

Claudia Cartoni, Michele Di Bari, Michela Conte, Gabriele Vaccari, Romolo Nonno, Umberto Agrimi - Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale - Istituto Superiore di Sanità - Roma; Quanguo Liu, Serena Principe, Franco Cardone, Dipartimento Biologia cellulare e Neuroscienze - Istituto Superiore di Sanità, Roma; Maria Eugenia Schininà, Dipartimento Scienze biochimiche e Centro di Eccellenza BEMM Università di Roma "La Sapienza". cartoni@iss.it



# IDENTIFICAZIONE DEGLI ALLOTIPI DELLA PRP<sup>Sc</sup> IN LC-MS/MS

L'accumulo cerebrale della proteina prionica patologica PrP<sup>Sc</sup> è l'evento centrale delle malattie da prioni.

Si è osservato che nell'arvicola rossastra, roditore il cui gene della PrP è polimorfico al codone 109<sup>Met/Ile</sup>, i soggetti eterozigoti inoculati con la scrapie hanno tempi di sopravvivenza più lunghi degli omozigoti 109<sup>Met/Met</sup>. L'analisi in LC-MS/MS della PrP<sup>Sc</sup> accumulatasi nel cervello delle arvicole dimostra di essere in grado di discriminare gli allotipi ed indica che entrambi convertono nella forma patologica.

La scrapie della pecora e la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) dell'uomo, appartengono alle malattie da prioni, un gruppo di patologie neurodegenerative fatali e caratterizzate dall'accumulo nel sistema nervoso centrale della proteina prionica patologica (PrP<sup>Sc</sup>); questa deriva dalla modificazione conformazionale del suo precursore cellulare denominato PrP<sup>C</sup> (1, 2). Studi sperimentali ed epidemiologici hanno dimostrato che alcuni polimorfismi del gene della PrP sono importanti nel condizionare lo sviluppo delle malattie da prioni nell'uomo e in varie specie animali. Ad esempio, gli ovini omozigoti per la glutammina al codone 171

sono suscettibili alla scrapie, mentre quelli omozigoti per arginina allo stesso codone 171 sono pressoché resistenti (3). Nel topo il gene della PrP ha due posizioni polimorfiche e presenta due alleli (108<sup>Leu</sup>-189<sup>Thr</sup> o 108<sup>Phe</sup>-189<sup>Val</sup>) i quali conferiscono una diversa suscettibilità nei confronti dei vari ceppi di prioni.

L'identificazione degli allotipi della PrP<sup>Sc</sup> che si accumulano in corso di malattia nel cervello di soggetti eterozigoti appare come una strategia importante per valutare se i due alleli partecipino in modo differente alla conversione della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>. Ciò potrebbe contribuire a spiegare la diversa suscettibilità osservata in animali che pre-

sentano differenti polimorfismi del gene della PrP (4, 5). L'arvicola rossastra (*Clethrionomys glareolus*) è un roditore selvatico il cui gene della PrP è polimorfico al codone 109, potendo codificare per isoleucina (Ile) o metionina (Met) (Vaccari *et al.*, dati non pubblicati). Nel presente studio abbiamo inoculato le arvicole rossastre omozigoti 109<sup>Met/Met</sup> ed eterozigoti 109<sup>Met/Ile</sup> con tre ceppi di scrapie al fine di studiarne la suscettibilità e di identificare, mediante LC-MS/MS, gli allotipi che si accumulano nei soggetti eterozigoti.

## Ioni precursore e ioni prodotto dei peptidi TNMK e TNIK con intensità relativa più significativa

Peptide	Ione precursore (M+H) <sup>+</sup> m/z	Ioni prodotto (m/z)
TNMK	493,2	216,1; 278,1
TNIK	475,3	216,1; 260,4

zionando il valore di m/z dello ione corrispondente al peptide TNMK (493,2) e il valore di m/z dello ione corrispondente al peptide TNIK (475,3).

La modalità massa-massa è stata accoppiata alla modalità SIM.

Gli ioni quasi molecolari dei peptidi triptici utilizzati come reporter della relativa PrP<sup>Sc</sup> sono stati frammentati negli ioni prodotto (Tabella). I segnali sono stati registrati in modalità di analisi ionica positiva ("positive ion mode").

## Materiali e metodi

Le arvicole omozigoti 109<sup>Met/Met</sup> ed eterozigoti 109<sup>Met/Ile</sup> sono stati infettati con due isolati di scrapie naturale ovina (SS3 e SS5) e uno di scrapie in capra (SG1).

Gli animali sono stati sacrificati allo stadio terminale della malattia ed il loro cervello congelato a -20 °C. Al fine di ottenere quantità di PrP<sup>Sc</sup> sufficienti all'analisi in LC-MS/MS, i tessuti cerebrali degli animali eterozigoti infettati con SS3, SS5 e SG1 sono stati omogeneizzati insieme prima della purificazione.

La PrP<sup>Sc</sup> è stata isolata e purificata secondo lo Schema sopra riportato (Silvestrini *et al.*, 1997). Dopo aver inattivato il campione, la PrP<sup>Sc</sup> è stata digerita con tripsina (Roche, Basel, Switzerland) in tampone (1 mM EDTA, 25 mM Tris HCl pH 8,25 e 1% octyl-glucopyranoside) a 37 °C per 24 h.

