



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXVI

TITOLO TESI

**Studio del Promoter ATP7B.
Ruolo potenziale nella variabilità fenotipica
presente nella malattia di Wilson.**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza
Bio/11

Presentata da: Mameli Eva
Coordinatore Dottorato: Prof. Paolo Moi
Tutor/Relatore: Prof. Paolo Moi - Dr. Georgios Loudianos

Esame finale anno accademico 2012 - 2013

INDICE

Introduzione.....	4
Il promotore di un gene	6
Posizione del Promotore.....	7
Importanza delle mutazioni nel Promoter	7
Promoter Polimorfici	7
Tecniche per l'analisi del Promoter.....	8
Saggi funzionali del Promoter	9
Il Promoter del gene ATP7B.....	11
Cenni sulla malattia di Wilson	14
Patogenesi.....	14
Genetica.....	17
Materiali e metodi.....	18
Polymerase chain reaction (PCR).....	21
Clonaggio.....	22
Sequenziamento.....	24
Studi di espressione.....	25
Obiettivo dello studio.....	28
Risultati.....	28
Discussione.....	37
Bibliografia.....	43

Introduzione

La regolazione dell'espressione genica è un processo molto complesso dove tutti i passaggi sono regolati a vari livelli, tra cui il confezionamento della cromatina, la modificazione degli istoni, l'iniziazione di trascrizione, la poliadenilazione del RNA, lo splicing pre-mRNA, la stabilità del mRNA e l'inizio della traduzione. Tuttavia, si crede che una parte importante della regolazione avvenga a livello di inizio della trascrizione (1). Fattori di trascrizione TF_s ed enzimi per la modifica della cromatina si uniscono per attivare i geni e vengono reclutati in un ordine preciso da parte dei promotori. Per i promotori i tempi dell'attivazione della trascrizione e l'assunzione ordinata dei fattori sono i motori che, al momento giusto e per la giusta durata di tempo, conducono la regolazione trascrizionale di ciascun gene per tutta la vita della cellula (2). Il fallimento in tempo o nell'assunzione di TF possono interessare la regolazione trascrizionale di un gene, portando putativamente alla malattia. La regione promotrice di un gene (regione di circa 5kb a monte del Transcription Start Site) è forse la regione regolatrice più semplice e potenzialmente la più importante, in quanto nella regione promotrice di molti geni è presente una quantità sufficiente di siti di legame per i fattori trascrizionali che modulano direttamente la corretta espressione genica (3). Nella regione centrale del promoter sono presenti delle sequenze consensus come la TATA box, riconosciuta come la regione che facilita l'attacco della RNA polimerasi II, l'enzima che dà inizio alla trascrizione; nei promoters umani, questa regione è spesso assente e l'RNA polimerasi II utilizza altri siti per iniziare correttamente la trascrizione (4). Infatti, nel promoter esistono altri elementi in grado di adempiere questo compito come: l'inziatore (Inr), l'elemento a monte del promoter (DPE) e l'elemento di riconoscimento di TFIIB (BRE). Questi elementi vengono riconosciuti da diversi fattori trascrizionali indicati genericamente con TFII seguito da una lettera diversa che indica i diversi fattori (5). Nella fase iniziale della trascrizione TFIID, formato dalla TBP (TATA Binding Protein) associata a fattori TAF (TBP Associated Factors) (5), si deve legare al DNA con o senza la presenza di una TATA box; TFIID è legato anche al fattore TFIIA, fattore che indirettamente permette il legame tra TFIID e DNA, successivamente TFIIB si lega a TFIID seguito dall'attacco dell'RNA polimerasi II in associazione con TFIIF, infine si uniscono al complesso TFIIE e TFIIH (5). TFIIH è un fattore composto da diverse subunità, una di queste è una proteina chinasi che fosforila sequenze ripetute presenti nel dominio C-terminale della subunità più grande della RNA polimerasi II. La fosforilazione di queste sequenze rilascia la polimerasi dalla sua

associazione con il complesso iniziale, permettendole di procedere lungo lo stampo e allungare la catena di RNA in formazione. La distruzione di questi siti di legame per i fattori di trascrizione (TFBS) potrebbe avere degli effetti negativi sulla trascrizione (5). Nella regione centrale e prossimale del promoter è possibile che siano presenti polimorfismi che hanno una certa influenza sull'espressione genica (6, 7). Le mutazioni del promotore sono conosciute per causare funzionalmente conseguenze importanti per l'espressione genica, ma non tutte le variazioni di sequenza del promotore colpiscono la regolazione trascrizionale. A seconda della posizione e della natura del difetto genetico, una mutazione nella regione promotrice di un gene potrebbe perturbare i normali processi di attivazione del gene disturbando l'assunzione ordinata di TF da parte del promotore. Come risultato una mutazione nel promotore può diminuire o aumentare il livello di mRNA e quindi di proteina. Nonostante l'analisi del promotore sia una parte essenziale della diagnosi di malattie causate da mutazioni nel Promotore e migliori la comprensione del ruolo della regolazione trascrizionale nella malattia umana, non è una normale parte della diagnostica del DNA (8) perché l'analisi di mutazione nel promotore è complessa, spesso laboriosa e difficile da eseguire.

Inoltre, essendo un'analisi complessa, che richiede saggi laboriosi e difficili da eseguire per indagare sulla relazione funzionale tra la mutazione e la malattia, studi approfonditi sulle mutazioni del promotore sono scarsi e spesso confinati ai laboratori di ricerca. Per questo motivo sarebbe opportuno che laboratori di routine e gruppi di ricerca specializzati nella ricerca del gene promoter cooperassero per ampliare le conoscenze generali e la diagnosi dei difetti del gene-promotore (8).

Il promotore di un gene

Il promotore, è una regione di DNA regolatrice, situato a monte di un gene e svolge un ruolo importante nella regolazione trascrizionale. Il nucleo del promotore, una regione vagamente definita (approssimativamente tra i nucleotidi - 40 e + 50 dal sito di inizio della trascrizione [TSS]), dirige il basso livello di trascrizione e contiene siti di legame per TF_s generali e RNA polimerasi II. I TF generali, come TFIID, TFIIA e TFIIB si riuniscono sul nucleo promotore in un modo ordinato per formare un' iniziazione di trascrizione complessa, che dirige l' RNA polimerasi II del TSS (sito di inizio trascrizionale) (9). Il nucleo promotore può anche contenere altri elementi come la TATA box, che è il sito di legame per una subunità di TFIID. La TATA box ha il consenso-vincolante per la sequenza 5'-tataaa-3' ed è caratteristica dei geni tessuto-specifici, l'espressione di essa è limitata ad un numero limitato di cellule (10). L' assemblamento dei TFs generali sul nucleo promotore è sufficiente per dirigere bassi livelli di trascrizione, un processo generalmente indicato come trascrizione basale. L' attività trascrizionale è fortemente stimolata da una seconda classe di TFs, chiamata attivatori. In generale, gli attivatori sono sequenze-specifiche di DNA-legante proteine i cui siti di riconoscimento sono presenti nel promotore prossimale. Il promotore prossimale è la regione immediatamente a monte, fino a qualche centinaio di paia di basi, dal nucleo promotore, e contiene in genere più siti di legame per i TF_s (1). In contrasto con il nucleo e il promotore prossimale, gli Enhancers, detti anche esaltatori, sono sequenze di DNA che possono trovarsi al 5' o al 3', all'interno di un esone o introne di un gene con funzione di ausilio nel controllo della trascrizione esercitata dal promoter. La funzione dell' enhancer è per definizione indipendente dalla posizione e dall'orientamento. Gli enhancers non contengono molti motivi di sequenza distintive, pertanto essi non possono essere facilmente identificati sulla sola base della loro sequenza di DNA. Altri elementi specifici di sequenza sono i Silenziatori che conferiscono un effetto negativo, tacendo o reprimendo la trascrizione di un gene. Essi hanno in genere le caratteristiche simili agli enhancers. Sono state descritte molte classi di TFs, che possono essere distinte dalle altre dai diversi domini di DNA-leganti. **Esempi di famiglie di attivatori comprendono quelli contenenti un zinc finger ricco in cisteina, homeobox, helix-loop-helix, basic leucine zipper, forkhead, o dominio ETS-DNA-binding (9).** I siti TF-leganti (TFBS) sono generalmente piccoli, con un intervallo di 6-12 bp, anche se la specificità di legame è solitamente dettata da non più di 4-6 posizioni all'interno del sito (1). Il TFBS per un attivatore

specifico è pertanto tipicamente descritto da una sequenza di consenso in cui alcune posizioni sono relativamente limitate, mentre altri sono più variabili.

Posizione del Promotore

L' identificazione del promotore di uno specifico gene è molto difficoltosa, perché i principali promotori spesso sono situati più a monte del primo esone codificante. Inoltre, almeno metà dei geni di mammifero sono regolati da più di un promotore, questo per consentire una regolamentazione tessuto-specifica (11). Recentemente sono stati identificati i promotori di molti geni e caratterizzati alcuni dei più importanti TFBSs (1). Recentemente, regioni 5' non tradotte hanno dimostrato di contenere diversi elementi regolatori critici (12, 13). Pertanto appare opportuno iniziare lo screening immediatamente a monte del sito di inizio della traduzione (che inizia con la sequenza nucleotidica ATG). La valutazione delle registrazioni nel database Human Gene Mutation (HGMD) (14) rivela che le maggiori mutazioni regolatrici sono state individuate e registrate, esse sono situate tra i nucleotidi +50 e -500 dal TSS di un gene.

Importanza delle mutazioni nel Promoter

Le mutazioni nel promotore possono alterare o sopprimere la capacità di legame di motivi di sequenza di DNA-cis-agente e trans-agente per i fattori proteici che normalmente interagiscono con essi (15). Tuttavia, il totale delle mutazioni del promotore e il contributo delle mutazioni che causano la malattia non è ben chiaro. Le mutazioni del promotore possono causare piccoli difetti quantitativi, che possono essere difficili da rilevare. Anche se il promotore di un gene autosomico è completamente sotto regolato a seguito della mutazione, la metà della quantità di proteina normale è presente, e spesso è sufficiente a prevenire una grave malattia (8).

Promoter Polimorfici

Il genoma umano contiene meno geni codificanti proteine di quanto generalmente previste (16), questo ha portato a pensare che le cause genetiche di suscettibilità nei disordini complessi possono essere conseguenza di spettri diversi di variazioni di sequenza come mutazioni missense e nonsense che dominano i più semplici disordini genetici. Questa ipotesi è avvalorata da studi quantitativi su organismi più semplici (17, 18) ed anche da studi molecolari su malattie umane complesse (19, 20). Tra i diversi spettri di varianti che conferiscono suscettibilità ad una

malattia complessa, i polimorfismi che alterano l'espressione genica sono sospettati avere un ruolo fondamentale (21). I polimorfismi, frequentemente detti Single Nucleotide Polymorphism o SNPs, sono variazioni di sequenza che implicano la sostituzione di una singola base o la delezione di una o poche basi; questa terminologia è usata in funzione della frequenza con cui il polimorfismo compare nella popolazione o dal numero di basi coinvolte (22). I polimorfismi che hanno una certa influenza sull'espressione genica è possibile che risiedano nella regione centrale e prossimale del promotore e quelli che si verificano nel promotore possono influenzare l'espressione genica e potenzialmente possono avere significato fenotipico o anche patologico (15). Attuali indagini epidemiologiche, in cui grandi quantità di SNPs sono studiati in relazione alla malattia, stanno rivelando un numero considerevole di putativi SNPs promotore funzionali. Tuttavia, un legame di causalità tra i polimorfismi del promotore e la malattia è spesso assente, perché generalmente questi studi mancano di saggi funzionali nel promotore (8).

Gli SNPs, rappresentano circa il 90% delle variazioni genetiche umane, si presentano ogni 100-300 basi lungo l'intero genoma umano (23, 24). Si pensa che il genoma umano abbia circa un milione di SNPs dislocati tra le regioni codificanti, negli introni e nei promoter; è stata fatta un'ipotesi sul loro ruolo e si ritiene che oltre ad essere responsabili della comparsa di alcune malattie, in alcuni casi possano anche influenzare la risposta ai farmaci (25). Gli SNPs nei geni codificanti proteine possono influenzare il fenotipo in due modi, cambiando la qualità o la quantità della proteina codificata (22). Questi cambiamenti sono trasmessi dal gene alla proteina attraverso l'mRNA. Il primo cambiamento è rappresentato da modificazioni riguardanti la sequenza che codifica l'mRNA mentre il secondo è rappresentato dalla quantità di mRNA codificante, o nella quantità di mRNA tradotto in proteina (22).

Ad ogni modo si conosce un numero limitato di SNPs che esercitano un effetto sulla stabilità e sulla traduzione dell'mRNA, mentre sono note circa un centinaio di variazioni di sequenza che incidono sulla trascrizione in vitro (26) e la loro presenza è stata messa in evidenza con metodi in vivo (27, 28).

Tecniche per l'analisi del Promoter

Per indagare sul promoter, un primo passo da compiere è quello di verificare se una variazione di sequenza identificata nel promotore è nota, se è associata a una malattia e se precedentemente è stata caratterizzata funzionalmente. Spesso nei database non sono catalogati i polimorfismi del DNA a meno che non mostrino sufficientemente forte associazione fenotipica (29). Il passo successivo è quello di utilizzare analisi in silico per indagare se la variazione di sequenza interrompe o crea un TFBS putativo. I dati sperimentali riguardano specifici siti di legame, i meglio caratterizzati sono i TFs e i dati ottenuti sono stati raccolti in database come TRANSFAC (30). Nei database determinati sperimentalmente vengono utilizzati TFBSs per calcolare un punteggio di probabilità sui nucleotidi in una specifica posizione del TFBS consenso (matrice sito). Programmi come TESS (software di ricerca elemento trascrizione) (31) sono atti a confrontare una potenziale sequenza genomica con tutte le matrici in TRANSFAC e segnalare una lista di potenziali TFBSs sulla base di una corrispondenza statistica tra una regione della sequenza e un sito della matrice. Tuttavia questa analisi è spesso ingombrata dalla previsione di un gran numero di TFBSs putativi, una frazione significativa che non sarà coinvolta nella regolazione trascrizionale del gene. Questa situazione può essere attribuita alla qualità dei dati utilizzati per costruire le matrici TFBS (32) e alle discrepanze che si verificano a causa dell' assenza o dell' inattività in vivo di un TF o di un cofattore, oppure alla presenza di locale cromatina condensata (33). In aggiunta al problema dei falsi positivi, si deve tener conto anche della non completezza dei database, data dalla ancora non completa identificazione di tutti i TFs- DNA-binding, e per alcuni fattori noti, la non completa caratterizzazione della specificità di legame (1). Per studiare la rilevanza funzionale putativa di una variazione di sequenza del promotore si utilizza il confronto tra l' impronta filogenetica, la sequenza di interesse e la regione omologa in altre specie. Alla base di questo processo la logica è che i nucleotidi all'interno dei siti di legame hanno più probabilità di essere conservati dalla selezione naturale. Anche se vi è abbondante evidenza che le regioni conservate siano sufficienti, infatti, spesso possono contenere motivi regolatori funzionali; ma questa correlazione non sempre esiste, perché fra le specie non tutti TFBSs sono conservati.

