

## REFERATE GENERALE



DOI: 10.5281/zenodo.6510173

UDC: [616.831+616.36]-007.17-056.7+577.11+546.56

## ROLUL PROTEINEI ATP7B ÎN HOMEOSTAZIA CUPRULUI ȘI ÎN DEZVOLTAREA BOLII WILSON: REVISTA LITERATURII

### THE ROLE OF ATP7B PROTEIN IN COPPER HOMEOSTASIS AND IN THE DEVELOPMENT OF WILSON'S DISEASE: A LITERATURE REVIEW

Veronica Cumpătă, student-doctorand

Departamentul Medicină Internă, disciplina de Gastroenterologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

#### Rezumat

**Obiective.** Scopul lucrării prezente constă în studierea funcției proteinei ATP7B la nivel celular și sistemic, implicarea enzimei în menținerea echilibrului intern al ionilor de cupru, precum și rolul ei în dezvoltarea maladiei Wilson.

**Material și metode.** A fost efectuată o căutare în baza de date electronice PubMed, fiind luate în considerare articolele relevante, publicate în ultimii 20 de ani. Termenii de căutare utilizați (în limba engleză) au fost: "cooper homeostasis", "ATP7B gene", "Wilson's disease protein", "ATP7B protein", "ATP7B structure", "ATP7B function", "pathogenesis of Wilson disease", "cooper and ATP7B".

**Rezultate.** Gena ATP7B codifică structura unei proteine ce transportă cuprul intracelular, proces facilitat energetic de către hidroliza adenozin trifosfatului. Proteina ATP7B are o arhitectură complexă de tip multidomeniu, fiind localizată în mai multe țesuturi. Ea reprezintă o verigă importantă în menținerea echilibrului cuprului, atât la nivel intracelular, cât și sistemic. Reducerea excreției biliare a cuprului determină depunerea lui în exces în mai multe organe, în special ficat și creier, astfel fiind afectate funcțiile fiziologice ale organelor implicate, provocând dezvoltarea bolii Wilson, o maladie ereditară rară cu transmitere autozomal-recesivă și tablou clinic imprezvizibil.

**Concluzii.** Stabilirea diagnosticului precoce și inițierea tratamentului cât mai rapid, sunt momente critice în prevenirea progresiei bolii și a sechelelor ireversibile, iar o înțelegere mai bună a mecanismelor moleculare ce provoacă depunerea anormală de cupru și leziuni ale organelor este cheia în dezvoltarea unei abordări eficiente de management.

**Cuvinte-cheie:** homeostazia cuprului, proteina ATP7B, mecanisme moleculare, boala Wilson

#### Summary

**Objectives.** The aim of this paper is to study the function of ATP7B protein at the cellular and systemic level, the involvement of the enzyme in maintaining the internal balance of copper ions, and its role in the development of Wilson's disease.

**Materials and methods.** A structured search was performed in the PubMed electronic database, taking into account relevant articles, published in the last 20 years. The search terms used (in English) were: "cooper homeostasis", "ATP7B gene", "Wilson's disease protein", "ATP7B protein", "ATP7B structure", "ATP7B function", "pathogenesis of Wilson disease", "cooper and ATP7B".

**Results.** The ATP7B gene encodes the structure of a protein that carries intracellular copper, a process that is energetically facilitated by the hydrolysis of the adenosine triphosphate. ATP7B protein has a complex multidomain architecture, being located in several tissues. It is an important link in maintaining the balance of copper, both intracellularly and systemically. Reducing the bile excretion of copper causes its excess deposition in several organs, especially the liver and brain, thus affecting the physiological functions of the organs involved and causing the development of Wilson's disease, a rare inherited disease with autosomal recessive transmission and unpredictable clinical picture.

**Conclusions.** Early diagnosis and early treatment are critical moments in preventing disease progression and irreversible sequelae. A better understanding of the molecular mechanisms that cause abnormal copper deposition and organ damage is key to developing an effective management approach.

**Keywords:** cooper homeostasis, ATP7B protein, molecular mechanism, Wilson's disease

#### Introducere

Cuprul (Cu) este un metal clasificat ca fiind un micronutrient esențial, necesar în cantități mici, dar crucial pentru funcționarea metabolică adecvată și susținerea creșterii normale a țesuturilor. El participă în calitate de cofactor al mai multor metaloproteine cheie, implicate în diferite procese celulare, inclusiv în metabolismul energetic, activitate antioxidantă, neurotransmitere și

sinteza colagenului tisular [1]. Prezența deficitară a Cu în organism, rezultată din mutații genetice, spre exemplu, boala Menkes (ATP7A), rezecții intestinale sau alimentație deficitară, poate afecta grav funcția sistemului imunitar, dezvoltarea și creșterea structurilor țesutului conjunctiv și neurologic. Totodată, perturbarea mecanismelor de reglare a concentrației de Cu în organism determină acumularea ionilor de metal în diverse organe, precum ficatul și

ganglionii bazali ai creierului (boala Wilson), ceea ce duce la toxicitate și disfuncție multiplă de organe [2]. Deși este un element esențial în celule, Cu poate acționa fie ca receptor, fie ca donator de electroni, participând în diferite reacții biochimice, iar excesul lui devine dăunător, deoarece poate genera radicali liberi și iniția reacții oxidativ-distructive, ce se finalizează cu moartea celulei. Metabolismul Cu implică absorbția, distribuția, sechestrarea și excreția lui, atât la nivel celular cât și sistemic [3]. Pentru a evita acumularea toxică a Cu, în procesul de evoluție umană s-a dezvoltat un mecanism fin de reglare, ce permite ca excesul de Cu să fie excretat din organism, fapt datorat proteinei ATP7B [4].

