

Proteiny 14-3-3 a jejich klinický význam

Novobilský R.^{1,2}, Štefanská H.³, Kušnierová P.^{4,5}

¹ Katedra klinických neurověd, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

² Neurologická klinika, Fakultní nemocnice, Ostrava

³ Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

⁴ Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava

⁵ Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

SOUHRN

Proteiny 14-3-3 se řadí mezi vysoce konzervované kyselé homologní proteiny, které se podílí na celé řadě důležitých procesů v lidském těle, např. na řízení buněčného cyklu, apoptóze, neuronálním vývoji, buněčném růstu nebo signální transdukcí a fosforylaci. Skládají se ze sedmi izoform, které se nachází ve všech eukaryotních buňkách. Nejvyšší exprese proteinů 14-3-3 je však vykazována v mozku. Z tohoto důvodu má detekce/stanovení proteinů 14-3-3 význam u pacientů s neurologickým onemocněním, převážně u rychle progredující demence s neurologickými příznaky. Nejčastěji používanou metodou je Western blot s chromogenní nebo chemiluminiscenční detekcí, možnou variantou je i ELISA stanovení jednotlivých izoform.

Klíčová slova: proteiny 14-3-3, Creutzfeldt-Jakobova choroba, priony, demence, Western blot, ELISA.

SUMMARY

Novobilský R., Štefanská H., Kušnierová P.: 14-3-3 proteins and their clinical significance

14-3-3 proteins are among the highly conserved acidic homologous proteins that are involved in several important processes in the human body, such as cell cycle control, apoptosis, neuronal development, cell growth, or signal transduction and phosphorylation. They consist of seven isoforms found in all eukaryotic cells. However, the highest expression of 14-3-3 proteins is shown in the brain. For this reason, the detection/determination of 14-3-3 proteins is important in patients with neurological diseases, predominantly in rapidly progressive dementia with neurological symptoms. The most commonly used method is Western blot with chromogenic or chemiluminescent detection. A possible variant is the ELISA determination of individual isoforms.

Keywords: 14-3-3 proteins, Creutzfeldt-Jakob disease, prions, dementia, Western blot, ELISA.

Úvod

Proteiny 14-3-3 se účastní různých fyziologických buněčných procesů, jako je signalizace, buněčný růst, dělení, adheze, diferenciací, apoptóza a regulace iontových kanálů. Jeho přítomnost v mozkomíšním moku byla popsána u lidí postižených rychlým rozpadem mozkové tkáně, ať už na podkladě cévní mozkové příhody, traumatu či vlivem neurodegenerativního poškození, typicky u Creutzfeldt-Jakobovy choroby.

Creutzfeldt-Jakobova choroba patří mezi prionová onemocnění způsobená ukládáním patologicky změněného prionového proteinu do mozkové tkáně. Tímto způsobem dochází k postupnému zániku neuronů, což se klinicky projevuje kromě motorických a psychiatrických poruch i rychle progredující demencí. Jedná se o nevyléčitelné onemocnění nezadržitelně spějící k smrti.

Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 představují skupinu vysoce konzervovaných kyselých homologních proteinů s molekulo-

vou hmotností 25-35 kDa. Skládají se ze sedmi izoform, které se nachází ve všech eukaryotních buňkách a jsou označeny písmeny řecké abecedy – beta (β), gama (γ), epsilon (ϵ), zeta (ζ), éta (η), sigma (σ) a tau (τ) [1-3]. Poprvé byly popsány Moorem a Pertezem v roce 1967 jako kyselé frakce mozkových proteinů [4]. Proteiny 14-3-3 interagují s celou řadou dalších proteinů (dle dosavadních odhadů celkem více než 200), čímž ovlivňují mozkové funkce včetně nervové signalizace, vývoje neuronů a neuroprotektce [5].

Nachází se v různých tkáních, přičemž nejvyšší expresi vykazují v mozku. V nervových buňkách se proteiny 14-3-3 vyskytují v cytoplazmě, intracelulárních organelách i plazmatické membráně [5]. Jsou řazeny mezi nespecifické markery neuronálního poškození. Zvýšenou hladinu lze prokázat u pacientů s neurologickými potížemi, u kterých se vyskytují parenchymové léze různého původu, například u akutních cévních mozkových příhod, tumorů CNS, encefalitid, transversální myelitidy, anebo u roztroušené sklerózy mozkomíšní [2]. Je možné je stanovit např. v mozkomíšním moku (likvoru) nebo buněčném lysátu [2].

V rámci neurodegenerativních onemocnění má jejich stanovení význam hlavně u rychle progredující

demence, kde se pomýšlí na Creutzfeldt-Jakobovu nemoc. Zde patří pozitivita mezi diagnostická kritéria pravděpodobné diagnózy [2].

Struktura proteinů 14-3-3

Jedná se o skupinu kyselých proteinů tvořící cca 1 % všech nerozpustných proteinů v mozku [2]. Jejich monomerní jednotky vykazují schopnost sdružovat se do homo- nebo heterodimerů, přičemž některé izoformy tvoří přednostně homodimery (např. izoforma 14-3-3σ), jiné zase heterodimery (např. izoforma 14-3-3ε), obr. 1 [5, 6].