Infine, alcuni dei più importanti elementi regolatori trascrizionali pertinenti al normale sviluppo umano e alla malattia possono non essere altamente conservati. Tale conservazione può essere limitata solo a esseri umani o a parenti primati (1).

Saggi funzionali del Promoter

Una mutazione nel promotore che causa la malattia putativamente deve essere caratterizzata per valutare il rapporto delle variazioni di sequenza nel DNA in relazione alla malattia. Una corretta analisi richiede la prova che in vitro la mutazione alteri significativamente l'attività del promotore (8). Uno dei test funzionali più versatili si basa sull'uso di saggi nel gene reporter nei quali la regione di DNA da testare per l'attività regolamentare viene clonata in un plasmide a monte di un gene reporter facilmente valutabile, come i geni codificanti per cloramfenicolo acetiltransferasi, β -galattosidasi, proteina verde fluorescente, o luciferasi (34). I wild-type risultanti e i costrutti mutanti vengono poi trasfettati (transitoriamente o stabilmente) in cellule di coltura e si misura l'attività del gene reporter per determinare se la mutazione del promotore altera l'espressione del gene reporter. La cotrasfezione di un plasmide reporter di controllo viene usata per correggere l'efficienza di trasfezione all'interno o tra esperimenti di trasfezione. Una delle limitazioni è che gli elementi regolatori possono essere ampiamente dispersi e difficili da trovare in un DNA plasmidico posto in un ambiente artificiale, che può portare all'inattività o disregolazione di elementi di regolamentazione (35). Un altro inconveniente è che in vivo l'attività di un gene reporter può non riuscire a riprodurre il pattern di espressione del suo equivalente endogeno a causa di differenze nel contesto della cromatina; infine, un dato elemento di regolazione a monte può essere utilizzato praticamente solo per scopi limitati, come quelli specifici per alcuni tessuti o stadi di sviluppo. Se il sistema di coltura cellulare utilizzato per saggiare l'attività del gene reporter non corrisponde alle condizioni fisiologiche, sotto le quali l'elemento di regolazione è normalmente attivo, non possono essere rilevate differenze tra l'attività del promotore wild-type e i costrutti mutanti (1). Nonostante le limitazioni, le analisi del gene reporter rimangono i mezzi più accurati a disposizione per studiare le conseguenze funzionali di una mutazione del promotore.

Oltre ai saggi funzionali del promotore, è essenziale dimostrare che l'interazione di un TF putativo con la sequenza di DNA di interesse è influenzata dalla mutazione del promotore (36). Sono stati utilizzati diversi metodi in vitro per l'individuazione e caratterizzazione di interazioni proteina-DNA, compreso il saggio di spostamento della mobilità (mobility shift) elettroforetica (EMSA) e saggi DNase I-footprinting. EMSA è il test più utilizzato comunemente, principalmente perché fornisce una tecnica estremamente sensibile e

relativamente semplice e rapida, per la rilevazione e la caratterizzazione di specifiche interazioni proteina-DNA (37). Il test EMSA si basa sul principio che un complesso proteina-DNA attraverso un gel nativo migra più lentamente rispetto al corrispondente DNA libero. Proteine entro un estratto nucleare che specificamente riconosce una data sequenza del promotore possono essere identificate incubando con l'estratto una piccola sonda di DNA radiomarcata per consentire la formazione di complessi proteina-DNA. L'applicazione della miscela di un gel di poliacrilammide nativo e successiva elettroforesi, separerà la sonda libera radiomarcata dalle molecole proteiche-legate (36). DNA libero e complessi DNA-proteina vengono poi rilevati da analisi di autoradiografia o phosphorimager. Le differenze di legame nel pattern tra la wild-type e le sonde mutanti radioattive sono indicative dell'interagire dei TFs con la sequenza di DNA di interesse. Per verificare la specificità delle interazioni DNA-proteina sono stati utilizzati studi di competizione con wild-type non marcato e sonde mutanti competitive. Da non molto tempo è possibile eseguire il test EMSA senza la necessità di sonde radiomarcate. Il candidato TF putativo può essere ulteriormente identificato attraverso l'uso di un anticorpo diretto contro questa proteina. Dopo l'elettroforesi, a causa del legame dell'anticorpo al complesso DNA-proteina la migrazione risulta più lenta oppure si può avere la completa scomparsa del complesso DNA-proteina (Saggio Supershift). Per evitare che una proteina sconosciuta interagisca con la sequenza di DNA di interesse, precedentemente è necessario eseguire esperimenti di purificazione delle proteine. Il test EMSA è vantaggioso perché è analiticamente sensibile e può rivelare uno specifico complesso proteina-DNA anche quando la proteina è presente in basse concentrazioni. Per questo test, costituisce uno svantaggio il fatto che l'interazione proteina-DNA deve essere mantenuta durante l'elettroforesi su gel e alcuni complessi proteina-DNA non sono sufficientemente forti per durare nel tipico periodo di tempo di elettroforesi da 2 a 4 h. Inoltre, le sonde devono essere sufficientemente lunghe per sostenere la formazione di interazioni stabili proteina-DNA e relativamente grandi concentrazioni di DNA aspecifico concorrente, spesso per aumentare la specificità sono necessari concorrenti non specifici, uno dei più potenti e probabilmente il più usato è il polimero sintetico poli (dI: dC) [deoxyinosinic-deoxycytidylic] (36).

Il Promoter del gene ATP7B

La regione 5' UTR, localizzata a monte del gene ATP7B (Fig. 1), è stata isolata, sequenziata e caratterizzata. In questa regione sono stati messi in evidenza:

- una CAAT-box (38, 39);
- una TATA-box (38, 39);
- tre E-box (38, 39);
- isole CpG, dove la somma tra le citosine e le guanine è del 65,4% (39, 40, 41);
- diversi potenziali siti di legame per i fattori di trascrizione (Sp1, Ap1, Ap2, HNF-1, HNF-3, CTF-NF-1, C/EBP) (38, 39);
- quattro regioni MRE (Metal Response Element) (38, 39);
- sei sequenze MLS (Multiple MRE Like Sequenze) (38, 39);

Le quattro regioni MRE (MREa; MREc; MREd; MREe), sono costituite da una regione consensus TGCRNC dove R è una purina A o G ed N è un nucleotide qualsiasi (41), sono state trovate anche nel promoter del gene MT (vertebrate metallothionein) come regioni fortemente influenzate dei metalli pesanti (42).

Questo dato indica che il rame e altri metalli pesanti sono importanti nella regolazione dell'espressione genica e sottolinea che, nei geni regolati da metalli, la risposta al metallo è indipendente dalla posizione o dall'orientamento della regione MRE (43). Questo sembra che si verifichi anche nel gene ATP7B, dove MRE potrebbe rappresentare un sito di legame per i fattori di trascrizione metallo-dipendenti giocando un ruolo importante nel controllo dell'attività trascrizionale del gene della malattia di Wilson. Le sei sequenze MLS (indicate con la numerazione da 1 a 6) differiscono dalla sequenza consensus degli MRE per uno o due nucleotidi, questa similitudine riflette anche un'analogia funzionale tra MREs e MLSs (38). Studi funzionali attraverso il saggio del gene reporter sul promoter del gene ATP7B, hanno dimostrato che i costrutti che non presentavano MLS2, MLS3, Sp1 e la CAAT-box, mostravano una diminuzione dell'attività del promoter del 50%. Questo indica un effetto regolatore positivo di MLS2 e MLS3 che sono considerate come sequenze fortemente candidate al mantenimento della normale attività del promoter del gene della malattia di Wilson (38). Con l'utilizzo di un gene reporter sono state studiate anche le regioni MRE, per capire in che modo potessero influire sull'attività del promoter del gene ATP7B. I risultati hanno messo in evidenza che, fra tutte le quattro regioni, variazioni di sequenza in prossimità di MREa risultano in una marcata diminuzione dell'attività del promoter, mentre, variazioni di sequenza negli altri MREs non

mostrano significativi cambiamenti, questo dimostra che MREa produce il maggiore effetto sull'attività del promoter. Inoltre, diversi studi hanno riportato che, l'MREa nel gene MT possiede una certa attività regolatoria trascrizionale e che diversi fattori trascrizionali nucleari interagiscono specificatamente con MREa. Queste scoperte suggeriscono che le proteine attivatrici della trascrizione che regolano l'espressione del gene ATP7B potrebbero legarsi a MREa (44). Va evidenziato che altri MREs e altre MLSs potrebbero avere effetti regolatori (come ad esempio MLS6 e MREd che si trovano in una regione a valle del sito d'inizio della trascrizione). Studi futuri potrebbero chiarire meglio la loro rilevanza trascrizionale o post-trascrizionale (38). In particolare, nel promoter del gene ATP7B in prossimità di MLS6 e MREd, sono state trovate due rare variazioni di sequenza: la -224G>A in MREd e la -247A>C in MLS6.

Cenni sulla malattia di Wilson

La malattia di Wilson fu descritta per la prima volta da Kinnear Wilson nel 1912 come “degenerazione progressiva epatolenticolare” (45) . Nel 1921 Hall descrisse i sintomi epatici e dimostrò l’ereditarietà della malattia, successivamente definita da Bearn nel 1960 autosomica recessiva (46). La sua incidenza varia da 1 su 30.000 a 1 su 100.000 individui con una frequenza di portatore di 1 su 90 (45). La malattia di Wilson è un raro disordine del trasporto del rame dato da un difetto nel gene ATP7B, localizzato sul cromosoma 13q14-21, che codifica per una proteina di membrana ATP7B, espressa principalmente nel fegato dove regola il trasporto del rame (47). Mutazioni nel gene ATP7B causano un difetto di escrezione del rame epatico con un accumulo tossico di rame prima nel fegato dove può causare epatite e cirrosi; in seguito il rame rilasciato nel sangue si deposita in altri organi come il cervello causando danni neurologici, nella cornea, nei tubuli renali, e in altri organi (48). I sintomi clinici possono essere vari ma principalmente sono di tipo epatico e neurologico e possono manifestarsi in età variabile, dai primi anni di vita fino a oltre i cinquanta.

Patogenesi

Il rame è un oligoelemento essenziale e insostituibile per numerosi enzimi fondamentali per la respirazione cellulare, per la protezione dai radicali liberi, per la sintesi del tessuto connettivo, per il metabolismo del ferro e per l’amidazione dei peptidi (49). Il rame alimentare viene assorbito attraverso lo stomaco e il duodeno, e per mezzo della vena porta arriva al fegato dove viene utilizzato per la sintesi di vari enzimi, mentre l’eccesso viene eliminato attraverso le vie biliari (50).

L’omeostasi del rame dipende dunque dal bilancio tra l’assorbimento intestinale e la sua escrezione in forma non assorbibile.

Negli epatociti l’ingresso del rame avviene attraverso la membrana basolaterale per opera di una proteina di membrana Ctr1. Dopo l’ingresso, il rame viene immediatamente legato da diverse proteine, i metallochaperoni, e trasportato in diversi siti per il suo utilizzo (50). In condizioni fisiologiche la quantità di rame libero nel fegato é molto esigua. Tra i chaperoni, l’Atox1, é essenziale per il trasporto del rame nella via secretoria attraverso l’interazione con la proteina ATP7B (48).

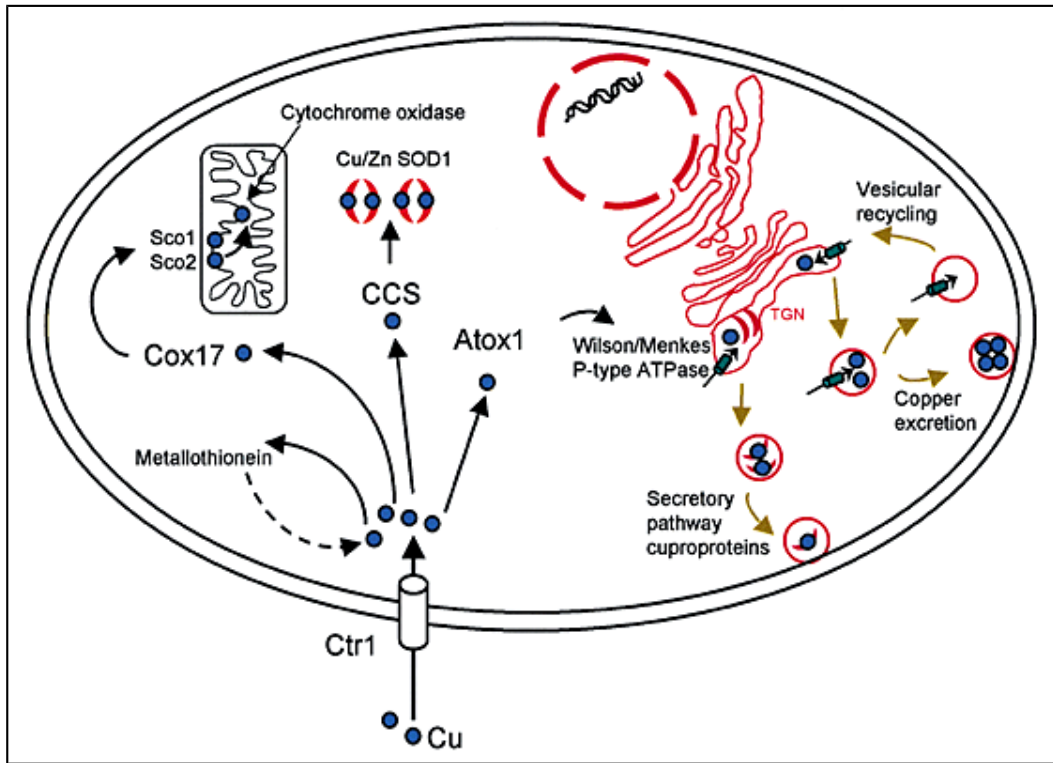


Figura 2. Trasporto del rame nella cellula.

