



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

Dottorato di Ricerca in
BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI ED AMBIENTALI

17° ciclo - III ciclo nuova serie

Ruolo diagnostico della tipizzazione delle proteine
14-3-3 liquorali nella Malattia di Creutzfeldt-Jakob

Coordinatore: Ch.mo Prof. Hugo Luis Monaco

Tutore: Ch.mo Prof. Salvatore Monaco

Dottorando: Michele Fiorini

Ai miei genitori

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	5
<i>LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI.....</i>	<i>5</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>5</i>
<i>L'agente patogeno</i>	<i>5</i>
<i>Eziologia delle malattie da prioni umane.....</i>	<i>8</i>
<i>Genetica.....</i>	<i>9</i>
<i>Biochimica.....</i>	<i>10</i>
<i>Caratteristiche cliniche della sCJD.....</i>	<i>11</i>
<i>Basi molecolari della sCJD.....</i>	<i>12</i>
<i>Diagnosi della sCJD.....</i>	<i>14</i>
<i>Criteri diagnostici per la sCJD)</i>	<i>16</i>
<i>LIQUIDO CEREBROSPINALE (CSF).....</i>	<i>17</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>17</i>
<i>LE PROTEINE 14-3-3.....</i>	<i>19</i>
<i>Introduzione.....</i>	<i>19</i>
<i>Struttura.....</i>	<i>21</i>
<i>Struttura e funzione</i>	<i>23</i>
<i>Fosforilazione.....</i>	<i>25</i>
<i>Comunicazione intracellulare, divisione e differenziazione cellulare.....</i>	<i>26</i>
<i>Funzione nei canali ionici</i>	<i>27</i>
<i>Apoptosi.....</i>	<i>28</i>
<i>Le proteine 14-3-3 nelle malattie neurologiche.....</i>	<i>31</i>
<i>Le proteine 14-3-3 nella malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica.....</i>	<i>32</i>
<i>PROTEINA TAU.....</i>	<i>35</i>
<i>Proteina Tau nella sCJD</i>	<i>37</i>
SCOPO DELLA TESI	38
PAZIENTI E METODI	40
<i>PAZIENTI.....</i>	<i>40</i>
<i>STUDI GENETICI.....</i>	<i>40</i>
<i>ELETTROFORESI SU GEL POLIACRILAMIDE IN PRESENZA DI</i>	
<i>SODIO-DODECIL-SOLFATO (SDS-PAGE)</i>	<i>41</i>
<i>ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE (2D-PAGE)</i>	<i>42</i>
<i>WESTERN BLOT.....</i>	<i>43</i>

<i>DOSAGGIO DELLA PROTEINA TAU</i>	<i>44</i>
<i>ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA UMANA</i>	
<i>RICOMBINANTE 14-3-3 ζ.....</i>	<i>45</i>
<i>DEFOSFORILAZIONE CON FOSFATASI ALCALINA.....</i>	<i>46</i>
RISULTATI.....	47
<i>STUDIO RETROSPETTIVO DI CAMPIONI DI CSF DI SOGGETTI CON</i>	
<i>SCJD DEFINITA.....</i>	<i>47</i>
<i>Pazienti.....</i>	<i>47</i>
<i>Ricerca della proteina 14-3-3.....</i>	<i>48</i>
<i>Dosaggio della proteina Tau.....</i>	<i>49</i>
<i>STUDIO DI CAMPIONI DI CSF DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON</i>	
<i>NEUROLETTICI.....</i>	<i>51</i>
<i>Pazienti.....</i>	<i>51</i>
<i>Ricerca della proteina 14-3-3.....</i>	<i>51</i>
<i>Dosaggio della proteina Tau.....</i>	<i>53</i>
<i>CARATTERIZZAZIONE DELLE DIVERSE ISOFORME DI 14-3-3 NEL</i>	
<i>TESSUTO CEREBRALE NEI SOGGETTI CON SCJD DEFINITA E NEI</i>	
<i>PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON NEUROLETTICI.....</i>	<i>54</i>
<i>Studio della specificità degli anticorpi utilizzati e caratterizzazione</i>	
<i>monodimensionale.....</i>	<i>54</i>
<i>CARATTERIZZAZIONE DELLE DIVERSE ISOFORME DI 14-3-3 NEL</i>	
<i>CSF DEI SOGGETTI CON SCJD DEFINITA E NEI PAZIENTI IN</i>	
<i>TRATTAMENTO CON NEUROLETTICI.....</i>	<i>58</i>
<i>Caratterizzazione monodimensionale.....</i>	<i>58</i>
<i>Caratterizzazione bidimensionale.....</i>	<i>60</i>
<i>Defosforilazione enzimatica dei campioni di CSF.....</i>	<i>61</i>
<i>Defosforilazione enzimatica dei campioni di CSF.....</i>	<i>62</i>
DISCUSSIONE	64
BIBLIOGRAFIA	68
RINGRAZIAMENTI.....	82

ABSTRACT

The 14-3-3 proteins are a family of multifunctional polypeptides highly expressed in human brain. In several neurological disorders, characterized by rapid tissue destruction, these and other neuronal proteins, including Tau-protein, are released in the cerebrospinal fluid (CSF).

Here were investigated 59 CSF samples of patients screened for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD). Twelve patients were under treatment with typical and atypical antipsychotic drugs (NT patients). All samples except control specimens were 14-3-3 positive. High Tau-protein levels were found in CSF from sCJD subjects, whereas normal CSF Tau-protein levels were observed in the 12 NT patients.

NT, sCJD and control CSF were studied by one- and two-dimensional immunoblots with 14-3-3-isotype-specific antibodies. All patients with "14-3-3/Tau-protein dissociation" showed a marked increase of phosphorylated 14-3-3 ζ , while 14-3-3 γ , ϵ and unphosphorylated ζ were seen in Creutzfeldt-Jakob disease.

These results show that characterization of CSF 14-3-3 isotypes greatly increases diagnostic sensitivity in patients under evaluation for sCJD.

The novel detection of phosphorylated 14-3-3 ζ , an inactivated anti-apoptotic factor, in patients under treatment with neuroleptics raises the possibility that neuroleptic drugs may activate neuronal apoptotic mechanisms.

In addition, detection in the CSF of phosphorylated 14-3-3 ζ , may represent a real-time marker of ongoing cellular processes in the brain.

RIASSUNTO

Le proteine 14-3-3 sono una famiglia di proteine multifunzionali altamente espresse nel cervello umano. In numerose malattie neurologiche, caratterizzate da una rapida distruzione tissutale, queste ed altre proteine, comprese la proteina Tau, sono rilasciate nel liquido cerebrospinale.

In questa tesi sono stati studiati 59 campioni di CSF di pazienti con una diagnosi di malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica (sCJD). Dodici pazienti erano in trattamento con farmaci antipsicotici tipici e atipici (pazienti NT).

Tutti i campioni, ad eccezione dei controlli erano 14-3-3 positivi, ma abbiamo rilevato alti livelli di Tau nei CSF poi attribuiti a pazienti sCJD confermati e livelli di proteina Tau liquorale normali nei 12 pazienti NT.

I CSF di soggetti NT, sCJD e dei controlli sono stati analizzati con immunoblot con anticorpi anti-14-3-3 isoforma specifici dopo separazioni mono- e bi-dimensionali.

Tutti i pazienti con "dissociazione 14-3-3/proteina Tau" hanno mostrato un marcato incremento di 14-3-3 ζ fosforilata, mentre nella sCJD sono stati osservate le 14-3-3 γ , ϵ e ζ non fosforilata.

Questi risultati mostrano che la caratterizzazione degli isotipi di 14-3-3 nel CSF aumentano notevolmente la sensibilità diagnostica nei pazienti in diagnosi per sCJD.

La nuova identificazione della 14-3-3 ζ fosforilata, un fattore anti-apoptotico inattivato, nei pazienti in trattamento con neurolettici aumenta

la possibilità che i farmaci neurolettici possano attivare meccanismi apoptotici neuronali.

Inoltre, la ricerca della 14-3-3 ζ fosforilata nel CSF può rappresentare un marker in tempo reale di processi cellulari in atto.

INTRODUZIONE

LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI

Introduzione

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), o malattie da prioni, sono un gruppo di malattie neurodegenerative che colpiscono il sistema nervoso centrale. Le TSE sono invariabilmente ad esito fatale e sono caratterizzate da un lungo periodo d'incubazione. Sono malattie che colpiscono i mammiferi: tra le più note e diffuse la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD) negli uomini, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e la scrapie negli ovi-caprini (1).

L'agente patogeno

L' agente responsabile di queste malattie presenta alcune peculiarità, quali la lenta incubazione (anche 30 anni) e la resistenza alle comuni tecniche di inattivazione utilizzate per i virus (i.e. raggi ultravioletti, trattamento con calore, DNAsi, RNAsi, etc.).

Nel 1982, S. Prusiner riprendendo la teoria proposta da Griffith nel 1967 secondo la quale queste encefalopatie trasmissibili potessero essere causate da una proteina infettiva, introdusse il concetto di "prione" (da

proteinaceous infectious particle) e cioè di un agente infettante privo di acidi nucleici e distinto dai virus (1).

L'agente patogeno delle TSE è stato identificato in una particella proteica: si tratta di un'isoforma patologica o prione della proteina prionica cellulare normale (1).

L'evento chiave della patologia è una modificazione a livello conformazionale della proteina sana nell'isoforma patologica (2).

Il cambiamento è caratterizzato dal passaggio da una struttura terziaria costituita prevalentemente da α -elica ad una struttura dove prevalgono le strutture a foglietto- β (vedi figura 1) (3, 4).

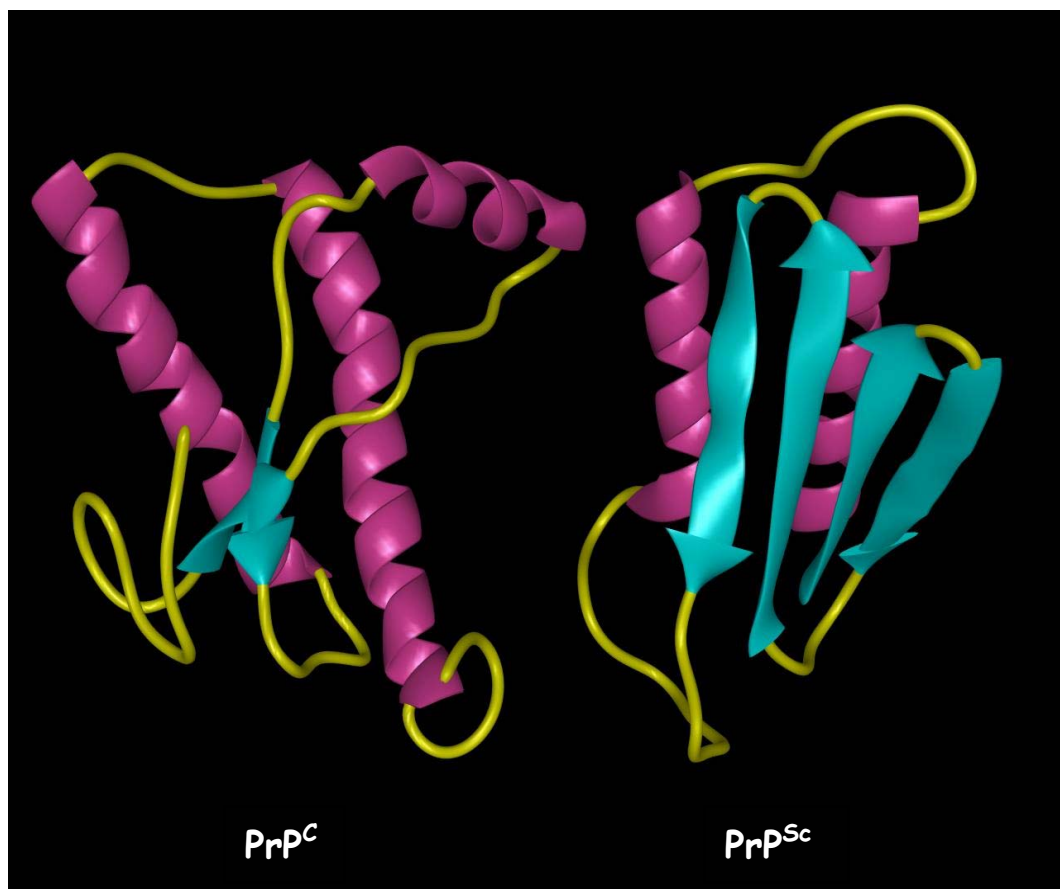


Figura 1: struttura tridimensionale della PrP^C e della PrP^{Sc} (la struttura è stata ricavata da modelli teorici)

Questi cambiamenti conferiscono al prione delle caratteristiche nuove: diventa resistente al trattamento con proteasi e insolubile in detergenti deboli (5).

Il prione possiede caratteristiche di infettività: può propagare questa proprietà ad altre proteine prioniche cellulari e i tessuti che lo contengono possono a loro volta trasmettere la malattia ad altri individui (6).

La teoria della nucleazione e del “template assistance” sono i modelli proposti per spiegare la propagazione.

Secondo la teoria della nucleazione, la PrP^{C} tende spontaneamente a modificarsi in una forma in grado di aggregarsi, o PrP^{Sc} ; quando avviene la formazione del primo nucleo di PrP^{Sc} capace di reclutare nuove molecole di PrP^{C} , queste assumono le caratteristiche della PrP^{Sc} , venendo aggregate nel nucleo. Il nucleo poi si frammenta formando nuovi nuclei che, disseminandosi, aggregano nuove PrP^{C} e il processo si perpetua.

Nel modello del template assistance la PrP^{C} si converte in PrP^{Sc} attraverso la formazione di una forma intermedia definita anche PrP^* . La conversione della PrP^* in PrP^{Sc} dipende dalla presenza di una terza proteina, definita Proteina X, che modula questo cambio conformazionale. Formata la prima molecola di PrP^{Sc} , quest’ultima rientra nel ciclo legandosi al complesso PrP^* -Proteina X determinando la formazione di una nuova molecola di PrP^{Sc} ed il fenomeno procede a cascata (7).

Eziologia delle malattie da prioni umane

Le malattie da prioni umane possono avere una eziologia sporadica, genetica o infettiva (2).

MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB SPORADICA. Le forme sporadiche delle malattie da prioni costituiscono la maggior parte delle CJD. In questi pazienti non sono riscontrate mutazioni del gene della PrP (*PRNP*) (7). Le ipotesi più plausibili includono una trasmissione orizzontale dei prioni da uomo o animale (8), mutazioni somatiche del gene della PrP o la conversione spontanea della PrP^C in PrP^{Sc} (9, 10, 11).

MALATTIE DA PRIONI GENETICHE. Ad oggi, sono note venti diverse mutazioni a carico del gene della PrP umana che segregano con malattie da prioni ereditarie (12). Fra queste la malattia di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) (10), l'insonnia fatale familiare (FFI) (13) e la malattia di Creutzfeldt-Jakob familiare (fCJD) (14). Le forme familiari, trasmesse con modalità autosomica dominante, rappresentano circa il 10-15% e segregano con diversi fenotipi clinici e patologici a seconda della mutazione presente nel *PRNP* e del codone 129. Le mutazioni sono per la maggior parte puntiformi oppure dovute all'inserzione di ottapeptidi (12).

MALATTIE DA PRIONI INFETTIVE. Le malattie da prioni infettive includono il kuru delle popolazioni della Nuova Guinea dove l'agente infettivo veniva trasmesso tramite rituali cannibalistici (8). Fonti

iatrogeniche di prioni possono essere elettrodi intratecali impropriamente sterilizzati, trapianti di cornea, ormoni della crescita umani e gonadotropine derivati da ghiandole pituitarie cadaveriche e trapianti di dura madre (16). Un'altra forma infettiva è la nuova variante della CJD (vCJD), manifestatasi con il primo caso nel 1994 in Gran Bretagna. Si ritiene che l'origine della vCJD sia stata la trasmissione della BSE all'uomo (17).

Genetica

La proteina prionica è codificata del gene *PRNP*. Questo gene presenta siti polimorfici metionina/valina al codone 129 (18).

L'omozigotità al codone 129 è considerata un fattore di rischio per la sCJD. I pazienti VV tendono ad essere più giovani dei pazienti MM o MV. In generale il polimorfismo al codone 129 è considerato influenzare la suscettibilità e correlare con i fenotipi clinico patologici nella sCJD (19).

