

WOJCIECH KRZEPTOWSKI, OLGA PIERZCHAŁA, MAŁGORZATA LENARTOWICZ

*Uniwersytet Jagielloński  
Instytut Zoologii  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
E-mail: wojciech.krzeptowski@uj.edu.pl  
olga.pierzchala@uj.edu.pl  
malgorzata.lenartowicz@gmail.com*

## METABOLIZM MIEDZI ORAZ CHARAKTERYSTYKA DZIEDZICZNYCH ZESPOŁÓW CHOROBYCH, NA TLE NIEDOBORU MIEDZI, SPOWODOWANYCH ZABURZENIAMI AKTYWNOŚCI BIAŁKA ATP7A

### ROLA MIEDZI U SSAKÓW

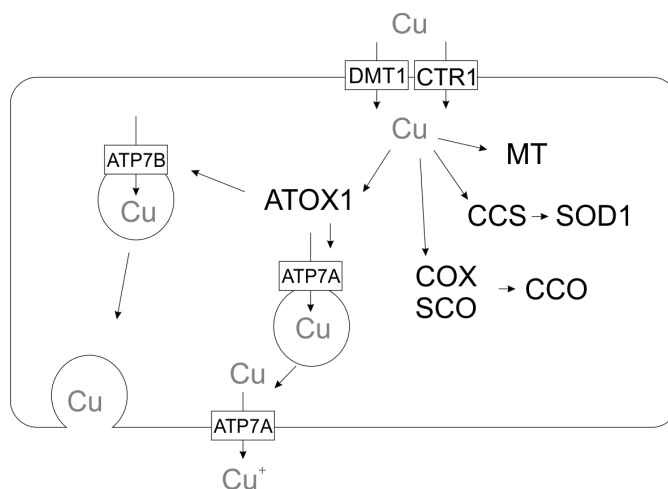
Miedź, jako mikroelement, jest metalem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Pierwiastek ten jest przyswajany z pożywienia w małych ilościach (0,6–1,6 mg/d) i jest on wchłaniany z pokarmu w jelicie cienkim (zwłaszcza w jego początkowym odcinku, dwunastnicy) oraz w mniejszej ilości w żołądku. Znacząca pula miedzi w organizmie jest stała i w zależności od potrzeb ulega gromadzeniu bądź uwolnieniu z poszczególnych organów i tkanek. Podobna regulacja zachodzi na poziomie komórkowym (TAPIERO i współaut. 2003). Miedź może występować zarówno w formie utlenionej Cu(II), jak i zredukowanej Cu(I), przez co pełni rolę kofaktora w wielu enzymach. Z tego też powodu pierwiastek ten jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania wielu szlaków metabolicznych odpowiedzialnych na przykład za wytwarzanie energii w komórce (oksydaza cytochromu c), usuwanie wolnych rodników (dysmutaza ponadtlenkowa), tworzenie kolagenu i elastyny (oksydaza lizylova), produkcję katecholamin ( $\beta$ -monooksygenaza dopaminy) czy też produkcję melaniny (tyrozynaza). Z drugiej strony, nadmiar miedzi jest toksyczny dla komórek, gdyż podczas tzw. reakcji Fentona, w

której pierwiastek ten bierze udział, powstają wolne rodniki, mogące uszkadzać błony komórkowe, materiał genetyczny oraz białka. Z uwagi na ogromnie ważną rolę jaką pełni opisywany pierwiastek w organizmie, jak i z uwagi na jego toksyczność, zwierzęta wykształciły precyzyjne mechanizmy regulujące poziom miedzi w komórkach, jak i w całym organizmie (TAPIERO i współaut. 2003).

Pobieranie, transport i usuwanie nadmiaru miedzi w komórce (Ryc. 1) podlega ścisłej kontroli genetycznej i zachodzi przy udziale specjalnych białek, które początkowo były badane głównie u drożdży. Obecnie wiadomo, że u ludzi transport i metabolizm miedzi jest kontrolowany przez trzy główne grupy białek. Pierwszą z nich stanowią białka błonowe CTR1 i DMT1, dzięki którym jony miedzi mogą być pobrane przez komórkę. Druga grupa to metalochaperony (ATOX1, CCS, białka z grupy COX oraz SCO), białka wiążące jony miedzi w obrębie cytoplazmy i transportujące je do różnych organelli. W skład trzeciej grupy wchodzi białka o budowie ATPaz (ATP7A i ATP7B), które regulują stężenie jonów miedzi w komórce, jak również pośredniczą we włączaniu kationów tego pierwiastka do cząsteczek białek enzy-

matycznych. Przedstawiona poniżej krótka charakterystyka poszczególnych grup białek

pozwoleli nakreślić złożoność procesu związanego z metabolizmem miedzi.



Ryc. 1. Białka zaangażowane w metabolizm miedzi w komórce.

Miedź jest transportowana do komórki poprzez dwa transbłonowe białka, CTR1 oraz DMT1. W cytoplazmie miedź jest wiązana w kompleksach, głównie z metalotioneiną (MT), co stanowi wewnątrzkomórkowy magazyn tego pierwiastka. Część jonów miedzi jest przyłączana do odpowiednich enzymów, gdzie pierwiastek ten pełni rolę kofaktora. Za dostarczanie jonów miedzi do odpowiednich enzymów odpowiedzialne są chaperony. W przypadku transportu miedzi do dysmutazy ponadtlenu (SOD1) za transport odpowiada białko CCS, do oksydazy cytochromu c (CCO) miedź transportowana jest przez białka z grupy COX oraz SCO. Białko chaperonowe ATOX1 transportuje jony miedzi do ATPaz ATP7A i ATP7B odpowiadających za utrzymanie właściwego stężenia jonów Cu w komórce, poprzez aktywny eksport lub przyłączanie tego pierwiastka do białek enzymatycznych.

#### TRANSPORT MIEDZI NA POZIOMIE KOMÓRKOWYM

Z uwagi na fakt, iż błona komórkowa jest nieprzepuszczalna dla większości substancji i jonów, miedź może być transportowana do cytoplazmy z udziałem specjalnych białek transportowych. Możemy do nich zaliczyć białko CTR1 (ang. copper transporter 1), CTR2 (ang. copper transporter 2) oraz DMT1 (ang. divalent metal membrane transporter 1, inaczej DCT1 lub Nramp2), jednakże lokalizacja tkankowa i komórkowa wymienionych transporterów, a także regulacja ich ekspresji jest różna (WEE i współaut. 2013).

Za główne białko transportujące miedź w organizmie uznaje się CTR1, ponieważ jego ekspresję stwierdzono w większości organów. Przypuszcza się, że CTR1 jest odpowiedzialne za transport 80% miedzi i innych metali do komórek. U myszy szczególnie wysoki poziom opisywanego białka występuje w wątrobie, jelicie cienkim, sercu i nerkach. CTR1 jest transbłonowym białkiem, które jako trimer tworzy kanał, umożliwiając transport miedzi i innych metali. W warunkach fizjologicznych białko to jest

zlokalizowane głównie w błonie komórkowej, jednakże jego obecność stwierdzono także w błonie pęcherzyków cytoplazmatycznych. W warunkach wysokiego stężenia miedzi w środowisku zewnątrzkomórkowym CTR1 jest szybko internalizowane do cytoplazmy i degradowane. Ponadto jego aktywność może być modyfikowana potranslacyjnie, poprzez glikozylację. Okazuje się, że CTR1 jest białkiem kluczowym nie tylko w transporcie miedzi w organizmie dorosłych ssaków, ale jest także niezbędne już w trakcie rozwoju, gdyż inaktywacja genu *Ctr1* u myszy powoduje obumieranie embrionów w macicy. Zaburzenia te mogą być spowodowane upośledzonym transportem miedzi, aczkolwiek przypuszcza się, że białko *Ctr1* może także wchodzić w interakcje z receptorami hormonów. Sugeruje to, że mutacja genu *Ctr1* może także być odpowiedzialna za nieprawidłowe funkcjonowanie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych w czasie rozwoju embrionalnego (WEE i współaut. 2013).

Znacznie mniej poznana jest funkcja białka CTR2. Ekspresja tego transportera została opisana m.in. w sercu i łożysku, natomiast jego lokalizacja w komórce w dużej mierze zależy od typu tkanki oraz od lokalnego stężenia miedzi. Białko to, podobnie jak CTR1, jest zlokalizowane w błonie otaczającej komórkę, jednakże największa ilość CTR2 znajduje się w błonie organelli wewnątrzkomórkowych, głównie endosomów i lizosomów. Stąd uważa się, że białko CTR2 pełni ważną rolę w wewnątrzkomórkowym obrocie miedzi między organellami a cytoplazmą. Na chwilę obecną nie opisano modyfikacji posttranslacyjnych opisywanego białka, brak jest również danych na temat jego roli w embriogenezie (WEE i współaut. 2013).

Do białek transportujących miedź w komórce zaliczamy także DMT1, które jest nie-selektywnym transporterem dwuwartościowych jonów metali, takich jak żelazo, miedź, mangan, kobalt, cynk oraz kadm. Z udziałem tego białka transport wspomnianych pierwiastków przez błonę zachodzi na zasadzie ko-transportu z protonami. Ekspresję DMT1 stwierdzono w większości komórek, m. in. w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych, erytrocytach, kardiomiocytach, a także w łożysku i mózgu (ZHENG i MONNOT 2012). Szczególnie wysoki poziom tego białka występuje natomiast w nerkach i dwunastnicy. Do tej pory opisano kilka izoform białka DMT1, które posiadają wspólny odcinek o długości 543 aminokwasów, jednakże różniące się C- i N-końcem. Obecnie uważa się, że w przypadku miedzi, DMT1 odgrywa szczególnie ważną rolę w pobieraniu tego metalu przez komórki układu pokarmowego (ARREDONDO i współaut. 2014).

Białko CTR1 transportuje miedź w formie Cu(I), jednakże w środowisku większość jonów występuje w formie Cu(II). Aby transport jonów miedzi przez błonę komórkową był możliwy muszą one ulec redukcji, a proces ten jest katalizowany poprzez enzymy z grupy metaloreduktaz. W przypadku transportu miedzi zidentyfikowano do tej pory metaloreduktazy STEAP (ang. six transmembrane epithelial antigen of the prostate) oraz DCYTB (ang. duodenal cytochrome b), jednakże ich rola w metabolizmie wspomnianego pierwiastka jest jeszcze ciągle słabo poznana. Białka z rodziny STEAP są zlokalizowane w błonie komórkowej oraz w błonie pęcherzyków cytoplazmatycznych, aczkolwiek ich ekspresja w poszczególnych organach nie jest opisana. Badania na pozio-

mie mRNA wskazują natomiast specyficzną tkankowo ekspresję genów kodujących białka STEAP 1, STEAP 2, STEAP 3, STEAP 4 w mózgu, nerkach, łożysku, dwunastnicy, prostaty, mięśniach i szpiku kostnym. Ekspresję genów kodujących wszystkie, wymienione powyżej białka z grupy STEAP, stwierdzono w wątrobie. Badania *in vitro* wskazują, że za transport miedzi do komórki odpowiadają głównie białka STEAP 2, STEAP 3, STEAP 4 (KNUTSON 2007). Najsłabiej opisanym białkiem, wśród białek zaangażowanych w transport miedzi w komórce, jest białko DCYTB. Wiadomo, że ekspresja genu *Cybrd1* (ang. cytochrome b reductase 1, gen kodujący białko Dcytb) u myszy jest aktywowana w przypadku niedoboru miedzi w komórkach dwunastnicy, co z kolei może prowadzić do wzmożonej absorpcji miedzi oraz żelaza. Przypuszcza się, że DCYTB współdziała z białkiem CTR1 w pobieraniu miedzi przez komórki układu pokarmowego (MATAK i współaut. 2013).