La proteina ATP7B appartiene ai trasportatori di metalli pesanti attraverso le membrane, utilizzando l'energia liberata dall'idrolisi del fosfato terminale dell'ATP, per questo è denominata P-type ATPasi (51,47, 52), ha una struttura costituita da 8 regioni transmembrana e diversi domini funzionali (52); 6 domini di legame del Rame (copper binding domains), 1 dominio di transduzione ITGEA coinvolto nella transduzione dell'energia proveniente dall'idrolisi dell'ATP, 1 sequenza (CPC) invariata in tutti i trasportatori di metalli pesanti dove si lega il Rame prima di attraversare la regione Tm6 considerata essere il canale degli ioni,

1 grande loop citoplasmatico il dominio dei legami dell'ATP che contiene i siti di legame dell'ATP, 1 dominio di fosforilazione DKTGT altamente conservato con la presenza di un acido aspartico che lega il fosfato terminale dell' ATP per dare avvio alle conformazioni che permettono il normale funzionamento della proteina, 1 sequenza altamente conservata (SEHPL) sede della mutazione più comune identificata in pazienti con la WD (52), 1 dominio altamente conservato GDGVND che costituisce la regione cerniera con la regione transmembrana 7.

Wilson Disease P-Type ATPase

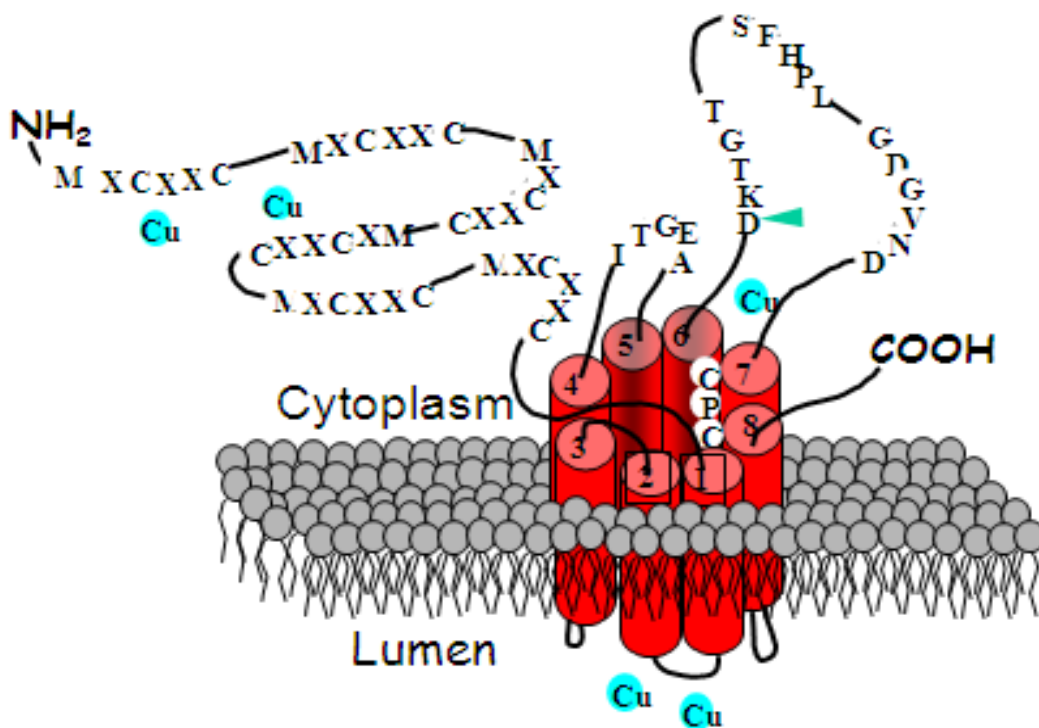


Figura 3. Proteina ATP7B

Questa proteina è localizzata nella regione trans-Golgi dove agisce portando il rame nella via secretoria per la sua incorporazione nell' apoceruloplasmina affinché questa assuma la forma matura e funzionante della ceruloplasmina (53).

In condizioni di aumento della concentrazione del rame intracellulare, la proteina ATP7B migra in una regione citoplasmatica vicina alla membrana canalicolare, e ricicla nella regione trans-Golgi quando la concentrazione intracellulare del rame riacquista valori normali (53). Anche se

non ancora ben chiarito, si pensa che la migrazione della ATP7B costituisca il meccanismo per l'eliminazione del rame in eccesso. Per tale motivo, tutte le condizioni che portano a un difetto di sintesi della proteina ATP7B, della sua corretta localizzazione nella regione trans-Golgi e della sua capacità di trafficare in condizione di eccesso di rame intracellulare, portano a una diminuzione di sintesi della ceruloplasmina e ad un accumulo di rame nella cellula con conseguente danno cellulare e rilascio di rame nel circolo, che progressivamente si deposita nel fegato, successivamente nel cervello, nella cornea, nei tubuli renali e in altri organi dove provoca danno tissutale (54).

Genetica

Lo studio molecolare del gene di Wilson in varie popolazioni del mondo ha messo in evidenza la presenza di circa 520 variazioni di sequenza appartenenti a tutte le categorie: missenso, nonsense, delezioni, inserzioni e variazioni nucleotidiche nel sito di splicing; tra queste le missense sono largamente prevalenti, secondo i dati del HUGO database (<http://www.uofa-medical.genetics.org>). Esiste un'alta eterogeneità allelica con la presenza di poche mutazioni relativamente frequenti e molte mutazioni rare. In Sardegna lo studio molecolare della malattia di Wilson ha evidenziato la presenza di 25 diverse mutazioni, dove la -441/-427 del 15 è la più comune e costituisce circa il 65% degli alleli mentre le 6 mutazioni più comuni costituiscono circa l'85% del totale. Questi dati suggeriscono una certa omogeneità allelica, in particolare nella popolazione sarda, dove l'incidenza della malattia di Wilson è di 1:3000 nati vivi; lo studio genetico potrebbe essere utilizzato con efficacia anche in uno screening di massa per la diagnosi e il trattamento precoce della malattia (55). Nelle varie popolazioni, fatta eccezione della sarda, la regione del Promoter del gene ATP7B, è studiata molto limitatamente, tuttavia lo studio delle mutazioni in questa regione ha permesso l'identificazione di 2 mutazioni, la -133A>C e la -215A>T, identificate in pazienti di origine cinese, dove studi di espressione hanno rilevato una diminuzione dell'attività del Promoter rispettivamente del 51% e 25% (56). Inoltre in diverse popolazioni sono state descritte, nella regione 5' UTR del gene ATP7B, altre 4 comuni variazioni di sequenza: -525T>C, -413T>C, -123/-119 del CGCCG e -75A>C considerate variazioni normali perché sono presenti con frequenze simili in pazienti Wilson e in individui non affetti (57, 58, osservazioni di questo laboratorio non pubblicate).

Materiali e metodi

Il materiale dello studio ha incluso: una sostituzione nucleotidica rara, la -224G>A, trovata in un paziente di origine turca, ma non identificata in 100 cromosomi normali e in 100 cromosomi di pazienti con la malattia di Wilson della stessa origine.

Due sostituzioni nucleotidiche rare, la -403/-404CG>TT e la -247A>C, trovate in cis in due pazienti di origine albanese ma non identificate in 100 cromosomi di origine mediterranea.

Altre varianti di sequenze rare, trovate in pazienti con la malattia di Wilson senza mutazioni identificate nel gene ATP7B sono: la -1064G>A; la -858insG; la -717G>C; la -576C>G; la -401C>G (Fig. 2).

RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA REGIONE 5' UTR DEL GENE ATP7B

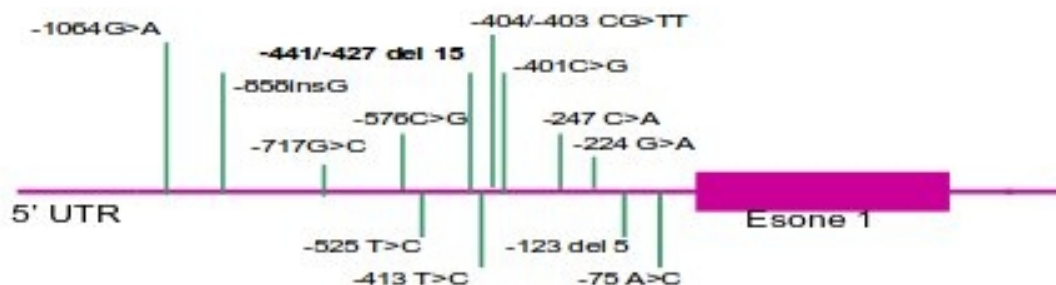


Figura 4. Rappresentazione schematica della distribuzione delle variazioni di sequenza nel promoter del gene ATP7B.

Tutte queste variazioni avvengono in un contesto aploipico, determinato da variazioni di frequenza relativamente frequenti: la -75A>C; la -123/-119ins>del5; la -413 T>C; la -525 T>C (Tabella 1).

Tabella 1. Polimorfismi più frequenti del promoter in cromosomi normali e in cromosomi di pazienti con la malattia di Wilson.

Polimorfismi	Frequenza cromosomi	Frequenza cromosomi
	normali	mutati
-525T>C	47%	50%
-413T>C	85%	81%
-123/-119ins>del5	48%	49%
-75A>C	64%	72%

Le variazioni nucleotidiche più frequenti, combinate fra loro, danno origine a degli aplotipi presenti con diverse frequenze sia nella popolazione Wilson, che in quella non Wilson e di queste due insieme (Tabelle 2-3-4).

Tabella 2. Aplotipi del promoter identificati nei cromosomi dei pazienti con la malattia di Wilson.

-75A>C	-123/-119ins>del	-413T >C	-525T>C	254 cromosomi	100,00%
A	ins	T	T	135	52,73%
C	del	T	C	53	20,70%
A	del	C	C	34	13,28%
A	del	T	C	25	9,76%
A	del	T	T	5	1,95%
A	ins	C	C	2	0,78%
A	ins	C	T	1	0,39%
C	ins	T	C	1	0,39%

Tabella 3. Aplotipi del promoter identificati nei cromosomi della popolazione normale.

-75A>C	-123/-119ins>del	-413T >C	-525T>C	254 cromosomi	100,00%
A	ins	T	T	120	47,24%
C	del	T	C	75	29,52%
A	del	C	C	32	12,60%
A	del	T	C	17	6,69%
A	ins	T	C	6	2,36%
A	ins	T	T	2	0,79%
C	del	T	T	1	0,39%
A	del	T	T	1	0,39%

Tabella 4. Aplotipi del promoter identificati nei cromosomi dei pazienti con la malattia di Wilson e della popolazione normale.

-75A>C	-123/-119ins>del	-413T >C	-525T>C	510 cromosomi	100,00%
A	ins	T	T	255	50,00%
C	del	T	C	128	25,09%
A	del	C	C	66	12,94%
A	del	T	C	42	8,23%
A	del	T	T	6	1,18%
A	ins	T	C	6	1,18%
A	ins	C	C	2	0,39%
C	ins	T	T	2	0,39%
A	ins	C	T	1	0,20%
C	ins	T	C	1	0,20%
C	del	T	T	1	0,20%

Le variazioni di sequenza rare, inserite nel contesto aplotipico dei quattro aplotipi più frequenti in assoluto (Tabella 5), danno delle combinazioni di varianti nucleotidiche che sono quelle utilizzate in questo studio (Tabella 6). In tabella 6 sono riportati i dodici costrutti presi in esame, costituiti da variazioni nucleotidiche rare combinate con i quattro aplotipi più frequenti. Si osserverà se, i polimorfismi sono in qualche modo capaci di influenzare l'attività del promoter del gene ATP7B ma anche se hanno un ruolo nella resistenza al rame.

Tabella 5. Aplotipi più frequenti del promoter identificati nei cromosomi della popolazione mista.

Aplotipi				Frequenza cromosomi normali	Frequenza cromosomi mutati
-75A	-123/-119ins5	-413T	-525T	44,90%	50,25%
-75C	-123/-119del5	-413T	-525C	31,30%	24,70%
-75A	-123/-119del5	-413C	-525C	12,60%	13,28%
-75A	-123/-119del5	-413T	-525C	7,00%	17,40%

Tabella 6. Costrutti presi in esame in questo studio.

1	- 525T	-413T	-123/-119ins5	-75A	Aplo A		
2	- 717C	-525T	-413T	-123/-119ins5	-75A	Aplo A -717C	
3	- 858insG	-525T	-413T	-123/-119ins5	-75A	Aplo A -858insG	
4	- 525T	-413T	-401G	-123/-119ins5	-75A	Aplo A -401G	
5	- 525C	-413T	-123/-119del5	-75A	Aplo B		
6	- 1064A	-525C	-413T	-123/-119del5	-75A	Aplo B -1064A	
7	- 525C	-413T	-123/-119del5	-75C	Aplo C		
8	- 525C	-413T	-404/-403TT	-247A	-123/-119del5	-75C	Aplo C -404/3TT -247A
9	- 525C	-413T	-247A	-123/-119del5	-75C	Aplo C -247 A	
10	- 576G	-525C	-413T	-123/-119del5	-75C	Aplo C -576G	
11	- 525C	-413C	-123/-119del5	-75A	Aplo D		
12	- 525C	-413C	-224A	-123/-119del5	-75A	Aplo D -224A	

Polymerase chain reaction (PCR)

Per poter ottenere un elevato numero di copie della regione di DNA di interesse, nel nostro caso quella compresa tra la posizione nucleotidica -1134 e la posizione nucleotidica +18, i campioni in esame sono stati sottoposti alla Polymerase Chain Reaction o PCR.

La PCR consiste nell'amplificazione enzimatica di una data regione del genoma.

