

**EVALUAREA
EXPRESIEI
GENEI *ATP7B* ÎN LINIILE
CELULARE CHO TRANSGENICE
LA NIVELUL PROTEINEI**

Elena SCVORȚOVA,

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor,
Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

Summary

Assessing the *ATP7B* gene expression in CHO transgenic cell lines at protein levels

Knowledge of how mutations other than p.H1069Q translate into the basic defect in Wilson disease (WD) is scarce due to the low incidence of homozygous index cases. A total of 12 homozygous mutations of *ATP7B*, were examined for their functional activity. Transfected Chinese hamster ovary cells (CHO) was used as a model for predicting the severity of different WD mutations. The results of this research have direct implications for WD diagnosis. Obtained data strongly confirms that phenotypic presentation of the patients is related to the *ATP7B* mutation, providing evidence for genotype – phenotype correlations and can explain in part the variable clinical features observed in patients with WD. The results provided help to highlight the information still needed for understanding the function and malfunction of *ATP7B* and its role in the disease.

Keywords: *ATP7B* gene, mutation, protein.

Резюме

Оценка экспрессии гена *ATP7B* в трансгенных клеточных линиях (CHO) белка

В связи с редкой встречаемостью гомозиготных вариантов мутаций, существует мало информации о влиянии новых мутаций на особенности патогенеза болезни Вильсона-Коновалова (ВК). Была исследована функциональная активность 12 гомозиготных мутаций *ATP7B*. Для прогнозирования тяжести выбранных мутаций *ATP7B* в качестве модели были использованы стабильно трансфицированные клеточные линии (CHO), экспрессирующие *ATP7B*. Полученные данные подтверждают, что фенотипические проявления у пациентов связаны с тяжестью мутаций *ATP7B*, что свидетельствует о корреляции генотипа и фенотипа и может частично объяснить вариабельность клинических признаков, наблюдаемых у пациентов с ВК. Представленные результаты вносят вклад в понимание функции и дисфункции *ATP7B* и его роли в развитии заболевания.

Ключевые слова: ген *ATP7B*, мутация, белок.

Introducere

BW implică pierderea capacității ficatului de a elimina cuprul prin bilă și incorporarea acestui element în proteinele transportoare. Ca urmare, cuprul se acumulează în ficat, creier, cornee și în alte organe.

Gena *ATP7B* codifică o proteină transportoare transmembranară formată din 1465 aminoacizi, care efectuează transportul cuprului sub formă de adenzin trifosfatază de tip P (ATP-ază). Mutațiile la nivelul genei *ATP7B* cauzează o patologie autosomal recesivă – boala Wilson (BW; OMIM # 277900).

S-a estimat că prevalența BW variază de la 1:10.000 în populația din Sardinia (Italia) până la 1:100.000 în Australia, având o frecvență alelică de 0,56% și o frecvență a purtătorilor de aproximativ 1:90. În prezent, sunt descrise cel puțin 600 de mutații ale genei *ATP7B* asociate cu BW (conform bazelor de date ale Universității din Alberta, HGMD) [4, 11].

Debutul clinic al bolii este extrem de variabil. Semnele distinctive ale BW cuprind: acumularea cuprului la nivel hepatic, scăderea concentrației serice a ceruloplasminei cu reducerea simultană a concentrației cuprului în serul sangvin și creșterea acesteia în urină, prezența inelelor corneene Kayser-Fleischer (KF). Diagnosticul pozitiv este uneori dificil, deoarece manifestările menționate pot lipsi sau pot fi puțin pronunțate. În cazurile depistării tardive a BW și tratamentului necorespunzător, boala poate evolua spre un deces timpuriu [5,12].

În prezent, mecanismele moleculare care stau la baza manifestărilor clinice ale BW nu sunt pe deplin cunoscute. A fost sugerat faptul că tipul și localizarea mutațiilor în gena *ATP7B* reprezintă niște factori determinanți pentru fenotipul bolii [12].