Každý monomer se skládá z devíti antiparalelních α-helixů, seskupených do N-koncové a C-koncové domény [5, 7]. C-koncové domény vytváří dvě drážky pro vazbu ligandu [8]. N-koncové domény slouží k dimerizaci mezi helixem α1 jednoho monomeru a helixy α3 a α4 druhého monomeru [9]. Struktura připomíná písmeno L [7].

Vnitřní část této struktury je tvořena čtyřmi helixy α3, α5, α7 a α9. První dva helixy α3 a α5 obsahují mnoho polárních a nabitých aminokyselin, zatímco helixy α7 a α9 obsahují hydrofobní a nepolární aminokyseliny. Tyto čtyři helixy vytváří konkávní amfipatickou drážku, která interaguje s cílovými proteiny [5, 7, 9].

Dimery mají charakteristickou strukturu s velkým záporně nabitým centrálním kanálem [8]. Centrální kanál se skládá z invariantních aminokyselinových zbytků. Naopak vnější povrch proteinů je vysoce variabilní. Struktura dimerů je u savců velmi obdobná, proto tyto aminokyselinové zbytky napomáhají odlišit od sebe jednotlivé izoformy. Rozdíly lze také pozorovat v relativní poloze monomerů. Mezi monomery jsou změněné úhly, což ovlivňuje jejich vazebnou specifitu [6, 8]. Struktura dimerů, znázorněná na obr. 1, připomíná písmeno omega (ω) [7].

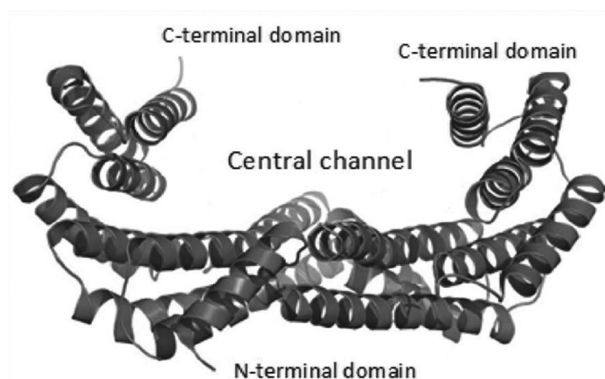


Fig. 1: Structure of 14-3-3 protein dimers [8].

Pomocí fosforylace vazebného partnera je řízena dynamika vazby proteinů 14-3-3 [10]. Dále je pro funkci a vazbu s cílovými proteiny nezbytná charakteristická struktura dimerů. Proteiny 14-3-3 jsou schopny vázat dvě konsenzuální sekvence na jeden cílový protein. Nejčastěji vážou fosforylovaný serinový a threoninový konsenzuální vazebný motiv. Kromě tohoto optimálního vazebného motivu, mohou proteiny 14-3-3 vázat nestandardní fosforylovaná serinová a threoninová

místa. V některých případech se také mohou vázat nefosforylované cíle [8].

Mezi proteiny interagující s proteiny 14-3-3 způsobem závislým na fosforylaci se řadí například proteinkinázy, receptorové proteiny, enzymy, strukturální a cytoskeletální proteiny, proteiny zapojené do řízení buněčného cyklu, proteiny zapojené do kontroly transkripce a proteiny účastníci se apoptózy [3].

Nicméně existují proteiny, které interagují s proteiny 14-3-3 způsobem nezávislým na fosforylaci. Jedná se konkrétně o více jak 200 polypeptidů doprovázejících například syntézu mastných kyselin, interakce DNA/chromatin včetně transkripčních faktorů, syntézu proteinů, proteolýzu, buněčnou signalizaci či buněčné dělení [3].

Někdy pro vazbu 14-3-3 stačí pouze jedna fosforylace, v jiných případech jsou nutné fosforylace dvě. Vazba také může zahrnovat jadernou lokalizaci a exportní signály, či blokovat vazbu jiných proteinů nebo deformovat proteiny do aktivních nebo inhibovaných konformací. Za změnu struktur vazebných partnerů má zodpovědnost α-helikální struktura, která se váže kolem fosforylovaných míst [10].

Proteiny 14-3-3 rovněž podléhají posttranslačním modifikacím, jako je fosforylace, acylace a acetylace, polyglykace a změny po oxidačním stresu. Tyto modifikace mají různé účinky na proteiny 14-3-3. Mohou ovlivňovat funkční regulace, cílové interakce, specifitu dimerizace nebo buněčné lokalizace [8].

Lokalizace jednotlivých izoform se odvíjí od jejich vazebných partnerů. Poškození specifických interakcí 14-3-3 posuzuje tuto lokalizaci a vede k hromadění těchto poškozených proteinů 14-3-3 s defektní vazbou v jádře [10].

