

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

**PORUCHY METABOLISMU MĚDI U ČLOVĚKA:
MOLEKULÁRNĚBIOLOGICKÁ STUDIE**


Lubomír Králík

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením Prof. MUDr. Pavla Martáska, DrSc.

V Praze 5.5. 2006


Lubomír Králík

Zvláštní poděkování patří především mému školiteli Prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc. za cenné rady a všechnen čas, který mi věnoval. Také bych chtěl poděkovat MUDr. Evě Flachsové, MUDr. Lence Pospíšilové a všem, kteří mi byli jakkoliv nápomocni, ať už radou, nebo příkladem. Celé své rodině a svým přátelům děkuji za podporu a pochopení, kterého se mi od nich dostalo.

Práce vznikla v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch na Klinice dětského a dorostového lékařství Všeobecné fakultní nemocnice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za podpory grantů GAUK 109/2006/C a MŠMT 0021620806 v letech 2004 až 2006.

ABSTRACT

Disorders of copper metabolism in man: A molecular biology study

Copper is an essential trace element for all organisms because it is required by a variety of enzymes that are involved in metabolism. However, copper is also potentially toxic, when accumulated in excess. Disruption of copper homeostasis in human leads to severe disorders, such as Menkes disease (MD) and Wilson disease (WD). Menkes disease is an X-linked recessive disorder characterised by progressive neurological degeneration, connective tissue abnormalities and kinky hair due to malabsorption of dietary copper, caused by mutations in the ATP7A gene. Wilson disease is an autosomal recessive disorder characterized by dramatic accumulation of intracellular hepatic copper with subsequent hepatic and neurological abnormalities, caused by mutations in the ATP7B gene.

Genomic DNA of 5 unrelated MD patients and of 33 unrelated WD patients were studied for mutations in the ATP7A gene and in the ATP7B gene respectively using direct sequencing of all exons of the gene amplified by polymerase chain reaction (PCR).

Disease alleles were identified in 4 MD patients and in 20 WD patients. This method allows fast and sensitive detection of mutation in patients and identification of carriers in affected families.

Key words: copper; Menkes disease; Wilson disease; ATP7A; ATP7B; metabolism; transport; mutation.

Klíčová slova: měď; Menkesova choroba; Wilsonova choroba; ATP7A; ATP7B; metabolismus; transport; mutace.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. PŘEHLED LITERATURY	11
2.1 Měď jako stopový prvek	11
2.1.1 Význam mědi v organismu	11
2.1.2 Metabolismus mědi	12
2.2 Menkesova choroba	16
2.2.1 Klinické projevy Menkesovy choroby	16
2.2.2 Molekulární podstata Menkesovy choroby	20
2.2.3 Populační genetika Menkesovy choroby	22
2.2.4 Diagnostika Menkesovy choroby	23
2.2.5 Léčba Menkesovy choroby	25
2.2.6 Modely pro studium Menkesovy choroby	27
2.3. Wilsonova choroba	29
2.3.1 Klinické projevy Wilsonovy choroby	29
2.3.2 Molekulární podstata Wilsonovy choroby	31
2.3.3 Populační genetika Wilsonovy choroby	33
2.3.4 Diagnostika Wilsonovy choroby	34
2.3.5 Léčba Wilsonovy choroby	36
2.3.6 Modely pro studium Wilsonovy choroby	38
3. MATERIÁL A METODY	40
3.1 Materiál	40
3.1.1 Biologický materiál	40
3.1.2 Použité chemikálie	40
3.1.3 Použité enzymy	41
3.1.4 Použité roztoky	42
3.1.5 Přístrojové vybavení	43
3.2 Metody	44
3.2.1 Izolace DNA	44
3.2.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)	45
3.2.3 Elektroforéza DNA	48
3.2.4 Sekvenování DNA	48
3.2.5 Analýza délky restrikčních fragmentů	48

4. VÝSLEDKY	49
4.1 Charakteristika souboru pacientů	49
4.2 Mutační analýza genu ATP7A	49
4.2.1 Soubor pacientů s Menkesovou chorobou	49
4.2.2 Výsledky mutační analýzy genu ATP7A	49
4.2.3 Analýza mutací genu ATP7A rodinách	50
4.3 Mutační analýza genu ATP7B	56
4.3.1 Soubor pacientů s Wilsonovou chorobou	56
4.3.2 Výsledky mutační analýzy genu ATP7B	56
4.3.3 Analýza mutací genu ATP7B rodinách	57
5. DISKUSE	61
5.1 Mutační analýza genu ATP7A	61
5.2 Mutační analýza genu ATP7B	62
6. SHRNUÍ	65
7. SEZNAM LITERATURY	66