La miscela di amplificazione è stata preparata in un volume finale di 50 µl e conteneva:

- due primers (forward e reverse) fiancheggianti la regione da studiare;
 primer forward: 5' tcacctcaacaactgacag 3'
 primer reverse: 5' tctctctgctcaggcat 3'
- 200 µM di quattro desossiribonucleosidi trifosfati (dNTPs);
- 2 U di Taq Polimerasi;
- buffer 10x contenente 1,5 mM di MgCl₂;

- 100 ng di DNA genomico;

Le condizioni di amplificazione sono state:

- denaturazione iniziale a 95°C per 5'
 - denaturazione a 95°C per 30''
 - annealing a 58°C per 30''
 - estensione a 72°C per 1'
 - estensione finale a 72°C per 10'
- } 30 cicli

Durante la denaturazione i due filamenti stampo del DNA a doppia elica si separano.

Durante l'annealing (ibridazione dei primers) ciascun primer si lega alla terminazione del filamento che si vuole amplificare.

Durante l'estensione la Taq Polimerasi aggiunge nucleotidi ai primers producendo una copia complementare al DNA stampo.

Ripetuti cicli di denaturazione, annealing ed estensione, in cui i filamenti sintetizzati servono da stampo per i cicli successivi, producono un accumulo esponenziale di copie della sequenza di DNA.

Lo strumento utilizzato per la PCR è un termociclatore ed i prodotti ottenuti vengono visualizzati su un transilluminatore a raggi UV dopo corsa elettroforetica su gel di agarose al 2% colorato con bromuro di etidio.

Clonaggio

Tutti i frammenti ottenuti dalla PCR sono stati clonati in un vettore plasmidico, pCR® 2.1-Topo Cloning (Invitrogen).

L'attacco del frammento di DNA nel vettore plasmidico è avvenuta tramite la reazione di ligazione. Per ottenere una quantità maggiore, i plasmidi ottenuti con il clonaggio sono stati amplificati attraverso la tecnica della trasformazione di cellule batteriche competenti

all'acquisizione del plasmide. Sono state utilizzate cellule di Escherichia Coli TOP10 (Invitrogen). Durante la trasformazione il vettore con il DNA entra nelle cellule e si replica.

Una volta trasformate, le cellule sono state piastrate su piastre Petri con terreno solido selettivo LB-agar contenente come antibiotico ampicillina 100 µg/ml.

Dopo incubazione a 37°C per tutta la notte (O/N), sono comparse le colonie batteriche.

La selezione delle colonie contenenti il frammento d'interesse è avvenuta casualmente, infatti, non tutte le colonie potevano aver assunto il plasmide in questione.

Da ogni piastra di cellule batteriche, è stato effettuato l'inoculo di una singola colonia in 3 ml di brodo LB con ampicillina 100 µg/ml all'interno di un tubo batteriologico da 15 ml, in ambiente aerobio. Affinché la coltura di cellule batteriche raggiungesse la fase di crescita stazionaria, il tubo batteriologico è stato incubato O/N a 37°C in agitazione.

Al termine dell'incubazione, è stata effettuata l'estrazione del DNA plasmidico su piccola scala (Miniprep). Un'aliquota di DNA plasmidico così estratto, è stato digerito con un enzima di restrizione EcoRI. L'avvenuta digestione è stata verificata tramite la semina di una piccola aliquota di DNA digerito, con a fianco un marcatore, su un gel di agarosio all'1% colorato con bromuro di etidio.

Dopo questa verifica, abbiamo seminato tutta la digestione in un gel di Low Melting all'1,5% e proceduto al taglio del gel con la banda corretta, a questo punto abbiamo provveduto alla purificazione del DNA della banda col kit Qquick Gel Extraction (Qiagen).

Il DNA dei costrutti di partenza così ottenuto, è stato quindi subclonato in un sito di restrizione EcoRI di un vettore di espressione pRL-null (Promega) contenente il cDNA della luciferasi di Renilla come gene reporter.

L'inserimento del DNA liberato dal vettore plasmidico Topo Cloning nel vettore di espressione pRL-null, è avvenuto tramite una reazione di legazione con l'utilizzo dell'enzima T4 Ligase a 16°C O/N, con un rapporto tra vettore pRL-null e DNA di 1:4.

Questi nuovi cloni sono stati anch'essi amplificati, sempre attraverso la tecnica della trasformazione di cellule competenti all'acquisizione del plasmide. Questa volta le cellule utilizzate erano XL1-Blue.

Dopo la trasformazione le cellule sono state piastrate sul terreno LB-agar con ampicillina 100 µg/ml. Dopo l'incubazione O/N a 37°C e la comparsa delle colonie sulla piastra Petri, una colonia è stata inoculata in un tubo batteriologico lasciato poi O/N a 37°C, in agitazione e in ambiente aerobio. Dopo l'estrazione dei DNA plasmidici (Miniprep) da queste cellule, essi sono

stati digeriti con l'enzima AccI per verificare che i costrutti fossero inseriti nel vettore pRL-null secondo il giusto orientamento 5'-3'. La conferma a questo è avvenuta in seguito alla semina dei DNA digeriti su un gel di agarosio al 2%, che ha rivelato la presenza di due bande, una di 4213 bp, e l'altra di 236 bp.

I frammenti orientati in 3'-5' invece, erano caratterizzati da una banda di 3536 bp e da una banda di 913 bp.

Sequenziamento

L'integrità di tutti i costrutti è stata verificata attraverso il sequenziamento ciclico o "cycle sequencing".

La reazione di sequenziamento è stata preparata in un volume finale di 10 µl e conteneva:

- 2 µl di miscela di reazione costituita dall'enzima polimerasi, buffer, dNTPs e ddNTPs (Big Dye Mix);
- 3,2 pmol di un primer
- 10 ng di DNA
- H₂O deionizzata

Il sequenziamento ciclico comprende tre fasi come la PCR, le condizioni sono state:

- denaturazione iniziale a 96°C per 1'
 - denaturazione a 96°C per 10''
 - annealing a 50°C per 6''
 - estensione a 72°C per 4'
- } 25 cicli

I primers utilizzati durante il sequenziamento sono stati i seguenti:

Forward 5' tcacctcaacaactgcacag 3'

Forward 5' ccgaggcgtagactagtgtt 3'

Forward 5' ggcgcagagtccgagga 3'

Forward 5' cacggcagagaactgt 3'

Reverse 5' ctgtcaatcacaggccacg 3'

Reverse 5' ccaccctggaactgcc 3'

Reverse 5' agaggaggcgcagagtgtga3'

Durante la denaturazione si ha l'apertura della doppia elica di DNA.

Durante l'annealing, l'unico primer presente nella reazione, si lega al filamento stampo di DNA per permettere alla DNA polimerasi di copiare la sequenza, in questo modo il prodotto della reazione si accumula con modalità lineare e non esponenziale come avviene nella PCR.

Durante l'estensione avviene l'aggiunta di nucleotidi al primer tramite l'incorporazione di dNTPs e ddNTPs, questi ultimi, privi del 3' OH, una volta incorporati, impediscono la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. Ciò provoca il blocco della reazione di polimerizzazione.

Questo metodo di sequenziamento si basa perciò sul principio di terminazione precoce del filamento (Metodo di Sanger). Le catene inizieranno in uno stesso punto (quello in cui si lega il primer) e termineranno in punti diversi perché, durante l'estensione, vengono incorporati sia i dNTPs che i ddNTPs marcati con quattro fluorocromi diversi.

Una volta avvenute le reazioni, queste sono state purificate meccanicamente con l'utilizzo dello strumento Biomek (Beckman Coulter). Di questi purificati, una piccola aliquota è stata successivamente esaminata sull'analizzatore genetico ABI Prism 3130, uno strumento multicolor basato sull'analisi fluorescente del DNA.

Qui, una luce laser incide sui frammenti analizzati, eccitando i fluorocromi legati ai nucleotidi che li compongono. L'emissione della fluorescenza da parte dei fluorocromi permette la lettura della sequenza, infatti, le quattro basi che compongono il DNA sono distinte perché ciascuna è marcata con un fluorocromo differente e quindi ha una lunghezza d'onda di emissione caratteristica che si traduce in un colore diverso per ogni distinta base azotata.

Studi di espressione

Per ottenere concentrazioni maggiori del DNA in studio, si è provveduto all'estrazione del DNA plasmidico su ampia scala (Maxiprep,) utilizzando il kit QIAGEN Plasmid Maxi (Qiagen). Per poter effettuare gli studi funzionali sul gene questi DNA sono stati transfettati. Col termine di transfezione si intende il processo attraverso il quale si ha il trasferimento di DNA esogeno all'interno di cellule eucariotiche.

Le transfezioni effettuate erano transienti. In una transfezione transiente il DNA esogeno non si integra al genoma cellulare ma rimane nella cellula come frammento extracromosomico.

Sono state utilizzate due linee cellulari, cellule di epatoma HepG2 e cellule di neuroblastoma SH-SY5Y.

Le cellule sono state fatte crescere in terreno di coltura RPMI-1640 (Sigma), addizionato con 10% di siero fetale, penicillina 50 U/ml e streptomina 50 µg/ml, a 37°C in atmosfera arricchita con 5% di anidride carbonica.

Al raggiungimento della confluenza del 60%, le cellule sono state trasferite in piastre da 35 mm, lasciate incubare per una notte e transfettate utilizzando il liposoma DMRIE-C (Invitrogen), 2 µg per ogni µg di DNA.

Il liposoma, contenente lipidi policationici, con la sua carica positiva netta, si associa ai gruppi fosfato carichi negativamente del DNA.

Il complesso DNA-liposoma, grazie alla sua porzione lipidica, si fonde con la membrana cellulare e rilascia il suo contenuto nelle cellule.

Per la transfezione sono state preparate due soluzioni, una contenente il DNA con il terreno OPTIMEM (privo di siero e antibiotici) alla quale è stato aggiunto come controllo interno il pCMV-luc per valutare l'efficienza di transfezione, e l'altra contenente il liposoma e il terreno OPTIMEM. Queste due sono poi state unite insieme e lasciate incubare per 45' per favorire l'interazione fra i componenti. Nel frattempo le piastre da 35 mm con all'interno le cellule sono state lavate con il terreno OPTIMEM in modo che questo, essendo privo di siero, eliminasse eventuali residui di siero dalle cellule che avrebbero potuto compromettere l'efficienza della transfezione. Al termine dei 45' di incubazione il preparato è stato addizionato alle cellule da transfettare e il tutto messo a incubare per 5h.

Dopo di che, eliminata dalle piastre la miscela contenente l'OPTIMEM, il DNA, il pCMV-luc e il liposoma, le cellule sono state fatte incubare per circa 15h a diverse condizioni:

basali, ovvero solo con terreno RPMI-1640, con RPMI-1640 a cui è stato aggiunto CuSO₄ in due diverse concentrazioni, 10 µM e 40 µM. Alla fine delle 15h di incubazione le cellule sono state lavate col tampone salino PBS, raccolte, centrifugate e risospese in 80 µl di soluzione di lisi (Passive Lysis Buffer 1X). Di questi estratti 20 µl sono stati testati per l'attività luciferasica nel lumenometro Lumat LB9501.

Tutti i valori di attività luciferasica sono stati normalizzati in base al contenuto proteico (utilizzando identiche quantità di ogni estratto proteico), e in base all'efficienza di transfezione

saggiata tramite la misura dell'attività del reporter di controllo interno (pCMV-luc) contenente il gene reporter della luciferasi di lucciola distribuito in uguale quantità nelle varie transfezioni. Per la valutazione dell'attività luciferasica è stato utilizzato il kit Dual-Luciferase® Reporter Assay Sistem (Promega). L'attività luciferasica è stata espressa come percentuale del valore di luciferasi nelle cellule transfettate con DNA funzionalmente inerte, il vettore pRL-null. Nel saggio con il doppio reporter luciferasico, i valori sono espressi come rapporto dell'attività delle due luciferasi (di renilla e di lucciola) nei costrutti transattivanti, diviso per il rapporto di attività nel controllo (transattivato con DNA inerte) reso uguale ad 1. In tal modo il valore uguale a 1 indica l'assenza di attività transattivante equamente ripartita tra i due promotori in esame

Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio è quello di indagare sul potenziale ruolo svolto dalla regione promoter nell'espressione del gene ATP7B in relazione all'aplotipo presente come risultato della combinazione di vari polimorfismi identificati in pazienti con la malattia di Wilson, in individui con alterazioni del metabolismo del rame non attribuibili alla malattia ed in individui normali. Una diversa espressione del gene ATP7B in relazione dell'assetto polimorfico del promoter potrebbe tradursi in variazione di espressione e funzionamento della proteina codificata e della sua capacità di eliminazione del rame in condizioni di eccesso. Questo dato potrebbe tradursi ad una variabilità nella resistenza in presenza di rame in eccesso nel fegato, dato che suggerirebbe un ruolo potenziale della regione promoter del gene ATP7B non solo nella patogenesi ma anche nella eterogeneità fenotipica presente nelle malattie da accumulo di rame, in particolare la malattia di Wilson.

Risultati

Sono stati condotti studi funzionali su 12 costrutti che contengono la regione promoter del gene ATP7B corrispondente ai 12 aplotipi identificati durante lo studio di pazienti con sospetta malattia di Wilson (Tabella 6). Dei 12 aplotipi 4 sono frequenti e presenti in circa 96 % della popolazione. Questi derivano dalla combinazione di 4 variazioni di sequenza della regione 5'UTR del gene ATP7B, -525 T>C, -413 T>C, -123/-119delAGCCG e -75 A>C, descritte in diverse popolazioni, considerate variazioni normali perché sono presenti con frequenze simili sia in pazienti WD ed in individui non affetti. I rimanenti 8 aplotipi rari sono il risultato di altrettante rarissime variazioni di sequenza avvenute sul background degli aplotipi frequenti. Più precisamente l'aplotipo 1, Aplo A, è l'aplotipo più frequente e costituisce il background sul quale si formano gli aplotipi 2,3,4, Aplo A-717C, Aplo A-858insC, Aplo A-401G, per la presenza rispettivamente delle variazioni di sequenza -717C, -858insC e -401G. Allo stesso modo sul background degli aplotipi frequenti Aplo B, Aplo C ed Aplo D vengono formati i rimanenti aplotipi rari per la presenza delle variazioni di sequenza -1064A, la doppia variazioni -404/3TT -247A, la -247A isolata, la -576G e la -224A. Lo studio consiste nelle transfezioni transitorie dei costrutti in 2 linee cellulari HepG2, cellule di epatoma e SH-SY5Y cellule di neuroblastoma. Sono state scelte queste 2 linee cellulari perché già utilizzate in studi funzionali di altro tipo e sono considerate modelli interessanti per lo studio del gene e della proteina ATP7B. Inoltre HepG2 e SH-SY5Y sono linee cellulari provenienti dal fegato e dal cervello rispettivamente, i 2 organi maggiormente danneggiati e di cui il coinvolgimento risulta nelle principali manifestazioni cliniche presenti nella malattia di Wilson, quelle di tipo epatico e di tipo neurologico. Si voleva indagare se il

promoter potesse in qualche modo essere coinvolto nelle manifestazioni cliniche maggiormente presenti nella malattia. Gli esperimenti sono stati eseguiti in 3 condizioni: basali e dopo l'aggiunta di 10 μ M e di 40 μ M di solfato di rame nel medium. Si voleva indagare sull'attività del promoter dei vari costrutti, nei 2 modelli cellulari e nelle diverse condizioni create dall'assenza/presenza del rame nel medium.