Funkce proteinů 14-3-3

Funkce proteinů 14-3-3 není doposud zcela objasněna. Předpokládá se jejich účast na regulaci buněčného cyklu, modulaci některých onkogenů, a také jejich zapojení do fyziologických pochodů v centrální nervové soustavě [2]. Další biologické procesy, které proteiny 14-3-3 regulují, jsou signální transdukce, transkripce, apoptóza a neuronální vývoj [5].

Progrese v rámci buněčného cyklu je ovlivněna interakcí proteinů 14-3-3 s celou řadou cílových proteinů. Po této interakci dochází ke změně intracelulární lokalizace cílových proteinů nebo k modifikaci jejich enzymatické aktivity. Tato vazba může zároveň chránit cílové proteiny před defosforylací [3, 11].

Uvolněním proteinů 14-3-3 z proteinu cdc25 (protein řídící vstup do mitózy) dochází k jeho defosforylaci, a tím je zahájena progrese buněčného cyklu z kontrolních bodů DNA do M fáze [10, 12]. Uvolňování je také ovlivněno sekvestrací proteinů 14-3-3 do fosforylovaných keratinových vláken. Proteiny 14-3-3 regulují buněčnou odpověď na poškození DNA inhibicí předčasné progrese buněčného cyklu z důvodu umožnění opravy DNA před zahájením mitózy, nebo aby pokračovaly v procesu apoptózy. Interakce proteinů 14-3-3 s dalšími proteiny reagujícími na poškození DNA mohou být dále vyvolány genotoxickým stresem. Interak-

ce způsobené poškozením DNA aktivují kontrolní body nebo proapoptické dráhy, což představuje hnací sílu ve vývoji onkologických nemocí. Interakce 14-3-3 vyvolávají zpomalování proapoptické signalizace ve spojení s oxidačním stresem [10].

Proteiny 14-3-3 dále regulují buněčný růst prostřednictvím jejich interakce s proteinem Raf-1 v Raf-1/ERK (dráha kinázy regulována extracelulárním signálem). Buněčný růst a přežití regulují 14-3-3 také pomocí usměrňování mitogenem aktivované kinázy (mitogen aktivovaný protein podporující buněčnou proliferaci a inhibující apoptózu). Buněčná proliferace může být také regulována vazbou proteinů 14-3-3 na p27 (inhibitor cyklin-dependentní kinázy, blokuje progresi buněčného cyklu) [3].

Další z funkcí proteinů 14-3-3 je regulace apoptózy, ať již ve smyslu její podpory či omezení. Interagují s proapoptickými proteiny Bax a BAD. Protein Bax se za normálních okolností vyskytuje neaktivní v cytoplasmě. Při porušení DNA tento protein translokuje do mitochondrií a vyvolává rychlý postup do apoptózy. Pokud je přítomen protein 14-3-3, konkrétně jeho izoforma sigma, dochází k sekvestraci Bax v cytoplasmě. Buňka pak nevstupuje do apoptózy [3].

Protein p53 může být aktivován poškozením DNA nebo hypoxií. Vlivem negativní zpětné vazby se protein BAD při vysoké hladině váže na p53 v cytosolu. Tím pádem nedochází k jadernému přenosu p53 a je zastavena transkripce genů BAD a Bax. Tento děj probíhá u nefosforylovaného BAD, proto je udržována rovnováha mezi proteiny 14-3-3 a p53 s BAD. To znamená, že blokují aktivaci BAD, ale zároveň aktivují p53 [13].

Proteiny 14-3-3 se dále účastní regulace dynamiky cytoskeletu a jsou exprimovány v neuronech během tvorby neuritů a synaptogeneze [8].

Předpokládá se jejich podíl na vzniku mnoha neurologických poruch. Regulace aktivity tyrosinhydroxylázy (TH) byla jednou z prvních odhalených funkcí proteinů 14-3-3. Jde o enzym snižující rychlost syntézy dopaminu a dalších neurotransmiterů [8]. Tato funkce signalizuje zapojení do patofyziologie Parkinsonovy nemoci. Kromě toho byl protein 14-3-3 nalezen v patogenezi dalších chronických i akutních neurodegenerativních onemocnění (např. Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza a cévní mozková příhoda) [14, 15].

Proteiny 14-3-3 jsou schopny vázat fosforylované cíle a bránit tak jejich defosforylaci působením fosfatáz. Pokud se proteiny 14-3-3 vážou na své cíle, fyzicky blokují sekvencně specifické nebo strukturní rysy. Dále mohou blokovat interakční místa protein-protein nebo protein-DNA. Také blokují lokalizační signály, a tím přeměňují subcelulární lokalizaci svých vazebných cílů. Proteiny 14-3-3 fungují jako molekulární kovadliny (působí jako rigidní struktury), díky tomu jsou schopny transformovat konformaci cílových proteinů. Rovněž mohou fungovat jako lešení a vázat více cílů. Tím dochází k jejich ukotvení v těsné blízkosti, což napomáhá při vytvoření proteinových komplexů. Jeden monomer v dimeru 14-3-3 váže jeden protein a druhý monomer váže jiný protein. Další známou funkcí proteinů 14-3-3 je schopnost vázat svůj cíl a regulovat ubikvitinaci

(označení proteinů určených k odbourávání). Mohou buď zvyšovat nebo snižovat ubikvitinaci svých cílů, tzn. zabraňují jejich následné degradaci nebo ji urychlují [8].