Tabella 1: distribuzione del polimorfismo al codone 129 nella sCJD e nei soggetti sani di controllo (20).

	MM	MV	VV
Controlli	42%	45%	13%
sCJD	70%	14%	16%

Biochimica

La proteina prionica è codificata come un polipeptide di 253 aminoacidi; durante la biosintesi nel reticolo endoplasmico, la PrP^C è sottoposta a numerose modificazioni post-traslazionali (9). Viene rimosso un peptide segnale di 22 aminoacidi all'N-terminale, sono aggiunte catene oligosaccaridiche alle asparagine 181 e 197, viene formato un ponte disolfuro tra cisteina 179 e cisteina 214 ed è aggiunta un'ancora di glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) dopo rimozione di un peptide segnale di 22 aminoacidi al C-terminale (9, 21). La proteina contiene due esapeptidi ripetuti e cinque ottapeptidi ripetuti all'N-terminale. La PrP può essere ritrovata come tre glicoforme: non- mono- e di-glicosilata (9, 21).

Il Western blot della PrP^C mostra tre bande a circa 27, 30 e 35 kDa corrispondenti alle tre glicoforme. In seguito a digestione con proteinasi-K di omogenato di tessuto, la PrP^C viene completamente degradata, mentre la PrP^{Sc}, parzialmente resistente, mostra uno spostamento a peso molecolare inferiore delle tre bande, per la rimozione di un frammento all'N-terminale. In seguito a digestione con proteinasi-K si possono ottenere due tipi di PrP^{Sc} con frammento resistente di 21 o 19 kDa, chiamate PrP^{Sc} di tipo 1 e tipo 2 rispettivamente (9, 21).

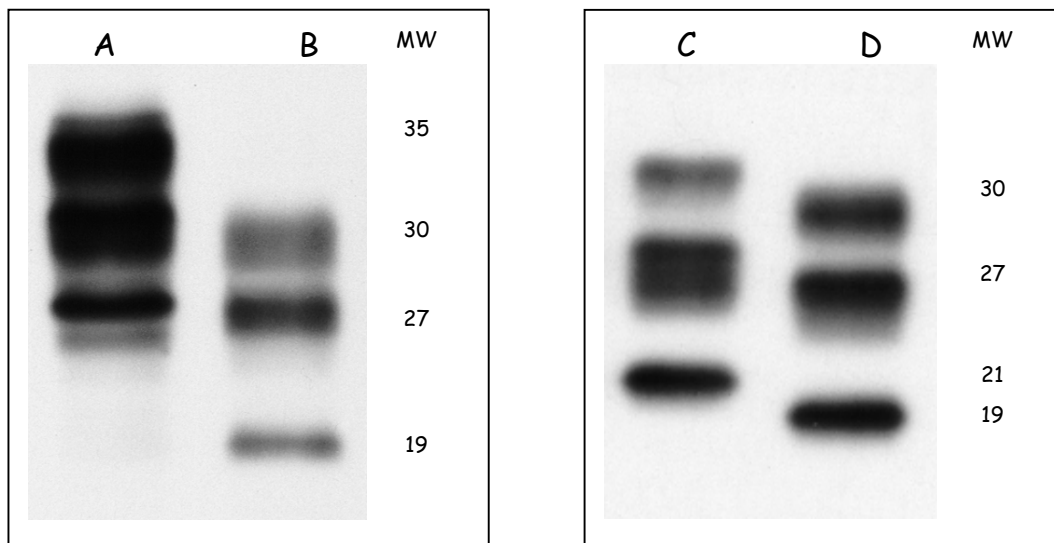


Figura 2: Western blot su PrP^{Sc} di tessuto cerebrale. (A) omogenato cerebrale intero; (B) omogenato cerebrale trattato con proteinasi K; (C) omogenato cerebrale trattato con proteinasi K, con frammento resistente a 21 kDa; (D) omogenato cerebrale trattato con proteinasi K, con frammento resistente a 21 kDa.

Caratteristiche cliniche della sCJD

La sCJD colpisce in età medio-avanzata, colpisce tipicamente pazienti nella sesta-settima decade di vita (15, 22). Non ci sono sintomi specifici all'esordio della malattia. Molto spesso si riscontrano cambiamenti depressivi, disordini del sonno e perdita di peso. Sintomi tipici sono decadimento cognitivo, o anomalie comportamentali; spesso sono osservati anche disturbi visivi. In molti casi questi sintomi sono presenti per un breve tempo allo stadio iniziale della malattia. La malattia può iniziare esclusivamente con deficit neurologici, soprattutto disturbi cerebellari (atassia) o disturbi corticali visivi. I pazienti sviluppano un graduale declino della memoria e una perdita delle funzioni cognitive.

Oltre ad una demenza rapidamente progressiva il sospetto di sCJD è suggerito da mioclono. In conseguenza del coinvolgimento di molti nuclei e tratti del CNS si possono sviluppare disfunzioni piramidali ed extrapiramidali (15, 22).

Basi molecolari della sCJD

Sono stati fatti numerosi tentativi per distinguere tra i diversi sottotipi di sCJD, basati sul profilo delle lesioni neuropatologiche e delle caratteristiche cliniche. Parchi et al. hanno stabilito la base molecolare per l'eterogeneità fenotipica nella sCJD. I fenotipi clinicopatologici sono stati caratterizzati per il polimorfismo al codone 129 e in base al tipo di frammento resistente a proteinasi-K della proteina prionica (19).

Fenotipi clinicopatologici

- M/M-1 / M/V-1: è il fenotipo più comune con una breve durata (in media 5 mesi) ed ha il picco di incidenza intorno ai settanta anni. Molto spesso l'esordio della malattia è caratterizzato da disturbi visivi corticali e demenza rapidamente progressiva, mentre è rara l'atassia a questo stadio. La sindrome clinica è accompagnata da un serio coinvolgimento del sistema piramidale ed extrapiramidale e molti pazienti sviluppano mioclono in corso di malattia. Questo fenotipo è

caratterizzato dalla presenza di degenerazione spongiotica fine, astrogliosi e perdita neuronale (19,23).

- V/V-2: colpisce in media persone più giovani (in media 62 anni) e la durata è leggermente superiore (circa 8 mesi). Spesso il primo segno clinico è l'atassia, mentre disturbi visivi sono meno frequenti all'esordio. Raramente è riscontrata demenza all'esordio, anche se tutti i pazienti diventano dementi durante il corso della malattia. L'esame neuropatologico mostra tipicamente un forte coinvolgimento del cervelletto e del tronco e lesioni spongiotiche negli strati profondi della corteccia cerebrale (19,23).
- M/V-2: le caratteristiche principali sono la lunga durata (in media 17 mesi). La demenza è il primo sintomo in circa metà dei casi, la malattia, comunque, può esordire anche con atassia o segni extrapiramidali. Dal punto di vista neuropatologico questo fenotipo è caratterizzato dalla presenza delle cosiddette placche kuru. Si possono riscontrare lesioni focali distribuite nella corteccia, sebbene possano essere trovate anche nei gangli della base, nel talamo e nel cervelletto (19,23).
- M/M-2: è ritrovato solo nel 2-8 % dei casi. Questo fenotipo è stato riconosciuto per la prima volta nel 1999. l'età media di insorgenza è intorno ai 65 anni con una durata di malattia media di 16 mesi. Si

presenta con decadimento cognitivo, seguito da afasia in un terzo dei casi. Durante il decorso della malattia insorgono comunemente mioclono e segni piramidali. La neuropatologia è caratterizzata da degenerazione spongiosa con larghi vacuoli in corteccia cerebrale, gangli della base e talamo (19,23).

- V/V-1: è il fenotipo meno comune (circa 1%).l'età d'esordio è in media 39 anni e la durata di circa 15 mesi. L'esordio è con demenza di tipo fronto-temporale che può evolvere per alcuni mesi anche senza evidenti segni motori. Possono comparire mioclono e segni piramidali. L'EEG è rallentato ma senza onde periodiche trifasiche (PSWCs). Dal punto di vista neuropatologico è severa la degenerazione spongiosa, mentre i depositi di PrP^{Sc} sono deboli e con pattern sinaptico (19,23).

Diagnosi della sCJD

In accordo con i criteri diagnostici usati correntemente, la diagnosi di sCJD definita è possibile solo dopo autopsia (24). Tuttavia negli ultimi anni sono avvenuti notevoli progressi nella caratterizzazione dei diversi fenotipi di sCJD e sono state sviluppate numerose tecniche diagnostiche per permettere una diagnosi in vita sempre più precisa della malattia (25).

NEUROPATOLOGIA

L'identificazione immunoistochimica della PrP^{Sc} è la base della diagnosi neuropatologia corrente della sCJD e delle altre malattie da prioni (24).

CSF

Il liquor cefalorachidiano è solitamente normale nei pazienti con sCJD.

Il marker del CSF universalmente utilizzato per supportare la diagnosi della sCJD è la proteina 14-3-3. Nei pazienti con sCJD si assiste solitamente ad un aumento della proteina 14-3-3. Pazienti con danno neuronale acuto causato da ipossia, infiammazione o altri eventi patologici possono presentare inizialmente positività alla 14-3-3, ma si assiste poi ad una diminuzione nel tempo se non addirittura ad una scomparsa totale (24).

ELETTROENCEFALOGRAMMA (EEG)

La caratteristica principale all'EEG nei pazienti con sCJD è la presenza di onde trifasiche periodiche (PSWCs) in circa il 70% dei casi. Nei primi stadi della malattia è riscontrata attività bilaterale alfa, con onde teta e delta irregolari (24).

IMAGING DELLA RISONANZA MEGNETICA (MRI)

L'MRI è stata considerata recentemente utile per aiutare la diagnosi della sCJD. Circa il 63% dei casi di sCJD presenta iperintensità ai gangli della base (24).

Criteri diagnostici per la sCJD (24)**CJD PROBABILE:**

- Durata inferiore a 2 anni
- Demenza progressiva
- Almeno 2 tra i segni clinici:
 - Mioclono
 - Disturbi visivi o cerebellari
 - Segni piramidali o extrapiramidali
 - Mutismo acinetico
- PSWCs all'EEG o presenza della 14-3-3 nel CSF

CJD POSSIBILE:

- Durata inferiore a 2 anni
- Demenza progressiva
- Almeno 2 tra i segni clinici:
 - Mioclono
 - Disturbi visivi o cerebellari
 - Segni piramidali o extrapiramidali
 - Mutismo acinetico
- Assenza di PSWCs all'EEG e assenza della 14-3-3 nel CSF

LIQUIDO CEREBROSPINALE (CSF)

Introduzione

Il CSF è prodotto come ultrafiltrato del plasma dai letti vascolari nei plessi corioidei, un network intricato di capillari, cellule epiteliali e tessuto connettivo interstiziale, situati nel terzo e quarto ventricolo (25). Il CSF è importante per il trasporto di biomolecole e per la rimozione di metaboliti come lattato e anidride carbonica dal sistema nervoso centrale (CNS) (26). Un adulto sano possiede circa 140 ml di CSF, che è prodotto ad una velocità di circa 0,35 ml al minuto e viene, quindi, ricambiato in 5-7 ore (26). Circa il 75% del CSF prodotto è formato dal plesso corioideo, mentre il rimanente è prodotto dai letti vascolari in zone extracorticali (25). Le cellule epiteliali in questi letti vascolari possiedono giunzioni forti che impediscono alle grandi macromolecole come le proteine e alle cellule di passare attraverso di loro. Questa barriera sangue-sistema nervoso centrale (SNC) assicura che la composizione del CSF sia strettamente regolata. Una $\text{Na}^+/\text{K-ATPasi}$ nel plesso corioideo trasporta attivamente Na^+ nel CSF ed acqua libera lo segue passivamente. Le proteine sono trasportate all'interno del CSF per pinocitosi o tramite trasportatori specifici e questi processi ne determinano una concentrazione proteica di circa 1/350 di quella del sangue. Almeno l'80% delle proteine presenti nel CSF originano dalla circolazione sistemica, mentre il rimanente 20% delle proteine è prodotto dal CNS e può essere considerato derivato dal cervello.

Negli anni '60 Moore e McGregor identificarono un numero di proteine che erano presenti ad alte concentrazioni nel cervello di bovini, conigli, ratti e scimmie, ma erano pressoché assenti o presenti in quantità molto basse nel loro fegato (27). Queste proteine furono chiamate “brain-specific proteins”, ma in seguito molte di queste furono ritrovate anche in altri tessuti, anche se in basse concentrazioni, e perciò è stato preferito il termine “brain-derived”. Molte di queste brain-derived proteins sono originate da tipi di cellule specifiche del CNS, come neuroni (NSE, 14-3-3, Tau) o astrociti (S-100b e GFAP) o microglia (ferritina) o cellule infiammatorie (IgG oligoclonali) o oligodendrociti (MBP) (28).

LE PROTEINE 14-3-3

Introduzione

Le proteine 14-3-3 sono una famiglia di proteine identificate per la prima volta nel 1967 da Moore e Perez durante una classificazione sistematica delle proteine del cervello (29).

Il nome 14-3-3 inizialmente era stato attribuito alla frazione di eluizione in seguito a cromatografia per scambio ionico su DEAE-cellulosa e ad elettroforesi su gel d'amido (29).

Questa classe di proteine è stata trovata in tutti gli organismi eucariotici in modo altamente conservato (vedi figura3). Nei mammiferi vengono distinte sette isoforme, denominate β , ϵ , η , γ , τ , ζ e σ (30); altre due specie, inizialmente denominate α e δ , sono le forme fosforilate delle isoforme β e ζ rispettivamente (31). La concentrazione più elevata è riscontrata nel cervello, dove rappresentano circa l'1% delle proteine solubili totali (32) e sono maggiormente espresse nel compartimento citoplasmatico, nella membrana plasmatica e negli organelli intracellulari (33).

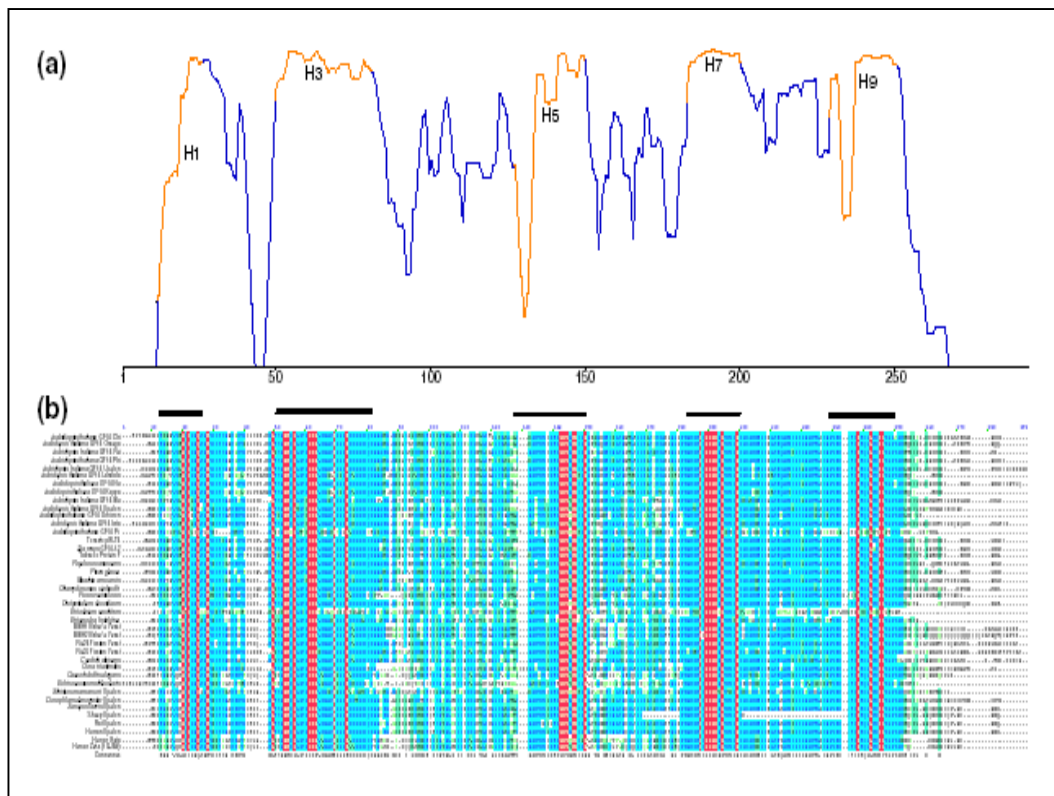


Figura 3: conservazione delle proteine 14-3-3. (a) Grafico della percentuale di omologia derivato da (b), che mostra un allineamento di sequenze multiple di 40 isoforme di 14-3-3. I residui colorati in rosso sono conservati nel 100% delle isoforme, mentre i residui colorati in blu sono altamente conservati; questi colori corrispondono a quelli della struttura nella figura 4.