La miscela peptidica è stata quindi separata mediante RP-HPLC, con un cromatografo LabFlow 4000 (LabService Analytica, Bologna, Italy) provvisto di una colonna C18 (2,1x 220 mm, 5 µm diametro delle particelle, e 300 Å dei pori, Vydac, Hesperia, CA, USA). L'eluizione è stata effettuata usando un gradiente lineare 1-60% con acqua e acetonitrile contenenti 0,05% acido trifluoroacetico, in 60 minuti, ad un flusso costante di 150 µL/min.

L'eluato della colonna è stato analizzato mediante uno spettrometro di massa ad elettrospray con trappola ionica (ES-IT, mod. LCQ, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Sono stati selezionati gli ioni dei peptidi triptici composti dagli amminoacidi treonina, asparagina, metionina o isoleucina e lisina (107TNXK110, dove X è Met o Ile) e sono stati utilizzati come reporter della relativa PrP<sup>Sc</sup>. Tale peptide corrisponde agli amminoacidi compresi fra il codone 107 e 110 della PrP. La modalità SIM è stata utilizzata sele-

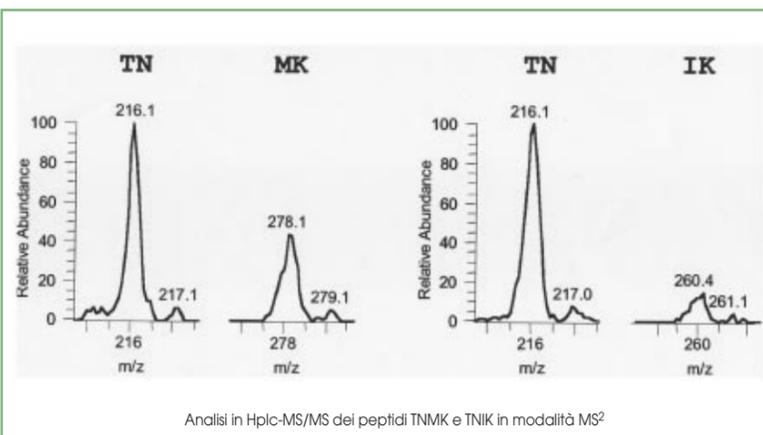
## Osservazioni

I tre ceppi di scrapie hanno determinato nei soggetti eterozigoti nell'arvicola rossastra 109<sup>Met/Ile</sup> tempi di sopravvivenza significativamente più lunghi di quelli osservati negli omozigoti 109<sup>Met/Met</sup>. Al fine di valutare se entrambi gli allotipi della PrP vanno incontro al processo di conversione nell'isoforma patologica, abbiamo analizzato, mediante Hplc-MS/MS, la PrP<sup>Sc</sup> isolata e purificata dal pool dei cervelli degli animali eterozigoti. Sono stati selezionati gli ioni dei peptidi TNMK e TNIK e sono stati analizzati in modalità massa-massa. Lo spettro di massa (Figura) dimostra che sono presenti entrambi gli allotipi 109<sup>Met</sup> e 109<sup>Ile</sup>. Questi risultati indicano che entrambi gli allotipi convertono nella forma patologica e suggeriscono che la diminuita suscettibilità degli animali eterozigoti non dipende da una mancata conversione dell'allotipo 109<sup>Ile</sup> in PrP<sup>Sc</sup>. Il disegno sperimentale del presente lavoro non permette di concludere con certezza che gli allotipi siano contemporaneamente presenti nei tessuti provenienti da ciascun animale. Al fine di indagare se i tempi di sopravvivenza più lunghi osservati nelle arvicole 109<sup>Met/Ile</sup> possano essere spiegati attraverso una minore propensione dell'allotipo 109<sup>Ile</sup> a convertire nella forma patologica, verranno condotti ulteriori studi per determinare le quantità relative dei due allotipi di PrP<sup>Sc</sup> che si accumulano nel cervello degli animali eterozigoti.

## Bibliografia

- (1) K.M. Pan *et al.*, *PNAS USA*, 1993, **90**, 10962.
- (2) K. Basler *et al.*, *Cell*, 1986, **46**, 417.
- (3) W. Goldmann *et al.*, *Journal of General Virology*, 1994, **75**, 989.
- (4) M.C. Silvestrini *et al.*, *Nature Medicine*, 1997, **3**, 521.
- (5) M.E. Schininà *et al.*, *Pure and Applied Chemistry*, 2003, **75**, 317.

Pool dei tessuti cerebrali infettati con scrapie  
↓  
Omogeneizzazione al 10% (p/v) in Sarkosyl  
↓  
Ultracentrifugazione a 200000 g  
↓  
Sospensione del pellet in 0,02 M Tris HCl pH 7,0 e digestione con Proteinasi K  
↓  
Ultracentrifugazione su un gradiente discontinuo (10-20%) di saccarosio  
↓  
Inattivazione della PrP<sup>Sc</sup> con acido formico 80%



## PrP<sup>Sc</sup> Allotype Profiling by LC-MS/MS

The cerebral accumulation of the pathological prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) is the key in the pathogenesis of prion disease. In the bank vole, a rodent in which the PrP gene is polymorphic at codon 109<sup>Met/Ile</sup>, heterozygous subjects inoculated with scrapie show longer survival times than homozygous 109<sup>Met/Met</sup>. LC-MS/MS analysis of PrP<sup>Sc</sup> accumulate in the brain of affected animal demonstrates the method used is able to discriminate both allotypes which convert in pathological form.

ABSTRACT