



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXIII°

Tesi di Dottorato di Ricerca

**STUDIO DEL RUOLO DELLA PROTEINA PRIONICA NELLA REGOLAZIONE DEL SONNO
MEDIANTE L'UTILIZZO DI MODELLI MURINI TRANSGENICI.**

Dottorando: Dott. Loris Lucio Ferrari

Matricola: R07706

Tutor: Prof. Luca Imeri

Dip. di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, A.O. San Paolo

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Sommario

Sommario	2
Riassunto	4
Introduzione	7
Primi studi del sonno	7
EEG e polisonnografia.....	9
Organizzazione del sonno.....	12
NREM.....	12
REM	14
Cicli del sonno.....	15
Circuiti della veglia.....	18
Noradrenalina.....	19
Dopamina	20
Serotonina	21
Istamina	22
Acetilcolina	22
Orexina	23
Circuiti del sonno.....	24
Adenosina.....	25
Sonno REM.	26
La proteina prionica.....	28
Proteina prionica: struttura e localizzazione.....	28
Proteina prionica: funzioni fisiologiche	29
Malattie prioniche.....	31
Morbo di Creutzfeldt-Jakob.....	34
Scopo del lavoro	36
Materiali e Metodi.....	38
Risultati_1.....	42
Risultati 2.....	54
Analisi del sonno REM	54
Analisi del sonno NREM.....	55
Analisi della veglia	55
Analisi della frammentazione del sonno	56
Risultati 3.....	59
Animali anziani	59

Sonno REM	59
Sonno NREM.....	59
Veglia	59
Banda Delta	60
Animali adulti.....	63
Sonno REM	63
Sonno NREM.....	63
Veglia	63
Banda delta.....	64
Animali giovani	67
Sonno REM	67
Sonno NREM.....	67
Veglia	67
Banda delta.....	67
Discussione	71
Caratterizzazione del ceppo Tg(CJD)	71
Studio longitudinale	75
Analisi della deprivazione di sonno	79
Conclusioni	84
Bibliografia.....	85

Riassunto

Introduzione:

Una forma ereditaria della malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) è legata alla mutazione (D178N/V129) sul gene codificante per la proteina prionica. Tale patologia è normalmente caratterizzata in base alla presenza di disturbi motori, demenza ed alterazioni elettoneurofisiologiche. Tuttavia recentemente sono state descritte alterazioni del sonno in pazienti affetti da CJD. Inoltre, un coinvolgimento della proteina prionica nella regolazione del sonno è stato proposto sulla base di dati raccolti in animali che non esprimono la proteina prionica stessa.

Scopo del lavoro:

Sulla base dei dati sopra descritti si è deciso di procedere alla creazione di un nuovo modello murino in grado di esprimere in sé tutte le caratteristiche della CJD riscontrate nell'uomo, per permettere un più completo ed approfondito studio dello sviluppo della malattia e testare eventuali approcci terapeutici. A questo si affianca lo scopo di studiare il ruolo della proteina prionica nei meccanismi di controllo del ciclo sonno/veglia.

Si è perciò provveduto a portare a termine i seguenti studi:

- Caratterizzazione di un nuovo modello murino di morbo di Creutzfeldt-Jakob.
- Studio dell'evoluzione temporale delle caratteristiche del sonno in tutti i ceppi oggetto di studio.
- Analisi della risposta alla deprivazione di sonno da parte di tutti i ceppi.

Materiali e metodi.

Sono stati generati 3 ceppi di topi:

- Topi transgenici che esprimono l'omologo murino della mutazione sopra citata (D177N/V128).

- Topi che non esprimono la proteina prionica.
- Topi che esprimono elevati livelli di questa proteina.

Tutti gli animali sono stati sottoposti all'impianto di elettrodi per la registrazione dei segnali elettroencefalografici. I tracciati acquisiti sono stati analizzati per descrivere alterazioni morfologiche dei tracciati stessi o delle caratteristiche del sonno.

L'analisi dell'evoluzione del sonno nel tempo è stata condotta usando tre gruppi di età per ogni ceppo (6, 12 e 18 mesi).

La registrazione degli animali a seguito di una deprivazione di sonno di sei ore è stata usata per analizzare la risposta alla deprivazione stessa.

Risultati.

Le analisi condotte hanno mostrato che animali anziani che esprimono la mutazione (D177N/V128) hanno trascorso meno tempo in sonno REM rispetto a tutti gli altri ceppi. Essi presentano inoltre alterazioni elettroencefalografiche assenti negli altri gruppi di animali e simili ad altre alterazioni descritte in pazienti ed in altri modelli animali di CJD.

L'analisi dell'evoluzione temporale della malattia ha mostrato che la diminuzione del sonno REM nel ceppo portatore della mutazione (D177N/V128) è presente già a 12 mesi di età ma assente a 6 mesi. Questo aspetto è di particolare importanza se si considera che, generalmente, la diagnosi della malattia viene effettuata in soggetti relativamente anziani e sulla base di sintomi motori. Inoltre sia questo ceppo che il ceppo che non esprime la proteina prionica hanno mostrato una riduzione della circadianità del ciclo sonno/veglia.

L'analisi del sonno in seguito a deprivazione ha mostrato come alla riduzione del tempo trascorso in sonno REM in condizioni di controllo si accompagni anche una ridotta capacità di recupero di questa fase rispetto ad animali WT.

Conclusioni:

È stato caratterizzato dal punto di vista elettroencefalografico ed ipnologico un nuovo modello murino di morbo di Creutzfeldt-Jakob. Tale modello racchiude in sé tutte le caratteristiche già descritte in pazienti affetti da questa malattia. In quanto oltre ai ben noti sintomi motori e cognitivi ed elettroencefalografici presenta anche le alterazione del sonno recentemente descritte.

L'analisi longitudinale dello sviluppo della malattia ha mostrato come la riduzione del sonno REM sia presente anche in animali adulti e non solo in quelli anziani, quindi precedentemente al supposto inizio della malattia. Indicando un possibile nuovo strumento diagnostico in grado di fornire una diagnosi precoce di questa malattia.

L'analisi in seguito a deprivazione di sonno ha infine confermato i dati raccolti, indicando una ridotta capacità di recupero negli animali che presentano alterazione della proteina prionica.

Introduzione

Descrivere brevemente cosa sia il sonno è talmente banale da risultare difficile. Chiunque sa cosa significhi dormire, perché chiunque dorme, tuttavia le caratteristiche che vengono comunemente accettate per descrivere il sonno rappresentano solo una parte di ciò che il sonno è veramente. Se infatti da un lato le tecniche attualmente usate per studiarlo sono in grado di descrivere nel dettaglio molti degli aspetti comportamentali e fisiologici del sonno, dall'altro lato rimane ancora avvolto nell'oscurità il motivo per il quale esiste questo stato.

Già nell'antichità alcuni sapienti (Lucrezio, Plinio il vecchio) si erano occupati di sonno, stimolati soprattutto dal fenomeno del sogno, e ne avevano descritto alcune caratteristiche, come l'assenza di attività, la postura tipica, la sua presenza in varie specie animali. (Gottesmann 2001) In particolare, l'assenza di attività dei soggetti dormienti ha spesso portato a ritenere questa condizione come uno stato di quiescenza totale dell'organismo. È solo a partire dall'inizio del XX secolo che lo studio del sonno ha iniziato ad avere un orientamento maggiormente scientifico e basato su un approccio anatomo-fisiologico affiancato alle evidenze degli studi comportamentali. Dagli anni '20 del novecento (con l'uso dell'elettroencefalografia) si è intrapresa definitivamente la strada che ha portato alle conoscenze attuali.

Primi studi del sonno

Come accennato precedentemente, l'evento che diede la svolta allo studio del sonno fu la registrazione delle onde elettriche generate dai neuroni grazie all'invenzione dell'elettroencefalografo. Fu Hans Berger, negli anni '20 del novecento, a registrare per primo le onde cerebrali nell'uomo e rilevò aumenti nell'ampiezza e diminuzioni nella frequenza di tali onde quando i soggetti chiudevano gli occhi, aumenti che si facevano sempre più consistenti mano a mano che si addormentavano (Haas 2003). Si ipotizzò che fosse semplicemente l'assenza di stimoli sensoriali a causare i cambiamenti descritti ed, in ultima analisi, il sonno. A rafforzare questa ipotesi, pochi anni più tardi Bremer mostrò come la disconnessione tra encefalo e tronco encefalico (mediante sezione completa a livello della lamina quadrigemina) porti alla perdita delle caratteristiche corticali dello stato di veglia (Bremer and Terzuolo 1953).

In realtà le prime evidenze che il sonno non costituisca semplicemente un'assenza di veglia, in cui l'organismo cade solo a causa di ridotte o nulle stimolazioni, ma uno stato a se stante, attivamente promosso dal cervello, risalgono già ad alcuni anni prima rispetto alle osservazioni di Berger (Hobson 1995).

Al termine della prima guerra mondiale Von Economo, un neurologo austriaco, effettuò la prima descrizione dell'encefalite letargica (un'encefalite legata alla diffusione in quegli anni dell'influenza "spagnola") e osservò che i soggetti affetti potevano andare incontro a due opposti destini, una continua sonnolenza od un'insonnia. (Hobson 1995; Haas 2003; Triarhou 2007).

Sulla base di studi neuropatologici condotti su pazienti con encefalite, Von Economo ipotizzò l'esistenza di un centro del sonno a cavallo tra il mesencefalo ed il diencefalo, a sua volta suddiviso in nuclei di promozione della veglia ed in nuclei di promozione del sonno (von Economo 1929; Hobson 1995).

Ci vollero alcuni anni affinché gli studi elettroencefalografici mostrassero chiaramente come il sonno non sia semplicemente uno stato di inattività dovuta alla deprivazione sensoriale. A cavallo tra gli anni '40 e '50 i lavori di Moruzzi e Magoun mostrarono, attraverso studi di lesione, in particolare a livello del tegmento pontino e mesencefalico (Lindsley, Schreiner et al. 1950; French and Magoun 1952; Moruzzi 1972) e stimolazione elettrica, come la generazione del sonno e della veglia dipenda dall'attività di numerosi nuclei cerebrali e non dalla presenza o meno di stimoli esterni.

Pochi anni più tardi N. Kleitman ed E. Aserinsky registrarono l'elettroencefalogramma (EEG) e l'elettroculogramma (EOG) in alcuni soggetti sia svegli che dormienti (Aserinsky and Kleitman 1953).

Le due registrazioni combinate mostrarono la comparsa, durante il sonno, di alcuni periodi di intensa attività motoria da parte degli occhi che corrispondevano a momenti di desincronizzazione (caratteristica tipica della veglia) a livello dell'EEG. I due ricercatori ipotizzarono così che il sonno fosse diviso in due fasi distinte fra loro e chiamarono REM (rapid eye movement) la fase da loro scoperta, da contrapporsi alla fase NREM.

Successivi studi hanno poi mostrato come la fase NREM possa a sua volta essere suddivisa in quattro diverse fasi (Rechtschaffen and Siegel 2000).

A partire dagli anni '50-'60 gli studi elettrofisiologici, le analisi istochimiche e poi anche molecolari si sono moltiplicate in maniera esponenziale, andando a descrivere sempre più nel

dettaglio le caratteristiche del sonno, i centri cerebrali deputati alla sua regolazione e le sue interazioni con tutti gli altri processi fisiologici e patologici dell' organismo.

Nonostante i grandi progressi ottenuti, mancano ancora le risposte ad alcune fondamentali domande sul sonno, dalla sua reale funzione (che è ancora ignota) al suo sviluppo filogenetico, al ruolo dei numerosi nuclei encefalici che sono coinvolti nella sua regolazione.

EEG e polisonnografia

L'elettroencefalografia è una delle tecniche regine per lo studio dell'attività cerebrale e, poiché il sonno deriva dal cervello ed ha un profondissimo impatto sulla sua attività, è anche una metodica cruciale nello studio del sonno.

I neuroni sono cellule eccitabili e, come tali, generano campi elettrici che è possibile registrare; questo è evidente con tecniche, quali il patch-clamp, che registrano i flussi di corrente di un singolo neurone (o di un singolo canale), tuttavia è possibile rilevare anche l'attività di intere popolazioni neuronali. Ponendo 2 elettrodi sul cuoio capelluto, o, come è possibile fare nell'animale da esperimento, direttamente a contatto con la superficie cerebrale, si possono registrare le variazioni di potenziale tra di essi; tali variazioni riflettono le variazioni di potenziale dei gruppi di neuroni che si trovano sotto ciascun elettrodo.

Tanto più un singolo neurone è vicino all'elettrodo tanto maggiore è il suo contributo nella generazione del segnale raccolto dall'elettrodo stesso, per questo motivo sono i neuroni corticali quelli che sviluppano le correnti rilevate dall'EEG mentre i nuclei più profondi, troppo distanti, contribuiscono poco al segnale che viene registrato (Koester and Siegelbaum 2000; Westbrook 2000). Un'eccezione a questa situazione è costituita dagli animali da esperimento, nei quali è possibile inserire elettrodi in profondità nel tessuto cerebrale per registrare segnali, ad esempio, direttamente dall'ippocampo. In caso di determinate patologie, quali l'epilessia od alcune patologie neurodegenerative, il posizionamento di elettrodi in profondità viene eseguito anche nell'uomo.

Vi sono due modalità in cui è possibile posizionare gli elettrodi per la registrazione di un EEG. Una delle principali distinzioni è quella fra registrazioni monopolari e registrazioni bipolari: nella prima i segnali elettroencefalografici raccolti da un elettrodo "attivo" sono confrontati con i segnali provenienti da un elettrodo di riferimento, che non raccoglie segnali EEG in quanto posto in una zona elettricamente neutra, come il lobulo dell'orecchio. Nel caso di registrazioni

bipolari entrambi gli elettrodi registrano segnali EEG e questi segnali sono confrontati tra loro; entrambi gli elettrodi fungono quindi sia da elemento attivo che da elemento di riferimento.

I segnali raccolti dagli elettrodi devono necessariamente andare in contro a processi di amplificazione e filtraggio (Hobson 1995; Westbrook 2000).

L'ampiezza dei segnali EEG è infatti nell'ordine dei microvolt e non dei millivolt, come accade per le registrazioni intracellulari. Ciò accade perché, nelle registrazioni intracellulari (in cui un elettrodo è interno alla cellula ed uno è esterno) ad una data corrente I (necessaria per depolarizzare la cellula) si associa un'elevata resistenza R (dovuta alle proprietà della membrana plasmatica). Per la legge di Ohm $V=I \times R$ si ottiene un determinato valore di V (nell'ordine dei millivolt).

Viceversa l'EEG è una registrazione extracellulare nella quale entrambi gli elettrodi sono posizionati esternamente alla cellula. Ipotizzando di registrare un singolo neurone la corrente I (necessaria alla depolarizzazione) rimane invariata rispetto all'esempio precedente, ma R risulta estremamente inferiore (in quanto corrisponde alla resistenza del fluido extracellulare, che non ha un'elevata resistenza) e quindi, per la legge di Ohm, V risulta grandemente ridotta (Westbrook 2000).

All'atto pratico, tramite elettrodi EEG non è possibile registrare extracellularmente un singolo neurone, i segnali raccolti rappresentano, appunto, la somma dei segnali di svariati neuroni.

Inoltre, l'attività dei gruppi neuronali è fortemente attenuata e disturbata dagli elementi che deve attraversare prima di raggiungere gli elettrodi (ossa, muscoli, capelli). Nel caso di piccoli animali da laboratorio, quali i roditori, bisogna anche considerare le ridotte dimensioni del cervello, che non può produrre segnali molto potenti; a ridotte dimensioni corrisponde infatti un ridotto numero di neuroni, che sono la fonte generatrice dei segnali elettrici che vengono registrati sotto forma di segnale elettroencefalografico.

Quest'ultimo si presenta come una linea oscillante caratterizzata da una determinata ampiezza delle oscillazioni, espressa in sottomultipli del Volt, e da una data frequenza, espressa in cicli per secondo (hertz, Hz). Queste sono inversamente proporzionali tra loro, all'aumentare dell'ampiezza dell'onda EEG si ha una parallela diminuzione della frequenza e viceversa.

Nell'uomo le onde elettroencefalografiche hanno ampiezza nell'ordine dei microvolt e frequenze che vanno da 0,5 Hz ad oltre 30 Hz. Al fine di rendere più agevole l'analisi dell'EEG è stata effettuata una suddivisione arbitraria delle onde in bande sulla base delle differenti frequenze ed ampiezze. Le onde che hanno frequenze comprese fra 0,5 e 4 Hz (quindi quelle a

minor frequenza) sono caratterizzate da elevata ampiezza e costituiscono la banda delta, le onde comprese fra 4 e 7 Hz costituiscono la banda teta, quelle tra 8 e 13 la banda alfa mentre quelle tra 13 e 30 Hz formano la banda beta. Ulteriori bande sono state caratterizzate nel corso del tempo e si sono andate ad affiancare alle 4 principali: tra queste la banda gamma, che rappresenta frequenze oltre i 25 Hz fino a 100 (Hughes 2008) e la banda sigma, con frequenze altissime, oltre i 500 Hz (Niedermeyer 2004). Già a partire dagli studi di Berger si era notata una corrispondenza tra lo stato comportamentale del soggetto ed il pattern di bande prevalente in quello stato, così, mentre nella veglia attiva prevale la banda beta, nella veglia ad occhi chiusi prevale la banda alfa e via via che un soggetto si addormenta e cade in un sonno sempre più profondo, acquista sempre più importanza la banda delta (Westbrook 2000; Miller 2007).

Come verrà illustrato più avanti, questa dipendenza tra lo stato di attività e la frequenza delle onde EEG viene spiegata analizzando i circuiti talamo-corticali.

Mentre in veglia i soggetti sono attivi e, quindi, i singoli neuroni “scaricano” in risposta a stimoli sensoriali, indipendentemente dal comportamento del resto della popolazione nella quale si trovano, durante le fasi di sonno prevalgono circuiti interni all'encefalo e le popolazioni neuronali tendono ad avere un comportamento sincronizzato tra loro ed a scaricare contemporaneamente. Poiché l'EEG non è altro che la somma dell'attività elettrica a cavallo della membrana plasmatica dei singoli neuroni, in veglia prevale un'onda a bassa ampiezza ed alta frequenza dovuta al fatto che in ogni momento vi è un piccolo gruppo di neuroni attivi, mentre in sonno prevalgono onde di ampiezza elevata, dovute al fatto che vi sono pochi gruppi contenenti moltissimi neuroni che si attivano seguendo ritmi ciclici.

Le caratteristiche dell'EEG sono profondamente influenzate dallo stato comportamentale nel quale si trova l'individuo.

La registrazione polisonnografica consiste nella registrazione di numerosi parametri fisiologici associati al sonno. I principali sono l'EEG ed il movimento (sottoforma di elettromiogramma EMG o di telecamere ad infrarossi) a questi possono essere associati vari altri parametri, dall'elettoculogramma (EOG) all'elettrocardiogramma (ECG) a parametri respiratori, solo per citarne alcuni.

La polisonnografia è l'unica tecnica che permette un'analisi quantitativa del sonno, sia con scopi di ricerca sia con scopi clinici. La sola analisi EEG, infatti, non permette di distinguere chiaramente tra gli stati di sonno REM e gli stati di veglia attiva (in entrambi, nel roditore, si ha un'elevata potenza della banda teta) e neppure tra le fasi di addormentamento e le fasi di veglia

quieta (nell'uomo); inoltre esso non è informativo riguardo a tutti gli altri sistemi che sono influenzati durante il sonno, da quello cardiovascolare a quello respiratorio.

Nell'animale da esperimento tali registrazioni richiedono operazioni chirurgiche necessarie al fissaggio dei vari elettrodi. Viceversa, nell'uomo le analisi polisonnografiche sono meno invasive, in pratica ad una normale registrazione EEG (effettuata con elettrodi posti sul cuoio capelluto) si affiancano registrazioni elettrocardiografiche, actigrafiche, video od altre, a seconda delle esigenze. Da notare che, poiché l'applicazione della strumentazione necessaria ad effettuare le registrazioni ha come effetto collaterale quello di disturbare il sonno (principalmente durante la fase di addormentamento), si effettua, di norma, almeno una notte di adattamento, durante la quale il soggetto si addormenta nelle esatte condizioni in cui verrà eseguito l'esame.

Organizzazione del sonno

Lo studio del sonno può essere approcciato da vari punti di vista, ad esempio molecolare, elettrofisiologico o filogenetico; il primo e più facile approccio è, però, quello comportamentale. Quattro caratteristiche descrivono il sonno in tutti gli esseri viventi: una marcata riduzione dell'attività motoria, una postura tipica (ad esempio giacere sdraiato, per l'uomo, e restare fermo eretto sulle 4 zampe nel cavallo), una ridotta sensibilità alla stimolazione sensoriale ed, infine, la facilità ad uscire da questo stato per passare alla veglia.

I mammiferi iniziano la fase di sonno con un periodo di NREM per poi passare al sonno REM, le 2 fasi si alternano più volte nel corso della notte secondo cicli di durata stabilita detti cicli ultradiani, in quanto durano meno di 24 ore e che, nell'uomo, sono di circa 90-100 minuti (Rechtschaffen and Siegel 2000).

NREM

Il sonno NREM si caratterizza, rispetto alla veglia, per una marcata riduzione del metabolismo dell'intero organismo, un abbassamento della temperatura (dovuto alla pressoché assente attività muscolare, ed all'aumentata vasodilatazione) (Gilbert, van den Heuvel et al. 2004) ed una ridotta attività cerebrale; tali modificazioni si accordano perfettamente con l'aumento del tono parasimpatico che è rilevabile in questa fase.

Così come il sonno nel suo complesso si divide in due fasi differenti fra loro (NREM e REM), così il sonno NREM, almeno prendendo in considerazione l'uomo ed i primati, è a sua volta suddivisibile in 4 stadi (Hsieh, Robinson et al. 2008). Viceversa questa ulteriore suddivisione non viene fatta nei roditori ed, in generale, negli altri animali.

Nelle fasi di veglia attiva ed ad occhi aperti a prevalere è la desincronizzazione fra i vari neuroni, che ha come risultato un EEG ad alta frequenza e, quindi, una predominanza delle bande beta e gamma (una banda composta da frequenze superiori ai 30 Hz, caratterizzata più recentemente rispetto alle principali). Come era stato descritto nei primi pionieristici esperimenti, già chiudendo gli occhi si ha un profondo cambiamento nell'attività cerebrale, la banda beta lascia il posto alla banda alfa. Questa può essere registrata a livello della corteccia occipitale ed ha frequenza inferiore della precedente, dimostrando così anche il ruolo cruciale del sistema visivo nella nostra specie. Se il soggetto ad occhi chiusi non viene più stimolato tende, in un tempo variabile, ma, generalmente, intorno ai 10-15 minuti, (Carskadon, Dement et al. 1986) a cadere nel primo stadio del sonno NREM (Hobson 1995; Rechtschaffen and Siegel 2000).

Fase1: è la fase dalla quale comincia sempre il sonno nell'uomo, in questa fase il sonno resta molto leggero ed è quindi elevata la possibilità di svegliarsi. Secondo alcuni, in realtà, questa è più una fase di addormentamento che di sonno, durante la quale questo comportamento si sta stabilendo ma la veglia non è ancora completamente scomparsa (Rechtschaffen and Siegel 2000)). Il respiro tende a farsi più lento e più profondo, mentre l'attività muscolare scema sempre più fino a farsi molto leggera (Hauri and Wisbey 1992) e l'attività cardiaca va incontro ad un leggero rallentamento. Complessivamente si può dire che si ha un aumento dell'attività parasimpatica ed una diminuzione dell'attività simpatica. Anche l'attività cerebrale, naturalmente, va incontro a cambiamenti. Il ritmo dell'attività elettrica cerebrale tende a farsi sempre più lento e la banda alfa viene sostituita dalla banda teta. (Ogilvie 2001)

Fase2: in questa fase i soggetti si trovano in uno stato di sonno vero e proprio. Rispetto alla fase 1, sostanzialmente, vengono accentuati i segni che già erano comparsi, il respiro si fa ancora più lento e profondo, la prevalenza del sistema parasimpatico si fa ancora più marcata.

A livello dell'EEG, a fronte di una continua riduzione della frequenza delle onde si ha la comparsa di alcune caratteristiche formazioni tipiche di questo stato: i fusi del sonno ed i complessi K. I primi sono descritti come un gruppo di onde di frequenza compresa fra 12 e 14 Hz che progressivamente aumentano la loro potenza e poi, sempre progressivamente, la diminuiscono (De Gennaro and Ferrara 2003). I complessi K, invece, sono onde molto lente

caratterizzate da una prima, breve, fase di potenziale positivo seguita da una profonda negativizzazione del potenziale dell'onda ed infine un ritorno alla normalità. La durata complessiva di un tipico complesso K è di circa 1 secondo ed essi possono essere registrati in tutta la corteccia (Cash, Halgren et al. 2009).

Fasi 3 e 4 (detto anche sonno ad onde lente, SWS): queste 2 fasi sono state recentemente accorpate dall' American Academy of Sleep Medicine (Schulz 2008). In questo stadio il sonno raggiunge la sua massima profondità, il sistema parasimpatico prevale fortemente sul simpatico, rendendo ancora più lento il battito cardiaco e più alta la soglia di stimolazione necessaria a risvegliare il soggetto. La temperatura corporea continua a scendere. A livello EEG prevale la banda delta, costituita da onde a frequenza molto bassa ed elevata ampiezza. E' considerata la fase di sonno più profonda e maggiormente riposante. All'opposto del sonno REM, questo stadio è prevalente nella prima parte della notte mentre si presenta meno spesso nella seconda parte.

REM

Il sonno REM, nell'uomo, si alterna al NREM secondo un ciclo ultradiano della durata di circa 100 minuti. Dall'addormentamento i soggetti attraversano le 4 fasi del sonno NREM ed entrano poi nel sonno REM, questo ciclo si ripete 3-4 volte nel corso della notte. La durata della fase REM tende ad aumentare nelle ultime ore della notte, al contrario le fasi più profonde di sonno NREM tendono a diminuire. Nell'adulto il tempo trascorso nella fase REM ammonta a circa il 20-25% del tempo totale di sonno (Rechtschaffen and Siegel 2000).

Da un punto di vista EEG il sonno REM presenta un tracciato desincronizzato, come la veglia, ad indicare un'attivazione a livello corticale. Sempre a livello di registrazioni di massa (cioè di gruppi di cellule) si ha la comparsa delle onde ponto-genicolo-occipitali (PGO). Esse possono essere registrate, tramite elettrodi posti in profondità nell'animale da esperimento, a livello del ponte, del nucleo genicolato laterale e dalla corteccia visiva primaria. Queste onde si presentano sottoforma di potenziali isolati di grande ampiezza e si manifestano a partire da pochi secondi prima dell'effettivo inizio dell'episodio REM (Jouvet, Michel et al. 1959; Brooks and Bizzi 1963). Per questo motivo esse sono considerate un segno premonitore del presentarsi di un episodio REM. Queste onde si generano a livello della formazione reticolare del ponte, da qui si dirigono prima al nucleo genicolato laterale ed infine alla corteccia occipitale. Dopo l'inizio

del REM si presentano come brevi treni di onde (3-10 per ogni treno) (Brooks and Bizzi 1963; Mouret and Guilleminet 1963). La presenza di queste onde in regioni correlate con vari organi di senso ha lasciato supporre che vi sia una correlazione tra onde PGO ed i sistemi: visivo, uditivo (Drucker-Colin, Bernal-Pedraza et al. 1983) e somatosensotiale (Jouvet 1962; Callaway, Lydic et al. 1987).

In accordo con l'attivazione neuronale presente nel sonno REM si ha un aumento di temperatura cerebrale rispetto al NREM; la capacità di termoregolazione del corpo è invece ridotta in questa fase e l'organismo, come per un animale poichilotermo, tende a raggiungere la temperatura ambientale (Parmeggiani 1987).

A livello del sistema cardiocircolatorio, nel passaggio da sonno NREM a REM si hanno significative modificazioni, la caratteristica più importante è l'instabilità di tutto il sistema in questo stato. Si hanno rapidi passaggi tra periodi di preminenza del sistema parasimpatico e periodi di preminenza del sistema simpatico, con ampie variazioni della frequenza cardiaca (Borbely 1982; Penzel, Kantelhardt et al. 2003). Possono verificarsi anche extrasistoli (Dickerson, Huang et al. 1993). Anche a livello della pressione arteriosa si assiste a repentini cambiamenti, con picchi di alta pressione alternati a momenti di pressione simile a quella del sonno NREM. Anche il sistema respiratorio va incontro ad un aumento di oscillazione dei parametri fisiologici con una ridotta responsività alla pressione parziale di CO₂.

A livello del sistema motorio si ha la comparsa di un atonia che riguarda pressoché tutta la muscolatura scheletrica, con l'importante esclusione della muscolatura extraoculare (caratteristica che dà il nome a questo stato) e di quella respiratoria.

Cicli del sonno

Il normale ciclo sonno-veglia, così come molti altri processi fisiologici, segue un ritmo naturale (detto ritmo circadiano) della durata di circa 24 ore. Questo ritmo, tuttavia, interagisce anche con un altro processo, di natura omeostatica. Solo dall'interazione di questi 2 processi, che sono stati denominati processo C (circadiano) e processo S (omeostatico) deriva la propensione all'addormentamento od al risveglio di un soggetto nell'arco della giornata (Borbely 1982).

I ritmi circadiani sono regolati endogenamente e, per quanto interagiscano con l'ambiente esterno e ne siano da questo influenzati, sono completamente autonomi in assenza di input. Il termine tedesco *zeitgeber* indica quegli elementi esterni al ciclo circadiano che però

interagiscono con esso, spesso causandone un reset. Il più importante tra gli zeitgebers è la luce, una diminuzione nella sua intensità è un importante fattore che spinge al sonno gli animali diurni (mentre, al contrario è un fattore che aumenta l'attività negli animali notturni). Per quanto riguarda l'uomo, il mondo moderno ha avuto un notevole impatto sui ritmi circadiani, i ritmi lavorativi imposti dalla società non si conciliano alla perfezione con i ritmi naturali, tanto meno nel caso di coloro che effettuano lavori notturni, e sono probabilmente una delle cause dei sempre più numerosi disturbi del sonno (Hobson 1995).

La scoperta dei ritmi circadiani e di alcune loro caratteristiche avvenne ad opera di J. Aschoff e R. Wever, due ricercatori presso il Max-Planck institute di Monaco (Aschoff 1965). Essi crearono un bunker che fosse completamente isolato dal resto del mondo (e dai suoi zeitgebers) e vi rinchiusero alcuni volontari; ciò che osservarono fu un leggero allungamento della giornata soggettiva dei volontari da 24 ad oltre 25 ore, ma, a parte questa leggera differenza oraria, il ciclo sonno veglia (ed anche altri cicli, come quello della temperatura) si mantenne costante in oltre un mese di sperimentazione. Una volta reintrodotta la luce del giorno nel bunker, il ciclo sonno/veglia si riportò, nel giro di 2 giorni, al ciclo di 24 ore al quale siamo abituati (Aschoff and Wever 1976).

I sistemi di controllo del ciclo circadiano sono altamente conservati da un punto di vista filogenetico (Allada, Emery et al. 2001; Reppert and Weaver 2001) e vari studi ne hanno identificato i nuclei cerebrali di origine ed i meccanismi molecolari che ne stanno alla base.

Il meccanismo molecolare alla base del controllo circadiano è presente in tutti i neuroni del nucleo soprachiasmatico (un nucleo ipotalamico che si trova in prossimità del chiasma ottico); queste cellule nervose, persino se isolate, mantengono in attività questo meccanismo (Welsh, Logothetis et al. 1995). Il nucleo soprachiasmatico viene identificato come il nucleo principale che controlla, a sua volta, molti altri nuclei implicati nel controllo di numerosi sistemi posti sotto un controllo circadiano: esperimenti condotti nel criceto hanno mostrato come la sostituzione di tale nucleo da animali sani ad animali con alterazioni dei ritmi circadiani porti alla remissione dei disturbi, mentre il risultato opposto è stato ottenuto trapiantando il nucleo soprachiasmatico da animali malati a sani (Ralph, Foster et al. 1990).

Un ulteriore indizio dell'importanza di questo centro è data dal fatto che riceva afferenze dal tratto retinoipotalamico, che porta informazioni sulla luminosità dell'ambiente direttamente dalla retina all'ipotalamo. Questa stretta connessione è uno dei motivi che spiegano le importanti interazioni della luce ambientale con i ritmi circadiani.