Struttura

La diffrazione ai raggi X delle isoforme mammifere ζ e τ ha rivelato una struttura dimerica a coppa in cui ogni monomero contiene 9 α -eliche (denominate H1, H2, ..., H9) organizzate in maniera antiparallela a formare una struttura ripiegata ad L (34) (vedi figura 4). L'interno di questa struttura consiste di due α -eliche con molti aminoacidi carichi e polari e di due aminoacidi idrofobici che formano un solco anfipatico concavo altamente conservato (35). Questo è il sito di interazione delle 14-3-3 con ligandi fosforilati e non fosforilati (36).

La struttura primaria delle proteine 14-3-3 consiste di cinque blocchi altamente conservati, separati da regioni meno conservate (37). I blocchi conservati contengono i residui che sono importanti per il legame della proteina e alcuni residui che sono coinvolti nella dimerizzazione (38). La regione C-terminale mostra un basso livello di conservazione e si ritiene che possa regolare le funzioni delle proteine 14-3-3 oppure stabilizzi la regione non legata tramite interazioni con i due solchi interni del dimero (34).

La dimerizzazione prevede l'interazione tra l'elica 1 dell'N-terminale di un monomero di 14-3-3 e le eliche 3 e 4 di un altro monomero (38). L'alta variabilità della parte N-terminale della proteina può rappresentare un meccanismo per limitare il numero di possibili omo- o etero-dimeri (38). Poiché molti residui idrofobici e polari all'interfaccia del dimero sono fortemente conservati fra le isoforme mammifere, è possibile la formazione di mono- ed etero-dimeri fra isoforme diverse (39).

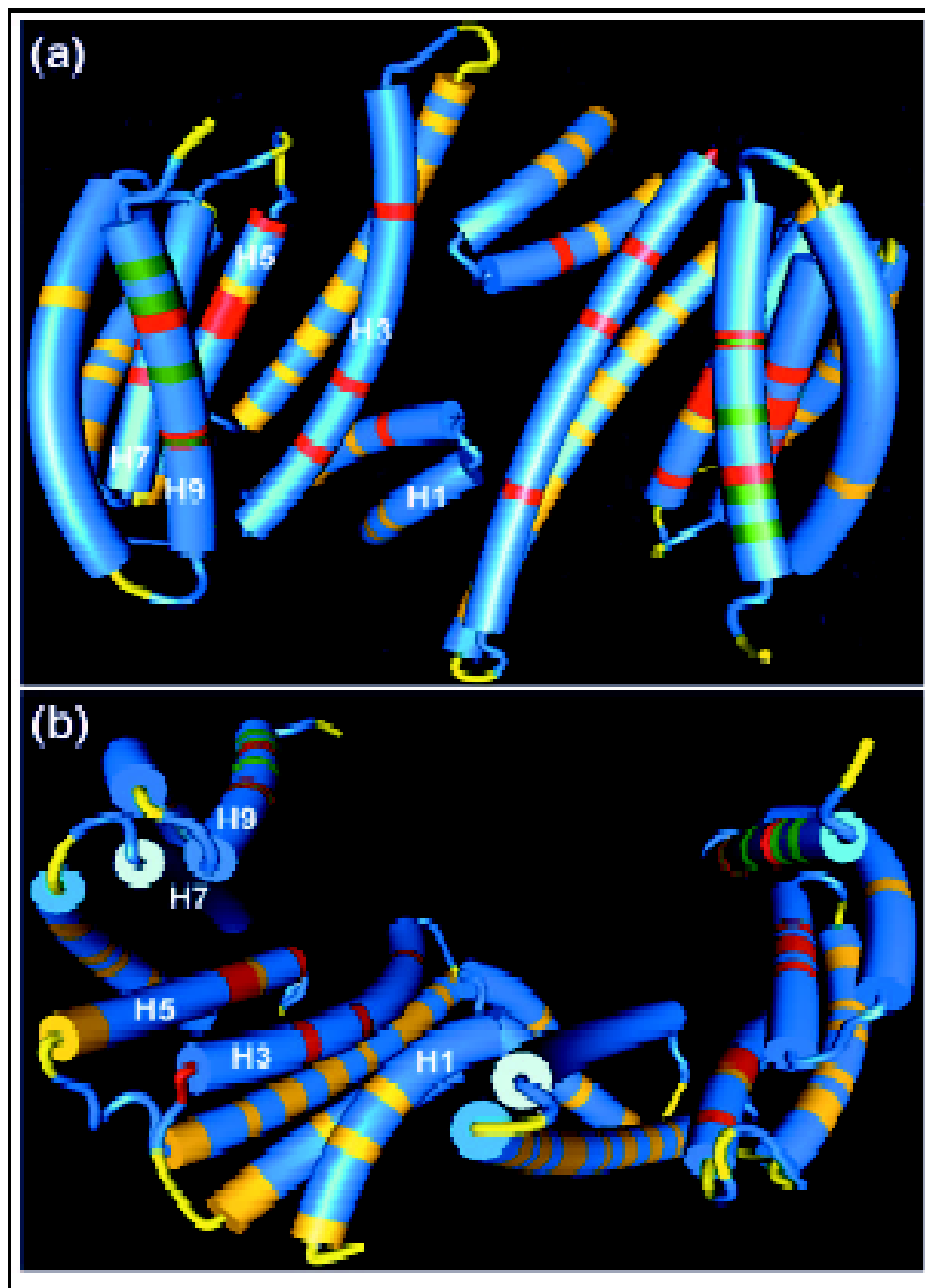


Figura 4: struttura tridimensionale della 14-3-3 ζ . La proteina è rappresentata come dimero e le α -eliche come cilindri; la figura mostra una veduta dall'alto (a) e una dal lato (b). I residui colorati in rosso sono conservati nel 100% delle isoforme, mentre i residui colorati in blu sono altamente conservati e corrispondono ai colori dell'allineamento della figura 3; le regioni colorate in giallo rappresentano quelle poco conservate.

Struttura e funzione

Sono stati identificati diversi motivi importanti per il legame alle proteine 14-3-3. Molti di questi contengono sequenze di consenso fosfoserina/treonina che sono riconosciute da tutte le isoforme di 14-3-3 (40, 41). Questi motivi non sembrano essere responsabili del legame poiché altre parti della proteina possono ulteriormente modulare il legame alle 14-3-3. Il motivo fosforilato, tuttavia, sembra costituire la minima sequenza necessaria per il legame (42).

E' stato dimostrato che la dimerizzazione è la caratteristica funzionale di queste proteine. Permette il legame di due regioni differenti della stessa proteina. Nel caso di motivi che interagiscono debolmente può risultare un legame più stabile con le proteine partner, mentre nel caso di due siti di legame con alta affinità, possono essere facilitate conformazioni proteiche specifiche (33).

D'altra parte, il dimero può legare due proteine target uguali o diverse, funzionando quindi come un adattatore che avvicina due ligandi per modificare l'attività di entrambi (33).

I dimeri di 14-3-3 sono stabili e non possono essere scambiati a meno che non vengano denaturati e rinaturati (39).

Va sottolineato che una singola isoforma di 14-3-3 ricombinante può formare omodimeri, dal momento che la forma monomerica sarebbe termodinamicamente instabile. Le proteine 14-3-3, inoltre, hanno una velocità di turnover molto lenta (43).

Studi di espressione delle diverse isoforme di 14-3-3 in cellule in coltura hanno evidenziato il pattern di formazione dei dimeri, rivelando una preferenza distinta per una particolare formazione di dimero (43).

La 14-3-3 γ forma omodimeri ed eterodimeri preferenzialmente con ε . In contrasto, l'isoforma ε forma eterodimeri con tutte le isoforme testate (β , η , γ e ζ), ma non omodimeri (43). Tutto ciò suggerisce che le combinazioni di dimeri osservate possono essere dovute a proprietà strutturali all'interfaccia del dimero delle singole isoforme (43).

Omo- ed eterodimeri potrebbero svolgere funzioni differenti. E' possibile che omodimeri di particolari isoforme agiscano per sequestrare una proteina, mentre gli eterodimeri più verosimilmente agirebbero come proteine adattatore, modulando l'interazione di due proteine distinte, ognuna delle quali si lega con una delle isoforme dell'eterodimero.

L'isoforma γ potrebbe essere coinvolta in funzioni di sequestro, mentre la ε potrebbe più realmente agire come una proteina adattatore negli eventi di trasduzione del segnale. Infatti, l'isoforma γ è stata ritrovata come preponderante nell'apparato di Golgi ed è implicata nella secrezione e nel trasporto di proteine, mentre l'isoforma ε è generalmente trovata in associazione con proteine coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale (43).

Fosforilazione

L'utilizzo della spettrometria di massa ha permesso di dimostrare che le isoforme α e δ sono le isoforme fosforilate di β e ζ . Questa fosforilazione è piuttosto stabile e non presenta un turnover apprezzabile poiché è stata identificata senza prevedere l'inibizione di alcuna fosfatasi (44). α e δ sono state trovate con fosforilazione al residuo serina 185; tuttavia le isoforme ε e σ , che pure presentano lo stesso residuo nella stessa posizione, non sono rinvenute in forma fosforilata (31). Le isoforme α e δ non sono state ritrovate altri tessuti ad eccezione di quello cerebrale (31).

La casein chinasi 1a (CKI) è una chinasi del cervello che fosforila le isoforme ζ e τ alla treonina e alla serina 233 rispettivamente (45).

In vivo la fosforilazione della 14-3-3 ζ a questo sito, ne inibisce il legame con le proteine target (45).

Alcune isoforme di 14-3-3 sono fosforilate da una chinasi sfingosino-dipendente alla serina 59. Poiché questo residuo è mascherato all'interfaccia del dimero, si ritiene che la sua fosforilazione potrebbe essere un meccanismo per inibire la formazione del dimero stesso (46).

E' stato dimostrato che alcune isoforme di proteina 14-3-3 possono essere fosforilate al residuo serina 64 (47).

14-3-3 β e τ possono essere substrati per diverse chinasi e l'isoforma γ può essere fosforilata in siti che non sono stati precisamente identificati (48).

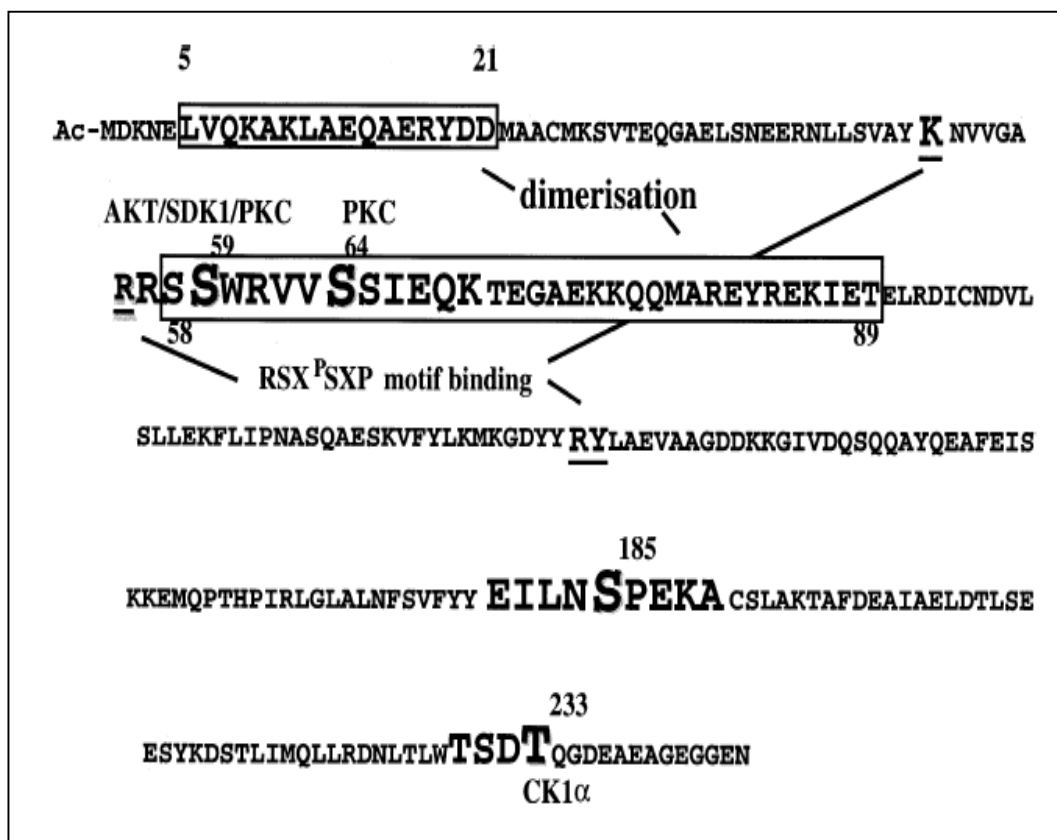


Figura 5: motivi e siti di fosforilazione della 14-3-3 ζ umana. I residui fosforilati sono rappresentati ingranditi e i residui di legame a fosfopeptidi sono sottolineati.

Comunicazione intracellulare, divisione e differenziazione cellulare

E' stato dimostrato che le proteine 14-3-3 possono stimolare il rapido passaggio dalla forma inattiva ad attiva di Raf1 e di mediare l'interazione di Raf1 con altre proteine che la attivano (49). Raf1 fosforila la MAP chinasi-chinasi (MEK), il che risulta nella stimolazione di MAPK ed eventualmente nella trascrizione di geni coinvolti nella divisione cellulare (50). L'importanza delle proteine 14-3-3 in questo meccanismo è stata determinata osservando che mutazioni nella parte N-terminale del motivo

di legame alla 14-3-3 di Raf1 cancellava la sua capacità di attivare il meccanismo (51).

Le 14-3-3 regolano anche la serina/treonina chinasi Rsk1, chinasi coinvolta nella crescita, proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare (52).

La 14-3-3 ζ attiva costitutivamente e autonomamente PKC, una chinasi coinvolta nella plasticità sinaptica, nella comprensione e nella memoria (53).

Funzione nei canali ionici

Alcune H^+ -ATPasi, che sono accoppiate all'idrolisi dell'ATP per il trasporto di protoni fuori dalla cellula, sono regolate da proteine legate alle proteine 14-3-3 (54). L'azione delle 14-3-3 si attua sulla modulazione dell'attività delle chinasi. Inoltre le 14-3-3 possono avere un ruolo essenziale nel controllo della localizzazione nella membrana e della espressione funzionale del canale potassio KCNK, che controlla l'eccitabilità neuronale (55).

Apoptosi

Il termine apoptosi indica il fenomeno di morte cellulare programmata nel normale sviluppo di vertebrati o invertebrati. E' un tipo di morte cellulare altamente controllato, che gioca un ruolo critico nello sviluppo embrionale, nella delezione delle cellule immuni autoreattive e nell'omeostasi dei tessuti adulti (56). C'è un'evidenza crescente che un malfunzionamento nel programma apoptotico sia causa di una serie di patologie. Il meccanismo cellulare fondamentale che sottende l'apoptosi può essere ben descritto come un bilancio tra fattori anti-apoptotici e pro-apoptotici, che possono essere controllati da segnali extracellulari (57).

Le proteine 14-3-3 giocano un importante ruolo inibitorio in numerose vie apoptotiche negli animali.

L'apoptosi può essere iniziata dall'interazione di un ligando ai membri di una famiglia di recettori TNF (tumor necrosis factor) legati alla membrana. Il cuore del meccanismo intracellulare attivato conseguentemente in questo caso è formato da un set di proteasi denominate caspasi (58). Dopo una cascata di eventi proteolitici a carico delle caspasi (caspasi 9, 8, 3) (59), viene attivata la chinasi MAPK, che a sua volta attiva la chinasi MEKK1, che finalmente attiva l'apoptosi (60). Le proteine 14-3-3 legano il dominio di regolazione di MEKK1, ma non è stata ancora identificata un'isoforma specifica. Questa interazione può costituire un legame tra la trasduzione del segnale di MAPK e l'apoptosi (60).