Miedź po przejściu przez błonę komórkową trafia do cytoplazmy, gdzie może zostać zdeponowana w kompleksach, bądź też trafia do odpowiednich enzymów, w których pełni rolę kofaktora. Jednym z takich enzymów jest dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase 1, SOD1). Białko to występuje powszechnie w komórkach i bierze udział w usuwaniu wolnych rodników (KAWAMATA i MANFREDI 2010). Za dostarczanie miedzi do dysmutazy ponadtlenkowej odpowiedzialne jest białko CCS (ang. copper chaperone for SOD1). CCS jest to małe białko należące do grupy chaperonów, u ludzi zbudowane z 274 aminokwasów. W jego budowie możemy wyróżnić trzy główne domeny białkowe. Domena 1, zawierająca charakterystyczny motyw MXCXXC, odpowiedzialna jest za wiązanie miedzi. Domena 2 odpowiada za tworzenie heterodimeru CCS-SOD1. Domena 3 zawiera fragment CXC i jest odpowiedzialna za translokację miedzi oraz katalizę powstawania konserwatywnych mostków dwusiarczkowych w obrębie SOD1, co umożliwia uformowanie prawidłowej struktury tego enzymu. W warunkach fizjologicznych za wiązanie miedzi odpowiedzialna jest domena z motywem MXCXXC, natomiast w przypadku podniesionego poziomu wspomnianego pierwiastka domena ta nie wiąże jonów miedzi niezależnie, lecz współdziała z motywem CXC (KAWAMATA i MANFREDI 2010, PALUMAA 2013). Ciekawym jest, że białko CCS oraz SOD1 mogą być zlokalizowane w mitochondrium, aczkolwiek nie posiadają

one sekwencji sygnałowej MTS (ang. mitochondrial targeting signal), kierującej białka do wspomnianego organellum. Postuluje się, że niedojrzała forma CCS (apoCCS) przechodzi przez zewnętrzną błonę mitochondrialną i wchodzi w interakcje z białkiem Mia40 zlokalizowanym w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium (ang. intermembrane space, IMS). Wynikiem tej interakcji jest wytworzenie odpowiednich mostków dwusiarczkowych w obrębie CCS, co skutkuje zatrzymaniem tego białka w obrębie IMS. Taka dojrzała forma białka CCS oddziałuje z niedojrzałą formą SOD1 (apoSOD1), która również ulega translokacji do przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Powstanie dojrzałej formy SOD1 skutkuje, podobnie jak w przypadku CCS, jej zatrzymaniem w IMS. Import CCS oraz SOD1 do przestrzeni międzybłonowej mitochondrium jest pośrednio regulowany aktywnością enzymów łańcucha mitochondrialnego. W warunkach zwiększonej ilości tlenu dojrzewanie CCS zachodzi w cytosolu, co z kolei powoduje dojrzewanie SOD1 w tym przedziale komórkowym. To sprawia, że SOD1 właśnie w cytoplazmie bardziej efektywnie usuwa wolne rodniki produkowane poza mitochondrium. W warunkach niskiej zawartości tlenu dojrzewanie CCS i SOD1 w cytosolu jest opóźnione i więcej formy apoCCS oraz apoSOD1 trafia do mitochondrium, gdzie dojrzewa i bierze udział w usuwaniu wolnych rodników. Zarówno forma cytosolowa, jak i mitochondrialna SOD1 otrzymują miedź z udziałem CCS (KAWAMATA i MANFREDI 2010). U zwierząt, w przeciwieństwie do drożdży, niedobór CCS tylko częściowo hamuje aktywność SOD1, co związane jest z istnieniem alternatywnych dróg dostarczania miedzi do tego enzymu, np. z wykorzystaniem glutationu (KAWAMATA i MANFREDI 2010).

W mitochondrium miedź wbudowana jest nie tylko w białku SOD1 ale pierwiastek ten jest niezbędny także do prawidłowego funkcjonowania łańcucha oddechowego mitochondriów, gdyż stanowi kofaktor oksydazy cytochromu *c* (ang. cytochrome *c* oxidase, CCO). Jest to ostatnia z trzech pomp protonowych łańcucha oddechowego, która katalizuje przeniesienie elektronów z ferrocycyochromu *c* do akceptora końcowego, czyli tlenu. U ssaków enzym ten stanowi duży kompleks białkowy, w którym trzy podjednostki (CCO I-III) stanowią centrum katalityczne, a jony miedzi zlokalizowane są w dwóch centrach miedziowych, tzw. CuA i CuB. Pozostałe jed-

nostki stabilizują całą strukturę i modyfikują jej aktywność. Za transport miedzi do oksydazy cytochromowej odpowiedzialne są białka chaperonowe z grupy SCO oraz z grupy COX. Obecnie przyjmuje się, że jony miedzi włączane są do centrum CuB w podjednostce I, przy udziale białek COX17 oraz COX11. Białko COX17 jest małym białkiem (7 kDa), zawierającym sześć konserwatywnych reszt cysteiny, zlokalizowanym w IMS mitochondrium oraz w cytosolu. Rola białka COX17 została najlepiej zbadana u drożdży i uważa się, że białko to pośredniczy w transporcie miedzi między cytoplazmą a IMS, a także odpowiedzialne jest ono za dostarczanie miedzi do COX11. Chaperon COX11 z kolei przekazuje jony miedzi do cząsteczki oksydazy cytochromu *c*, jednak mechanizm ten jest słabo poznany. Białko COX11 zostało najlepiej scharakteryzowane u drożdży, gdzie jest białkiem transbłonowym zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, którego N-koniec zwrócony jest do matrix mitochondrialnego, a C-koniec do IMS. COX11 posiada dwie reszty cysteiny w motywie CFCF, a jego funkcjonalna forma jest dimerem (PALUMAA 2013). Jeszcze bardziej skomplikowane jest włączanie atomu miedzi do centrum CuA, zlokalizowanego w podjednostce II CCO. Biorą w nim udział białko COX17 i białka SCO zakotwiczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Miejsca wiążące miedź białek SCO1 oraz SCO2 związane są z obecnością dwóch cystein w motywie CXXXCP oraz w konserwatywnej reszcie histydyny. Uważa się, że białka te są niezbędne w procesie potranslacyjnej modyfikacji cząsteczki CCO (STIBUREK i ZEMAN 2010, PALUMAA 2013). Geny *SCO1* i *SCO2*, kodujące wspomniane powyżej białka, mają konstytutywną ekspresję w tkankach organizmu, a ich mutacje powodują niedobory miedzi oraz wiele specyficznych tkankowo nieprawidłowości w funkcjonowaniu oksydazy cytochromu *c*. U ludzi mutacje genu *SCO2* i *SCO1* prowadzą do występowania kardiomiopatii. Ponadto mutacje genu *SCO1* odpowiedzialne są za wystąpienie w okresie noworodkowym niewydolności wątroby (LEARY 2010). Dla prawidłowego rozwoju organizmu potrzebne są również białka z grupy COX, gdyż u myszy inaktywacja genu *Cox17* powoduje obumieranie zarodków w macicy. W procesie dostarczania miedzi do łańcucha oddechowego mitochondriów uczestniczą także inne białka, jak na przykład COX19 i COX23, które są małymi białkami posiadającymi cztery reszty cysteiny występujące w dwóch motywach



CXXXXXXXXXC, jednak ich rola nie jest do końca poznana (PALUMAA 2013).

Jony miedzi w cytoplazmie mogą również zostać związane przez inne białko opiekuńcze, a mianowicie białko ATOX1 (ang. antioxidant protein 1). Jest to zbudowane z 68 aminokwasów białko zawierające domenę MBS (ang. metal binding site) z konserwatywną sekwencją MXCXXC wiążącą jony miedzi. Jedna cząsteczka białka przyłącza jeden jon miedzi poprzez wiązanie koordynacyjne do dwóch reszt cysteinowych (HUFFMAN i O'HALLORAN 2001). Główną funkcją białka ATOX1 w komórce jest przyłączanie miedzi i jej transport do szlaku sekrecyjnego aparatu Golgiego, gdzie odbiorcami tych jonów są białka ATP7A i ATP7B. Ponadto, może ono ulec homodimeryzacji i pełnić rolę magazynu miedzi w komórce (LUTSENKO i współaut. 2007a). Białko ATOX1 funkcjonuje jako komponent ścieżki chroniącej komór-

kę przed negatywnym wpływem stresu oksydacyjnego, gdyż struktura czwartorzędowa tego białka umożliwia ochronę atomu metalu przed utleniaczami lub związaniem przez „konkurencyjne” związki takie jak glutation (KELNER i współaut. 2000). Brak ATOX1 skutkuje akumulacją miedzi i zahamowaniem sekrecji tego pierwiastka. U ludzi nie opisano schorzeń związanych z brakiem aktywności ATOX1, natomiast inaktywacja genu *Atox1* u myszy powoduje wiele efektów fenotypowych, jak zaburzenia rozwoju i wzrostu, wrodzone wady wzroku, hipopigmentację czy też epilepsję. Najnowsze badania wskazują również, że dzięki obecności domeny NLS białko to może być transportowane do jądra komórkowego, gdzie najprawdopodobniej pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, który może wpływać na ekspresję innych genów (MULLER i KLOMP 2009).

#### BUDOWA BIAŁKA ATP7A

Białka ATP7A i ATP7B zasługują na szczególną uwagę nie tylko z powodu doniosłej roli jaką pełnią w metabolizmie miedzi, ale również dlatego, że brak bądź tylko zaburzenie ich aktywności prowadzi u człowieka do ciężkich i najczęściej nieuleczalnych schorzeń metabolicznych. Dlatego też w obecnym artykule skoncentrujemy się na dokładnym omówieniu budowy i funkcji tych białek.

Białka ATP7A oraz ATP7B należą do rodziny ATPaz typu P<sub>1B</sub>, których główną funkcją jest transport jonów metali, takich jak miedź, kadm, kobalt, ołów oraz cynk. Grupa ta jest najliczniejszą z wszystkich grup rodziny P-ATPaz i zawiera około 100 różnych białek (LUTSENKO i współaut. 2007b, SMITH i współaut. 2014). ATPazy transportujące jony miedzi przez błony są białkami wysoce konserwatywnymi ewolucyjnie i występują zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Ich główną funkcją jest usuwanie miedzi z komórki w przypadku jej nadmiaru, a także włączanie jonów tego pierwiastka do centrum aktywnego enzymów, w których pełni on rolę kofaktora (LUTSENKO i współaut. 2008, WANG i współaut. 2011). U ludzi są to białka ATP7A oraz ATP7B, które należą do integralnych białek błonowych, wykorzystujących energię, pochodzącą z procesu hydrolizy ATP, do transportu miedzi przez błony lipidowe (VAN DEN BERGHE i KLOMP 2009, LA FONTAINE i współaut. 2010,

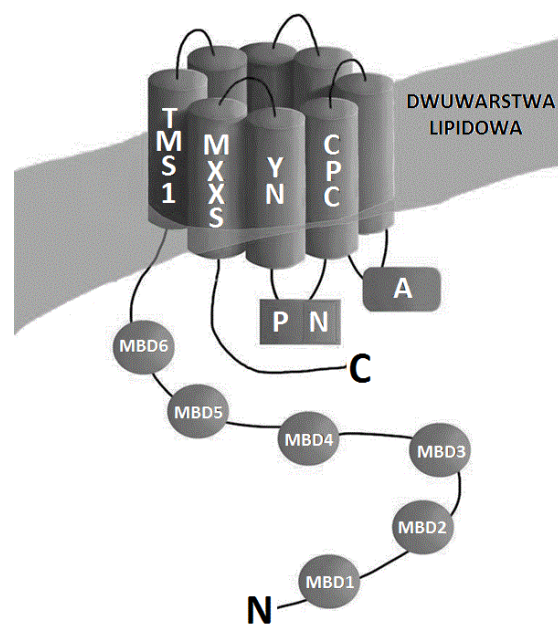
GOURDON i współaut. 2012). W przypadku, gdy poziom jonów Cu przekroczy wartość fizjologiczną, białko ATP7A (normalnie znajdujące się w cysternach trans aparatu Golgiego), na drodze transportu w pęcherzykach klatrynowych jest transportowane do błony komórkowej, gdzie bierze udział w aktywnym usuwaniu jonów miedzi. W momencie, gdy homeostaza zostanie przywrócona, białko to na drodze endocytozy wraca do aparatu Golgiego (LA FONTAINE i współaut. 2010).

