791-3795.

Wadsworth, J.D., Joiner, S., Linehan, J.M., Desbruslais, M., Fox, K., Cooper, S., Cronier, S., Asante, E. A., Mead, S., Bradner, S., Hill, A. F., Collinge, J. (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 3885-3890.

Weissmann, C., Enari, M., Klohn, P.C., Rossi, D., Flechsig, E. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 16378-16383.

Wiegandt, H. (1982). The gangliosides. *Neurochem.* 4: 149-173.

Williams, M. A. and McCluer, R. H. (1980). The use of Sep-pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J. Neurochem.* 35: 266-269.

Wong, B. S., Brown, D. R., Pan, T., Whiteman, M., Liu, T., Bu, X., Li, R., Gambetti, P., Olesik, J., Rubenstein, R. and Sy, M. S. (2001a). Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *J. Neurochem.* 79: 689-698.

Wong, B. S., Chen, S. G., Colucci, M., Xie, Z., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M. S. and Brown, D. R. (2001b). Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *J. Neurochem.* 78: 1400-1408.

Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J.D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.T., Liautard, J.P. (2008). Physiological role of cellular prion protein. *Vet. Res.* 39: 09 .

Zigas, V. (1970). Kuru in New Guinea: discovery and epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 130-132.