Un'altra via, attivata dal TNF, attiva alla fine il fattore nucleare di trascrizione anti-apoptotico κ B. La sua attività apoptosi-soppressiva

prevede la regolazione dell'espressione della proteina zinc-finger A20 e di geni anti-apoptotici (61). Studi recenti hanno dimostrato che le isoforme di 14-3-3 β , ϵ , η , e ζ legano A20 e che possono mediare l'interazione di A20 con la Raf chinasi (coinvolta nei meccanismi di traduzione del segnale). Le isoforme η e ζ legano lo zinc-finger A20, inibendo di fatto il suo legame con altre proteine (62). L'effetto pratico di A20 sull'apoptosi, inoltre, sembra essere l'inibizione dell'attivazione di NF-kB (fattore pro-apoptotico) da parte di IKK dopo che l'apoptosi è stata fermata (63).

Un'altra famiglia di proteine regolatorie dell'apoptosi importante è la famiglia Bcl-2, che comprende le proteine pro-apoptotiche BAD, BID, BAX, Bak e le proteine anti-apoptotiche Bcl-2, Bcl-X_L. Le azioni anti-apoptotiche consistono nell'ancoraggio sulla membrana esterna dei mitocondri, controllando il flusso di ioni ed il rilascio di citocromo-C (57). BAD è la più studiata fra le proteine della famiglia Bcl-2 ed è l'unica della famiglia che lega le proteine 14-3-3. BAD ha tre siti di fosforilazione: serina 112, serina 136 e serina 155, che sono fosforilati da diverse chinasi (63). La fosforilazione alla serina 155 rompe il legame con Bcl-2 e comporta il ritorno di Bcl-2 sulla membrana mitocondriale e la soppressione dell'apoptosi. Dopo defosforilazione, la 14-3-3 si dissocia da BAD che può di nuovo legare e traslocare Bcl-2. E' stato dimostrato che tutte le isoforme di 14-3-3 possono legare BAD (64).

L'apoptosi può essere regolata anche dall'espressione genica, attivata da fattori di trascrizione in un importante processo per mantenere il bilancio tra agonisti e antagonisti dell'apoptosi. Le proteine 14-3-3 possono legare

fattori di trascrizione fosforilati, come per esempio FKHRL-1, e traslocarli nel citoplasma (65).

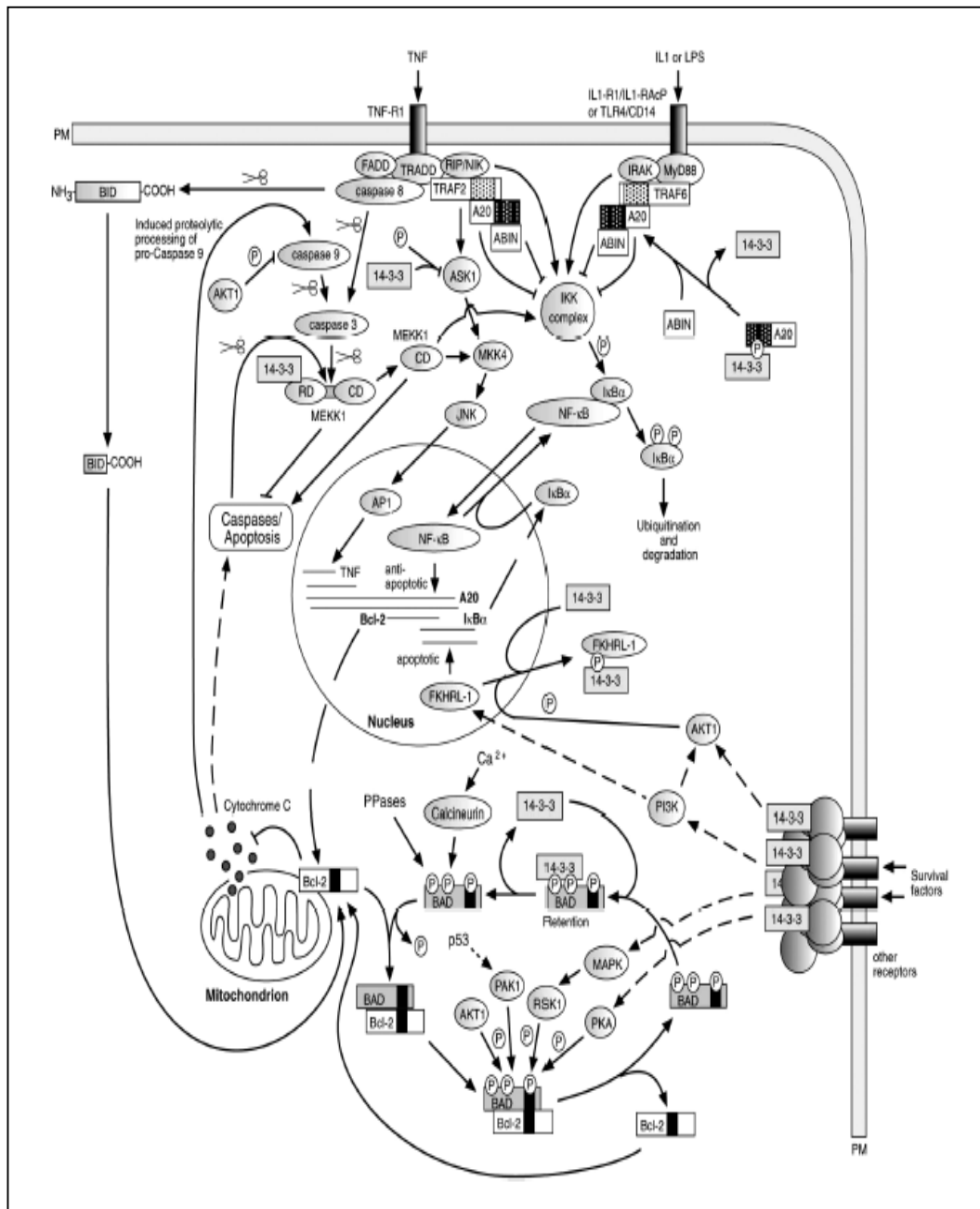


Figura 6: il complesso macchinario apoptotico.

Fino ad oggi sono state identificate 5 proteine target delle 14-3-3 in pathway diversi. Gli eventi di fosforilazione sono indicati con P e i processi proteolitici con una forbice.

Le proteine 14-3-3 nelle malattie neurologiche

Il ruolo delle proteine 14-3-3 è stato investigato anche nei processi patologici per la moltitudine dei loro partner di legame e per il ruolo chiave che svolgono in numerosi processi fisiologici.

Le proteine 14-3-3 sono state rivelate nel liquido cerebrospinale in varie malattie neurologiche (66) (vedi tabella 2).

Le proteine 14-3-3, inoltre, sembrano accumularsi in alcune lesioni e aggregati proteici specifici di malattie (66). Risulta, quindi, importante stabilire se le proteine 14-3-3 nel CSF e nel cervello possano costituire dei markers generici della distruzione tissutale e se siano coinvolte nella patogenesi delle malattie neurologiche.

Tabella 2: 14-3-3 nelle malattie neurologiche.

Infiammatorie	Vascolari	Altre demenze	Malignomi	Metaboliche	Altre
Meningoencefalite	Infarto	Demenza frintotemporale	Tumore del cervello e metastasi	Encefalopatia anossica	Delirio nella sindrome di Down
Meningite asettica	Emorragia subaracnoidale	Demenza per cause sconosciute	Malattie paraneoplastiche	Encefalopatia di Hashimoto	Stato epilettico
Vasculite del CNS	Angiopatia amiloidotica cerebrale	Sclerosi amiotrofica laterale con demenza	Linfoma intravascolare centrale	MELAS	Mielite trasversa
Sclerosi multipla	Demenza vascolare		Meningite carcinomatosa		Neuropatia

Le proteine 14-3-3 nella malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica

Nel 1986 due proteine denominate p130 e p131 furono rivelate nel CSF di 21 pazienti con sCJD usando l'elettroforesi bidimensionale (67). Le due proteine avevano rispettivamente un peso molecolare di 26 e 29 kDa e un punto isoelettrico di 5.2 e 5.1. Queste proteine non erano ritrovate in altre forme di demenza come la Malattia di Alzheimer o in altre malattie neurologiche come la sclerosi multipla o la malattia di Parkinson. Alcuni pazienti con encefaliti da *herpes simplex*, comunque, risultavano positivi sia per la proteina p130 che per la 131 (67). Allargando lo studio a 182 pazienti con sospetta sCJD, le proteine p130 e p131 furono riscontrate nell'81% dei pazienti con sCJD definita, ma in nessuno dei pazienti successivamente diagnosticati non sCJD. E' stato nel 1996 che la proteina p130 fu isolata e identificata per spettrometria di massa come membro della famiglia delle proteine 14-3-3 (68). Una volta nota la proteina, le tecniche di SDS-PAGE e l'immunoblot divennero disponibili per l'uso diagnostico di routine (68).

Studi successivi con l'uso dell'SDS-PAGE monodimensionale e l'immunoblot hanno mostrato che la rivelazione della proteina 14-3-3 nel CSF presenta una sensibilità tra il 90 e il 97 % e specificità tra l'87 e il 100 % per la diagnosi di sCJD (68, 69).

Dal 1998 la presenza della proteina 14-3-3 nel CSF è stata inserita negli standard diagnostici per la sCJD dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (70).

Ci sono due questioni fondamentali che meritano di essere approfondite:

- Quale è la specificità delle proteine 14-3-3 nel CSF dei pazienti con sCJD?
- Potrebbe la presenza delle proteine 14-3-3 nel CSF rivelare informazioni sulla patogenesi della malattia?

Il fatto che le proteine 14-3-3 siano rinvenute anche nel CSF di altre patologie con estesa distruzione del cervello come lo stroke e in patologie senza demenza, può indicare che la loro presenza nel CSF possa essere dovuta alla distruzione del tessuto cerebrale ed al conseguente rilascio delle proteine cellulari nel CSF (71).

Con l'aumento delle patologie investigate è in continuo aumento la lista delle malattie che possono presentare positività alla proteina 14-3-3 nel CSF (71). In base a queste considerazioni, quindi, il test positivo per 14-3-3 dovrebbe essere considerato come marker generico di distruzione tissutale del cervello. Per la diagnosi della sCJD, la positività alla 14-3-3 rimane un marker molecolare piuttosto attendibile, poiché le opportune considerazioni cliniche possono aiutare ad escludere i falsi positivi (72).

Il livello delle proteine 14-3-3 nel CSF durante il processo di neurodegenerazione è nell'intervallo dei ng/ml, mentre aumenta considerevolmente nei pazienti con possibile o probabile sCJD (73).

Risulta quindi interessante indagare se le proteine 14-3-3 possano partecipare alla patogenesi della sCJD.

La letteratura riporta che ricerche diverse, in maniera piuttosto frammentaria e non sempre in accordo, indicano la presenza delle

isoforme β , γ , ε , ζ e η nel CSF di pazienti con sCJD (74). Ciò che sorprende è che l'isoforma ζ sia spesso rinvenuta per immunistochemica nelle placche di amiloide nella vCJD e nella sCJD, mentre non è riportata la presenza di nessun altro isotipo in questi depositi (75). Questo porta a pensare che la 14-3-3 ζ sia l'unica presente oppure che gli epitopi riconosciuti dagli anticorpi contro le altre isoforme non siano accessibili in questi accumuli (75).

Le isoforme di 14-3-3 γ , ε ed η sono state identificate come le predominanti nell'apparato di Golgi e ciò fa pensare ad un loro ruolo secretorio (76).

A livello sub-cellulare le 14-3-3 γ , ε , η , β e ζ sono state trovate nelle membrane delle vescicole sinaptiche e ci sono evidenze che le isoforme γ , ε e η potrebbero situarsi alla giunzione sinaptica e legarsi alla membrana sinaptica (77).

E' interessante sottolineare che anche la proteina prionica cellulare è localizzata sulla membrana sinaptica. Questo fatto, in aggiunta al ruolo nella stabilizzazione conformazionale delle 14-3-3, potrebbe far pensare che alcune isoforme di 14-3-3 potrebbero essere coinvolte nel trasporto assonale delle proteine prioniche e nel loro rilascio sulla superficie cellulare (78).

Tuttavia non è ancora stato dimostrato se le proteine 14-3-3 possano essere coinvolte nella patogenesi della sCJD o altre malattie neurodegenerative.

PROTEINA TAU

La proteina Tau è una proteina associata ai microtubuli, presente ad alte concentrazioni negli assoni e nelle cellule gliali del CNS (79). E' coinvolta nel mantenimento e nella integrità assonale: è legata ai microtubuli e induce una modificazione conformazionale che li rende più stabili (80).

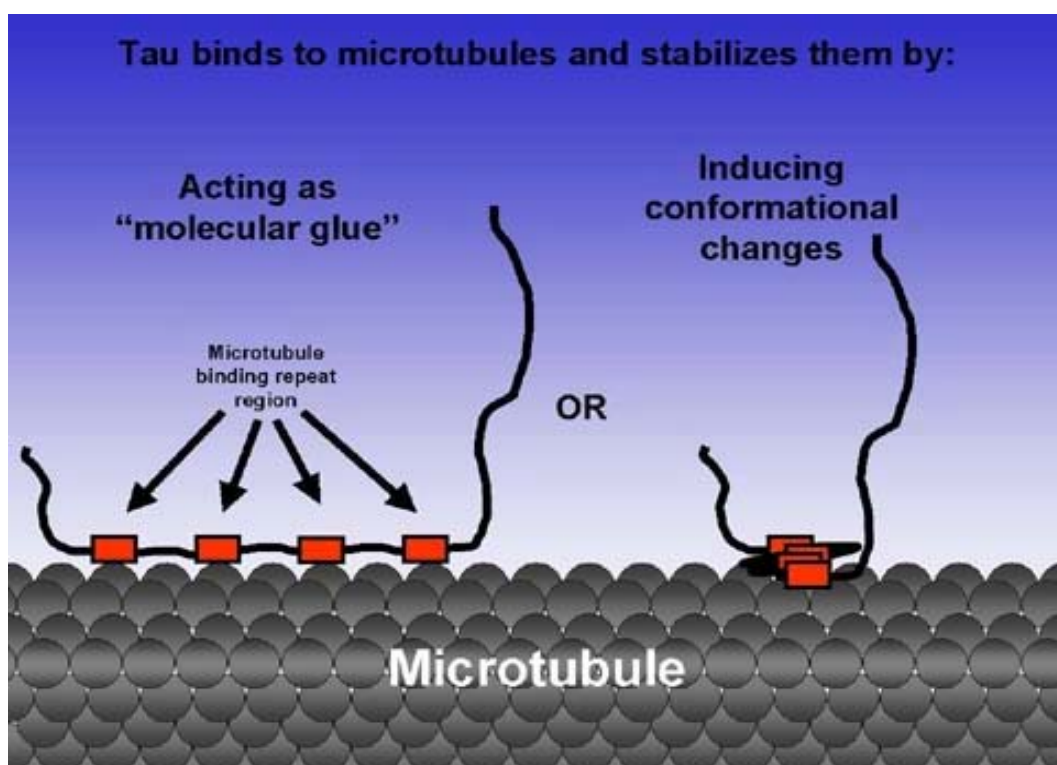


Figura 7: rappresentazione schematica della proteina Tau e della sua interazione con i microtubuli; i rettangoli rossi rappresentano le regioni con sequenze ripetute che interagiscono con i microtubuli.

Ci sono 6 isoforme di Tau presenti nel cervello di un uomo adulto, che sono prodotte per splicing alternativo dell'mRNA di un singolo gene situato sul cromosoma 1. Ognuna delle isoforme differisce dalle altre per la

presenza o meno all’N-terminale di una o due inserzioni e per la presenza di tre o quattro regioni ripetute in tandem di 31-32 aminoacidi nella parte C-terminale (81). Ognuna di queste isoforme può essere fosforilata ad un numero diverso di siti nel cervello adulto sano, ma può diventare iperfosforilata in varie condizioni. L’iperfosforilazione diminuisce la sua capacità di legare i microtubuli, permettendo alla Tau di aggregarsi; questo porta all’accumulo di filamenti e formazione di tangles (82). La Tau iperfosforilata può formare diversi corpi di inclusione con tangles microfibrillari nell’Alzheimer, i corpi di Pick nella malattia di Pick. Questi corpi di inclusione possono contenere diverse isoforme di Tau (82).