În contextul celor relatate, considerăm necesară, suplimentar studiilor clinice, caracterizarea structurală și funcțională a mutațiilor genei *ATP7B*.

Interpretarea variantelor recent depistate poate fi complexă. Există unele metode care ar putea prognoza consecința variantelor cu sens greșit pentru structura și/sau funcția proteinei. Acestea includ algoritmi predictivi de calcul, ce evaluează conservarea, structura și proprietățile biochimice ale variantelor și modelelor structurii 3D a proteinei, comparând efectele formei restante originale cu variantele acesteia la situsul afectat. Cel mai eficient mod de caracterizare a unei variante cu sens greșit este cel prin testare funcțională, deși acesta necesită o perioadă îndelungată de timp.

Metode și materiale

Majoritatea mutațiilor au fost colectate prin studierea bazelor de date Pubmed, Medline, HGMD, UKM. Criteriile de selecție a datelor au inclus: prezența unei mutații *ATP7B* homozigote și disponibilitatea informației clinice, inclusiv

momentul de debut al bolii, și particularitățile clinice. Douăsprezece mutații ale genei *ATP7B* au fost selectate arbitrar din bazele de date publice.

Studiile au fost efectuate folosind cultura de linie celulară obținută din ovar de hamster chinezesc (CHO), care a fost obținută din Colecția germană a culturilor de țesut (DSMZ).

Analiza Western Blot. Totalul de celule lizate ce conțin 20 μg de proteine, după cum s-a determinat prin metoda Bradford [2], au fost separate prin electroforeză în gel de poli-acrilamidă în prezența de sodium dodecil sulfat (SDS-PAGE; poli-acrilamidă 9%), iar apoi transferat pe membranele de nitroceluloză. Membrana a fost blocată o noapte la 4° C, spălată și incubată cu serul de anticorpi policlonali de iepure anti-*ATP7B*. Anticorpii secundari, marcați cu peroxidază (*Sigma*), au fost folosiți în detectare de către ECL (*Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare Life Sciences*). Analiza densitometrică a fost realizată cu ajutorul programului *ImageQuant TL Plus 7.0 (GE Healthcare Life Sciences)*. Expresia relativă a fost normalizată în comparație cu celulele CHO, care exprimau *ATP7B* de tip sălbatic [8, 14].

Rezultate obținute

Scopul acestui studiu a fost de a determina orice modificări potențiale în transportul dependent de cupru al proteinelor mutante *ATP7B*, pentru a înțelege mai bine BW. Printr-o combinație de teste cu acumularea cuprului, teste de culturi celulare, care determină rata de viabilitate a celulelor transfectate și studii de eficacitate la pacienții cu BW, pare a fi posibil în prezent de a face o prognoză cu privire la efectul clinic. *ATP7B* expresat exogen în celulele CHO poate media sechestrarea veziculară a excesului de cupru. Pentru a caracteriza activitatea funcțională a mutațiilor selectate dintre pacienții cu BW, implicații în transportul *ATP7B* reglat de cupru, celulele CHO ce exprimau variante transfectate au fost expuse la niveluri ridicate de cupru. Testul de viabilitate a cuprului măsoară capacitatea variantelor *ATP7B* de a transporta cuprul – o cerință pentru o funcționare normală. Aceste proteine mutante, cu deficiențe din punct de vedere funcțional, în modelul de celule CHO sunt un indicator al unei proteine ce funcționează necorespunzător și care ar putea fi cauza fenotipului BW la pacient.

Au fost identificate mai mult de 250 SNP (polimorfisme uninucleotidice) și 700 de mutații în gena *ATP7B*, care au ca rezultat fenotipul bolii Wilson, și sunt parțial înregistrate în Baza de Date a Mutațiilor Umane (www.hgmd.org). Investigarea indivizilor heterozigoți compuși nu furnizează informații clare despre fenotipul mutației individuale și, în consecință, fenotipul in vivo a unei mutații *ATP7B* poate fi mai bine studiat la homozigoți cu anumite mutații în BW.