Proteiny 14-3-3 vykazují vysokou vazebnou cílovou specifitu a funkční specifitu mezi izoformami. Někteří vazební partneři se mohou vázat pouze s určitými dimery proteinů 14-3-3 [8]. Příkladem může být izoforma sigma, která homodimerizuje a není schopna na rozdíl od jiných izoform vázat a regulovat protein buněčného cyklu cdc25C [16].

Izoformy proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 se skládají ze sedmi izoform – beta, gama, epsilon, zeta, éta, sigma a tau [1].

Nezávislá ablace jednotlivých izoform odhaluje informace o jejich funkcích v neuromorfogenezi [8]. Jednotlivé izoformy se liší strukturou [6, 16].

Pro zkoumání jednotlivých funkcí izoform 14-3-3 byl vyvinut myší model. Transgenní 14-3-3 funkční knock-out myši byly vytvořeny pomocí exprese YFP fúzaného difopeinu (dimerní 14-3-3 peptidový inhibitor). Tato exprese byla řízena neuronálně specifickým promotorem thy-1. Produkuje proměnlivé vzorce exprese transgenu v mozcích různých zakladatelských linií [17, 18]. Izoforma 14-3-3β je kódována genem YWHAB, který se nachází na 20. chromozomu. Je schopna se vázat na cytoplazmatický konec β1-integrinu. Integriny jsou buněčné povrchové proteiny spojující extracelulární matrix s aktinovým skeletem a díky tomu mohou regulovat migraci buněk [8]. Nadměrná exprese této izoformy stimuluje šíření a migraci buněk [3]. Tato izoforma představuje jeden z důležitých diagnostických markerů Creutzfeldt Jakobovy choroby, konkrétně její sporadické formy [2].

Izoforma 14-3-3γ je kódována genem YWHAG, který se nachází na 7. chromozomu, tento protein je 100 % identický s krysím ortologem. Hladina této izoformy je v mozkové kůře snížena u Downova syndromu, avšak u Alzheimerovy choroby je jeho hladina zvýšená. Izoforma 14-3-3γ byla také identifikována jako onkogen působící nepřímou down-regulací transaktivace supresoru tumoru p53. Má zásadní roli v buněčném cyklu i kortikálním vývoji. Delece genu YWHAG způsobuje Williamsův syndrom (WS), což je neurovývojová porucha vyvolávající opoždění vývoje, intelektuální postižení a epilepsii [8].

Taktéž má významnou roli pro správnou migraci neuronů, přičemž poruchy tohoto procesu souvisí s výskytem epilepsie. Ve studii Jin et al. bylo zjištěno, že se váže na cytoplazmatické linkerové proteiny. Tato interakce pravděpodobně ovlivňuje dynamiku mikrotubulů a narušuje tak migraci neuronů. Odstranění 14-3-3γ v kortikálních neuronech in vivo vyvolává abnormální neuronální morfologii s kratšími procesy vedení a nižším počtem procesů zasahujících do marginální zóny [8, 19].

Izoforma 14-3-3ε je kódována genem YWHAЕ, který se nachází na 17. chromozomu. Byla prokázána u všech druhů savců. Konzervuje se velmi dobře v aminokyselinové sekvenci. Spolu s izoformou

14-3-3ζ bývá zapojena do patogeneze neurologických poruch, jako je například schizofrenie, Alzheimerova choroba nebo Parkinsonova nemoc. Jsou podstatnými regulátory neurogeneze a neurodiferenciace během kortikálního vývoje. Izoforma 14-3-3ε je nepostradatelná pro migraci radiálních neuronů během kortikálního vývoje. Delece genu YWHAE způsobuje poruchu migrace neuronů, která se může projevit jako tzv. lissencefalie, neboli „hladký mozek“ odkazující na tvar mozku s vyhlazenými fisurami. Tato abnormalita bývá popisována v rámci Miller-Diekerova syndromu, kde je vyjádřena kombinace mentální retardace, abnormálního svalového tonu s typickým facies a epileptickými záchvaty [8].

Současně se tato izoforma váže na protein Doublecortin (Dcx) na T42 specifickým fosforylačním způsobem. Jedná se o protein vázající mikrotubuly. Jeho nadměrná exprese narušuje organizaci a polymeraci mikrotubulů. Nadměrná exprese 14-3-3ε poškozuje iniciaci neuritů vazbou na protein Dcx, zabraňuje jeho degradaci, což podněcuje zvýšení hladiny Dcx, čímž zhoršuje dynamiku mikrotubulů a zabraňuje jejich invazi do primitivních neuritů [8].