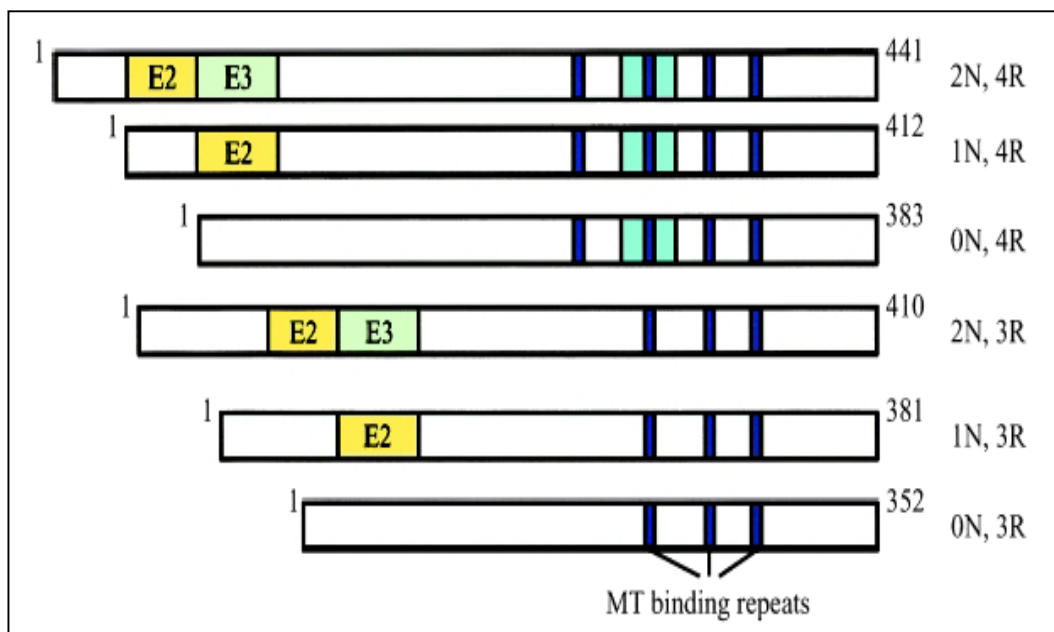


Figura 8: rappresentazione schematica delle sei isoforme di proteina Tau; E2 ed E3 sono le inserzioni e i rettangoli blu le sequenze ripetute.

Proteina Tau nella sCJD

E' stato dimostrato che i livelli di Tau nel CSF di pazienti con sCJD sono molto alti e possono aumentare anche di 100 volte rispetto ai livelli normali. Usando un valore di cut-off di 1300 pg/ml è stata riscontrata una sensibilità diagnostica del 94% con il 90% di specificità e con un valore predittivo del 92%. Questi dati suggeriscono che anche l'analisi dei livelli di Tau liquorale è uno strumento diagnostico importante nella sCJD (83).

SCOPO DELLA TESI

Fino ad ora, l'unico modo per identificare la PrP^{Sc} *in vita* può essere mediante biopsia cerebrale o di mucosa olfattoria (84), altrimenti la diagnosi di sCJD definitiva è possibile solo post-mortem con l'identificazione della PrP^{Sc} tramite western blot o immunoistochimica.

Alcuni studi si sono occupati di identificare la PrP^{Sc} nel CSF dei pazienti con sCJD, ma non hanno dato risultati apprezzabili (85, 86)

La 14-3-3, come le altre proteine del CSF investigate come marker molecolari, non sembrano essere direttamente associate alla malattia. La 14-3-3 e la proteina Tau, tuttavia, hanno dimostrato una elevata specificità e sensibilità, soprattutto se associate alle opportune valutazioni cliniche (68, 69).

Un primo scopo di questa tesi sarà quello di valutare ulteriormente l'efficacia diagnostica delle proteine 14-3-3 e Tau e di valutare la loro correlazione con i fenotipi di sCJD, utilizzando i campioni disponibili presso il laboratorio di neuropatologia del policlinico G.B. Rossi di Verona.

Altri studi si sono occupati di verificare se nella sCJD ci fosse una diversa espressione delle singole isoforme rispetto a soggetti normali di controllo.

Poichè i risultati forniti fino ad ora non hanno fornito risultati sempre concordi, ad oggi non è ben chiaro quali isoforme siano presenti con certezza nel CSF dei soggetti sCJD (74, 87)

Un secondo scopo sarà quello di identificare le isoforme di 14-3-3 presenti nel CSF dei soggetti con sCJD e non sCJD ed effettuare la loro caratterizzazione bidimensionale. In questo modo, oltre ad approfondire gli studi svolti fino a questo momento sulle diverse isoforme di 14-3-3, sarà possibile valutarne l'effettivo ruolo diagnostico.

PAZIENTI E METODI

PAZIENTI

Sono stati studiati complessivamente 59 campioni di CSF. Sono stati studiati retrospettivamente 39 casi di sCJD definita. Questi soggetti erano classificati in base al polimorfismo al codone 129 del gene della proteina prionica (*PRNP*) per l'aminoacido valina (V) o metionina (M) ed in base alla presenza del tipo di PrP^{Sc} con frammento proteasi-resistente di 19 o 21 kDa. Il CSF era stato ottenuto anche da 12 pazienti sotto osservazione per diagnosi di sospetta sCJD che presentavano demenza ed erano in trattamento con farmaci neurolettici (NT). Infine, erano disponibili anche 8 campioni di controllo di soggetti normali dal punto di vista neuropatologico e cognitivo con follow-up di almeno tre anni dopo il prelievo di liquor. Il tracciato all'elettroencefalogramma (EEG) era valutato secondo criteri standard.

Dopo aver ottenuto il consenso informato, i campioni di liquido cerebrospinale sono stati ottenuti mediante puntura lombare e conservati a -80C°.

STUDI GENETICI

Il DNA genomico è stato estratto da plasma presso l'Istituto Superiore di Sanità, è stata effettuata la ricerca di eventuali mutazioni e identificato il polimorfismo M/V al codone 129.

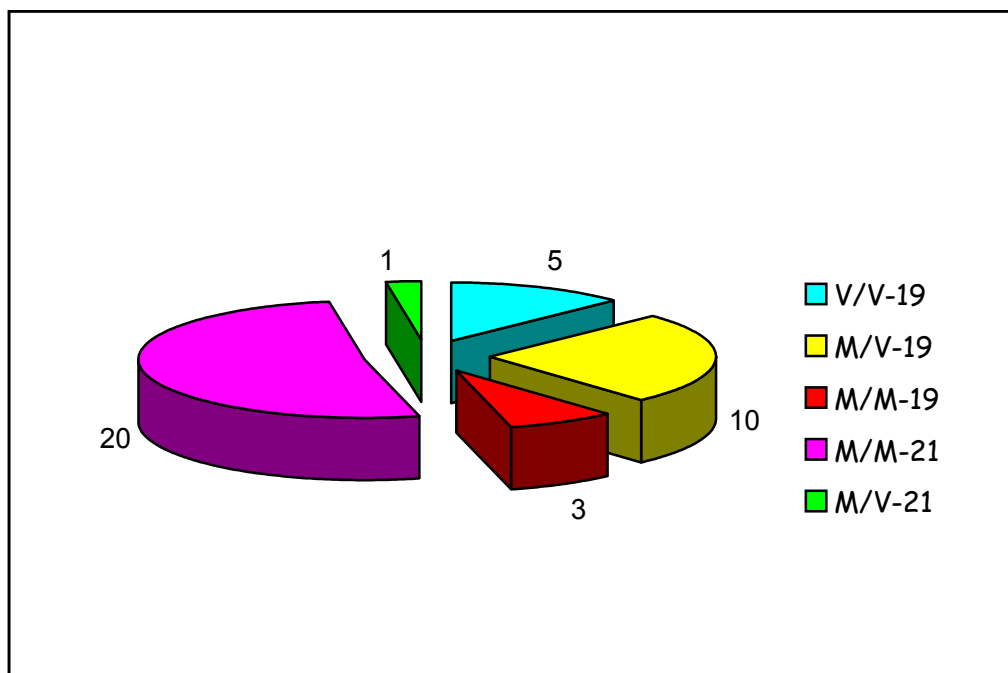


Figura 9: distribuzione dei diversi fenotipi molecolari di sCJD studiati.

ELETTROFORESI SU GEL POLIACRILAMIDE IN PRESENZA DI SODIO-DODECIL-SOLFATO (SDS-PAGE)

100 µl di CSF dopo l'aggiunta di 700 µl di metanolo pre-raffreddato a -20°C° erano lasciati a -20 C° per due ore. Dopo centrifugazione a 20.000g per 30 minuti il supernatante era rimosso ed il pellet veniva dissolto in 40 µl di sample buffer 1X (3% SDS, 3% β-mercaptoetanol, 2mM EDTA, 10% glicerolo, 62.5 mM Tris, pH 6.8) e bollito per 5 minuti.

100 mg di tessuto cerebrale erano omogenati al 10% in 10mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,2, contenete 0,5% acido deossicolico, 0,5% Nonidet P-40; dopo centrifugazione a 1000g per 5 minuti il pellet era eliminato, al surnatante era aggiunto un volume uguale di sample buffer 2X (6% SDS,

6% β -mercaptoetanol, 4mM EDTA, 20% glicerolo, 125 mM Tris, pH 6.8) e veniva bollito per 5 minuti.

In ogni corsia erano caricati 10 μ l di campione (tessuto cerebrale o CSF) e separati applicando un voltaggio di 100V per 30 minuti e 150V per un'ora. Erano utilizzati gel di poliacrilamide al 13%T.

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE (2D-PAGE)

Per la prima dimensione era effettuata una isoelettrofocalizzazione (IEF) su gradienti di pH immobilizzati (IPG), utilizzando gel pre-cast (strisce IPG) con un gradiente di pH lineare nell'intervallo 3-10 (Bio-Rad).

100 μ l di CSF venivano precipitati come sopra ed il pellet risospeso in 125 μ l di tampone Destreak (Amersham Biosciences), contenente 7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris, 2% anfoline, destreak reagentTM come riducente.

Prima della isoelettrofocalizzazione i gel venivano reidratati con i campioni per 16 ore a temperatura ambiente e la separazione era condotta per 30 minuti a 250V, 30 minuti a 500V, 1 ora 1000V e 2 ore a 8000V su un apparecchio per elettroforesi orizzontale termostatato (IPGphor, Amersham Biosciences).

Per la seconda dimensione le strisce IPG erano equilibrate per 15 minuti in 50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L Urea, 10% glicerolo, 2% SDS e una traccia di blu di bromofenolo e caricate su un gel di acrilamide al 13%T per l'SDS-PAGE.

WESTERN BLOT

Le proteine separate venivano trasferite su una membrana di polivinilidenedifluoruro (PVDF) (Immobilon P, Millipore) per 2 ore a 60V. Le membrane erano saturate poi con latte scremato all'1% in TBST (10mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) per un'ora a 37C° e incubate con l'anticorpo appropriato per tutta la notte. Dopo 4 lavaggi in TBST da 15 minuti le membrane erano incubate con anticorpo secondario (anti-rabbit IgG, Amersham Biosciences) coniugato con perossidasi per 1 ora a temperatura ambiente. Poi venivano effettuati altri 4 lavaggi da 15 minuti in TBST e successivamente i blot erano sviluppati con un sistema di chemiluminescenza (ECL plus, Amersham Biosciences) e le proteine visualizzate su lastre radiografiche (Hyperfilm, Amersham Biosciences).

Sono stati usati i seguenti anticorpi (Santa Cruz Biotechnology inc.):

anti 14-3-3 pan (K-19) policlonal antibody, sc-629;

anti 14-3-3 ζ (C-16) policlonal antibody, sc-1019;

anti 14-3-3 γ (C-16) policlonal antibody, sc-731;

anti 14-3-3 ϵ (T-16) policlonal antibody, sc-1020;

anti 14-3-3 η (K-12) policlonal antibody, sc-17286;

anti 14-3-3 β (A-15) policlonal antibody, sc-17288;

anti 14-3-3 σ (C-18) policlonal antibody, sc-7683;

anti 14-3-3 τ (C-17) policlonal antibody, sc-732.

DOSAGGIO DELLA PROTEINA TAU

Il dosaggio della proteina Tau liquorale è stato effettuato con metodo ELISA (Total Human Tau kit, Biosource International) su micropiastre a 96 pozzetti, già derivatizzate con anticorpo monoclonale che riconosce tutte le isoforme della proteina Tau. Tutti i reagenti utilizzati per questa determinazione erano forniti nel kit.

Tutti i campioni e gli standard erano caricati in doppio.

Sono stati preparate diluizioni seriali di Tau standard da 2000 a 31.3 pg/ml in tampone di diluizione ed in ogni pozzetto venivano caricati 100µl di standard e di CSF diluito 1:2 con tampone di diluizione. Dopo incubazione per 2 ore a temperatura ambiente e 4 lavaggi con tampone di lavaggio erano aggiunti 100 µl di anticorpo di rivelazione anti-Tau policlonale per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 4 lavaggi con tampone di lavaggio i campioni erano incubati per 30 minuti con anticorpo secondario coniugato con perossidasi; dopo 4 lavaggi veniva aggiunto il substrato tetrametilbenzidina (TMB) e lasciato reagire per 20 minuti. La reazione di sviluppo era bloccata con soluzione di bloccaggio (H₂SO₄) e veniva effettuata la lettura delle piastre allo spettrofotometro a 450 nm. La concentrazione della Tau nel CSF era calcolata tramite EXCEL in base a regressione lineare della curva di taratura preparata con la Tau standard.

ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DELLA PROTEINA UMANA RICOMBINANTE 14-3-3 ζ

Il cDNA codificante per la proteina 14-3-3 ζ e 14-3-3 γ è stato amplificato con metodica PCR usando primers specifici disegnati per introdurre i siti di restrizione per BamHI e PstI e una sequenza codificante per un sito di taglio della trombina alla fine della sequenza della proteina. Il frammento è stato digerito e ligato nel vettore pQE50 (Qiagen), che esprime una proteina di fusione con una coda di 6 istidine al C-terminale. Con il costrutto 14-3-3 ζ -pQE50 e 14-3-3 γ -pQE50 sono state trasformate cellule *E. coli* BL21 e fatte crescere tutta la notte a 37 °C in terreno LB; l'espressione della proteina è stata indotta con l'aggiunta di 0.5 mM IPTG. Le cellule sono poi state risospese in 20 mM Tris (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 10mM imidazolo e sonicate. Il lisato è stato centrifugato e il surnatante è stato filtrato su una colonna di Ni²⁺-sefariosio equilibrata con lo stesso tampone. La proteina di fusione His₆-tagged è stata eluita con un gradiente lineare di imidazolo 10 mM–0.5 M. Le frazioni contenenti la proteina His₆-14-3-3 ζ e His₆-14-3-3 γ sono state raccolte, concentrate e ulteriormente purificate per gel filtrazione su una colonna cromatografica Superdex200. La purezza finale è stata controllata per SDS PAGE e immunoblotting con un anticorpo monoclonale coniugato con perossidasi anti-His₆ (Sigma). La proteina è stata concentrata fino ad 1 mg/mL, dializzata contro tampone PBS e conservata a –80°C.

DEFOSFORILAZIONE CON FOSFATASI ALCALINA

A 100 μ l di CSF venivano aggiunti 11 μ l di tampone di reazione 10X (50 mM glicina-NaOH pH 10,5, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM $ZnCl_2$, 60 mM $NiCl_2$) e 2 μ l di fosfatasi alcalina ricombinante prodotta in E. coli (Roche diagnostic) 6000 U/ml.

I campioni venivano incubati a 37° per 20 ore e la reazione veniva bloccata direttamente con aggiunta di 800 μ l di metanolo pre-raffreddato a -20°C per la precipitazione del campione. Successivamente il campione di CSF defosforilato veniva risospeso direttamente nel tampone per SDS-PAGE o per 2D-PAGE.