Proteina ATP7B (cunoscută și ca Wilson ATP-aza) aparține clasei IB a superfamiliei de ATP-aze (proteine ce catalizează descompunerea adenozin trifosfatului) de tip P foarte selective și are un rol primordial în transportul intracelular al ionilor de Cu [5]. Structura ei este codificată de gena ATP7B, care se găsește în brațul lung al cromozomului 13 (13q14.3), fiind singura genă cunoscută în prezent că provoacă boala Wilson (BW) [6]. În pofida importanței sale fiziologice, activitatea biochimică și reglarea funcțională a proteinei ATP7B sunt limitate, iar acest lucru se datorează organizării sale sofisticate de tip multidomeniu [3].

Boala Wilson, numită și degenerescența hepato-lenticulară, este o maladie genetică rară cu transmitere autozomal-recesivă, determinată de prezența unor mutații la nivelul genei ATP7B, în rezultat fiind sintetizată o proteină defectă sau afuncțională, ce duce la acumularea în exces a ionilor de Cu în mai multe țesuturi, în special în ficat și creier. Este răspândită în întreaga lume și considerată una dintre cele mai frecvente tulburări mendeliene, datorită frecvenței înalte a purtătorilor sănătoși 1:90-150 [7]. Deși este o afecțiune monogenică, cu distribuție conform caracterului mendelian, au fost raportate cazuri de transmitere „pseudo-dominantă” și model de moștenire atipică cu mecanisme mutaționale neobișnuite [6]. Imposibilitatea de a stabili corelații genotip-fenotip multor factori: complexitatea biochimică și funcțională a proteinei ATP7B, variabilitatea mutațională înaltă, heterogenitatea clinică imprezibilă, prezența factorilor epigenetici, precum și factorii de mediu și cei dietetici, bine definite, care ar facilita diagnosticul și tratamentul pacienților, se datorează mai

### Material și metode

A fost efectuată o căutare a lucrărilor științifice publicate începând cu anul 2001 în baza electronică de date MEDLINE folosind motorul de căutare PubMed și HINARI (*Health Internet Work Acces to Research Initiative*) – program Research4Life, fiind selectate articole în text integral, oferite de aceste platforme. Termenii de căutare utilizați (în limba engleză) au fost: „*cooper homeostasis*”, „*ATP7B gene*”, „*Wilson's disease protein*”, „*ATP7B protein*”, „*ATP7B structure*”, „*ATP7B function*”, „*pathogenesis of Wilson disease*”, „*cooper and ATP7B*”. Au fost selectate articole originale, meta-analize, reviuiri sistematice, precum și capitole din cărți. Nu au fost stabilite limite de limbă, dar au fost prioritizate articolele în limba engleză. Adicional, a fost studiată bibliografia articolelor selectate, cu scopul de a găsi alte articole relevante

la această temă. Au fost incluse lucrări științifice care au abordat metabolismul uman al cuprului, structura și funcția proteinei ATP7B, precum și urmările disfuncției acesteia. Au fost excluse articolele ce vizau studiile genetice, tabloul clinic, diagnosticul și tratamentul BW.

### Rezultate și Discuții

După procesarea informației din bazele de date PubMed și HINARI, conform criteriilor de căutare au fost selectate 220 de articole privind rolul proteinei ATP7B în organismul uman. Bibliografia finală conține 33 de surse relevante, care au fost considerate reprezentative pentru materialul publicat la tema acestui articol de sinteză. Publicațiile, conținutul cărora nu reflectau subiectul abordat în articolul dat, deși au fost alese de programul de căutare, precum și articolele, care nu au fost accesibile pentru vizionarea liberă și prin baza de date HINARI au fost excluse din listă.

Aspectele biologice ale Cuprului în organism. Cuprul este unul dintre primele și cele mai utilizate metale din istoria omenirii. Scoarța terestră reprezintă rezervorul principal al Cu, aproape 80% fiind depozitat în ecosistemele terestre. Cuprul poate contamina aerul, apa și solul prin diferite procese naturale, cum ar fi erupțiile vulcanilor, praful suflat de vânt, activitate microbiană sau prin activitățile industriale, cum ar fi exploatarea minelor și prelucrarea minereurilor. Cu atmosferic este rezultatul activității umane, însă datorită schimbării continue a concentrației lui în aer, la moment nu reprezintă un pericol pentru sănătatea umană. Companiile ce extrag Cu și cele ce fac produse din el, activează conform unei legislații ecologice stricte pentru a reduce impactul industrial asupra mediului [8]. Datorită efectului antimicrobian, produsele din Cu sunt utilizate pe scară largă în fabricarea hainelor, controlul alimentelor și în spitale (suprafețe și tencuială), reducând cu mai mult de 50% infecția pacientului internat [9].

Rolul fiziologic al Cuprului. Omul obține Cu printr-un regim alimentar obișnuit, din alimente sau băuturi, aportul zilnic variind de la 2-4 mg, în mediu, până la 10 mg. Nivelul total al Cu în sânge este rezultatul echilibrului dintre absorbția intestinală și excreția biliară. Reglarea concentrației are loc la ambele nivele, dar excreția biliară este determinantul principal al homeostaziei interne. La nivel celular, procesele fiziologice sunt menținute printr-un mecanism de reglare mai complex, ce implică mai mulți transportatori de Cu, chaperoni și proteine de legare [10].