Mikrodelece u izoformy 14-3-3ε jsou charakterizovány autistickými projevy a deformacemi obličeje. V některých případech může být s neurodegenerací propojena snížená hladina testosteronu. Izoforma 14-3-3ε tedy představuje negativní regulátor testosteronu [13].

Izoforma 14-3-3ζ je kódována genem YWHAZ, který se nachází na 8. chromozomu. Mnoho studií dokázalo souvislost mezi izoformou 14-3-3ζ a rozvojem schizofrenie [8, 17]. Tato izoforma je zkoumána i v rámci onkologie, kdy je zapojena do onkogenních procesů a zároveň se zkoumá její funkce v rámci chemoresistence. Vysoké hladiny exprese 14-3-3ζ byly objeveny u různých druhů rakoviny jako např. prsu, plic, hlavy, krku, mnohočetného myelomu nebo u glioblastomu [10]. Bývá přítomna převážně v jádře buňky [3].

Izoforma 14-3-3η je kódována genem YWHAH, který se nachází na 22. chromozomu. Funkce této izoformy není známá, zatím je součástí výzkumu [8].

Izoforma 14-3-3σ reguluje řízení buněčného cyklu [8]. Kromě toho se jedná o nádorový supresor, který je down-regulován u rakoviny prsu. Bylo prokázáno, že se tato izoforma váže na komplexy cytokinů cdc2, které uvolňuje do cytoplazmy. Díky tomu dochází k opravení poškozené DNA před zahájením buněčného cyklu [8]. Je velmi vzácná, protože je převážně exprimována v epiteliálních buňkách a funguje převážně jako homodimer [8]. Může být také výrazně exprimována u karcinomu tlustého střeva či u duktálního karcinomu slinivky břišní, a tím zajišťuje vyšší přežití nádorových buněk a jejich invazivitu [10]. Někdy také bývá označována jako lidský epiteliální marker (HEM) nebo jako stratifin. Jeho hlavním regulátorem je p53 (tumor supresorový gen). Ten zastavuje buněčný cyklus nebo apoptózu při poškození DNA. Například u nádorových onemocnění způsobuje mutace tohoto genu snížení exprese izoformy 14-3-3σ. Kromě p53 může být izoforma regulována proteinem p63 (řídí přerušování buněčného cyklu nebo apoptózy) [3].

Izoforma 14-3-3τ je kódována genem YWHAQ,

který se nachází na 2. chromozomu. Tato izoforma se vyskytuje u pacientů s nádorovým onemocněním prsu [10].

Prionová onemocnění

Tato skupina onemocnění patří mezi vzácná neurodegenerativní onemocnění. Prionová onemocnění způsobují drobné bílkovinné infekční částice, také označované jako priony (z angl. Proteinaceous Infectious Particles). Tento pojem byl poprvé uveden v roce 1982 americkým lékařem Stanley B. Prusinerem [21, 22]. Priony jsou odolné vůči inaktivaci většiny postupů, které modifikují nukleové kyseliny [23].

U všech prionových onemocnění dochází k přeměně prionového proteinu PrPC (prion-related protein C jako „cell“, tedy buněčná forma proteinu) na patogenní abnormální formu PrPSc (Sc znamená scrapie neboli klusavka, prionové onemocnění ovcí a koz) a k jeho následnému hromadění [24]. Patologicky změněný prionový protein se ukládá do mozkové tkáně a vede k zániku neuronů [21]. PrPC je rozpustný v jemných detergentech a je citlivý na trávení proteázami. PrPSc je vysoce agregovaný a částečně odolný vůči štěpení proteázy K [25].

Podle Prusinera vzniká patogenní prionový protein změnou prostorového uspořádání bílkovinného řetězce. Při změně dochází ke zmenšování podílu a helikálního upořádání a přibývá podíl β-struktury bílkovinného řetězce, tím se mění rozpustnost a odolnost vůči proteázám [24, 26].

V roce 1997 byl Prusiner za svůj objev prionů oceněn Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu [27].

Priony jsou jediné patogeny, které nemají nukleové kyseliny, jsou tvořeny pouze molekulou prionového proteinu. Normální protein PrPC se nachází ve spoustě tkání, například v neuronech, B lymfocytech, T lymfocytech nebo ve slizničních buňkách gastrointestinálního traktu [21, 26].

Existují tři mechanismy vzniku prionového onemocnění - spontánní (sporadický), genetický (familiární) a získaný (infekční, příp. iatrogenní) [24].

Přítomnost PrPC proteinu představuje důležitý předpoklad pro další tvorbu prionů [26]. Abnormální forma prionového proteinu PrPSc působí jako šablona a v případě kontaktu s prionovým proteinem PrPC dochází k transformaci PrPC na PrPSc. Tímto způsobem vzniknou dva priony, které transformují další dva PrPC na PrPSc. Ty pak transformují další čtyři priony, což vede k exponenciální transformaci a hromadění prionů [24].