Il meccanismo molecolare alla base del funzionamento di questo sistema è stato studiato nel dettaglio ed è, oggi, ben descritto; esso si basa sulla regolazione a feedback dell'espressione di alcuni geni base (la famiglia Per, la famiglia Cry, ed i geni clock e bmal1). In breve, all'inizio del giorno soggettivo i complessi eterodimerici formati dalle proteine clock:bmal1, accumulate nella notte precedente, inducono un' aumentata trascrizione dei geni Per e Cry, che raggiunge un picco massimo all'inizio della notte soggettiva. Tramite un meccanismo a feedback, i complessi proteici contenenti Cry inibiscono a loro volta l'espressione di clock e bmal e, quindi, come risultato ultimo, rallentano la trascrizione degli stessi Per e Cry; la diminuzione di tali prodotti genici, durante la notte soggettiva, libera mano a mano clock:bmal1 dall'inibizione. All'inizio del giorno soggettivo seguente si è ripristinata la situazione di partenza (elevato numero di etero dimeri clock:bmal1) che stimola quindi la trascrizione di Per e Cry (Pace-Schott and Hobson 2002).

Il ciclo circadiano non basta però a spiegare i meccanismi dell'addormentamento, basta infatti pensare al caso in cui, dopo una notte insonne, si vada a letto al mattino.

Per dare una spiegazione più completa del processo di addormentamento Borbély ed Achermann proposero quindi il modello dei due processi (two-process model). L'idea di questo modello parte dai lavori di Webb e Feinberg degli anni '70 (Webb and Agnew 1971; Feinberg 1974) che mostrarono che tanto più una veglia è prolungata, tanto maggiore è la quantità di banda delta nel sonno che segue quella veglia. Tramite la valutazione della propensione al sonno, che viene effettuata con un semplice test di addormentamento (un soggetto viene posto, sdraiato, in una stanza buia e viene calcolato il tempo necessario all'addormentamento) è possibile valutare la somma delle pressioni al sonno dei due processi.

Questo modello (Borbely 1982) ipotizza che la tendenza all'addormentamento dipenda da 2 differenti processi che interagiscono tra loro, uno di natura circadiana (il processo C) ed uno di natura omeostatica (il processo S). Secondo tale modello il processo C risulta esclusivamente dal ciclo circadiano e, quindi, per l'uomo, induce la massima pressione verso il sonno alla sera mentre al mattino la pressione è minima. Il processo S, invece, con un meccanismo ancora da chiarire, crea una pressione verso il sonno sempre maggiore a partire dal momento del risveglio fino al successivo addormentamento. Con il sonno lo stimolo all'addormentamento dovuto al processo S diminuisce progressivamente fino a scomparire nel caso di un sonno sufficientemente prolungato. Il modello matematico prevede che venga assegnato un punteggio arbitrario indicante la propensione al sonno. In una giornata normale questo punteggio

raggiunge il valore massimo alla sera, quando sia il processo C che il processo S raggiungono il valore più alto. Viceversa, al risveglio dopo una notte di sonno entrambi i processi sono al valore più basso. Nel caso in cui un soggetto venga sottoposto ad una notte di deprivazione del sonno si assiste ad un aumento del punteggio dovuto al fatto che il processo S continua ad aumentare la sua pressione verso il sonno. Al mattino successivo, nonostante il processo C sia al valore più basso la pressione verso il sonno è elevata a causa del processo S, col procedere della giornata la pressione continua ad aumentare sia a causa del processo S che del processo C, la sera successiva la pressione sarà molto elevata perché il processo C raggiunge il suo massimo ed il processo S ha continuato ad incrementare il suo punteggio per tutta la giornata.

Circuiti della veglia

Sonno e veglia sono sottoposti al controllo di differenti e numerosi nuclei cerebrali, alcuni deputati al controllo delle variazioni di stato ed altri al mantenimento di un determinato stato. Dall' interazione tra questi numerosi circuiti esita lo stato di veglia, sonno NREM o sonno REM nel quale ci troviamo in ogni dato momento della giornata.

La promozione ed il mantenimento della veglia coinvolge un gran numero di diversi nuclei che sfruttano differenti neurotrasmettitori: glutammato, noradrenalina, dopamina, orexina, istamina ed acetilcolina sono i principali.

Come mostrato dagli studi di Moruzzi e Magoun la formazione reticolare gioca un ruolo cruciale nel controllo del ciclo sonno/veglia: in particolare, per quanto riguarda la veglia, la parte più caudale di questa struttura (midollo allungato e ponte) risulta particolarmente attiva nel mantenimento della postura e del tono muscolare mentre la parte più rostrale (parte del ponte e mesencefalo) è coinvolta nell'attivazione corticale (Jones 2005). Esperimenti di lesione condotti nella parte più rostrale del tronco encefalico hanno mostrato la comparsa di coma in tutti i casi (Lindsley, Schreiner et al. 1950; Steriade and McCarley 2005) . Viceversa la stimolazione elettrica di questa regione induce l'attivazione corticale. Esperimenti di elettrofisiologia hanno poi mostrato una correlazione tra la frequenza di scarica dei neuroni in tale area ed il livello di attivazione corticale (Steriade and McCarley 2005).

I neuroni reticolari proiettano al prosencefalo tramite 2 vie principali, una dorsale ed una ventrale (Steriade and McCarley 2005). La via dorsale parte dalla formazione reticolare ed ha la sua prima tappa a livello talamico; qui gli assoni prendono contatto con una popolazione

neurone che proietta in vaste aree della corteccia; questi neuroni talamici mostrano un'elevata attivazione asincrona durante la veglia e contribuiscono quindi alla formazione dell'attività corticale tipica della veglia (Fujiyama, Furuta et al. 2001; Manns, Mainville et al. 2001).

La via ventrale proietta invece all'ipotalamo posteriore e, da qui, ancora alla corteccia. A livello ipotalamico questa via gioca anche un ruolo nei segni tipici dell'attivazione simpatica. Lesioni a questo livello, come nel caso del mesencefalo, esitano in coma, mentre la stimolazione di questa regione stimola la veglia e l'attivazione simpatica.

Entrambe queste due vie maggiori sono costituite dagli assoni di neuroni glutammatergici, che sono la popolazione eccitatoria numericamente principale sia tra i neuroni talamici che tra quelli ipotalamici che tra quelli reticolari (Jones 1995).

Noradrenalina

La noradrenalina (NA) è contenuta nei neuroni del Locus Coeruleus(LC), situato a livello del tronco encefalico. Questo nucleo riceve numerose afferenze dal midollo spinale, dal nucleo del fastigio del cervelletto, da aree ipotalamiche, preottiche, dall'amigdala e da numerosi altri nuclei tronco-encefalici. A sua volta il LC invia afferenze a numerose aree sia del tronco encefalico che del prosencefalo che del midollo spinale. (Jones 1995)

L'attività dei neuroni del LC è massima durante la veglia mentre si riduce grandemente nei periodi di sonno NREM e scompare nei periodi REM(McCarley and Hobson 1975; Aston-Jones and Bloom 1981). Gli assoni dei neuroni noradrenergici sono dotati di varicosità in grado di rilasciare il neurotrasmettitore lungo il loro percorso, grazie a questa particolare struttura tali cellule sono particolarmente efficaci nello stimolare numerose altre cellule per volta. Questi neuroni possono svolgere un ruolo eccitatorio (nel caso in cui il target esprima in superficie recettori del tipo α_1 , associati alla chiusura di canali al K^+ e, quindi, a depolarizzazione) od un ruolo inibitorio (nel caso la cellula target esprima recettori α_2 , associati all'apertura di canali al K^+ e, quindi, ad iperpolarizzazione)(Jones 2005). In tal modo il LC è in grado di attivare popolazioni neuronali coinvolte nella promozione della veglia mentre inibisce attivamente popolazione adibite alla promozione del sonno. I neuroni adrenergici vanno anche incontro ad un meccanismo di auto-inibizione, essi infatti esprimono in membrana il recettore α_2 (Jones 2005). La stimolazione elettrica del LC stimola lo stato di veglia, tuttavia lesioni a suo carico non

esitano in una perdita od in un decremento dell'attività corticale durante la veglia, né in una diminuzione della veglia stessa. Questo lascia pensare che il LC svolga un ruolo prevalentemente facilitatorio e non indispensabile nel controllo della veglia.

Dopamina

Neuroni dopaminergici sono contenuti nel tegmento mesencefalico ventrale e nella *substantia nigra* e proiettano ai gangli della base, allo striato ed alla corteccia frontale, tramite i sistemi meso-corticale e nigro-striatale. Anche se questi nuclei sono noti principalmente per il loro ruolo a livello motorio essi sono implicati anche nella promozione della veglia (Jones 2005). Esperimenti di lesione di questi nuclei esitano in una riduzione dei tipici comportamenti associati alla veglia (allerta, generazione spontanea di movimenti). Studi recenti hanno però mostrato un ruolo più complesso per questi gruppi di neuroni.

Esperimenti in animali knock-out per il recettore D₁ della dopamina hanno mostrato una ridotta allerta, mentre la somministrazione di agonisti della dopamina esita in un'aumento della veglia ed in una riduzione del sonno ad onde lente e del sonno REM (Ongini, Caporali et al. 1985; Monti, Fernandez et al. 1990; Monti and Jantos 2008) . D'altro canto la somministrazione di antagonisti per il recettore D₁ porta ad un incremento del sonno ad onde lente e REM ed ad una riduzione della veglia (Ongini, Caporali et al. 1985; Monti, Fernandez et al. 1990; Trampus and Ongini 1990).

I recettori D₂ sembrano invece avere un meccanismo d'azione dose dipendente. La somministrazione di basse dosi di agonista comporta un incremento del sonno NREM e REM ed una riduzione della veglia. Viceversa, ad alte dosi, di ha un effetto opposto (Bagetta, De Sarro et al. 1988; Monti and Jantos 2008).

A livello clinico pazienti con morbo di Parkinson, accanto ai classici sintomi motori, mostrano difficoltà nell'iniziare un movimento e cali di allerta. Analisi elettrofisiologiche hanno poi mostrato come i neuroni dopaminergici siano molto attivi durante la veglia mentre la loro attività sia ridotta in sonno NREM. A differenza del LC questi neuroni sono attivi anche durante il sonno REM (Mirenowicz and Schultz 1996; Maloney, Mainville et al. 2002).

Il ruolo della dopamina risulta quindi abbastanza complesso e non del tutto chiaro. E' stato anche proposto che questi neuroni svolgano un ruolo nel mantenimento dell'atonia durante il sonno REM. Questo avverrebbe tramite un sistema multisinaptico che raggiunge il tronco

encefalico passando per l'area mesencefalica extraspinale ed il nucleo peduncolo pontino (Rye 2004).

Serotonina

La serotonina (5-HT) è prodotta da una popolazione abbastanza ristretta di neuroni siti nel tronco encefalico, a livello dei nuclei del Raphe (Jacobs and Azmitia 1992). Le proiezioni dei nuclei del Raphe possono essere divise in 2 grossi rami, uno che si dirige caudalmente al midollo spinale ed uno che si dirige rostralmente. Il fascio di fibre diretto al midollo spinale svolge 2 ruoli principali: 1) è coinvolto nella modulazione del dolore e 2) determina un'attivazione di fondo dei meccanismi alla base della motricità. Il fascio rostrale è diretto in numerosissimi siti posti un po' in tutto il SNC dove svolge svariati ruoli (ad esempio nella termoregolazione e nella modulazione dell'umore) (Jacobs and Fornal 1999).

Nonostante oggi la 5-HT sia ritenuta una molecola legata alla veglia essa venne proposta negli anni '50 come molecola del sonno.

Esperimenti di lesione a livello dei nuclei del Raphe ed esperimenti farmacologici con molecole in grado di ridurre la 5-HT (somministrazione sistemica di PCPA, un antagonista della triptofano-idrossilasi, un enzima fondamentale nella sintesi della serotonina) esitarono in periodi di prolungata insonnia (oltre 10 giorni) nell'animale da esperimento. Sulla scorta di tali risultati questa monoamina venne presentata come la molecola del sonno (Delorme, Froment et al. 1966; Jouvet 1967; Koella, Feldstein et al. 1968; Ursin 1972; Portas, Bjorvatn et al. 2000).

Tuttavia a partire dagli anni '70 numerosi altri esperimenti confutarono tale ipotesi. L'attività elettrica dei neuroni serotoninergici del Raphe è massima in veglia, si riduce in NREM e diviene pressoché nulla in REM (McGinty and Harper 1976; Trulson and Jacobs 1979; Cespuglio, Faradji et al. 1981). Esperimenti di voltammetria, su un metabolita della serotonina (l'acido 5-idrossi-indolacetico) (Imeri, De Simoni et al. 1994), e di microdialisi, sulla serotonina (Lydic 1987; Jacobs and Fornal 1999), hanno mostrato come il rilascio della 5-HT sia massimo in veglia e ridotto in sonno. Sulla base di questi dati, per quanto oggi si ritenga la 5-HT una molecola legata alla veglia essa è ritenuta importante anche per la promozione del sonno, si pensa infatti che afferenze dei neuroni del nucleo del Raphe all'area preottica possano andare a stimolare l'avvio di una cascata (a tutt'oggi sconosciuta) di eventi molecolari che abbia come target ultimo la promozione del sonno ad onde lente (Portas, Bjorvatn et al. 2000).

Istamina

A livello del SNC l'istamina è rilasciata da neuroni localizzati nel nucleo tubero-mamillare (Brown, Stevens et al. 2001; Saper, Chou et al. 2001). Essi, analogamente ai neuroni adrenergici, hanno alta frequenza di scarica in veglia mentre la frequenza cala in NREM e scompare in REM (Sakai 1990). Inoltre antagonisti dei recettori per l'istamina (largamente usati nel trattamento delle allergie) provocano sonnolenza (Buysse 2005). Tuttavia, lesioni del nucleo tubero-mamillare non esitano in una diminuzione del tempo complessivo trascorso in veglia, pur causando una riduzione dell'allerta ed un aumento della sonnolenza (92). Questo ha fatto pensare che queste cellule non giochino un ruolo cruciale nella normale omeostasi del sonno. I neuroni istaminergici hanno proiezioni molto vaste dirette in tutto l'encefalo.

Acetilcolina

Neuroni colinergici implicati nella regolazione del ciclo sonno/veglia sono stati trovati nel tegmento pontomesencefalico a livello del nucleo latero-dorsale (LDT) e del tegmento peduncolo-pontino (PPT) (Rye, Saper et al. 1987; Hallanger and Wainer 1988) e nel prosencefalo basale (McCarley 2007). Le proiezioni dei nuclei PPT/LDT, insieme a quelle di quelli della formazione reticolare, sono dirette al talamo dove forniscono impulsi eccitatori ai neuroni glutammatergici del sistema talamo-corticale (Herkenham 1980; Berendse and Groenewegen 1990). L'attivazione talamica promossa dai neuroni colinergici coinvolge, sulle cellule target, sia i recettori nicotinici che quelli muscarinici (Jones 2005). LDT e PPT proiettano anche all'ipotalamo posteriore (insieme ai neuroni della formazione reticolare, nella via ventrale extratalamica), inoltre prendono contatto con la stessa formazione reticolare. I neuroni colinergici di LDT e PPT scaricano rapidamente durante la veglia, riducono la loro attività in sonno NREM e la riprendono durante le fasi di sonno REM (España and Scammell 2004). Analisi dei livelli di espressione di c-Fos (in grado di stabilire il livello di attivazione delle cellule neurali) mostrano come i livelli siano alti in veglia ed in periodi di REM seguenti ad un periodo di deprivazione di sonno REM. Inoltre la somministrazione di un agonista dell'acetilcolina (quale il carbacolo) porta ad un aumento di attività corticale ed inibizione motoria, caratteristiche, queste, tipiche del sonno REM (Jones 2004). Ulteriori analisi hanno mostrato come in questi nuclei vi siano 2 diverse popolazioni

cellulari, una di neuroni rem-on, attivi nei periodi di sonno REM e silenti in veglia ed un'altra di cellule wake-rem-on, attive sia in veglia che in sonno REM. Questi dati mostrano come l'attività colinergica sia associata ad un'aumentata attività cerebrale, che è una caratteristica tipica della veglia, ma non, in sé e per sé, alla veglia in tutti i suoi aspetti (attività corticale ed attivazione motoria), essi svolgono infatti un ruolo fondamentale nella genesi del sonno REM, come verrà illustrato più avanti.

Il prosencefalo basale contiene vari nuclei colinergici attivi nei processi di stimolazione dell'attività corticale, sia in veglia che in sonno REM (McCarley 2007). La stimolazione elettrica di neuroni del nucleo basale magno cellulare porta al rilascio di acetilcolina a livello corticale (Rasmusson, Clow et al. 1992), processo coinvolto nell'attivazione della corteccia stessa. Lesioni della substantia innominata esitano in un ridotto rilascio di acetilcolina a livello corticale, cui segue un aumento dell'attività sincrona sia in veglia (Buzsaki, Bickford et al. 1988) che in sonno REM (Szymusiak 1995).

Questi nuclei sono ritenuti importanti nella regolazione del sistema limbico e nell'attivazione corticale (Szymusiak 1995).

Orexina

L'orexina (orx) è un peptide di piccole dimensioni presente nell'ipotalamo posteriore, un'area del cervello riconosciuta come importante nel controllo della veglia già da molti anni (Von Economo 1930). La scoperta di questo sistema è, però, molto recente. Nel 1998 due distinti gruppi descrissero questo peptide, uno di essi lo associò ai meccanismi di regolazione dell'appetito (Sakurai, Amemiya et al. 1998) mentre l'altro lo associò alla sua attività neuroeccitatoria (de Lecea, Kilduff et al. 1998). I neuroni orexinergici ricevono afferenze provenienti da diversi nuclei della formazione reticolare, tra cui il Locus Coeruleus, e vengono eccitati dal rilascio di noradrenalina (93). Studi elettrofisiologici hanno mostrato che questi neuroni sono attivi durante il periodo di veglia, riducono l'attività in NREM e si spengono completamente in REM (Lee, Hassani et al. 2005). Grazie alle sue diffuse proiezioni alla corteccia cerebrale, al talamo, ed ai numerosi nuclei attivi in veglia del tronco encefalico, i neuroni orexinergici sono ritenuti coinvolti nella promozione e nel mantenimento della veglia (Jones and Muhlethaler 2005). A conferma di ciò vi sono numerose altre evidenze: è stata descritta, tramite l'analisi di cFOS, l'attivazione di questi neuroni in veglia (Estabrooke, McCarthy et al. 2001),

l'analisi della concentrazione extracellulare di orexin ha mostrato un suo più elevato livello sempre in condizioni di veglia (Yoshida, Fujiki et al. 2001), infine registrazioni elettrofisiologiche hanno permesso di identificare numerosi neuroni attivi in veglia (Alam, Gong et al. 2002). Dall'altro lato questa popolazione neuronale non effettua alcun tipo di inibizione sui neuroni della regione preottica, coinvolti nella promozione del sonno (Jones and Muhlethaler 2005). Lo studio del sistema orexinergico ha tratto molti vantaggi dall'analisi di soggetti (e modelli animali) narcolettici. In essi l'orexina è assente a causa di lesioni a livello dell'ipotalamo posteriore e da questo consegue un'instabilità del sistema sonno/veglia e frequenti passaggi dalla veglia al sonno REM, con associati fenomeni cataplettici.

Circuiti del sonno

Come detto precedentemente, già studi in pazienti ed esperimenti di lesione risalenti alla prima metà del secolo scorso, avevano dimostrato l'importanza dell'ipotalamo anteriore e del prosencefalo basale nei meccanismi di promozione del sonno.

I circuiti coinvolti nella promozione e nel mantenimento del sonno sono, sostanzialmente, quelli gabaergici.

Neuroni che rilasciano GABA sono interspersi in tutti i nuclei attivi nella veglia e, a questo livello, hanno un'azione inibitoria sui neuroni delle altre classi (colinergici, noradrenergici eccetera) contribuendo quindi alla regolazione dei nuclei stessi (McGinty and Szymusiak 2000).

Altri gruppi di neuroni GABAergici sono invece organizzati in nuclei. In particolare, in anni relativamente recenti è stato evidenziato il ruolo della regione preottica-ventrolaterale (VLPO) (McGinty and Szymusiak 2000; Saper, Chou et al. 2001). Questa regione presenta (all'analisi con c-fos) un livello di attivazione più elevato in sonno NREM che in veglia (Sherin, Shiromani et al. 1996). Studi elettrofisiologici hanno inoltre mostrato come questi neuroni abbiano alta frequenza di scarica durante il sonno e, in particolare, aumentino la loro attività con l'approfondirsi del sonno stesso (Szymusiak, Alam et al. 1998). Inoltre esperimenti di lesione del VLPO hanno mostrato come i danni a questa regione causino una riduzione dell'ammontare di sonno (Lu, Greco et al. 2000). Altri studi hanno mostrato come le proiezioni che partono da questo nucleo siano dirette a tutti i nuclei che promuovono la veglia e come la loro azione su questi ultimi sia di tipo inibitorio (Saper, Chou et al. 2001).

Ulteriori analisi hanno poi permesso di disegnare lo schema dei circuiti che coinvolgono il VLPO. I neuroni GABAergici qui presenti inviano afferenze ai neuroni adrenergici del Locus Coeruleus,

ai neuroni serotoninergici del Raphe ed ai neuroni colinergici di LDT e PPT; a questi livelli essi svolgono un'azione inibitoria, andando, perciò, a spegnere i circuiti che promuovono la veglia ed inducendo, di conseguenza, il sonno. A loro volta i neuroni colinergici, adrenergici e serotoninergici inviano afferenze al VLPO dove prendono contatto con una sotto-popolazione GABAergica che ha, a sua volta, un'azione inibitoria sulla popolazione GABAergica principale del VLPO (quella, cioè, che va ad inibire i circuiti della veglia). In tal modo si instaura un controllo reciproco dei sistemi di promozione della veglia e del sonno che permette una certa stabilità del sistema. Durante la veglia, infatti, i nuclei che promuovono questo stato inibiscono l'attivazione del VLPO e quindi la loro stessa inattivazione.

Adenosina.

Proprio per la stabilità dei meccanismi della veglia elencati nel precedente paragrafo risulta fondamentale la comprensione del sistema che permette il passaggio dalla fase di veglia a quella di sonno. Numerosi indizi lasciano pensare che l'adenosina giochi un ruolo cruciale nella fase di addormentamento. Antagonisti dei recettori per l'adenosina, come la caffeina, promuovono la veglia (Fredholm, Battig et al. 1999). Il nucleoside ha inoltre un effetto iperpolarizzante sul potenziale di membrana di numerose cellule eccitabili, dal muscolo liscio ai neuroni (McCarley 2007). Esperimenti di microiniezione di adenosina nel gatto (Feldberg 1958) e nel cane (Haulica, Ababei et al. 1973) hanno mostrato un'attività ipnogenica di questa molecola.

Sulla base di questi e numerosi altri lavori è stato proposto che l'accumulo di questa molecola descritto a livello del prosencefalo basale (Rainnie, Grunze et al. 1994) e del nucleo tegmentale latero-dorsale (LDT) (Arrigoni, Chamberlin et al. 2003) abbia un effetto di tipo inibitorio su diverse popolazioni neuronali attive in veglia.

L'effetto principale sarebbe di tipo post-sinaptico, iperpolarizzando neuroni attivi in veglia ed impedendo loro il rilascio di neurotrasmettitori necessari a mantenere l'attivazione corticale e periferica (Basheer, Strecker et al. 2004). A livello dell'LDT è stato descritto anche un effetto presinaptico (Arrigoni, Rainnie et al. 2001).

In tal modo l'adenosina promuoverebbe il passaggio dalla veglia al sonno NREM per inibizione dei centri di promozione della veglia (Basheer, Strecker et al. 2004).

Sonno REM.

Numerose evidenze sperimentali indicano un importante ruolo dei nuclei colinergici LDT e PPT nella generazione del sonno REM. Questi nuclei proiettano al talamo ed alla formazione reticolare pontina, a questo livello prendono contatto con vari gruppi di neuroni glutammatergici, questi da un lato proiettano a loro volta al LDT/PPT dove svolgono un'azione eccitatoria sui neuroni colinergici, rinforzando così il circuito. Dall'altro lato i neuroni glutammatergici sono responsabili della generazione dei fenomeni tipici del sonno REM (dalle onde PGO ai movimenti oculari rapidi).

Come è stato detto in precedenza i neuroni colinergici di questi nuclei possono essere suddivisi in 2 diverse sottopopolazioni: cellule REM-on e cellule wake-REM-on; le prime proiettano principalmente lungo la via diretta alla formazione reticolare, le seconde al talamo (McCarley 2007). I neuroni glutammatergici talamici presentano 2 comportamenti completamente diversi a seconda che vi sia, o meno, il rilascio di acetilcolina (ACh). In veglia ed in sonno REM le cellule wake-REM-on dell'LDT/PPT scaricano frequentemente depolarizzando i neuroni talamici, in tal modo questi ultimi si mantengono intorno alla soglia di attivazione e, quando ricevono impulsi da fibre afferenti che li contattano scaricano; in tal modo le informazioni possono raggiungere la corteccia. Viceversa in sonno NREM il rilascio di ACh è grandemente ridotto quindi i neuroni talamici, non più stimolati, si trovano lontani dal loro potenziale di "soglia". A potenziali iperpolarizzanti in queste cellule si assiste all'apertura di canali al calcio voltaggio dipendenti, questi causano una lenta depolarizzazione che porta le cellule al potenziale di attivazione dei canali al Na⁺, a questo punto si ha la scarica di una serie di potenziali, a formare un burst. La depolarizzazione raggiunta permette la chiusura dei canali al Ca⁺⁺ e l'apertura di canali al K⁺causando la conseguente ripolarizzazione ed il riprendere del ciclo (Rechtschaffen and Siegel 2000). Questa modalità di attivazione dei neuroni talamici blocca il passaggio di informazione dalle vie afferenti alla corteccia in quanto i potenziali eccitatori periferici non sono sufficientemente potenti da causare la scarica dei neuroni talamici. Questa modalità di funzionamento ciclica è anche ritenuta uno dei meccanismi che genera la sincronizzazione EEG rilevabile nel sonno NREM.

I neuroni REM-on, viceversa, proiettano alla formazione reticolare pontina. Questi neuroni sono coinvolti nella regolazione dell'alternanza tra fasi NREM e REM. Secondo il modello proposto da Hobson e McCarley (e successive precisazioni) in veglia si ha l'attivazione dei numerosi nuclei visti precedentemente (LC, Raphe) che proiettano collaterali al LDT/PPT dove svolgono

un'azione inibitoria, questi neuroni hanno però un feedback negativo su essi stessi e perciò, col tempo, riducono la loro attività. La ridotta attivazione dei neuroni REM-off libera i neuroni REM-on dall'inibizione permettendo l'inizio della fase di sonno REM (McCarley 2007).

I neuroni REM-on inviano a loro volta collaterali eccitatori ai neuroni REM-off, quando questi ultimi raggiungono la soglia di attivazione si ha il termine dell'episodio REM per inibizione dell'LDT/PPT.

La proteina prionica

Proteina prionica: struttura e localizzazione

La proteina prionica (PrP) è una glicoproteina localizzata principalmente sulla membrana di neuroni (Manson et al.; Moser et al.) ma trovata anche nelle cellule astrocitarie (Bendheim, Brown et al. 1992; Ford, Burton et al. 2002) ed in numerose popolazioni cellulari differenti presenti in svariati organi e tessuti. Tra questi il tessuto linfonodale, il cuore, il rene ed il polmone (Horiuchi, Yamazaki et al. 1995). Nell'uomo questa proteina è codificata dal gene PRNP localizzato sul braccio corto del cromosoma 20 (20pter-p12) e costituito da 2 esoni di cui solo uno codificante (Puckett, Concannon et al. 1991). La proteina neo-sintetizzata è costituita da 253 aminoacidi e contiene una sequenza di 22 amminoacidi di indirizzamento per il reticolo endoplasmatico rugoso (Kretzschmar and Parchi 2007). In questo compartimento subcellulare la proteina prionica subisce sia l'aggiunta di catene di oligosaccaridi che altre modificazioni strutturali (Prusiner 1991).

Dopo le trasformazioni che subisce nel reticolo, la PrP transita per l'apparato del Golgi, dove subisce modificazioni a livello di alcuni oligosaccaridi e l'aggiunta di acido sialico (Bolton, Meyer et al. 1985; Endo, Groth et al. 1989). Attraverso la via delle vescicole di secrezione, la PrP viene infine trasportata alla membrana plasmatica (Prusiner 1991).

La proteina, una volta in membrana, è ancorata tramite un'ancora a GPI (glicosil-fosfatidil-inositolo) ed espone, sul versante extracellulare, una struttura globulare, costituita da 3 eliche e 2 foglietti-beta. All'interno di questa struttura sono contenuti: un sito di legame per il rame, 2 siti di glicosilazione (a livello dei residui 181 e 197) ed un ponte disolfuro tra la seconda e la terza elica (Prusiner 2004).

A livello cellulare la localizzazione della PrP è principalmente a livello della membrana plasmatica, in particolare nei cosiddetti micro domini a zattera, cioè zone della membrana dalla funzione specializzata. Tuttavia la proteina può andare rapidamente incontro ad un processo di endocitosi in seguito ad esposizione a rame (Harris 2004).

Sebbene la forma ancorata alla membrana sia la più comune, sono state descritte anche varianti che attraversano completamente la membrana (forme trans-membrana) ed altre non ancorate (forme citoplasmatiche) (Hegde, Mastrianni et al. 1998; Ma, Wollmann et al. 2002).

Proteina prionica: funzioni fisiologiche

Il compito della PrP non è ancora chiaro, anche se alcune evidenze mostrano un suo ruolo nella differenziazione cellulare e nel mantenimento della funzione neurale (Clinton, Forsyth et al. 1993; Landolt, Glatzel et al. 2006).

Lo studio della funzione della PrP è stato condotto principalmente tramite l'uso di animali Knock-Out (KO, incapaci di esprimere la proteina), prodotti mediante la tecnica della ricombinazione omologa (Bueler, Aguzzi et al. 1993; Manson, Clarke et al. 1994). Le analisi di questi animali non hanno mostrato né una riduzione nella lunghezza della vita né evidenti anomalie comportamentali.

In seguito a studi elettrofisiologici sulla funzionalità dell'ippocampo, Collinge descrisse una ridotta inibizione-rapida del recettore GABA_A nell'ippocampo ed una inibizione del meccanismo di potenziamento a lungo termine dell'attività sinaptica. Su queste basi è stato proposto che la PrP svolga un ruolo necessario per la corretta funzionalità sinaptica (Collinge, Whittington et al. 1994). Numerosi altri lavori di elettrofisiologia sono stati svolti su animali KO; alcuni hanno confermato le scoperte di Collinge (Manson, Hope et al. 1995) mentre altri le hanno contraddette (Lledo, Tremblay et al. 1996). Ad oggi non esiste una risposta definitiva su questo punto.

Oltre ai lavori sopra citati vi sono, però, altre evidenze di un'attività a livello sinaptico della proteina prionica. In particolare è stato dimostrato come topi KO per la PrP siano estremamente più suscettibili ad episodi epilettici indotti da farmaci (Walz, Amaral et al. 1999). Ancora, in studi di elettrofisiologia animali che sovra-esprimono la variante normale della proteina prionica hanno mostrato un potenziamento dell'attività glutammatergica a livello ippocampale (Carleton, Tremblay et al. 2001). Questo effetto, che ben si accorda con le descrizioni di Collinge, è stato spiegato con un aumento nel reclutamento di fibre presinaptiche a livello delle giunzioni (Carleton, Tremblay et al. 2001).

Inoltre, la capacità della proteina prionica di legare numerose altre molecole di membrana o della matrice extra-cellulare, è stata indicata per proporre un suo ruolo a livello dell'adesione inter-cellulare o dello sviluppo assonale (Caughey and Baron 2006). A conferma di ciò è stata descritta un'aumentata crescita dendritica ed assonale in neuroni ippocampali incubati con PrP ricombinante (Kanaani, Prusiner et al. 2005).

In conclusione, quindi, la proteina prionica potrebbe svolgere numerosi compiti nel sistema nervoso centrale, sia a livello elettrofisiologico (trasmissione sinaptica) che a livello strutturale (crescita dendritica ed assonale e promozione della formazione di nuove sinapsi).

Molte sono anche le funzioni proposte per la PrP al di fuori del sistema nervoso centrale.

Studi hanno evidenziato il ruolo di questa proteina nei processi di rimodellamento tissutale, oltre che durante lo sviluppo anche a seguito di infezioni (de Almeida, Chiarini et al. 2005). Vi sono, infatti, dati che mostrano come la PrP moduli negativamente l'attività fagocitaria dei macrofagi.

Ulteriori analisi condotte in topi KO per la PrP hanno evidenziato alterazioni a livello dell'apprendimento spaziale (Criado, Sanchez-Alavez et al. 2005), del danno ossidativo (Shyu, Lin et al. 2005), della differenziazione delle cellule staminali neuronali (Steele, Emsley et al. 2006).

Tutte le alterazioni descritte, tuttavia, causano alterazioni lievi e non portano a gravi danni a livello neurologico.