Absorbția Cu începe la nivelul stomacului și duodenului, principalele locuri de absorbție, fiind dependentă de disponibilitatea alimentară a nutrientului: absorbția este mai mare din alimentele cu conținut scăzut de Cu și mai scăzut în alimentele bogate în Cu, ceea ce sugerează că bariera intestinală este primul reglator al nivelului total de Cu din organism. Înainte de absorbție,  $\text{Cu}^{2+}$  este redus la ioni de  $\text{Cu}^+$ , proces dirijat de citocrom b reductaza 1 (CYTB1) sau 6-reductaza antigenului epitelial transmembranar al prostatei (STEAP). La nivelul membranei apicale a enterocitelor, absorbția Cu are loc prin intermediul proteinelor: transportorului 1 de cupru (CTR1) și transportorului 1 de metal divalent (DMT1). CTR1 este principalul importator cu

afinitate mare față de  $\text{Cu}^+$ , transportarea fiind efectuată ATP-independent. DMT1 este responsabil pentru absorbția  $\text{Fe}^{2+}$  în enterocite, iar ionii  $\text{Cu}^+$  se leagă nespecific, ceea ce poate reprezenta un mecanism alternativ de intrare a  $\text{Cu}^+$  în celulă [11]. Astfel, preluat prin CTR1,  $\text{Cu}^+$  este transferat către proteinele chaperone – proteina antioxidant 1 (ATOX1), chaperon de  $\text{Cu}$  a superoxidazei (CCS) și ansamblu de proteine a citocromului C oxidaza (COX17/COX11), care împiedică circulația liberă a ionilor de  $\text{Cu}^+$  și evită leziuni oxidative intracelulare. Concomitent,  $\text{Cu}$  este sechestrat și depozitat de către glutatation (GSH), un antioxidant important, și metalotionein (MT), regulator al metabolismului celular al metalelor esențiale [12]. În continuare, ATOX1, îl transportă spre cele două pompe majore de  $\text{Cu}$  ATP-dependente: ATP7A și ATP7B, CCS la superoxid dismutază  $\text{Cu}/\text{Zn}$  (SOD1) din citosol și, respectiv, COX17/COX11 la citocrom C oxidază din mitocondrii [13]. ATP7A, numită și Menkes ATP-aza are o distribuție în majoritatea celulelor, cu excepția hepatocitelor, având rol major în – transferul  $\text{Cu}$  în circulația portală prin membrana bazolaterală a enterocitelor [14]. Nivelul enteric al proteinei ATP7A este invers corelat cu nivelul sistemic al  $\text{Cu}$ , iar acest lucru se explică prin răspunsul ATP7A la diferite concentrații intracelulare de  $\text{Cu}$ , la un eflux înalt de ioni, enzima fiind translocată din rețeaua Golgi spre membrana apicală, pentru a preveni acumularea intracelulară și toxicitatea lui. Absorbția intestinală a  $\text{Cu}$  poate fi afectată de diverși factori: caracteristici demografice, conținutul  $\text{Cu}$  în alimente, sursa de hrană, conținutul intraluminal al intestinelor (de exemplu, zincul inhibă absorbția  $\text{Cu}$ ) [15].

În fluxul sanguin,  $\text{Cu}$  este legat predominant de proteinele ce îl transportă la ficat, precum albumina și transcupreina (alfa-2-macroglobulina), și la aminoacizi, pentru a facilita absorbția de  $\text{Cu}$  de către țesuturile periferice, precum histidina, glutamina, treonina și cisteina. La nivel hepatic, transportul intracelular de  $\text{Cu}$  este similar cu cel din intestin, doar că chaperonul ATOX1 va transfera  $\text{Cu}$  spre proteina ATP7B, o ATP-ază crucială în procesul de biosinteză și excreție de  $\text{Cu}$ , defectul căreia cauzează boala Wilson [4].

Arhitectura moleculară a proteinei ATP7B. Proteina este compusă dintr-un singur lanț polipeptidic pliat în mai multe domenii funcționale, ce conține 1465 aminoacizi, fiind localizată intracelular, preponderent în partea *trans* a complexului Golgi, transmembranar [5, 16]. Porțiunea membranară a ATP-azei conține domeniul M, care este compus din opt canale ionice transmembranare hidrofobe (TM1-TM8) și reprezintă mai puțin de 20% din masa moleculară a acesteia. Cea mai mare parte (aproximativ 80%) a masei proteice este expusă în citoplasmă și include nouă domenii: 6 MBDs (*metal-binding domains*), domeniu N, A, P și capătul C-terminal (-COOH). Capetele C-terminal și N-terminal se întâlnesc la toate proteinele; domeniu N, A și P sunt comune pentru toate ATP-azele de tip P; iar MBDs este componentă specifică proteinei ATP7B [5].