Białka ATP7A i ATP7B kodowane są na matrycy zupełnie różnych genów, a ich ekspresja podlega osobnej regulacji. U człowieka gen *ATP7A* jest zlokalizowany na chromosomie X w pozycji Xq13.2-13.3 i jest on kodowany przez odcinek o długości około 150 kpz, złożony z 23 egzonów. Z kolei gen *ATP7B* o wielkości 80 kpz składa się z 21 egzonów. Zlokalizowany jest on na 13 chromosomie autosomalnym w pozycji 14.3. Wielkość produktów transkrypcji obu tych genów waha się pomiędzy 7.5 a 8.5 kpz. Badania przeprowadzone na myszach wskazują, że ekspresja obu wspomnianych genów zachodzi już na etapie życia zarodkowego (dla genu *Atp7a* w dniu E7, natomiast *Atp7b* w dniu E9.5) i utrzymuje się aż do śmierci organizmu, jednak poziom tej ekspresji jest różny w zależności od wieku. Najwyższa ekspresja obu tych genów przypada na takie tkanki jak wątroba (tu w szcze-

gólności występuje bardzo wysoka ekspresja genu *ATP7B*), mózg oraz nerka. Gen *ATP7A* jest zaliczany do grupy genów metabolizmu podstawowego (ang. house-keeping genes), ponieważ jego ekspresja ma miejsce w praktycznie wszystkich tkankach organizmu (LINZ i współaut. 2008, LA FONTAINE i współaut. 2010). Oba geny podlegają mechanizmowi alternatywnego składania egzonów (tzw. alternatywny splicing), dzięki któremu z jednego genu możemy otrzymać kilka różnych form białek, które mogą pełnić podobne lub całkiem różne funkcje. Niektóre z tych białek są produkowane w formie niefunkcjonalnej i nie jest wiadome w jakim celu powstają. Dla przykładu, w oku oraz w szyszynce produkowane jest białko PINA, powstające na matrycy genu *ATP7B*. Białko to nie posiada części, która odpowiada N-końcowi białka *ATP7B*; skutkuje to brakiem domen wiążących jony Cu oraz utratą sześciu domen transbłonowych. Możliwe jest, że PINA należy do nowej podgrupy P-ATPaz transportujących jony metali ciężkich, jednak nieposiadającej charakterystycznych domen wiążących miedź. Białko to może być związane z działaniem zegara biologicznego, gdyż zarówno w szyszynce, jak i w siatkówce oka ekspresja obu form białek PINA jest zależna od pory dnia (LI i współaut. 1998, BORJIGIN i współaut. 1999, AHMED i współaut. 2005). Funkcja białka PINA nie jest dokładnie poznana, jednak przypuszcza się, że ma ono właściwości pozwalające tej cząsteczce na transport jonów miedzi (BORJIGIN i współaut. 1999, AHMED i współaut. 2005). Procesowi alternatywnego splicingu ulega również gen *ATP7A*. Powstałe transkrypty są najczęściej jednak związane z opisanymi poniżej, chorobą Menkesa lub jej lżejszą formą, zespołem rogu potylicznego. Występujące w tych przypadkach formy białka *ATP7A* najczęściej nie posiadają części wiążących miedź oraz domen transbłonowych. Takie białka najczęściej nie mają możliwości transportu jonów miedzi (LUTSENKO i współaut. 2008, LA FONTAINE i współaut. 2010, GOURDON i współaut. 2012).

Badania wykazały, że podobieństwo między białkami *ATP7A* i *ATP7B* wynosi około 60%, aczkolwiek białko *ATP7A* podlega procesowi glikozylacji, co wpływa na wzrost jego masy molekularnej (LA FONTAINE i współaut. 2010). Cechą charakterystyczną omawianych białek jest obecność specyficznych domen pełniących określone funkcje (Ryc. 2). Na końcu N tych białek, u ssaków, znajduje się 6 domen wiążących jony miedzi (domeny

MBD1-MBD6) (LUTSENKO i współaut. 2007b, LA FONTAINE i współaut. 2010, GUPTA i LUTSENKO 2012) Każda domena zbudowana jest z 72 aminokwasów, a miejsca (tzw. kieszenie) wiążące jony metalu znajdują się w części dystalnej domeny MBD, która może wiązać jeden jon miedzi (WANG i współaut. 2011). Ponadto, najnowsze doniesienia wskazują również, iż domeny te mogą być swego rodzaju centrum regulującym pracę ATPazy, jednak mechanizm tej regulacji nie jest bliżej poznany. Na N-końcu białek *ATP7A* i *ATP7B* występują również, charakterystyczne dla rodziny P-ATPaz, bardzo konserwatywne sekwencje CXXC, które umożliwiają przyłączanie jonów miedzi do białka. Pomędzy kolejnymi domenami MBD znajdują się pętle o różnej długości. Przypuszcza się, że mogą znajdować się tutaj dodatkowe domeny odpowiedzialne za wiązanie jonów miedzi lub przynajmniej



Ryc. 2. Budowa białka *ATP7A*.

Białko *ATP7A* jest zakotwiczone w dwuwarstwie lipidowej poprzez osiem domen TMS. Jednocześnie te same domeny dzięki obecności unikatowych sekwencji (motyw CPC w obrębie domeny 6, motyw YN w obrębie domeny 7 oraz motyw MXXS w obrębie domeny 8) umożliwiają transport jonów miedzi przez błonę. Kationy tego pierwiastka są wiązane poprzez domeny MBD zlokalizowane w N-końcowym fragmencie białka. Pozostałe domeny biorą udział w cyklu katalitycznym białka *ATP7A* poprzez wiązanie cząsteczki ATP do domeny N, a następnie przyłączenie reszty fosforanowej do domeny P. Z kolei za defosforylację białka odpowiada domena A.

ułatwiający zajście tego procesu (LUTSENKO i współaut. 2008). Obecność domen MBD5 oraz MBD6, charakteryzujących się największym powinowactwem do jonów metali, jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania Cu-ATPazy (LUTSENKO i współaut. 2007b). Potwierdzają to wyniki badań na hepatocytach pochodzących od szczurów (linia WIF-B), u których występuje forma Atp7b nieposiadająca domen MBD1-MBD4. Okazało się, że funkcjonalność takiego białka nie została naruszona w stopniu uniemożliwiającym transport miedzi (GUO i współaut. 2005). Wysunięto również przypuszczenie, iż jony wspomnianego pierwiastka w pierwszej kolejności przyłączają się do domeny piątej oraz szóstej, co stabilizuje współpracę między domenami umożliwiając proces transportu jonów (LUTSENKO i współaut. 2007b).

Kolejne domeny białek ATP7A i ATP7B, łączące się z domeną MBD6, to 8 transbłonowych domen TMS, które zakotwiczą wspomniane białka w dwuwarstwie lipidowej (WANG i współaut. 2011). Charakterystyczne i bardzo konserwatywne motywy występują w domenie TMS6 (motyw CPC), domenie TMS7 (motyw YN) oraz w TMS8 (motyw MXXS) (LUTSENKO i współaut. 2008). Dzięki odpowiedniemu ułożeniu aminokwasów, domeny transbłonowe uzyskują odpowiednie ułożenie przestrzenne, które jest kluczowe dla transportu jonów miedzi. Ponadto, jakiegokolwiek zmiany w sekwencji aminokwasów wewnątrz domen skutkują częściową lub całkowitą utratą funkcji danego białka (TÜMER i MØLLER 2010). Domeny TMS1 oraz TMS2, mimo że również biorą udział w transporcie miedzi, w przeciwieństwie do domen TMS3-TMS8, nie posiadają sekwencji konserwatywnych (WANG i współaut. 2011). Ze względu na swój przestrzenny układ, wspólna budowa tych domen nazywana jest strukturą „spinki do włosów” (ang. hairpin). Całość tej struktury łączy się poprzez domenę TMS1 z domeną MBD6, ta część opisywanych białek jest bogata w cysteinę, dzięki której możliwe jest powstawanie mostków dwusiarczkowych, utrzymujących strukturę i umożliwiającą wzajemne interakcje domen TMS1 i MBD6 (LUTSENKO i współaut. 2007b, WANG i współaut. 2011).

Domena A (ang. actuator domain) jest zlokalizowana na cytoplazmatycznej pętli, pomiędzy domeną TMS4 i TMS5 (TELIANIDIS i współaut. 2013). Podlega zmianom konfiguracji zależnym od przyłączenia ATP (BANCI i współaut. 2009). Jakikolwiek mutacje w ob-

rebie tego rejonu, a szczególnie obszaru sekwencji TGE, powodują w konsekwencji wystąpienie objawów ogólnoustrojowych, jakie można obserwować u pacjentów z chorobą Menkesa. Sugeruje to, iż konserwatywność domeny A, która występuje w strukturze wszystkich P<sub>1B</sub>-ATPaz, jest bardzo znacząca w procesie transportu miedzi ze względu na utrzymanie prawidłowego mechanizmu fosforylacji białka (ARGÜELLO i współaut. 2007).

Ostatnią charakterystyczną strukturą występującą w białkach ATP7A oraz ATP7B jest tzw. domena ATP. Zlokalizowana jest ona na odcinku łączącym TMS6 z TMS7. W jej skład wchodzi subdomeny N oraz P, a jej funkcja przyłączania cząsteczki ATP jest wypadkową działania obu tych domen. Można tu wyróżnić dwie charakterystyczne sekwencje aminokwasowe oznaczane jako motywy DKTG (znajdująca się w obrębie subdomeny P) oraz GDGXXD (w obrębie subdomeny N). Motywy te są odpowiedzialne za katalityczną aktywność obu Cu-ATPaz (LA FONTAINE i współaut. 2010; GOURDON i współaut. 2012). Subdomena P jest bardzo konserwatywną strukturą, charakterystyczną dla wszystkich białek rodziny P<sub>1B</sub>-ATPaz i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie procesu fosforylacji białka (ARGÜELLO i współaut. 2007, LUTSENKO i współaut. 2008). W jej obrębie znajdują się reszty kwasu asparaginowego (motyw DKTG), które ulegają katalitycznemu procesowi fosforylacji podczas hydrolizy przyłączonej cząsteczki ATP (LA FONTAINE i współaut. 2010, GOURDON i współaut. 2012). Subdomena N wykazuje największą strukturalną różnorodność pomiędzy ATPazami typu P, co wynika z odmiennego układu sekwencji aminokwasowych pomiędzy poszczególnymi białkami grup tej nadrodziny białek. Układ aminokwasów DXXXK, występujący we wszystkich P-ATPazach, zlokalizowany jest na końcu domeny N. Ta część białka odpowiada prawdopodobnie za ruchliwość pomiędzy leżącymi blisko siebie składowymi domenami ATP podczas zachodzących procesów fosforylacji oraz defosforylacji (VOSKOBOINIK i współaut. 2003).

Funkcja oraz struktura C-końca ATPazy jest słabo poznana. Jego długość wynosi około 90 reszt aminokwasowych i prawdopodobnie jest on odpowiedzialny za stabilizację całego białka w błonie oraz jego transport wewnątrzkomórkowy (GUO i współaut. 2005). Ponadto, badania nad zmutowanymi komórkami linii MDCK wykazały, że ATPazy, których C-końiec ma nieprawidłowo-



wą budowę są „uwięzione” w błonie komórkowej i nie są w stanie powrócić do błon aparatu Golgiego. Co więcej, nie są one zlokalizowane w błonie podstawno-bocznej, do których w normalnych warunkach trafia białko ze związaną miedzią, tylko w błonie apikalnej komórki. Powyższe fakty sugerują, że koniec C białka może brać udział nie tylko w utrzymaniu stabilności białka, ale także odpowiada za odpowiednią lokalizację białka w błonie komórkowej. Nie wiadomo również, czy za ten proces odpowiadałby sam koniec C, czy też wymagane są odpowiednie interakcje tej części białka z innymi domenami (AGARWAL i współaut. 2010). Koniec C ATPaz zawiera również charakterystyczny motyw HXXC, specyficzny dla struktury wszystkich białek transportujących jony miedzi (LUTSENKO i współaut. 2008). Przypuszcza się, że motywy te biorą udział w procesie transportu jonów miedzi.

Jak już wspomniano, białka ATP7A i ATP7B charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa wynoszącym aż 60% (LA FONTAINE i współaut. 2010). Różnice pomiędzy nimi wynikają natomiast z różnic w samym funkcjonowaniu tych cząsteczek, a można je zaobserwować już w samej strukturze końca N. Przestrzenny układ tej części opisanych białek nie jest znany, jednak wiadomo,

że jest on znacznie dłuższy w białku ATP7B, co wynika z różnych długości pętli, pomiędzy poszczególnymi domenami MBD. W tym rejonie, w białku ATP7B, występuje motyw 9 aminokwasów (w pozycji 37FAFDNVGYE45), dzięki któremu ATPaza jest transportowana do apikalnej błony hepatocytów, sekwencja ta nie występuje natomiast w białku ATP7A. Najnowsze doniesienia wskazują, iż dzięki wspomnianej sekwencji aminokwasowej w obrębie ATP7B, białko to jest sortowane do błony pęcherzyków mających ulec eksportowi z błon TGN w czasie wewnątrzkomórkowego wzrostu stężenia jonów miedzi (WANG i współaut. 2011). Procent podobieństwa C końca wynosi natomiast około 56% pomiędzy ATPazami (LUTSENKO i współaut. 2008). Tu z kolei występuje trileucynowy motyw LLL1454-1456 znajdujący się w białku ATP7B. Odpowiada on prawdopodobnie za transport tego białka wewnątrz komórki z TGN do błony komórkowej, a mutacja w tym rejonie prowadzi do zatrzymania tego białka w pęcherzykach egzocytarnych (PETRIS i MERCER 1999). Dla białka ATP7A charakterystyczne w tym miejscu są natomiast powtórzenia dileucynowe, które służą temu białku jako sygnał powrotu do błony TGN (WANG i współaut. 2011).