È nota da tempo la presenza di importanti alterazioni del sonno in pazienti affetti da varie malattie causate da mutazioni della proteina prionica, dall'insonnia fatale familiare al morbo di Creutzfeldt-Jakob. Per questi motivi, quando furono disponibili modelli murini KO per la PrP essi vennero immediatamente analizzati anche da un punto di vista polisonnografico.

Cronologicamente, infatti, le alterazioni a livello dei meccanismi di regolazione del sonno furono la prima caratteristica descritta nei modelli murini KO per la PrP (Tobler, Gaus et al. 1996) (Steele, Lindquist et al. 2007). Gli studi condotti hanno mostrato un allungamento del periodo circadiano nei topi KO rispetto a topi wild type in condizioni di oscurità costante, che, a causa dell'assenza del segnatempo (o *zeitgeber*) legato all'alternarsi di luce e buio, rende gli animali *free running*. In queste condizioni, mentre nei topi wild type la giornata soggettiva risulta di circa 23.3 ore nei topi KO essa si mantiene costante, intorno alle 24 ore. Tali differenze, tuttavia, non emergono nelle normali condizioni di alternanza di luce e buio (Tobler, Gaus et al. 1996).

Ulteriori studi hanno mostrato alterazioni anche a livello della frammentazione del sonno. Animali KO per la PrP presentano un numero significativamente maggiore di brevi risvegli (episodi di veglia che non durano, al massimo, oltre 16 secondi) durante gli episodi di sonno NREM rispetto agli animali wild type. Tale differenza si mantiene sia nella fase di luce che nella fase di buio (Tobler, Deboer et al. 1997). Sono state descritte leggere differenze anche nella comparazione degli spettri di potenza tra animali wild type ed animali che non esprimono la proteina prionica. In particolare i topi KO hanno mostrato un più rapido incremento dell'attività

ad onde lente durante il primo minuto di sonno NREM a partire dall'addormentamento (Tobler, Deboer et al. 1997).

La mancanza di un fenotipo particolarmente evidente in animali KO per la PrP, accompagnata alle numerosi alterazioni descritte fa sì che le funzioni della proteina prionica siano, a tutt'oggi, ancora ampiamente dibattute.

Malattie prioniche.

Le malattie da prioni, conosciute anche come encefalopatie spongiformi od encefalopatie trasmissibili, sono quell'insieme di patologie causate dalle alterazioni della proteina prionica.

Queste patologie sono presenti non solo nell'uomo (in cui sono malattie rare) ma anche in altri animali, quali le pecore (Scrapie) od i bovini (encefalopatia spongiforme bovina, BSE od, in inglese, bovine spongiform encephalopathy). Esse si presentano sottoforma di malattie neurodegenerative trasmissibili, sia all'interno della stessa specie che fra specie diverse (Gibbs, Harrison et al. 1966; Gibbs, Gajdusek et al. 1968; Gajdusek 1977; Masters, Gajdusek et al. 1981). Fino al 1982 la causa di malattie come il morbo di Creutzfeldt-Jakob (CJD), l'insonnia fatale familiare (FFI) o la sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) era ignota. In quell'anno S. Prusiner propose che la causa fosse una forma mutata della proteina prionica (Prusiner, Bolton et al. 1982). Questa teoria risultava, per certi versi, rivoluzionaria. Per la prima volta si proponeva che una malattia infettiva si propagasse senza basarsi su del materiale genetico. La proposta di Prusiner ricevette moltissime critiche ma, col tempo, anche diverse conferme (Bolton, McKinley et al. 1982; Diener, McKinley et al. 1982; Prusiner 1982; McKinley, Masiarz et al. 1983; Oesch, Westaway et al. 1985; Basler, Oesch et al. 1986; Bellinger-Kawahara, Cleaver et al. 1987; Gabizon, McKinley et al. 1988).

Attualmente i meccanismi patogenetici delle malattie da prioni non sono noti nella loro interezza; vi sono, tuttavia, alcune interessanti teorie. Accanto alla normale proteina prionica (detta PrP^C) i soggetti malati presentano un'altra forma, detta PrP^{SC}. Esperimenti hanno mostrato come la conversione da PrP^C a PrP^{SC} sia un evento post-traduzionale (Borchelt, Scott et al. 1990). Entrambe le forme raggiungono l'apparato di Golgi; da qui la forma normale prosegue il cammino tramite le vescicole di secrezione fino alla membrana esterna, alla quale resta ancorata (Stahl, Borchelt et al. 1987; Safar, Ceroni et al. 1990; Stahl, Baldwin et al. 1990; Stahl, Borchelt et al. 1990). La forma mutata, invece, si accumula in vescicole all'interno della cellula

(Butler, Scott et al. 1988; Taraboulos, Serban et al. 1990). A causa della componente idrofobica della PrP è possibile l'unione di numerose proteine in aggregati insolubili (Prusiner, Groth et al. 1980; Gabizon, McKinley et al. 1987).

Come accennato all'inizio del paragrafo malattie da prioni sono presenti in varie specie di mammiferi, oltre all'uomo. Lo Scrapie è la più diffusa encefalopatia spongiforme nei mammiferi (Prusiner 1995). Questa malattia, che colpisce le pecore e le capre, era conosciuta almeno già nel XVIII secolo. Come per molte malattie da prioni i segni tipici della malattia sono disordini motori. In particolare si ha la totale perdita di coordinazione motoria degli animali che, col passare del tempo, non sono più in grado di reggersi in piedi. In alcuni casi si ha la comparsa di irritazioni della pelle, che portano gli animali a strapparsi il pelo per trovare sollievo (Prusiner 1995). Proprio da quest'ultima caratteristica deriva il nome Scrapie. Negli anni '30 del novecento, esperimenti condotti sulle capre mostrarono la trasmissibilità di questa malattia all'interno della stessa specie, mentre risale agli inizi degli anni '60 la prima trasmissione interspecie controllata, al topo (Ironsides and Head 2008).

Varie forme di malattie da prioni colpiscono numerose specie differenti: cervi, alci, visoni e numerosi specie di felini. Negli anni '90 ha ricevuto particolare attenzione la forma bovina delle malattie prioniche, detta BSE (encefalopatia spongiforme bovina). In particolare nel Regno Unito si verificarono centinaia di migliaia di casi di questa malattia, con gravi danni economici. Questa patologia si trasmette anche per via orale e la pratica di nutrire animali con derivati di animali deceduti sembrerebbe essere stata la causa dell'epidemia degli anni '90 (Smith and Bradley 2003).

Dalla seconda metà degli anni '90 numerose prove indicarono la capacità della BSE di trasmettersi, sempre per via orale, anche a specie diverse. Di particolare importanza la sua trasmissione all'uomo. Risale al 1996 la prima descrizione di una nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob, detta vCJD (Ironsides and Head 2008). L'anno seguente venne provato che a causare la vCJD è lo stesso agente che è causa della BSE.

Nell'uomo le malattie prioniche si presentano distinte in 3 principali famiglie: la malattia di Creutzfeldt-Jakob, la sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker e l'insonnia fatale familiare. A queste si possono aggiungere altre 2 forme: il Kuru, che è ritenuta una variante infettiva di una forma sporadica di morbo di Creutzfeldt-Jakob dovuta alla pratica del cannibalismo (Ironsides and Head 2008), e l'angiopatia amiloide della proteina prionica cerebrale, una malattia prionica

causata dalla presenza di una forma tronca della PrP dovuta alla comparsa di un codone di stop a livello dell'amminoacido 145 (Ghetti, Piccardo et al. 1996).

L'insonnia fatale familiare (FFI) è una malattia prionica a base genetica, essa è causata da una mutazione sul gene della PrP (D178N) accompagnata dalla presenza dell'amminoacido metionina nel sito polimorfico 129. È di particolare interesse sottolinearne la base genetica in quanto la stessa mutazione, accompagnata da un diverso amminoacido (la valina) nel sito polimorfico 129, è la causa dell'omologo umano della mutazione oggetto di questo lavoro e che è causa di una variante di morbo di Creutzfeldt-Jakob.

Segni clinici di questa malattia sono principalmente i disturbi del sonno dai quali prende anche il nome. In particolare la malattia si manifesta inizialmente con una riduzione del tempo trascorso in sonno, che viene normalmente evidenziata a causa della comparsa di sonnolenza diurna (Montagna, Gambetti et al. 2003). Con l'aggravarsi della malattia il tempo trascorso in sonno si riduce sempre più e fanno la loro comparsa i cosiddetti comportamenti onirici, uno stato allucinatorio nel quale è assente l'atonia (Montagna, Gambetti et al. 2003).

L'analisi dei tracciati elettroencefalografici mostra una precoce e progressiva riduzione nel numero dei complessi K e dei fusi del sonno (Tinuper, Montagna et al. 1989). Con il progredire della malattia si verifica una ulteriore diminuzione del tempo trascorso in sonno e la concomitante riduzione della componente ad onde lente. I pazienti passano parte del tempo in uno stadio in bilico tra veglia e sonno NREM che viene interrotto da episodi di sonno REM che si possono presentare anche senza atonia (Montagna, Gambetti et al. 2003).

Un altro importante aspetto di questa malattia è rappresentato dai disturbi vegetativi. In particolare si assiste ad un'iper-attivazione del sistema simpatico che si manifesta sottoforma di tachicardia e tachipnea associate ad ipertensione; a queste si aggiungono un aumento della sudorazione e la presenza di episodi febbrili inspiegati (Montagna 2005).

Oltre ai disturbi del sonno ed a quelli vegetativi, i pazienti manifestano anche difficoltà motorie ed autonome, generalmente senza la comparsa di demenza (Ironsides and Head 2008).

Con il progredire della malattia i sintomi continuano ad aggravarsi fino al sopraggiungere del decesso che avviene nella totalità dei casi, anche se la durata del decorso è molto variabile. Nei casi più gravi, nei quali il decesso dei pazienti giunge a meno di un anno dalla diagnosi, i sintomi si aggravano molto rapidamente, viceversa nei casi meno gravi (tra 12 e 72 mesi il decorso) il progredire della malattia è più rallentato (Montagna, Cortelli et al. 1998).

Dal punto di vista patologico la malattia si caratterizza per un vasto danneggiamento dei aree talamiche con perdita neuronale e gliosi (Parchi, Petersen et al. 1998).

La sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) è un rara malattia da prioni (5 casi per 100 milioni di individui (Ghetti, Tagliavini et al. 2003)) che si presenta con disturbi motori e cognitivi. La trasmissione è per via ereditaria e sono state descritte numerose mutazioni del gene PRNP associate a questa malattia (Ironsides and Head 2008). A livello patologico si osserva atrofia cerebellare accompagnata da depositi amiloidi principalmente nel cervelletto, nel talamo, nella corteccia e nei gangli della base (Kovacs, Trabattoni et al. 2002). L'analisi dei depositi amiloidi ha dimostrato l'alta concentrazione di proteina prionica al loro interno (Ghetti, Tagliavini et al. 2003).

Morbo di Creutzfeldt-Jakob

Il morbo di Creutzfeldt-Jakob (CJD) è la più diffusa malattia da prioni nell'uomo. Nonostante questo essa resta una malattia rara, con una prevalenza di circa 1 caso per milione di individui (Tyler 2003). La patologia si può presentare in 3 diverse forme: forma sporadica, familiare ed infettiva/iatrogena.

La forma sporadica è la più diffusa e risponde per circa l'85% dei casi di CJD (Pedersen and Smith 2002). Essa colpisce uomini e donne in eguale misura. Le cause che portano allo sviluppo di questa malattia sono a tutt'oggi ignote, è stata però descritta l'elevata diffusione della presenza in omozigosi dell'amminoacido metionina in posizione 129 della PrP. L'85% dei soggetti affetti da CJD nella popolazione europea presenta questa caratteristica genetica contro il 50% della popolazione di controllo (Pedersen and Smith 2002). La CJD sporadica si manifesta, generalmente, in soggetti di età compresa tra i 50 ed i 75 anni. Questa forma si presenta tipicamente con una demenza che progredisce rapidamente ed alla quale si associano, successivamente, disordini motori, in particolare atassia e miocloni (Brown, Cathala et al. 1986; Weber 2000; Collinge 2001). L'evoluzione della malattia è molto rapida e conduce a morte, nel giro di un anno, nel 100% dei casi (Johnson and Gibbs 1998).

La forma familiare rappresenta il 10% dei casi di CJD (Pedersen and Smith 2002) e sono state descritte oltre 30 mutazioni sul gene della proteina prionica riconducibili alle forme ereditarie (Prusiner and Scott 1997; Kovacs, Zerbi et al. 2002). Tutte queste mutazioni si trasmettono in forma autosomica dominante (Gambetti, Kong et al. 2003; Ghetti, Tagliavini et al. 2003).

Secondo alcuni lavori la penetranza è variabile a seconda della mutazione coinvolta e varia tra 0,5 ed 1 (Pedersen and Smith 2002). Secondo altri la penetranza è del 100% in tutti i casi e ciò che cambia è solo l'età alla quale la malattia si manifesta (Brown 2002).

In generale le varianti familiari hanno un esordio più precoce rispetto alle forme sporadiche; a questo si associa, però, un decorso più lento.

La forma iatrogena/infettiva è la meno comune ed era, generalmente, associata a trapianti di cornea o di dura madre od alla somministrazione di ormone della crescita umano, in caso in cui questi prodotti fossero prelevati da soggetti malati (Brown 2000; Will 2003).

Negli anni '90 dello scorso secolo è stata descritta una nuova forma di CJD, detta variante. Tale forma risulta essere legata all'epidemia di encefalopatia spongiforme bovina e, in particolare, essa sarebbe dovuta all'ingestione di tessuto di animali contaminati, con conseguente trasmissione all'uomo dopo un salto interspecie (Collinge 1999).

Come già accennato i sintomi della CJD sono, principalmente, di tipo motorio e cognitivo. La demenza, che inizia a manifestarsi fin dalle prime fasi, può presentarsi in varie forme e può comprendere: perdita di memoria, allucinazioni visive ed un'elevata instabilità dell'umore.

Questi disturbi cognitivi sono generalmente molto aspecifici e difficilmente vengono ricondotti alla CJD. Successivamente compaiono i disturbi motori, che sono presenti nella quasi totalità dei pazienti, sia sottoforma di mioclonie che di atassia (Brown, Cathala et al. 1986; Weber 2000; Collinge 2001). L'insieme di tutti questi sintomi era ritenuto da Fisher (1960), sufficiente ad effettuare una diagnosi di CJD (Tyler 2003). Tuttavia, a quell'epoca, la conferma definitiva poteva avvenire solo mediante l'analisi istologica post-mortem. Pazienti affetti da CJD presentano, infatti, una marcata degenerazione spongiforme associata a gliosi e perdita neuronale, quest'ultima concentrata principalmente a livello della corteccia cerebrale e di quella cerebellare (Tyler 2003). I danni cerebrali possono essere molto variabili da paziente a paziente (Ironsides and Head 2008).

Negli anni successivi sono state individuate nuove caratteristiche di questa patologia che si sono rivelate utili nel formulare la diagnosi. In particolare, a livello dell'EEG si ha la comparsa di alterazioni tipiche e caratteristiche della CJD, la principale delle quali è rappresentata dai complessi polifasici periodici (PSWC, dall'inglese periodic sharp wave complexes)(Jones and Nevin 1954; Furlan, Henry et al. 1981; Levy, Chiappa et al. 1986; Steinhoff, Racker et al. 1996). Morfologicamente questi complessi tendono a presentarsi sottoforma di complessi ad alto voltaggio bi- o tri-fasici, anche se possono assumere caratteristiche più variegate. La durata

tipica varia tra i 100 ed i 600 ms ed essi si ripetono ogni 1-2 secondi circa (Gloor 1980). Sebbene siano stati descritti casi di lateralizzazione, i PSWC tendono a manifestarsi bilateralmente (Wieser, Schindler et al. 2006).

Oltre ai PSWC altre alterazioni EEG fanno la loro comparsa nei pazienti CJD. In particolare si assiste ad un generale “rallentamento” del tracciato elettroencefalografico, con l’aumento delle frequenze lente in maniera indipendente dallo stato comportamentale nel quale si trova il soggetto, o la comparsa di complessi di onde delta (FIRDA dall’inglese frontal intermittent rhythmical delta activity)(Hansen, Zschocke et al. 1998; Wieser, Schwarz et al. 2004).

La presenza di queste alterazioni progredisce insieme al progredire della malattia, fino a rendere il tracciato EEG dei pazienti negli stati più avanzati completamente amorfo (Wieser, Schwarz et al. 2004).

Tra le alterazioni comportamentali descritte più di recente in casi di CJD ve ne sono anche riguardanti il sonno. Uno studio pubblicato pochi anni fa ed effettuato su oltre 150 casi sporadici di CJD, ha evidenziato disturbi del sonno in circa la metà dei pazienti analizzati (Meissner, Kortner et al. 2004). Molti altri studi, incentrati sull’analisi elettroencefalografica del sonno in pazienti affetti da CJD, hanno mostrato la presenza di generiche alterazioni del normale ciclo sonno veglia (Calleja, Carpizo et al. 1985).

In dettaglio è stato inoltre descritto in letteratura che pazienti affetti da questa malattia mostrano una riduzione molto marcata di molti dei segni elettroencefalografici tipici di alcune fasi del sonno, quali i fusi ed il complesso K(Donnet, Farnarier et al. 1992).

A questo si aggiunge un’importante riduzione dell’efficienza del sonno ed una quasi totale scomparsa della fase REM (Landolt, Glatzel et al. 2006) e delle fasi più profonde del sonno NREM (Petit, Gagnon et al. 2004).

L’aumento delle frequenze più lente a livello EEG (Wieser, Schindler et al. 2006) rende, come detto, difficile effettuare una corretta analisi quantitativa del sonno nei pazienti che hanno raggiunto gli stadi più avanzati della malattia.

Scopo del lavoro

Questo lavoro si è proposto, nel suo complesso, 3 differenti scopi.

- La messa a punto e la caratterizzazione di un nuovo modello murino di morbo di Creutzfeldt-Jakob.
- Lo studio del decorso temporale della malattia a livello del modello stesso.

- L'analisi delle risposte del modello a condizioni di stress comportamentali (deprivazione di sonno).

In primo luogo un modello transgenico murino di variante familiare di malattia di Creutzfeldt-Jakob è stato creato nel laboratorio di Roberto Chiesa presso l'Istituto Mario Negri di Milano. Esso consiste di animali eterozigoti che presentano, a livello del gene PRNP codificante per la proteina prionica, una sostituzione aminoacidica da aspartato ad asparagina a livello del codone 177, associata alla presenza di valina sul codone polimorfico 128 (D177N/V128). Tali animali esprimono l'omologo murino di una forma mutata della proteina prionica che è stata descritta nel dettaglio in letteratura (Apetri, Vanik et al. 2005; Zarranz, Digon et al. 2005).

Questi topi transgenici per PrP mutata potrebbero rappresentare un utile mezzo per studiare più dettagliatamente i meccanismi patogenetici implicati nello sviluppo di questa malattia ed uno strumento per valutare potenziali interventi terapeutici.

Per il seguente studio sono stati utilizzati, oltre agli animali descritti sopra, anche 3 gruppi di controllo, rappresentati da: animali wild type, animali knock out per la proteina prionica ed altri animali transgenici che esprimono alti livelli della forma non mutata della proteina prionica. Oltre all'importanza di questi ceppi come controllo è da sottolineare l'interesse del loro studio per sé. Come descritto in precedenza, infatti, sia gli animali che non esprimono la proteina prionica sia gli animali che la sovra esprimono sono modelli utili per lo studio delle funzioni fisiologiche della PrP.

Dopo la loro creazione gli animali sono stati studiati nel dettaglio, per descriverne le caratteristiche e verificarne la concordanza con altri modelli animali di CJD e con studi condotti su pazienti.

Nella seconda parte dello studio ci si è focalizzati sull'evoluzione temporale di questa malattia, nello sforzo non solo di descriverne l'andamento ma anche di evidenziare eventuali segni a comparsa precoce che potrebbero essere utili per una pronta e specifica diagnosi della CJD nell'uomo.

Nell'ultima parte del progetto si è deciso di studiare la risposta di questi modelli animali a condizioni di stress, sottoponendoli a deprivazione di sonno. Questo tipo di stress permette infatti di evidenziare risposte anomale e di valutare alterazioni comportamentali che in condizioni basali

non sarebbero rilevate.

Materiali e Metodi

Negli studi descritti nel successivo capitolo sono stati utilizzati 4 diversi ceppi di animali, sviluppati presso il laboratorio del Dr. R. Chiesa (Istituto Mario Negri, Milano):

- Animali wild type (WT) con background genetico C57BL/6J; non-Tg/PrP^{+/+}
- Animali che non esprimono la proteina prionica (knock out, KO), creati su puro background C57BL/6J; non-Tg/PrP^{0/0}
- Animali che sovra-esprimono la forma non mutata della proteina prionica (Tg(WT)); Tg(WT-E1^{+/+}).
- Animali transgenici che possiedono un allele del gene della proteina prionica che presenta una sostituzione aminoacidica ed un particolare polimorfismo (D178N/V128), Tg(CJD); Tg(CJD-A21^{+/-}).
- Il ceppo Tg(WT) ed il ceppo Tg(CJD) sono entrambi stati creati a partire dal genoma degli animali knock out e sono mantenuti su quel background tramite incroci con animali del ceppo KO.

Nella seconda e terza parte del lavoro gli animali sono stati portati su puro background C57 tramite ripetuti incroci degli animali appena descritti con animali WT C57. L'aspetto genetico della creazione degli animali è descritto più dettagliatamente nella sezione Materiali e Metodi della prima parte dei risultati e nella tesi di dottorato presentata dalla dottoressa S. Mantovani dal titolo "Modelli murini transgenici di malattie prioniche per lo studio del ruolo fisiopatologico della proteina prionica".

L'analisi polisomnografica è stata eseguita mantenendo gli animali in gabbie singole in un luogo isolato acusticamente. Gli animali sono stati mantenuti ad una temperatura costante di 25 °C (± 1 °C) e con un ciclo luce oscurità programmato per avere 12 ore di luce e 12 ore di buio nelle 24 ore. Gli animali hanno costantemente avuto libero accesso a cibo ed acqua.

Gli animali sono stati sottoposti ad operazione chirurgica per l'impianto di elettrodi per la registrazione elettroencefalografica (EEG). Sia l'induzione che il mantenimento dell'anestesia sono stati effettuati mediante somministrazione di isofluorano per via aerea (1-2% in ossigeno). Dopo l'induzione dell'anestesia gli animali sono stati posti su un apparato stereotassico. Come elettrodi di registrazione sono state usate viti in acciaio inossidabile. Due di queste viti sono state poste in posizione occipitale ed una in posizione fronto-parietale. Gli elettrodi sono poi

stati saldati ad un connettore cementato alla teca cranica. Il giorno dell'operazione ed i 2 giorni successivi gli animali sono stati trattati con un analgesico.

Nel terzo giorno successivo all'intervento è stato effettuato il collegamento dell'animale al sistema di registrazione tramite un cavo flessibile. Dopo un tempo minimo di 9 giorni, durante il quale gli animali hanno avuto sia il tempo di adattarsi al fatto di essere collegati ad un cavo sia il tempo di riprendersi dall'operazione chirurgica, vengono effettuate le registrazioni.

Esse hanno avuto durata di 24 ore con inizio al principio della fase di luce. Oltre al segnale elettroencefalografico è stata registrata, per mezzo di una telecamera in grado di rilevare i raggi infrarossi (Bioserve GmbH), anche l'attività motoria degli animali. L'attività registrata dalla telecamera, dopo essere stata convertita in valori di voltaggio, è stata inviata insieme alle registrazioni EEG ad un apparato poligrafico (Grass, Quincy MA).

I segnali acquisiti, dopo essere stati amplificati e filtrati a livello dei poligrafi, sono stati trasmessi ad una scheda di digitalizzazione collegata ad un computer sul quale i dati sono stati salvati.

Nella prima parte dello studio è stato analizzato un gruppo sperimentale, costituito da animali di 18 mesi appartenenti ad i 4 ceppi sopra citati. Per ogni ceppo sono stati analizzati 6 animali, tranne che per il ceppo Tg(WT) per il quale sono stati analizzati 5 animali.

Nella seconda parte del lavoro, al fine di studiare l'evoluzione del morbo di Crutzfeldt-Jakob e l'eventuale precoce comparsa di suoi segni, sono stati studiati 3 differenti gruppi sperimentali definiti da differenti età:

- un gruppo di animali di 6 mesi.
- un gruppo di animali di 12 mesi.
- un gruppo di animali di 18 mesi.

Per ogni gruppo di età sono stati registrati animali per tutti e 4 i ceppi descritti in precedenza.

Il giorno successivo la registrazione in condizione basale gli animali descritti nel precedente paragrafo sono stati sottoposti a privazione di sonno. In questa condizione gli animali, che pure sono stati registrati per 24 ore, sono stati mantenuti nello stato di veglia mediante una leggera stimolazione meccanica durante le prime 6 ore della fase di luce. Al termine del periodo di stimolazione gli animali sono stati lasciati liberi di dormire per le seguenti 18 ore.

Al termine della registrazione tutti gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia e ne è stato prelevato il cervello per gli studi istologici.

Le registrazioni polisonnografiche sono state analizzate per determinare 4 parametri:

- Tempo trascorso nei 3 stati comportamentali (veglia, sonno NREM e sonno REM).
- Architettura del sonno (analisi della distribuzione degli episodi di sonno e della loro struttura, ad esempio tramite analisi della frammentazione del sonno).
- Distribuzione circadiana del sonno.
- Presenza e morfologia di eventuali alterazioni a livello del tracciato elettroencefalografico.

Per determinare questi parametri è stata condotta sui tracciati un'analisi visuale. Mediante l'uso di un software dedicato (Icelus; Mark Opp, Ann Arbor, University of Michigan, MI) i tracciati sono stati suddivisi in periodi della durata di 12 secondi. Tali periodi sono definiti epoche. Un operatore ha provveduto ad assegnare ciascuna di queste epoche ad uno degli stati comportamentali descrivendo, inoltre, l'eventuale presenza di alterazioni elettroencefalografiche; tali analisi sono state eseguite senza che l'operatore fosse a conoscenza del ceppo di appartenenza dell'animale oggetto di analisi.

Nei casi nei quali, per la massiccia presenza di alterazioni elettroencefalografiche, si è rivelata impossibile l'assegnazione di una data epoca ad un dato stato comportamentale si è provveduto a categorizzare tali epoche come "quarto stato".

La densità dello spettro di potenza è stata ottenuta per ogni stato comportamentale in ogni animale mediante l'uso della trasformata di Fourier applicata a tutte le epoche prive di artefatti od alterazioni. Sono state analizzate le frequenze da 0,5 a 20 Hz.

Per effettuare un'analisi approfondita della deprivazione di sonno sono state studiate anche le variazioni quantitative delle onde più lente del sonno NREM (banda delta). Questa banda è infatti ritenuta correlata alla durata del tempo trascorso in veglia prima dell'episodio di sonno NREM (Mistlberger, Bergmann et al. 1987). A conferma di ciò sono anche i numerosi lavori che descrivono uno specifico aumento delle frequenze più lente nel sonno che segue la deprivazione, ad esempio: nella scimmia (Reite, Rhodes et al. 1965), nel ratto (Borbely and neuhaus 1979) e nell'uomo (Borbely, Baumann et al. 1981).

La significatività dei risultati ottenuti è valutata mediante l'applicazione dell'analisi della varianza (ANOVA) sui campioni a cui hanno fatto seguito test *post hoc* (Fisher's test).

Per quanto riguarda le analisi dei risultati ottenuti in seguito a deprivazione di sonno è stata effettuata un'analisi per misure ripetute con un modello misto che, per i dati di controllo, ha compreso tutti i risultati ottenuti dalla analisi polisonnografica mantenendo come valori fissi il ceppo e l'età e come misura ripetuta il tempo. Come test *post hoc* è stata eseguita un'analisi ANOVA ad una via con correzione di Bonferroni. L'analisi dei risultati in seguito a deprivazione è stata condotta nella stessa maniera ma come valore fisso è stata usata la variabile manipolazione.

Parte dei dati descritti nella prima parte dei risultati non sono stati trattati in questa sezione e sono solo accennati nella discussione di questo lavoro in quanto progettati ed eseguiti presso altre strutture. Un approfondimento generale di questa sezione è presente nella sezione materiali e metodi della prima parte dei risultati.

Mutant Prion Protein Expression Causes Motor and Memory Deficits and Abnormal Sleep Patterns in a Transgenic Mouse Model

Sara Dossena,^{1,2,8} Luca Imeri,^{4,8} Michela Mangieri,⁵ Anna Garofoli,^{1,2} Loris Ferrari,^{1,4} Assunta Senatore,^{1,2} Elena Restelli,^{1,2} Claudia Balducci,² Fabio Fiordaliso,³ Monica Salio,³ Susanna Bianchi,⁴ Luana Fioriti,^{1,2,9} Michela Morbin,⁵ Alessandro Pincherle,⁶ Gabriella Marcon,^{5,7} Flavio Villani,⁶ Mirjana Carli,² Fabrizio Tagliavini,⁵ Gianluigi Forloni,² and Roberto Chiesa^{1,2,*}

¹Dulbecco Telethon Institute, 20156 Milan, Italy

²Department of Neuroscience

³Bio-imaging Unit, Department of Cardiovascular Research

"Mario Negri" Institute for Pharmacological Research, 20156 Milan, Italy

⁴Department of Human Physiology, University of Milan Medical School, 20133 Milan, Italy

⁵Division of Neuropathology and Neurology

⁶Division of Clinical Epileptology and Experimental Neurophysiology

"Carlo Besta" National Neurological Institute, 20133 Milan, Italy

⁷Department of Pathology and Experimental Medicine, University of Udine, 33100 Udine, Italy

⁸These authors contributed equally to this work

⁹Present address: Department of Neuroscience, Columbia University, New York, NY 10032, USA

*Correspondence: chiesa@marionegri.it

DOI 10.1016/j.neuron.2008.09.008

SUMMARY

A familial form of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is linked to the D178N/V129 prion protein (PrP) mutation. Tg(CJD) mice expressing the mouse homolog of this mutant PrP synthesize a misfolded form of the mutant protein, which is aggregated and protease resistant. These mice develop clinical and pathological features reminiscent of CJD, including motor dysfunction, memory impairment, cerebral PrP deposition, and gliosis. Tg(CJD) mice also display electroencephalographic abnormalities and severe alterations of sleep-wake patterns strikingly similar to those seen in a human patient carrying the D178N/V129 mutation. Neurons in these mice show swelling of the endoplasmic reticulum (ER) with intracellular retention of mutant PrP, suggesting that ER dysfunction could contribute to the pathology. These results establish a transgenic animal model of a genetic prion disease recapitulating cognitive, motor, and neurophysiological abnormalities of the human disorder. Tg(CJD) mice have the potential for giving greater insight into the spectrum of neuronal dysfunction in prion diseases.

INTRODUCTION

Clinical signs in the diagnosis of prion diseases in animal models are essentially confined to late motor deficits. In humans, prion diseases have a more complex presentation, with dementia and nonmotor as well as motor disturbances, often following

a long prodromal phase. A broader spectrum of clinical signs is needed in experimental models for insight into the mechanisms of neuronal dysfunction and its evolution, and to identify earlier markers of clinical disease when therapeutic intervention may be effective. Here we report the emergence of behavioral, electrophysiological, and motor deficits in a mouse model of inherited prion disease that closely mirror those seen in a newly diagnosed human patient with the same mutation.

Approximately 15% of human prion diseases display autosomal dominant inheritance and are linked to point or insertional mutations in the gene encoding PrP^C (*PRNP*) (Young et al., 1999). The mechanism of neurotoxicity of mutant PrP molecules is not clear (Chiesa and Harris, 2001), but structural changes involving increased β sheet structure, aggregation, and resistance to protease digestion may contribute to the pathogenicity of the mutant protein (Prusiner, 1998). *PRNP* mutations have been associated with defined clinical and neuropathological phenotypes—Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), and fatal familial insomnia (FFI)—but there is extensive variability in disease presentation for individual mutations and even within the same family (Young et al., 1999).

An important source of phenotypic variation is the polymorphism at codon 129 of *PRNP*, where either methionine (M) or valine (V) can be encoded. The prion disease linked to the substitution of aspartic acid (D) to asparagine (N) at codon 178 is a typical example. The D178N/V129 haplotype segregates with a subtype of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD¹⁷⁸) recognized clinically by global cortical dementia, motor abnormalities, and myoclonus, whereas the D178N/M129 allele is associated with FFI, primarily characterized by severe sleep alterations, with total disorganization of normal sleep structure and endocrine dysfunction (Goldfarb et al., 1992). Electroencephalographic (EEG) changes

characterize CJD (Wieser et al., 2006). However, sleep alterations are also increasingly recognized in sporadic and inherited CJD (Calleja et al., 1985; Chapman et al., 1996; Kazukawa et al., 1987; Landolt et al., 2006; Taratuto et al., 2002; Terzano et al., 1995).