MBDs cuprinde șase domenii care leagă  $\text{Cu}$ , numerotate de la 1 la 6 începând cu capătul N-terminal (NH<sub>2</sub>) a lanțului polipeptidic, unite prin secvențe de linker. Linker-ul conține locusuri pentru fosforilare și participă în mișcarea intracelulară a proteinei ATP7B. Domeniul A („actor”)

– prima buclă citoplasmatică, coordonează schimbările conformaționale în timpul catalizei; domeniul P – a doua buclă citoplasmatică, responsabilă de fosforilare catalitică și conține un aspartat rezidual neschimbat la poziția 1027 (Asp1027) fosforilat tranzitoriu în timpul hidrolizei adenozin trifosfatului (ATP); domeniul N – a treia buclă citoplasmatică, include domeniul de legare a nucleotidelor – ATP (a nu se confunda cu capătul N-terminal) [5, 17]. Capătul C-terminal se consideră implicat în interacțiuni de reglementare cu alte regiuni ale proteinei și conține semnalul trileucină (1454LLL1456), acesta fiind recunoscut de complexe proteice adaptoare de clatrină (AP) în procesul de transportare intracelulară a Wilson ATP-azei [5, 16].

Fiecare domeniu funcțional conține secvențe unice de aminoacizi („motif”), cum ar fi în domeniul N – SEHPL, în domeniul P – DKTGT (Asp1027), în domeniul A – TGEA, în domeniul M, TM6 – CPC, capătul C-terminal – LLL, iar în domeniul MBD cele șase locusuri de legare a  $\text{Cu}$ , conține fiecare secvența repetitivă GMXCXXC. Toate acestea secvențe amino unice au un rol important în procesul de transportare a  $\text{Cu}$ , iar mutațiile lor sunt asociate cu apariția BW [6].

Rolul proteinei ATP7B. Wilson ATP-aza, este exprimată în numeroase tipuri de celule, cel mai mult în ficat, dar poate fi găsită și în rinichi, placentă, glanda mamară, creier, plămâni. În ficat se conțin cele mai ridicate niveluri de proteină ATP7B, iar purificarea hepatocitelor denotă că atât ele, cât și structurile non-parenchimotoase (celule Kupffer, endoteliale și stelate) exprimă această proteină; însă sunt necesare cercetări suplimentare pentru a determina cu exactitate care din aceste structuri. Studiile funcționale ilustrează faptul că ATP7B atât în celulele parenchimotoase, cât și în cele non-parenchimotoase contribuie semnificativ la homeostazia cuprului [18, 19]. Expresia ATP7B în alte organe este mai mică în comparație cu cea din ficat; cu toate acestea, se cunosc anumite structuri și/sau celule specializate, în care ATP7B este foarte abundent, precum locus coeruleus din trunchiul cerebral, neuronii Purkinje din cerebel și celulele din criptele intestinului subțire [14, 20]. Rolul proteinei în ficat este bine știut, în timp ce informații despre funcția ei în țesuturile extrahepatice sunt limitate, unele studii recente sugerând că funcțiile extrahepatice pot fi diferite de cele hepatice, de exemplu, depozitarea  $\text{Cu}$  în vezicule [14]. În hepatocite, în condiții de echilibru Wilson ATP-aza transportă  $\text{Cu}$  în lumenul rețelei trans-Golgi, unde  $\text{Cu}$  este transmis ceruloplasminei - feroxidază dependentă de  $\text{Cu}$ . Inactivarea proteinei ATP7B nu perturbă sinteza ceruloplasminei, însă fără  $\text{Cu}$  aceasta este instabilă și susceptibilă la degradarea proteolitică din fluxul sanguin [21].

Pentru a transfera  $\text{Cu}$  din citosol în lumenul rețelei trans-Golgi, proteina ATP7B utilizează energia obținută prin hidroliza ATP, și anume ruperea legăturii dintre ultimii doi fosfați ATP eliberează cea mai mare energie, astfel producând adenozin difosfat (ADP) și un fosfat (P) [22]. Transportul și hidroliza sunt procese interdependente, adică transportul de  $\text{Cu}$  din citosol în lumenul complexului Golgi este dependent de energia provenită din hidroliza ATP-ului și, invers, hidroliza ATP-ului necesită legarea

Cu de ATP7B [16]. Proteina antioxidant 1, numită și ATOX1, este una din proteinele chaperone ce participă în transportarea Cu spre proteină, iar domeniile MBDs au o afinitate înaltă pentru Cu, jucând un rol major în procesul de acceptare a Cu de la ATOX1 prin interacțiuni proteină-proteină [6, 16]. Achiziția Cu(I) de la ATOX1 și transferul lui la situs-ul transmembranar, perturbază „interacțiunea” dintre MBDs și domeniul N, astfel crește afinitatea ATP7B pentru molecula ATP din citoplasmă și stimulează atașarea ei la acest domeniu [12]. După aderarea ATP-ului, au loc fosforilarea intraproteică (Asp1027) și reacția de hidroliză, aceste procese servind ca impuls pentru domeniul A, ce coordonează modificări conformaționale în așa mod ca Cu să fie eliberat de transportor în lumenul domeniului M. După ce Cu părăsește canalele ionice transmembranare, Wilson ATP-aza suferă rearanjamente structurale suplimentare, care permit eliberarea ADP și P din situsurile lor respective în citoplasmă, iar ATP7B se resetează pentru un nou ciclu de transport. Mișcarea/eliberarea Cu prin canalele transmembranare este favorizată și de diferența de pH pe o parte a membranei în comparație cu cealaltă parte. Pentru a media aceste reacții biochimice complexe, Wilson ATP-aza are site-uri pentru legarea selectivă a liganzilor (Cu și ATP) și, cu toate că sunt separate spațial, ele comunică reciproc prin mișcarea diferitor elemente structurale [22]. Din acest motiv, când Cu intracelular este relativ scăzut, capătul N-terminal interacționează cu domeniul N, respectiv ducând la inhibarea legării ATP-ului [12]. Complexitatea „comportamentului” ATP7B și necesitatea de a se adapta interacțiunii cu diferite molecule de reglare (lipide, kinaze, fosfataze, „mașini” de transport) explică arhitectura complexă multi-domeniu a proteinei ATP7B [16, 22].