RISULTATI

STUDIO RETROSPETTIVO DI CAMPIONI DI CSF DI SOGGETTI CON SCJD DEFINITA

Pazienti

La tabella 3 riporta le informazioni cliniche sull'esordio e sull'evoluzione dei soggetti con sCJD studiati, suddivisi per gruppi molecolari.

Tabella 3: dati clinici dei diversi fenotipi clinico-patologici di sCJD.

GENOTIPO- PrP^{Sc}	SINTOMI ALL'ESORDIO	EVOLUZIONE	DURATA (mesi)	EEG
M/M-21 (n=20)	Demenza/Atassia	Demenza	6	+/-
M/V-21 (n=1)	Demenza	Demenza	20	-
V/V-19 (n=5)	Atassia	Demenza	8	-
M/V-19 (n=10)	Atassi/segni extrapiramidali	Demenza	8	-
M/M-19 (n=3)	Demenza	Demenza	18	-

Ricerca della proteina 14-3-3

Tutti i campioni di CSF di soggetti con sCJD e i controlli sono stati testati per la presenza della proteina 14-3-3. Il Western blot dei CSF di sCJD è rappresentato in figura 10 dove sono presenti campioni di tutti i fenotipi molecolari di sCJD; tutti gli 8 controlli investigati sono risultati negativi (dato non mostrato). Tutti i campioni studiati hanno presentato una positività netta ad eccezione dei M/M-19 in cui la 14-3-3 era presente, ma mostrava una positività di debole intensità. Il pattern di separazione si presentava con due bande: una a 30 e una a 32 kDa. Questo pattern è in accordo con la presenza della isoforma ϵ a 32-33 kDa e delle altre isoforme a 30 kDa.

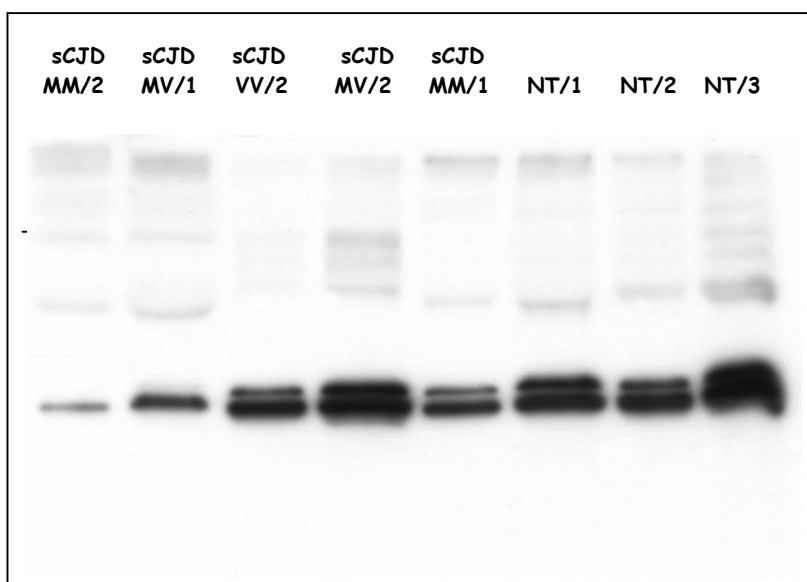


Figura 10: Western blot con anticorpo pan anti-14-3-3 in soggetti con sCJD e NT.

Dosaggio della proteina Tau

I valori della proteina Tau nel CSF di soggetti con sCJD sono riportati nella tabella 5. E' stato effettuato anche un confronto tra i diversi fenotipi molecolari dei valori della proteina Tau, riportato in tabella 4: tutti i fenotipi presentavano livelli di Tau ben al di sopra del cut-off diagnostico di 1300 pg/ml ad eccezione del gruppo M/M-19. Anche questo gruppo, tuttavia, presentava valori statisticamente superiori a quelli dei controlli. Nell'unico caso M/V-21 la concentrazione della proteina Tau era 1478 pg/ml. Entrambi questi ultimi due gruppi presentavano un lungo decorso della malattia (18 e 20 mesi rispettivamente) rispetto ai gruppi molecolari con alti livelli di Tau (6 e 8 mesi).

Tabella 4: media e mediana dei valori di Tau (pg/ml) nel CSF dei diversi fenotipi di sCJD, nei soggetti NT e nei controlli.

		Mediana (intervallo)	media (dev. st.)
sCJD	M/M-21	6.270 (1.272-30.779)	8.047 (7.280)
	M/V-21	1478	
	M/M-19	609 (445-767)	607 (161)
	M/V19	3.328 (934-24.812)	6.743 (10.174)
	V/V-19	3.128 (1.628-50.000)	10.172 (15.236)
Controlli		147 (117-356)	195 (89)
soggetti NT		215.5 (87-600)	239.1 (126)

Tabella 5: positività alla 14-3-3 e valori della proteina Tau nei soggetti con sCJD.

PAZIENTE	GENOTIPO	14-3-3	Tau (pg/ml)	età
1	V/V-19	+	15170	63
2	V/V-19	+	50000	65
3	V/V-19	+	2764	69
4	V/V-19	+	2076	64
5	V/V-19	+	2630	63
6	V/V-19	+	3581	63
7	V/V-19	+	3493	69
8	V/V-19	+	18556	79
9	V/V-19	+	1830	71
10	V/V-19	+	1628	74
11	M/M-19	+/-	767	60
12	M/M-19	+/-	609	60
13	M/M-19	+/-	445	62
14	M/V-19	+	1088	62
15	M/V-19	+	934	70
16	M/V-19	+	3328	65
17	M/V-19	+	24812	72
18	M/V-19	+	3553	70
19	M/M-21	+	10000	78
20	M/M-21	+	10445	58
21	M/M-21	+	22557	70
22	M/M-21	+	1272	50
23	M/M-21	+	14005	76
24	M/M-21	+	11883	64
25	M/M-21	+	1817	66
26	M/M-21	+	6955	59
27	M/M-21	+	1874	69
28	M/M-21	+	6270	65
29	M/M-21	+	15057	71
30	M/M-21	+	7943	63
31	M/M-21	+	2742	71
32	M/M-21	+	30779	67
33	M/M-21	+	6967	74
34	M/M-21	+	1443	68
35	M/M-21	+	1684	64
36	M/M-21	+	4102	71
37	M/M-21	+	4022	71
38	M/M-21	+	3980	73
39	M/V-21	+	1478	59

STUDIO DI CAMPIONI DI CSF DI PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON NEUROLETTICI

Pazienti

I dati clinici dei 12 pazienti in trattamento con neurolettici sono riportati nella tabella 6; era stata effettuata la ricerca della proteina 14-3-3 nel liquor di questi pazienti per la diagnosi di possibile o probabile sCJD.

Al follow-up questi pazienti sono stati diagnosticati con altre malattie neurologiche, riportate in tabella 6. Il follow up è variato tra 12 e 18 mesi e la diagnosi clinico/patologica è stata effettuata in base all'evoluzione clinica o all'aumento dei sintomi e segni clinici, a ripetuti EEG ed MRI o esami patologici.

Ricerca della proteina 14-3-3

Tutti i 12 campioni di CSF indagati presentavano una netta positività alla proteina 14-3-3, del tutto indistinguibile da quella di soggetti con sCJD sia per intensità di segnale che per pattern di migrazione. La figura 10 riporta il confronto tra alcuni campioni rappresentativi dei CSF studiati.

Tabella 6: dati clinici dei soggetti NT.

Caso	Età (anni)/ Sesso	Diagnosi clinica	EEG	MRI	Trattamento / puntura lombare dopo inizio del trattamento con neurolettici (mesi)	Tau (pg/ml)
1	78/M	Decadimento cognitivo	Rallentato	Negativo	Cloropromazina/1	503
2	78/M	Decadimento cognitivo	Normale	Atrofia corticale	Aloperidolo/7	163
3	66/M	Decadimento cognitivo	Rallentato	Negativo	Olanzapina/1	213
4	64/M	Demenza a corpi di Lewi	Rallentato	Atrofia corticale	Olanzapina/3	253
5	77/F	Demenza fronto- temporale	Rallentato	Atrofia fronto- temporale	Cloropromazina /6 Carbamazepina/7	175
6	76/M	Demenza a corpi di Lewi	Rallentato	Atrofia temporale	Olanzapina /20 Benzodiazepina/5	114
7	75/F	Demenza fronto- temporale	Rallentato	Atrofia corticale	Olanzapina/2 Mirtazapina/20 Pramipexolo/20	200
8	81/F	Demenza vascolare	Rallentato	Lesioni ischemiche vascolari	Olanzapina/2	230
9	74/F	Decadimento cognitivo	Rallentato	Negativo	Olanzapina/1 Venlafaxina/2	428
10	73/M	Malattia di Alzheimer	Rallentato	Atrofia corticale	Olanzapina/4	234
11	63/M	Demenza fronto- temporale	PSWCs	Atrofia fronto- temporale	Olanzapina/2 Oxazepam/1	128
12	78/M	Malattia di Alzheimer	Rallentato PSWCs	Negativo	Aloperidolo /2 Olanzapina/1	289

Dosaggio della proteina Tau

I valori della proteina Tau nel CSF di soggetti con sCJD sono riportati nella tabella 6.

La media di questo gruppo era 239.1 ± 126 pg/ml e questo valore era statisticamente paragonabile a quello ottenuto per i controlli (ANOVA: $F=0,4$, ns). I livelli della proteina Tau sono risultati anche significativamente più bassi di quelli riscontrati nel gruppo sCJD M/M-19 (ANOVA: $F=6,52$, $p < 0.001$) che era quello con i valori più prossimi ai controlli.

CARATTERIZZAZIONE DELLE DIVERSE ISOFORME DI 14-3-3 NEL TESSUTO CEREBRALE NEI SOGGETTI CON SCJD DEFINITA E NEI PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON NEUROLETTICI

Studio della specificità degli anticorpi utilizzati e caratterizzazione monodimensionale

Per valutare la specificità degli anticorpi utilizzati per la caratterizzazione delle diverse isoforme di proteina 14-3-3 presenti nel tessuto cerebrale e nel CSF dei soggetti studiati sono stati eseguiti Western blot con gli anticorpi isoforma-specifici delle proteine ricombinanti 14-3-3 ζ e 14-3-3 γ , mostrati in figura 11. Gli anticorpi utilizzati non presentano alcuna cross-reattività.

Come si può notare dalla figura 11 nel tessuto cerebrale sono presenti le isoforme γ , ϵ e ζ ; l'isoforma ϵ è identificabile per il maggior peso molecolare (32 kDa); i western blot eseguiti su tessuto cerebrale con anticorpi contro le isoforme β , τ , ϵ e σ non hanno fornito alcun segnale (dati non mostrati).

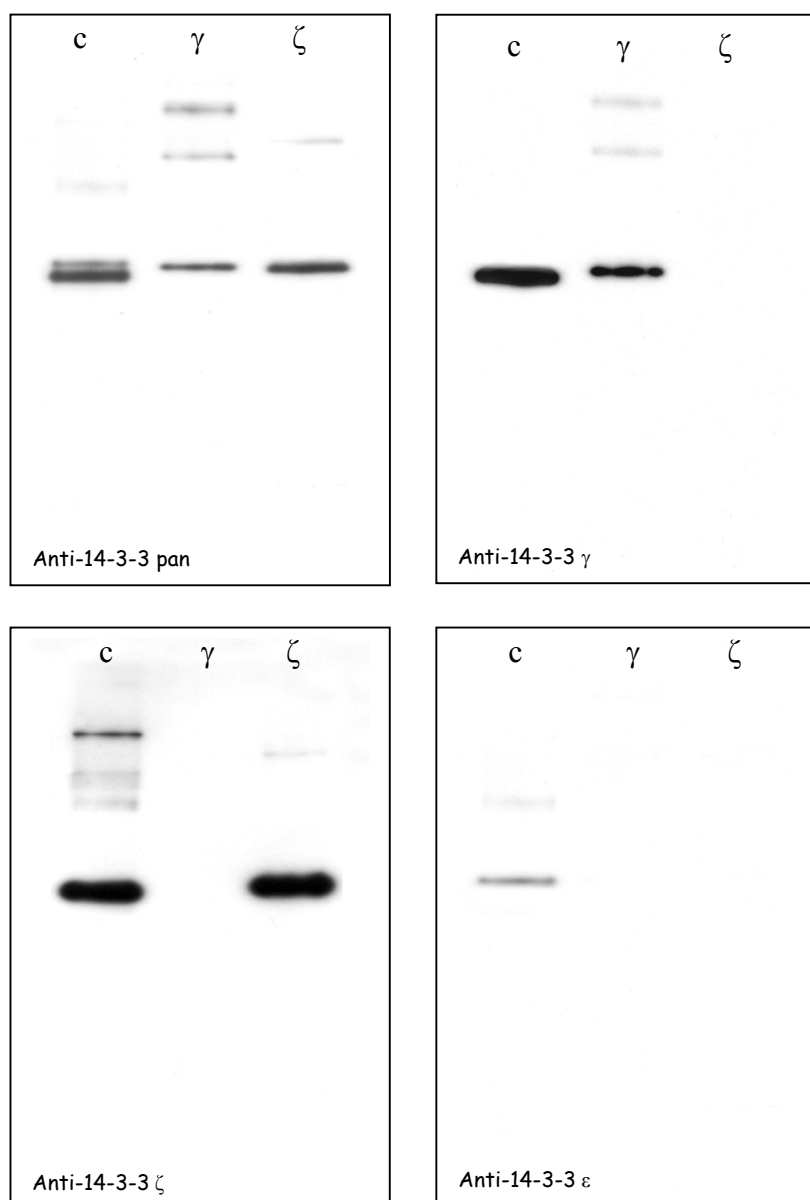


Figura 11: Western blot di tessuto cerebrale (indicato con la lettera c) e delle proteine ricombinanti γ ed ζ .

Caratterizzazione bidimensionale

Per caratterizzare le isoforme di 14-3-3 presenti nel tessuto cerebrale, tutti gli anticorpi isoforma-specifici sono stati utilizzati anche nell'immunoblot delle separazioni bidimensionali di campioni di tessuto cerebrale di soggetti con sCJD e di quattro campioni di soggetti trattati con neurolettici. La caratterizzazione bidimensionale ha confermato i dati ottenuti per SDS-PAGE.

Campioni sCJD e NT hanno fornito i medesimi risultati e nella figura 11 vengono riportate degli immunoblot rappresentativi per ogni isoforma. Le isoforme γ e ζ (figura 12B e 12C) presentavano un pattern di migrazione perfettamente sovrapponibile, apparivano entrambe come uno spot di forma allungata a 30 kDa e pI tra 5 e 5,4. L'isoforma ϵ (figura 12D) veniva identificata a 32 kDa e pI 4,9.

L'immunoblot con l'anticorpo pan 14-3-3 mostra tutte le isoforme contemporaneamente presenti nel CSF.