Investigation of inherited prion disease biology requires animal models with the essential features of the human disorders. To date, the existing mouse models of inherited human prion disease, Tg(P101L) (Hsiao et al., 1990; Nazor et al., 2005; Telling et al., 1996) and Tg(PG14) (Chiesa et al., 1998), develop motor deficits, but models showing the cognitive and neurophysiological abnormalities typical of CJD have not been reported.

Here we describe a transgenic mouse model of inherited CJD expressing the mouse homolog of the D178N/V129 mutation, in which we found EEG and sleep abnormalities as well as memory impairment and motor dysfunction. Striking morphological alterations of the neuronal endoplasmic reticulum (ER) associated with ER retention of mutant PrP were found in these animals, suggesting that perturbation of ER homeostasis may be involved in the pathogenesis. These mice increase the spectrum of clinical signs and other functional abnormalities in experimental models of prion disease. They provide a platform for greater insight into mechanisms of disease pathogenesis and for potential approaches to intervention.

RESULTS

Generation of Transgenic Mice and Characterization of Mutant PrP

We produced transgenic mice that express a mouse PrP (moPrP) homolog of the D178N/V129 mutation associated with CJD¹⁷⁸ (moPrP D177N/V128). We identified five founders (A21, G1, G5, H, and I). Transgene copy number and mutant PrP expression are shown in Table S1 and Figure S1 in the Supplemental Data available online. To generate transgenic lines, referred to as Tg(CJD), founders were bred with *Pmp^{0/0}* mice (Bueler et al., 1992), so that the progeny expressed only mutant PrP. The pattern of transgenic PrP expression in the brain was similar to that of endogenous PrP in nontransgenic mice (Figure S2), although subtle differences in cellular distribution cannot be excluded. Unglycosylated PrP was underrepresented (Figures S1 and S2A), consistent with observations in humans carrying the D178N mutation (Petersen et al., 1996).

Approximately 50% of mutant PrP in the mouse brains was insoluble (seen in pellet fractions in Figures 1A and 1B and Figure S3) and was immunoprecipitated by the PrP^{Sc}-specific antibody 15B3, which also recognizes a variety of misfolded and aggregated forms of PrP (Biasini et al., 2008; Nazor et al., 2005) (Figure 1B). No detergent-insoluble PrP was detected in nontransgenic mice (Figure 1A, lanes 1 and 2).

Mutant PrP was weakly protease resistant (Figure 1C, lanes 5–12), in contrast to the complete protease sensitivity of wild-type PrP (Figure 1C, lanes 1–4). This was clearly seen under standard assay conditions in the Tg(CJD-G5) founder expressing high levels of mutant PrP. To enhance detection of the proteinase K (PK)-resistant fraction in Tg(CJD-A21) mice, brain homogenates were digested at 4°C (Figure 1D). After deglycosylation with PNGase F, the PK-resistant fragment found in Tg(CJD) mice

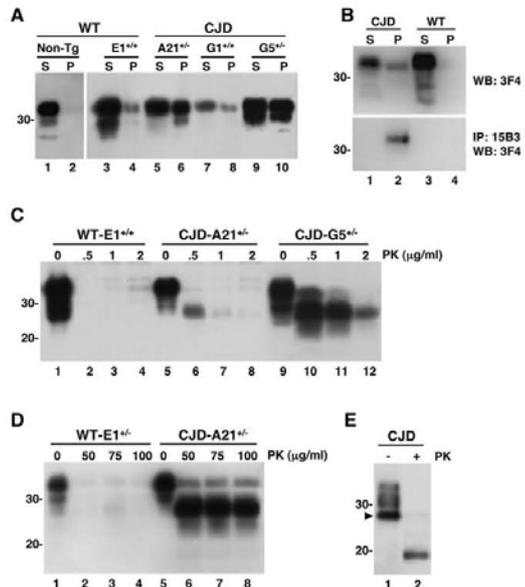


Figure 1. D177N/V128 PrP Is Insoluble, Immunoprecipitated by 15B3 Antibody, and Mildly Protease Resistant

(A) Brain lysates prepared from mice of the following genotypes and ages were ultracentrifuged at 186,000 × g for 40 min, and PrP in the supernatants (S) and pellets (P) was analyzed by western blotting using P45–66 (lanes 1 and 2) or 3F4 antibody (lanes 3–10): non-Tg/*Pmp^{+/+}*, 304 days (lanes 1 and 2); Tg(WT-E1^{+/+}), 581 days (lanes 3 and 4); Tg(CJD-A21^{+/+}), 570 days (lanes 5 and 6); Tg(CJD-G1^{+/+}), 309 days (lanes 7 and 8); Tg(CJD-G5^{+/+})/*Pmp^{+/+}*, 72 days (lanes 9 and 10).

(B) Brain lysates from Tg(CJD-A21^{+/+}), 720 days (lanes 1 and 2) and Tg(WT-E1^{+/+}), 581 days (lanes 3 and 4) were ultracentrifuged, and the supernatant and pellet fractions were split into two parts and either analyzed by western blotting using antibody 3F4 (top panel) or immunoprecipitated using monoclonal antibody 15B3 (lower panel). Immunoprecipitated PrP was analyzed by western blotting using antibody 3F4 (lower panel).

(C) Brain lysates from mice of the following genotypes and ages were incubated with 0–2 μg of proteinase K (PK) for 30 min at 37°C, and PrP was visualized by western blotting using antibody 3F4: Tg(WT-E1^{+/+}), 42 days (lanes 1–4); Tg(CJD-A21^{+/+}), 153 days (lanes 5–8); Tg(CJD-G5^{+/+})/*Pmp^{+/+}*, 72 days (lanes 9–12). The undigested samples (0 μg/ml PK) represent 50 μg of protein; the other samples represent 200 μg.

(D) Brain lysates from a 71-day-old Tg(WT-E1^{+/+}) mouse and a 191-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse were incubated with 0–100 μg of PK for 60 min on ice, and PrP was visualized by western blotting with antibody 3F4. The undigested samples (0 μg/ml PK) represent 5 μg of protein; the other samples represent 20 μg.

(E) Brain lysate from a 422-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse was incubated with 0 or 75 μg/ml of PK as in (D), followed by incubation with PNGase F and western blot analysis with antibody 3F4. Deglycosylation of the undigested sample in lane 1 was incomplete; arrowhead indicates the completely deglycosylated PrP band.

had an apparent molecular mass of 19 kDa (Figure 1E). There were no regional differences in insolubility and protease resistance of mutant PrP throughout the brain (Figure S3 and data not shown).

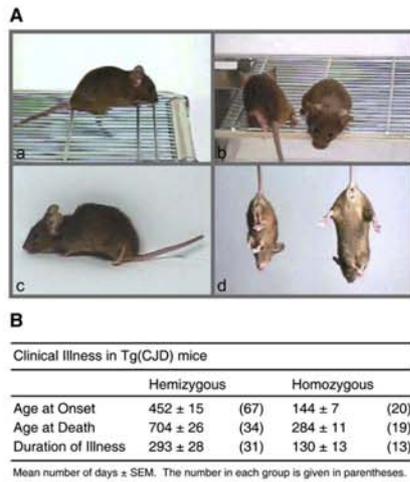


Figure 2. Neurological Symptoms in Tg(CJD) Mice

(Aa) A Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse at 201 days of age is incapable of deambulating on a metal grill.
 (Ab) Two Tg(CJD-A21^{+/+}) mice at 201 and 223 days of age. Note the ataxic posture with extension of the hindlimb and the unbalanced posture.
 (Ac) A Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse at 671 days of age shows kyphosis (hunchback position) and abnormal gait with extension of the hindlimbs.
 (Ad) When suspended by its tail, a Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse at 188 days of age (left) assumes a flexed posture and tightly clasps its hindlimbs, whereas a nontransgenic littermate (right) splays its limbs.
 (B) Time course of clinical illness in Tg(CJD-A21) mice.

Tg(CJD) Mice Develop Motor Dysfunction and Alteration of Spatial Working Memory

All Tg(CJD) mice expressing mutant PrP at a level similar to that of endogenous PrP in wild-type mice, or higher, exhibited progressive neurological disease. They developed ataxia, with abnormal posture, leaning to one side, unusual flexed posture of hind legs, kyphosis, and foot clasping on suspension (Figure 2A). On a rotarod, Tg(CJD) mice showed a significantly shorter latency to fall than *Pmp^{+/+}* or *Pmp^{0/0}* nontransgenic littermates and Tg(WT) mice (Figure S4).

The phenotype was evident from ~450 days in hemizygous Tg(CJD-A21) mice and ~145 days in homozygous mice. Duration of illness was 293 ± 28 and 130 ± 13 days (Figure 2B), respectively, suggesting a transgene dose-related neurological dysfunction. Furthermore, the Tg(CJD-G5) founder, which expressed mutant PrP at eight times wild-type levels, died with neurological symptoms at 72 days of age, whereas mice expressing mutant PrP below the endogenous level did not develop neurological disease during their lifetimes. Nontransgenic littermates and Tg(WT) mice observed over the same period remained free of neurological disease and survived more than 1000 days.

Coexpression of wild-type PrP had no effect on onset, severity, or duration of illness in Tg(CJD) mice, in contrast to the effect of endogenous PrP expression in other transgenic mutant PrP models (Telling et al., 1996). For example, in a group of litter-

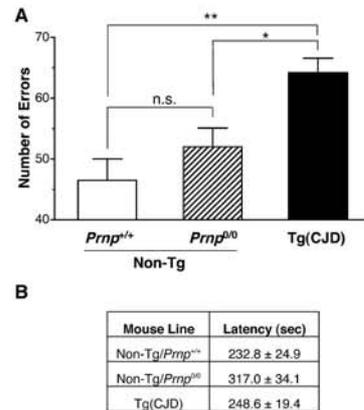


Figure 3. Tg(CJD) Mice Show Working Memory Impairment in the Eight-Arm Radial Maze

(A) Histograms show the mean ± SEM of total errors in the eight-arm radial maze during 10 days of training by 10 non-Tg/*Pmp^{+/+}*, 10 non-Tg/*Pmp^{0/0}*, and 11 Tg(CJD-A21^{+/+}) mice aged between 200 and 316 days. $F_{2,28} = 9.0$; $p = 0.001$ by one-way analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Tukey's post hoc test.

(B) Values show the mean latency (±SEM) to complete the test. One-way ANOVA did not find any difference between groups ($F_{2,28} = 2.8$; $p = 0.08$).

mates consisting of 10 Tg(CJD-A21^{+/+})/*Pmp^{+/+}*, 13 Tg(CJD-A21^{+/+})/*Pmp^{0/0}*, and 7 Tg(CJD-A21^{+/+})/*Pmp^{0/0}* mice, symptom onset was at 405 ± 44, 409 ± 35, and 410 ± 39 days, respectively (mean ± SEM).

We also found alterations in spatial working memory in Tg(CJD) mice. Mice were tested with a battery of behavioral tasks for different aspects of memory, including passive avoidance, novel object recognition, Morris water maze, and eight-arm radial maze. To avoid confounding effects due to the motor deficit that develops in older mice, we tested Tg(CJD) hemizygous animals younger than 320 days. Mice performed poorly in the eight-arm radial maze, which tests spatial working memory, making significantly more errors over 10 training days than nontransgenic controls (Figure 3A). Latency to complete the test was similar in Tg(CJD) and control mice, confirming that the deficit was not due to motor abnormalities (Figure 3B). We found no significant differences between Tg(CJD) and control mice in the other behavioral tasks at this stage.

Tg(CJD) Mice Show Abnormal EEG Patterns and Sleep Disturbance Reminiscent of Those Observed in a Human CJD Patient with the Same Mutation

As EEG abnormalities are common in CJD (Wieser et al., 2006), we analyzed EEG patterns in Tg(CJD) mice. The EEG activity of Tg(CJD) mice was characterized by bursts of polyphasic complexes (Figure 4A, left panels), which were not seen in the other groups of mice. The polyphasic complexes lasted from 0.3 to 4.6 s, and their amplitude varied but in most cases was larger than the EEG amplitude during non-REM (NREM) sleep. The frequency power spectrum of polyphasic complexes peaked

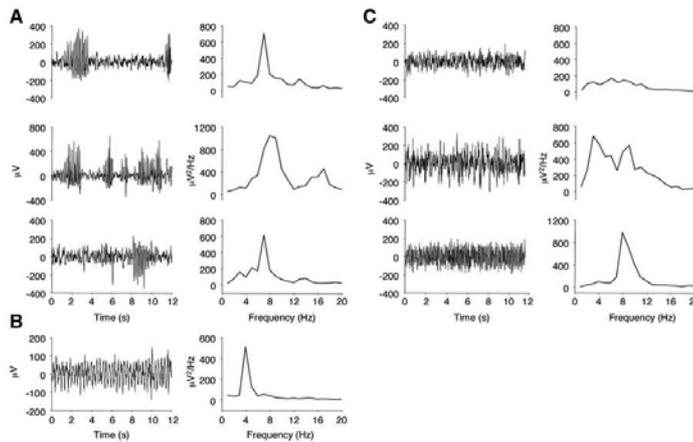


Figure 4. Electroencephalographic Activity Is Altered in Tg(CJD) Mice

(A) Three examples of bursts of polyphasic complexes (left panels) and corresponding frequency power spectra obtained by fast Fourier transform (right panels). These alterations were observed in all 6 Tg(CJD-A21^{+/+}) mice.

(B) An example of sawtooth waves (left panel) and the corresponding frequency power spectrum (right panel), which were observed in 5 out of 6 Tg(CJD-A21^{+/+}) mice.

(C) Examples of normal electroencephalographic recordings (left panels) and corresponding frequency power spectra (right panel) during epochs of wakefulness (top panel), non-rapid eye movement (NREM) (middle panel), and rapid eye movement (REM) (bottom panel) sleep in a representative Tg(WT) mouse.

around 7–8 Hz (Figure 4A, right panels). Scoring epochs (12 s) containing one or more bursts of polyphasic complexes were almost equally distributed during the light and dark phases (33.0% ± 5.5% and 27.8% ± 5.6% of the total number of epochs, respectively). During the light phase, polyphasic complexes were present in 36.1% ± 4.8%, 18.7% ± 4.0%, and 13.8% ± 7.4% of epochs scored as wakefulness, NREM sleep, and REM sleep, respectively. These percentages were 29.7% ± 4.4%, 29.3% ± 2.9%, and 13.6% ± 11.3% during the dark phase. As shown in the lower panel of Figure 5B, the polyphasic complexes were distributed in clusters.

In 5 out of 6 Tg(CJD) mice, we also observed abnormal “sawtooth” waves with a frequency power spectrum that peaked around 4 Hz (Figure 4B). The number of epochs with these waves ranged from 5 to 33 during the light phase and from 4 to 56 during the dark phase, except in one Tg(CJD) mouse in which hundreds of sawtooth waves were recorded during the light-dark cycle.

Mice expressing mutant PrP showed marked sleep abnormalities; 24 hr polygraphic analysis indicated significant alterations of sleep-wake patterns. Tg(CJD) mice spent strikingly less time in REM sleep than all other mouse lines during both phases of the light-dark cycle (Figure 5A; top panel of Figure 5B; Figure 5E; Figure S5). The amount of time spent in NREM sleep during the dark phase was also significantly reduced. In Tg(CJD) mice, 3.9% ± 2.1% of time during the light phase and 4.7% ± 1.9% during the dark phase was characterized by repeated bursts of polyphasic complexes and could not be assigned to any conventional behavioral state; these periods were classified as “unscored” (Figure 5B, top panel). There were no significant differences in the number of transitions between behavioral states (an indicator of continuous or broken sleep) or state-specific EEG power spectra in the different groups of mice.

Analysis of circadian distribution of sleep and gross body movements did not bring to light any differences between Tg(CJD) and control mice. As expected in nocturnal animals, mice of all experimental groups spent more time awake (Figure 5E, top panel) and moved more during the dark phase than the light phase of the light-dark cycle, with no differences be-

tween strains ($F_3 = 0.64$, $p = 0.6$ by two-way ANOVA). Animals of all strains also slept more (as evaluated by total sleep time) during the light phase than the dark phase. Thus, the extreme reduction of REM sleep in Tg(CJD) mice could not be attributed to alterations of circadian rhythms.

Our findings of marked EEG and sleep disruption in Tg(CJD) mice expressing the mouse homolog of the D178N/V129 mutation confirm that sleep dysfunction is more widespread in prion diseases than previously thought, consistent with recent reports of such disturbances not only in FFI (Landolt et al., 2006). We therefore examined the sleep profile and EEG of a case of CJD¹⁷⁸ in a 47-year-old woman newly diagnosed during the course of our experiments (see case report in the Supplemental Data).

We found EEG alterations (periodic sharp wave complex [PSWC] activity) and marked abnormalities in the patient’s sleep profile. NREM sleep EEG pattern was characterized by monomorphic low-amplitude theta and unstable delta activities, with total absence of vertex waves, spindles, and K complex. Triphasic waves were clearly attenuated during NREM sleep. REM sleep, limited to brief phases during the night, appeared characterized by very low-amplitude theta and beta rhythms, reduction of submental electromyographic tone, and only rare rapid eye movements (Figure S6). These severe EEG alterations meant that the sleep-wake profile could not be scored according to Rechtschaffen and Kales (1968). However, we identified three patterns on the basis of the above characteristics: wake, NREM sleep, and REM sleep (Figure 5D). Sleep appeared very unstable, with frequent transitions between wakefulness and NREM sleep. NREM sleep was also broken by frequent arousals associated with limb movements (limb movement index = 64). The respiratory profile was unremarkable.

In summary, some of the neurophysiological features of Tg(CJD) mice are similar to those observed in the CJD¹⁷⁸ patient.

Tg(CJD) Mice Show PrP Deposits, Gliosis, and Loss of GABAergic Cells

Tg(CJD) mice exhibited several neuropathological abnormalities. Immunohistochemistry indicated protease-resistant PrP

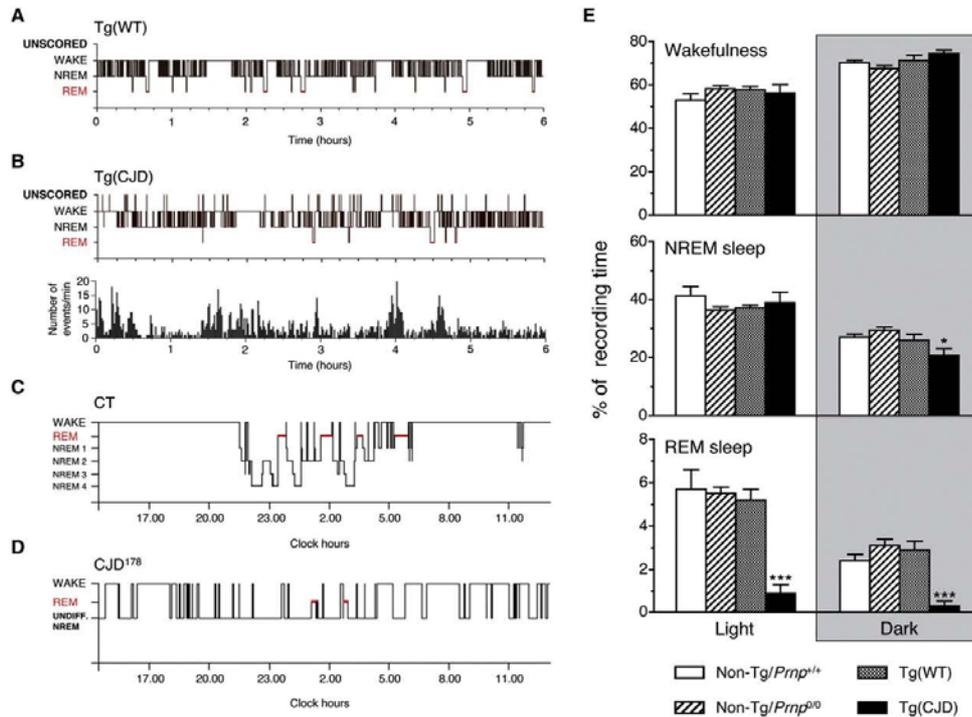


Figure 5. Abnormal Sleep Patterns in Tg(CJD) Mice and a Human CJD¹⁷⁸ Patient

(A) Representative hypnogram of a 578-day-old Tg(WT-E1^{+/+}) mouse. "Unscored" indicates epochs not assigned to any behavioral state. (See Results and Experimental Procedures for further details.)

(B) Representative hypnogram (upper panel) and distribution across time of polyphasic complexes (lower panel) in a 631-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse. Note the reduction in REM sleep epochs (highlighted in red) in comparison to the Tg(WT-E1^{+/+}) mouse and the presence of unscored epochs. Hypnograms in (A) and (B) cover the first 6 hr of the light phase of the light-dark cycle and are intended to provide a qualitative picture of the amount of sleep and sleep distribution in time (sleep architecture) during this interval.

(C) The 24 hr hypnogram of a healthy human shows a normal pattern of waking during the daytime and regular NREM-REM cycles during the night.

(D) Only a rudimentary wake-sleep rhythm is detectable in a human patient carrying the D178N/V129 PrP mutation, with a prevalence of waking during the day and sleep epochs during the night. Note the absence of ultradian cycles, the severe reduction of REM sleep, and the impossibility to distinguish NREM sleep stages.

(E) Percentage of time (mean \pm SEM) spent in wakefulness, NREM sleep, and REM sleep across 24 hr by 6 non-Tg/Prnp^{+/+}, 6 non-Tg/Prnp^{0/0}, 6 Tg(CJD-A21^{+/+}), and 5 Tg(WT-E1^{+/+}) mice. At the time of recording, the animals' mean (\pm SEM) ages were: non-Tg/Prnp^{+/+}, 629 \pm 20 days; non-Tg/Prnp^{0/0}, 632 \pm 59 days; Tg(WT-E1^{+/+}), 427 \pm 70 days; Tg(CJD-A21^{+/+}), 560 \pm 34 days. The gray background identifies the dark portion of the light-dark cycle. Two-way ANOVA indicated a significant reduction in the percentage of time spent in REM sleep during both the light and dark phases for the Tg(CJD) animals (F_{3,42} = 4.8, p = 0.01). *p < 0.05, ***p < 0.001 versus other groups by Fisher's test.

deposits in many brain regions of Tg(CJD) mice that were absent in nontransgenic and Tg(WT) mice (Figures 6A–6D). Diffuse "synaptic-type" PrP deposition was prominent in the hippocampal formation, particularly in the stratum moleculare (Figure 6E), and in the amygdala and olfactory bulb. Definite PrP immunostaining was also detected in the neocortex and striatum and, less intensely, in the thalamus, hypothalamus, brainstem, and molecular layer of the cerebellum. In addition, small PrP "plaque-like" deposits were found in several brain regions, including the fimbria of the hippocampus, the reticular thalamic nucleus, the corpus callosum, the external and internal capsule, the cingulate cortex, and the anterior commissure nuclei (Figure 6F).

These deposits were not fluorescent after thioflavine S staining, indicating that they did not contain amyloid fibrils.

PrP deposition was associated with hypertrophy and proliferation of astrocytes, prominent in the hippocampus, amygdala, and olfactory bulb as revealed by immunostaining with anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (Figure S7). No spongiform-like changes were observed.

There is evidence that parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-positive subpopulations of GABAergic neurons are primarily affected in CJD (Belichenko et al., 1999; Guentchev et al., 1997). Immunohistochemistry for calretinin showed striking differences in the hippocampus and cerebral cortex of Tg(CJD) mice

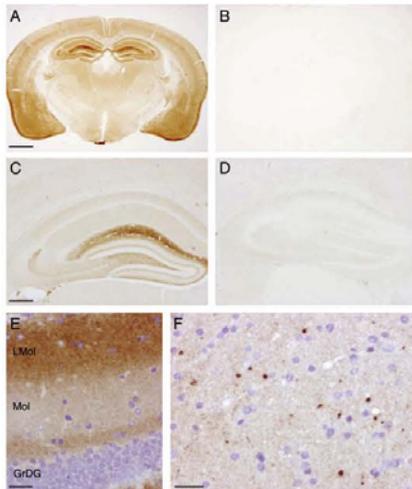


Figure 6. Tg(CJD) Mice Show Cerebral Accumulation of Protease-Resistant PrP

(A and B) Immunohistochemical detection of PrP using monoclonal antibody 12B2 after PK digestion of a section in a 290-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse (A) and a 396-day-old non-Tg/*Prnp*^{0/0} mouse (B). (C and D) Immunohistochemical detection of PrP using monoclonal antibody 3F4 after PK digestion of a section in a 267-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse (C) and a 299-day-old Tg(WT-E1^{+/+}) mouse (D). (E and F) The pattern of PrP deposition in Tg(CJD) mice was either diffuse, as in the hippocampal formation (E), or plaque-like, as in the anterior commissure nucleus (F). Sections in (E) and (F) are from a 744-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse. Scale bars = 1 μ m in (A) (also applicable to [B]), 250 μ m in (C) (also applicable to [D]), and 25 μ m in (E) and (F). Lmol, lacunosus molecular stratum; Mol, molecular stratum; GrDG, granular zone of dentate gyrus.

compared to controls (Figure 7; Figure S8). In non-Tg mice, the anti-calretinin antibody strongly labeled bipolar neurons in layers II and III of the cerebral cortex, mossy cells in the dentate gyrus of the hippocampus, and their synaptic terminals projecting to the supragranular zone. Tg(CJD) mice consistently showed markedly less calretinin immunoreactivity of interneurons and neuropil of the cerebral cortex and mossy cell terminals in the hippocampus. The loss of calretinin immunoreactivity progressed with age and correlated with the local deposition of PrP, although the two proteins did not colocalize precisely (Figure S8). Synaptophysin immunoreactivity was low in the supragranular layer of the hippocampus where calretinin reduction was most pronounced (data not shown).

These observations indicate a profound abnormality of calretinin-positive fibers at the synaptic terminals up to their complete disappearance.

Tg(CJD) Cerebellar Granule Neurons Show Swelling of the ER and Abnormal Intracellular Localization of PrP

Histological analysis of Tg(CJD) brains did not find any obvious signs of cerebellar degeneration, in contrast to other transgenic mutant PrP models with similar motor dysfunctions (Chiesa et al.,

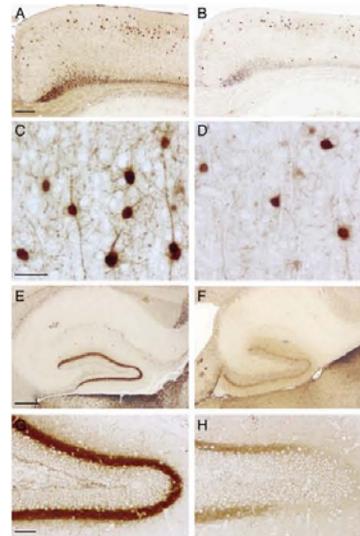


Figure 7. Tg(CJD) Mice Show Low Calretinin Immunoreactivity in Several Nerve Cell Populations

Sections from non-Tg/*Prnp*^{0/0} mice aged 245 (A and C), 334 (E), or 808 (G) days; Tg(CJD-A21^{+/+}) mice aged 284 (B and D) or 208 (F) days; and a 709-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse (H) were stained with anti-calretinin antibody. In non-Tg mice, calretinin immunostaining labels bipolar and multipolar neurons in layers II and III of the cerebral cortex (A and C) and the synaptic terminals of the mossy cells in the supragranular zone of the dentate gyrus in the hippocampus (E and G). Tg(CJD) mice show marked loss of calretinin immunoreactivity in cortical neurons (B and D) and hippocampal mossy cell terminals (F and H). Scale bars = 250 μ m in (A) and (E) (also applicable to [B] and [F]), 15 μ m in (C) (also applicable to [D]), and 50 μ m in (G) (also applicable to [H]).

1998, 2000). Tg(CJD) cerebella were not atrophic judging from morphometric measurements, nor did they show loss of granule neurons or alterations of Purkinje cell density and dendritic arborization in the molecular layer (Figure S9; data not shown). Electron microscopy of Tg(CJD) cerebella, however, detected striking ultrastructural abnormalities in granule neurons. The ER of these cells was consistently enlarged and fragmented (Figure 8A). These abnormalities were not seen in non-Tg/*Prnp*^{0/0} or Tg(WT) mice, suggesting that they were related to mutant PrP expression.

To test whether the ultrastructural alterations were associated with accumulation of mutant PrP in the secretory pathway, we used immunogold electron microscopy. Because immunostaining of mutant PrP in brain sections requires antigen retrieval with guanidine thiocyanate, which alters the tissue ultrastructure, we made this analysis in primary cerebellar cultures established from newborn mice. Preliminary tests showed that mutant PrP could in fact be detected in paraformaldehyde/glutaraldehyde-fixed neurons without the need for antigen retrieval. The majority of wild-type PrP in granule neurons from non-Tg/*Prnp*^{+/+} and Tg(WT) mice localized on the plasma membrane and in endosomes, with only a small fraction in the ER and the Golgi

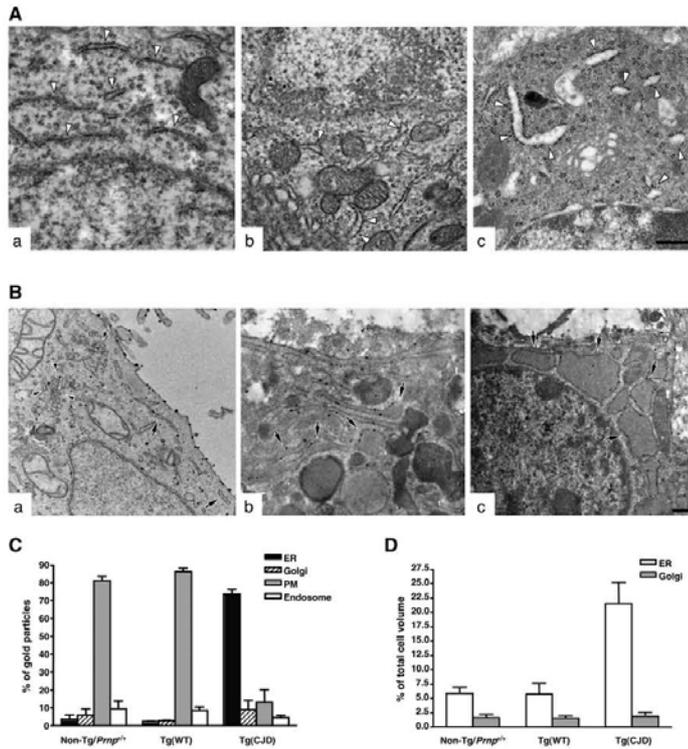


Figure 8. Tg(CJD) Neurons Have Enlarged Endoplasmic Reticulum and Abnormal Intracellular PrP Distribution

(A) Electron microscopy of granule neurons in the cerebellum of a 268-day-old non-Tg/*Pmp*^{0/0} mouse (Aa), a 262-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse (Ab), and a 43-day-old Tg(CJD-A21^{+/+}) mouse (Ac). Arrowheads point to the endoplasmic reticulum (ER) cisternae, which are normal in the non-Tg control (Aa) mouse but are fragmented and swollen in the Tg(CJD) mice (Ab and Ac). Scale bar in (Ac) (applicable to [Aa]–[Ac]) = 500 nm.

(B) Cultures of cerebellar granule neurons from non-Tg/*Pmp*^{+/+}, Tg(WT), and Tg(CJD-A21^{+/+}) mice were fixed and labeled with anti-PrP antibody using the Nanogold enhancement protocol. Wild-type PrP is mostly found at the plasma membrane (Ba); some staining is also visible in the ER (arrows) and in the Golgi complex (arrowheads). D177N/V128 PrP is mostly found in ER cisternae, which appear moderately (Bb) or strongly (Bc) enlarged and swollen. Scale bar in (Bc) (applicable to [Ba]–[Bc]) = 250 nm.

(C) Quantification of gold particles in different cell compartments. PM, plasma membrane.

(D) Quantification of ER and Golgi volumes of cultured cerebellar granule neurons.

Data are the mean ± SD of at least 10 cells per specimen.

complex (Figures 8Ba and 8C). In contrast, mutant PrP localized mostly in the ER of Tg(CJD) neurons (~75% versus ~2.5% in control cells), with a much smaller fraction of molecules on the plasma membrane (~15% versus ~85% in controls) (Figures 8Bb, 8Bc, and 8C). Cultured cerebellar neurons from the mutant mice showed striking alterations of the ER cisternae, which appeared enlarged, swollen, and electron-dense (Figures 8Bb, 8Bc, and 8D).

These results indicate altered trafficking of mutant PrP to the plasma membrane, protein retention in the ER, and morphological abnormalities in intracellular organelles.