Tabelul 1

Sumarul variantelor testate

Mutația	Debut (ani)	Simptome	N. pacienți ¹
E583R-fs, c.1745_1746insT	5	Neurologic	1F
p.R616Q, c.1847G>A	7, 9	Hepatic	2M
p.G691R, c.2071G>A	17	Neurologic	1M
p.T766R, c.2297C>G	8	Neurologic	1M
p.A874V, c.2621C>T	5	Hepa./Neuro.	1M
p.R969Q, c.2906G>A	38,55,13	Neuro./Hepa.	2M, 1F
p.H1069Q, c.3207C>A	25,35,34,27	Hepa./Neuro.	4M
p.L1071W, c.3212T>G	30	Hepatic	1M
p.C1079Y, c.3236G>A	-*	-*	-*
p.I1102T, c.3305T>C	-*	-*	-*
p.T1288R, c.3863C>G	11	Neurologic	1M
p.G1341D, c.4022G>A	11, 12, 12, 16	Neuro./Hepa.	3M, 1F

Notă: ¹Numărul de pacienți de sex feminin și de sex masculin prevăzut în studii.

*Debutul și simptomele sunt extrem de variate, fiind prezentate doar referințe selectate.

Pentru aceasta, au fost selectate și testate funcțional consecințele moleculare ale 12 mutații *ATP7B*, asociate cu BW la celule CHO. Mutațiile *ATP7B* analizate în acest studiu au fost p.E583fs, p.R616Q, p.G691R, p.T766R, p.A874V, p.R969Q, p.H1069Q, p.L1071W, p.C1079Y și p.I1102T, p.T1288R, p.G1341D.

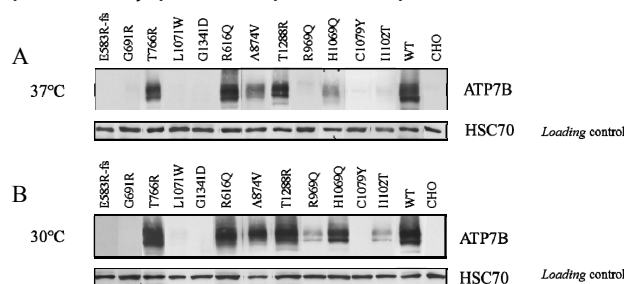


Figura 1. Expresia la nivelul proteinelor specifice a genei *ATP7B* în liniile celulare CHO transgenice, cultivate la o temperatură optimă 37°C (A) și la o temperatură scăzută 30°C (B). Pentru normalizarea rezultatelor s-au folosit HSC-70

Testele Western blot au fost utilizate pentru a confirma expresia variantelor *ATP7B* în liniile de celule CHO. Genele mutante *ATP7B* (tabelul 1) au demonstrat niveluri moderate de *ATP7B* în toate replicările, iar celulele parentale CHO (fără vectori) nu au avut niciun *ATP7B* detectabil (figura 1).

Analizele densitometrice (tabelul 2) în testul Western blot au arătat că proteina specifică *ATP7B*

a fost slab exprimată (<5% de tip sălbatic) în grupa E (E583R-fs, G691R, L1071W și G1341D), cu excepția liniei celulare mutante T766R (37,2±7%). În grupa L (R616Q, A874V și T1288R), a fost înregistrat un nivel relativ ridicat de proteină *ATP7B* – până la 90% ale activității demonstrate de celulele CHO cu gena *ATP7B* de tip sălbatic. În grupa I (R969Q, H1069Q, C1079Y și I1102T), numai linia celulară mutantă H1069Q a arătat nivele moderate (18,5±5%) de expresie a produsului genei *ATP7B*, pe când celelalte trei linii mutante au avut o activitate extrem de slabă (<5% în comparație cu tipul sălbatic).