ZKRATKY

ATOX1	antioxidant protein 1 (chaperon)
ATP	adenosintrifosfát
ATP7A	ATPasa transportující měď alfa
ATP7B	ATPasa transportující měď beta
BLAST	basic local alignment search tool, program pro porovnávání sekvencí
bp	nukleotidový (bazový) pár (base pair)
BSA	hovězí sérový albumin
CCS	copper chaperone for superoxid dismutase (chaperon)
COX	cytochrom c oxidasa
COX17	cytochrome c oxydase assembly protein (chaperon)
CP	ceruloplasmin
CTR1	copper transporter (přenašeč Cu)
Da	dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GHS	glutathion
HAH1	human atx homolog 1 (chaperon)
hCTR1	human copper transporter 1 (přenašeč Cu)
hCTR2	human copper transporter 2 (přenašeč Cu)
HMA	heavy metal asociated (doména vážící Cu)
kDa	kilodalton
KDDL	Klinika dětského a dorostového lékařství
MD	Menkesova choroba
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT	metallothionein
Nramp2	natural resistance - associated macrophage protein 2 (přenašeč iontů)
OHS	occipital horn syndrome, syndrom týlního rohu
PCR	polymerase chain reactin, polymerasová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
Sco	<i>S. cerevisiae</i> homolog of scod1 (chaperon)
SDS	dodecylsulfát sodný

SOD1	superoxiddismutasa
TGN	trans síť Golgiho aparátu
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TYR	tyrosinasa
UTHSCSA	University of Texas Health Science Center
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
WD	Wilsonova choroba

1. ÚVOD

Menkesova choroba a Wilsonova choroba jsou velmi závažná onemocnění narušující metabolismus mědi v lidském těle. Příčinou těchto onemocnění jsou poruchy v genech pro proteiny účastnící se přenosu mědi v buňkách. Menkesova choroba je způsobena mutací v genu ATP7A a Wilsonova choroba mutací v genu ATP7B. Odhalení mutací genu je určující pro stanovení diagnózy, následně má význam pro léčbu a prognózu těchto závažných chorob. Je také velmi důležité pro vyšetření osob, které jsou ve zvýšeném riziku postižení některým z těchto onemocnění, pro prenatální diagnostiku a presymptomatickou diagnostiku.

Cílem této práce bylo:

1. Navrhnout vhodný diagnostický postup, který by pomohl odhalit příčinu onemocnění u pacientů s Menkesovou chorobou a jeho zavedení pro molekulárně-genetickou diagnostiku v České republice.
2. Rozšířit spektrum analyzovaných mutací v genu ATP7B, z diagnostiky nejčastější mutace H1069Q, i na možnost odhalení ostatních mutací genu a uplatnit toto vyšetření u pacientů s Wilsonovou chorobou.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

V lidském těle probíhá současně řada složitých dějů. Pro zajištění všech funkcí organismu je potřeba získávat živiny z potravy a umět je rozdělit do míst jejich potřeby. Narušení těchto procesů může vést k závažným onemocněním.

2.1 Měď jako stopový prvek

Lidský organismus je složen téměř ze všech prvků, které se vyskytují na Zemi. Stopové prvky jsou v těle obsaženy ve velmi nízkém, stopovém množství nepřesahujícím 0,01% tělesné hmotnosti. Většina stopových prvků má důležitou funkci jako kofaktory enzymatických katalytických procesů, jako součást metaloenzymů nebo neenzymatických metaloproteinů. Stopové prvky vedle svojí nepostradatelnosti vykazují i vysokou toxicitu při vyšších koncentracích.

2.1.1 Význam mědi v organismu

Měď je nepostradatelný stopový prvek, který se nachází u všech organismů na Zemi. Vyskytuje se v oxidovaném (CuII) a redukovaném (CuI) stavu a slouží jako katalytický kofaktor oxidoredukčních chemických dějů v proteinech, které mají zásadní biologickou funkci. Hraje roli ve vývoji a udržování kardiovaskulární soustavy, kosterní opěrné soustavy a nervové soustavy. Měď je zahrnuta do procesu získávání energie v mitochondriích. Je nepostradatelná pro produkci kolagenu a neurotransmiteru noradrenalinu. Účastní se produkce kožního barviva, melatoninu, v metabolické dráze přeměny aminokyseliny tyrosinu. Je důležitá pro tvorbu fosfolipidů, které jsou součástí myelinové pochvy obalující nervová vlákna. Měď je důležitým antioxidantem, chrání před volnými radikály, a může tedy pomáhat předcházet vzniku zhoubného bujení, růstu nádorů a artritidě.