DISCUSSION

The D178N/V129 haplotype is linked to a CJD subtype that has been described in families from Germany, France, Finland, Israel, and America (Young et al., 1999). The disease is characterized by early cognitive impairment with prominent memory deterioration, abnormal behavior, and progressive signs of motor dysfunction such as ataxia, tremor, and myoclonus, as well as characteristic neuropathological signs. In the present study, we found that mice carrying a transgene encoding the mouse homolog of the CJD¹⁷⁸ mutation accumulate an abnormal form of PrP in their brains and show neuropathological

changes of prion diseases. We also found that the mutant mice develop a neurological illness characterized by progressive motor dysfunction, deficits in spatial working memory, and abnormal sleep-wake behavior with dramatic reduction of REM sleep. Although sleep abnormalities are not commonly considered symptoms of CJD¹⁷⁸, we have now reported sleep disorganization with severe reduction of REM epochs in a recently diagnosed patient with the D178N/V129 mutation. Thus, our combined behavioral and neurophysiological analyses indicate that Tg(CJD) mice recapitulate essential clinical features of CJD¹⁷⁸. The results also suggest that perturbation of ER homeostasis due to mutant PrP misfolding may be a critical factor in neuronal dysfunction in inherited prion disease, indicating new pathogenic mechanisms and potential therapeutic strategies.

Clinical Features of Tg(CJD) Mice

Tg(CJD) mice expressing mutant PrP at a level comparable to that of endogenous PrP in wild-type mice develop a progressive neurological disease that can be easily scored on the basis of kyphosis, foot clasp reflex, unbalanced body posture, and ataxia. Tg(CJD) mice also show sensorimotor deficits, such as inability to climb on a vertically oriented grill and poor performance on a rotarod. These signs are indicative of motor dysfunction, a prominent clinical feature of CJD. No neurological signs are observed in nontransgenic littermates of Tg(CJD) mice or in Tg(WT) mice, strongly indicating that the phenotype is due to expression of the D177N/V128 transgene.

We found that expression of mutant PrP above the endogenous level dramatically exacerbates the Tg(CJD) phenotype. Homozygous mice of the A21 line develop neurological signs much earlier than hemizygous mice (at ~145 versus ~450 days of age) and show much faster disease progression, reaching the terminal stage in ~130 days (Figure 2B). Moreover, the G5 founder, which expressed eight times the endogenous PrP level, died with neurological disease at only 72 days of age, further supporting a direct correlation between D177N/V128 level and disease severity. In contrast, Tg(CJD) lines with PrP expression below the endogenous level remain healthy during their lifetime. This dose-dependent effect of mutant PrP expression has been described in other PrP mutant mice (Chiesa et al., 2000; Nazor et al., 2005; Telling et al., 1996) and supports the concept that higher levels of mutant PrP molecules result in earlier onset and a faster course of disease.

Consistent with the dominant mode of inheritance of CJD¹⁷⁸ (Goldfarb et al., 1992), expression of wild-type PrP does not rescue the neurological illness of Tg(CJD) mice. Tg(CJD) mice carrying either one or two copies of the endogenous wild-type *Prnp* allele develop neurological signs at an age similar to Tg(CJD)/*Prnp*^{0/0} littermates and invariably progress to terminal disease. Further experiments, however, are necessary to determine whether coexpression of wild-type PrP modifies any other aspects of the Tg(CJD) phenotype, such as the deficits in working memory or the alteration of sleep-wake patterns.

Memory loss is a distinctive early sign of CJD¹⁷⁸ (Brown et al., 1992). Tg(CJD) mice have a significant deficit in working memory detectable in the eight-arm radial maze well before onset of neurological signs. Tg(CJD) mice appear to be affected specifically in this function since they have no significant alterations in aspects of reference memory as measured by the passive avoidance, object recognition, or Morris water maze tests. Interestingly, Tg(CJD) mice show alterations in calretinin-positive mossy cell terminals of the hippocampus and bipolar interneurons of the cerebral cortex, which are thought to play important roles in spatial orientation and working memory (Crusio and Schwegler, 2005; Wang et al., 2004).

EEG Abnormalities and Sleep Disruption in Tg(CJD) Mice and a CJD¹⁷⁸ Patient

EEG alterations have been described in CJD since the early 1980s. The alterations depend on the stage of the disease, ranging from nonspecific findings such as diffuse slowing and frontal rhythmic delta activity in the early stage of disease to typical PSWC in the middle and late stages. PSWC has been reported in a carrier of the D178N/V128 mutation (Laplanche et al., 1992) and were also detected in the patient analyzed here.

Tg(CJD) mice develop striking pathological EEG alterations mimicking the human EEG pattern. Bursts of polyphasic complexes and, to a lesser extent, "sawtooth" waves resemble the EEG patterns observed in a feline model of CJD (Gourmelon et al., 1987) and can be regarded as the equivalent of human PSWC (Wieser et al., 2006).

Tg(CJD) mice also exhibit the sleep alterations seen in sporadic CJD (Landolt et al., 2006) and in the CJD¹⁷⁸ patient described here. The most striking feature is a highly significant reduction of REM sleep during both the light and dark phases

of the light-dark cycle in these mice. A second finding is the presence of epochs that cannot be assigned to any normal behavioral state based on standard criteria used for the polygraphic scoring of mouse sleep-wake behavior ("unscored" epochs). The pattern was similar in the CJD¹⁷⁸ patient, who spent a significant amount of time in a condition that could not be assigned to any normal vigilance or sleep state. A "nonwake-nonsleep" sub-wakefulness state has been recognized in FFI (Montagna et al., 2003) and in sporadic CJD (Landolt et al., 2006), and we found a severe reduction of sleep efficiency, virtual absence of REM sleep, and absence of usual ultradian modulation in our CJD¹⁷⁸ patient.

Longitudinal 24 hr monitoring and spectral EEG analysis in FFI patients show that an early and progressive reduction in thalamic sleep spindles and K complexes is an early marker in the natural history of the disease (Cortelli et al., 2006; Montagna et al., 2003); spindling activity was completely absent in the whole 24 hr recording of the CJD¹⁷⁸ patient described here. Thus, sleep promotion and organization appear to be altered in prion diseases regardless of the specific etiology, suggesting a "continuum" between FFI, CJD¹⁷⁸, and sporadic CJD.

The sleep-wake alterations observed in Tg(CJD) mice are not seen in non-Tg littermates and Tg(WT) mice, consistent with these alterations being caused by mutant PrP expression. PrP may regulate circadian rhythm and promote sleep continuity (Tobler et al., 1996), but no significant changes are seen in the percentage of time spent in wakefulness, REM sleep, and NREM sleep in *Prnp*^{0/0} mice. Therefore, the altered sleep-wake behavior of Tg(CJD) mice seen here is unlikely to be due to loss of any putative PrP function in sleep regulation.

Interleukin-1 and tumor necrosis factor are potent inhibitors of REM sleep (Obal and Krueger, 2003). These cytokines are elevated in sporadic and variant CJD and in CJD-infected mice (Kordek et al., 1996; Sharief et al., 1999), suggesting their involvement in the severe REM sleep reduction in Tg(CJD) mice and the CJD¹⁷⁸ patient.

Neuropathological Features and Biochemical Properties of Mutant PrP in Tg(CJD) Mice

PrP deposition in most forms of prion disease is extracellular, occurring either in typical amyloid plaques or as more diffuse "synaptic-like" deposits in perineuronal and perivacuolar structures throughout the neuropil. In familial CJD linked to the D178N/V129 mutation, weak "synaptic-like" and small focal deposits of PrP are observed (Parchi et al., 2003), and Tg(CJD) mice have the same types of PrP deposits.

A striking pathological alteration in Tg(CJD) mice that appears to be related to PrP deposition is the decrease of calretinin-positive GABAergic neurons in the dentate gyrus of the hippocampus and in layers II and III of the neocortex. In the hippocampus, loss of calretinin is accompanied by reduced synaptophysin staining, suggesting that presynaptic terminals are affected. In the neocortex, the decrease in calretinin is most evident in the neuropil, whereas the cell bodies retain a certain degree of immunoreactivity. These observations suggest that nerve terminals are primarily affected, consistent with the idea that synapses are the main targets of abnormal PrP (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004; Jeffrey et al., 2000; Kitamoto et al., 1992).

Specific subpopulations of GABAergic neurons in the hippocampus and cerebral cortex are selectively affected in sporadic CJD and in experimental prion diseases (Guentchev et al., 1997, 1998). In sporadic CJD, parvalbumin-positive interneurons in the frontal cortex are mostly involved, although there is also degeneration of calbindin- and calretinin-positive cells (Belichenko et al., 1999).

In CJD-infected mice, loss of GABAergic inhibitory neurons occurs very early after inoculation, suggesting that it may be an important step during disease development representing the basis of excitatory symptoms (Guentchev et al., 1997, 1998). Whether alterations of calretinin-positive GABAergic neurons in Tg(CJD) mice contribute to the EEG abnormalities observed in this model remains to be established.

Mutant PrP in the brains of Tg(CJD) mice can be distinguished from PrP^C by several biochemical properties, including propensity to form detergent-insoluble aggregates, protease resistance, and reactivity with the 15B3 antibody. D177N/V128 PrP, however, differs from mutant PrP in the brains of CJD¹⁷⁸ patients because it is much less protease resistant and has a smaller protease-resistant core, suggesting possible structural differences. Experiments to test whether mutant PrP in Tg(CJD) brains is infectious like that in CJD¹⁷⁸ patients (Brown et al., 1992) are underway.

Impaired Trafficking of Mutant PrP and Its Potential Role in Disease Pathogenesis

We observed that the ER of Tg(CJD) cerebellar granule neurons was dramatically swollen and electron-dense and contained abnormal amounts of mutant PrP. These data suggest that ER retention of mutant PrP may be an instigating pathogenic mechanism in cerebellar granule neurons that could also be active in other neuronal populations.

A number of inherited human diseases are attributable to defects in export of a mutant protein out of the ER (Aridor and Hannan, 2002). In some cases the misfolded mutant protein is triaged by the ER quality control and degraded by the proteasome; in other cases it is retained in the ER lumen and stimulates ER stress response pathways, such as the unfolded protein response (UPR), eventually leading to apoptosis (Kaufman, 1999). We have reported that PrP molecules carrying the D177N mutation are delayed in their biosynthetic maturation in the ER (Driscaldi et al., 2003) but are not subject to retrotranslocation and proteasomal degradation in cerebellar granule neurons (Floriti et al., 2005). No signs of UPR were detected in the brains of carriers of the D178N/V129 mutation (Unterberger et al., 2006), and we did not find splicing of the mRNA encoding X box-binding protein 1 or increased expression of UPR-regulated genes such as *Grp78/Bip* and *CHOP/GADD153* in the brains of Tg(CJD) mice (data not shown), suggesting that some other pathogenic mechanism may be triggered by this mutation. ER overload with mutant PrP may lead to activation of NF- κ B (Pahl and Baeuerle, 1997), with possible consequences for neuronal function and synaptic plasticity (O'Mahony et al., 2006). Alternatively, buildup of the mutant protein in the ER may perturb the ER calcium signaling essential for normal neuronal function (Mattson et al., 2000). Finally, aggregation of mutant PrP in the secretory pathway may interfere with folding, assembly, and transport of other membrane proteins, such as multimeric ion

channels or receptors (Schwappach, 2008), leading to defective synaptic transmission.

The fact that Tg(CJD) mice accumulate a misfolded form of mutant PrP in their brains and develop clinical features of CJD argues that essential aspects of pathogenesis are modeled in these animals. Tg(CJD) mice may be suitable for investigating disease mechanisms and testing potential therapies in inherited prion diseases. Since the mutant mice spontaneously develop profound alterations of sleep-wake behavior, they offer a unique model for investigating the pathophysiology of sleep in prion disorders. Finally, comparative studies of Tg(CJD) and transgenic mice expressing other mutant PrPs may provide important information on the cellular and molecular mechanisms responsible for the phenotypic heterogeneity of inherited prion diseases.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of Transgenic Mice

Production of transgenic Tg(WT) mice expressing wild-type PrP tagged with an epitope for the monoclonal antibody 3F4 has been reported previously (Chiesa et al., 1998). In this study, we used hemizygous or homozygous mice of the E1 line, which express two and four times the endogenous PrP level, respectively. The cDNA encoding mouse PrP derived from the *Pmp*^{0/0} allele and containing the 3F4 epitope tag and the D177N and M128V substitutions has been described previously (Floriti et al., 2005). The coding region of this cDNA was amplified by PCR using Vent polymerase (New England Biolabs) and ligated into the MoPrP.Xho vector, which contains a 12 kb fragment of *Pmp*, including the promoter and intron 1, and drives expression of transgenic PrP in a tissue pattern similar to that of the endogenous protein (Borchelt et al., 1996). Recombinant plasmids were selected by PCR screening and restriction analysis, and their identity was confirmed by sequencing the entire coding region (Chiesa et al., 1998). The transgene was excised by NotI digestion and injected into the pronuclei of fertilized eggs from an F2 cross of C57BL/6J \times CBA/J F1 parental mice. Transgenic founders were bred with an inbred colony of Zürich I *Pmp*^{0/0} mice (C57BL/6J \times 129 background) (Bueler et al., 1992; Chiesa et al., 2000). The status of the *Pmp* gene and the presence of the transgene were determined by PCR, and the zygosity of the transgene was determined by Southern blot analysis (Chiesa et al., 1998). The transgenic lines were maintained on the *Pmp*^{0/0} genotype. For some experiments, the *Pmp* allele was reintroduced by breeding transgenic mice to C57BL/6J \times CBA/J mice; nontransgenic *Pmp*^{+/+} and *Pmp*^{0/0} littermates were used as controls.

All procedures involving animals and their care were conducted according to European Union (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358,1; December 12, 1987) and Italian (D.L. n.116, G.U., suppl. 40; February 18, 1992) laws and policies and in accordance with the United States Department of Agriculture Animal Welfare Act and National Institutes of Health Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals.

Biochemical Analyses

Tissue homogenates were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% NP-40 and 0.5% sodium deoxycholate using a glass/Teflon tissue homogenizer. In some experiments, protease inhibitor cocktail (1 μ g/ml pepstatin and leupeptin; 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 2 mM EDTA) was added to the homogenization buffer. Assays of detergent insolubility, proteinase K (PK) resistance, and immunoprecipitation with antibody 15B3 were carried out as described previously (Biasini et al., 2008; Chiesa et al., 1998; Tremblay et al., 2004). Western blots were developed with monoclonal antibody 3F4 (Kasczak et al., 1987), which selectively recognizes transgenic PrP, or polyclonal antibody P45-66 raised against a synthetic peptide encompassing residues 45-66 of mouse PrP.

Clinical Analysis of Mice

Mice were observed weekly for signs of neurological dysfunction according to a set of objective criteria (Chiesa et al., 1998). Onset of disease was scored as

the time at which at least two of the following neurological signs were observed: foot-clasp reflex, kyphosis, unbalanced body posture, inability to walk on a horizontal metal grid, and inability to remain on a vertical grid for at least 30 s. An accelerating Rota-Rod 7650 (Ugo Basile) was used; mice were first trained twice the week before official testing. They were positioned on the rotating bar and allowed to become acquainted with the environment for 30 s. The rod motor was started at an initial setting of 3 rpm and accelerated to 30 rpm at a constant rate of 0.3 rpm/s for a maximum of 300 s. The performance was scored as latency to fall, in seconds. Animals were given three trials, and the average was used for statistical analysis.

Radial Maze

Spatial working memory was measured using an eight-arm radial maze made of gray plastic with a Plexiglas lid. The arms, which radiated from an octagonal central arena with a diameter of 12 cm, were 30 cm long, 5 cm wide, and 4 cm high. Several external visual cues surrounded the apparatus. Starting one week before testing, the mice were water deprived by being given access to water for only 1 hr per day. One day before starting the task schedule, a habituation trial was run. The mice were placed in the center of the maze and let free to explore the environment for 10 min. The next day, the arms of the radial maze were baited with 50 μ l of water. Animals were placed in the center of the maze, and the arm entry sequence was recorded. The task ended once all eight arms of the maze had been visited or after a maximum of 16 trials, whichever came first. Repeated entry into an arm that had already been visited constituted an error. The number of errors and the latency to complete the test were recorded manually by an operator (A.G.) blinded to the experimental groups. Animals were tested for 10 consecutive days.

EEG and Sleep-Wake Behavior

EEG and sleep patterns were investigated in six non-Tg/*Pmp*^{+/+}, six non-Tg/*Pmp*^{0/0}, six Tg(CJD-A21^{+/+}), and five Tg(WT-E1^{+/+}) mice. Mice were anesthetized and instrumented for chronic EEG recording according to standard techniques (Baracchi and Opp, 2008) and then allowed at least 10 days to recover from surgery and adapt to the recording conditions. Mice were individually housed in standard cages with food and water ad libitum. Cages were kept in sound-attenuated boxes at a constant temperature between 24.5°C and 26.0°C, with a 12/12 hr light-dark cycle. Gross body activity was detected using an infrared sensor housed in an observation unit that also contained a camera (BIOSSERVE GmbH) allowing continuous recording of the animals' behavior. Movements detected by the infrared sensor were converted to a voltage output. The conditioned EEG signal and the voltage output from the infrared sensor were digitized and collected using custom software (M.R. Opp, University of Michigan). EEG signals and gross body activity were recorded for 24 hr (starting at first light) in undisturbed conditions and used for polygraphic determination of vigilance state. The animals were not handled starting from 48 hr before the recording session. Two mice of different genotypes were randomly matched and recorded simultaneously. The order of recording of mice of the different lines was also randomized.

Postacquisition determination of vigilance state was performed according to standard criteria (Baracchi and Opp, 2008). Visual scoring of 12 s epochs was performed by an investigator (L. Ferrari or S.B.) blinded to the strain. As described in Results, it was sometimes impossible to assign certain epochs to any behavioral state in Tg(CJD) mice. In these cases, epochs were classified as "unscored." EEG power density values were obtained for each animal and each behavioral state by Fourier transform for each artifact-free 12 s scoring epoch for the frequency range 0.5–20 Hz.

Histology

Brains were fixed in Carnoy's fixative (6:3:1 ethanol:chloroform:acetic acid), dehydrated in graded ethanol solutions, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Serial sections (5 μ m thick) were cut and stained with hematoxylin and eosin, Nissl, or thioflavin S. Some sections were immunostained with rabbit polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Dako, 1:1000), anti-calretinin (Swant, 1:2000), anti-calbindin (Chemicon, 1:1000), or anti-synaptophysin (Dako, 1:200), followed by visualization with a Vectastain ABC kit (Vector) using 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. Alexa 488- or Alexa 546-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes Inc.) were used for immunofluorescence.

For PrP immunohistochemistry, sections were incubated with PK (2 μ g/ml in 0.1% Brij-35, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.8]) for 30 min at room temperature and exposed to guanidine thiocyanate (3 M in H₂O) for 30 min (Giaccione et al., 2000). PK-resistant PrP was detected with monoclonal antibody 3F4 (1:200) (Kascsak et al., 1987) or 12B2 (1:1000) (Langeveld et al., 2006). Results were similar with the two antibodies.

Electron Microscopy

One 269-day-old Tg(WT) mouse, two non-Tg/*Pmp*^{0/0} mice aged 268 and 392 days, two Tg(CJD-A21^{+/+})/*Pmp*^{0/0} mice aged 262 and 488 days, and one 43-day-old Tg(CJD-A21^{+/+})/*Pmp*^{0/0} mouse were deeply anesthetized and perfused through the ascending aorta with PBS (0.1 M; pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) and 2.5% glutaraldehyde in PBS. The cerebellum was excised and cut along the sagittal plane with a razor blade, postfixed in 3% glutaraldehyde in PBS, and immersed for 2 hr in OsO₄. After dehydration in a graded series of ethanol, tissue samples were cleared in propylene oxide, embedded in Epon 812 epoxy medium (Fluka), and polymerized at 60°C for 72 hr. From each sample, one semithin section (1 μ m) was cut with a Leica EM UC6 ultramicrotome and mounted on glass slides for light microscopic inspection to identify the Purkinje and granular cell layers. Ultrathin sections (70 nm thick) of the area of interest were obtained, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with an energy filter transmission electron microscope (Zeiss LIBRA 120 EFTEM) equipped with a YAG scintillator slow-scan CCD camera.

Immunoelectron Microscopy

Cerebellar granule neurons were prepared from 6-day-old mice as described previously (Fioriti et al., 2005) and cultured for 7 days before immunoelectron microscopy. Cells grown on poly-L-lysine-coated glass coverslips were washed with PBS and fixed in a solution of 4% PFA and 0.1% glutaraldehyde in 0.2 M HEPES buffer (pH 7.4) for 15 min at room temperature. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min in blocking solution (50 mM NH₄Cl, 0.1% saponin, 1% BSA in HEPES buffer) and then overnight at 4°C with anti-PrP monoclonal antibody SA65 (Matucci et al., 2005) or 12B2 (Langeveld et al., 2006) diluted 1:250 in blocking solution. Cells were washed and incubated for 1 hr at room temperature with Nanogold-conjugated anti-mouse IgG Fab' fragment diluted 1:100 in blocking solution and processed according to the Nanogold enhancement protocol (Nanoprobes). Stained cells were embedded in Epon 812 and cut as described previously (Polishchuk et al., 2003). EM images were acquired from thin sections using a Philips Tecnai 12 electron microscope equipped with an ULTRA VIEW CCD digital camera (Philips). Gold particles were quantified in the different compartments of the secretory pathway, and total cell, ER, and Golgi volumes were analyzed using analysis software (Soft Imaging Systems GmbH). The SA65 and 12B2 antibodies yielded similar results.

Polysomnography

The 24 hr EEG recordings, including complete polysomnography, were taken according to guidelines approved by the Standards of Practice Committee of the American Academy of Sleep Medicine (Kushida et al., 2005). The EEG was acquired with Ag/AgCl electrodes positioned over the vertex and the frontal, central, and occipital regions bilaterally, according to the International 10-20 Electrode Placement System. Two electrooculographic channels, respiratory channels, electrocardiography, bilateral tibialis anterior, and chin electromyography were also recorded. All signals were digitalized at a sampling rate of 256 Hz. The record was visually scored according to standard criteria (Rechtschaffen and Kales, 1968), and the hypnogram was stored digitally, linked to the recording. Arousals, cardiorespiratory events, and EMG activities were recognized by dedicated software and reviewed by a clinical neurophysiologist trained in sleep medicine. A control 24 hr recording was taken in an age-matched healthy subject in the same sleep laboratory.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data can be found online at [http://www.neuron.org/supplemental/S0896-6273\(08\)00755-1](http://www.neuron.org/supplemental/S0896-6273(08)00755-1).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank David Harris for making the transgenic facility of Washington University in St. Louis available to us, for the P45-66 antibody, and for comments on the manuscript. We also thank David Borchelt for the MoPrP.Xho vector, Charles Weissmann for the *Pmp*^{0/0} mice, Richard Kaskasak for the 3F4 antibody, Jan P. Langeveld for the 12B2 antibody, Gianluigi Zanusso for the SA65 antibody, and Alex Raeber and Bruno Oesch from Prionics (Zürich) for providing the 15B3 antibody. We are grateful to Roman S. Polishchuk of the Telethon Microscopy and Bio-Imaging Facility (Consorzio Mario Negri Sud) for immunogold staining of cerebellar granule neurons and for useful discussion, to Susanna Mantovani for assistance with animal perfusion and RNA extraction, and to Simona Airaghi for participating in the initial phase of this project. This work was supported by grants from Telethon Italy (TCR05006), "Fondazione Cariplo" and "Compagnia di San Paolo" to R.C., the European Community (QLG-CT-2001-2353 to R.C. and Network of Excellence Neuro-Prion to F.T. and R.C.), and the Italian Ministry of Health to F.T. L. Fioriti was supported by a fellowship from the Fondazione Monzino. R.C. is an Assistant Telethon Scientist (Dulbecco Telethon Institute, Fondazione Telethon).

Accepted: September 4, 2008
Published: November 25, 2008

REFERENCES

Aridor, M., and Hannan, L.A. (2002). Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic* 3, 781–790.

Baracchi, F., and Opp, M.R. (2008). Sleep-wake behavior and responses to sleep deprivation of mice lacking both interleukin-1 beta receptor 1 and tumor necrosis factor-alpha receptor 1. *Brain Behav. Immun.* 22, 982–993.

Belichenko, P.V., Miklossy, J., Belser, B., Budka, H., and Celio, M.R. (1999). Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Dis.* 6, 269–279.

Biasini, E., Seegulam, M.E., Patti, B.N., Solfrosi, L., Medrano, A.Z., Christensen, H.M., Senatore, A., Chiesa, R., Williamson, R.A., and Harris, D.A. (2008). Non-infectious aggregates of the prion protein react with several PrP^{Sc}-directed antibodies. *J. Neurochem.* 105, 2190–2204.

Borchelt, D.R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M.K., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., and Price, D.L. (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet. Anal.* 13, 159–163.

Bouzamondo-Bernstein, E., Hopkins, S.D., Spilman, P., Ueyehara-Lock, J., Deening, C., Safar, J., Prusiner, S.B., Ralston, H.J., 3rd, and DeArmond, S.J. (2004). The neurodegeneration sequence in prion diseases: evidence from functional, morphological and ultrastructural studies of the GABAergic system. *J. Neurobiol. Exp. Neurol.* 63, 882–899.

Brown, P., Goldfarb, L.G., Kovanen, J., Haltia, M., Cathala, F., Sulima, M., Gibbs, C.J., Jr., and Gajdusek, D.C. (1992). Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with the codon 178Asn *PrP* mutation. *Ann. Neurol.* 31, 282–285.

Bueller, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577–582.

Calleja, J., Carpizo, R., Berciano, J., Quintill, C., and Polo, J. (1985). Serial waking-sleep EEGs and evolution of somatosensory potentials in Creutzfeldt-Jakob disease. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 60, 504–508.

Chapman, J., Arlazoroff, A., Goldfarb, L.G., Cervenakova, L., Neufeld, M.Y., Werber, E., Herbert, M., Brown, P., Gajdusek, D.C., and Korczyn, A.D. (1996). Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200(Lys) mutation. *Neurology* 46, 758–761.

Chiesa, R., and Harris, D.A. (2001). Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol. Dis.* 8, 743–763.

Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B., and Harris, D.A. (1998). Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21, 1339–1351.

Chiesa, R., Drisaldi, B., Quaglio, E., Migheli, A., Piccardo, P., Ghetti, B., and Harris, D.A. (2000). Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5574–5579.

Cortelli, P., Perani, D., Montagna, P., Gallassi, R., Tinuper, P., Federica, P., Avoni, P., Ferrillo, F., Anchisi, D., Moresco, R.M., et al. (2006). Pre-symptomatic diagnosis in fatal familial insomnia: serial neurophysiological and 18FDG-PET studies. *Brain* 129, 668–675.

Crusio, W.E., and Schwegler, H. (2005). Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav. Brain Funct.* 1, 3.

Drisaldi, B., Stewart, R.S., Adles, C., Stewart, L.R., Quaglio, E., Biasini, E., Fioriti, L., Chiesa, R., and Harris, D.A. (2003). Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 278, 21732–21743.

Fioriti, L., Dossena, S., Stewart, L.R., Stewart, R.S., Harris, D.A., Forloni, G., and Chiesa, R. (2005). Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *J. Biol. Chem.* 280, 11320–11328.

Giaccone, G., Canciani, B., Puoti, G., Rossi, G., Goffredo, D., Iussich, S., Fociani, P., Tagliavini, F., and Bugiani, O. (2000). Creutzfeldt-Jakob disease: Carnoy's fixative improves the immunohistochemistry of the proteinase K-resistant prion protein. *Brain Pathol.* 10, 31–37.

Goldfarb, L.G., Petersen, R.B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A.C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W.W., et al. (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258, 806–808.

Goumleau, P., Amyx, H.L., Baron, H., Lemerrier, G., Court, L., and Gibbs, C.J., Jr. (1987). Sleep abnormalities with REM disorder in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in cats: a new pathological feature. *Brain Res.* 411, 391–396.

Guentchev, M., Hainfellner, J.A., Trabattoni, G.R., and Budka, H. (1997). Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurobiol. Exp. Neurol.* 56, 1119–1124.

Guentchev, M., Groschup, M.H., Kordek, R., Liberski, P.P., and Budka, H. (1998). Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathol.* 8, 615–623.

Hsiao, K.K., Scott, M., Foster, D., Groth, D.F., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 250, 1587–1590.

Jeffrey, M., Halliday, W.G., Bell, J., Johnston, A.R., MacLeod, N.K., Ingham, C., Sayers, A.R., Brown, D.A., and Fraser, J.R. (2000). Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26, 41–54.

Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., and Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61, 3688–3693.

Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1211–1233.

Kazukawa, S., Nakamura, I., Endo, M., Hori, A., and Inao, G. (1987). Serial polysomnograms in Creutzfeldt-Jakob disease. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 41, 651–661.

Kitamoto, T., Shin, R.W., Doh-ura, K., Tomokane, N., Miyazono, M., Muramoto, T., and Tateishi, J. (1992). Abnormal isoform of prion proteins

- accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* 140, 1285–1294.
- Kordek, R., Nerurkar, V.R., Liberski, P.P., Isaacson, S., Yanagihara, R., and Gajdusek, D.C. (1996). Heightened expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1-alpha, and glial fibrillary acidic protein in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9754–9758.
- Kushida, C.A., Littner, M.R., Morgenthaler, T., Alessi, C.A., Bailey, D., Coleman, J., Jr., Friedman, L., Hirshkowitz, M., Kapen, S., Kramer, M., et al. (2005). Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. *Sleep* 28, 499–521.
- Landolt, H.P., Glatzel, M., Blattler, T., Achermann, P., Roth, C., Mathis, J., Weis, J., Tobler, I., Aguzzi, A., and Bassetti, C.L. (2006). Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 66, 1418–1424.
- Langeveld, J.P., Jacobs, J.G., Erkens, J.H., Bossers, A., van Zijderveld, F.G., and van Keulen, L.J. (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet. Res.* 2, 19.
- Laplanche, J.L., Chatelain, J., Thomas, S., Launay, J.M., Gaultier, C., and Derouesse, C. (1992). Uncommon phenotype for a codon 178 mutation of the human PrP gene. *Ann. Neurol.* 31, 345.
- Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N., and Geiger, J.D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 23, 222–229.
- Matucci, A., Zanusso, G., Gelati, M., Farinazzo, A., Fiorini, M., Ferrari, S., Arighetto, G., Cestari, T., Caramelli, M., Negro, A., et al. (2005). Analysis of mammalian scrapie protein by novel monoclonal antibodies recognizing distinct prion protein glycoforms: an immunoblot and immunohistochemical study at the light and electron microscopic levels. *Brain Res. Bull.* 65, 155–162.
- Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P., and Lugaresi, E. (2003). Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol.* 2, 167–176.
- Nazor, K.E., Kuhn, F., Seward, T., Green, M., Zwald, D., Purro, M., Schmid, J., Biffiger, K., Power, A.M., Oesch, B., et al. (2005). Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J.* 24, 2472–2480.
- Obal, F., Jr., and Krueger, J.M. (2003). Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Front. Biosci.* 8, d520–d550.
- O'Mahony, A., Raber, J., Montano, M., Foehr, E., Han, V., Lu, S.M., Kwon, H., LeFevour, A., Chakraborty-Selt, S., and Greene, W.C. (2006). NF-kappaB/Rel regulates inhibitory and excitatory neuronal function and synaptic plasticity. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7283–7298.
- Pahl, H.L., and Baeuerle, P.A. (1997). The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem. Sci.* 22, 63–67.
- Parchi, P., Capellari, S., Chen, S.G., and Gambetti, P. (2003). Familial Creutzfeldt-Jakob disease. In *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*, D.W. Dickson, ed. (Basel, Switzerland: ISN Neuropath Press), pp. 298–306.
- Petersen, R.B., Parchi, P., Richardson, S.L., Urig, C.B., and Gambetti, P. (1996). Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 271, 12861–12868.
- Polishchuk, E.V., Di Pentima, A., Luini, A., and Polishchuk, R.S. (2003). Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Mol. Biol. Cell* 14, 4470–4485.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13363–13383.
- Rechtschaffen, A., and Kales, A. (1968). A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages in Human Subjects, National Institutes of Health Publication 204 (Washington, DC: US Government Printing Office).
- Schwappach, B. (2008). An overview of trafficking and assembly of neurotransmitter receptors and ion channels. *Mol. Membr. Biol.* 25, 270–278.
- Sharief, M.K., Green, A., Dick, J.P., Gawler, J., and Thompson, E.J. (1999). Heightened intrathecal release of proinflammatory cytokines in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 52, 1289–1291.
- Taratuto, A.L., Piccardo, P., Reich, E.G., Chen, S.G., Sevelev, G., Schultz, M., Luzzi, A.A., Rugiero, M., Abecasis, G., Endelman, M., et al. (2002). Insomnia associated with thalamic involvement in E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 58, 362–367.
- 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. *Genes Dev.* 10, 1736–1750.
- Terzano, M.G., Parrino, L., Pietrini, V., Mancina, D., Spaggiari, M.C., Rossi, G., and Tagliavini, F. (1995). Precocious loss of physiological sleep in a case of Creutzfeldt Jakob disease: a serial polygraphic study. *Sleep* 18, 849–858.
- Tobler, I., Gaus, S.E., DeBoer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., and Manson, J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639–642.
- Tremblay, P., Ball, H.L., Kaneko, K., Groth, D., Hegde, R.S., Cohen, F.E., Dearmond, S.J., Prusiner, S.B., and Safar, J.G. (2004). Mutant PrP^{Sc} conformers induced by a synthetic peptide and several prion strains. *J. Virol.* 78, 2088–2099.
- Unterberger, U., Hoffberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H., and Voigtlander, T. (2006). Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 348–357.
- Wang, X.J., Tegner, J., Constantinidis, C., and Goldman-Rakic, P.S. (2004). Division of labor among distinct subtypes of inhibitory neurons in a cortical microcircuit of working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1368–1373.
- Wieser, H.G., Schindler, K., and Zumsteg, D. (2006). EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Neurophysiol.* 117, 935–951.
- Young, K., Piccardo, P., Dlouhy, S., Bugiani, O., Tagliavini, F., and Ghetti, B. (1999). The human genetic prion diseases. In *Prions: Molecular and Cellular Biology*, D.A. Harris, ed. (Wymondham, UK: Horizon Scientific Press), pp. 139–175.