Deși ATP-aza este un monomer stabil cu o greutate de 164 kDa și conține toate situs-urile funcționale necesare pentru a efectua etapele biochimice asociate cu transportul Cu, in vivo, doi monomeri ATP7B interacționează pentru a forma un dimer. Nu este cunoscută semnificația funcțională a dimerizării ATP7B, însă o posibilă ipoteză este că structura dimerică permite o reglare mai sofisticată și/sau poate fi necesară pentru traficul intracelular de Cu [5].

*Rolul proteinei ATP7B în ficat.* ATP7B este exprimat cel mai mult în hepatocite. Rolul ATP7B în fiziologia ficatului este bine stabilit: de biosinteză și homeostazie. Cu absorbit din alimente este direcționat mai întâi către ficat, unde este procesat de hepatocite [12]. În condiții de echilibru, ATP7B hepatic își exercită în primul rând „funcția biosintetică”, adică asigură transportul Cu în lumenul complexului Golgi și îl încorporează în apoceruloplasmină, o feroxidază sintetizată de novo în nucleu. În hepatocite, apoceruloplasmina este principalul substrat care primește Cu de la ATP7B, iar capacitatea ceruloplasminei de a lega șase atomi de Cu, proces dirijat prin oxidarea  $Fe^{2+}$  spre  $Fe^{3+}$ , o face să fie depozit major de Cu în sânge. După achiziționarea Cu, ceruloplasmina este eliberată în fluxul sistemic [12, 13]. Chiar dacă 85% - 95% din Cu plasmatic este fixat în ceruloplasmină, Cu se consideră a fi doar un cofactor pentru ceruloplasmină, la fel ca și pentru diverse altele metaloenzime [4]. Sunt unele studii ce sugerează că, în afară de ceruloplasmină, Wilson ATP-aza

transferă Cu la omologul ceruloplasminei, hephaestin, în enterocite. Această proteină este implicată în captarea Fe în intestin, iar, aparent, pierderea funcțională a ATP7B în BW nu suprimă în mod substanțial funcția ei, deoarece Menkes ATP-aza (ATP7A) exprimată în enterocite poate livra Cu la hephaestin [12, 13].

Ficatul este responsabil de menținerea echilibrului sistemic de Cu. Wilson ATP-aza joacă un rol cheie în excreția excesului de Cu din hepatocite în bilă, datorită abilității de a se deplasa între diferite compartimente intracelulare, ca răspuns la modificarea nivelului de Cu în interiorul celulei. Când cresc nivelurile sistemice de Cu și mai mulți ioni intră în hepatocite, această cauzăază relocarea rapidă a proteinei ATP7B sub formă de vezicule către membrana canaliculară, unde se acumulează și facilitează sechestrarea surplusului de Cu. Ulterior, veziculele care conțin ATP7B și ioni de Cu, fuzionează cu membrana pentru a elibera conținutul lor în bilă. Astfel, Cu este eliminat prin bilă, iar enzima este recaptată prin endocitoză [13]. Când nivelurile intracelulare de Cu se reduc, ATP7B se reîntoarce în complexul Golgi, unde revine la sarcinile sale de biosinteză. Coordonarea acestui proces nu este cunoscut pe deplin. Recuperarea ATP7B din regiunea apicală a hepatocitului (canaliculară) și transferul acesteia de la endozomi la Golgi și invers, se bazează pe complexe proteice adaptoare de clatrină (AP), AP1 și AP2. Unele mutații, fie în ATP7B, fie în componentele „mașinării” endocitare, blochează întoarcerea ATP7B la complexul Golgi și compromit homeostazia Cu [23]. Cu eliberat în bilă nu este biodisponibil pentru recaptare în tractul gastrointestinal și este eliminat prin masele fecale. Astfel, ficatul joacă un rol major în excreția biliară a Cu, în timp ce rinichii prezintă un rol secundar în excreția lui [24].

Activitatea hepatică a ATP7B este stimulată de insulină și inhibată de glucagon. Unele studii sugerează că menținerea echilibrului Cu în hepatocite este esențială pentru echilibrul lipidelor în organism [12, 13]. Odată cu creșterea concentrației de Cu în interiorul hepatocitului, proteina ATP7B devine inactivă fiind direcționată din complexul Golgi spre endozom/lizozom pentru a fi hidrolizată/distrușă [16].

*Rolul proteinei ATP7B în intestin.* Cu pătrunde în organism prin intermediul alimentelor și lichidelor, iar absorbția intestinală este o etapă importantă în menținerea echilibrului de Cu. Funcția proteinei ATP7B enterice nu este cunoscută pe deplin, se sugerează că este implicată în păstrarea balanței de Cu în organism, prin depozitarea excesului de Cu alimentar și eliberarea graduală a ionilor proteinei ATP7A [14]. În caz de influx redus de Cu în lumenul intestinal, ATP7A transportă Cu spre circulația portală, iar ATP7B rămâne în complexul Golgi și în vezicule din citosolul enterocitului pentru a tampona Cu absorbit. În caz de influx mare de Cu în lumenul intestinal, ATP7B pompează Cu în vezicule pentru sechestrarea/stocarea lui, astfel menținând procesele normale de absorbție [12, 13].