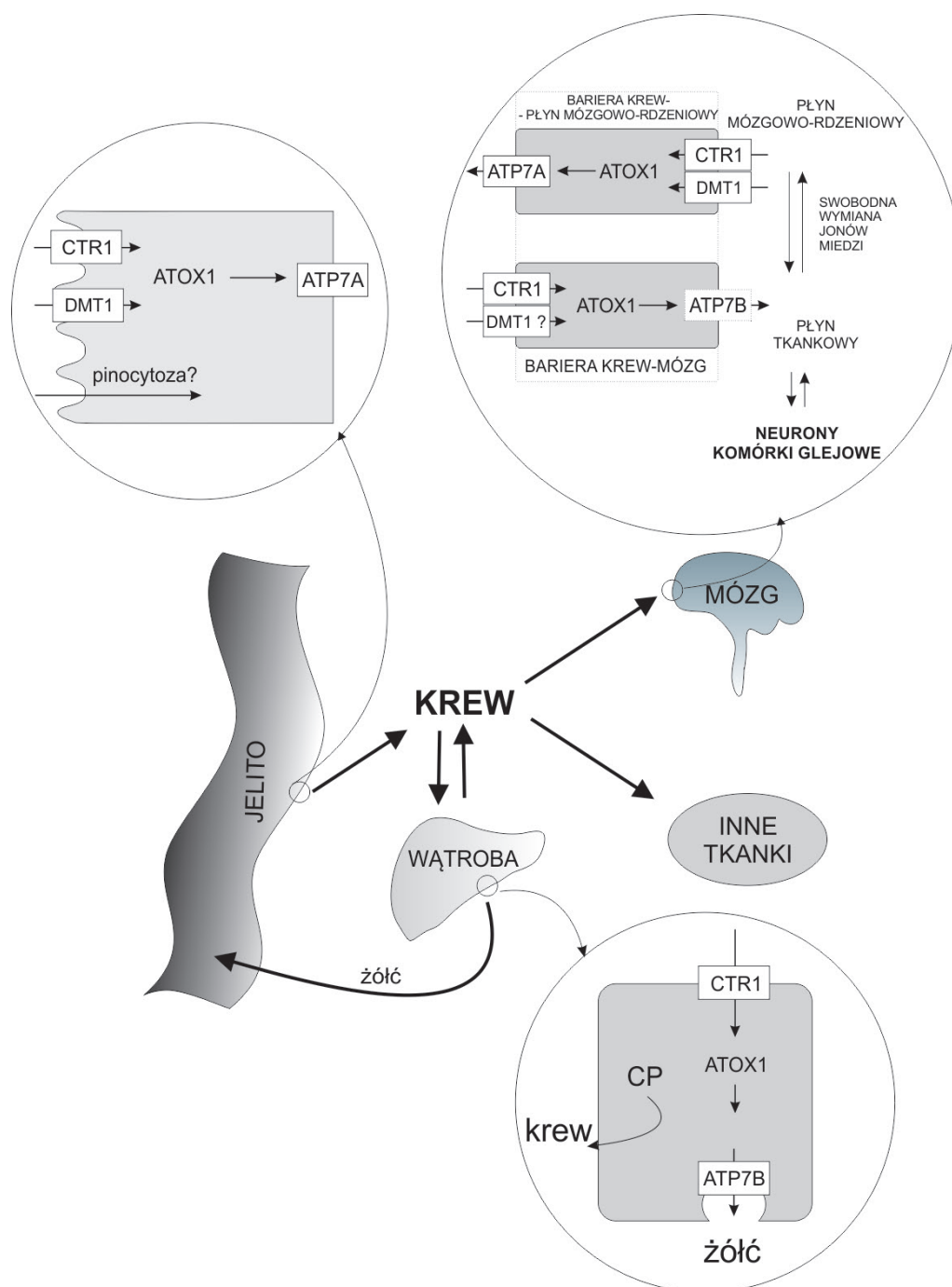
#### TRANSPORT MIEDZI W ORGANIZMIE

Większość miedzi zawartej w pokarmie znajduje się w formie utlenionej Cu(II) i aby mogła być zaabsorbowana w układzie pokarmowym, musi zostać zredukowana do formy Cu(I). Jak już wspomniano, za proces ten odpowiedzialne enzymy z grupy reduktaz, najprawdopodobniej białko DCYTB oraz białka STEAP, których obecność została potwierdzona w dwunastnicy. Następnie zredukowana forma miedzi jest transportowana przez błonę enterocytów dzięki aktywności białka CTR1. Przypuszcza się również, że dwuwartościowe jony miedzi mogą być transportowane dzięki aktywności białka DMT1. Następnie za transport miedzi przez błonę podstawno-boczną enterocytów i uwolnienie miedzi do krwioobiegu odpowiada białko ATP7A (TAPIERO i współaut. 2003, LÖNNERDAL 2008). W krwioobiegu miedź praktycznie nie występuje w formie wolnej, lecz jest przyłączana do białek, peptydów i aminokwasów takich jak glutation, albuminy, makroglobuliny, transkuperyna czy też histydyna. W tej

postaci miedź wraz z krwią rozprowadzana jest po całym organizmie. Schemat prezentujący transport miedzi w organizmie został przedstawiony na Ryc. 3.

Głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm miedzi jest wątroba. Organ ten gromadzi najwięcej miedzi (WIJMENGA i KLOMP 2004) w życiu postnatalnym, a także odgrywa istotną rolę w magazynowaniu tego pierwiastka w okresie prenatalnym. Ponadto, w wątrobie następuje synteza ceruloplazminy oraz produkcja żółci, w której miedź jest (obok żelaza) najliczniej reprezentowanym metalem (DIJKSTRA i współaut. 1996). Miedź z wątroby wydzielana jest do krwi w kompleksie z ceruloplazminą, a proces włączania tego pierwiastka do ceruloplazminy zachodzi przy udziale białka ATP7B. Kompleks Cu-ceruloplazmina stanowi aż 65-70% puli miedzi w osoczu i pełni rolę głównego czynnika utrzymującego homeostazę tego pierwiastka w organizmie. W wątrobie zachodzi również produkcja metalotioneiny,





Ryc. 3. Schemat transportu miedzi w organizmie.

Miedź zawarta w pokarmie jest transportowana do cytoplazmy enterocytów z udziałem białek CTR1 i DMT1 oraz najprawdopodobniej z wykorzystaniem pinocytozy. Dzięki aktywności białka ATP7A pobrana przez komórki układu pokarmowego miedź trafia do krwioobiegu, gdzie wiąże się z białkami osocza i w tej formie dociera do wszystkich tkanek organizmu. Głównym organem związanym z metabolizmem miedzi oraz gromadzeniem tego pierwiastka jest wątroba. Miedź pobierana jest przez hepatocyty głównie dzięki działaniu białka CTR1, natomiast nadmiar tego pierwiastka jest usuwany do żółci a proces ten jest zależny od białka ATP7B. Ponadto, w wątrobie produkowana jest ceruloplazmina (CP), która jest głównym białkiem wiążącym miedź w osoczu. Miedź jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Pierwiastek ten wraz z krwią dociera do mózgu, jednakże jego transport jest aktywnie regulowany poprzez barierę krew-mózg oraz barierę krew-płyn mózgowo rdzeniowy. W proces ten zaangażowane są zarówno transportery CTR1 oraz DMT1 jak i białka ATP7A oraz ATP7B.

drobnozasteczkowego, bogatego w cysteinę białka (KELLY i PALMITER 1996) odwracalnie wiążącego miedź, a szczególnie jej nadmiar występujący w danej chwili w organizmie. Wraz z krwią miedź jest transportowana do innych organów. W nerkach, w procesie filtracji kłębuszkowej, pierwiastek ten trafia do przesączu pierwotnego, jednak ponownie w kanalikach proksymalnych ulega reabsorpcji przy udziale białka ATP7A i trafia do krwioobiegu. Tylko 2% miedzi usuwane jest wraz z moczem, a organem zaangażowanym w wydalanie nadmiaru tego pierwiastka z organizmu jest wątroba. Jak już wspomniano, to w wątrobie miedź przechodzi do syntetyzowanej tu żółci i jest wydzielana razem z nią do przewodu pokarmowego. Jest to główna droga wydalania miedzi z organizmu i w ten sposób z organizmu jest usuwane 98% tego metalu (DIDONATO i SARKAR 1997, WIJMENGA i KLOMP 2004). Aby zapobiec ponownemu wchłanianiu tego pierwiastka, w jelicie zawarta w żółci miedź jest związana w kompleksie z ceruloplazminą, co uniemożliwia absorpcję (TAPIERO i współaut. 2003).

Wraz z krwią, miedź jest transportowana w obrębie całego organizmu, w tym do mózgu. Organ ten, zaraz po wątrobie, gromadzi największe ilości wspomnianego pierwiastka, a sama miedź jest niezbędna zarówno do prawidłowego rozwoju układu nerwowego, jak i jego funkcjonowania w życiu postnatalnym. W mózgu, podobnie jak w innych tkankach, miedź jest niezbędna do prawidłowej pracy komórek poprzez pełnienie roli kofaktora enzymów podstawowych ścieżek metabolicznych. Jednakże poza tym istnieje szereg procesów specyficznych dla mózgu, gdzie miedź jest niezbędna dla funkcjonowania centrum

aktywnego enzymów. Przykładem może być amidacja neuropeptydów oraz produkcja noradrenaliny, dzięki działaniu odpowiednio enzymów PAM (ang. peptidyl-a-amidating monooxygenase) oraz MOXD1 (ang. DBH-like monooxygenase). W mózgu miedź jest także niezbędna w procesach synaptogenezy oraz pełni kluczową rolę dla pracy oksydazy lizyowej, która z kolei odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie macierzy zewnątrzkomórkowej (LUTSENKO i współaut. 2010). Miedź transportowana jest do mózgu wraz z krwią, a ilość wspomnianego metalu, która jest bezpośrednio wykorzystywana przez neurony i komórki glejowe, jest regulowana przez barierę krew-mózg (ang. blood-brain barrier, BBB) oraz barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. blood-cerebrospinal fluid barrier, BCB). W fizjologicznych warunkach bariery te są nieprzepuszczalne dla miedzi i tylko transport z użyciem odpowiednich białek umożliwia wymianę jonów Cu. Głównym transbłonowym transporterem miedzi w mózgu, podobnie jak w przypadku jelita, jest białko CTR1. Pobieranie miedzi do komórek tworzących barierę może także zachodzić z użyciem DMT1, jednakże wydaje się, że białko to odgrywa główną rolę w BCB. Z kolei za eksport miedzi z komórek tworzących barierę odpowiadają białka ATP7A oraz ATP7B, jednakże ich ekspresja w obrębie BBB oraz BCB jest różna. Ilość ATP7A jest znacznie większa w BCB, natomiast w przypadku BBB przeważa białko ATP7B. Zaburzenia procesów homeostazy jonów miedzi w mózgu mogą prowadzić do wielu dysfunkcji układu nerwowego, które są obserwowane także u chorych cierpiących na zespół Menkesa i Wilsona (LUTSENKO i współaut. 2010, ZHENG i MONNOT 2012).