Risultati 2

Analisi del tempo trascorso nei diversi stadi comportamentali a 3 differenti età.

A seguito dei risultati descritti nel precedente capitolo, si è deciso di seguire l'evoluzione temporale della malattia di Creutzfeldt-Jakob nel nostro modello. Si è perciò provveduto ad eseguire le registrazioni polisonnografiche precedentemente descritte nei quattro ceppi in studio a 3 diverse età: 6 mesi (animali giovani), 12 (animali adulti) e 18 mesi (animali anziani). 18 mesi rappresenta l'età degli animali coinvolti nello studio precedente. I dati relativi allo studio dei vari ceppi a diverse età hanno permesso da un lato di seguire l'evolversi della malattia dall'animale giovane all'anziano e dall'altro lato di individuare la comparsa di eventuali alterazioni precoci che potrebbero essere utili per una più rapida diagnosi della malattia stessa.

Analisi del sonno REM

A livello del sonno REM (fig. 1a) gli animali Tg(CJD) hanno mostrato un comportamento compatibile con quello descritto in precedenza. In fase di luce, il sonno REM è risultato significativamente ridotto già negli animali di 12 mesi ($3,3\% \pm 0,6$) rispetto a quelli di 6 mesi ($8,7\% \pm 0,5$) e si è osservato che tale riduzione si mantiene costante negli animali anziani di 18 mesi ($3,7\% \pm 0,6$). I valori indicano la percentuale di tempo trascorso in sonno REM sul totale della registrazione (ventiquattr'ore).

Nel confronto con gli altri ceppi risulta subito evidente un grande differenza tra il ceppo Tg(CJD) ed i 3 ceppi di controllo: WT, Tg(WT) e KO.

A 6 mesi di età l'ammontare di sonno REM è risultato comparabile in tutti e 4 i ceppi analizzati in questo studio.

Viceversa, negli animali adulti (12 mesi) appartenenti ai 3 gruppi di controllo non è stata riscontrata la significativa diminuzione del sonno REM descritta nel ceppo Tg(CJD). Infine, nel confronto tra animali giovani ed anziani si ha una significativa diminuzione dell'ammontare di sonno REM solo negli animali WT, oltre che, come descritto, nel ceppo Tg(CJD).

Nel confronto fra ceppi diversi a 12 e 18 mesi di età, tutti i ceppi di controllo hanno presentato un ammontare di sonno REM significativamente maggiore rispetto al ceppo Tg(CJD).

In fase di buio l'ammontare di sonno REM è risultato fisiologicamente ridotto se comparato alla fase di luce, ciò a causa la circadianità tipica dei murini che sono animali notturni. L'analisi del

ceppo Tg(CJD) ha mostrato valori costanti alle 3 età. Il confronto con i ceppi WT e Tg(WT) non ha mostrato differenze statisticamente significative a nessuna delle età considerate. Per quanto riguarda il ceppo KO si ha un incremento del sonno REM a 18 mesi ($4,3 \% \pm 0,78$) se confrontato con animali dello stesso ceppo a 6 ($1,98\% \pm 0,4$) e 12 mesi ($1,64 \% \pm 0,67$). Per questo ceppo il confronto tra la fase di luce e la fase di buio a 18 mesi indica un'importante riduzione della normale differenza di tempo trascorso in sonno REM tra le due fasi del giorno. Questa minore differenza indica un'affievolimento della circadianità tipica dei murini negli animali di 18 mesi. Tale caratteristica è assente a 6 e a 12 mesi.

Analisi del sonno NREM

A livello del sonno NREM (fig 1b) in fase di luce gli animali hanno mostrato un comportamento omogeneo. All'età di 6 e 12 mesi tutti e 4 i ceppi hanno trascorso in questa fase un tempo simile. All'età di 18 mesi il solo ceppo Tg(CJD) ha mostrato una riduzione del sonno NREM se comparato agli animali di 12 mesi.

In fase di buio l'analisi del ceppo KO ha evidenziato un significativo aumento del tempo trascorso in sonno NREM degli animali di 18 mesi ($32,91 \% \pm 2,5$) se confrontati con quelli di 6 mesi ($22,27\% \pm 1,2$). Anche gli animali Tg(CJD) mostrano lo stesso incremento (tempo trascorso in sonno NREM a 6 mesi $23,34\% \pm 1,3$; a 18 mesi $27,68\% \pm 1,4$).

L'aumento, a 18 mesi, dell'ammontare di sonno NREM nella fase di buio, accompagnato alla riduzione di sonno NREM nella fase di luce, indica, ancora una volta, una riduzione della circadianità per questi ceppi.

Analisi della veglia

In fase di veglia (fig 1c) in condizioni di luce la sola variazione significativa è stato l'incremento di questa fase nel ceppo Tg(CJD) tra 6 mesi ($42,4\% \pm 1,4$) e 18 mesi ($54,71\% \pm 2,7$).

Anche i ceppi Tg(WT) e KO, tuttavia, sembrano presentare una tendenza all'incremento della veglia tra i 6 ed i 18 mesi.

In fase di buio gli animali anziani del ceppo KO hanno trascorso significativamente meno tempo in veglia ($62,75\% \pm 2,9$) sia rispetto agli animali giovani ($75,74\% \pm 1,5$) che a quelli adulti ($75,72\%$

$\pm 3,1$). Allo stesso modo i topi anziani del ceppo Tg(CJD) hanno trascorso meno tempo in veglia ($67,82\% \pm 1,7$) rispetto a quelli giovani ($74,35\% \pm 1,4$).

Viceversa i ceppi WT e Tg(WT) non hanno mostrato differenze statisticamente significative.

Analisi della frammentazione del sonno

L'analisi della frammentazione del sonno ha indicato (fig 1d), sia in condizione di luce che di buio, una tendenza all'aumento di questa caratteristica negli animali anziani rispetto ai gruppi più giovani in tutti i ceppi coinvolti nello studio, anche se con alcune differenze.

In fase di luce tutti i ceppi oggetto di studio hanno mostrato valori di frammentazione del sonno simili a 6 e 12 mesi di età. Viceversa, nel ceppo Tg(CJD) si è assistito ad un aumento significativo di transizioni nel confronto tra i topi giovani ($39,33 \pm 3,7$) e quelli anziani ($50,88 \pm 5,4$) (i valori esprimono il numero assoluto di transizioni per ora). Il ceppo WT, a sua volta, ha mostrato un aumento di transizioni nell'anziano ($45,81 \pm 2,6$) rispetto all'animale adulto ($35,25 \pm 1,99$).

In fase di buio la tendenza all'aumento della frammentazione negli animali anziani appare ancora più marcata. Nel ceppo Tg(CJD) viene replicato l'aumento di frammentazione già descritto in fase di luce tra gli animali di 18 mesi ($35,52 \pm 6,5$) e quelli di 6 ($16,79 \pm 1,1$). Gli animali KO mostrano un deciso incremento di transizioni sia nel confronto tra 6 ($15,7 \pm 1,5$) e 18 ($39,79 \pm 5,4$) mesi che nel confronto tra gli animali anziani e quelli di 12 mesi ($16,19 \pm 4,9$).

Differenze significative appaiono anche nel ceppo WT sia nel confronto tra 6 ($21,69 \pm 2,6$) e 18 ($31,37 \pm 3,2$) mesi che in quello tra i 12 ($20,2 \pm 0,8$) ed i 18 mesi.

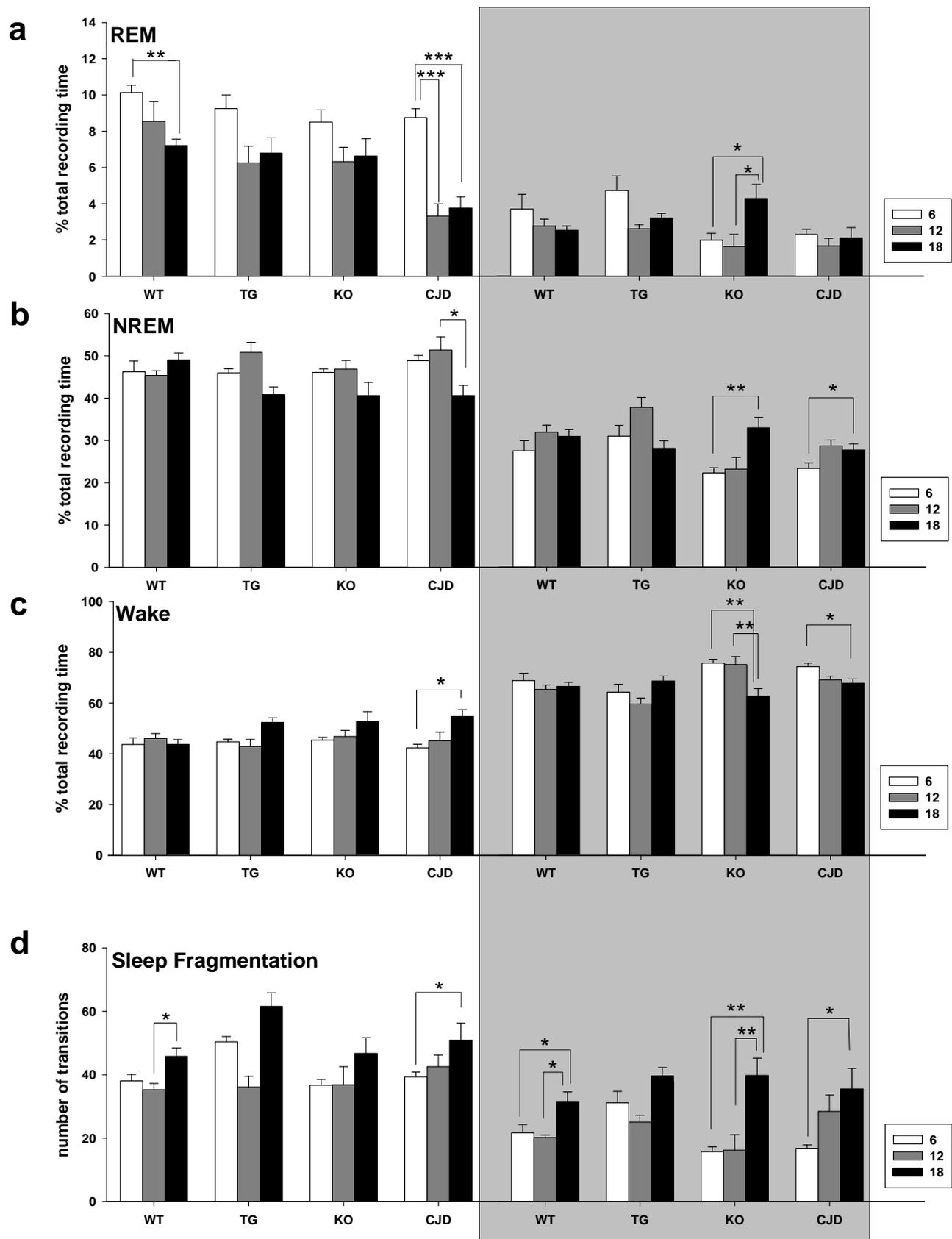


Figura 1

Percentuale del tempo (media ed errore standard) trascorso nelle 3 diverse fasi comportamentali (veglia, sonno NREM e sonno REM) e numero di transizioni tra stati comportamentali nelle 24 ore (suddivise in fase di luce e fase di buio) per 3 diverse classi di età. Valori per 8 animali non-Tg/PrP^{+/+} (WT), 11 animali

Tg(WT-E1^{+/-})(TG), 6 animali non-Tg/PrP^{0/0}(KO) ed 8 animali Tg(CJD-A21^{+/-}) (CJD). Il fondo bianco identifica i valori per le 12 ore di luce, il fondo grigio i valori per le 12 ore di buio. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative in seguito ad analisi tramite Anova a 3 vie. Risulta evidente la riduzione di sonno REM nel ceppo CJD tra 6 mesi e le 2 età maggiori in fase di luce. Numerosi i dati che indicano perdita di circadianità per gli animali KO e CJD. Il ceppo KO presenta, in condizioni di buio, incrementi di sonno REM e NREM a 18 mesi di età rispetto a 6 e 12 mesi, a questi si associa una diminuzione della veglia. Il ceppo CJD mostra invece: in fase di luce un aumento della veglia nel confronto 6-18 mesi ed una diminuzione del sonno NREM nel confronto 12-18 mesi, in fase di buio un incremento del sonno NREM (tra 6 e 18 mesi) ed una diminuzione della veglia (ancora tra 6 e 18 mesi). La frammentazione di sonno risulta in generale aumentata negli animali anziani rispetto ai più giovani per tutti i ceppi. In particolare il ceppo WT mostra un incremento a 18 mesi sia in fase di luce (nel confronto con gli animali di 12 mesi) che in fase di buio (nel confronto con entrambi i gruppi più giovani). Il ceppo TG(WT) ha mostrato un incremento tra animali adulti ed animali anziani. Il ceppo KO mostra un incremento in fase di buio tra i 6 e 18 mesi e tra 6 e 12. Il ceppo CJD, infine, mostra un incremento tra 6 e 18 mesi sia in fase di luce che di buio.

Risultati 3

Risposta a deprivazione di sonno.

Animali anziani

Sonno REM

L'analisi del sonno REM in seguito a deprivazione di sonno (sleep deprivation, SD) di sei ore negli animali anziani, ha mostrato un ridotto recupero di questa fase per i ceppi KO e Tg(CJD) ed un recupero più importante per i ceppi WT e Tg(WT) (fig 2a).

Nello specifico, nel ceppo Tg(CJD) si è avuto un recupero del sonno REM limitato alla fase di buio, dalla prima alla seconda ora e dalla quinta alla sesta; anche negli animali KO il recupero si è limitato alla sola fase di buio, dalla settima all'ottava ora.

Gli animali del ceppo Tg(WT) hanno mostrato un più esteso recupero di questa fase: nelle ultime quattro ore della fase di luce, nelle prime due ore di quelle di buio ed infine dalla settima all'ottava ora di buio. Anche gli animali WT hanno presentato un ampio incremento di sonno REM in seguito a SD, nelle ultime quattro ore della fase di luce e dalla terza alla sesta ora di buio.

Sonno NREM

L'analisi del sonno NREM ha indicato un recupero leggermente ridotto nel ceppo Tg(CJD) rispetto ai tre ceppi di controllo (fig 2b).

In particolare il ceppo Tg(CJD) ha mostrato un incremento di sonno NREM solo nelle prime due ore immediatamente al termine della deprivazione, mentre nelle ultime due ore al termine della fase di buio ha mostrato una diminuzione del sonno NREM in seguito a SD.

Viceversa il ceppo KO ha mostrato un incremento di sonno NREM nelle prime quattro ore al termine della SD, il ceppo Tg(WT) nelle prime sei ore ed il ceppo WT ha avuto un incremento di sonno NREM nelle ultime due ore della fase di luce e dalla terza alla sesta ora della fase di buio.

Veglia

I dati riguardanti la fase di veglia sono risultati speculari a quelli descritti per le due fasi di sonno. I ceppi KO e Tg(CJD) hanno mostrato un ridotto decremento della veglia in seguito a SD, mentre i ceppi Tg(WT) e WT hanno presentato una diminuzione più marcata (fig 2c).

Il ceppo Tg(CJD) ha mostrato un decremento di veglia limitato alle prime due ore dal termine della SD mentre per il ceppo KO è stato evidenziato un decremento nelle prime quattro ore dal termine della SD.

Viceversa il ceppo TG(WT) ha mostrato una riduzione della veglia per otto ore, dal termine della deprivazione ed il ceppo WT ha mostrato tale diminuzione per dieci ore a cavallo tra la fase di luce e quella di buio.

Banda Delta

Tutti i ceppi hanno mostrato un incremento della banda delta nelle prime ore dal termine della SD e, tranne il ceppo KO, hanno mostrato anche una diminuzione della stessa banda nella fase di buio.

In particolare il ceppo Tg(CJD) ha avuto un incremento della banda delta nelle prime sei ore dal termine della deprivazione e un decremento della stessa banda nelle prime quattro ore della fase di buio.

Il ceppo Tg(WT) ha mostrato a sua volta un incremento nelle prime sei ore della fase di luce al quale è seguito una diminuzione nelle ultime quattro ore della fase di buio.

Nel ceppo WT l'incremento della banda delta dopo SD si è limitato alle prime quattro ore dal termine della SD stessa, mentre il decremento è durato dalla terza all'ottava ora di buio.

Il ceppo KO, viceversa, a fronte di un aumento della banda delta nelle prime quattro ore dal termine della SD non ha mostrato nessun decremento della stessa nella fase di buio.

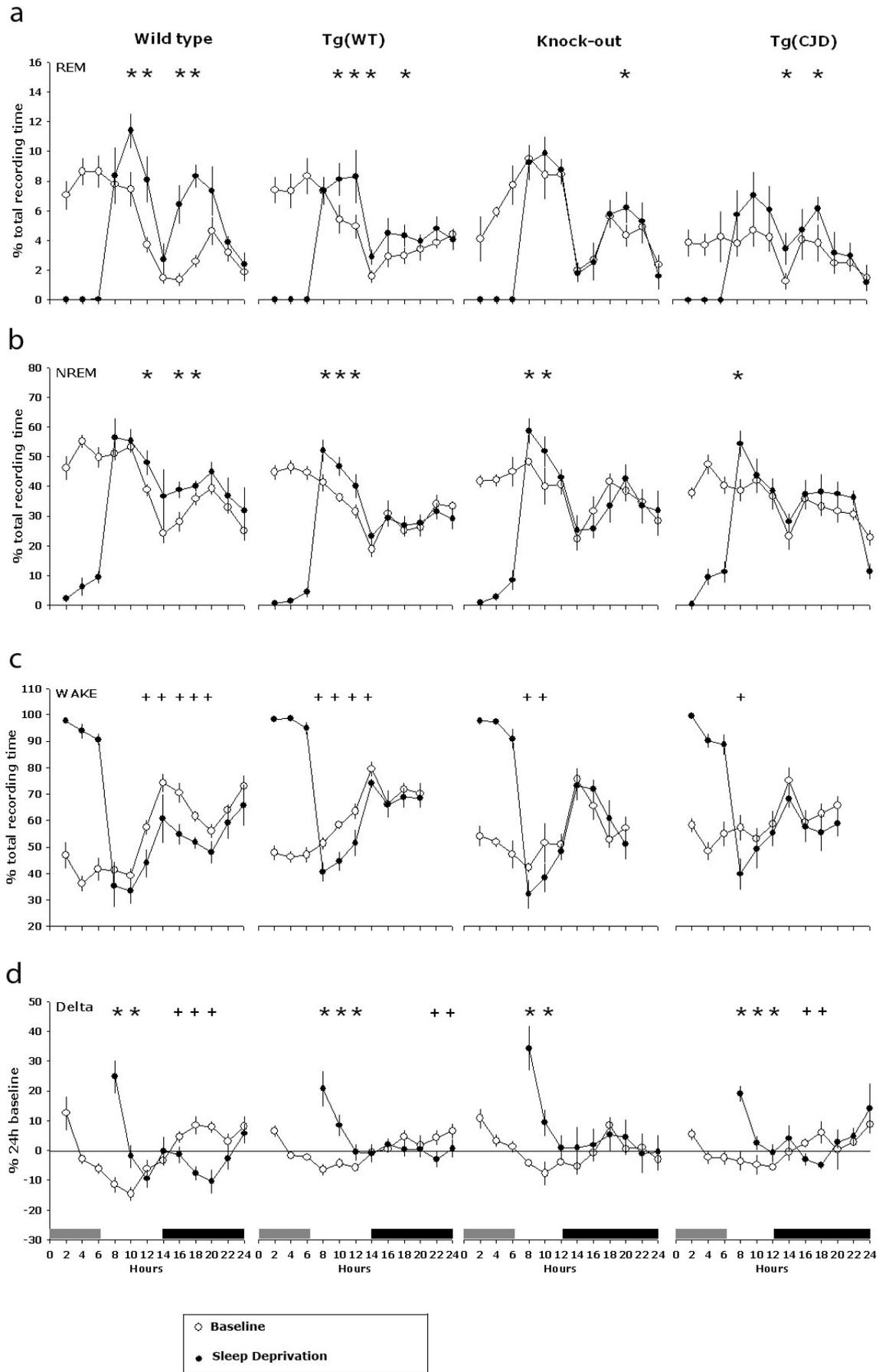


Figura 2

Effetto della privazione di sonno sul tempo trascorso nelle diverse fasi comportamentali e sulla banda delta negli animali anziani (18 mesi di età).

Dall'alto: sonno REM, NREM, veglia e banda delta (media della potenza dei segnali EEG compresi tra 0,5 e 4 Hz). La barra grigia indica le 6 ore di deprivazione, mentre la barra nera indica le 12 ore della fase di buio.

I punti delle curve rappresentano i valori medi per gruppi di due ore \pm l'errore standard, in nero l'andamento durante SD, in bianco in condizioni di controllo. Gli asterischi indicano un incremento statisticamente significativo ($p < 0,05$, l'analisi statistica descritta nella sezione M&M) del parametro in seguito a SD, le croci indicano un decremento in seguito ad SD. Le registrazioni e la deprivazione di sonno iniziano all'inizio della fase di luce.

Animali adulti

Sonno REM

A questa età i ceppi KO e Tg(CJD) hanno mostrato un recupero di sonno REM dopo SD ridotto rispetto ai ceppi Tg(WT) e WT (fig 3a).

Gli animali Tg(CJD) di questa età hanno mostrato un aumento di questa fase in seguito a SD limitato alle prime sei ore di buio. il ceppo KO ha limitato il suo aumento di sonno REM alla fase di buio, dalla quinta all'ottava ora e nelle ultime due ore. Viceversa il ceppo WT ha mostrato un incremento di sonno REM nelle ultime due ore di luce e nelle prime otto ore di buio dal termine della SD, mentre il ceppo Tg(WT) ha presentato un incremento nelle ultime quattro ore di luce e nelle prime quattro di buio e, ancora, dalla settima all'ottava ora di buio.

Sonno NREM

Il recupero di sonno NREM ha mostrato risultati simili nei ceppi WT, KO e Tg(CJD) mentre il ceppo Tg(WT) ha presentato un recupero ridotto (fig 3b).

In particolare il ceppo Tg(CJD) ha mostrato un incremento di questa fase nelle prime due ore di luce al termine della deprivazione ed, ancora, nelle ultime due ore sempre della fase di luce e nelle seguenti quattro ore della fase di buio.

Il ceppo KO ha evidenziato un incremento del sonno NREM nelle sei ore di luce dal termine della deprivazione fino e nella quinta-sesta ora di buio.

Il ceppo WT ha presentato un prolungato aumento di sonno NREM dopo SD, in particolare nelle sei ore di luce al termine della SD ed, ancora, dalla terza all'ottava ora di buio.

Come accennato il ceppo Tg(WT) ha avuto un recupero di sonno NREM minore, esso è risultato confinato al periodo che va dalla nona alla decima ora della fase di luce. Nelle ultime due ore della fase di buio in questo ceppo è stata riscontrata una riduzione del tempo trascorso in NREM dopo essere stato sottoposto a SD.

Veglia

Come atteso lo stato di veglia ha presentato, per tutti i ceppi, caratteristiche relativamente speculari a quelle del sonno NREM (fig 3c).

Il ceppo Tg(CJD) ha presentato una diminuzione della veglia nelle prime due ore dal termine della SD e per sei ore a cavallo tra la fase di luce e quella di buio. Nel ceppo KO è stata rilevata una diminuzione della veglia nelle sei ore al termine della derivazione e dalla nona alla decima ora di buio. Il ceppo Tg(WT) ha mostrato una diminuzione della veglia in otto ore, distribuite tra la fase di luce e quella di buio. Infine il ceppo WT ha presentato una riduzione della veglia nelle sei ore di luce dal termine della deprivazione e per altre sei ore durante la fase di buio.

Banda delta

L'analisi della banda delta ha mostrato per tutti i ceppi, un aumento, in seguito a deprivazione, nelle quattro ore immediatamente successive al termine della deprivazione stessa.

Viceversa, tutti i ceppi hanno mostrato una riduzione della banda stessa in seguito a deprivazione nella fase di buio (fig 3d).

Il ceppo Tg(CJD) ha mostrato una riduzione della fase delta dalla terza alla decima ora di buio.

Il ceppo KO dalla quinta all'ottava ora di buio e nelle ultime due ore della stessa fase.

Il ceppo Tg(WT) dalla terza alla quarta ora della fase di buio e nelle ultime due ore sempre della fase di buio.

Il ceppo WT nelle prime dieci ore della fase di buio.

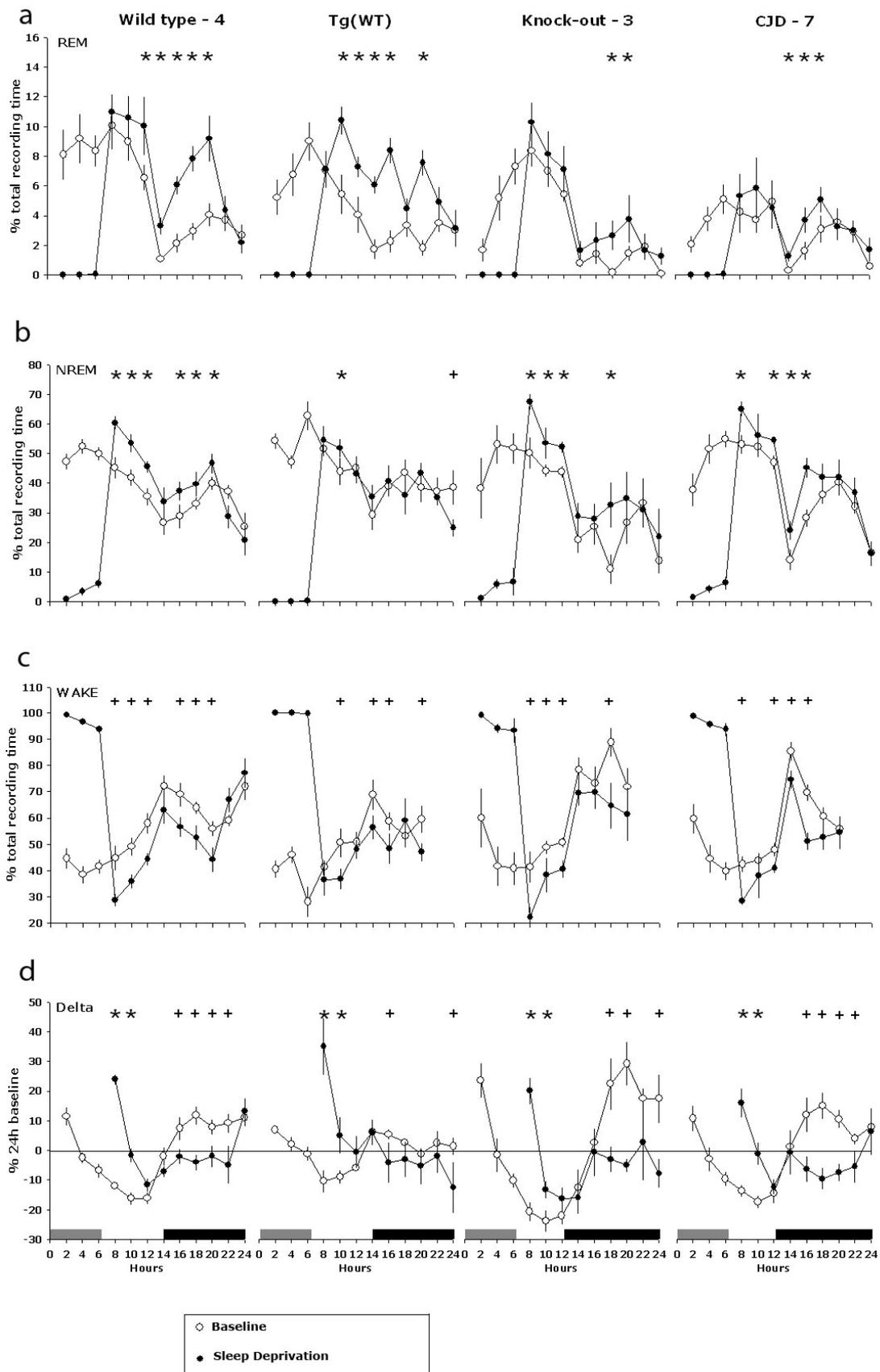


Figura 3

Effetto della privazione di sonno sul tempo trascorso nelle diverse fasi comportamentali e sulla banda delta negli animali adulti (12 mesi di età).

Dall'alto: sonno REM, NREM, veglia e banda delta (media della potenza dei segnali EEG compresi tra 0,5 e 4 Hz). La barra grigia indica le 6 ore di deprivazione, mentre la barra nera indica le 12 ore della fase di buio. I punti delle curve rappresentano i valori medi per gruppi di due ore \pm l'errore standard, in nero l'andamento durante SD, in bianco in condizioni di controllo. Gli asterischi indicano un incremento statisticamente significativo ($p < 0,05$, dopo analisi statistica descritta nella sezione M&M) del parametro in seguito a SD, le croci indicano un decremento in seguito ad SD. Le registrazioni e la deprivazione di sonno iniziano all'inizio della fase di luce.

Animali giovani

Sonno REM

Per quanto riguarda il sonno REM gli animali giovani si sono mostrati abbastanza omogenei, con incrementi dopo SD sia nella fase di luce che nella fase di buio (fig 4a).

Il ceppo Tg(CJD) ha evidenziato un incremento di sonno REM nelle prime due ore al termine della deprivazione, in sei ore a cavallo tra la fase di luce e quella di buio ed, infine, tra la nona e la decima ora della fase di buio. Il ceppo KO, a sua volta, ha avuto un incremento del sonno REM nelle quattro ore immediatamente al termine della deprivazione ed per sei ore durante la fase di buio. Il ceppo Tg(WT) ha mostrato un incremento della fase REM nelle otto ore immediatamente seguenti il termine della deprivazione e dalla nona alla decima ora della fase di buio. Infine, l'analisi del ceppo WT ha evidenziato un recupero del sonno REM nelle ultime due ore della fase di luce e dalla terza alla ottava ora della fase di buio.

Sonno NREM

Riguardo al sonno NREM, tutti i ceppi studiati hanno presentato un significativo incremento, paragonato alla registrazione di controllo, del tempo trascorso in questa fase nelle prime ore successive al termine della deprivazione di sonno (fig 4b)

Il ceppo Tg(CJD) ha presentato un incremento di questa fase nelle sei ore di luce seguenti la SD e nelle prime due ore di buio. Anche il ceppo KO ha mostrato un incremento del sonno NREM nelle 6 ore di luce seguenti la deprivazione; a ciò si è aggiunto un ulteriore incremento tra la terza e la sesta ora della fase di buio.

Il ceppo Tg(WT) ha avuto incrementi di NREM dopo SD sia nelle sei ore di luce seguenti la SD che nella terza-quarta e nona-decima ora di buio. Nel ceppo WT è stato descritto un incremento di sonno NREM nelle 4 ore di luce immediatamente seguenti la SD ed un ulteriore incremento al termine della fase di buio (dalla nona alla decima ora).

Veglia

In veglia i ceppi hanno mostrato un andamento assolutamente speculare a quello presentato in sonno NREM (fig 4c).

Banda delta

L'analisi della banda delta (fig 4d) ha mostrato un aumento in tutti i ceppi in seguito a deprivazione, in particolare nelle prime quattro ore dal termine della deprivazione. Tutti i ceppi, inoltre, hanno mostrato una diminuzione di questo valore nelle ore di buio che seguono la deprivazione, anche se con grande variabilità. In particolare: il ceppo WT ha presentato questo effetto durante la nona-decima ora di registrazione, il ceppo TG(WT) nelle prime due ore di buio, il ceppo KO nelle ultime sei ore di buio ed il ceppo Tg(CJD) per l'intera durata della fase di buio.