*Rolul proteinei ATP7B în creier.* Expresia ATP7B în numeroase regiuni ale creierului este bine documentată. În plexul coroid proteina ATP7B se găsește din abundență și creșterea concentrației de Cu, declanșează mișcarea ei către



membrana bazolaterală, pentru a exporta excesul de Cu prin bariera hematoencefalică. Rolul ATP7B în sistemul nervos central este evident și din modificările patologice din creierul pacienților cu BW. Cu toate acestea, funcțiile specifice ale proteinei ATP7B în neuroni sau în celulele gliale rămân în mare parte neclare. Studiile „in vitro” asupra neuronilor primari ai hipocampului și a celulelor de neuroblastom cultivate, folosind ATP7B recombinant, au descoperit că ATP7B este localizată în rețeaua transGolgi și, după adăugarea Cu în probă, circulă către membrana plasmatică a dendritelor și a corpului celular, dar nu și în axoni, probabil pentru a facilita efluxul de Cu. Livrarea Cu către enzime dependente de Cu atât de importante, precum peptidil-alfa monooxigenaza, este mediată de ATP7A și nu de ATP7B, iar pierderea funcției ATP7A nu este compensată de ATP7B [25].

*Rolul proteinei ATP7B în alte țesuturi.* Actualmente, sunt disponibile puține informații cu privire la funcția Wilson ATP-azei în alte organe sau țesuturi. În glanda mamară, proteina este exprimată în celulele epiteliale luminale și contribuie la transportul Cu în lapte. Studiile „in vitro” asupra celulelor mamare cultivate cu un cocktail de hormoni de lactație sau cu Cu, declanșează traficul de ATP7B către membrana apicală și facilitează exportul de Cu din celulă. Inactivarea ATP7B este asociată cu un conținut mai scăzut de Cu în lapte [26].

În placentă, ATP7B este prezentă sub formă de vezicule în sincitiotrofoblast, mai ales în microvilozități. Microscopia electronică și studii ce au urmărit comportamentul proteinei ATP7B în celulele placentare indică faptul că ea este implicată în echilibrarea nivelurilor de Cu din celulele citosolului și poate transporta Cu înapoi în circulația maternă [13].

ATP7B este exprimată în celulele epiteliale ciliate ale căilor respiratorii, în celulele părului, glandele pineale și rinichi, iar concentrația diferă în dependență de rasă și vârstă [13]. Lipsa deplasării ATP-azei către membrană, ca răspuns la creșterea Cu în celulele renale cultivate, a sugerat că ATP7B renală ar putea avea mai degrabă un rol de stocare a Cu decât de eflux. Această sugestie este susținută de studiile la șoareci, care acumulează Cu în ficat, dar nu și în rinichi [24].

Consecințe ale disfuncției proteinei ATP7B. Inactivarea proteinei ATP7B în BW duce la excreția biliară deficitară a Cu, ceea ce cauzează supraîncărcarea ficatului și a altor țesuturi, precum și încărcarea ineficientă a ceruloplasminei cu Cu. Un defect în încorporarea normală a Cu în ceruloplasmină duce la secreția peptidului fără Cu, ce are un timp de înjumătățire mai scurt, astfel rezultând o concentrație plasmatică redusă [27]. Cauza principală a apariției semnelor clinice sunt modificările patologice declanșate de efectele toxice ale excesului de Cu acumulat în țesuturi, și anume provocarea stresului oxidativ intracelular cu deteriorarea lipidelor, proteinelor, moleculelor de ADN și ARN, deteriorarea mitocondriilor, iar la final, inducerea apoptozei celulare [28].

Din cauză că ficatul este locul principal de depozitare a metalului și fiind implicat în efluxul biliar al excesului de Cu, leziunea hepatică este cea mai frecventă manifestare a BW. De fapt, chiar și bolnavii cu manifestare neurologică a bolii acumulează în exces Cu în ficat și mai mult de jumătate dintre

ei se prezintă cu ciroză hepatică. La pacienții cu BW, de obicei, concentrația hepatică a Cu este crescută de aproximativ 5 ori, mai mare (peste 250 mg/g) comparativ cu 15-55 mg/g la persoanele sănătoase; Cu fiind distribuit intracelular neomogen și cu o localizare variată în dependență de stadiul bolii. Steatoza hepatică, rezultată în urma distrugerii mitocondriale și dereglării metabolismului lipidic, induce modificări inflamatorii (hepatită), iar persistența factorului toxic provoacă leziune cronică hepatică și necroză celulară, în consecință cu inițierea procesului de fibrozare a ficatului [27, 28]. Ca rezultat al progresiei fibrozei hepatice, se dezvoltă ciroza macronodulară. În cazul că BW nu este tratată, capacitatea de stocare a hepatocitelor se reduce semnificativ, astfel, se mărește concentrația serică de Cu liber, ceea ce duce la acumularea progresivă în alte organe, în special în creier, ochi, rinichi, oase și inimă, exercitând toxicitate extrahepatică [28].