#### ZABURZENIA METABOLIZMU MIEDZI U LUDZI

U człowieka opisano kilka jednostek chorobowych związanych z nieprawidłowym metabolizmem miedzi, szczególnie spowodowanych niedoborem tego pierwiastka. Część z nich wywołana jest przez mutacje genu kodującego białko ATP7A, powodujące choroby recesywne dziedziczone na chromosomach X, np. choroba Menkesa. W chorobie Menkesa główną przyczyną defektu metabolicznego jest brak wchłaniania jonów miedzi w przewodzie pokarmowym, spowodowany brakiem aktywności białka ATP7A. Brak lub znaczne obniżenie aktywności białka wywo-

łane jest z kolei mutacjami w obrębie genu *ATP7B*, a częstość występowania tej rzadkiej choroby metabolicznej w populacji europejskiej ocenia się jako 1: 300 000 żywych urodzeń (TÜMER 2013). W Japonii schorzenie to występuje jeszcze rzadziej, bo 1 na 360 000 przypadków (GUY i współaut. 2005), natomiast stosunkowo często choroba ta pojawia się w Australii – 1 na 100 000 urodzonych dzieci (a według innych źródeł nawet z częstością 1: 50 000) (DANKS 1988, TÜMER 2013). W ogromnej większości pacjentami są chłopcy, aczkolwiek chorobę tę zdiagno-

zowano również u 13 dziewczynek (MØLLER i współaut. 2012), a jej ujawnienie się było spowodowane translokacją chromosomową lub mozaicyzmem 45X/46XX, gdzie prawdopodobnie ekspresja zmutowanego genu nastąpiła w komórkach o kariotypie 45X. Choroba ta może być także związana z nietypową inaktywacją chromosomu X (MØLLER i współaut. 2012). Zwykle jednak kobiety tylko przenoszą mutację i nie wykazują objawów chorobowych. Obecnie, w zależności od stopnia nasilenia objawów chorobowych, a co za tym idzie również od długości życia pacjentów, wyróżnia się trzy formy choroby Menkesa: ostrą, przebiegającą łagodniej, pośrednią oraz najłagodniejszą, tzw. syndrom rogu potylicznego (ang. occipital horn syndrome, OHS) (TÜMER i MØLLER 2010, KODAMA i współaut. 2012). W formie ostrej, nazwanej też chorobą Menkesa o przebiegu klasycznym, chorzy chłopcy umierają zwykle przed osiągnięciem 5 roku życia. Niestety forma ta występuje u 95% wszystkich chorych ze zdiagnozowaną chorobą Menkesa i u tych pacjentów występuje cały zespół objawów patologicznych obejmujących zarówno zaburzenia neurologiczne, jak i szereg objawów wynikających z upośledzonej budowy tkanki łącznej. Dzieci takie rodzą się w większości w terminie i z prawidłową wagą urodzeniową (TÜMER i MØLLER 2010), jednak opisywano również przypadki przedwczesnych urodzeń (GU i współaut. 2005). U niektórych noworodków obserwowano również występowanie przepukliny pępkowej lub pachwinowej oraz deformację klatki piersiowej, tzw. klatka piersiowa lejkowata (TÜMER i MØLLER 2010). Choroba ta, z powodu braku charakterystycznych objawów występujących wkrótce po urodzeniu, diagnozowana jest zwykle u dzieci 3–6 miesięcznych. Jakkolwiek w pierwszych tygodniach życia niepokój może budzić ciężka i przedłużająca się żółtaczka noworodkowa, jak również trudności w pobieraniu pokarmu, przemijające zaburzenia termoregulacji (hipotermia) czy hipoglikemia (KOCHANOWSKA i współaut. 2008, KODAMA i współaut. 2012). Ważnym czynnikiem, który może przyczynić się do wczesnego zdiagnozowania choroby jest wygląd włosów dziecka, które u pacjentów są szorstkie, suche, przypominające w dotyku owczą wełnę i najczęściej odbarwione. Włosy u takich dzieci są specyficznie skręcone o 180° tworząc strukturę określaną jako pili torti, dlatego też chorobę Menkesa określa się czasem, jako chorobę krętych włosów

(ang. kinky hair disease). Wspomniana zmiana struktury włosów spowodowana jest zaburzeniem aktywności miedzio-zależnego enzymu oksydazy lizylowej, która odpowiada za prawidłową syntezę cząsteczek kolagenu (TÜMER i MØLLER 2010, KODAMA i współaut. 2011). Odbarwienie włosów, to z kolei efekt zaburzeń pigmentacji wywołany brakiem aktywności innego enzymu, tyrozynazy, kontrolującej syntezę melaniny (MERCER i współaut. 1993). Zwraca uwagę również bardzo jasna skóra dziecka oraz charakterystyczny „cherubinowy” wygląd pozbawionej mimiki twarzy z szerokimi policzkami, płaską nasadą nosa, i opadającymi powiekami (KOCHANOWSKA i współaut. 2008). Zwykle powyżej 2 miesiąca życia obserwuje się zahamowanie rozwoju psychicznego i fizycznego, a nawet regres już posiadanych zdolności. U pacjentów, na skutek postępującej degeneracji systemu nerwowego, występują oporne na leczenie drgawki i nasilające się wraz z wiekiem napady padaczkowe. Obserwowano również szereg innych objawów neurologicznych takich jak drżenie mięśni, spastyczność, wygórowanie odruchów ścięgnistych, zaburzenia widzenia. Dołączają również zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego (wymioty, biegunka) (DESAI i KALER 2008, KODAMA i współaut. 2011), a u chorych obserwuje się także osłabienie mięśniowe, co związane jest z obniżeniem aktywności enzymu oksydazy cytochromowej (KREUDER i współaut. 1993, TÜMER 1998). Chorzy cierpią ponadto na osteoporozę, co prowadzi do złamań żeber i rozrzedzenia struktury kości długich oraz kości czaszki (PINTO i współaut. 1995, KALER 1999, KOCHANOWSKA i współaut. 2008). U chorych obserwowano także anomalie w budowie i funkcjonowaniu układu moczowego (uchyłkowatość pęcherza, rak nerki, refluks moczu), prowadzące do licznych infekcji dróg moczowych (OSHIO i współaut. 1997, HADDAD i współaut. 2012). Badania głowy z użyciem rezonansu magnetycznego wykazały, że u chorych dochodzi do atrofii pewnych obszarów mózgu, występują również zaburzenia w procesie mielinizacji (DESAI i KALER 2008). Wszystko to skutkuje upośledzeniem fizycznym i umysłowym pacjentów. W większości przypadków, osoby takie nie są w stanie samodzielnie chodzić, a nawet mają trudności z utrzymaniem pozycji siedzącej i prawidłowej pozycji głowy (KODAMA i współaut. 2012). W ostatnim stadium choroby, wraz z nasilającymi się objawami neurologicznymi, występują trudności z oddychaniem, często



dochodzi do utraty wzroku, tworzą się także krwinki podtwardówkowe (TÜMER i MØLLER 2010). Objawy chorobowe nasilają się wraz z wiekiem pacjentów, prowadząc w końcu do śmierci.

Pacjenci cierpiący na OHS żyją znacznie dłużej i nie wykazują takiego stopnia zaawansowania choroby, a zaburzenia w funkcjonowaniu organizmu są głównie następstwem nieprawidłowości w budowie tkanki łącznej. U chorych formują się charakterystyczne wyrostki, powstające jako zwapnienia, sięgające od mięśnia czworobocznego i mostkowo-obojęczykowo-sutkowego do kości potylicznej. Widoczna też jest nadmierna elastyczność skóry oraz wady w budowie kręgosłupa (KALER 1999, TÜMER i MØLLER 2010, KODAMA i współaut. 2011). Osłabienie mięśni, hipermobilność stawów i niezbornosć są przyczyną opóźnienia rozwoju ruchowego pacjentów, jednak ich zdolności intelektualne są tylko nieznacznie obniżone w porównaniu ze zdrowymi osobami. Pacjenci cierpiący na OHS charakteryzują się hipotermią i dlatego występuje u nich problem z tolerancją wysokich temperatur. Zaburzenia w budowie tkanki łącznej są u takich chorych również przyczyną wadliwej budowy naczyń krwionośnych przejawiającej się występowaniem tętniaków aorty i mózgu, w sercu może występować niedomykanie zastawki mitralnej (KODAMA i współaut. 2011, 2012). Bardzo często występuje uporczywa biegunka oraz infekcje dróg moczowych i nerek, spowodowane uchyłkowatością pęcherza moczowego i refluksami moczu, a w skrajnych przypadkach dochodzi do pęknięcia pęcherza moczowego (PROUD i współaut. 1996). Długość życia pacjentów jest różna, jednak znacznie dłuższa niż w przypadku klasycznej formy choroby. Niektórzy pacjenci osiągają wiek 38 (PROUD i współaut. 1996), a nawet 50 lat (TÜMER i MØLLER 2010).

Opisano też grupę nielicznych pacjentów, u których choroba przebiegała w sposób nietypowy, czyli wykazywali oni objawy charakterystyczne dla formy ostrej, jednak długość życia zbliżona była raczej do formy OHS. Taki przebieg choroby określano, jako formę pośrednią (TÜMER i MØLLER 2010, KODAMA i współaut. 2012).

Wyniki badań biochemicznych wykazały, że u pacjentów z chorobą Menkesa występuje obniżenie stężenia miedzi w surowicy krwi (o dwie trzecie w porównaniu ze stanem fizjologicznym), obniżenie zawartości ceruloplazminy oraz niska kon-

centracja miedzi w mózgu i wątrobie (HARRIS 1993).

Występowanie trzech wariantów choroby Menkesa spowodowane jest tym, że w obrębie genu *ATP7A* zachodzą różnego typu mutacje, które w różnym stopniu upośledzają aktywność białka *ATP7A*. U około 75% pacjentów chromosom ze zmutowanym genem pochodzi od matki, która jest nosicielką choroby, a sama nie wykazuje objawów patologicznych, natomiast u pozostałych 25% chorych mutacja w genie *ATP7A* powstaje *de novo* (KODAMA i współaut. 2012, TÜMER 2013). Wyniki badań wykazały, że ostra forma choroby występuje w przypadku, gdy u danej osoby białko *ATP7A* jest funkcjonalnie nieczynne, czyli nie przejawia swojej aktywności na drodze włączania jonów miedzi do cząsteczek enzymów, jak również nie uczestniczy w regulacji stężenia kationów miedziowych. W komórkach pacjentów, którzy cierpią na OHS lub pośrednią, łagodniejszą formę choroby, białko *ATP7A* ma znacznie obniżoną aktywność, np. na skutek zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej (MØLLER i współaut. 2009; TÜMER i MØLLER 2010). W takim przypadku cząsteczki białka, zamiast w aparacie Golgiego, zlokalizowane są w siateczce śródplazmatycznej, co znacznie ogranicza możliwość transportu Cu do enzymów miedzio-zależnych, natomiast zachowało ono w pewnym stopniu zdolność do transportu jonów miedzi przez błony komórkowe. Badania przeprowadzone na komórkach pacjentów z formą OHS wykazały również, że oprócz formy zmutowanej znajdowano tam również niewielkie ilości prawidłowych cząsteczek białka, które zachowały swoją aktywność. Okazało się, że w komórkach nawet 5–10% prawidłowo zbudowanego i aktywnego białka jest wystarczające, aby u pacjenta wystąpiła łagodna postać choroby. W sumie, do 2013 r. w obrębie genu *ATP7A* opisano 274 różnych mutacji prowadzących do wystąpienia objawów chorobowych. Różne też jest spektrum mutacji, począwszy od rearanżacji chromosomowych polegających na przeniesieniu całych fragmentów chromosomu X na autosom, poprzez mutacje typu delecji, duplikacji czy insercji w obrębie omawianego genu, a skończywszy na zamianie jednej zasady w łańcuchu DNA w sekwencji genu *ATP7A* (TÜMER 2013). W przypadku choroby Menkesa najliczniejszą grupę mutacji (25%) stanowią duże delecje obejmujące jeden lub kilka egzonów; występowanie tego typu mutacji prowadzi w większości przy-

padków do powstania ostrej postaci choroby. Niemniej liczne (22%) są małe delecje, insercje i duplikacje (MØLLER i współaut. 2009, TÜMER 2013). W przypadku, gdy delecja lub insercja obejmuje trzy pary zasad bądź ilość, która jest wielokrotnością liczby 3, to w powstałym białku nastąpi odpowiednio utrata bądź wstawienie jednego lub kilku aminokwasów. Jeżeli mutacje tego typu zajdą w egzonach kodujących bardzo konserwatywne domeny białka, to może dojść do obniżenia lub utraty jego aktywności. Jeżeli jednak liczba wstawionych lub utraconych par zasad jest różna od 3 (lub wielokrotności 3), to z reguły powstaje nieaktywne białko o całkowicie zmienionej strukturze. Na skutek małych delecji i insercji może również dojść do mutacji nonsensownych polegających na utworzeniu nowego kodonu „stop”, co równoznaczne jest z przedwczesnym zakończeniem procesu translacji, a co za tym idzie, do produkcji krótszego i często нефunkcjonalnego białka. Około 16% mutacji opisanych w genie *ATP7A*, to mutacje splicingowe, których efektem jest niewłaściwe składanie egzonów genu w trakcie obróbki potranskrypcyjnej (SKJRRINGE i współaut. 2011). Często w wyniku takich mutacji w komórkach powstaje również niewielka ilość prawidłowego i aktywnego białka, dlatego też mutacje splicingowe często prowadzą do łagodnej formy choroby Menkesa oraz do OHS (KALER 1999, SKJØRRINGE i współaut. 2011).