Il costrutto di riferimento corrisponde all'aplotipo più comune, Aplo A.

Sulla base dei risultati riportati nella figura 5, si osserva che in condizioni basali l'attività del promoter nella linea cellulare HepG2 varia a seconda dell'aplotipo, talvolta in modo significativo.

Il promoter con l'aplotipo più comune presenta l'attività più alta. Osservando l'attività del promoter nell'ambito dei 4 gruppi indicati con colore diverso e costituiti nei singoli contesti dall'aplotipo più comune e quelli rari risultati dalla presenza delle variazioni rare, possiamo osservare che la variazione dell'attività tende a diminuire di vario grado nel gruppo dell'aplo A, aumenta nel gruppo dell'aplo B, varia aumentando o diminuendo nel gruppo dell'aplo C mentre aumenta nell'aplo D. In particolare nel gruppo dell'aplo C si osserva che presenza della doppia variazione -404/3TT -247A porta ad un aumento dell'attività del promoter rispetto al promoter aplo C mentre la presenza della singola variazione -247A non altera l'attività del promoter rispetto all'aplo C.

Osservando i dati riportati nella figura 6 si osserva che in condizioni basali l'attività del promoter nelle cellule SH-SY5Y è altrettanto varia a seconda dell'aplotipo presente nel costrutto, talvolta in modo significativo. In questo sistema cellulare il promoter con l'aplotipo più comune non presenta sempre l'attività più alta ma esistono diversi costrutti con attività più alta in modo significativo.

Osservando i dati nell'ambito di ciascuno dei 4 gruppi studiati, nelle cellule HepG2 si può osservare che nel gruppo del aplo A l'attività dei costrutti è significativamente più bassa nei costrutti 2,3,4 rispetto al costrutto aplo A, questo non si è verificato nel gruppo corrispondente delle transfezioni nelle HepG2 dove solo il costrutto 3 presentava tale diminuzione. Nel gruppo del aplo B, avviene una inversione delle attività dei 2 costrutti rispetto a quanto accade nelle transfezioni nelle linee cellulari HepG2, nel gruppo aplo C si osserva un'attività del costrutto della doppia variazione -404/3TT -247A molto più alta rispetto al promoter aplo C, mentre nel costrutto contenente la singola variazione -247A non altera l'attività del promoter rispetto all'aplo C. Nel gruppo dell'aplo D la situazione rimane sostanzialmente invariata.

Confrontando l'attività dei costrutti con gli aplotipi più comuni, figura 7, si osserva che nelle transfezioni delle HepG2, l'attività dell'aplotipo più comune A è in modo significativo la più alta; mentre nelle transfezioni nella linea cellulare SH-SY5Y si osserva che l'attività dell'aplo B è più alta in modo molto significativo.

Nella figura 8 sono riportati i risultati dell'attività del promoter nelle transfezioni della linea cellulare HepG2 in condizioni basali e dopo l'aggiunta di rame nelle concentrazioni di 10 μM e 40 μM .

Risulta molto evidente che l'aggiunta del rame, rispetto alle condizioni basali, ha provocato una diminuzione significativa dell'attività del promoter in tutti i costrutti ed in entrambe le concentrazioni. Tale diminuzione varia nei diversi costrutti a seconda del contesto dell'aplotipo. Inoltre il grado di diminuzione dell'attività del promoter non segue i valori dell'attività in condizioni basali, ma maggiore è la concentrazione del rame nel medium maggiore è l'inibizione dell'attività del promoter.

Nella figura 9 sono riportati i risultati delle transfezioni nella linea cellulare SH-SY5Y in condizioni basali e dopo l'aggiunta di rame nelle concentrazioni di 10 μM e 40 μM . I risultati evidenziano una inalterata attività del promoter dei vari costrutti nelle 3 condizioni sperimentali.

Nella figura 10 sono riportati i dati sperimentali nelle 3 condizioni nelle HepG2 e SH-SY5Y.

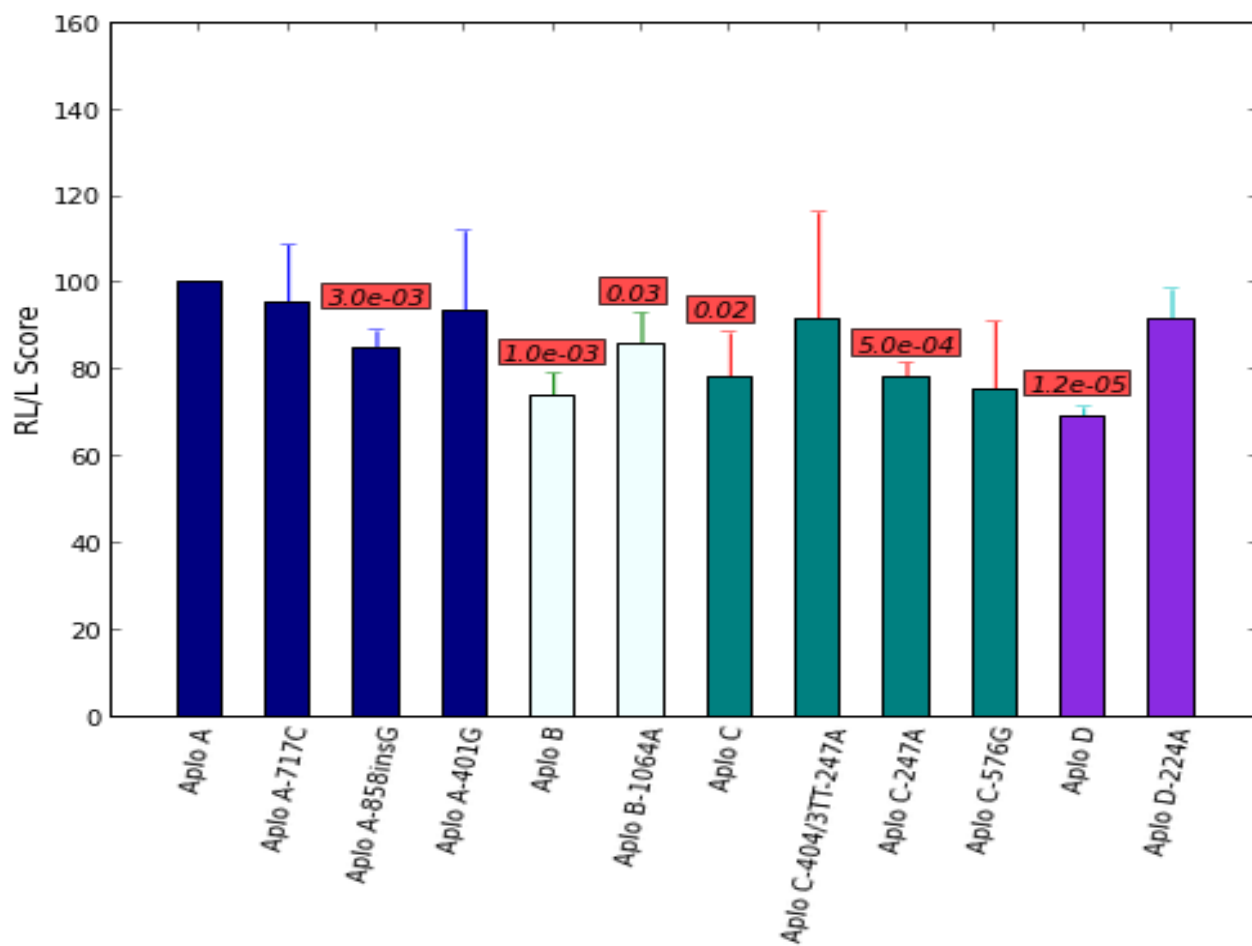


Figura 5. Attività dei promoter nella linea cellulare HepG2 in condizioni basali.

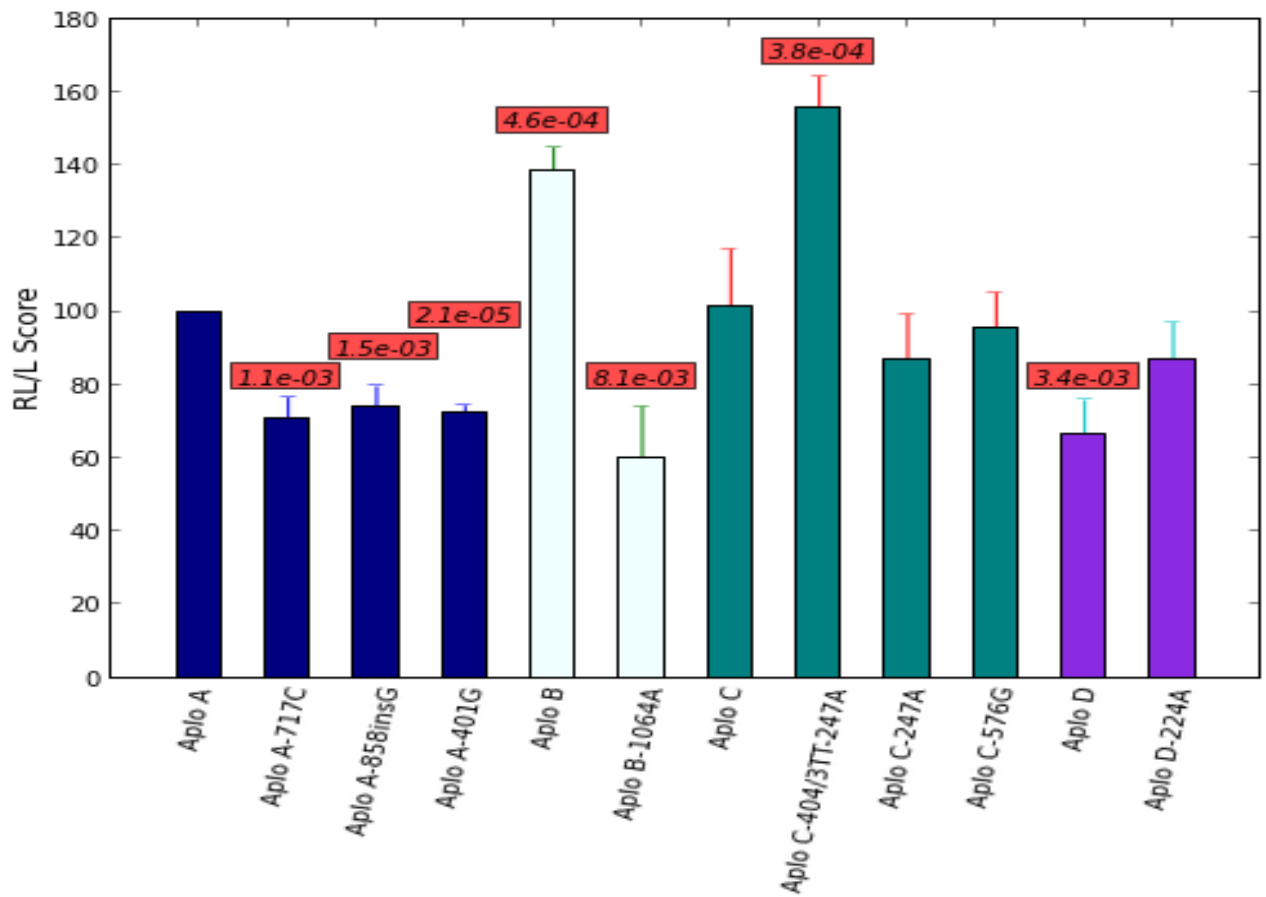


Figura 6. Attività dei promoter nella linea cellulare SH-SY5Y in condizioni basali

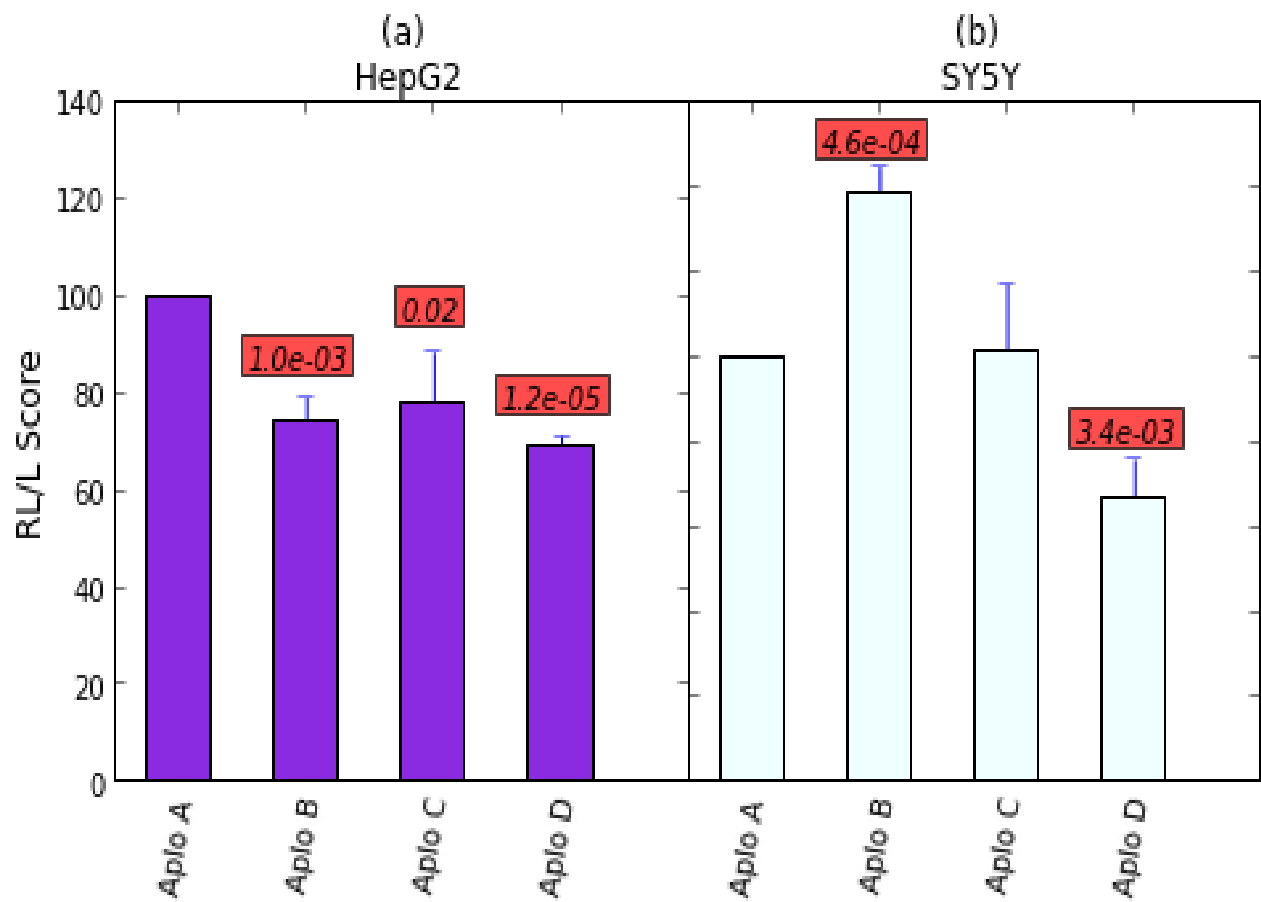


Figura 7. Espressione dei promoter più frequenti:

(a) linea cellulare HepG2,

(b) linea cellulare SH-SY5Y.