V současné době se odhadují dva způsoby (kinetický a termodynamický), kterými dochází k množení PrPSc proteinu, a tím k poškození mozku a vzniku prionového onemocnění. Po vniknutí PrPSc do organismu probíhá změna prostorového uspořádání bílkovinného řetězce, která je řízena kineticky. Díky konformaci dojde ke zdolání energeticky náročné bariéry [26].

Druhý způsob přeměny PrPC na PrPSc je řízen termodynamicky. Prusinerova skupina předpokládá existenci proteinu X, který by mohl interakci s PrPC být

příčinou jeho změny na patogenní formu [26].

Mezi nejvíce se vyskytující prionová onemocnění patří sporadická forma Creutzfeldt-Jakobovy choroby (sCJN). Dále se vyskytují jiné vzácnější formy CJN, jako je například familiární CJN, iatrogenní CJN nebo nová varianta CJN. Existují také další onemocnění způsobené priony objevující se u lidí, například kuru, Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom nebo fatální familiární insomnie [22, 26].

Prionová onemocnění se nachází nejenom u lidí, ale postihuje i zvířata. Zde patří původně Prusinerem zkoumaná klusavka (scrapie) u ovcí, chronické chřadnutí jelenovitých nebo bovinní spongiformní encefalopatii, označovaná také jako nemoc šílených krav [22, 26]. Právě posledně jmenovaná nemoc počátkem tohoto tisíciletí způsobila smrt několika desítek lidí v Evropě. Projevila se u člověka jako tzv. nová varianta CJN neboli Willova nemoc. K diagnóze prionových onemocnění se využívá neurohistologické vyšetření mozkové tkáně spolu s imunohistochemickými metodami a Western blot. Součástí je kromě tohoto i molekulární genetická analýza [22].

Z patologického hlediska je pro prionová onemocnění charakteristická spongiformní dystrofie, numerická atrofie neuronů a sekundární reaktivní izomorfní astroglóza [22].

Sporadická Creutzfeldt-Jakobova choroba (sCJN) sCJN je vzácné geneticky podmíněné onemocnění projevující se rychle progredující demencí a dalšími neurologickými symptomy. Většina pacientů umírá do jednoho roku od prvních symptomů.

Incidence tohoto onemocnění se pohybuje mezi 1-2 osoby na milion obyvatel. Průměrný věk nástupu nemoci se je okolo 65 let (rozmezí 14 - 92 let). U pacientů se nejprve objevují nespecifické příznaky, jako je bolest hlavy, únava, nespavost, deprese, posléze se rozvíjí demence. K demenci se připojují nejméně dva další klinické projevy, myoklonus (nejprve vyvolaný např. úlekem nebo poklepem na svalstvo hrudníku či končetin, později se již projevuje spontánně); mozečkové a zrakově prostorové dysfunkce, pyramidové a extrapyramidové projevy (změny svalového tonu s ataxií a poruchami chůze), nakonec se může rozvinout akinetický mutismus, kdy je pacient nepohyblivý a neschopný plynulé řeči [21, 28].

Pro diagnostiku sCJN se kromě klinických kritérií využívá pozitivního nálezu dalších pomocných metod, EEG, stanovení proteinů 14-3-3 v mozkomíšním moku nebo vyšetření magnetickou rezonancí. Pro sCJN svědčí EEG nález generalizované trifázické nebo polyfázické vlny periodicky se opakující v intervalech 0,5-2 s po dobu 100-300 ms [21]. Přítomnost zvýšené hladiny proteinů 14-3-3 v likvoru je zjišťována po elektroforetické separaci a následném Western blottingu. Význam má také stanovení celkového tau proteinu v mozkomíšním moku, který v porovnání např. s Alzheimerovou nemocí vykazuje násobně vyšší koncentrace, přičemž fosforylovaný tau zvýšený nebývá [30]. Ze zobrazovacích metod je velmi důležitá magnetická rezonance mozku. Kromě vyloučení jiných možných příčin rychle progredující demence je možno pozorovat

i typické znaky prionového onemocnění. Zejména v sekvencích FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) a DWI (Diffusion Weighted Imaging) jsou patrné hyperintenzity bazálních ganglií. Od roku 2017 je zahrnuta do diagnostických kritérií také metoda RT-QuIC (real-time quaking-induced conversion), Tabulka 1. Tato metoda umožňuje detekovat patogenní formu prionového proteinu ve vzorku stěru z nosní dutiny nebo z mozkomíšního moku [21].