Concentrația Cu în creierul pacienților Wilson poate atinge valori de 10-15 ori mai mare (până la 450 mg/g) decât 7-60 mg/g la grupul de control; acest lucru fiind confirmat într-un studiu post-mortem al creierului la pacienții cu BW, astfel, relevând o asociere clară între conținutul cerebral de Cu și severitatea bolii neurologice [28]. Expunerea pe termen lung la concentrații mari de Cu are ca rezultat modificări morfologice și afectare funcțională a astrocitelor. Astrocitele formează o parte importantă a barierei hematoencefalice și sunt esențiale pentru homeostazia neuronală. Nivelurile crescute de Cu din țesut și alterarea micromediului cerebral, cauzate de deteriorarea astrocitelor, conduc la implicarea altor celule și țesuturi ale creierului, inclusiv neuroni și oligodendrocite. Modificările patologice, precum astrogliaza, demielinizarea și dezintegrarea țesuturilor (de la rarefacție ușoară la necroză) sunt cel mai frecvent raportate în ganglionii bazali, cerebel și partea superioară a trunchiului cerebral [29]. Pe lângă leziunile cauzate de toxicitatea Cu, encefalopatia hepatică poate contribui la simptomele neuropsihiatrice în BW, unde disfuncția creierului este cauzată de insuficiență hepatică și/sau șuntul portosistemic [27]. Anomaliile morfologice și funcționale ale retinei din BW sunt asociate cu severitatea patologiei cerebrale detectate prin RMN (Rezonanță Magnetică Nucleară) și cu deteriorarea neurologică [30].

Procesul fiziopatologic de afectare a altor organe a fost mai puțin investigat, dar se consideră că eliberarea rapidă a Cu în rezultatul necrozei în masă a hepatocitelor poate duce la o creștere considerabilă a nivelului de Cu în sânge în doar câteva zile, prin urmare, poate mima o intoxicație acută cu ioni de Cu. Aceasta se manifestă prin anemie hemolitică Coombs-negativă (non-autoimună) asociată câteodată cu rabdomioloză, mecanismul lor fiind neînțeles în totalitate [28]. Cu seric liber sau cupru nelegat de ceruloplasmină este filtrat de epiteliul tubilor renali și excretat prin urină, iar în cazul BW, excesul de Cu în parenchimul renal cauzează disfuncția tubilor renali, aminoacidurie și nefrocalcinoză [31]. Acumularea Cu în membrana sinovială și cartilaj a fost sugerată ca fiind cauza majoră a osteoartritei la pacienții cu BW și poate contribui la modificări degenerative accelerate cu deformări, care afectează în special articulațiile mai mari,

de asemenea fiind observate și modificări patologice în oase, precum osteomalacia și osteoporoză [32]. Depozitarea Cu în miocard este asociată cu cardiomiopatie și aritmie, iar la examenul histopatologic al țesutului cardiac se evidențiază fibroză interstițială, scleroza vaselor mici și infiltrație focală a celulelor inflamatorii [33].

### Concluzii

Wilson ATP-aza joacă un rol esențial în menținerea homeostaziei Cu. Mai multe mecanisme moleculare reglatorii permit proteinei ATP7B să balanseze între funcția de biosinteză din rețeaua trans-Golgi, unde are loc sinteza

ceruloplasminei, și funcția homeostatică, realizată la polul biliar al hepatocitului. În pofida progresului raportat în cunoașterea proceselor fiziologice, care implică proteina ATP7B, detalii despre reglarea intracelulară a transportului Cu și funcțiile proteinei la diferite nivele necesită a fi studiate mai aprofundat. Prin urmare, cunoașterea factorilor și a proceselor biochimice, ce influențează modul de acțiune a proteinei ATP7B în anumite situații, poate oferi noi perspective în înțelegerea mecanismele patogenetice, a polimorfismului mutațional și fenotipic, de asemenea, poate descoperi ținte moleculare noi pentru a combate toxicitatea cuprului în boala Wilson.