W przypadku pacjentów z chorobą Menkesa terapia obejmuje podawanie związków miedzi z ominięciem bariery jelitowej, czyli w postaci iniekcji lub kroplówek. Bardzo istotne jest, aby terapia została wdrożona możliwie jak najwcześniej, czyli przed ukończeniem drugiego miesiąca życia, a optymalnie przed 10 dobą życia (KALER i współaut. 2008, HADDAD i współaut. 2012). Jednak problemy z właściwym zdiagnozowaniem choroby powodują, że często taka terapia rozpoczyna się w późniejszym wieku. Najczęściej stosowany jest kompleks miedź-histydyna, gdyż jest on dobrze tolerowany przez organizm. Efekty leczenia bywają jednak różne. Możliwe jest spowolnienie choroby i poprawa parametrów psychoruchowych, jednak nigdy nie dochodzi do całkowitego ustąpienia jej objawów, a szczególnie do zatrzymania procesów neurodegeneracyjnych. Dzieje się tak dlatego, że brak aktywności białka *ATP7A* uniemożliwia transport jonów miedzi przez barierę krew-mózg. Znacznie lepsze efekty dałoby wdrożenie terapii, kiedy barie-

ra krew-mózg jest jeszcze niedojrzała, czyli w okresie płodowym (HADDAD i współaut. 2012). Okres płodowy jest szczególnie ważny dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego i niepełna podaż miedzi w tym okresie może być przyczyną nieodwracalnych zmian w tej strukturze (PROHASKA 1997, KODAMA i współaut. 2011). Przeprowadzone próby terapii z podawaniem miedzi bezpośrednio do rozwijającego się płodu nie dały jednak spodziewanych efektów; dziecko poddane takiej terapii rozwinęło objawy choroby Menkesa i zmarło w wieku 5,5 miesiąca. W tym przypadku terapia była wyjątkowo trudna, gdyż mutacja prowadziła do zupełnego braku białka *ATP7A*, co zostało potwierdzone analizą Western Blot (HADDAD i współaut. 2012). Jednak opisano także przypadki dwóch pacjentów, którzy zostali poddani terapii z użyciem związku miedź-histydyna osiągając wiek 9 i 19 lat i nie wykazywali symptomów neurologicznych, charakterystycznych dla „ostrego” przebiegu choroby Menkesa. Pacjenci ci byli jednak wcześniakami urodzonymi w 35 i 37 tygodniu ciąży, u których terapię rozpoczęto bardzo wcześnie (TÜMER i współaut. 1996). Pomimo podejmowanych rozlicznych prób terapii, choroba Menkesa pozostaje ciągle nieuleczalna.

Okazało się, że mutacje w obrębie genu *ATP7A* mogą prowadzić nie tylko do choroby Menkesa, bowiem w 2010 r. opisano mutacje genu *ATP7A* u pacjentów cierpiących na dziedziczną neuropatię ruchową. Dziedziczne neuropatie ruchowe są rzadkimi chorobami, w których proces patologiczny obejmuje komórki ruchowe rogów przednich, co prowadzi do niedowładu i zaniku odsiebnych mięśni kończyn (DRAC 2009). W przypadku neuropatii ruchowej spowodowanej mutacjami w genie *ATP7A* mamy do czynienia z dziedziczeniem sprzężonym z płcią i również w tym przypadku, podobnie jak przy chorobie Menkesa, objawy chorobowe występują u pacjentów płci męskiej, natomiast kobiety są nosicielkami choroby. Skutkiem opisywanej choroby jest postępujące wraz z wiekiem osłabienie mięśni kończyn dolnych oraz zanik mięśni kończyn górnych. U chorych nie stwierdzono jednak obniżenia zawartości miedzi w surowicy krwi ani też żadnych innych objawów charakterystycznych dla choroby Menkesa czy OHS (KENNERSON i współaut. 2010, YI i współaut. 2012, YI i KALER, 2014). Chorobę tą opisano u członków dwóch niespokrewnionych rodzin, a była ona spowodowana punktowymi

mutacjami typu zamiany sensu. W przypadku jednej z badanych rodzin była to mutacja prowadząca do zamiany C na T w egzonie 15, a wynikiem tej tranzycji była zmiana kodonu aminokwasu treoniny na izoleucynę. U pacjentów pochodzących z drugiej badanej rodziny stwierdzono tranzycję C do T w egzonie 22, której efektem była zmiana aminokwasu proliny na serynę w zmutowanym białku (KENNERSON i współaut. 2010). Jak już wspomniano wcześniej, w komórkach, w których stężenie kationów miedziowych nie przekracza poziomu fizjologicznego, białko ATP7A zlokalizowane jest w aparacie Golgiego. W przypadku, gdy stężenie jonów miedzi przekracza poziom fizjologiczny, białko ATP7A transportuje jony miedzi do błony komórkowej i usuwa ich nadmiar z komórki. Analiza ekspresji wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATP7A w komórkach pochodzących od pacjentów cierpiących na neuropatię ruchową wykazała, że nawet, gdy stężenie jonów miedzi w komórkach przyjmowało poziom fizjologiczny, białko ATP7A zlokalizowane było w cytoplazmie i na błonie komórkowej (YI i współaut. 2012, YI i KALER, 2014). Dalsze badania potwierdziły, że opisane powyżej mutacje upośledzają transport powrotny białka do aparatu Golgiego. Stwierdzono również, że białko ATP7A z mutacją w egzonie 15 w cytoplazmie wchodzi w interakcję z należącym do grupy ATPaz AAA+ białkiem VCP (ang. valosin containing protein), zwanym również białkiem p97. Białko p97/VCP bierze udział w procesie degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek w komórce, a skutkiem jego niedoboru jest akumulacja ubikwitynowanych białek w komórce. Stwierdzono również, że mutacje w białku p97/VCP prowadzą do rozwoju takich chorób neurologicznych jak stwardnienie zanikowe boczne czy dziedziczna miopatia z chorobą Pageta i otępieniem czołowoskroniowym (ang. inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, IBMPFD) (YI i KALER 2014). Pozostaje dyskusyjnym, czy neuropatia ruchowa stwierdzona u pacjentów z mutacją w egzonie 15 białka ATP7A jest skutkiem zaburzeń metabolizmu miedzi, czy też w komórkach takich chorych jest niewystarczająca ilość białka p97/VCP. Jednocześnie wskazuje to na bardzo ważną rolę białka ATP7A w procesie rozwoju chorób neurologicznych.

Jak się okazało, nie tylko mutacje w genie *ATP7A* lub genach kodujących białka bezpośrednio odpowiedzialne za transport i meta-

bolizm miedzi mogą być przyczyną rozwoju chorób na tle niedoboru tego pierwiastka. W 2012 r. opisano pacjentów, u których doszło do mutacji w zlokalizowanym na chromosomie 3 genie *SLC33A1* kodującym białko AT-1. Białko to składa się z 549 aminokwasów i bierze udział w transporcie acetylo-CoA do siateczki śródplazmatycznej, gdzie acetylo-CoA jest substratem dla enzymów, acetylotransferaz. Enzymy te biorą udział w potranslacyjnej modyfikacji białek i okazuje się, że proces ten zachodzi w przypadku około 1700 znanych białek (HUPPKE i współaut. 2012). Choroba spowodowana mutacją w genie *SLC33A1* dziedziczy się autosomalnie recesywnie i od nazwiska jej odkrywców nazwana została zespołem Huppke-Brendel (KALER 2013). Jest to choroba o ciężkim przebiegu, kończąca się śmiercią pacjentów wieku od 22 miesięcy do 6 roku życia (HUPPKE i współaut. 2012). U chorych stwierdzono bardzo niski poziom miedzi i ceruloplazminy w osoczu krwi. Opisani pacjenci wykazywali upośledzenie rozwoju psychoruchowego, żaden z nich nie był w stanie samodzielnie chodzić, a nawet siedzieć, również żaden z nich nie potrafił mówić. U chorych występowała ponadto wrodzona katarakta, głuchota, osłabienie mięśniowe, a badania mózgu z użyciem rezonansu magnetycznego wykazały hipoplazję i zaburzenia mielinizacji (HORVÁTH i współaut. 2005, HUPPKE i współaut. 2012). Pomimo wdrożonej terapii polegającej na suplementacji związkami miedzi pacjenci zmarli w okresie wczesnodziecięcym. Przypuszcza się, że zaburzenia metabolizmu miedzi u tych pacjentów wywołane były brakiem acetylacji białek biorących bezpośredni udział w transporcie jonów tego metalu, najprawdopodobniej uznaje się brak acetylacji białka ATP7A (HUPPKE i współaut. 2012).

Innym, ciężkim schorzeniem związanym z zaburzeniami metabolizmu miedzi jest zespół MEDNIK. Nazwa choroby nie pochodzi tym razem od nazwiska jej odkrywcy, ale od pierwszych liter angielskich nazw jednostek chorobowych (ang. mental retardation, enteropathy, deafness, ichthyosis, keratoderma) charakteryzujących ten syndrom. Zespół MEDNIK po raz pierwszy opisano u 5 pacjentów pochodzących z 3 rodzin zamieszkałych w regionie Kamouraska w prowincji Quebec w Kanadzie. Wtedy chorobę tą określano jako erythrokeratodemia variabilis-3 (SABA i współaut. 2005). Choroba, a właściwie cały zespół chorobowy, spowodowana jest mutacją w genie *AP1S1* zlokalizowanym na dłu-



gim ramieniu chromosomu 7 w pozycji q22. Gen ten koduje białko  $\sigma$ 1A będące małą podjednostką kompleksu adapterowego AP1, który jest odpowiedzialny za prawidłowe pakowanie w pęcherzyki klatrynowe i transport białek z aparatu Golgiego do błony komórkowej (MONTPETIT i współaut. 2008, MARTINELLI i DIONISI-VICI 2014). Pomimo że białko  $\sigma$ 1A nie jest bezpośrednio zaangażowane w wiązanie kationów miedziowych, to zmiany powodowane przez jego mutacje prowadzą do ciężkich zaburzeń metabolizmu tego pierwiastka. Dzieje się tak dlatego, że białko ATP7A pakowane jest w pęcherzyki klatrynowe i transportowane z aparatu Golgiego do błony komórkowej, a nieprawidłowy transport prowadzi do wystąpienia objawów chorobowych (MONTPETIT i współaut. 2008). We wszystkich opisanych przypadkach syndromu MEDNIK u chorych stwierdzono obniżenie poziomu miedzi i ceruloplazminy w surowicy, przy jednoczesnym, potwierdzonym przez biopsję, podniesieniu zawartości tego pierwiastka w wątrobie. Chorzy charakteryzowali się upośledzeniem umysłowym, głuchotą oraz znacznym opóźnieniem rozwoju ruchowego spowodowanego hipotonią mięśniową oraz neuropatiami ruchowymi. Występowała u nich również osteoporoza, a u wszystkich chorych występowały zaburzenia ze strony układu pokarmowego, manifestujące się między innymi uporczywymi biegunkami, prowadzącymi w kilku przypadkach do śmierci w okresie dziecięcym. Charakterystyczne dla tego zespołu chorobowego jest równocześnie występowanie problemów dermatologicznych. Zmiany skórne obejmują nadmierne rogowacenie i złuszczenie naskórka o cechach rybiej łuski (łac. *ichthyosis*), a także erytrodermie. U niektórych chorych występowały zaburzenia pigmentacji i zmiany w strukturze włosów podobne do tych, które obserwowano u pacjentów z chorobą Menkesa. Nadmierne i postępujące wraz z wiekiem gromadzenie miedzi w wątrobie prowadziło u części pacjentów do zwłóknienia tego organu, jak również do wewnątrzwątrobowego zastojów żółci (MARTINELLI i DIONISI-VICI 2014). Wyniki badań krwi takich pacjentów wykazały, że w ich osoczu występowało podniesienie poziomu bardzo długocięściowych kwasów tłuszczowych (ang. very long chain fatty acid, VLCFA). Wykazano również, że u chorych, wtórnie do hypocupremii, występowało obniżenie ekspresji białek enzymatycznych zawierających w swoim składzie atomy miedzi, np. oksydazy cyto-

chromowej *c*. Przypuszcza się, że nadmierna akumulacja miedzi w wątrobie może, w tym przypadku, być spowodowana upośledzeniem funkcji białka ATP7B odpowiadającego w hepatocytach za włączanie miedzi do cząsteczek ceruloplazminy oraz biorącego udział w wydzielaniu nadmiaru tego pierwiastka do żółci. Wiadomo bowiem, że białko ATP7B w trakcie swojego cyklu katalitycznego również pakowane jest w pęcherzyki i transportowane z aparatu Golgiego w obrębie cytoplazmy oraz do błony apikalnej w komórkach o budowie spolaryzowanej. Również opisane u pacjentów z syndromem MEDNIK objawy chorobowe ze strony wątroby przypominają nieco te, występujące u pacjentów z chorobą Wilsona. Dlatego też w przypadku syndromu MEDNIK zastosowano leczenie podobne jak w przypadku wspomnianego zespołu chorobowego, czyli podawanie preparatów zawierających cynk i ograniczających wchłanianie miedzi w jelicie cienkim. Terapia ta spowodowała poprawę ze strony objawów wątrobowych, natomiast nie zaobserwowano u chorych ustąpienia zmian skórnych (MARTINELLI i współaut. 2013; MARTINELLI i DIONISI-VICI 2014).