Tabelul 2

Analiza densitometrică efectuată cu utilizarea programului ImageQuant TL Plus 7.0 (GE Healthcare Life Sciences)

	Mutația	Proteina (%)	
		37°C	30°C
Grupa _E	E583R-fs	0±0	0±0
	G691R	3±0	3±0
	T766R	37±7	76±15
	L1071W	3±1	5±1
	G1341D	2±1	6±3
Grupa _L	R616Q	77±8	78±2
	A874V	35±8	60±7
	T1288R	85±6	90±1
Grupa _I	R969Q	2±1	22±1
	H1069Q	18±5	100±9
	C1079Y	0±0	1±1
	I1102T	3±1	24±1

Determinarea proteinelor a fost evaluată și la o temperatură mai scăzută de circa 30°C, ceea ce permite demonstrarea stabilității proteinelor produse de variantele mutante individuale ale ADN. O creștere ne semnificativă a nivelului de proteină produsă de gena *ATP7B* a fost observată practic în toate liniile celulare mutante, iar mai mare creștere (> 70%) a fost înregistrată în linia celulară mutantă H1069Q. O sporire semnificativă (> 20%) a proteinei produse de gena *ATP7B* a fost atestată la scăderea temperaturii în grupa E (T766R), grupa L (A874V) și grupa I (R969Q, H1069Q și I1102T). În cazul celor 5 linii celulare mutante (E583R-fs, G691R, L1071W, G1341D și C1079Y), care în condiții normale au avut o producție redusă de proteină, scăderea temperaturii mediului nu a influențat semnificativ expresia proteinei produse de gena *ATP7B*.

Determinarea expresiei la nivel de proteină cu ajutorul metodei Western Blot permite diferențierea mai exactă a mutației, conform gradului de manifestare a acțiunii acesteia asupra conformației proteinei native.

Discuții

Una dintre cele mai frecvente și mai bine caracterizate mutații, p.H1069Q, este situată în porțiunea de legare a nucleotidelor din domeniul de legare a ATP (N-domeniu). Caracterizarea biochimică a *ATP7B* recombinant, precum și N-domeniul izolat al *ATP7B* a arătat că această mutație nu modifică semnificativ plierea proteinelor [15, 17] și nici configurația situs-

lui de legare. În același timp, afinitatea N-domeniului pentru ATP este diminuată semnificativ – de aproximativ 20 de ori [15]. Se pare că organizarea generală structurală a proteinelor mutante se păstrează, însă cataliza lor este afectată. Acest lucru este sugerat de fenotipul relativ ușor al bolii la pacienții cu mutații p.H1069Q [7] și activitatea reziduală a omologului *ATP7B* (ATP7A) cu mutație echivalentă [18].

Alte trei mutații bine caracterizate au loc în domeniul evoluționar păstrat de legare a nucleotidelor (p.L1071W, p.C1079Y și p.I1102T). În studiul dat, a fost dovedit că mutația p.I1102T afectează transportul de cupru, dar nu capacitatea variantei proteinei de a lega cuprul. Acest lucru sugerează faptul că aminoacizii din această regiune a *ATP7B* sunt critici pentru formarea structurii terțiare a domeniului de legare a ATP.

N-terminalul citozolic al proteinei *ATP7B* conține un domeniu de legare a cuprului și are șase situsuri asociate cu metale grele, fiecare dintre ele conținând motivul conservat de legare a metalelor GMTCCXC și acceptând cuprul de la ligandul cuprului Atox1 [12, 13], Murr1/Commd1 [16]. Legarea cuprului induce schimbări secundare și terțiare conformaționale. Pentru funcția de transport este necesar domeniul de legare a metalului cel mai apropiat de membrană (al cincilea și al șaselea situs de legare a metalelor), în timp ce situsurile mai distale de legare a cuprului (Cu1, C2, Cu3 și Cu4) joacă un rol de reglare [1, 3, 9, 10]. Două dintre mutații au loc în cel de-al șaselea motiv de legare a Cu (p.R616Q și p.E583fs) al *ATP7B* și s-au dovedit a fi variante blânde și nocive, respectiv p.E583fs reprezintă o modificare a unei singure baze prin inserție/duplicație (c.1745dupT sau c.1745_1746insT), ducând la un codon de oprire prematură a translării, și codifică o proteină nefuncțională trunchiată, probabil degradată printr-un mecanism de descompunere nonsens-mediat (NMD). Cea de-a doua mutație (p.R616Q) în Cu6 a fost inițial descrisă ca o mutație homozigotă la doi pacienți diferiți cu debut tardiv și clinică ușoară (tabelul 1) [11].