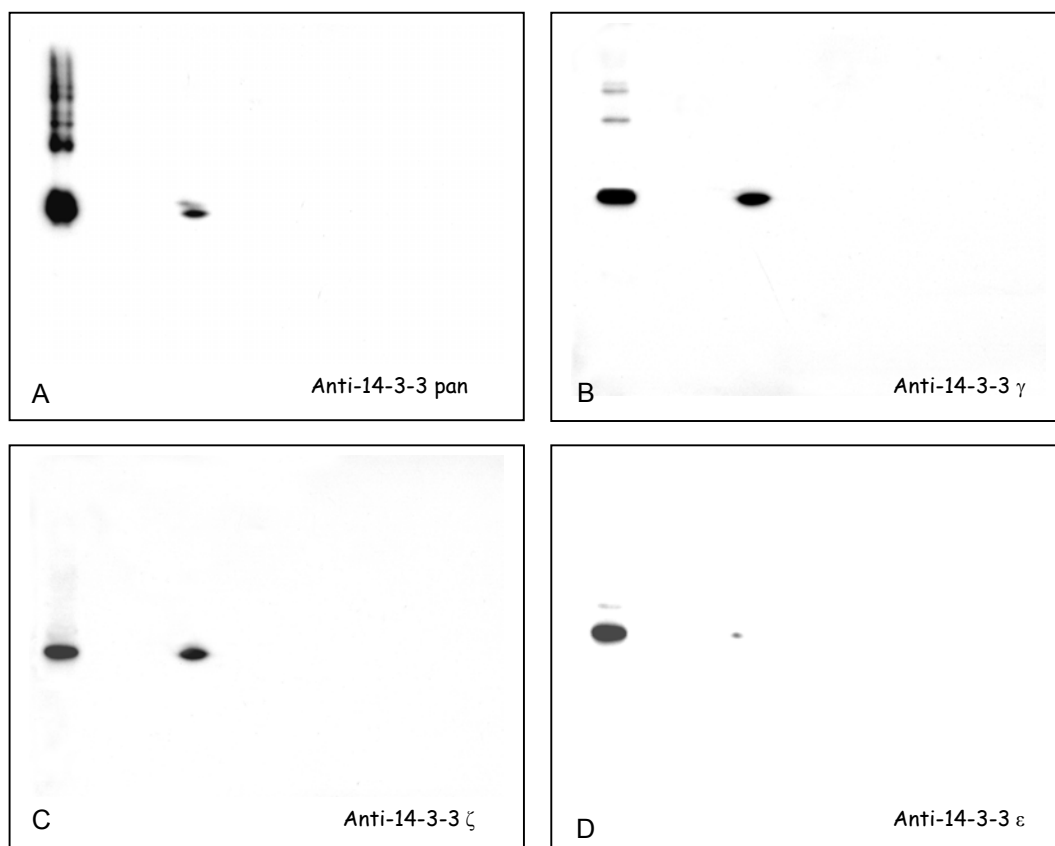


Figura 12: Western blot rappresentativi dopo 2D-PAGE di tessuto cerebrale.

CARATTERIZZAZIONE DELLE DIVERSE ISOFORME DI 14-3-3 NEL CSF DEI SOGGETTI CON SCJD DEFINITA E NEI PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON NEUROLETTICI

Caratterizzazione monodimensionale

Dopo separazione per SDS-PAGE ed immunoblot con anticorpi specifici per le diverse isoforme di 14-3-3, i campioni di CSF di tutti i casi di sCJD definita mostravano la presenza delle isoforme γ e ζ a 30 kDa (vedi figura 13A, 13B e 13C), dell'isoforma ε a 32 kDa (figura 13D), mentre risultavano negativi per tutte le altre isoforme testate: β , η , σ , e τ (dati non mostrati). I campioni di CSF dei pazienti in trattamento con neurolettici mostravano bande appena visibili all'immunoblot con anticorpo anti-14-3-3 γ (figura 13C) e risultavano completamente negativi con l'anticorpo anti ε 14-3-3 (figura 13D) e con tutti i rimanenti anticorpi testati: anti-14-3-3 β , η , σ e τ . Questo gruppo risultava, tuttavia, positivo per l'isoforma ζ , mostrando due bande a 30 e 32 kDa o, in alcuni casi una strisciata nel range 30-33 kDa (figura 13B).

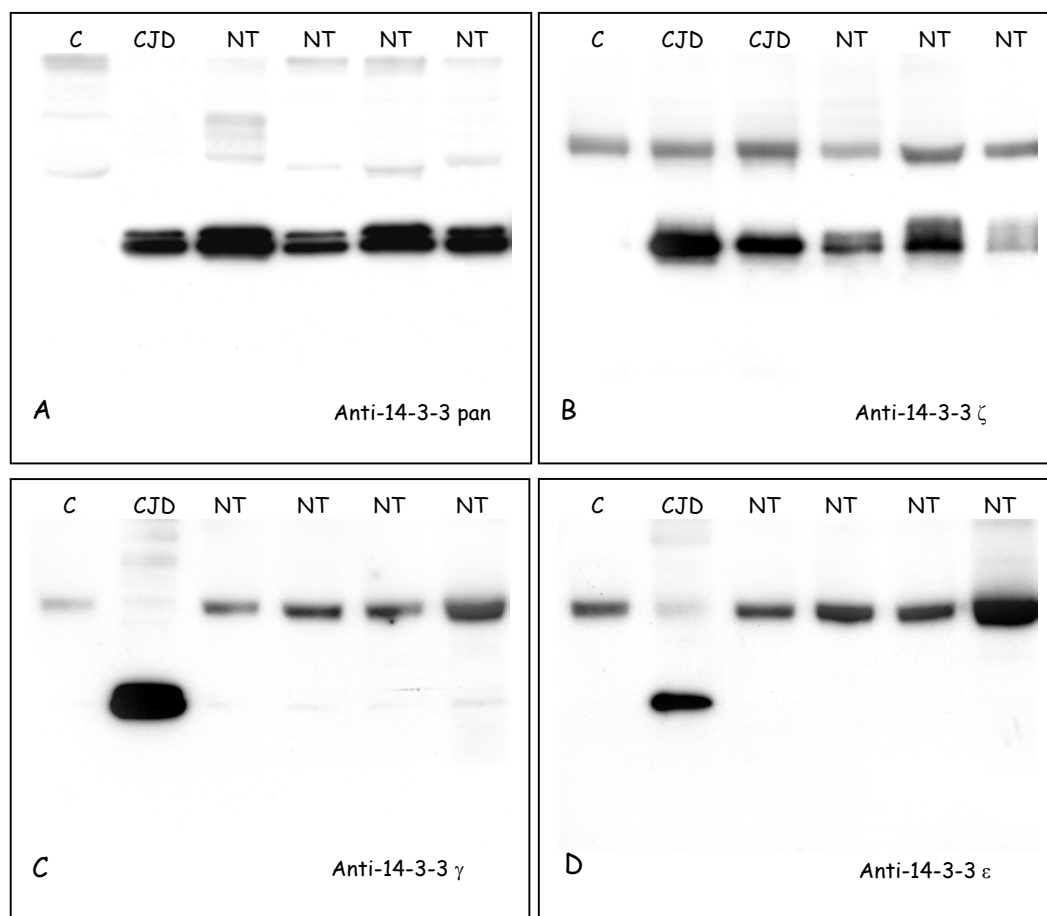


Figura 13: Western blot dopo SDS-PAGE dei CSF di soggetti sCJD e NT.

Caratterizzazione bidimensionale

Per indagare il differente pattern di separazione della 14-3-3 ζ nei soggetti con sCJD e in quelli trattati con neurolettici, è stata fatta una elettroforesi bidimensionale dei campioni di CSF dei due gruppi seguita da immunoblot con anticorpi anti-14-3-3 ζ e pan.

Nei campioni dei soggetti con sCJD i Western-blot delle separazioni bidimensionali hanno confermato la presenza delle isoforme γ , ϵ e ζ nel CSF (vedi figura 14A, B). I campioni di CSF dei pazienti in trattamento con neurolettici mostravano la presenza dell'isoforma γ a 30 kDa e un debole segnale per l'isoforma ϵ (figura 14C), logica conseguenza della maggiore quantità di CSF utilizzata nella separazione bidimensionale (100 μ l) rispetto all' SDS-PAGE (25 μ l). Un pattern diverso era riscontrato per l'isoforma ζ , che si presentava come un treno di spots in una zona a 30-33 kDa con pI tra 4 e 5,5 (figura 14D): questo pattern è compatibile con una fosforilazione della proteina 14-3-3 ζ .

I Western blot mostrano anche degli altri spot dovuti ad aspecificità dell'anticorpo secondario: in particolare sono evidenti tracce dell'albumina a 60 kDa e di catene leggere di immunoglobuline.

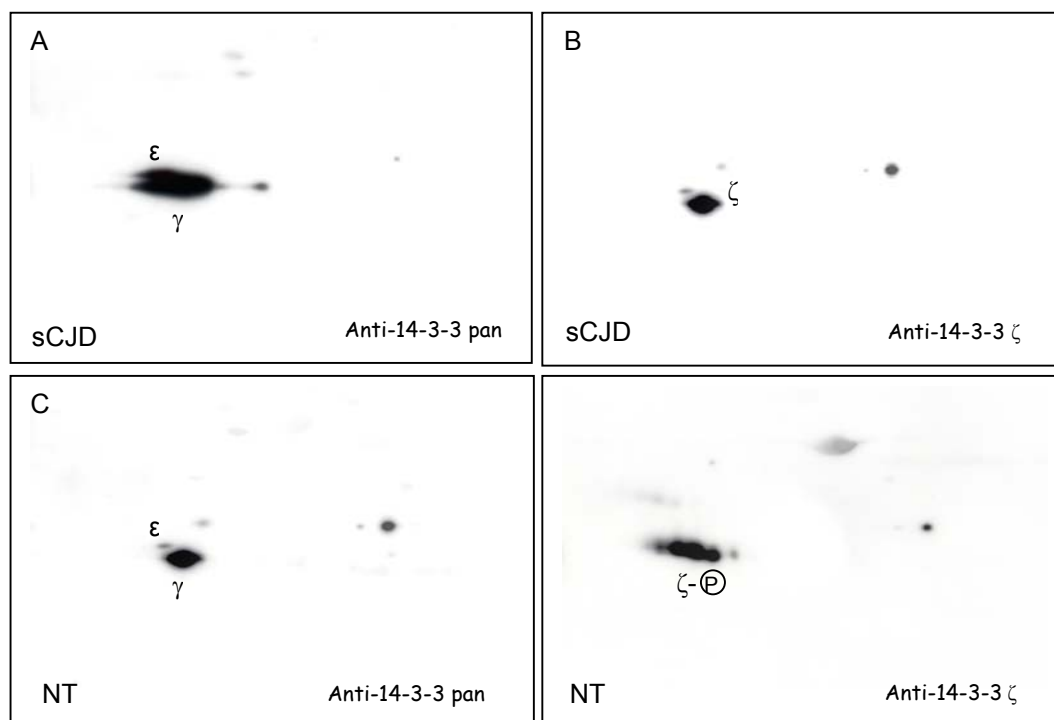


Figura 14: Western blot rappresentativi dopo 2D-PAGE del CSF dei soggetti sCJD e NT.

Defosforilazione enzimatica dei campioni di CSF

Per confermare il fatto che nei campioni di CSF di pazienti trattati con neurolettici la 14-3-3 ζ fosse in forma fosforilata è stata effettuata una defosforilazione enzimatica con fosfatasi alcalina. Sono stati defosforilati campioni di CSF di soggetti con sCJD e pazienti trattati con neurolettici. Il Western blot con anticorpo anti-14-3-3 ζ nei campioni di CSF di soggetti con sCJD (vedi figura 15) mostrava sempre la stessa banda di 30 kDa senza nessun cambiamento di pattern prima e dopo defosforilazione. I campioni di CSF dei pazienti trattati con neurolettici, invece, dopo defosforilazione enzimatica, mostravano la perdita della banda a 32 kDa o del treno 30-33 kDa ed erano risolti come una sola banda a 30 kDa (vedi figura 15).

Per confermare questi dati sono stati effettuati anche degli immunoblot della separazioni bidimensionali dopo defosforilazione enzimatica. I campioni defosforilati dei pazienti in trattamento con neurolettici perdevano il caratteristico pattern con il treno di isoforme fosforilate ed erano ridotti ad un unico spot di 30 kDa con pI 5,2 (figura 16).

I campioni di CSF defosforilati sono stati confrontati anche direttamente con la proteina 14-3-3 ζ ricombinante (figura 16). L'immunoblot della separazione bidimensionale mostra un pattern qualitativo perfettamente sovrapponibile fra 14-3-3 ζ defosforilata e 14-3-3 ζ ricombinante ad eccezione di lievi differenze nel peso molecolare (circa 1 kDa in più per la ricombinante) e nel pI (5,6 per la ricombinante).

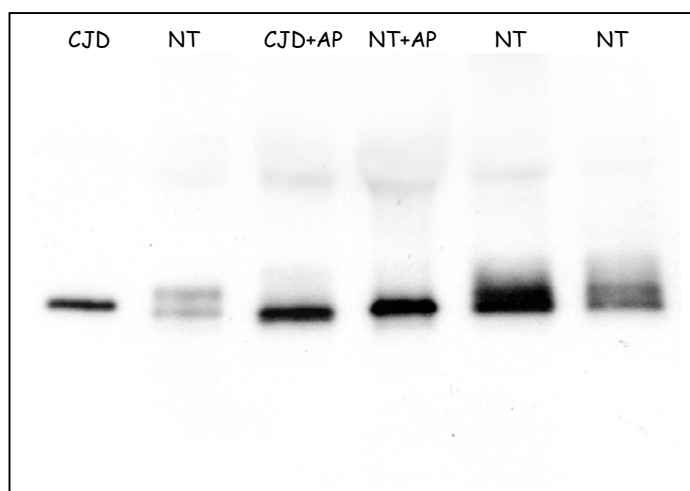


Figura 15: confronto per Western blot con anti-14-3-3 ζ di campioni di CSF di sCJD e NT prima e dopo defosforilazione enzimatica (indicata con AP).

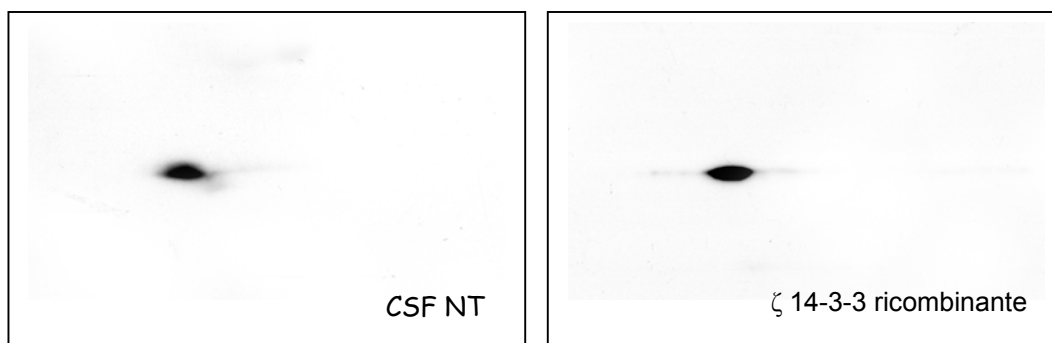


Figura 16: confronto per Western blot con anti-14-3-3 ζ di un campione rappresentativo di CSF NT dopo defosforilazione enzimatica e di 14-3-3 ζ ricombinante .

DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi è partito da uno studio sulla specificità della ricerca della proteina 14-3-3 nel CSF di soggetti con sCJD. Lo studio è stato approfondito suddividendo i campioni di CSF disponibili nei diversi fenotipi clinico-patologici. Tutti i campioni testati hanno mostrato positività alla 14-3-3 ad eccezione del gruppo MM-19, in cui la positività pur non essendo del tutto assente, mostrava solo una debole intensità. Due lavori precedenti, che analizzavano la specificità della proteina 14-3-3 nel CSF, avevano già evidenziato un diverso comportamento tra i singoli sottotipi di sCJD (88, 89); tuttavia non era mai stata riportata una sensibilità così elevata come quella descritta nella presente tesi. In generale era riportata una minore sensibilità in tutti i soggetti sCJD di tipo 2, mentre, per i fenotipi MM-21, era riportata una sensibilità paragonabile. Questo fatto potrebbe trovare riscontro in una aumentata sensibilità della metodica di rivelazione impiegata in questa tesi.

Parallelamente alla determinazione della 14-3-3 è stato effettuato anche il dosaggio della proteina Tau nel CSF. Il risultato ottenuto è paragonabile a quello registrato per le 14-3-3: tutti i campioni di sCJD studiati hanno presentato un marcato aumento rispetto ai controlli (media 195 pg/ml), registrando valori al di sopra del cut-off diagnostico per la sCJD riportato dalla letteratura di 1300 pg/ml; l'unica eccezione era rappresentata dal fenotipo MM-19, che, pur presentando livelli significativamente superiori ai controlli, rimaneva nettamente al di sotto del limite di 1300 pg/ml.

Va sottolineato, quindi, come ricerca della proteina 14-3-3 e dosaggio della proteina Tau abbiano dimostrato la stessa sensibilità per la sCJD nei CSF analizzati in questo lavoro di tesi.