Choroba Wilsona wywołana jest przez mutację w genie *ATP7B* (MARAMATSU i współaut. 1998). Zespół ten występuje z częstością od 1:35 000 na 100 000 żywych urodzeń (THOMAS i współaut. 1995) i dziedziczony jest autosomalnie, recesywnie. Rozrzut ten jest spowodowany różną frekwencją zmutowanej formy genu w różnych populacjach ludzkich. Główną przyczyną zaburzeń w chorobie Wilsona jest brak aktywności białka ATP7B, co powoduje defekt przy włączaniu miedzi do ceruloplazminy podczas syntezy tego białka w wątrobie (ROBERTS i SCHILSKY 2008). W czasie choroby dochodzi do akumulacji miedzi, aż do stężenia toksycznego, w wątrobie, mózgu, nerkach oraz gałkach ocznych, co prowadzi do chronicznych stanów zapalnych wątroby i zaburzeń typu neurologicznego (WU i współaut. 1994, HUSTER 2010). Choroba Wilsona przebiega w trzech etapach. W pierwszym stadium miedź akumulowana jest w cytoplazmie hepatocytów, gdzie osiąga poziom toksyczny prowadzący do śmierci komórek. W drugim etapie miedź z obumarłych hepatocytów uwalniana jest do krwioobiegu, a gwałtowny wzrost stężenia tego pierwiastka w surowicy krwi powoduje uszkodzenie błon erytrocytów, co prowadzi do anemii hemolitycznej. W ostatniej fazie choroby miedź akumulowana jest w nerkach prowadząc do dysfunkcji i stanów zwyrodnieniowych tego

organu. Równocześnie miedź odkładana jest w mózgu wywołując szereg objawów neurologicznych. Charakterystyczne dla pacjentów dotkniętych chorobą Wilsona jest występowanie

nie żółtego pierścienia, zwanego pierścieniem Kaysera-Fleischera, w rogówce oka. Nielezione schorzenie, kończy się śmiercią chorego (DIDONATO i SARKAR 1997, HUSTER 2010).

#### METABOLIZM MIEDZI ORAZ CHARAKTERYSTYKA DZIEDZICZNYCH ZESPOŁÓW CHOROBYCH, NA TLE NIEDOBORU MIEDZI, SPowodOWANYCH ZABURZENIAMI AKTYWNOŚCI BIAŁKA ATP7A

##### Streszczenie

Miedź, ze względu na swoje właściwości oksydoredukcyjne, jest kofaktorem wielu enzymów, ale nadmiar tego pierwiastka w organizmie jest szkodliwy, gdyż przyczynia się do powstawania dużych ilości wolnych rodników. W konsekwencji organizmy wykształciły precyzyjne mechanizmy kontrolujące transport i metabolizm miedzi, zarówno na poziomie komórkowym, jak i w obrębie całego organizmu. W transport tego pierwiastka w komórce zaangażowane są białka, które możemy podzielić na trzy grupy. Pierwszą są transblonowe białka odpowiedzialne za transport miedzi przez błonę komórkową do cytoplazmy, do których zaliczamy białka CTR1 oraz DMT1. Kolejną grupą są białka chaperonowe, a ich główną funkcją jest dostarczenie miedzi do odpowiednich enzymów w komórce. Zaliczamy do nich białka CCS, ATOX1, COX oraz SCO. Ostatnią grupą są białka ATP7A oraz ATP7B, które odpowiadają za utrzymanie właściwego stężenia jonów Cu w komórce poprzez aktywny eksport miedzi z komórki lub przyłączanie tego pierwiastka do białek enzymatycznych. Zaburzenia w funkcjonowaniu wymienionych powyżej białek powodują naruszenie homeostazy miedzi w organizmie, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju wielu zespołów chorobowych. U ludzi, intensywnie badana jest mutacja genu *ATP7A*, a nasilenie objawów chorobowych zależy od typu mutacji. Ekspresja całkowicie niefunkcjonalnego białka prowadzi do powstania klasycznej choroby Menkesa, która charakteryzuje się znaczącym upośledzeniem

fizycznym i umysłowym pacjentów oraz śmiercią w okresie wczesnodziecięcym. W przypadku zachowania części aktywności białka ATP7A rozwija się łżejsza forma wspomnianej choroby, której objawy nie są tak dotkliwe, a pacjenci dożywają nawet pięćdziesięciu lat. Mutacje genu *ATP7A* mogą najprawdopodobniej prowadzić także do rozwoju dziedzicznej neuropatii ruchowej, aczkolwiek objawy chorobowe związane są głównie z osłabieniem i zanikiem mięśni kończyn górnych i nie przypominają objawów choroby Menkesa. Okazało się także, że mutacje innych genów mogą wpływać na prawidłowe funkcjonowanie białka ATP7A. Badania ostatniej dekady wykazały istnienie dwóch nowych zespołów chorobowych związanych z niedoborem miedzi w organizmie. Są to zespół Huppke-Brendel oraz zespół MEDNIK, spowodowane mutacjami, odpowiednio w genach *SLC33A1* oraz *APISI*. Białko kodowane na matrycy pierwszego z wymienionych genów odpowiada za acetylację białek, z kolei drugie białko jest związane z „pakowaniem” odpowiednich białek w pęcherzyki klatrynowe i ich transport z aparatu Golgiego do błony komórkowej. Wymienione powyżej białka są najprawdopodobniej niezbędne dla prawidłowej aktywności białka ATP7A, stąd mutacje w genach *SLC33A1* i *APISI* pośrednio powodują zaburzenia metabolizmu miedzi. Niestety, pomimo prób leczenia chorób związanych z niedoborem miedzi w organizmie, nadal nie opracowano skutecznej terapii.

#### COPPER METABOLISM AND CHARACTERISTIC OF INHERITED METABOLIC SYNDROMES CAUSED BY COPPER DEFICIENCY AND LACK OF ATP7A PROTEIN ACTIVITY

##### Summary

Copper due to its oxyreductive properties plays a role as a catalytic cofactor in a variety of enzymes. On the other hand excess of copper can be cytotoxic because copper can participate in reactions that result in the production of highly reactive free radicals. Thus, living organisms developed precise regulatory mechanisms to keep accurate copper homeostasis. In cells copper ions are bound by several proteins such as: membrane transporters (CTR1 and DMT1) responsible for influx of Cu ions into cytoplasm; copper chaperones (CCS, ATOX1, COX and SCO) necessary for copper delivery to specific subcellular compartments and thereby to cuproenzymes; Cu-transporting P-type ATPases (ATP7A and ATP7B) involved in copper transport into the secretory pathway and its export from the cell. Mutations of these proteins result in disturbance of copper homeostasis and lead to severe metabolic diseases. For

example mutations of critical copper-transport protein- ATP7A are implicated in distinctive phenotypes of Menkes disease or the milder Occipital Horn Syndrome. Severe form of Menkes disease characterized by growth failure and deterioration of the nervous system developed when mutation lead to lack of activity of ATP7A protein. When mutated ATP7A protein preserves partial activity, milder form of disease is developed. Recently it was reported that missense mutations in *ATP7A* gene can lead to isolated adult-onset distal motor neuropathy. Such mutations appear to selectively disturb normal motor neuron function and it is distinctively different from Menkes disease, however. Additionally, two other syndromes induced by autosomal recessive mutations which indirectly affected the function of ATP7A have been discovered. Huppke-Brendel syndrome is caused by mutations in *SLC33A1* which encodes an acetyl

CoA transporter needed for acetylation proteins. MEDNIK syndrome is developed in the presence of mutations in the s1A subunit of adaptor protein complex 1 (*AP1S1* gene), which mediates intracellular trafficking linking clathrin to receptors in coated

vesicle. Both proteins are probably involved in ATP7A modification or trafficking, respectively. Unfortunately, therapeutic strategies against inherited copper deficiency disorders are still unsuccessful.

## LITERATURA

- AGARWAL S., HONG D., DESAI N. K., SAZINSKY M. H., ARGÜELLO J. M., ROSENZWEIG A. C., 2010. *Structure and interactions of the C-terminal metal binding domain of Archaeoglobus fulgidus CopA*. *Proteins* 78, 2450–2458.
- AHMED S., DENG J., BORJIGIN J., 2005. *A new strain of rat for functional analysis of PINA*. *Brain research*. *Mol. Brain Res.* 137, 63–69.
- ARGÜELLO J. M., EREN E., GONZÁLEZ-GUERRERO M., 2007. *The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases*. *Biometals* 20, 233–248.
- ARREDONDO M., MENDIBURO M. J., FLORES S., SINGLETON S. T., GARRICK M. D., 2014. *Mouse divalent metal transporter 1 is a copper transporter in HEK293 cells*. *Biometals* 27, 115–123.
- BANCI L., BERTINI I., CANTINI F., MIGLIARDI M., NATILE G., NUSHI F., ROSATO A., 2009. *Solution structures of the actuator domain of ATP7A and ATP7B, the Menkes and Wilson disease proteins*. *Biochemistry* 48, 7849–7855.
- BORJIGIN J., PAYNE A. S., DENG J., LI X., WANG M. M., OVODENKO B., GITLIN J. D., SNYDER S. H., 1999. *A novel pineal night-specific ATPase encoded by the Wilson disease gene*. *J. Neurosci.* 19, 1018–1026.
- DANKS D. M., 1988. *Copper deficiency in humans*. *Annu. Rev. Nutr.* 8, 235–257.
- DESAI V., KALER S. G., 2008. *Role of copper in human neurological disorders*. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 855S–858S.
- DIDONATO M., SARKAR B., 1997. *Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1360, 3–16.
- DIJKSTRA M., VAN DEN BERG G. J., WOLTERS H., IN'T VELD G., SLOOFF M. J., HEYMANS H. S., KUIPERS F., VONK R. J., 1996. *Adenosine triphosphate-dependent copper transport in human liver*. *J. Hepatol.* 25, 37–42.
- DRAC H., 2009. *Wieloogniskowa neuropatia ruchowa*. *Polski Przegląd Neurol.* 5, 74–77.
- GOURDON P., SITSSEL O., LYKKEGAARD KARLSEN J., BIRK MLLER L., NISSEN P., 2012. *Structural models of the human copper P-type ATPases ATP7A and ATP7B*. *Biol. Chem.* 393, 205–216.
- GU Y. H., KODAMA H., SHIGA K., NAKATA S., YANAGAWA Y., OZAWA H., 2005. *A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003: incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to earlier diagnosis*. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 473–478.
- GUO Y., NYASAE L., BRAITERMAN L. T., HUBBARD A. L., 2005. *NH<sub>2</sub>-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G904–G916.
- GUPTA A., LUTSENKO S., 2012. *Evolution of copper transporting ATPases in eukaryotic organisms*. *Curr. Genom.* 13, 124–133.
- GUY H., KODAMA H., SHIGA K., NAKATA S., YANAGAWA Y., OZAWA H., 2005. *A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003: incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to earlier diagnosis*. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 473–478.
- HADDAD M. R., MACRI C. J., HOLMES C. S., GOLDSTEIN D. S., JACOBSON B. E., CENTENO J. A., POPEK E. J., GAHL W. A., KALER S. G., 2012. *In utero copper treatment for Menkes disease associated with a severe ATP7A mutation*. *Mol. Genet. Metab.* 107, 222–228.
- HARRIS E. D., 1993. *Menkes Disease: Perspective and Update on a Fatal Copper Disorder*. *Nutr. Rev.* 51, 235–238.
- HORVÁTH R., FREISINGER P., RUBIO R., MERL T., BAX R., MAYR J. A., SHAWN MÜLLER-HÖCKER J., PONGRATZ D., MÖLLER L. B., HORN N., JAKSCH M., 2005. *Congenital cataract, muscular hypotonia, developmental delay and sensorineural hearing loss associated with a defect in copper metabolism*. *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 479–492.
- HUFFMAN D. L., O'HALLORAN T. V., 2001. *Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins*. *Ann. Rev. Biochem.* 70, 677–701.
- HUPPKE P., BRENDDEL C., KALSCHUEER V., KORENKE G. C., MARQUARDT I., FREISINGER P., CHRISTODOULOU J., HILLEBRAND M., PITELET G., WILSON C., GRUBER-SEDLMAYR U., ULLMANN R., HASS S., ELPELEG O., NÜRNBERG G., NÜRNBERG P., DAD S., MLLER L. B., KLER S. G., GÄRTNER J., 2012. *Mutations in SLC33A1 cause a lethal autosomal-recessive disorder with congenital cataracts, hearing loss, and low serum copper and ceruloplasmin*. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 61–68.
- HUSTER D., 2010. *Wilson disease*. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 531–539.
- KALER S. G., 1999. *Metabolic and molecular bases of Menkes disease and occipital horn syndrom*. *Pediatr. Int.* 41, 436–442.
- KALER S. G., HOLMES C. S., GOLDSTEIN D. S., TANG J., GODWIN S. C., DONSANTE A., LIEW C. J., SATO S., PATRONAS N., 2008. *Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease*. *N. Engl. J. Med.* 358, 605–614.
- KALER S. G., 2013. *Inborn errors of copper metabolism*. *Handb. Clin. Neurol.* 113, 1745–1754.
- KAWAMATA H., MANFREDI G., 2010. *Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space*. *Antiox. Redox Signal.* 13, 1375–1384.
- KELLY E. J., PALMITER R. D., 1996. *A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein*. *Nat. Genet.* 13, 219–222.
- KELNER G.S., LEE M., CLARK M. E., MACIEJEWSKI D., MCGRATH D., RABIZADEH S., LYONS T., BREDESEN D., JENNER P., MAKI R. A., 2000. *The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival*. *J. Biol. Chem.* 275, 580–584.
- KENNERSON M. L., NICHOLSON G. A., KALER S. G., KOWALSKI B., MERCER J. F., TANG J., LLANOS R. M., CHU S., TAKATA R. I., SPECK-MARTINS C. E., BAETS J., ALMEIDA-SOUZA L., FISCHER D., TIMMERMAN V., TAYLOR P. E., SCHERER S. S., FERGUSON T. A., BIRD T. D., DE JONGHE P., FEELY S. M., SHY M. E., GARBERN J. Y., 2010. *Missense mutations in the copper transporter gene ATP7A cause X-linked distal hereditary motor neuropathy*. *Am. J. Hum. Genet.* 12, 343–52.