Nedostatek mědi je velmi vzácný. Projevuje se jako soubor poruch způsobených nedostatečnou funkcí enzymů vyžadujících měď a následným porušením metabolických procesů. Příznaky nedostatku mědi zahrnují celkovou slabost, nižší odolnost, sníženou pevnost kolagenu a elastinu, která se projevuje změnami kostí a kloubů a praskáním cév. Vlasy bývají šedé až bělavé a pokožka velmi bledá.

Ve vysokých koncentracích může být měď naopak toxická. Podobně jako železo se může podílet na reakcích, které vedou ke tvorbě vysoce reaktivních kyslíkových částic (ROS), které jsou zodpovědné za peroxidaci lipidových membrán, oxidaci proteinů a štěpení molekul DNA a RNA, což přispívá k buněčnému stárnutí a rozvoji různých patologických stavů včetně rakoviny. Měď může také zaujímat místo jiných kovových kofaktorů a tím narušit funkci jejich přirozených ligandů (Halliwell a Gutteridge 1984).

Je tedy velmi důležité, aby množství mědi bylo regulováno přesným způsobem. Homeostáze mědi je udržována hlavně prostřednictvím vylučování mědi. Nedostatek nebo přebytek mědi, který by byl způsobený pouze složením stravy, je u lidí vzácný. Podobné projevy však mohou mít genetická onemocnění, která jsou způsobená poruchami přenašečů mědi, Menkesova choroba a Wilsonova choroba (Bull et al. 1993, Chelly et al. 1993, Mercer et al. 1993, Yamaguchi et al. 1993, Bull a Cox 1994).

2.1.2 Metabolismus mědi

Celkový obsah mědi v lidském těle je 0,000 001%, avšak liší se v různých tkáních. Nejvyšší koncentrace mědi je v mozku a v játrech. Zhruba 50% veškeré mědi v těle je obsaženo v kostech a svalech. Hlavními zdroji mědi v potravě jsou obiloviny, luštěniny, ořechy, mořští živočichové a játra. Příjem mědi z potravy probíhá především v tenkém střevě a v žaludku. Z požití stravy je přijato přibližně 30% v ní obsažené mědi, kromě toho je částečně znovu vstřebána měď ze slin, žluči, žaludečních a slinivkových šťáv. Množství mědi získávané z potravy odpovídá přibližně 1 mg denně pro dospělého člověka. Tato hodnota se samozřejmě mění podle současného stavu (1.0 mg až 3.0 mg) a je odpovídajícím způsobem nižší u kojenců (0.4 mg až 0.7 mg) a dětí (0.7 mg až 2.5 mg). Denně se z těla vyloučí hlavně žlučí asi 1 mg mědi (Turnlund et al. 1989, Scott a Turlund 1994).

Do buněk je měď přenášena pomocí membránového proteinu do CTR1 (hCTR1) (Zhou a Gitschier 1997), který je exprimován v mnoha tkáních, nejvíce pak v játrech a srdci, naopak nejméně v mozku a ve svalech (Moller et al. 2000 a). Protein CTR1 zajišťuje přenos mědi přes cytoplazmatickou membránu. Obsahuje

