

RESUMEN

La enfermedad de Wilson (EW) es un trastorno hereditario del metabolismo del cobre causado por mutaciones en *ATP7B*, que codifica para una proteína transportadora del cobre en el hígado; su mal funcionamiento provoca un fallo en la excreción biliar y su acumulación progresiva en el organismo, especialmente en hígado y cerebro.

Se abordó el estudio genético de *ATP7B* en una colección de muestras que comprende 73 casos índice. En la serie clínica objeto de estudio en este trabajo, que incluye 25 familias evaluadas clínicamente con la escala de Leipzig, se identificaron mutaciones bialélicas en 22 casos (88 %). El estudio del exoma en una de las tres familias restantes reveló que ambos hermanos enfermos eran heterocigotos compuestos para mutaciones en *CCDC115*, implicado en trastornos congénitos de la glicosilación y asociado a fenotipos Wilson-like. Análisis de expresión de variantes en *ATP7B* que alterarían el *splicing* en mRNA procedente de sangre periférica de pacientes portadores, así como mediante ensayo de minigenes, mostraron que cinco de ellas alterarían el correcto procesado de los transcritos. La caracterización de una variante novel en el promotor de *ATP7B* mediante ensayo de luciferasa confirmó una reducción de la actividad del promotor en presencia de dicho cambio. Las familias fEW-30 y fEW-77, con diagnóstico concluyente de EW y alta variabilidad intra-familiar, se seleccionaron para el estudio de modificadores genéticos mediante secuenciación de exoma. Se identificaron variantes candidatas en heterocigosis en *MYO5B*, *CCDC93* y *COMMD1*, genes que participan en el metabolismo del cobre y/o relacionados con *ATP7B*. El cribado mutacional de estos cambios en otros pacientes de la serie, no permitió establecer correlaciones genotipo-fenotipo que expliquen la variabilidad clínica apreciada. En el análisis comparativo de variantes identificadas en la familia fEW-30, se detectó en heterocigosis en una de las hermanas el cambio c.1255C>T (p.R419C) en *LMNA*, asociado a laminopatías. Estudios de la respiración mitocondrial y de inducción de estrés oxidativo en fibroblastos de la paciente portadora del cambio mostraron una capacidad limitada de la célula para responder frente a situaciones adversas.

Se ha llevado a cabo la búsqueda de biomarcadores basados en el perfil de miRNAs circulantes en plasma, que sirvan para monitorizar la progresión de la enfermedad. En una primera cohorte de investigación, se identificaron 18 miRNAs sobrerrepresentados en pacientes mediante miRNA-seq. Destacan cinco miRNAs previamente asociados a enfermedad hepática, metabolismo del hierro y lípidos. Análisis mediante qPCR en la misma cohorte, así como en una segunda cohorte independiente, confirmaron que tres de ellos estaban incrementados en plasma de pacientes EW y que correlacionaban con marcadores bioquímicos de función hepática. Aplicando modelos de regresión logística, se concluyó que los tres miRNAs de interés permiten la clasificación de pacientes con factores de evolución desfavorable. Por tanto, se proponen como candidatos para mejorar el seguimiento clínico o evaluar la efectividad de nuevas terapias en la EW.

RESUM

La malaltia de Wilson és un trastorn hereditari del metabolisme del coure causat per mutacions en *ATP7B*, que codifica per a una proteïna transportadora del coure al fetge; el seu mal funcionament produeix alteracions en l'excreció biliar i l'acumulació progressiva de coure, especialment en fetge i cervell.