Figura 4

Effetto della deprivazione di sonno sul tempo trascorso nelle diverse fasi comportamentali e sulla banda delta negli animali giovani (6 mesi di età). Dall'alto: sonno REM, NREM, veglia e banda delta (media della potenza dei segnali EEG compresi tra 0,5 e 4 Hz). La barra grigia indica le 6 ore di deprivazione, mentre la barra nera indica le 12 ore della fase di buio. I punti delle curve rappresentano i valori medi per gruppi di due ore \pm l'errore standard, in nero l'andamento durante SD, in bianco in condizioni di controllo. Gli asterischi indicano un incremento statisticamente significativo ($p < 0,05$, in seguito all'analisi statistica descritta nella sezione M&M) del parametro in seguito a SD, le croci indicano un decremento in seguito ad SD. Le registrazioni e la deprivazione di sonno iniziano all'inizio della fase di luce.

Discussione

I risultati prodotti tramite la caratterizzazione del nuovo modello di CJD hanno mostrato, per questo animale, una riduzione marcata del sonno REM se comparata con i ceppi di controllo. Questa riduzione si è inoltre dimostrata specifica di questo stato e non estesa al sonno nel suo complesso. A questo si è affiancata la presenza di alterazioni elettroencefalografiche con caratteristiche morfologiche simili a quelle presenti in pazienti affetti da questa malattia (Wieser, Schindler et al. 2006) .

Lo studio degli animali a differenti età ha mostrato come la riduzione del sonno REM, oltre ad essere specifica del ceppo CJD, sia stata anche precoce. Essa infatti è comparsa già in animali di 12 mesi di età, quindi prima dell'età prevista per la prima comparsa dei sintomi della CJD (Tyler 2003).

Questo studio ha inoltre mostrato una riduzione della circadianità negli animali Tg(CJD) e negli animali KO.

Lo studio della deprivazione di sonno ha infine mostrato come, in questo caso, le alterazioni non siano state solo a carico del tempo trascorso in sonno REM in condizioni di controllo ma si siano riflesse anche in caso di perturbazioni del sonno stesso. Inoltre in queste condizioni non è il solo sonno REM degli animali Tg(CJD) ad essere stato affetto ma quello di tutti i ceppi con alterazioni della PrP, mostrando forse come, in condizioni di stress, qualunque sistema con alterazioni, anche lievi, della PrP sia maggiormente pronò a mostrare alterazioni dei meccanismi di regolazioni di questo stato.

Caratterizzazione del ceppo Tg(CJD)

Nello studio delle malattie neurodegenerative riveste un ruolo particolarmente importante la possibilità di lavorare su modelli animali che presentino tutte, o quasi, le caratteristiche riscontrabili nei pazienti affetti dalle stesse malattie.

Nel topo, l'animale ormai d'elezione nel campo della ricerca biomedica, specie di tipo genetico, per quanto riguarda le malattie prioniche, esistevano, fino a poco tempo fa, solo modelli in

grado di esprimere i disordini motori ma non quelli cognitivi (Hsiao, Scott et al. 1990; Telling, Haga et al. 1996; Chiesa, Piccardo et al. 1998) e nemmeno le alterazioni elettroencefalografiche che, invece, erano già state descritte nei pazienti (Gloor 1980).

Per questi motivi si è deciso di lavorare alla creazione di un nuovo modello murino in grado di riassumere in sé tutte le caratteristiche del morbo di Creutzfeldt-Jacob (CJD) già descritte in studi clinici.

Per rendere possibile un parallelo tra l'uomo e l'animale il gruppo di Roberto Chiesa ha deciso di sviluppare come modello della malattia un topo transgenico di variante genetica della malattia causata da una mutazione che fosse presente in entrambe le specie, topo ed uomo.

L'attenzione venne focalizzata sulla mutazione D178N/V129. Questa mutazione è, infatti, relativamente diffusa e caratterizzata nell'uomo (Young, Piccardo et al. 1999) ed è, perciò, facilmente confrontabile con un nuovo modello animale. La relativamente alta frequenza della mutazione ha reso possibile un confronto tra il modello murino ed una paziente ricoverata presso l'istituto neurologico Besta di Milano.

Questa variante della CJD presenta, oltre ad i tipici sintomi motori della malattia, quali miocloni ed atassia, anche disturbi cognitivi e comportamentali, accompagnati da reperti neuropatologici.

Caratteristica rimarchevole di questa mutazione è anche che la sostituzione aminoacidica D178N, pur essendo necessaria per l'espressione della malattia, non è sufficiente. Il sito polimorfico in posizione 129 svolge infatti un ruolo cruciale, in quanto, in presenza della mutazione, l'espressione di valina in questo punto causa la CJD, mentre la comparsa di metionina causa l'insonnia fatale familiare (Zarranz, Dignon et al. 2005), una diversa malattia prionica.

Dopo la creazione di un topo esprimente l'omologo murino della mutazione umana (D177N/V128) si è perciò provveduto ad analizzarne le caratteristiche da tutti i punti di vista, da quello comportamentale a quello istologico, per poterne dare una descrizione il più completa possibile.

Gli animali Tg(CJD) sono stati comparati con i 3 diversi ceppi di controllo. Tutti questi animali sono stati analizzati intorno ai 18 mesi di età: tale età, piuttosto avanzata per il topo, è stata scelta in quanto la mutazione oggetto di studio presenta i suoi sintomi non nel soggetto giovane ma in quello più anziano (Gambetti, Kong et al. 2003).

Innanzitutto gli animali Tg(CJD) hanno mostrato la presenza di alterazioni motorie, caratteristica tipica della CJD. In particolare hanno mostrato la comparsa di atassia, miocloni, cifosi ed una postura caratteristica se sospesi in aria. Lo sviluppo di questi segni è in accordo con quelli descritti in precedenti modelli murini di questa patologia (Hsiao, Scott et al. 1990; Chiesa, Piccardo et al. 1998).

Dato che i disturbi cognitivi e la perdita di memoria sono tra i segni più prominenti nei pazienti affetti da CJD (Brown, Goldfarb et al. 1992; Tyler 2003), gli animali oggetto di studio sono stati sottoposti a test per valutarne le capacità di apprendimento spaziale. Nel test del labirinto ad 8 bracci gli animali del ceppo Tg(CJD) hanno ottenuto un risultato significativamente peggiore se comparati ad i 3 ceppi di controllo.

La presenza di alterazioni elettroencefalografiche in pazienti affetti da CJD è nota da tempo (Tyler 2003) e le loro caratterizzazioni sono sempre più precise (Wieser, Schindler et al. 2006). Anche in modelli animali della malattia sono state riportate numerose e varie alterazioni elettroencefalografiche (Bassant, Cathala et al. 1984). Per tale motivo è stato deciso di effettuare negli animali oggetto di studio registrazioni elettroencefalografiche e di caratterizzare le eventuali alterazioni riscontrate.

L'analisi dei tracciati ha evidenziato la comparsa di importanti alterazioni del tracciato nei topi Tg(CJD), alterazioni assenti negli animali di controllo. Queste alterazioni si sono presentate sotto 2 forme differenti.

Da un lato sono stati registrati numerosi complessi di onde polifasiche dalla frequenza costante, intorno ai 7 hertz, complessi ritrovati in elevato numero in tutti gli animali Tg(CJD) testati. Dall'altro lato si è evidenziata la comparsa di onde più lente, dette a dente di sega per la loro natura monomorfa, con un picco di frequenza intorno ai 4 hertz. Questo secondo tipo di alterazione è risultato molto meno diffuso del precedente.

È interessante notare come sia possibile trovare similarità tra le alterazioni elettroencefalografiche descritte in letteratura e quelle riportate nel modello oggetto di studio. Questi paralleli rafforzano considerevolmente l'ipotesi che tali alterazioni siano correlate alla malattia.

In particolare i complessi polifasici descritti sono analoghi a quelli descritti in un modello di ratto infettato con scrapie (una variante infettiva di CJD presente nelle pecore) (Bassant, Cathala et al. 1984). Analogamente, uno studio su un modello felino, aveva riportato la presenza di alterazioni

elettroencefalografiche con interessanti analogie con quelle descritte poco sopra nel modello Tg(CJD) (Gourmelon, Amyx et al. 1987).

Il parallelo con il paziente risulta, naturalmente, più complesso. Non bisogna infatti dimenticare la complessità enormemente superiore del cervello umano rispetto a quello murino. Non è però esagerato guardare alle alterazioni descritte nell'uomo come l'equivalente di quelle descritte nel modello animale.

Come accennato nell'introduzione, è nota da tempo la relazione tra malattie prioniche e sonno (Ironsides and Head 2008), anche se in questo ambito l'attenzione si è sempre focalizzata principalmente sull'insonnia fatale familiare. Nel 2006, tuttavia sono state descritte alterazioni del sonno anche in pazienti affetti da morbo di Creutzfeldt-Jakob (Landolt, Glatzel et al. 2006). Inoltre altri studi hanno evidenziato alterazioni del ciclo sonno-veglia in animali KO per la PrP, suggerendo perciò un suo ruolo nella regolazione del sonno. Per questi motivi è risultato immediatamente interessante sottoporre il ceppo Tg(CJD) ed i ceppi di controllo all'analisi polisonnografica.

Come descritto nei risultati, il ceppo Tg(CJD) ha mostrato un quantitativo di tempo trascorso in sonno REM estremamente ridotto, se comparato con i 3 ceppi di controllo. Questa riduzione è risultata presente sia nella fase di luce che nella fase di buio. Oltre a questo importante risultato va sottolineato come l'analisi elettroencefalografica abbia mostrato la presenza di epoche (periodi della durata di 12 secondi in cui vengono suddivisi i tracciati acquisiti per permetterne l'analisi) che non è stato possibile assegnare ad un preciso stato comportamentale, a causa delle alterazioni elettroencefalografiche presenti. È importante ricordare che, nei pazienti affetti da CJD in stadio avanzato, non è possibile identificare gran parte delle epoche, proprio a causa dell'importanza delle alterazioni osservate (Wieser, Schindler et al. 2006).

Al termine delle analisi comportamentali tutti gli animali sono stati sottoposti ad analisi istologiche e biochimiche, nel tentativo di evidenziare una possibile fonte delle alterazioni descritte. Negli animali Tg(CJD) è stata descritta la deposizione di piccoli accumuli di PrP nell'intorno dei neuroni. Tale tipo di depositi è in accordo con altri precedentemente descritti per la variante umana di questa stessa mutazione (Parchi, Capellari et al. 2003).

In conclusione della prima parte di questo lavoro è possibile iniziare a sottolineare alcune importanti conclusioni. Come detto in precedenza lo scopo principale di questo lavoro era

quello di creare e caratterizzare un nuovo modello animale di morbo di Creutzfeldt-Jakob che esprimesse in sé tutti i sintomi ed i segni (o almeno la maggior parte di essi) che si presentano nell'uomo in questa grave malattia.

Come descritto in questa e nelle precedenti sezioni, i topi Tg(CJD) hanno mostrato tutti i principali segni della CJD, da quelli motori alle alterazioni del sonno ed elettroencefalografiche. Per questi motivi non sembra esagerato ritenere gli animali Tg(CJD) come un ottimo modello per lo studio della malattia di Creutzfeldt-Jakob, sia per approfondire le conoscenze sulla genesi e l'evoluzione di questa malattia, sia per tentare nuovi approcci terapeutici.

Inoltre la selettiva riduzione del sonno REM nel modello in studio si mostra estremamente interessante anche in quanto modello per lo studio delle alterazioni del sonno nelle malattie prioniche ed, eventualmente, anche in altre malattie causate da accumulo di proteine mutate a livello cerebrale.

Oltre alla caratterizzazione del ceppo Tg(CJD) i dati discussi in questa sezione permettono di trarre anche un'altra conclusione. L'assenza di alterazioni negli animali KO in questa parte dello studio indica che le alterazioni viste nel ceppo esprimente la proteina con la mutazione D177N/V128 sono probabilmente dovute ad un guadagno di funzione di questa proteina, invece che ad una perdita di funzione della stessa.

In conclusione di questa parte del lavoro è importante anche tentare di dare una spiegazione in grado di giustificare la specifica riduzione di sonno REM negli animali Tg(CJD). È noto che elevati livelli di interleuchina-1 e fattore di necrosi tumorale vengono raggiunti in pazienti affetti da CJD (Sharief, Green et al. 1999), così come in modelli animali di questa malattia (Kordek, Nerurkar et al. 1996). Tali citochine sono conosciute per essere potenti inibitori del sonno REM. È perciò possibile che un loro elevato livello nel nostro modello animale sia alla base dell'importante riduzione del sonno REM che è stata riscontrata.

Studio longitudinale

Nel precedente paragrafo l'attenzione è stata focalizzata sulla ricerca dei segni clinici tipici della CJD negli animali del ceppo Tg(CJD), per poter permettere una caratterizzazione degli stessi. È risultato però subito evidente che non poteva bastare il solo limitarsi alla valutazione di questi parametri. Sebbene al momento non esista una terapia efficace per nessuna malattia da prioni resta comunque importante la capacità di diagnosticare precocemente la presenza di queste malattie. Perciò, sulla base dei risultati ottenuti, nella seconda parte del progetto, si è deciso di

approfondire il lavoro di caratterizzazione del nostro modello murino transgenico per la PrP mutata mediante uno studio longitudinale. L'obiettivo di un tale disegno sperimentale era avere da un lato un quadro dell'evoluzione della malattia nel tempo e dall'altro la possibilità di individuare segni precoci della malattia, segni che precedano la comparsa dei sintomi motori stessi.

Come detto, nella prima fase del lavoro di caratterizzazione si è scelto di lavorare con animali di 18 mesi di età, cioè animali anziani. Le ragioni di questa scelta sono da ricercarsi nel fatto che le malattie da prioni e la CJD in particolare, hanno generalmente un'età d'esordio piuttosto avanzata, con un picco intorno ai 70 anni di età (Ironsides and Head 2008).

Avendo riscontrato la presenza di alterazioni in tutti gli animali del ceppo Tg(CJD) di 18 mesi di età si è deciso di mantenere questa età per gli animali anziani. Infatti, nonostante i topi possano vivere oltre i 18 mesi (Meydani 1999), bisogna considerare il fatto che nella procedura sperimentale essi vengono sottoposti ad un vero intervento chirurgico per l'impianto degli elettrodi per le registrazioni polisonnografiche. Un'operazione di questo tipo, svolta nell'animale anziano, comporta tempi di recupero più lunghi rispetto all'animale giovane. Risulta quindi molto difficile spingersi oltre una certa soglia, sia per l'aumento dei tempi di recupero sia per l'incremento di possibilità che l'animale non sopporti l'operazione. Per seguire e caratterizzare l'evoluzione temporale della malattia si è presa la decisione di affiancare agli animali anziani due ulteriori gruppi: animali di 6 e di 12 mesi di età. 6 mesi rappresentano un'età in cui lo sviluppo neuronale è terminato nel topo, ma alla quale non è attesa la comparsa di segni del morbo di Creutzfeldt-Jakob. 12 mesi rappresenta invece l'età intermedia tra 6 e 18 mesi, si è perciò pensato che questa potesse essere la soglia alla quale iniziano a manifestarsi i segni della malattia.

Per tutte le età prese in considerazione sono stati studiati, oltre al ceppo Tg(CJD), anche i 3 ceppi di controllo precedentemente descritti (Tg(WT), KO e WT).

Di cruciale importanza è la riduzione del sonno REM negli animali di 12 mesi di età.

Mentre gli animali Tg(CJD) più giovani trascorrono in questo stato un tempo comparabile a quello degli altri ceppi, gli animali di 12 mesi di età passano significativamente meno tempo in questo stato rispetto ai ceppi di controllo. Indicando quindi una avvenuta repentina diminuzione del tempo trascorso in REM.

Poiché la diagnosi di malattia di Creutzfeldt-Jakob viene usualmente effettuata solo dopo la comparsa dei sintomi cognitivi e di alcuni sintomi motori (Tyler 2003), la diminuzione di sonno

REM potrebbe presentarsi come un nuovo fattore diagnostico precoce, non va infatti dimenticato che gli animali di 12 mesi sono ancora relativamente giovani mentre la CJD si manifesta, generalmente, nei soggetti anziani.

Inoltre anche l'analisi del sonno REM nella fase di luce negli animali Tg(CJD) più anziani ha confermato, se comparata agli altri gruppi, la riduzione descritta nella sezione precedente della tesi.

Il risultato ottenuto negli animali adulti ha confermato, inoltre, come il ridotto ammontare di sonno REM negli animali più anziani non sia frutto di un'alterazione aspecifica del background genetico durante la generazione degli animali, bensì la conseguenza di processi che, a 6 mesi di età, non hanno ancora avuto modo di manifestarsi.

Le fasi di veglia e di sonno NREM presentano allo stesso modo un andamento interessante. In luce l'aumento di tempo trascorso in veglia all'aumentare dell'età e la parallela riduzione del tempo trascorso in sonno NREM sono in accordo con dati descritti in varie altre specie in animali WT, tra cui il ratto (van Gool and Mirmiran 1986) e uomo (Hobson 1995).

In fase di buio, viceversa, si assiste ad un incremento del sonno NREM con l'età ed ad una riduzione della veglia. Per quanto questo andamento sia in contraddizione rispetto a quello in luce, una possibile spiegazione risiede nell'attenuazione del ritmo circadiano di veglia e sonno in questi animali. I topi sono infatti animali notturni che trascorrono circa il 60% del tempo in veglia in condizioni di buio a fronte del 40% trascorso in questa fase comportamentale in condizione di luce (Hobson 1995). Un cambiamento in questo comportamento indica un'alterazione a livello della regolazione del ciclo circadiano in questi animali. Quanto rilevato nei topi Tg(CJD) è in completo accordo con i dati presenti in letteratura per la malattia di Creutzfeldt-Jakob. Nei pazienti è infatti evidente una perdita del comportamento circadiano come descritto sia nella precedente sezione che in lavori presenti in letteratura (Tyler 2003; Landolt, Glatzel et al. 2006). È importante ricordare come questa ridotta circadianità (cioè la ridotta differenza tra il tempo trascorso nelle diverse fasi comportamentali nelle condizioni di luce e di buio), oltre che essere collegata allo sviluppo della malattia, potrebbe, almeno in parte, essere legata ai normali processi di invecchiamento. Tuttavia l'analisi comparata con animali di controlli anziani non affetti dalla malattia permette di scorporare la componente legata alla malattia da quella legata ai normali processi di invecchiamento. Inoltre l'assenza di questo tipo di alterazioni negli animali WT è un ulteriore indizio della specificità di quanto descritto negli

animali KO e Tg(CJD). L'aumento di attività nella fase in cui dovrebbe prevalere il riposo e la sua speculare diminuzione nella fase in cui questa dovrebbe raggiungere un picco è infatti stata ampiamente associata ai processi di invecchiamento in varie specie: nell'uomo (Cajochen, Munch et al. 2006) nei primati (Perret and Aujard 2006), in varie specie di roditori (Weinert 2000) ed anche, al di fuori dei mammiferi, nella *Drosophila* (Grotewiel, Martin et al. 2005).

L'analisi di animali KO per la PrP si rivela parimenti interessante. Le variazioni descritte nella fase di buio (aumento di sonno REM e NREM e diminuzione della veglia) vanno, come per gli animali CJD, nella direzione di attenuare la circadianità tipica degli animali notturni. Si arriva ad avere, infatti, un quantitativo di tempo trascorso nelle varie fasi comportamentali molto simile sia in buio che in luce. Alterazioni della circadianità in topi privi della PrP sono state descritte anche in altri articoli presenti in letteratura (Tobler, Gaus et al. 1996). Questi dati, associati all'attenuazione della circadianità negli animali Tg(CJD), supportano la tesi che la proteina prionica giochi un ruolo nella regolazione del ritmo circadiano (Steele, Lindquist et al. 2007).

Gli animali WT hanno mostrato una tendenza alla diminuzione del quantitativo di sonno REM con l'aumentare dell'età. Questi dati sono in accordo con altri presenti in letteratura e riferiti a varie specie, dall'uomo (Hobson 1995; Ohayon, Carskadon et al. 2004) al ratto (Zepelin, Whitehead et al. 1972; Rosenberg, Zepelin et al. 1979). Anche esperimenti condotti in vari ceppi di topi WT hanno mostrato una riduzione del sonno REM tra 6 mesi e la vecchiaia (Hasan, Dauvilliers et al.).

Per quanto riguarda la fase di veglia, nell'animale WT essa si mantiene relativamente costante. Non sono state rilevate differenze significative nemmeno per quanto riguarda il sonno NREM. Gli animali Tg(WT) hanno mostrato, per quanto riguarda l'analisi del sonno, risultati simili a quelli descritti negli animali WT.

L'aumento della frammentazione del sonno, presente in tutti i ceppi, ben si accorda con altri dati presenti in letteratura su animali anziani di varie specie e sull'uomo (Hasan, Dauvilliers et al. ; Kryger, Roth et al. 2005). E' anche interessante sottolineare come il ceppo CJD sia l'unico che presenta una tendenza all'aumento della frammentazione già a partire dai 12 mesi di età, in fase di buio. Questa caratteristica potrebbe risultare di particolare interesse. Sebbene infatti un aumento della frammentazione sia normale nell'anziano, non bisogna dimenticare che nei

soggetti affetti da CJD questa caratteristica risulta particolarmente marcata ed essi tendono a non raggiungere fasi NREM o REM consolidate (Landolt, Glatzel et al. 2006).

In conclusione va sottolineato che gli animali Tg(CJD) di 18 mesi presentano una riduzione del sonno REM associata ad una ridotta circadianità ed ad un'aumentata frammentazione del sonno rispetto all'animale giovane. Tutte queste caratteristiche ben si accordano con i risultati ottenuti da studi clinici condotti su pazienti. Inoltre tali alterazioni mostrano una comparsa già nell'animale di 12 mesi di età e risultano quindi potenzialmente interessanti sia come precoce strumento diagnostico che come strumento di ricerca, in quanto potrebbero permettere di individuare le aree cerebrali più precocemente colpite dalla malattia.

D'altro lato i dati sugli animali KO si mostrano in accordo con quanto presente in letteratura ed indicano un possibile ruolo di questa proteina nella regolazione del ritmo circadiano.

Poiché la perdita di circadianità è presente sia nel ceppo Tg(CJD) che nel ceppo KO è forse possibile ipotizzare che, specificamente riguardo questa caratteristica, il danno rilevato negli animali affetti da morbo di Creutzfeldt-Jakob sia riconducibile ad una perdita di funzione della proteina prionica. È poi importante sottolineare ancora una volta la specificità della diminuzione di sonno REM negli animali Tg(CJD). La riduzione di sonno è apparsa infatti confinata a questa fase ed a questo solo ceppo. Gli animali di altri ceppi anziani non hanno presentato riduzioni di sonno NREM o di sonno REM, mentre la riduzione di sonno NREM nel ceppo Tg(CJD) è risultata marginale. Alla luce di questi aspetti è possibile sostenere che la riduzione di sonno REM sia specifica di questa fase e non risultante da un'aspecifica riduzione del sonno in generale imputabile alla CJD od al naturale processo di invecchiamento di questi animali.

Analisi della deprivazione di sonno

Come accennato nel capitolo introduttivo la deprivazione di sonno (sleep deprivation, SD) rappresenta un valido metodo per mettere in evidenza la presenza e le caratteristiche di alterazioni che, in condizioni di controllo, sono troppo tenui per essere rilevate. La deprivazione di sonno consiste infatti in una perturbazione del normale ciclo sonno/veglia che richiede il reclutamento e l'efficiente funzionamento di tutti i circuiti di controllo dell'omeostasi del sonno, nel caso alcuni di essi siano in qualche modo affetti da una mutazione o da una patologia ciò

viene rilevato dalla comparsa di alterate dinamiche di recupero del sonno perso durante la deprivazione.

L'analisi degli animali anziani è risultata essere, come atteso, la più ricca di spunti interessanti.

Tutti i ceppi oggetto di studio hanno mostrato un aumento del tempo trascorso in sonno REM a seguito della SD, tuttavia tale incremento è risultato inferiore nei ceppi con alterazioni della PrP rispetto agli animali WT. Non solo, gli animali KO hanno presentato un incremento di sonno REM estremamente ridotto e comunque significativamente inferiore rispetto ai ceppi Tg(CJD) e Tg(WT). In seguito a deprivazione, quindi, tutti i ceppi con alterazioni della PrP hanno presentato una riduzione a carico del tempo trascorso in sonno REM.

È possibile spiegare il maggior recupero di sonno REM presente nei ceppi Tg(CJD) e Tg(WT) rispetto al ceppo KO ipotizzando un residuo di attività della PrP, attività che è invece completamente assente negli animali KO.

È molto interessante l'analisi della componente ad onde lente del sonno NREM (banda delta). Già lavori svolti a partire dagli anni '60 del XX secolo avevano dimostrato un aumento della componente ad onde lente nel sonno che fa seguito alla SD: dall'uomo (Berger and Oswald 1962) al gatto (Ursin 1971) fino a svariate altre specie (Huber, Deboer et al. 2000). Grazie a questi ed ad altri studi si è potuto stabilire che la componente ad onde più lente del sonno NREM è sotto un controllo di tipo omeostatico ed è direttamente correlata alla durata del tempo precedentemente trascorso in veglia (Tobler and Borbely 1986; Dijk, Beersma et al. 1987). Nello studio qui presentato l'analisi degli animali anziani ha mostrato un incremento della banda delta in tutti i ceppi nelle ore immediatamente seguenti il termine della deprivazione, in accordo con i lavori menzionati. Nella fase di buio gli animali WT hanno invece mostrato un importante decremento della banda delta nel tracciato di deprivazione rispetto a quello di controllo. Tale decremento è in accordo con quanto descritto in letteratura sia nel topo (Huber, Deboer et al. 2000) che nel ratto (Feinberg and Campbell 1993). Questo decremento è risultato estremamente ridotto nei ceppi Tg(WT) e Tg(CJD) e completamente assente nel ceppo KO. Questi risultati sono estremamente interessanti se integrati con i dati, discussi in precedenza, sul recupero della fase REM dopo deprivazione. È infatti stato proposto che il decremento della banda delta nella fase di buio che fa seguito alla deprivazione sia una conseguenza dell'incremento di sonno REM che si verifica in questa stessa fase. Proprio l'incremento di sonno REM impedirebbe un totale recupero della componente delta del sonno NREM (Feinberg and

Campbell 1993). In questa ottica i risultati ottenuti hanno mostrato una totale concordanza con questa teoria. Il ceppo KO, che non presenta, o quasi, recupero di sonno REM, non va incontro a nessun decremento della banda delta nella fase di buio. I ceppi Tg(WT) e Tg(CJD), che hanno presentato un modesto recupero di sonno REM, sono andati incontro ad un modesto decremento della banda delta nella fase di buio. Viceversa i topi WT, che hanno avuto il maggior recupero di sonno REM dopo deprivazione, hanno subito anche la più grande riduzione della banda delta nella fase di buio.

L'analisi del sonno NREM e della veglia, viceversa, non ha mostrato anomalie di particolare interesse in nessuno dei ceppi. Tutti gli animali hanno mostrato un recupero del sonno NREM comparabile tra loro ed in accordo con quanto è stata descritto anche in lavori presenti in letteratura condotti su topi WT (Huber, Deboer et al. 2000) e su topi KO per la PrP (Huber, Deboer et al. 2002).

L'analisi del sonno REM, dopo SD, in animali di 12 mesi ha portato ulteriori spunti interessanti. In questo caso è infatti risultato possibile distinguere i ceppi in due gruppi. Da un lato gli animali dei ceppi KO e Tg(CJD), dall'altro gli animali dei ceppi WT e Tg(WT). Questo secondo gruppo ha mostrato, in generale, un abbondante recupero del sonno REM, diffuso sia nella fase di luce che nella fase di buio ed è perciò risultato comparabile a risultati descritti in letteratura per animali WT (Huber, Deboer et al. 2000).

Viceversa gli animali dei ceppi KO e Tg(CJD) hanno mostrato un recupero meno marcato di questa fase del sonno. Dalla comparazione di questi risultati con quelli ottenuti negli animali anziani sembrano emergere alcuni spunti interessanti. Da un lato gli animali WT si mantengono costanti e coerenti con quanto presente in letteratura per animali adulti. A questi si affiancano gli animali Tg(WT), per i quali è possibile ipotizzare che a questa età siano ancora funzionanti meccanismi di compensazione in grado di contrastare modeste modificazioni dei sistemi di controllo del sonno dovute ad alterazioni puramente quantitative della PrP. Come descritto in precedenza, tali meccanismi potrebbero invece essere compromessi negli animali di questo ceppo ma di 18 mesi di età.

La ridotta compensazione del sonno REM negli animali KO e Tg(CJD), viceversa, conferma quanto già descritto negli animali più anziani, indicando un danno maggiore dovuto ad alterazioni importanti a carico della PrP rispetto agli animali Tg(WT).

L'analisi della banda delta ha mostrato un forte incremento di questa componente del sonno nelle prime ore dal termine della deprivazione, in accordo con quanto già detto per gli animali anziani. Viceversa ad un anno di età tutti gli animali hanno mostrato un decremento della banda delta durante la fase di buio, anche se meno marcato nel ceppo Tg(WT) rispetto agli altri.

Questi dati sono risultati in accordo con la teoria di Feinberg descritta in precedenza. Infatti tutti gli animali hanno mostrato un maggiore recupero di sonno REM durante la fase di buio se comparati con i topi di 18 mesi.

L'analisi del tempo trascorso in sonno NREM ha prodotto risultati abbastanza simili a quanto descritto negli animali più anziani, con una differenza. È stato infatti interessante notare il ridotto recupero di sonno NREM rilevato nel ceppo Tg(WT), integrando i dati derivati dal sonno NREM e quelli derivati dalla banda delta è emerso che questo ceppo ha presentato un marcato recupero della banda delta al termine della deprivazione ed un ridotto decremento della stessa banda durante la fase di buio accompagnato ad un ridotto aumento del tempo trascorso in sonno NREM. La valutazione complessiva di questi dati ha portato ad ipotizzare che, a 12 mesi di età, gli animali Tg(WT) abbiano mostrato, rispetto agli altri ceppi, un recupero del sonno in seguito a SD maggiormente incentrato sulla banda delta che sul tempo trascorso in sonno NREM. Per quanto differenze di questo tipo non fossero mai state descritte in relazione ad alterazioni della PrP esse sono state mostrate in studi su animali appartenenti a ceppi differenti (Huber, Deboer et al. 2000).

Negli animali più giovani l'andamento delle registrazioni in seguito a deprivazione è simile nei vari ceppi oggetto di studio. Questo risultato è in accordo con quanto descritto in precedenza. Gli animali di 6 mesi di età possono, perciò, essere ritenuti troppo giovani per mostrare eventuali alterazioni legate a mutazioni o disregolazioni della PrP.

Tutti i ceppi hanno mostrato un recupero bifasico del tempo trascorso in sonno REM. Tale andamento è risultato in accordo con quanto descritto in letteratura per animali aventi lo stesso sostrato genetico di quelli qui descritti (Huber, Deboer et al. 2000).

L'analisi della banda delta negli animali di sei mesi di età ha mostrato un andamento bifasico per tutti i ceppi, con un incremento della potenza della banda dopo SD ed una sua riduzione, rispetto al controllo, nella fase di buio. È stato interessante notare come gli animali WT e Tg(WT) abbiano mostrato un ridotta riduzione della potenza nella fase di buio rispetto ai ceppi KO e Tg(CJD). Questo andamento, apparentemente in contrasto con quanto descritto per gli animali adulti ed anziani, può forse essere spiegato con una maggiore capacità di generare onde lente

negli animali più giovani appartenenti ai ceppi WT e Tg(WT). È infatti ampiamente descritto in letteratura una riduzione del sonno più profondo nei soggetti anziani se comparati ai giovani, ad esempio nell'uomo (Rechtschaffen and Siegel 2000) e nel ratto (Shiromani, Lu et al. 2000). Per quanto riguarda l'andamento in sonno NREM ed in veglia i risultati si sono mostrati in accordo con quanto precedentemente descritto in letteratura per animali WT dello stesso ceppo (Huber, Deboer et al. 2000).

Conclusioni

In conclusione, riassumendo i risultati salienti di questo studio, è necessario partire dalla caratterizzazione del modello creato. I risultati descritti e discussi hanno mostrato come gli animali Tg(CJD) non solo abbiano presentato le alterazioni motorie, cognitive ed elettroencefalografiche tipiche anche dei pazienti affetti da CJD e di altri modelli animali di questa malattia, ma anche alterazioni descritte più di recente a carico del sonno, in particolare la marcata riduzione del sonno REM. Questi risultati mostrano come il nuovo modello, riassumendo in sé sostanzialmente tutte le caratteristiche di questo morbo, sia interessante sia come base per lo studio della genesi e dell'evoluzione di questa malattia sia per la sperimentazioni di eventuali approcci terapeutici. Esso pone inoltre interessanti interrogativi sul perché sia stata riscontrata tale riduzione di sonno REM.