Substituția p.A874V se găsește în domeniul de transducție (Td) și substituția cu valină poate preveni modificările conformaționale presupuse ale domeniului transmembranar, necesare pentru a iniția transportul extern din rețeaua Golgi ca răspuns la cupru, sau poate perturba semnalul cu direcționare ipotetică membranară.

Următoarele patru dintre mutațiile homozigote se găsesc în/între domeniile transmembranare ale *ATP7B* la pacienții cu BW: p.G691R (TM2), p.T766R (TM4), p.R969Q (TM5/TM6) și p.G1341D (TM7) (tabelul 2).

Datele obținute sugerează faptul că modificările în domeniile TM joacă un rol important în integritatea structurală a proteinei și se pare că mutațiile din regiunea TM duc la o formă mai severă a bolii și la un debut la o vârstă mai fragedă. În subgrupul de pacienți cu mutații p.L1071W, p.C1079Y și p.H1069Q, ce afectează N-domeniul de legare a ATP, a fost găsită o probabilitate semnificativ mai mare de simptome neurologice în avansare și ar putea fi postulat faptul că mutațiile în N-domeniul de legare a ATP sunt

asociate cu modificări neurologice și psihiatrice. De asemenea, există o corelație puternică între manifestarea hepatică și prezența mutațiilor p.G691R și p.T1288R. Se pare că diferite mutații ale genei *ATP7B* sunt asociate cu diferite prezentări clinice.

Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că o parte din mutații au fost specifice grupului sau regiunii, astfel concluziile nu pot fi aplicabile în totalitate pentru toate grupurile etnice. Nicio diferență semnificativă nu a fost găsită pentru parametrii clinici la pacienții cu o mutație situată în domeniile de legare și de transducție (TD) a Cu, comparativ cu cele cu o mutație situată în altă parte.

Concluzii

1. În funcție de manifestarea dereglărilor funcționale ale proteinelor codificate, aceste 12 mutații au fost grupate în:

- grupa E (*early*), care cuprinde mutații ce duc la dereglări pronunțate ale funcției *ATP7B*, cu debut timpuriu/brusc al BW (E583R-fs, G691R, T766R, L1071W și G1341D);
- grupa L (*late*) – mutații caracterizate prin dereglări nesemnificative ale funcției *ATP7B*, cu debut tardiv (R616Q, A874V și T1288R);
- grupa I (*intermediate*) – conține mutații (R969Q, H1069Q, C1079Y și I1102T) care nu posedă legitați precise în manifestarea lor și care au fost observate la pacienții cu un debut intermediar al BW.

2. Determinarea nivelului expresiei genei *ATP7B* la etapa de translație prin analiza electorforetică a probelor în sistem SDS/PAGE și evidențierea colorimetrică a expresiei proteice, utilizând anticorpi primari policlonali, permit diferențierea mai exactă a mutațiilor conform gradului de manifestare a acțiunii lor asupra conformației proteinei native. Analizele densitometrice au arătat că:

- în grupa E (E583R-fs, G691R, L1071W și G1341D), proteina specifică *ATP7B* a fost slab exprimată (<5% de tip sălbatic), cu excepția liniei celulare mutante T766R ($37,2 \pm 7\%$);
- în grupa L (R616Q, A874V și T1288R), a fost înregistrat un nivel relativ ridicat de proteină *ATP7B*: până la 90% ale activității demonstrate de celulele CHO cu gena *ATP7B* de tip sălbatic;
- în grupa I (R969Q, H1069Q, C1079Y și I1102T), numai linia celulară mutantă H1069Q a arătat nivele moderate ($18,5 \pm 5\%$) de expresie a produsului genei *ATP7B*, în timp ce celelalte trei linii mutante au avut o activitate extrem de slabă (<5% în comparație cu tipul sălbatic).