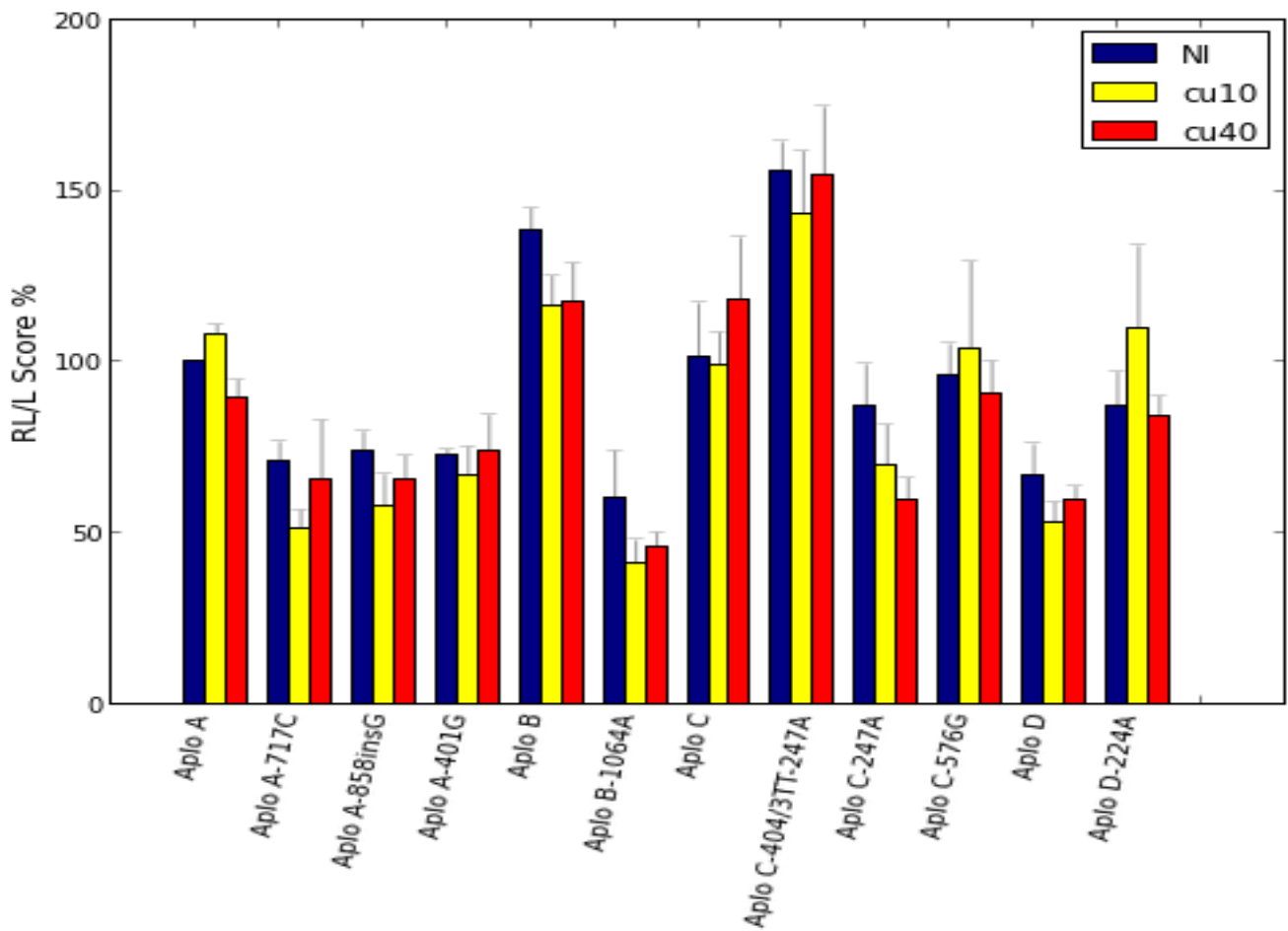


Figura 8. Attività dei promoter nelle transfezioni in condizioni basali, con 10 μ M e 40 μ M di Cu, nella linea cellulare HepG2.

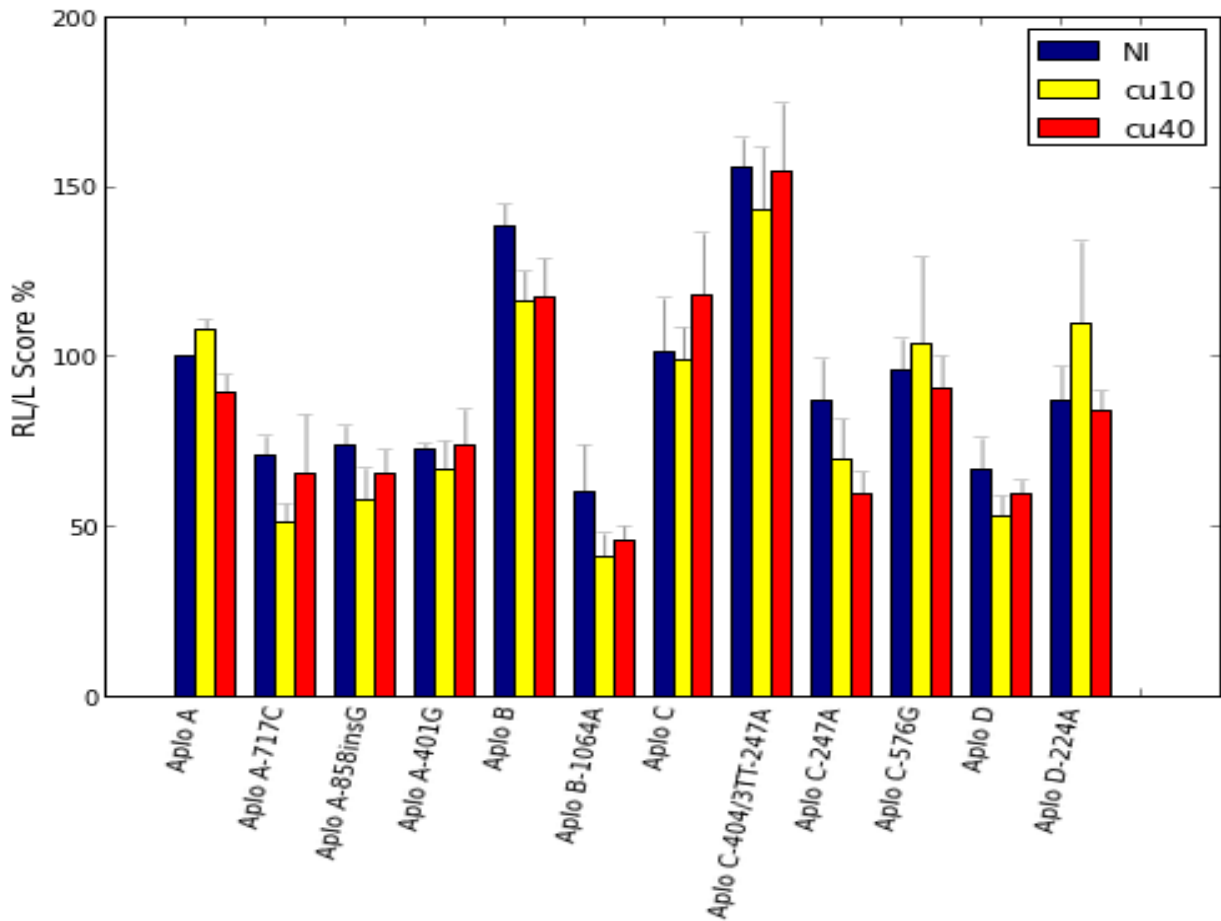


Figura 9. Attività dei promoter nelle transfezioni della linea cellulare SH-SY5Y, condizioni basali e con 10 μ M e 40 μ M .

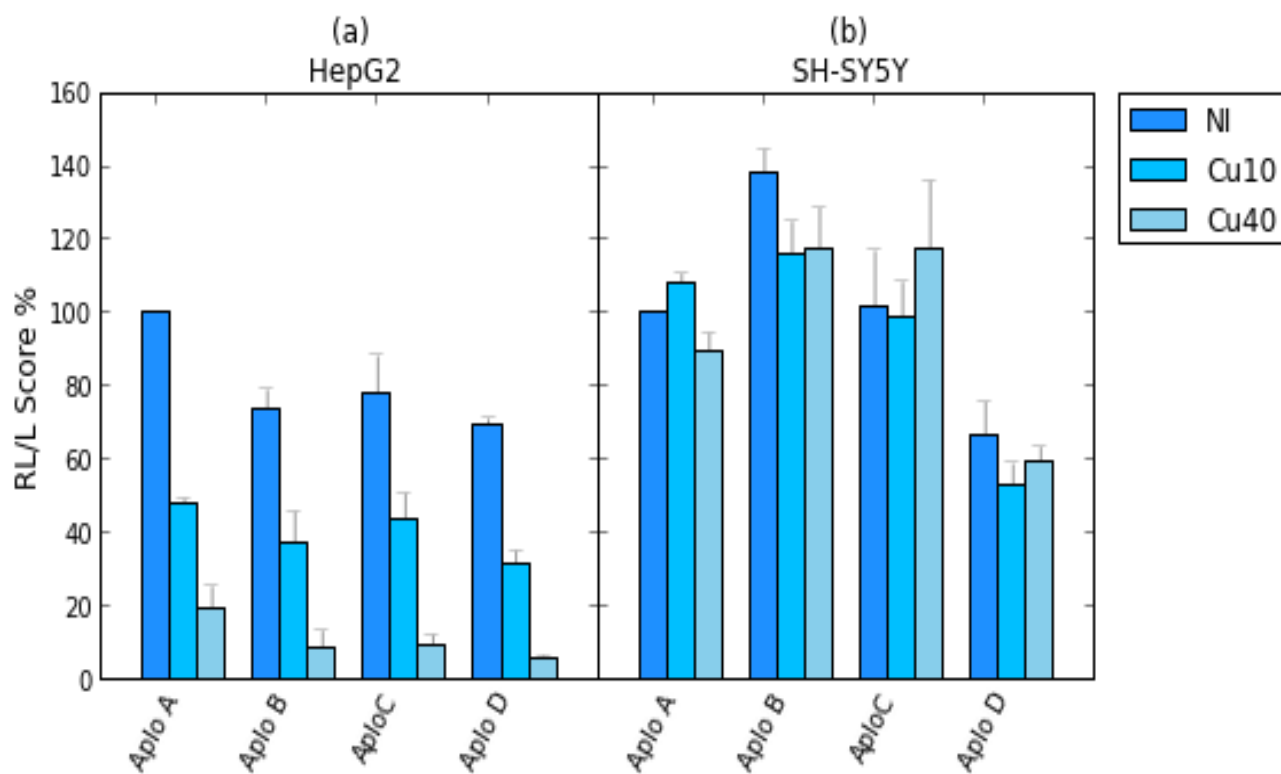


Figura 10.
(a) dati sperimentali delle cellule HepG2 in condizioni basali e con 10 μ M e 40 μ M,
(b) dati sperimentali delle cellule SH-SY5Y in condizioni basali e con 10 μ M e 40 μ M.

Discussione

Il rame costituisce un oligoelemento molto importante per la sopravvivenza di tutti gli organismi dai batteri all'uomo. Gli ioni rame possiedono delle proprietà importanti in quanto possono acquistare [Cu (I)] o cedere [Cu (II)] elettroni (redox) acquistando proprietà ossidative o riduttive (60).

Per questa caratteristica possono svolgere il ruolo di cofattori per il trasporto di elettroni in alcuni enzimi con funzioni biologiche strutturali, necessarie per la sopravvivenza e lo sviluppo degli organismi. Le proteine che legano il rame partecipano ad una serie di processi biologici come la respirazione cellulare, la difesa contro fattori ossidativi, la formazione del tessuto connettivo, la sintesi dei pigmenti per esempio della melanina, la sintesi dei neurotrasmettitori, l'ossidazione del ferro, e altri (60). Quindi un difetto nella funzione di questi enzimi, a causa della mancanza del rame in quantità sufficiente può creare l'alterazione di diversi processi biologici riconducibili a diverse situazioni patologiche per il nostro organismo (60). Al contrario, la presenza di rame in eccesso, nel nostro organismo, può dare inizio ad una serie di reazioni di ossido/riduzione con la produzione di radicali liberi altamente reattivi come lo sono i radicali idrossilici che provocano distruzione cellulare attraverso perossidazione dei lipidi della membrana cellulare, mitocondriale, lisosomiale, ossidazione delle proteine, rottura delle molecole di DNA ed RNA. E' dunque importante mantenere la normale omeostasi del rame nell' organismo. Il mantenimento dell'omeostasi del rame nell' organismo richiede una ben coordinata funzione di diversi processi che riguardano l'assunzione del rame, la distribuzione nella cellula la detossificazione e l'eliminazione del rame in eccesso. L' importanza del mantenimento dell'omeostasi nell' organismo é stata ben evidenziata dall'esistenza di 2 sindromi/malattie ben caratterizzate nell' uomo, la sindrome di Menkes dovuta a deficit di rame nell'organismo e la malattia di Wilson dovuta ad eccesso di rame nell' organismo (61).