Table 1. Modified WHO criteria for the diagnosis of sCJN (modified according to Zerr et al. 2019; modified 2017) [21].

| Disease | Diagnostic criteria |
|--|---|
| Possible sCJN (clinically defined only) | Progressive dementia |
| | EEG with negative findings (or unavailable) |
| | Disease duration < 2 years |
| | The presence of at least 2 of the 4 possible manifestations: <ul style="list-style-type: none"> ▪ myoclonus ▪ visual or cerebellar manifestations ▪ pyramidal / extrapyramidal impairment ▪ akinetic mutism |
| Probable sCJN (clinical picture + auxiliary examinations) | Conditions meeting a possible sCJN + routine investigation results do not offer an alternative diagnosis + EEG with typical findings (generalized triphasic complexes with a periodicity of around 1 s) or... evidence of 14-3-3 proteins in CSF or...MRI findings - hyperintense signals in the putamen, ncl. caudatus and cortical strips on FLAIR sequences and/or in diffusion weighting and/or diffusion-weighted and/or ... RT-QuIC positivity |
| Definitive sCJN | It requires a neuropathological examination of the brain tissue with the finding of spongiform dystrophy or detection of protease-resistant protein (immunohistochemistry, Western blot) or evidence of scrapie-associated fibrils (SAF - scrapie-associated fibrils) by electron microscopy. |

Metody detekce / stanovení

Nejčastěji používanou metodou detekce proteinů 14-3-3 je Western blot. Jedná se o metodu využívanou ke zjišťování relativního množství, relativní hmotnosti nebo také ke zkoumání interakcí protein-protein. Tato metoda je založena na interakci protilátek s cílovými antigeny ve vzorku. Metoda se skládá ze tří základních kroků. Prvním krokem je elektroforetická separace. Nejčastěji se provádí pomocí gelové elektroforézy, konkrétně SDS-PAGE elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Působením dodecylsiranu sodného (SDS, sodium dodecyl sulfate) dochází k denaturaci proteinů, čímž proteiny získávají záporný náboj a v elektrickém poli se pohybují od záporného ke kladnému pólu. Proteiny jsou během elektroforézy rozdělovány podle molekulové hmotnosti (kDa). Velké proteiny se na rozdíl od malých proteinů pohybují v gelu pomaleji. Druhým krokem je přenos separovaných proteinů elek-

troforézou na určitou membránu, kde je jejich přítomnost detekována pomocí primární protilátky. Pro přenos se využívá kapilární blotting nebo elektroblotting, tj. působení elektrického proudu, při němž jsou pásy (příslušné proteiny) uchyceny na membránu adsorpcí nebo kovalentní vazbou. Nejčastěji se využívají nitrocelulosové nebo polyvinyllové membrány. Třetím krokem je detekce proteinů. Primární protilátku nelze přímo vizualizovat, je rozpoznávána až po vazbě sekundární protilátky. Sekundární protilátky jsou značeny například biotinem nebo konjugovány s enzymem (např. HRP – křenuvová peroxidáza nebo ALP – alkalická fosfatáza). Její přítomnost je následně detekována různými způsoby, které jsou závislé na značce sekundární protilátky, chromogenně (nízká citlivost, fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně (vysoká citlivost). Pro posouzení velikosti signálu se využívá porovnání s proteinovým markerem (komerčně dodávaná směs proteinů o známé molekulové hmotnosti, lze připravit i ve specializované laboratoři), který by měl být vždy aplikován na gel společně se vzorky pacientů.

Další možností je kvantitativní stanovení proteinů 14-3-3 metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Jde o imunochemické stanovení využívající kromě reakce antigen-protilátka také přítomnost enzymu, který následně reaguje například s chromogenním substrátem za vzniku měřitelné barevné změny. Využívá se ke stanovení biologicky významných látek jako jsou sérové proteiny, hormony, cytokiny, markery nádorového bujení, ale také exogenních látek produkováných např. viry či bakteriemi

I přes veškerý pokrok, který v posledních letech doznal velkých úspěchů jak na poli laboratorním, tak i na poli diagnostiky, jsou dosud prionová onemocnění nevléčitelná. Kromě symptomatických postupů v terapii myoklonů a epilepsie, je přístup multioborový, postupně pak hlavně ošetrovatelský a paliativní. Často bývá nutno poskytnout i psychologickou podporu rodině.