3. Deși manifestarea fenotipică a BW la pacienții homozigoți după gena studiată este determinată de efectul cumulativ al unor factori modificatori necunoscuți, datele obținute sugerează că secvența de aminoacizi a proteinei *ATP7B* poate prezice debutul bolii la pacienți.

Bibliografie

1. Achila D., Banci L., Bertini I., et al. *Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, nr. 103, p. 5729–5734.

2. Caca K., Ferenci P., Kuhn H.J., et al. *High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis*. In: Journal of hepatology, 2001, nr. 35, p. 575–581.
3. Cater M.A., Forbes J., La Fontaine S., et al. *Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites*. In: Biochem. J., 2004, nr. 380, p. 805–835.
4. Dmitriev O., Tsivkovskii R., Abildgaard F., et al. *Solution structure of the N-domain of Wilson disease protein: distinct nucleotide-binding environment and effects of disease mutations*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, p. 5302–5307.
5. Ferenci P., Czlonkowska A., Yurdaydin C., et al. *Late-Onset Wilson's Disease*. In: Gastroenterology, 2007, nr. 132, p. 1294–1298.
6. Firneisz G., Lakatos P.L., Szalay F., et al. *Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary*. In: Am. J. Med. Genet., 2002, nr. 108, p. 23–28.
7. Gromadzka G., Schmidt H.H., Genschel J., et al. *p.H1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease*. In: Mov. Disord., nr. 21, 2006, p. 245–248.
8. Gromadzka G., Schmidt H.H., Genschel J., et al. *Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease*. In: Clin. Genet., 2005, nr. 68, p. 524–532.
9. Guo Y., Nyasae L., Braiterman L.T., Hubbard A.L. *NH2-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells*. In: Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., nr. 289, 2005, p. 904–916.
10. Huster D., Lutsenko S. *The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein*. In: J. Biol. Chem., nr. 278, 2003, p. 212–218.
11. Kusuda Y., Hamaguchi K., Mori T., et al. *Novel mutations of the ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease*. In: J. Hum. Genet., 2000, nr. 45, p. 86–91.
12. La Fontaine S., Theophilos M.B., Firth S.D., et al. *Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase*. In: Hum. Mol. Genet., 2001, nr. 10, p. 361–370.
13. Larin D., Mekios C., Das K., et al. *Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p*. In: J. Biol. Chem., nr. 274, 1999, p. 497–504.
14. Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y., Dmitriev O.Y. *Function and regulation of human copper-transporting ATPases*. In: Physiol. Rev., 2007, nr. 87, p. 1011–1046.
15. Morgan C.T., Tsivkovskii R., Kosinsky Y.A., et al. *The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F*. In: J. Biol. Chem., nr. 279, 2004, p. 363–371.
16. Tao T.Y., Liu F., Klomp L., et al. *The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein*. In: J. Biol. Chem., nr. 278, 2003, p. 593–596.
17. Tsivkovskii R., Efremov R.G., Lutsenko S. *The role of the invariant His-1069 in folding and function of the Wilson's disease protein, the human copper-transporting ATPase ATP7B*. In: J. Biol. Chem., nr. 278, 2003, p. 302–308.
18. Voskoboynik I., Mar J., Camakaris J. *Mutational analysis of the Menkes copper P-type ATPase (ATP7A)*. In: Biochem. Biophys. Res. Commun., nr. 301, 2003, p. 88–94.

Prezentat la 9.12.2013