Nella malattia di Wilson il danno cellulare si manifesta prevalentemente con 2 tipi di manifestazioni cliniche, quelle di tipo epatico e quelle di tipo neurologico con una ampia variazione di sintomi per ciascun tipo di manifestazioni (61). Studi sul genotipo-fenotipo eseguiti in pazienti con la malattia non hanno stabilito un'associazione tra determinate mutazioni o tipo di mutazioni del gene ATP7B e specifici sintomi clinici, per cui si pensa che oltre alla presenza di mutazioni, la variabilità del quadro clinico viene determinata con il contributo di altri fattori di tipo ambientale o genetico (62, 63).

I fattori ambientali riguardano fondamentalmente la presenza quantitativa del rame assunto attraverso gli alimenti o contenuto nell'acqua e come tale assunto direttamente o attraverso la cottura di alimenti. I fattori genetici sono i geni/proteine che in qualche modo contribuiscono a contenere lo stress ossidativo e la formazione di radicali liberi come conseguenza dell'accumulo del rame, aumentando in qualche modo la resistenza al rame da parte dell'organismo e prevenendo il danno cellulare . Tra i fattori genetici, sono i geni/proteine che legano il rame e lo possono mantenere in forma non tossica come lo sono le metallothioneine (64, 65). Inoltre le proteine CTR1, ATOX1, MURR1, che regolano il metabolismo del rame nella cellula, potenzialmente potrebbero contribuire al quadro clinico della malattia. Per quanto riguarda la proteina ATP7B, il cui il difetto causa la malattia di Wilson, presenta numerose variazioni di sequenza identificate sia in pazienti con la malattia di Wilson che nella popolazione normale e di conseguenza considerate polimorfismi non patogeni. Tra queste, diverse sono state identificate in questo studio nella regione promoter (66). Mentre negli ultimi anni sono stati effettuati diversi studi funzionali, per meglio definire il ruolo delle mutazioni nella patogenesi della malattia, niente si sa sul ruolo dei polimorfismi. Questi ultimi, pur non essendo determinanti nella patogenesi potenzialmente potrebbero contribuire, attraverso piccole variazioni della funzione proteica ed in aggiunta alle mutazioni, nella determinazione della variabilità fenotipica. Che la regione promoter svolga un ruolo determinante nella regolazione dell'espressione di tutti i sistemi genici è un dato acquisito da svariati lavori pubblicati da diversi anni. E' ormai noto che alterazioni nella regione promoter possono risultare in alterazioni nell'espressione del gene e quindi della proteina interessata, con conseguenze che possono essere le più varie. Per esempio, una delezione nella regione 5' UTR del gene ATP7B identificata molti anni fa in questo laboratorio, costituisce la mutazione più frequente nella popolazione sarda in quanto diminuisce l'attività del promoter del 75% rispetto al controllo normale.

In questo studio sono state analizzate, con studi funzionali, le variazioni di sequenza nella regione promoter del gene ATP7B attraverso lo studio dei costrutti ottenuti con il subclonaggio dei promotori corrispondenti a 12 aplotipi identificati durante lo studio genetico in pazienti con la malattia di Wilson, in individui con alterazioni del metabolismo del rame non attribuibili alla malattia ed in individui normali.

I risultati ottenuti permettono di fare alcune considerazioni: riguardo alle due linee cellulari utilizzate HepG2, cellule di epatoma e SH-SY5Y, cellule di neuroblastoma si può affermare che si tratta di due sistemi cellulari validi, già adoperati sia per lo studio della proteina ATP7B endogena dal punto di vista della sua cinetica e più in generale il suo

comportamento funzionale. Inoltre entrambe le linee sono state utilizzate per lo studio della proteina ATP7B attraverso esperimenti di transfezioni transitorie con costrutti contenenti il cDNA ATP7B (67, 72).

Negli esperimenti sono state usate 3 condizioni, basali e l'aggiunta di solfato di rame nelle concentrazioni di 10 μM e 40 μM . Si tratta di concentrazioni già utilizzate per esperimenti sulle suddette linee cellulari e considerate essere non tossiche (67, 72).

I dati riportati nella figura 5 dimostrano in modo chiaro che l'attività della regione promoter del gene ATP7B nella linea cellulare HepG2 è varia e la variazione in alcuni costrutti è significativa e dipende dall'aplotipo in studio. Il costrutto maggiormente espresso è quello con l'aplotipo più comune che è presente in circa il 50% della popolazione. Questo dato potrebbe non essere casuale ma dovuto a un effetto di selezione. Visto che la regione promoter svolge un ruolo importante nell'espressione del gene ATP7B diverse attività del promoter potrebbero essere tradotte in diversi gradi di espressione dei geni/proteine interessati dato che potrebbe rendere più efficace l'eliminazione del rame in eccesso sotto forma di rame libero che anche in minime quantità, potrebbe risultare tossico per l'organismo per la maggiore probabilità di creare radicali liberi altamente reattivi.

Nella figura 6 sono riportati i risultati delle transfezioni nelle SH-SY5Y che indicano altrettanto una espressione variabile dei promotori in studio, talvolta significative a seconda dell'aplotipo. Il grado di espressione dei promoter in SH-SY5Y è diverso di quanto non avvenga nella HepG2. L'aplotipo aplo A non è quello maggiormente espresso nelle SH-SY5Y. Infatti confrontando l'attività dei promoter degli aplotipi più comuni si nota che l'aplo B presenta un'attività maggiore rispetto all'aplo A mentre l'aplo C ha un'attività equivalente. Questi dati suggeriscono che l'attività del promoter oltre ad essere aplotipo specifica è anche tessuto specifica e che il contributo dei polimorfismi di queste regioni varia a secondo del tessuto in cui viene espressa la proteina ATP7B. Considerando anche gli aplotipi meno comuni vediamo che esiste una diversità nell'espressione nei vari promoter rispetto all'aplotipo più comune sia in alto che in basso dato che ulteriormente suggerisce un ruolo potenziale per questi complessi polimorfici di fattori modificatori dell'attività del promoter e dei geni/proteine di cui fanno parte. E' probabile che gli aplotipi maggiormente espressi nelle cellule nervose rispetto a quanto non avvenga nelle cellule epatiche possano costituire dei fattori protettivi contro l'accumulo del rame nel cervello e quindi in qualche modo prevenire il danno ed eventualmente manifestazioni di tipo neurologico. Queste osservazioni diventano più evidenti considerando i quattro gruppi dei costrutti sulla base del aplotipo-background di appartenenza. Nella figura 1 si nota come l'espressione del promoter

cambia se nell'aplotipo base, aplo A,B,C,D viene inserita una nuova variazione di sequenza. Nel gruppo dell'aplo A avviene una diminuzione dell'attività del promoter di vario grado rispetto all'aplo A. Nel gruppo dell' aplo B la variazione avviene in alto con un aumento dell'attività del promoter.

Nel gruppo dell' aplo C la variazione avviene sia in alto che in basso. E' interessante notare che il promoter aplo C -404/3TT -247A, formato dall'avvento di 3 nuove sostituzioni, mostra una maggiore espressione rispetto al promoter aplo C -247A privo della doppia sostituzione -404/3TT. La sostituzione -247 C>A interessa una sequenza MLS6 conservata (metal like response element 6) nella regione promoter delle metalloproteine come la ATP7B che costituiscono potenziali siti di legame di fattori di trascrizione in condizioni di accumulo di metalli aumentando la loro espressione per proteggere la cellule contro le conseguenze tossiche di tale accumulo (73). La -247 C>A non sembra avere nessuno impatto nell'espressione del promoter interessato.

Nel gruppo aplo D si osserva un aumento dell'espressione nel costrutto aplo D -224A. La sostituzione -224 G>A interessa una sequenza MRE (metal response element) quindi una sequenza conservata costituita da una regione consensus TGCRNC coinvolta anch' essa in interazioni con fattori di trascrizione nelle metalloproteine. Nel caso considerato sembra che la -224 G>A aumenti l'interazione ed il legame di tale sequenza con i fattori di trascrizione.

Se si vogliono analizzare gli stessi gruppi, nelle transfezioni nelle SH-SYS5 si nota che il gruppo aplo A ha una maggiore diminuzione negli aplotipi derivati, rispetto l'aplo A. Nel secondo gruppo probabilmente è presente il dato più interessante in quanto, l'aplo B nelle cellule HepG2 ha un'espressione minore rispetto all'aplo B -1064A, nelle cellule SH-SYS5 avviene il contrario in quanto l'espressione dell'aplo B -1064A è molto più bassa rispetto l'aplo B. Quindi questi 2 costrutti mostrano con più evidenza la differenziazione dell'attività di un determinato aplotipo nei diversi tessuti. Nel gruppo aplo C il costrutto mostra la maggiore espressione considerando tutti i promoter, questo dato indica che aplo C -404/3TT -247A è un promoter forte che potrebbe dare un vantaggio cellulare rispetto all'accumulo di rame. Nel gruppo la situazione è analoga a quanto si osserva nelle transfezioni delle cellule HepG2.

L'aggiunta del rame nel medium, nelle transfezioni nella linea HepG2, causa una severa diminuzione dell'attività dei promoter in tutti i costrutti. Si tratta di un dato poco spiegabile fondamentalmente per due motivi. Il primo è che la quantità di rame non è tanto alta da inibire l'espressione nelle cellule HepG2 né l'esposizione per circa 15 ore dopo l'aggiunta

del rame nel medium sia così lunga tanto da avere un impatto così forte nell'attività del promoter. Le linee HepG2 sono già state sottoposte in precedenza ad esperimenti di tossicità ed è stata analizzata sia la loro resistenza che l'espressione delle proteine endogene. Sono state trattate con diverse concentrazioni di rame e per diversi periodi di tempo (74). Secondo i dati ottenuti il grado di tossicità misurato in termini di sopravvivenza ed accrescimento cellulare risulta essere molto modesto nelle concentrazioni e nei tempi di esposizione usati in questi esperimenti. In altri esperimenti le cellule HepG2 sono state sottoposte a diverse concentrazioni di rame per diversi periodi di tempo ed è stato studiato in esse il profilo di espressione delle varie proteine. I risultati hanno evidenziato che diverse proteine coinvolte nel metabolismo cellulare del rame non hanno subito variazioni nella loro espressione nelle varie condizioni, suggerendo che l'espressione della ATP7B nelle cellule epatiche non varia significativamente con l'accumulo del rame. Come se la proteina ATP7B avesse una capacità di espressione "innata" che probabilmente dipende da fattori genetici che formano l'intero complesso che costituisce i meccanismi e contribuisce alla sua espressione e tali caratteristiche rimangono inalterate e poco influenzabili dall'ambiente (68). In questo contesto l'inibizione dei promoter considerati in questo studio può essere spiegata con il fatto che negli esperimenti si è analizzata, isolandola, una piccola parte del gene ATP7B e non l'insieme di tutte le regioni genomiche esoni, introni, 3'UTR che nell'insieme contribuiscono in sinergia nell'espressione della proteina attraverso meccanismi sia pro che posttraslazionali. Nelle condizioni degli esperimenti eseguiti con il sistema della Luciferasi il promoter può essere inibito, la stessa inibizione non potrebbe avvenire in altri sistemi di espressione o in vivo. È interessante notare che in linea di massima il grado di inibizione, almeno nelle condizioni con 10 μ M di rame nel medium varia, quindi anche in condizioni sfavorevoli il comportamento del promoter dipende dell'aplotipo.

L'aggiunta del rame nel medium nelle transfezioni in SH-SY5Y ha fornito risultati diversi rispetto a quelli ottenuti con le HepG2. Sulla base dei risultati ottenuti non si osservano differenze sostanziali nell'attività del promoter nelle 3 condizioni sperimentali dato che potrebbe suggerire che nelle cellule nervose l'attività del promoter varia a seconda dell'aplotipo e che non viene alterata dalla variazione del contenuto del rame nelle cellule. Questa differenza rispetto a quanto avviene nelle HepG2 sembra indicare che nelle cellule nervose la regione promoter può costituire una regione determinante nella regolazione del metabolismo del rame cellulare. Altrimenti i risultati ottenuti potrebbero essere dovuti alle condizioni nelle quali sono stati svolti questi esperimenti. Dati recenti ottenuti dopo il trattamento di cellule SH-SY5Y con alte concentrazioni di rame per lunghi periodi hanno

evidenziato che l'ingresso del rame nelle cellule avviene molto più lentamente di quanto non avvenga nelle cellule HepG2. Dunque è probabile che nelle condizioni sperimentali utilizzate il rame entrato nelle SH-SY5Y fosse in quantità molto limitata tanto da non incidere in nessun modo sull'attività dei promoter in studio.

Questi dati, nonostante siano interessanti, necessitano di ulteriori studi per meglio capire il ruolo dei polimorfismi del promoter. Questi studi devono essere svolti con appositi costrutti che contengano il promoter ed cDNA del gene ATP7B. Attraverso transfezioni stabili verranno transfettate le cellule CHO che non esprimono il gene ATP7B endogeno. In questo modo creando diversi costrutti con i vari promoter verrà studiata l'espressione del cDNA dell' ATP7B e la sua capacità di ottenere la sopravvivenza delle cellule transfettate a seconda del costrutto in studio.

Negli ultimi anni diversi studi hanno riportato dati secondo il quali esiste un coinvolgimento del rame in malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson (75,76). Secondo diversi studi in vitro, in animali di laboratorio e studi su pazienti hanno suggerito un'associazione tra alterazioni sistemiche del metabolismo del rame in particolare nella forma di rame libero e queste patologie (77). Tuttavia non sono ancora state evidenziate le determinanti genetiche coinvolte in questi processi. La proteina ATP7B costituisce un regolatore determinante del metabolismo del rame quindi potenzialmente un candidato per svolgere un ruolo in queste patologie. Essendo il promoter ATP7B una regione importante per la sua funzione dovrebbe essere presa in considerazione negli studi che in futuro verranno svolti per meglio chiarire le basi biologiche di queste patologie.