Literatura

1. **Aitken, A.** 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem. Sci.*, 1995, 20(3), s. 95-97. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(00)88971-9.
2. **Rusina, R., Nováková, J., Koukolík, F., Matěj, R.** Vyšetřování proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku – klinicko patologická korelace. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. Praha: Care Comm., 2008, 15(6).
3. **Mhaweck, P.** 14-3-3 proteins—an update. *Cell Res.*, 2005, 15(4), s. 228-236. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cr.7290291
4. **Dougherty, M., Morrison, K., Morrison, D. K.** Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci.*, 2004, 117(10), s. 1875-1884. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.01171
5. **Foote, M., Zhou, Y.** 14-3-3 proteins in neurological disorders. *International J Biochem. Mol. Biol.*, 2012, 3(2), s. 152-164.
6. **Benzinger, A., Popowicz, G. M., Joy, J. K., Majumdar, S., Holak, T. A., Hermeking, H.** The crystal structure of the non-liganded 14-3-3 σ protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Res.*, 2005, 15(4), s. 219-227. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cr.7290290
7. **Aitken, A.** 14-3-3 proteins: A historic overview. *Sem. Canc. Biol.*, 2006, 16(3), s. 162-172. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.005
8. **Cornell, B., Toyo-Oka, T.** 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Front. Mol. Neurosci.*, 2017, 10. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2017.00318
9. **Ferl, R. J., Manak, M. S., Reyes, M. F.** The 14-3-3s. *Genom. Biol.*, 2002, 3(7). Dostupné z: doi:10.1186/gb-2002-3-7-reviews3010
10. **Pennington, K. L., Chan, T. Y., Torres, M. P., Andersen, J. L.** The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene*, 2018, 37(42), s. 5587-5604. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-018-0348-3
11. **Tzivion, G., Shen, Y. H., Zhu, J.** 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene*, 2001, 20(44), s. 6331-6338. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1204777
12. **Dunphy, W. G., Kumagai, A.** The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 1991, 67(1), s. 189-196. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(91)90582-J
13. **Aghazadeh, Y., Papadopoulos, V.** The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discover. T.*, 2016, 21(2), s. 278-287. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2015.09.012
14. **Berg, D., Holzmann, C., Riess, O.** 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003, 4(9), s. 752-762. Dostupné z: doi:10.1038/nrn1197
15. **Steinacker, P., Aitken, A., Otto, M.** 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2011, 22(7), s. 696-704. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2011.08.005
16. **Wilker, E. W., Grant, R. A., Artim, S. C., Yaffe, M. B.** A Structural Basis for 14-3-3 Functional Specificity. *J Biol. Chem.*, 2005, 280(19), s. 18891-18898. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M500982200
17. **Foote, M., Qiao, H., Graham, K., Wy, Y., Zhou, Y.** Inhibition of 14-3-3 Proteins Leads to Schizophrenia-Related Behavioral Phenotypes and Synaptic Defects in Mice. *Biol. Psych.*, 2015, 78(6), s. 386-395. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopsych.2015.02.015
18. **Qiao, H., Foote, M., Graham, K., Wy, Y., Zhou, Y.** 14-3-3 Proteins Are Required for Hippocampal Long-Term Potentiation and Associative Learning and Memory. *J Neurosci.*, 2014, 34(14), s. 4801-4808. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.4393-13.2014
19. **Jin, J., Smith, F. D., Stark, C.** Proteomic, Functional, and Domain-Based Analysis of In Vivo 14-3-3 Binding Proteins Involved in Cytoskeletal Regulation and Cellular Organization. *Curr. Biol.*, 2004, 14(16), s. 1436-1450. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2004.07.051
20. **Cornell, B., Wachi, T., Zhukarev, V., Toyo-Oka, T.** Regulation of neuronal morphogenesis by 14-3-3epsilon (Ywhae) via the microtubule binding protein, doublecortin. *Hum. Mol. Gen.*, 2016, 25(20), s. 4405-4418. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddw270
21. **Rusina, R., Matěj, R.** *Neurodegenerativní onemocnění. 2., přepracované a doplněné vydání.* Praha: Mladá fronta, 2019. Aeskulap. ISBN 978-80-204-5123-1.
22. **Kaňovský, P., Bártková, A.** *Speciální neurologie.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2020. ISBN 978-80-244-5611-9.
23. **Prusiner, S. B.** Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*, 1982, 216(4542), s. 136-144. Dostupné z: doi:10.1126/science.6801762
24. **Geschwind, M. D.** Prion Diseases. *CONTINUUM: Life-long Learn. Neurol.*, 2015, 21, s. 1612-1638. Dostupné z: doi:10.1212/CON.0000000000000251

25. **Perrett, S., Ma, J., Wang, F.** Prion disease and the 'protein-only hypothesis'. *Essays Biochem.*, 2014, 56, s. 181-191. Dostupné z: doi:10.1042/bse0560181
26. **Koukolík, F., Jiráček, R.** Alzheimerova nemoc a další demence. *Praha: Grada*, 1998. ISBN 80-716-9615-3.
27. **Prusiner, S. B.** Nobel Lecture: Prions. *Proc.Nat. Acad. Sci.*, 1998, 95(23), s. 13363-13383. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.23.13363
28. **Uttley, L., Carroll, C., Wong, R., Hilton, D. A., Stevenson, Tevenson, M.** Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic review of global incidence, prevalence, infectivity, and incubation. *The Lancet Infect. Dis.*, 2020, 20(1), s. 2-10. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(19)30615-2
29. *WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies including variant Creutzfeldt-Jakob disease.* Geneva: World Health Organization, 2003. ISBN 9241545887.
30. **Hermann, P., Appelby, P., Brandel, J.-P. et al.** Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet Neurol.*, 2021, 20(3), s. 235-246. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(20)30477-4
31. **Zerr, I., Kallenberg, K., Summers, D. M. et al.** Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 2009, 132(10), s. 2659-2668. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awp191

Podpořeno MZ ČR – RVO – FNOs/2021

Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 25. 4. 2022

Adresa pro korespondenci
doc. RNDr. Pavlína Kušnířová, Ph.D.
Oddělení klinické biochemie
Ústav laboratorní medicíny
Fakultní nemocnice Ostrava
17. listopadu 1790/5
708 52 Ostrava-Poruba
e-mail: pavlina.kusnierova@fno.cz