- KNUTSON M., 2007. *Steap proteins: implications for iron and copper metabolism*. Nutr. Rev. 65, 335-340.
- KOCHANOWSKA I., HAMPPEL-OSIPOWICZ E., WALOSZCZYK P., 2008. *Choroba Menkesa – genetyczny defekt metabolizmu miedzi*. Neurol. Dziec. 17, 33, 63-68.
- KODAMA H., FUJISAWA C., BHADHPRASIT W., 2011. *Pathology, clinical features and treatments of congenital copper metabolic disorders – focus on neurologic aspects*. Brain. Dev. 33, 243-251.
- KODAMA H., FUJISAWA C., BHADHPRASIT W., 2012. *Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment*. Curr. Drug Metab. 13, 237-250.
- KREUDER J., OTTEN A., FUDER H., TÜMER Z., TONNESEN T., HORN N., DRALLE D., 1993. *Clinical and biochemical consequences of copper-histidine therapy in Menkes disease*. Eur. J. Pediatr. 152, 828-832.
- LA FONTAINE S., ACKLAND M. L., MERCER J. F., 2010. *Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B: emerging roles*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 42, 206-209.
- LEARY S., 2010. *Redox regulation of SCO protein function: controlling copper at a mitochondrial crossroad*. Antiox. Redox Signal. 13, 1403-1416.
- LI X., CHEN S., WANG Q., ZACK D. J., SNYDER S. H., BORJIGIN J., 1998. *A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1876-1881.
- LINZ R., BARNES N. L., ZIMNICKA A. M., KAPLAN J. H., EIPPER B., LUTSENKO S., 2008. *Intracellular targeting of copper-transporting ATPase ATP7A in a normal and Atp7b<sup>-/-</sup> kidney*. Am. J. Physiol. 294, F53-F61.
- LÖNNERDAL B., 2008. *Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective*. Am. J. Clin. Nutr. 88, 846S-850S.
- LUTSENKO S., GUPTA A., BURKHEAD J. L., ZUZEL V., 2008. *Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance*. Arch. Biochem. Biophys. 476, 22-32.
- LUTSENKO S., BARNES N. L., BARTEE M. Y., DMITRIEV O. Y., 2007a. *Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases*. Physiol. Rev. 87, 1011-1046.
- LUTSENKO S., LESHANE E.S., SHINDE U., 2007b. *Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases*. Arch. Biochem. Biophys. 463, 134-148.
- LUTSENKO S., BHATTACHARJEE A., HUBBARD A. L., 2010. *Copper handling machinery of the brain*. Metalomics 2, 596-608.
- MARAMATSU Y., YAMADA T., MORALEJO D. H., SUZUKI Y., MATSUMOTO K., 1998. *Fetal copper uptake and a homolog (Atp7b) of the Wilson's disease gene in rats*. Res. Com. Molec. Pathol. Pharm. 101, 225-231.
- MARTINELLI D., DIONISI-VICI C., 2014. *AP1S1 defect causing MEDNIK syndrome: a new adaptinopathy associated with defective copper metabolism*. Ann. NY Acad. Sci. 1314, 55-63.
- MARTINELLI D., TRAVAGLINI L., DROUIN C. A., CEBALLOS-PICOT I., RIZZA T., BERTINI E., CARROZZO R., PETRINI S., DE LONLAY P., EL HACHEM M., HUBERT L., MONTPETIT A., TORRE G., DIONISI-VICI C., 2013. *MEDNIK syndrome: a novel defect of copper metabolism treatable by zinc acetate therapy*. Brain 136, 872-881.
- MATAK P., ZUMERLE S., MASTROGIANNAKI M., EL BALKHI S., DELGA S., MATHIEU J. R., CANONNE-HERGAUX F., POUPON J., SHARP P. A., VAULONT S., PEYSSONNAUX C., 2013. *Copper deficiency leads to anemia, duodenal hypoxia, upregulation of HIF-2 $\alpha$  and altered expression of iron absorption genes in mice*. PLoS One, 8, e59538.
- MERCER J. F., LIVINGSTON J., HALL B., PAYNTER J. A., BEGY C., CHANDRASEKHARAPPA S., LOCKHART P., GRIMES A., BHAVE M., SIEMIENIAK D., GLOWER T. W., 1993. *Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning*. Nat. Genet. 3, 20-25.
- MØLLER L. B., MOGENSEN M., HORN N., 2009. *Molecular diagnosis of Menkes disease: genotype-phenotype correlation*. Biochimie 91, 1273-1277.
- MØLLER L. B., LENARTOWICZ M., ZABOT M. T., JOSIANE A., BURGLEN L., BENNETT C., RICONDA D., FISHER R., JANSSENS S., MOHAMMED S., AUSEMS M., TÜMER Z., HORN N., JENSEN T. G., 2012. *Clinical expression of Menkes disease in females with normal karyotype*. Orphanet. J. Rare Dis. 22, 6.
- MONTPETIT A., CÔTÉ S., BRUSTEIN E., DROUIN C. A., LAPOINTE L., BOUDREAU M., MELOCHE C., DROUIN R., HUDSON T. J., DRAPEAU P., COSSETTE P., 2008. *Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord*. PLoS Genet. 4, e1000296.
- MULLER P. A., KLOMP L. W., 2009. *ATOX1: a novel copper-responsive transcription factor in mammals?* Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 1233-1236.
- OSHIO T., HINO M., KIRINO A., MATSUMURA C., FUKUDA K., 1997. *Urologic abnormalities in Menkes' kinky hair disease: report of three cases*. J. Pediatr. Surg. 32, 782-784.
- PALUMAA P., 2013. *Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper*. FEBS Lett. 587, 1902-1910.
- PETRIS M. J., MERCER J. F., 1999. *The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal*. Hum. Molec. Genet. 8, 2107-2115.
- PINTO F., CALDERAZZI A., CANAPICCHI R., TADEUCCI G., TARANTINO E., 1995. *Radiological findings in a case of Menkes' disease*. Child's Nerv. Syst. 11, 112-114.
- PROHASKA J. R., 1997. *Neurological roles of copper as antioxidant or prooxidant*. [W:] *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. CONNOR J. R. (red.). Plenum Press, New York, 57-74.
- PROUD V. K., MUSSELL H. G., KALER S. G., YOUNG D. W., PERCY A. K., 1996. *Distinctive Menkes disease variant with occipital horns: delineation of natural history and clinical phenotype*. Am. J. Med. Genet. 65, 44-51.
- ROBERTS E. A., SCHILSKY M. L., 2008. *Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update*. Hepatology 47, 2089-2111.
- SABA T. G., MONTPETIT A., VERNER A., RIOUX P., HUDSON T. J., DROUIN R., DROUIN C. A., 2005. *An atypical form of erythrokeratoderma variabilis maps to chromosome 7q22*. Hum. Genet. 116, 167-171.
- SKJØRRINGE T., TÜMER Z., MØLLER L. B., 2011. *Splice site mutations in the ATP7A gene*. PLoS One 6, e18599.
- STIBUREK L., ZEMAN J., 2010. *Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis*. Biochim. Biophys. Acta 1797, 1149-1158.
- SMITH A. T., SMITH K. P., ROSENZWEIG A. C., 2014. *Diversity of the metal-transporting PIB-type ATPases*. J. Biol. Inorg. Chem. (w druku).
- TAPIERO H., TOWNSEND D. M., TEW K. D., 2003. *Trace elements in human physiology and pathology*. Copper Biomed. Pharmacother. 57, 386-398.
- TELIANIDIS J., HUNG Y. H., MATERIA S., FONTAINE S. L., 2013. *Role of the P-Type ATPases, ATP7A and*

- ATP7B* in brain copper homeostasis. *Front. Aging Neurosci.* 5, 1-17.
- THOMAS G. R., ROBERTS E. A., WALSH J. M., COX D. W., 1995. *Haplotypes and mutations in Wilson disease.* *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1315-1319.
- TÜMER Z., HORN N., TONNESEN T., CHRISTODOULOU J., CLARCE J. T. R., SARKAR B., 1996. *Early copper-histidine treatment for Menkes disease.* *Nat. Genet.* 12, 11-12.
- TÜMER Z., 1998. *Genetics of Menkes disease.* *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11, 147-16.
- TÜMER Z., 2013. *An overview and update of ATP7A mutations leading to Menkes disease and occipital horn syndrome.* *Hum. Mutat.* 34, 417-429.
- TÜMER Z., MÖLLER L. B., 2010. *Menkes disease.* *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 511-518.
- VOSKOBOINIK I., MAR J., CAMAKARIS J., 2003. *Mutational analysis of the Menkes copper P-type ATPase (ATP7A).* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 301, 88-94.
- VAN DEN BERGHE P. V., KLOMP L. W., 2009. *New developments in the regulation of intestinal copper absorption.* *Nutrition Rev.* 67, 658-672.
- WANG Y., HODGKINSON V., ZHU S., WEISMAN G. A., PENTRIS M. J., 2011. *Advances in the understanding of mammalian copper transporters.* *Adv. Nutrit.* 2, 129-137.
- WEE N. K. Y., WEINSTEIN D. C., FRASER S. T., ASSINDER S. J., 2013. *The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease.* *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 960-963.
- WIJMENGA C., KLOMP L. W., 2004. *Molecular regulation of copper excretion in the liver.* *Proc. Nutr. Soc.* 63, 31-39.
- WU J., FORBES J. R., CHEN H. S., COX D. W., 1994. *The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene.* *Nat. Genet.* 7, 541-545.
- YI L., DONSANTE A., KENNERSON M. L., MERCER J. F., GARBERN J. Y., KALER S. G., 2012. *Altered intracellular localization and valosin-containing protein (p97 VCP) interaction underlie ATP7A-related distal motor neuropathy.* *Hum. Mol. Genet.* 21, 1794-1807.
- YI L., KALER S., 2014. *ATP7A trafficking and mechanisms underlying the distal motor neuropathy induced by mutations in ATP7A.* *Ann. NY Acad. Sci.* 1314, 49-54.
- ZHENG W., MONNOT A., 2012. *Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases.* *Pharmacol. Therapeut.* 133, 177-188.