Bibliografia

1. G.A. Maston, S.K. Evans, M.R. Green. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;23:23.
2. M.P. Cosma. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 2002;10:227–36.
3. D.A. Kleinjan, V. van Heyningen: “*Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease*” *Am. J. Genet.* 76 (2005) 8-32.
4. N.I. Gershenzon, I.P. Ioshikhes: “*Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by ststistical sequence analysis*” *Bioinformatics* 21 (2005) 1295-1300.
5. P.R. Buckland: “*The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanism of action*” *Biochimica et Biophysica Acta* 1762 (2006) 17-28.
6. S.L. Coleman, P.R. Bukland, B. Hoogendoorn, C. Guy, K. Smith, M.C. O’Donovan: “*Experimental analysis of the annotation of promoters in the public database*” *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 1817-1821.
7. N.D. Trinklein, S.J.F. Aldred, A.J. Saldanha, R.M. Myers: “*Identification and functional analysis of human transcriptional promoters*” *Genome Res.* 13 (2003) 308-312.
8. M. K. Karen de Vooght, Richard van Wijk, and Wouter W. van Solinge. Mant of Gene Promoter Mutations in Molecular Diagnostics. *Clinical Chemistry* 55:4 698- 708 (2009)
9. D.S. Latchman. Eukaryotic transcription factors. 3rd ed. London: Academic Press; 1998. 360 p.
10. R. Breathnach, P. Chambon. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann Rev Biochem* 1981;50: 349 – 83.
11. K. Kimura, A. Wakamatsu, Y. Suzuki, T. Ota, T. Nishikawa, R. Yamashita, et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 2006; 16:55– 65.
12. K.M. de Vooght, R. van Wijk, W.W. van Solinge. GATA-1 binding sites in exon 1 direct erythroidspecific transcription of PPOX. *Gene* 2008;409: 83–91.
13. N. Zimmermann, J.L. Colyer, L.E. Koch, M.E. Rothenberg. Analysis of the CCR3 promoter reveals a regulatory region in exon 1 that binds GATA-1. *BMC Immunol* 2005;6:7.
14. P.D. Stenson, E.V. Ball, M. Mort, A.D. Phillips, J.A. Shiel, N.S. Thomas, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003;21:577– 81.

15. D.N. Cooper. Human gene mutation in pathology and evolution. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:157– 82.
16. K.V. Chowdari, K. Mirnics, P. Semwal, J.Wood, E. Lawrence, T. Bhatia, S.N. Deshpande, B.K. Thelma, R.E. Ferrell, F.A. Middleton, B. Devlin, P. Levitt, D.A.Lewis, V.L. Nimgaonkar: “*Association and linkage analysis of RGS4 polymorphism in schizophrenia*” *Hum. Mol.Genet.* 11 (2002) 1373-1380.
17. K.M. Druey, K.J. Blumer, V.K. Kang, J.H. Kehrl: “*Inhibition of G protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family*” *Nature* 379 (1996) 742-746.
18. L.M. Brustowicz, K.A. Hodgkinson, E.W. Chow, W.G. Honer, A.S. Bassett: “*Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22*” *Science* 288 (2000) 678-682.
19. Y. Horikawa, N. Oda, N.J. Cox, X. Li, M. Orho-Melander, M. Hara, Y. Hinokio, T.H. Lindner, H. Mashima, P.E. Schwarz, L. del Bosque-Plata, Y. Horikawa, Y. Oda, I. Yoshiuchi, S. Colilla, K.S. Polonsky, S. Wei, P. Concannon, N. Iwasaki, J. Schulze, L.J. Baier, C. Bogardus, L. Groop, E. Boerwinkle, C.L. Hanis, G.I. Bell: “*Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*” *Nat. Genet.* 26 (2000) 163-175.
20. A. Suzuki, R. Yamada, X. Chang, S. Tokuhira, T. Sawada, M. Suzuki, M. Nagasaki, M. Nakayama-Hamada, R. Kawaida, M. Ono, M. Ohtsuki, H. Furukawa, S. Yoshino, M. Yukioka, S. Tohma, T. Matsubara, S. Wakitani, R. Teshima, Y. Nishioka, A. Sekine, A. Iida, A. Takahashi, T. Tsunoda, Y. Nakamura, K. Yamamoto: “*Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis*” *Nat. Genet.* 34 (2003) 395-402.
21. P.R. Bukland, B. Hoogendoorn, C.A. Guy, S.L. Coleman, S.K. Smith, J.D. Buxbaum, V. Haroutunian, M.C. O’Donovan: “*A high proportion of polymorphism in the promoters of brain expressed genes influences transcriptional activity*” *Biochimica et Biophysica Acta* 1690 (2004)238-249.
22. P. R. Buckland: “*The importance and identification of regulatory polymorphism and their mechanism of action*” *Biochimica et Biophysica Acta* 1762 (2006)17-28.
23. F.S. Collins, L.D. Brooks, A. Chakravarti: “*A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation*” *Gnome Res.* 8 (1998) 1229-1231.
24. A.J. Brooks: “*The essence of SNPs*” *Gene* 234 (1999) 177-186.
25. K. Byoung-Chul, K. Woo-Yeon, P. Daeiu, C. Won-Hyong, S. Kwangsik, B. Jong: “*SNP@Promoter: a database of human SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) within the putative promoter regions*” *BMC Bioinformatics* 9 Suppl.I(2008).
26. M.V. Rockman, G.A. Wray: “*Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans*” *Mol. Biol. Evol.* 19 (2002) 1991-2004.

27. N.J. Bray, P.R. Buckland, M.J. Owen, M.C. O'Donovan: "*Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain*" *Hum. Genet.* 113 (2003) 149-153.
28. T. Pastinen, R. Sladek, S. Guard, A. Sammak, B. Ge, P. Lepage, K. Lavergne, A. Villeneuve, T. Gaudin, H. Brandstrom, A. Beck, A. Verner, J. Kingsley, E. Harmsen, D. Labuda, K. Morgan, M.C. Vohl, A.K. Naumova, D. Sinnet, T.J. Hudson: "*A*
29. S.E. Antonarakis, M. Krawczak, D.N. Cooper. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 2000;159:S173– 8.
30. E. Wingender, X. Chen, R. Hehl, H. Karas, I. Liebich, V. Matys, et al. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:316–9.
31. J. Schug, G.C. Overton. TESS: Transcription element search software on the WWW. Pennsylvania: Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania; 1998. 10 p. Available from: <http://www.cbil.upenn.edu/tess/techreports/1997/CBIL-TR-1997-1001-v0.0.pdf>.
32. G.B. Fogel, D.G. Weekes, G. Varga, E.R. Dow, A.M. Craven, H.B. Harlow, et al. A statistical analysis of the TRANSFAC database. *Biosystems* 2005; 81:137–54.
33. G.A. Wray, M.W. Hahn, E. Abouheif, J.P. Balhoff, M. Pizer, M.V. Rockman, L.A. Romano. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2003;20:1377– 419.
34. J. Alam, J.L. Cook. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 1990;188:245–54.
35. J.C. Knight. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:493–501.
36. M. Carey, S.T. Smale. Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and techniques. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. 640 p.
37. M.M. Garner, A. Revzin. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 1981;9: 3047– 60.
38. W. J. Oh, E. K. Kim, K. D. Park, S. H. Hahn, O. J. Yoo: "*Cloning and characterization of the promoter region of the Wilson disease*" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259 (1999) 206-211.

39. G. Loudianos, V. Dessì, M. Lovicu, A. Angius, A. Figus, F. Lilliu, S. De Virgiliis, A. M. Nurchi, A. Deplano, P. Moi, M. Pirastu, and A. Cao. Molecular Characterization of Wilson Disease in the Sardinian Population-Evidence of a Founder Effect. *Hum Mut* 1999 14:294-303
40. A.P. Bird: "CPG islands and the function of DNA methylation" *Nature* 321 (1986) 209-213
41. F. Larsen, et al.: " CPG islands as gene markers in the human genome " *Genomics* 13 (1992) 1095-1107.
42. S. Labbè, J. Prévost, P. Remondelli, A. Leone, C. Séguin: "*A nuclear factor binds to the metal regulatory elements of the mouse gene encoding metallothionein-I*" *Nucleic Acid Research* 15 (1991) 4225-4231.
43. A. D. Carter, B. K. Felber, M. J. Walling, M. F. Jubier, C. J. Schmidt, D. H. Hamer: "*Duplicated heavy metal control sequences of the mouse metallothionein-I gene*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7392-7396.
44. G.M. Stuart, P.F. Searle, R.D. Palmiter: "*Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying syntetic sequences*" *Nature* 317 (1985) 828-831.
45. W. J. Oh, E. K. Kim, J. H. Ko, S. H. Yoo, S. H. Hahn, O. J. Yoo: "*Nuclear proteins that bind to metal response element a (MREa) in the Wilson disease gene promoter are Ku autoantigens and the Ku-80 subunit is necessary for basal transcription of the WD gene*" *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2151-2161.
46. A. Ala, A.P. Walker, K. Ashkan, et al. Wilson's disease. *Lancet.* 2007;369:397-408
47. A.G. Bearn: Genetic analysis of the 30 families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ann. Hum. Genet.* 24,33-43,1960.
48. R.E. Tanzi, K. Petrukhin, I.Chernov, et al. *The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene.* *Nat Genet* 1993;5:344-50.

49. G. Rannucci, A. Zappu, M. B.Lepori, R. Iorio, G. Loudianos. Malattia di Wilson: ancora una sfida diagnostica. *Prospettive in pediatria* vol.42.N165 Gennaio Marzo 2012 Pacini Editore Medicina
50. S. Tanner: Disorder of Copper Metabolism in Disease of the Liver and Biliary System in Children. Kelly, Blackwell Science (eds). 1999, 167-185.
51. H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew. *Trace elements in human physiology and pathology*. Copper Biomed Pharmacother 2003;57:386–98.
52. P.C. Bull, G.R. Thomas, J.M. Rommens et al. *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nat Genet 1993;5:327–37.
53. K. Petrukhin, S. Lutsenko, I. Chernov, et al. *Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-Type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions*. Hum. Mol Gene 1994;3: 1647-1656.
54. S. Lutsenko, R.G. Efremov, R. Tsivkovskii, et al. *Human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein): biochemical properties and regulation*. J Bioenerg Biomembr 2002;34:351–62.
55. E. Roberts, M.L. Schilsky. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*. 2008;47:2089-2111.
56. A. Zappu, O. Magli, V. Dessì, et al. *High incidence and allelic homogeneity of Wilson disease in two isolated populations. A prerequisite for efficient disease prevention programs*. JPGN 2008;47: 334-338.
57. L. Wan, G. H. Tsai, C.M. Hsu, C.C. Huang, C.C. Liao, C.C. WU, Y.A. Hsu, C.C. Lee, S.C. Liu, W.D. Lin, F.J. Tsai. (2019).
58. L.M. Cullen, L. Prat, D.W. Cox. (2003). Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson disease. *Clin Genet* 64:429-432.
59. G. Loudianos, V. Dessì, M. Lovicu, A. Angius, A. Cao, M. Pirastu. (1998). The –75 A>C substitution in the 5' UTR of Wilson disease gene is a sequence polymorphism in the Mediterranean population. *Am J Hum Genet* 62:581.
60. M.M. Pena, J.Lee, D.J.Thiele: “*A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution*” *J Nutr* 129 (1999) 1251-1260.
61. J.D. Gitlin. Wilsons disease. *Gastroenterology* 125:1868–1877.
62. P. Ferenci. 2014. Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* doi:10.1111/nyas.12340 [Epub ahead of print].

63. S. Lutsenko. 2014. Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* doi: 10.1111/nyas.12420 [Epub ahead of print].
64. P. Ferenci. 2011. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as disease modifier —a deja-vu in Wilson disease? *J. Hepatol.* **55**: 753–755.
65. A. Aftab, M. Schilsky. Genetic modifiers of liver injury in hereditary liver disease. *Semin Liver Dis* 2011;31:208-14.
66. L.M.Cullen, L. Prat, D.W. Cox.(2003). Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson disease. *Clin Genet* 64:429-432.
67. J.H.Freedman, R.J. Weiner, J. Peisach. Resistance to Copper Toxicity of Cultured Hepatoma Cells. *J Biol Chem* 261: 11840-11848,1986.
68. P. Muller, H.V. Bakel, B. van de Sluis, F. Holstege, C. Wijmenga, L.W.J. Klomp. Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem* (2007) 12:495–507.
69. M.K. Song, J. Li, J.H. Freedman. Physiological and toxicological transcriptome changes in HepG2 cells exposed to copper. *Physiol Genomics* 38: 386–401, 2009.
70. Mark Schaefer, Robin G. Hopkins, Mark L. Failla and Jonathan D. Gitlin Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276:G639-G646, 1999.
71. M. Arciello, G. Rotilio, L. Rossi. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochem and Biophys Res Comm* 327 (2005) 454–459.
72. N.T.Watt and N.M. Hooper. The response of neurones and glial cells to elevated copper. *Brain Research Bulletin* 55:219–224, 2001.

73. G. Loudianos, V. Dessi, M. Lovicu, A. Angius, A. Figus, F. Lilliu et al. Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population--evidence of a founder effect. *Hum Mut* 1999; 14: 294–303.
74. R. Seth, S. Yang, M. Sabeen, E.A. Roberts. In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicology in Vitro* 18 (2004) 501–509.
75. R. Squitti, T. Hoogenraad, G. Brewer, A.I. Bush, R. Polimanti. Copper Status in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders 2013. *Int J Alzheimers Dis*. 2013;2013:838274. doi: 10.1155/2013/838274.
76. S. Montes, S. Rivera-Mancia, A. Diaz-Ruiz, L. Tristan-Lopez, C. Rios. Copper and Copper Proteins in Parkinson's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:147251.
77. J. Alzheimers Dis. 2014;38(4):809-22. doi: 10.3233/JAD-131247.
Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease.
Squitti R¹, Simonelli I, Ventriglia M, Siotto M, Pasqualetti P, Rembach A, Doecke J, Bush AI