### Bibliografie

1. Zeid CA, Kaler SG. Wilson Disease. In: Normal Human Copper Metabolism. Elsevier Inc., 2019.
2. Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem.* 2009; 1(6):1125-1142. doi:10.4155/fmc.09.84
3. Chen J, Jiang Y, Shi H, Peng Y, Fan X, Li C. The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflugers Arch.* 2020; 472(10):1415-1429. doi:10.1007/s00424-020-02412-2
4. Polishchuk EV, Concilli M, Iacobacci S, et al. Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis. *Dev Cell.* 2014; 29(6): 686-700. doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.033
5. Jayakanthan S, Braiterman LT, Hasan NM, Unger VM, Lutsenko S. Human copper transporter ATP7B (Wilson disease protein) forms stable dimers in vitro and in cells. *J Biol Chem.* 2017; 292(46): 18760-18774. doi:10.1074/jbc.M117.807263
6. Camarata MA, Si Houn Hahn. Wilson Disease. In: The genetics of Wilson disease. Elsevier Inc., 2019.
7. European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol.* 2012; 56(3):671-685. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.007
8. Georgopoulos PG, Roy A, Yonone-Lioy MJ, Opiekun RE, Lioy PJ. Environmental copper: its dynamics and human exposure issues. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2001; 4(4):341-394. doi:10.1080/109374001753146207
9. Sifri CD, Burke GH, Enfield KB. Reduced health care-associated infections in an acute care community hospital using a combination of self-disinfecting copper-impregnated composite hard surfaces and linens. *Am J Infect Control.* 2016; 44 (12):1565-1571. doi:10.1016/j.ajic.2016.07.007
10. Lattore M, Troncoso R, Uauy R. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: Biological Aspects of Copper. Elsevier Inc., 2019
11. Cousins RJ, Liuzzi JP. Trace metal absorption and transport. In: Said HM, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 6th ed. Academic Press; 2018. Pp.1485-1498.
12. Polishchuk RS. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: Cellular Function of ATP7B (Wilson ATPase). Elsevier Inc., 2019.
13. Pierson H, Lutsenko S. Wilson Disease. In: ATP7B function. Elsevier Inc., 2019.
14. Pierson H, Muchenditsi A, Kim BE, et al. The Function of ATPase Copper Transporter ATP7B in Intestine. *Gastroenterology.* 2018; 154(1):168-180.e5. doi:10.1053/j.gastro.2017.09.019
15. Van den Berghe PV, Klomp LW. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr Rev.* 2009; 67(11):658-672. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00250.x
16. Wu F, Wang J, Pu C, Qiao L, Jiang C. Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(3):6419-6431. Published 2015 Mar 20. doi:10.3390/ijms16036419
17. Pilankatta R, Lewis D, Inesi G. Involvement of protein kinase D in expression and trafficking of ATP7B (copper ATPase). *J Biol Chem.* 2011; 286(9):7389-7396. doi:10.1074/jbc.M110.171454
18. Kirk R. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: The ATP7B Gene. Elsevier Inc., 2019.
19. Muchenditsi A, Yang H, Hamilton JP, et al. Targeted inactivation of copper transporter Atp7b in hepatocytes causes liver steatosis and obesity in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017; 313(1):G39-G49. doi:10.1152/ajpgi.00312.2016
20. Barnes N, Tsvikovskii R, Tsvikovskaia N, Lutsenko S. The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum. *J Biol Chem.* 2005; 280(10):9640-9645. doi:10.1074/jbc.M413840200
21. Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J Biol Chem.* 2002; 277(48):46632-46638. doi:10.1074/jbc.M206246200
22. Lutsenko S, Jayakanthan S, Dmitriev OY. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. In: Molecular Architecture of the Copper-Transporting ATPase ATP7B. Elsevier Inc., 2019.
23. Hirst J, Borner GH, Antrobus R, et al. Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the "knocksideways" system. *Curr Biol.* 2012; 22(18):1711-1716. doi:10.1016/j.cub.2012.07.012
24. Barnes N, Bartee MY, Braiterman L, et al. Cell-specific trafficking suggests a new role for renal ATP7B in the intracellular copper storage. *Traffic.* 2009; 10(6):767-779. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00901.x

25. Fu X, Zhang Y, Jiang W, Monnot AD, Bates CA, Zheng W. Regulation of copper transport crossing brain barrier systems by Cu-ATPases: effect of manganese exposure. *Toxicol Sci.* 2014; 139(2):432-451. doi:10.1093/toxsci/kfu048
26. Michalczyk A, Bastow E, Greenough M, et al. ATP7B expression in human breast epithelial cells is mediated by lactational hormones. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56(4):389-399. doi:10.1369/jhc.7A7300.2008
27. Scheiber IF, Brůha R, Dušek P. Pathogenesis of Wilson disease. *Handb Clin Neurol.* 2017; 142:43-55. doi:10.1016/B978-0-444-63625-6.00005-7
28. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1):21. Published 2018 Sep 6. doi:10.1038/s41572-018-0018-3
29. Pal A, Prasad R. Recent discoveries on the functions of astrocytes in the copper homeostasis of the brain: a brief update. *Neurotox Res.* 2014; 26(1):78-84. doi:10.1007/s12640-013-9453-9
30. Langwińska-Wośko E, Litwin T, Dzieżyc K, Karlinski M, Członkowska A. Optical coherence tomography as a marker of neurodegeneration in patients with Wilson's disease. *Acta Neurol Belg.* 2017; 117(4):867-871. doi:10.1007/s13760-017-0788-5
31. Zhuang XH, Mo Y, Jiang XY, Chen SM. Analysis of renal impairment in children with Wilson's disease. *World J Pediatr.* 2008; 4(2):102-105. doi:10.1007/s12519-008-0019-5
32. Weiss KH, Van de Moortele M, Gotthardt DN, et al. Bone demineralisation in a large cohort of Wilson disease patients. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38(5):949-956. doi:10.1007/s10545-015-9815-y
33. Buksińska-Lisik M, Litwin T, Pasiński T, Członkowska A. Cardiac assessment in Wilson's disease patients based on electrocardiography and echocardiography examination. *Arch Med Sci.* 2019; 15(4):857-864. doi:10.5114/aoms.2017.69728

---

Recepționat – 07.01.2022, acceptat pentru publicare – 02.04.2022

**Autor corespondent:** Veronica Cumpătă, e-mail: veronica.cumpataciiorba@gmail.com

**Declarația de conflict de interes:** Autorul declară lipsa conflictului de interes.

**Declarația de finanțare:** Autorul declară lipsa de finanțare.

**Citare:** Cumpătă V. Rolul proteinei ATP7B în homeostazia cuprului și în dezvoltarea bolii Wilson: revista literaturii [The role of ATP7B protein in copper homeostasis and in the development of Wilson's disease: a literature review]. *Arta Medica.* 2022;82(1):16-22.