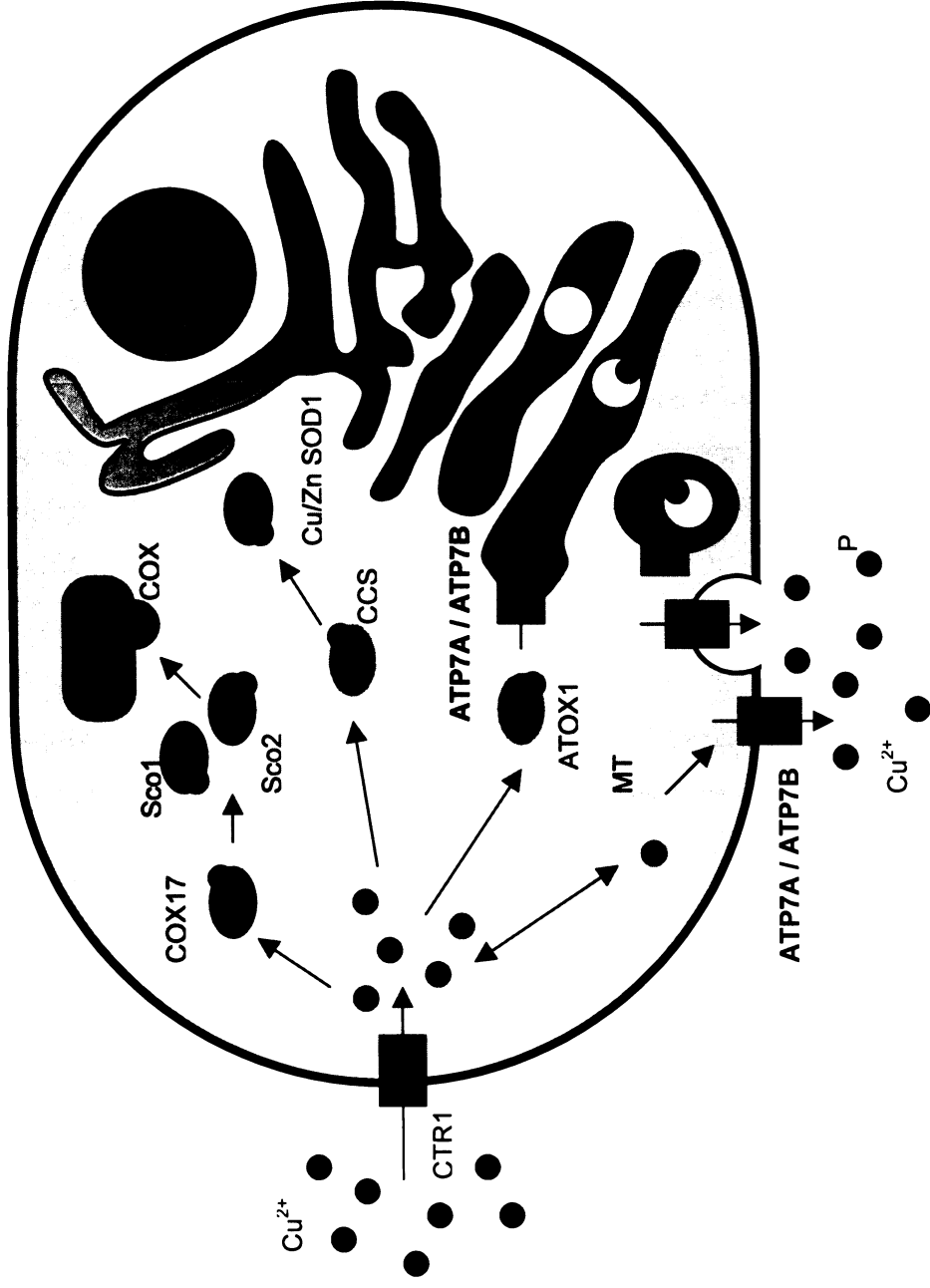
tři transmembránové domény, doménu bohatou na methionin a Cys/His doménu. Doména bohatá na methionin je umístěna vně buňky a slouží jako čidlo, které vychytává měď z mimobuněčného prostředí, zatímco Cys/His doména měď transportuje v buňce k některému z metalochaperonů, které jsou vymezeny pro určité dráhy v buňce. Dalšími známými přenašeči s nízkou afinitou pro měď jsou hCTR2 a Nramp2, který přenáší i jiné dvojmocné kovové ionty (Gunshin et al. 1997).