Lo studio dell'evoluzione della malattia a tre differenti età ha, a sua volta, prodotto risultati estremamente interessanti. La dimostrazione che la marcata riduzione del sonno REM abbia fatto la sua comparsa precocemente e bruscamente nel ceppo Tg(CJD) ad una età in cui non ci si aspetta siano presenti i sintomi della variante familiare di CJD descritta in questo studio pone interessanti prospettive. La precoce riduzione del sonno REM potrebbe, infatti, rappresentare un indizio dello

sviluppo della malattia e quindi configurarsi come un utile strumento per la diagnosi precoce.

Inoltre l'analisi della distribuzione circadiana del sonno ha confermato una perdita di circadianità negli animali KO ed ha esteso questo risultato al ceppo Tg(CJD).

Infine, l'analisi della deprivazione di sonno ha mostrato come, in caso di perturbazioni, i meccanismi di controllo del sonno REM non siano in grado di effettuare una corretta compensazione del REM perso durante la deprivazione stessa nel ceppo Tg(CJD). Inoltre è stato rilevato come tale deficienza esista anche negli altri due ceppi con alterazioni della PrP: KO e Tg(WT). Ciò potrebbe indicare come, mentre in condizioni basali alterazioni puramente quantitative della PrP siano compensabili da parte di altri sistemi tale compensazione non sia sufficiente in condizioni di stress.

I dati mostrati hanno inoltre evidenziato una relazione tra recupero di sonno REM e recupero della banda delta in seguito a deprivazione.

Bibliografia

- Alam, M. N., H. Gong, et al. (2002). "Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area." *J Physiol* **538**(Pt 2): 619-31.
- Allada, R., P. Emery, et al. (2001). "Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks." *Annu Rev Neurosci* **24**: 1091-119.
- Apetri, A. C., D. L. Vanik, et al. (2005). "Polymorphism at residue 129 modulates the conformational conversion of the D178N variant of human prion protein 90-231." *Biochemistry* **44**(48): 15880-8.
- Arrigoni, E., N. L. Chamberlin, et al. (2003). "The effects of adenosine on the membrane properties of basal forebrain cholinergic neurons." *Sleep* **26**: 45.
- Arrigoni, E., D. G. RAINNIE, et al. (2001). "Adenosine-mediated presynaptic modulation of glutamatergic transmission in the laterodorsal tegmentum." *J Neurosci* **21**(3): 1076-85.
- Aschoff, J. (1965). "Circadian Rhythms in Man." *Science* **148**: 1427-32.
- Aschoff, J. and R. Wever (1976). "Human circadian rhythms: a multioscillatory system." *Fed Proc* **35**(12): 236-32.
- Aserinsky, E. and N. Kleitman (1953). "Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep." *Science* **118**(3062): 273-4.
- Aston-Jones, G. and F. E. Bloom (1981). "Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle." *J Neurosci* **1**(8): 876-86.
- Bagetta, G., G. De Sarro, et al. (1988). "Ventral tegmental area: site through which dopamine D2-receptor agonists evoke behavioural and electrocortical sleep in rats." *Br J Pharmacol* **95**(3): 860-6.
- Basheer, R., R. E. Strecker, et al. (2004). "Adenosine and sleep-wake regulation." *Prog Neurobiol* **73**(6): 379-96.
- Basler, K., B. Oesch, et al. (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." *Cell* **46**(3): 417-28.
- Bassant, M. H., F. Cathala, et al. (1984). "Experimental scrapie in rats: first electrophysiological observations." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **57**(6): 541-7.
- Bellinger-Kawahara, C., J. E. Cleaver, et al. (1987). "Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation." *J Virol* **61**(1): 159-66.
- Bendheim, P. E., H. R. Brown, et al. (1992). "Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein." *Neurology* **42**(1): 149-56.
- Berendse, H. W. and H. J. Groenewegen (1990). "Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum." *J Comp Neurol* **299**(2): 187-228.
- Berger, R. J. and I. Oswald (1962). "Effects of sleep deprivation on behaviour, subsequent sleep, and dreaming." *J Ment Sci* **108**: 457-65.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, et al. (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." *Science* **218**(4579): 1309-11.
- Bolton, D. C., R. K. Meyer, et al. (1985). "Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein." *J Virol* **53**(2): 596-606.
- Borbely, A. A. (1982). "A two process model of sleep regulation." *Hum Neurobiol* **1**(3): 195-204.
- Borbely, A. A., F. Baumann, et al. (1981). "Sleep deprivation: effect on sleep stages and EEG power density in man." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **51**(5): 483-95.
- Borbely, A. A. and H. U. Neuhaus (1979). "Sleep-deprivation: effects on sleep and EEG in the rat." *J. comp. physiol. psychol.* **133**: 71-87.
- Borchelt, D. R., M. Scott, et al. (1990). "Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells." *J Cell Biol* **110**(3): 743-52.
- Bremer, F. and C. Terzuolo (1953). "[Interaction of the cerebral cortex and of the reticulated formation of the cerebral trunk in the mechanism of waking and in maintenance of wakeful state.]." *J Physiol (Paris)* **45**(1): 56-7.

- Brooks, D. C. and E. Bizzi (1963). "Brain Stem Electrical Activity during Deep Sleep." *Arch Ital Biol* **101**: 648-65.
- Brown, D. R. (2000). "PrP^{Sc}-like prion protein peptide inhibits the function of cellular prion protein." *Biochem J* **352 Pt 2**: 511-8.
- Brown, D. R. (2002). "Molecular advances in understanding inherited prion diseases." *Mol Neurobiol* **25**(3): 287-302.
- Brown, P., F. Cathala, et al. (1986). "Creutzfeldt-Jakob disease: clinical analysis of a consecutive series of 230 neuropathologically verified cases." *Ann Neurol* **20**(5): 597-602.
- Brown, P., L. G. Goldfarb, et al. (1992). "Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with the codon 178Asn PRNP mutation." *Ann Neurol* **31**(3): 282-5.
- Brown, R. E., D. R. Stevens, et al. (2001). "The physiology of brain histamine." *Prog Neurobiol* **63**(6): 637-72.
- Bueler, H., A. Aguzzi, et al. (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." *Cell* **73**(7): 1339-47.
- Butler, D. A., M. R. Scott, et al. (1988). "Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins." *J Virol* **62**(5): 1558-64.
- Buysse, D. J. (2005). Clinical pharmacology of other drugs used as hypnotics. *Principles and practice of sleep medicine*. M. H. e. a. Kryger, Elsevier Saunders: 452-467.
- Buzsaki, G., R. G. Bickford, et al. (1988). "Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat." *J Neurosci* **8**(11): 4007-26.
- Cajochen, C., M. Munch, et al. (2006). "Age-related changes in the circadian and homeostatic regulation of human sleep." *Chronobiol Int* **23**(1-2): 461-74.
- Callaway, C. W., R. Lydic, et al. (1987). "Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep." *Cell Mol Neurobiol* **7**(2): 105-49.
- Calleja, J., R. Carpizo, et al. (1985). "Serial waking-sleep EEGs and evolution of somatosensory potentials in Creutzfeldt-Jakob disease." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **60**(6): 504-8.
- Carleton, A., P. Tremblay, et al. (2001). "Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus." *Pflugers Arch* **442**(2): 223-9.
- Carskadon, M. A., W. C. Dement, et al. (1986). "Guidelines for the multiple sleep latency test (MSLT): a standard measure of sleepiness." *Sleep* **9**(4): 519-24.
- Cash, S. S., E. Halgren, et al. (2009). "The human K-complex represents an isolated cortical down-state." *Science* **324**(5930): 1084-7.
- Caughey, B. and G. S. Baron (2006). "Prions and their partners in crime." *Nature* **443**(7113): 803-10.
- Cespuglio, R., H. Faradji, et al. (1981). "Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats." *Neurosci Lett* **24**(2): 133-8.
- Chiesa, R., P. Piccardo, et al. (1998). "Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation." *Neuron* **21**(6): 1339-51.
- Clinton, J., C. Forsyth, et al. (1993). "Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study." *Neuroreport* **4**(1): 65-8.
- Collinge, J. (1999). "Variant Creutzfeldt-Jakob disease." *Lancet* **354**(9175): 317-23.
- Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." *Annu Rev Neurosci* **24**: 519-50.
- Collinge, J., M. A. Whittington, et al. (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." *Nature* **370**(6487): 295-7.
- Criado, J. R., M. Sanchez-Alavez, et al. (2005). "Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons." *Neurobiol Dis* **19**(1-2): 255-65.
- de Almeida, C. J., L. B. Chiarini, et al. (2005). "The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response." *J Leukoc Biol* **77**(2): 238-46.
- De Gennaro, L. and M. Ferrara (2003). "Sleep spindles: an overview." *Sleep Med Rev* **7**(5): 423-40.
- de Lecea, L., T. S. Kilduff, et al. (1998). "The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(1): 322-7.
- Delorme, F., J. L. Froment, et al. (1966). "[Suppression of sleep with p-chloromethamphetamine and p-chlorophenylalanine]." *C R Seances Soc Biol Fil* **160**(12): 2347-51.

- Dickerson, L. W., A. H. Huang, et al. (1993). "Relationship between coronary hemodynamic changes and the phasic events of rapid eye movement sleep." Sleep **16**(6): 550-7.
- Diener, T. O., M. P. McKinley, et al. (1982). "Viroids and prions." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(17): 5220-4.
- Dijk, D. J., D. G. Beersma, et al. (1987). "EEG power density during nap sleep: reflection of an hourglass measuring the duration of prior wakefulness." J Biol Rhythms **2**(3): 207-19.
- Donnet, A., G. Farnarier, et al. (1992). "Sleep electroencephalogram at the early stage of Creutzfeldt-Jakob disease." Clin Electroencephalogr **23**(3): 118-25.
- Drucker-Colin, R., J. Bernal-Pedraza, et al. (1983). "Increasing PGO spike density by auditory stimulation increases the duration and decreases the latency of rapid eye movement (REM) sleep." Brain Res **278**(1-2): 308-12.
- Endo, T., D. Groth, et al. (1989). "Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein." Biochemistry **28**(21): 8380-8.
- Espana, R. A. and T. E. Scammell (2004). "Sleep neurobiology for the clinician." Sleep **27**(4): 811-20.
- Estabrooke, I. V., M. T. McCarthy, et al. (2001). "Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state." J Neurosci **21**(5): 1656-62.
- Feinberg, I. (1974). "Changes in sleep cycle patterns with age." J Psychiatr Res **10**(3-4): 283-306.
- Feinberg, I. and I. G. Campbell (1993). "Total sleep deprivation in the rat transiently abolishes the delta amplitude response to darkness: implications for the mechanism of the "negative delta rebound". " J Neurophysiol **70**(6): 2695-9.
- Feldberg, W. S. (1958). "Behavioral changes in the cat after injection of drugs into the cerebral ventricle; a contribution to the study of subcortical convulsions and impairment of consciousness." Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis **36**: 401-23.
- Ford, M. J., L. J. Burton, et al. (2002). "Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse." Neuroscience **113**(1): 177-92.
- Fredholm, B. B., K. Battig, et al. (1999). "Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use." Pharmacol Rev **51**(1): 83-133.
- French, J. D. and H. W. Magoun (1952). "Effects of chronic lesions in central cephalic brain stem of monkeys." AMA Arch Neurol Psychiatry **68**(5): 591-604.
- Fujiyama, F., T. Furuta, et al. (2001). "Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex." J Comp Neurol **435**(3): 379-87.
- Furlan, A. J., C. E. Henry, et al. (1981). "Focal EEG abnormalities in Heidenhain's variant of Jakob-Creutzfeldt disease." Arch Neurol **38**(5): 312-4.
- Gabizon, R., M. P. McKinley, et al. (1988). "Properties of scrapie prion protein liposomes." J Biol Chem **263**(10): 4950-5.
- Gabizon, R., M. P. McKinley, et al. (1987). "Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(12): 4017-21.
- Gajdusek, D. C. (1977). "Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru." Science **197**(4307): 943-60.
- Gambetti, P., Q. Kong, et al. (2003). "Sporadic and familial CJD: classification and characterisation." Br Med Bull **66**: 213-39.
- Ghetti, B., P. Piccardo, et al. (1996). "Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 744-8.
- Ghetti, B., F. Tagliavini, et al. (2003). "Hereditary prion protein amyloidoses." Clin Lab Med **23**(1): 65-85, viii.
- Gibbs, A. J., B. D. Harrison, et al. (1966). "What's in a virus name?" Nature **209**(5022): 450-4.
- Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, et al. (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." Science **161**(839): 388-9.
- Gilbert, S. S., C. J. van den Heuvel, et al. (2004). "Thermoregulation as a sleep signalling system." Sleep Med Rev **8**(2): 81-93.
- Gloor, P. (1980). "EEG characteristics in Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **8**(3): 341.
- Gottesmann, C. (2001). "The golden age of rapid eye movement sleep discoveries. 1. Lucretius--1964." Prog Neurobiol **65**(3): 211-87.

- Gourmelon, P., H. L. Amyx, et al. (1987). "Sleep abnormalities with REM disorder in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in cats: a new pathological feature." Brain Res **411**(2): 391-6.
- Grotewiel, M. S., I. Martin, et al. (2005). "Functional senescence in *Drosophila melanogaster*." Ageing Res Rev **4**(3): 372-97.
- Haas, L. F. (2003). "Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and electroencephalography." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(1): 9.
- Hallanger, A. E. and B. H. Wainer (1988). "Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat." J Comp Neurol **274**(4): 483-515.
- Hansen, H. C., S. Zschocke, et al. (1998). "Clinical changes and EEG patterns preceding the onset of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease." Acta Neurol Scand **97**(2): 99-106.
- Harris, D. A. (2004). Cell biology of prions. Prion biology and diseases. S. S. Crotty D. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 483-544.
- Hasan, S., Y. Dauvilliers, et al. "Age-related changes in sleep in inbred mice are genotype dependent." Neurobiol Aging.
- Haulica, I., L. Ababei, et al. (1973). "Preliminary data on the possible hypnogenic role of adenosine." Rev Roum Physiol **10**(4): 275-9.
- Hauri, P. J. and J. Wisbey (1992). "Wrist actigraphy in insomnia." Sleep **15**(4): 293-301.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, et al. (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." Science **279**(5352): 827-34.
- Herkenham, M. (1980). "Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex." Science **207**(4430): 532-5.
- Hobson, J. A. (1995). Sleep. New York, Scientific American.
- Horiuchi, M., N. Yamazaki, et al. (1995). "A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep." J Gen Virol **76 (Pt 10)**: 2583-7.
- Hsiao, K. K., M. Scott, et al. (1990). "Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein." Science **250**(4987): 1587-90.
- Hsieh, K. C., E. L. Robinson, et al. (2008). "Sleep architecture in unrestrained rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) synchronized to 24-hour light-dark cycles." Sleep **31**(9): 1239-50.
- Huber, R., T. Deboer, et al. (2000). "Effects of sleep deprivation on sleep and sleep EEG in three mouse strains: empirical data and simulations." Brain Res **857**(1-2): 8-19.
- Huber, R., T. Deboer, et al. (2002). "Sleep deprivation in prion protein deficient mice sleep deprivation in prion protein deficient mice and control mice: genotype dependent regional rebound." Neuroreport **13**(1): 1-4.
- Hughes, J. R. (2008). "Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: their relationships with epilepsy and behavior." Epilepsy Behav **13**(1): 25-31.
- Imeri, L., M. G. De Simoni, et al. (1994). "Changes in the serotonergic system during the sleep-wake cycle: simultaneous polygraphic and voltammetric recordings in hypothalamus using a telemetry system." Neuroscience **58**(2): 353-8.
- Ironside, J. W. and M. W. Head (2008). Biology and neuropathology of prion diseases. Handbook of Clinical Neurology. C. Duyckaerts and I. Litvan, Elsevier. **89**: 779-797.
- Jacobs, B. L. and E. C. Azmitia (1992). "Structure and function of the brain serotonin system." Physiol Rev **72**(1): 165-229.
- Jacobs, B. L. and C. A. Fornal (1999). "Activity of serotonergic neurons in behaving animals." Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 9S-15S.
- Johnson, R. T. and C. J. Gibbs, Jr. (1998). "Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies." N Engl J Med **339**(27): 1994-2004.
- Jones, B. E. (1995). Reticular formation. Cytoarchitecture, transmitters and projections. The rat nervous system. G. Paxinos, Academic Press: 155-171.
- Jones, B. E. (2004). "Paradoxical REM sleep promoting and permitting neuronal networks." Arch Ital Biol **142**(4): 379-96.
- Jones, B. E. (2005). Basic mechanisms of sleep-wake states. Principles and Practice of Sleep Medicine. M. H. e. a. Kryger, Elsevier Saunders: 136-153.

- Jones, B. E. (2005). "From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates." Trends Pharmacol Sci **26**(11): 578-86.
- Jones, B. E. and M. Muhlethaler (2005). Modulation of cortical activity and sleep-wake state by hypocretin/orexin. The hypocretins: integrators of physiological systems. L. De Lecea and J. G. Sutcliffe, Springer: 289-301.
- Jones, D. P. and S. Nevin (1954). "Subacute cortical degeneration with myoclonus and epilepsy." Trans Am Neurol Assoc **13**(79th Meeting): 144-7.
- Jouvet, M. (1962). "[Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep.]" Arch Ital Biol **100**: 125-206.
- Jouvet, M. (1967). "Mechanisms of the states of sleep: a neuropharmacological approach." Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis **45**: 86-126.
- Jouvet, M., F. Michel, et al. (1959). "[Electric activity of the rhinencephalon during sleep in cats.]" C R Seances Soc Biol Fil **153**(1): 101-5.
- Kanaani, J., S. B. Prusiner, et al. (2005). "Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro." J Neurochem **95**(5): 1373-86.
- Koella, W. P., A. Feldstein, et al. (1968). "The effect of para-chlorophenylalanine on the sleep of cats." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **25**(5): 481-90.
- Koester, J. and S. A. Siegelbaum (2000). Propagated signaling: the action potential. principles of neural science. E. R. Kandell. New York, McGraw-Hill: 150-174.
- Kordek, R., V. R. Nerurkar, et al. (1996). "Heightened expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 alpha, and glial fibrillary acidic protein in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9754-8.
- Kovacs, G. G., G. Trabattoni, et al. (2002). "Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum." J Neurol **249**(11): 1567-82.
- Kovacs, G. G., P. Zerbi, et al. (2002). "The prion protein in human neurodegenerative disorders." Neurosci Lett **329**(3): 269-72.
- Kretzschmar, H. and P. Parchi (2007). Pathology and Genetics of Human Prion Diseases. Prions in Humans and Animals. B. Hoernlimann, D. Riesner and H. Kretzschmar. Berlin, De Gruyter: 287-314.
- Kryger, M. H., C. Roth, et al. (2005). Principles and Practice of Sleep Medicine, Saunders.
- Landolt, H. P., M. Glatzel, et al. (2006). "Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Neurology **66**(9): 1418-24.
- Lee, M. G., O. K. Hassani, et al. (2005). "Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle." J Neurosci **25**(28): 6716-20.
- Levy, S. R., K. H. Chiappa, et al. (1986). "Early evolution and incidence of electroencephalographic abnormalities in Creutzfeldt-Jakob disease." J Clin Neurophysiol **3**(1): 1-21.
- Lindsley, D. B., L. H. Schreiner, et al. (1950). "Behavioral and EEG changes following chronic brain stem lesions in the cat." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **2**(4): 483-98.
- Lledo, P. M., P. Tremblay, et al. (1996). "Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2403-7.
- Lu, J., M. A. Greco, et al. (2000). "Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep." J Neurosci **20**(10): 3830-42.
- Lydic, R. (1987). "State-dependent aspects of regulatory physiology." FASEB J **1**(1): 6-15.
- Ma, J., R. Wollmann, et al. (2002). "Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol." Science **298**(5599): 1781-5.
- Maloney, K. J., L. Mainville, et al. (2002). "c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery." Eur J Neurosci **15**(4): 774-8.
- Manns, I. D., L. Mainville, et al. (2001). "Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex." Neuroscience **107**(2): 249-63.

- Manson, J. C., A. R. Clarke, et al. (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." *Mol Neurobiol* **8**(2-3): 121-7.
- Manson, J. C., J. Hope, et al. (1995). "PrP gene dosage and long term potentiation." *Neurodegeneration* **4**(1): 113-4.
- Masters, C. L., D. C. Gajdusek, et al. (1981). "Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies." *Brain* **104**(3): 559-88.
- McCarley, R. W. (2007). "Neurobiology of REM and NREM sleep." *Sleep Med* **8**(4): 302-30.
- McCarley, R. W. and J. A. Hobson (1975). "Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model." *Science* **189**(4196): 58-60.
- McGinty, D. and R. Szymusiak (2000). "The sleep-wake switch: A neuronal alarm clock." *Nat Med* **6**(5): 510-1.
- McGinty, D. J. and R. M. Harper (1976). "Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats." *Brain Res* **101**(3): 569-75.
- McKinley, M. P., F. R. Masiarz, et al. (1983). "Resistance of the scrapie agent to inactivation by psoralens." *Photochem Photobiol* **37**(5): 539-45.
- Meissner, B., K. Kortner, et al. (2004). "Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: magnetic resonance imaging and clinical findings." *Neurology* **63**(3): 450-6.
- Meydani, M. (1999). "Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction." *Mech Ageing Dev* **111**(2-3): 123-32.
- Miller, R. (2007). "Theory of the normal waking EEG: from single neurones to waveforms in the alpha, beta and gamma frequency ranges." *Int J Psychophysiol* **64**(1): 18-23.
- Mirenowicz, J. and W. Schultz (1996). "Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli." *Nature* **379**(6564): 449-51.
- Mistlberger, R. E., B. M. Bergmann, et al. (1987). "Relationships among wake episode lengths, contiguous sleep episode lengths, and electroencephalographic delta waves in rats with suprachiasmatic nuclei lesions." *Sleep* **10**(1): 12-24.
- Montagna, P. (2005). "Fatal familial insomnia: a model disease in sleep physiopathology." *Sleep Med Rev* **9**(5): 339-53.
- Montagna, P., P. Cortelli, et al. (1998). "Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene." *Brain Pathol* **8**(3): 515-20.
- Montagna, P., P. Gambetti, et al. (2003). "Familial and sporadic fatal insomnia." *Lancet Neurol* **2**(3): 167-76.
- Monti, J. M., M. Fernandez, et al. (1990). "Sleep during acute dopamine D1 agonist SKF 38393 or D1 antagonist SCH 23390 administration in rats." *Neuropsychopharmacology* **3**(3): 153-62.
- Monti, J. M. and H. Jantos (2008). "The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking." *Prog Brain Res* **172**: 625-46.
- Moruzzi, G. (1972). "The sleep-waking cycle." *Ergeb Physiol* **64**: 1-165.
- Mouret, P. and M. Guilleminet (1963). "[Value and Indications for the Milch Operation.]." *Rhumatologie* **15**: 55-64.
- Niedermeyer, E. (2004). The Normal EEG of the Waking Adult. *Electroencephalography - Fifth Edition*. E. Niedermeyer and S. Lopes Da Silva. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 167-170.
- Oesch, B., D. Westaway, et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." *Cell* **40**(4): 735-46.
- Ogilvie, R. D. (2001). "The process of falling asleep." *Sleep Med Rev* **5**(3): 247-270.
- Ohayon, M. M., M. A. Carskadon, et al. (2004). "Meta-analysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: developing normative sleep values across the human lifespan." *Sleep* **27**(7): 1255-73.
- Ongini, E., M. G. Caporali, et al. (1985). "Stimulation of dopamine D-1 receptors by SKF 38393 induces EEG desynchronization and behavioral arousal." *Life Sci* **37**(24): 2327-33.
- Pace-Schott, E. F. and J. A. Hobson (2002). "The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks." *Nat Rev Neurosci* **3**(8): 591-605.

- Parchi, P., S. Capellari, et al. (2003). Familial Creutzfeldt-Jakob disease. Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders. D. W. Dickson. Basel, Neuropath Press.
- Parchi, P., R. B. Petersen, et al. (1998). "Molecular pathology of fatal familial insomnia." Brain Pathol **8**(3): 539-48.
- Parmeggiani, P. L. (1987). "Interaction between sleep and thermoregulation: an aspect of the control of behavioral states." Sleep **10**(5): 426-35.
- Pedersen, N. S. and E. Smith (2002). "Prion diseases: epidemiology in man." APMIS **110**(1): 14-22.
- Penzel, T., J. W. Kantelhardt, et al. (2003). "Dynamics of heart rate and sleep stages in normals and patients with sleep apnea." Neuropsychopharmacology **28 Suppl 1**: S48-53.
- Perret, M. and F. Aujard (2006). "[Aging and biological rhythms in primates]." Med Sci (Paris) **22**(3): 279-83.
- Petit, D., J. F. Gagnon, et al. (2004). "Sleep and quantitative EEG in neurodegenerative disorders." J Psychosom Res **56**(5): 487-96.
- Portas, C. M., B. Bjorvatn, et al. (2000). "Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies." Prog Neurobiol **60**(1): 13-35.
- Prusiner (2004). An introduction to prion biology and diseases. Prion Biology and diseases, second edition. S. S. Crotty D. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1-87.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-44.
- Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**(5012): 1515-22.
- Prusiner, S. B. (1995). "The Prion Diseases." Scientific American January: 48 - 57.
- Prusiner, S. B., D. C. Bolton, et al. (1982). "Further purification and characterization of scrapie prions." Biochemistry **21**(26): 6942-50.
- Prusiner, S. B., D. F. Groth, et al. (1980). "Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent." Biochemistry **19**(21): 4883-91.
- Prusiner, S. B. and M. R. Scott (1997). "Genetics of prions." Annu Rev Genet **31**: 139-75.
- Puckett, C., P. Concannon, et al. (1991). "Genomic structure of the human prion protein gene." Am J Hum Genet **49**(2): 320-9.
- Rainnie, D. G., H. C. Grunze, et al. (1994). "Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal." Science **263**(5147): 689-92.
- Ralph, M. R., R. G. Foster, et al. (1990). "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period." Science **247**(4945): 975-8.
- Rasmusson, D. D., K. Clow, et al. (1992). "Frequency-dependent increase in cortical acetylcholine release evoked by stimulation of the nucleus basalis magnocellularis in the rat." Brain Res **594**(1): 150-4.
- Rechtschaffen, A. and J. Siegel (2000). Sleep and dreaming. Principles of neural science. E. R. Kandell. New York, McGraw-Hill: 936-947.
- Reite, M. L., J. M. Rhodes, et al. (1965). "Normal Sleep Patterns in Macaque Monkey." Arch Neurol **12**: 133-44.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2001). "Molecular analysis of mammalian circadian rhythms." Annu Rev Physiol **63**: 647-76.
- Rosenberg, R. S., H. Zepelin, et al. (1979). "Sleep in young and old rats." J Gerontol **34**(4): 525-32.
- Rye, D. B. (2004). "The two faces of Eve: dopamine's modulation of wakefulness and sleep." Neurology **63**(8 Suppl 3): S2-7.
- Rye, D. B., C. B. Saper, et al. (1987). "Pedunculo-pontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum." J Comp Neurol **259**(4): 483-528.
- Safar, J., M. Ceroni, et al. (1990). "Subcellular distribution and physicochemical properties of scrapie-associated precursor protein and relationship with scrapie agent." Neurology **40**(3 Pt 1): 503-8.
- Sakai, K. (1990). The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep. The diencephalon and sleep. M. Mancia and G. Marini, Raven Press: 171-198.
- Sakurai, T., A. Amemiya, et al. (1998). "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior." Cell **92**(5): 1 page following 696.

- Saper, C. B., T. C. Chou, et al. (2001). "The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness." Trends Neurosci **24**(12): 726-31.
- Schulz, H. (2008). "Rethinking sleep analysis." J Clin Sleep Med **4**(2): 99-103.
- Sharief, M. K., A. Green, et al. (1999). "Heightened intrathecal release of proinflammatory cytokines in Creutzfeldt-Jakob disease." Neurology **52**(6): 1289-91.
- Sherin, J. E., P. J. Shiromani, et al. (1996). "Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep." Science **271**(5246): 216-9.
- Shiromani, P. J., J. Lu, et al. (2000). "Compensatory sleep response to 12 h wakefulness in young and old rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(1): R125-33.
- Shyu, W. C., S. Z. Lin, et al. (2005). "Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model." J Neurosci **25**(39): 8967-77.
- Smith, P. G. and R. Bradley (2003). "Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology." Br Med Bull **66**: 185-98.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, et al. (1990). "Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein." Biochemistry **29**(38): 8879-84.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, et al. (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." Cell **51**(2): 229-40.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, et al. (1990). "Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C." Biochemistry **29**(22): 5405-12.
- Steele, A. D., J. G. Emsley, et al. (2006). "Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3416-21.
- Steele, A. D., S. Lindquist, et al. (2007). "The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge." Prion **1**(2): 83-93.
- Steinhoff, B. J., S. Racker, et al. (1996). "Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease." Arch Neurol **53**(2): 162-6.
- Steriade, M. and R. W. McCarley (2005). Brain Control of Wakefulness and Sleep. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Szymusiak, R. (1995). "Magnocellular nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation." Sleep **18**(6): 478-500.
- Szymusiak, R., N. Alam, et al. (1998). "Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats." Brain Res **803**(1-2): 178-88.
- Taraboulos, A., D. Serban, et al. (1990). "Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells." J Cell Biol **110**(6): 2117-32.
- Telling, G. C., T. Haga, et al. (1996). "Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice." Genes Dev **10**(14): 1736-50.
- Tinuper, P., P. Montagna, et al. (1989). "The thalamus participates in the regulation of the sleep-waking cycle. A clinico-pathological study in fatal familial thalamic degeneration." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **73**(2): 117-23.
- Tobler, I. and A. A. Borbély (1986). "Sleep EEG in the rat as a function of prior waking." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **64**(1): 74-6.
- Tobler, I., T. Deboer, et al. (1997). "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice." J Neurosci **17**(5): 1869-79.
- Tobler, I., S. E. Gaus, et al. (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**(6575): 639-42.
- Trampus, M. and E. Ongini (1990). "The D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 enhances REM sleep in the rat." Neuropharmacology **29**(10): 889-93.
- Triarhou, L. C. (2007). "Constantin von Economo (1876-1931)." J Neurol **254**(4): 550-1.
- Trulson, M. E. and B. L. Jacobs (1979). "Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal." Brain Res **163**(1): 135-50.
- Tyler, K. L. (2003). "Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **348**(8): 681-2.

- Ursin, R. (1971). "Differential effect of sleep deprivation on the two slow wave sleep stages in the cat." Acta Physiol Scand **83**(3): 352-61.
- Ursin, R. (1972). "Differential effect of para-chlorophenylalanine on the two slow wave sleep stages in the cat." Acta Physiol Scand **86**(2): 278-85.
- van Gool, W. A. and M. Mirmiran (1986). "Effects of aging and housing in an enriched environment on sleep-wake patterns in rats." Sleep **9**(2): 335-47.
- von Economo, C. (1929). Die Encephalitis lethargica, ihre Nachkrankheiten und ihre Behandlung. Berlin Wien, Urban & Schwarzenberg.
- Von Economo, C. (1930). "Sleep as a problem of localization." J Nerv Ment Dis **71**: 249-259.
- Walz, R., O. B. Amaral, et al. (1999). "Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein." Epilepsia **40**(12): 1679-82.
- Webb, W. B. and H. W. Agnew, Jr. (1971). "Stage 4 sleep: influence of time course variables." Science **174**(16): 1354-6.
- Weber, T. (2000). "Clinical and laboratory diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." Clin Neuropathol **19**(5): 249-50.
- Weinert, D. (2000). "Age-dependent changes of the circadian system." Chronobiol Int **17**(3): 261-83.
- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, et al. (1995). "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms." Neuron **14**(4): 697-706.
- Westbrook, G. L. (2000). Seizures and epilepsy. Principles of neural science. E. R. Kandell. New York, McGraw-Hill: 910-935.
- Wieser, H. G., K. Schindler, et al. (2006). "EEG in Creutzfeldt-Jakob disease." Clin Neurophysiol **117**(5): 935-51.
- Wieser, H. G., U. Schwarz, et al. (2004). "Serial EEG findings in sporadic and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease." Clin Neurophysiol **115**(11): 2467-78.
- Will, R. G. (2003). "Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru." Br Med Bull **66**: 255-65.
- Yoshida, Y., N. Fujiki, et al. (2001). "Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities." Eur J Neurosci **14**(7): 1075-81.
- Young, K., P. Piccardo, et al. (1999). The human genetic prion diseases. Prions: Molecular and Cellular Biology. D. A. Harris. Wymondham, UK, Horizon Scientific Press: 139-175.
- Zarranz, J. J., A. Dagon, et al. (2005). "Phenotypic variability in familial prion diseases due to the D178N mutation." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(11): 1491-6.
- Zepelin, H., W. E. Whitehead, et al. (1972). "Aging and sleep in the albino rat." Behav Biol **7**(7): 65-74.