La cosa sorprendente era che quanto appena descritto non si era verificato per un gruppo di 12 soggetti che, per considerazioni cliniche e per la positività alla 14-3-3, presentavano una diagnosi di possibile o probabile sCJD. La positività alla 14-3-3 era perfettamente paragonabile a quella dei soggetti con sCJD definita. Questi soggetti, tuttavia, presentavano una dissociazione “positività alla 14-3-3/incremento dei livelli di Tau”, poiché i livelli di Tau non presentavano un aumento altrettanto significativo. Dal momento che, universalmente, la ricerca della proteina 14-3-3 nel CSF viene condotta con un anticorpo in grado di riconoscere tutte le isoforme, si è passati ad una tipizzazione delle singole isoforme. Già altri lavori del 1999 si sono occupati di ricercare quali isoforme mostrassero un aumento selettivo nel CSF dei soggetti con sCJD rispetto ad altre patologie. Saiz et al. descrivevano un incremento delle isoforme β , γ , ε , τ e ζ (90), Wiltfang et al. delle isoforme β , γ , ε ed η (74), mentre Takahashi et al. solamente delle isoforme γ ed ε (87).

Nel presente lavoro sono stati testati anticorpi specifici per tutte le isoforme (β , γ , ε , η , σ , τ e ζ) ed è stata valutata la loro specificità ed eventuale cross-reattività. L'utilizzo degli anticorpi anti-14-3-3 β , η , σ e τ non ha fornito alcun segnale né su tessuto cerebrale, né su CSF di tutti i soggetti studiati, quindi è da escludere la presenza di tali isoforme in tutti i campioni analizzati.

Tutti gli anticorpi che hanno fornito un segnale positivo si sono dimostrati completamente specifici.

La tipizzazione monodimensionale dopo SDS-PAGE ha mostrato la presenza delle isoforme 14-3-3 γ , ε e ζ nel tessuto cerebrale di entrambi i gruppi studiati, ma ha permesso, tuttavia, di evidenziare una diversa espressione di queste isoforme nel CSF dei due gruppi. Nel CSF dei soggetti sCJD sono state rivelate le isoforme γ , ε e ζ , mentre nei campioni di CSF dei pazienti in trattamento con neurolettici, invece, era evidenziata soprattutto la presenza dell'isoforma ζ e bassi livelli dell'isoforma γ .

L'isoforma ζ è già stata descritta anche nel CSF di soggetti con malattie paraneoplastiche neurologiche e AIDS con distruzione neuronale (90, 91). Poiché i due gruppi presentavano un diverso pattern nel Western blot con anti-14-3-3 ζ , la tipizzazione è stata approfondita con delle separazioni bidimensionali. Questo approccio ha permesso di identificare la presenza di 14-3-3 ζ fosforilata nei soggetti NT.

La letteratura non riporta né studi di caratterizzazione bidimensionale delle isoforme di 14-3-3 nel CSF, né, tanto meno, lavori che descrivano 14-3-3 ζ fosforilata nel CSF.

Considerando i risultati ottenuti emerge come la caratterizzazione delle diverse isoforme di 14-3-3 ed il dosaggio della proteina Tau possano contribuire a migliorare la diagnosi molecolare della sCJD.

La fosforilazione delle proteine 14-3-3 è stata ampiamente studiata ed è risultata fondamentale per la loro funzionalità (43). Le proteine 14-3-3 possono legare e regolare centinaia di proteine diverse in numerosi

processi cellulari diversi. Per poter esplicitare queste attività, le proteine 14-3-3 devono essere in grado di formare omo- od etero-dimeri.

Studi recenti hanno dimostrato che la fosforilazione può influenzare l'interazione tra isoforme e quindi la stabilità dei dimeri e può influenzare anche l'affinità di legame nei confronti dei diversi ligandi (43). In particolare è stato dimostrato che la fosforilazione della isoforma ζ al residuo serina-58 ne determina la dissociazione del dimero. Altre evidenze sperimentali mostrano come, una volta fosforilata, la 14-3-3 ζ si dissocia da Bax, permettendo la sua traslocazione nel mitocondrio, il rilascio del citocromo C e l'attivazione dell'apoptosi (66). Queste considerazioni suggeriscono che la fosforilazione della 14-3-3 ζ potrebbe rappresentare un indizio di apoptosi in atto.

Lavori recenti riportano che farmaci neurolettici e antiepilettici inducono apoptosi nel cervello di cavie (92, 93). Se si considera che i soggetti NT erano in trattamento con questi farmaci, si può avanzare l'ipotesi che il rilascio della 14-3-3 ζ nel CSF sia una conseguenza di eventi molecolari indotti dall'assunzione dei farmaci stessi.

Altri studi, inoltre, riportano che le proteine 14-3-3 nel CSF hanno un ricambio totale in meno di 24 ore (94) e quindi la determinazione delle proteine 14-3-3 nel CSF si presenta come un marker in tempo reale dell'andamento dei processi cellulari.

BIBLIOGRAFIA

1. Prusiner SB. : Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 1982; 216: 136–44.
2. Prusiner SB.: Molecular biology of prion diseases. Science 1991; 252: 1515–1522.
3. Huang Z, Prusiner SB & Cohen FE.: Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. Fold Des 1996; 1: 13–19.
4. Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn R, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE & Prusiner SB.: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10962–10966.
5. Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG, Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. Cell 1983; 2 Pt 1: 349-58.
6. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, & Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. Science 1968; 161: 388–389.
7. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 13363–13383.

8. Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 1977; 197: 943–960.
9. Prusiner SB, Scrapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.* 1989; 43: 345–374.
10. Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB & Gabizon R. Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1091–1097.
11. Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, & Castaigne P. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 1987; 37: 895–904.
13. Rosenthal NP, Keeseey J, Crandall B, & Brown WJ. Familial neurological disease associated with spongiform encephalopathy *Arch Neurol* 1976; 33: 252–259.
14. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 1986; 315: 997–1003.
15. Goldfarb LG, Brown P, Mitrova E, Cervenakova L, Goldin L, Korczyn AD, et al. Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* 1991; 7: 477–86.
16. Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E, et al. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six

- European countries, 1993–1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann Neurol* 1998; 43: 763–7.
17. Brown, P, Preece, MA, & Will RG. "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1992; 340: 24–27.
18. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921–5.
19. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40(4): 735-46.
20. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, Petersen RB, Gambetti P. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996; 39(6): 767-78.
21. Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Hegyi I, et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999; 353: 1673–4.
22. Weissmann C. Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 10–4
23. Brown P, Gibbs CJ, Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, et al. Human spongiform encephalopathy: the National

- Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 1994; 35: 513–29.
24. Parchi P, Giese A, Capellari S et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46: 224–33.
25. Zerr I, Poser S. Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests. *APMIS* 2002; 110(1): 88–98.
26. Cutler RW, Page L, Galicich J, Watters GV. Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man. *Brain* 1968; 91: 707–20
27. Milhorat TH, Hammock MK, Fenstermacher JD, Levin VA. Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus and brain. *Science* 1971; 173: 330–2.
28. Moore BW, McGregor D. Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver. *J Biol Chem* 1965; 40: 1647–53.
29. Green AJE. Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt–Jakob disease *Neuropathol and Appl Neurobiol* 2002; 28: 427–440.
30. Moore BW & Perez VJ. Specific acid proteins in the nervous system. *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice Hall/Woods Hole, Woods Hole, MA, USA, 1967, 3–359.

31. Martin H, et al. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. FEBS Lett 1993; 331: 296–303.
32. Aitken A, Howell S, Jones D, Madrazo J & Patel Y. 14-3-3 α and δ are the phosphorylated forms of raf activating 14-3-3 β and ζ . In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys motif. J Biol Chem 1995; 270: 5706–5709.
33. Boston PF, Jackson P & Thompson RJ. Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders. J Neurochem 1982; 38: 1475–1482.
34. Fu H, Subramanian RR & Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40: 617–647.
35. Liu, D. et al. Crystal structure of the ζ isoform of the 14-3-3 protein. Nature 1995; 376: 191–194.
36. Petosa C et al. 14-3-3 ζ binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. J Biol Chem 1998; 273: 16305–16310.
37. Wang H, Zhang L, Liddington R & Fu H. Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3 ζ disrupt its interaction with Raf-1 kinase. J Biol Chem 1998; 273: 16297–16304.

-
38. Wang W & Shakes DC. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol* 1996; 43: 384–398.
39. Aitken A. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol. Biol* 2002; 50: 993–1010.
40. Jones DH, Ley S & Aitken A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adaptor proteins. *FEBS Lett* 1995; 368: 55–58.
41. Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM. & Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996; 84: 889–897.
42. Yaffe MB. et al. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 1997; 91: 961–971.
43. van Hemert MJ, Steensma HY & van Heusden GP. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001; 23: 936–946.
44. Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell K, Peden A and Zemlickova E. Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 351-360.
45. Martin H, Patel Y, Jones D, Howell S, Robinson K and Aitken A. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. *FEBS Lett* 1993; 331: 296-303.

-
46. Dubois T, Rommel C, Howell S, Steinhusen U, Soneji Y, Moelling K and Aitken A. 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction. *J Biol Chem* 1997; 72: 28882-28888.
47. Megidish T, Cooper J, Zhang L, Fu H and Hakomori S. A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 21834-21845.
48. Toker A, Sellers, L A, Amess B, Patel Y, Harris A, and Aitken A. *Eur J Biochem* 1992; 206: 453-461.
49. Aitken A, Howell S, Jones D, Madrazo J, Patel Y, Autieri MV, and Carbone CJ. Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1995; 149-150: 41-9.
50. Yip-Schneider MT et al. Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* 2000; 351: 151–159.
51. Kiryu S, Morita N, Ohno K, Maeno H & Kiyama H. Regulation of mRNA expression involved in Ras and PKA signal pathways during rat hypoglossal nerve regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 29: 147–156.
52. Dhillon AS et al. A Raf-1 mutant that dissociates MEK/extracellular signal-regulated kinase activation from malignant transformation and differentiation but not proliferation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1983–1993.

53. Cavet ME, Lehoux S & Berk BC. 14-3-3 ζ is a p90 ribosomal S6 kinase isoform 1 (RSK1) binding protein that negatively regulates RSK kinase activity. *J Biol Chem* 2003; 16: 18376–18386.
54. Colombo PJ, Wetsel WC. & Gallagher M. Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14195–14199.
55. Bunney TD, van den Wijngaard PW & de Boer AH. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol Biol* 2002; 50: 1041–1051.
56. Rajan S et al. Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* 2002; 545: 13–26.
57. Schuchmann M & Galle PR. Apoptosis in liver disease. *Eur J Gastroenterol and Hepatol* 2001; 13: 785-790.
58. Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(4):403-8.
59. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV & Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Ann Rev Immunol* 1999; 17: 331-367.
60. Aggarwal BB. Apoptosis and nuclear factor-B: a tale of association and dissociation. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1033-1039.

-
61. Fanger GR, Widmann C, Porter AC, Sather S, Johnson GL & Vaillancourt RR. 14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 3476-3483.
62. Beyaert R, Heyninck K & Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor- κ B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1143- 1151.
63. Lademann U, Kallunki T & Jaattela M. A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 proteins. *Cell Death and Differentiation* 2001; 8: 265-272.
64. Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB & Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000; 6: 41-51.
65. Chiang CW, Harris G, Ellig C, Masters SC, Subramanian R, Shenolikar S, Wadzinski BE & Yang E. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* 2001; 97: 1289-1297.
66. Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G & Alexander-Bridges M. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 13402-13410.

-
67. Berg D, Holzmann C and Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4(9):752-62.
68. Harrington MG, Merril CR, Asher DM, and Gajdusek DC. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 279-283
69. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996; 335: 924-30.
70. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, Windl O, Kretzschmar HA, Weber T. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998; 43: 32-40.
71. Zeidler M, Gibbs CJ and Meslin F. WHO Manual for Strengthening Diagnosis and Surveillance of Creutzfeldt-Jakob Disease 1998, World Health Organization, Geneva.
72. Burkhard PR, Sanchez JC, Landis T & Hochstrasser DF. CSF detection of the 14-3-3 protein in unselected patients with dementia. *Neurology* 2001; 56: 1528–1533.
73. Collins S et al. Creutzfeld–Jakob disease: diagnostic utility of 14-3-3 immunodetection in cerebrospinal fluid. *J Clin Neurosci* 2000; 7: 203–208.
74. Kenney K, Brechtel C, Takahashi H, Kurohara K, Anderson P, Gibbs CJ Jr. An enzyme-linked immunosorbent assay to quantify 14-3-3

- proteins in the cerebrospinal fluid of suspected Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol* 2000; 48:395-8.
75. Wiltfang J et al. Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurochem* 1999; 73: 2485–2490.
76. Richard M et al. Immunohistochemical localization of 14.3.3 ζ protein in amyloid plaques in human spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 296–302.
77. Pietromonaco SF, Seluja GA, Aitken A. & Elias L. Association of 14-3-3 proteins with centrosomes. *Blood Cells Mol Dis* 1996; 22: 225–237.
78. Martin H, Rostas J, Patel Y & Aitken A. Subcellular localisation of 14-3-3 isoforms in rat brain using specific antibodies. *J Neurochem* 1994; 63: 2259–2265.
79. Moya KL et al. Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 58–65.
80. Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 1995; 75: 835–64.
81. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule associated protein 2. *Brain Res* 1986; 387: 271–80.
82. Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1998; 21: 428–33.

83. Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 1992; 8: 159–68.
84. Verbeek MM, De Jong D, Kremer HP. Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 25-40.
85. Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, Zampieri P, Gelati M, Fiorini M, Farinazzo A, Gardiman M, Cavallaro T, Bentivoglio M, Righetti PG, Pocchiari M, Rizzuto N, Monaco S. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 711-9.
86. Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, Eigen M, Kretzschmar H. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5468–73
87. Wong BS, Green AJ, Li R, Xie Z, Pan T, Liu T, Chen SG, Gambetti P, Sy MS. Absence of protease-resistant prion protein in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* 2001; 194: 9–14.
88. Takahashi H, Iwata T, Kitagawa Y, Takahashi RH, Sato Y, Wakabayashi H, Takashima M, Kido H, Nagashima K, Kenney K, Gibbs CJ Jr, Kurata T. Increased levels of epsilon and gamma isoforms

- of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 983-5.
89. Castellani RJ, Colucci M, Xie Z, Zou W, Li C, Parchi P, Capellari S, Pastore M, Rahbar MH, Chen SG, Gambetti P. Sensitivity of 14-3-3 protein test varies in subtypes of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2004; 63: 436-42.
90. Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielczyk B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Poser S. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002; 58: 192-7.
91. Saiz A, Graus F, Dalmau J, Pifarre A, Marin C, Tolosa E. Detection of 14-3-3 brain protein in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Ann Neurol* 1999; 46: 774-7.
92. Wakabayashi H, Yano M, Tachikawa N et al. Increased concentrations of 14-3-3 epsilon, gamma and zeta isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clin Chim Acta* 2001; 312: 97-105.
93. Mitchell IJ, Cooper AC, Griffiths MR, Cooper AJ. Acute administration of haloperidol induces apoptosis of neurones in the striatum and substantia nigra in the rat. *Neuroscience* 2002; 109: 89-99.
94. Bittigau P, Sifringer M, Genz K et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15089-15094.

95. Bonora S, Zanusso G, Raiteri R et al. Clearance of 14-3-3 protein from cerebrospinal fluid heralds the resolution of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2003; 36: 1492-1495.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare tutti quelli che mi sono stati vicini, mi hanno incoraggiato e sopportato durante questi tre anni di dottorato.

I miei genitori, miei tifosi numero uno, per averlo fatto fin dalla mia nascita e mia moglie Valeria, compagna preziosa, che lo fa da anni e che lo farà anche per tutto il tempo d'ora in poi.

Il prof. Monaco, per la fiducia dimostratami e per aver sempre creduto in questo progetto.

Il dott. Zanusso sempre disponibile e generoso di consigli.

I miei colleghi più stretti: Matteo, per il supporto tecnico, informatico, sportivo, tattico, ludico...; Alessia, con la quale ho condiviso in tranquillità infinite ore nella medesima stanza; Elisa, appena arrivata e già ambientata con generoso aiuto e spensierata allegria.

Andrea, un sicuro ed indispensabile riferimento per la buona riuscita dei miei test elisa nel territorio straniero del laboratorio di immunologia.

Oscar, insostituibile compagno della pausa pranzo con annesse chiacchierate ricreative.

Gli altri compagni di laboratorio: il dott. Ferrari, il dott. Salviati, Moreno, Chiara, Ilaria, Silvia, la signora Daniela, Floriana, Diana, Federica, Alessandra, Maria per aver reso sempre piacevole, allegra e talvolta festosa la mia permanenza in questo grande laboratorio.