V cytosolu buněk je přijatá měď poutána na tripeptid glutathion (GSH) a malé proteiny metallothioneiny (MT), které vazbou mědi na své thiolové skupiny zabraňují její toxicitě (Freedman et al. 1989, Steinebach a Wolterbeek 1994). Metallothioneiny se nijak neúčastní příjmu mědi, jsou ale důležité pro ukládání kovových iontů v buňkách a k ochraně před jejich možnou toxicitou. Nejvyšší afinitu mají metallothioneiny ze všech kovových iontů právě k mědi (Suzuki et al. 1989, Lin a Kosman 1990). Měď se obvykle nevyskytuje jako volný iont (Rae et al. 1999), ale přenášená ve vazbě na specifické proteiny, aby se předcházelo možnému poškození buněk. Tyto chaperony směřují měď ke svému partnerovi v další části řetězce přenosu na místo jejího využití do různých buněčných oddílů nebo mimo buňku. Glutathion může být využíván jako obecný chaperon, který váže měď a předává ji metallothioneinu nebo i některým cuproenzymům, které přímo měď vyžadují, což by mohlo naznačovat významnější zapojení GSH při přenosu mědi a přímá vazba metalochaperonů k membránovým přenašečům by nebyla nutná (Portnoy et al. 2001). Chaperon CCS doručuje v cytoplazmě měď enzymu Cu/Zn superoxididismutase (SOD) (Culotta et al. 1997, Casareno et al. 1998), chaperon COX17 na proteiny Sco1 a Sco2, důležité pro skládání a funkci proteinu cytochrom c oxidasy (COX) (Glerum et al. 1996, Amaravadi et al. 1997), zatímco protein ATOX1 přenáší měď na ATPasy typu P nacházející se na trans síti Golgiho aparátu (TGN) (Hartl 1996, Klomp et al. 1997, Larin et al. 1999, Papadopoulou et al. 1999). V případě mimojaterních buněk se jedná o protein ATP7A (MNK), u jaterních buněk o protein ATP7B (WND) (obr. 1) (Hartl 1996, Camacaris et al. 1999, Poulos 1999, Harris 2000, O'Halloran et al. 2000, Wernimont et al. 2000, Andrew 2001, Puig a Thiele 2002).

Měď není krví přenášena volně, ale je vázaná na proteiny, nejvíce na ceruloplasmin (až 95%), dále albumin (asi 10%) a transcuprein (Wirth a Linder

1985). V portální krvi se měď váže hlavně na albumin a transcuprein a je takto směřována do jater, kde je začleněna do ceruloplasminu, který je hlavním zdrojem mědi pro ostatní tkáně (Linder et al. 1998).

Regulace výdeje mědi z buněk je nejdůležitějším mechanismem udržování homeostáze mědi. Hlavní způsob vylučování mědi z těla je prostřednictvím žluči. Proteiny ATP7A (Menkesův) a ATP7B (Wilsonův) jsou vysoce podobné strukturou i funkcí. Obě tyto ATPasy se nacházejí na membráně TGN a přímo se účastní výdeje mědi z buněk. Poruchy těchto proteinů vedou v důsledku jejich odlišné tkáňové exprese ke zcela odlišným projevům. Menkesova choroba odpovídá klinickými projevy nedostatku mědi v těle, což je způsobeno narušeným příjmem mědi ve střevech, naopak při Wilsonově chorobě se měď v těle hromadí v důsledku narušeného vylučování mědi z těla.



Obrázek 1: Schéma transportu mědi v buňce. Cu – atomy mědi, COX – cytochrom c oxidasa, P – proton (např. ceruloplasmin), MT – metallothionein, Cu/Zn SOD1 – Cu /Zn superoxidismutasa 1; CTR1 – přenašeč mědi, ATP7A, ATP7B – membránové ATPasy, Menkesův a Wilsonův protein; COX17, Sco1, Sco2, CCS, ATOX1 – metalochaperony (upraveno podle Lutsenko a Petris 2002).

2.2 Menkesova choroba

Menkesova choroba je pojmenována podle svého objevitele J. H. Menkese, který v roce 1962 popsal recesivně dědičné onemocnění vázané na chromozom X projevující se brzkým zpomalením růstu, zvláštními bílými zkroucenými vlasy a poruchou vývoje mozku vedoucí k úmrtí v prvním nebo druhém roce života (Menkes et al. 1962). Porucha transportu mědi přes membrány u Menkesovy choroby znemožňuje získávání mědi z potravy ve střevě. Kvůli tomu dochází u postižených osob k typickým poruchám vývoje, které připomínají příznaky nedostatku mědi.

2.2.1 Klinické projevy Menkesovy choroby

Klinické projevy mutací genu ATP7A se liší mírou postižení jednotlivých nemocných s Menkesovou chorobou. Klasická podoba Menkesovy choroby je typická vážným průběhem s poruchami vývoje a nervovým poškozením, zatímco mírná forma onemocnění, syndrom týlního rohu (occipital horn syndrom, OHS) se vyznačuje hlavně poruchami pojivových tkání. Menkesova choroba je velmi závažné onemocnění s typickými příznaky. Novorozenci se obvykle jeví zdraví až do druhého nebo třetího měsíce života, kdy se projeví opoždění vývoje, poruchy růstu, hypotonie a někdy i záchvaty.