Es va abordar l'estudi genètic del gen *ATP7B* en una col·lecció de mostres que comprèn 73 casos índex. En la sèrie clínica objecte d'estudi, que inclou 25 famílies avaluades clínicament amb l'escala de Leipzig, en 22 casos (88 %) de la sèrie s'identificaren mutacions bial·lèliques en *ATP7B*. L'estudi de l'exoma en una de les tres famílies restants, va revelar que els dos germans malalts eren heterozigots compostos per a mutacions en *CCDC115*, implicat en trastorns congènits de la glicosilació i associat amb fenotips *Wilson-like*. L'anàlisi d'expressió de variants en *ATP7B* que alterarien el procés de *splicing* en mRNA de sang perifèrica de pacients portadors i també a través d'assajos de minigens van mostrar que cinc d'elles alterarien el correcte processament dels transcrits. La caracterització d'una variant novell en el promotor d'*ATP7B* per mitjà d'assaig de luciferasa va confirmar una reducció de l'activitat del promotor en presència d'aquest canvi. Les famílies fEW-30 i fEW-77, amb diagnòstic definitiu de malaltia de Wilson i alta variabilitat intra-familiar es triaren per a l'estudi de modificadors genètics mitjançant la seqüenciació de l'exoma. S'identificaren variants candidates en heterozigosi en *MYO5B*, *CCDC93* i *COMMD1*, gens que participen en el metabolisme del coure i relacionats amb *ATP7B*. El cribratge genètic d'aquestes variants en altres pacients de la sèrie no ha fet possible establir correlacions genotip-fenotip que expliquen la variabilitat clínica observada. En l'anàlisi comparatiu de variants identificades en la família fEW-30 es detectà en heterozigosi en una de les germanes el canvi c.1255C>T (p.R419C) en *LMNA*, associat a laminopaties. Estudis de respiració mitocondrial i d'inducció d'estrès oxidatiu en fibroblast de la pacient portadora del canvi mostraren una capacitat limitada de la cèl·lula per respondre a situacions adverses.

S'ha dut a terme la determinació d'un perfil de miRNAs circulants en plasma, que puga ser útil per monitoritzar l'evolució de la patologia. En una primera cohort d'investigació, s'identificaren 18 miRNAs incrementats en pacients per miRNA-seq. Destaquen cinc miRNAs prèviament associats a diferents aspectes d'afectació hepàtica, metabolisme del ferro i lípids. Anàlisis per qPCR en la mateixa cohort i en una segona cohort independent, confirmaren l'increment de tres d'ells en plasma de pacients i que correlacionaven amb marcadors bioquímics de funció hepàtica. Aplicant models de regressió logística, es va concloure que els tres miRNAs d'interès permetixen la classificació de pacients amb factors d'evolució desfavorable. Conseqüentment, es proposen com a candidats per tal de millorar el seguiment clínic o comprovar l'efectivitat de noves teràpies en la malaltia de Wilson.

ABSTRACT

Wilson disease (WD) is an inherited disorder of copper metabolism caused by mutations in *ATP7B*, which encodes for a liver copper-transporting protein. Its dysfunction causes a deficit in biliary copper excretion and a progressive accumulation of this metal in the organism, mainly in liver and brain.

The genetic analysis of *ATP7B* was address in a sample's collection comprising 73 index cases. Regarding to clinical series of interest in this work, including 25 families clinically evaluated with the Leipzig score system, biallelic mutations were detected in 22 probands (88%). The three remaining families were investigated by exome sequencing, and in one of them, both affected siblings resulted to be compound heterozygous for mutations in *CCDC115*, involved in a congenital disorder of glycosylation and linked to Wilson-like phenotypes. To characterize splicing variants in *ATP7B*, analysis of mRNA isolated from carrier patients peripheral blood sample as well as minigene assays were performed. For five of the studied variants, alterations of proper mRNA splicing were detected. Additionally, luciferase reporter assay showed a reduction of *ATP7B* promoter activity in presence of a novel mutation in this region. Families fEW-30 and fEW-77, with definitive diagnosis of WD and high intra-familial variability belonging to the characterised clinical series of interest, were chosen for the study of genetic modifiers and investigated by exome sequencing. Heterozygous candidate variants in *MYO5B*, *CCDC93* and *COMMD1*, genes involved in copper metabolism and related to *ATP7B*, were identified. Mutational screening of these variants in selected patients was carried out, but genotype-phenotype correlations which could explain observed clinical variability were not possible. Comparative analysis of variants identified in family fEW-30 revealed that one of the affected siblings is an heterozygous carrier of *LMNA* c.1255C>T (p. R419C), associated to laminopathies. Studies of mitochondrial respiration and induction of oxidative stress in carrier patient fibroblasts reported cell limitations to cope with adverse situations.

In this work, circulating miRNAs profiling in plasma has been accomplished to identify biomarkers that could serve to monitor disease progression. Initially, miRNA-seq was performed in a discovery cohort, and 18 miRNAs were identified increased in plasma from patients. Five of them stood out, as they were previously associated with different aspects of liver disease, iron and lipids metabolism. Quantitative PCR analyses in samples from the discovery cohort as well as in an independent validation cohort confirmed that three of them were induced in plasma from WD patients and showed strong correlation with biochemical liver function markers. Logistic regression models were developed, concluding that miRNAs of interest allowed for the classification of patients with poor outcome factors. Consequently, these three miRNAs are proposed as candidates to improve clinical follow-up or to support efficacy of novel therapies in WD.