Označení Menkesovy choroby jako choroba kudrnatých vlasů (kinky hair disease) je užitečné pro zjišťování nových případů, protože změny vlasů jsou jednoduše zapamatovatelným znakem, podle kterého může lékař být upozorněn na chorobný stav pacienta. Vlasy postižených bývají zpravidla krátké řídké drsné a zkroucené, většinou slabě pigmentované a mohou být i bílé nebo šedé.

Typické je snížení pevnosti pojivových tkání. Kůže vytváří nadbytečné převisy zvláště na trupu. Tváře jsou povadlé, uši se jeví veliké vzhledem k hlavě, patro je vysoce klenuté a zuby se prořezávají později. Vyskytují se abnormality systémových artérií a zvláštní vinutost mozkových cév. Další poruchy pojivových tkání zahrnují výchlípky močového měchýře, střevní polypy, změny metafýz dlouhých kostí a občasné zlomeniny žeber (Danks et al. 1971).

Poruchy vývoje nervové soustavy jsou patrné při vyšetření magnetickou rezonancí, která odhaluje u postižených změny v utváření bílé hmoty mozkové. Elektroencefalogram pak ukazuje střední až vážné abnormality někdy spojené se sekundární epilepsií. Typická je slabá kontrola pohybů hlavy, hypotonie, často spojená s nápadným hlasitým dýcháním, a autonomické disfunkce: hypotermie a hypoglycemie. Psychický vývoj bývá výrazně omezen a ovšem i to se u jednotlivých pacientů může velmi lišit.

Ukazuje se, že typ mutace a následné poškození proteinu mohou mít vliv na závažnost projevů Menkesovy choroby. Rozsáhlé delece genu vedou obvykle k vážným projevům choroby (Tumer et al. 2003) U těžkých mutací bývají projevy u postižených osob podobně závažné, naproti tomu však mírné mutace mohou vést k různě výrazným projevům u jednotlivých nemocných (Kaler et al. 1994, Borm et al. 2004).

Velmi časný nástup komplikací u Menkesovy choroby byl popsán u novorozence, který zemřel již ve 27 dnech života na vážná vnitřní krvácení a četné zlomeniny. Menkesova choroba u něj byla zjištěna z autopsie a potvrzena vyšetřením hromadění mědi v kultivovaných fibroblastech. Vyšetření genu ATP7A objevilo mutaci vedoucí k záměně R980S. Zjištěná mutace byla stejná jako mutace u nepříbuzného pacienta s Menkesovou chorobou, který zemřel ve věku 4 let bez vážných poruch pojivových tkání (Jankov et al. 1998).

Zachování zbytkové aktivity ATPasy se může projevit zmírněním příznaků Menkesovy choroby. U některých pacientů jsou projevy méně závažné, duševní vývoj je lepší než u klasické Menkesovy choroby a nemocní mohou mluvit a samostatně chodit. Častými neurologickými nálezy jsou slabost, porucha koordinace pohybů, třes, trhavé pohyby hlavy, ovšem epileptické záchvaty se objevují zřídka. Mentální retardace je mírná, výrazné jsou však poruchy pojivových tkání.

Nejmírnější projevem poruchy genu ATP7A je syndrom týlního rohu (OHS). Typickým rysem této podoby onemocnění je snížení pevnosti pojivových tkání, kůže kostí a cév. Inteligence osob je normální nebo jen mírně nižší a jediným neurologickým projevem je dysautonomie, porucha autonomního

vegetativního systému spojená s poruchou trávení. Nemocní se syndromem týlního rohu se dožívají dospělého věku.

Mírnější formy choroby mohou být způsobené mutacemi sestřihových míst, které ovšem nevyloučí, pouze sníží možnost vzniku řádného proteinu. Neobvyklá varianta Menkesovy choroby se objevila u čtyř osob ve třech generacích jedné rodiny (Proud et al. 1996). U těchto pacientů byly zjištěny týlní exostózy, volná kůže a vážná mentální retardace. Vyšetření genu ATP7A ukázalo, že došlo k záměně A za T v donorové oblasti pro sestřih, což ve výsledku vedlo k chybné úpravě transkriptu (Kaler et al. 1994). Přesto zhruba z 20% probíhal sestřih správně, což by mohlo být příčinou jedinečného fenotypového projevu u postižených osob. Tito pacienti, stejně jako osoby se syndromem týlního rohu (Wakai et al. 1993), představují jen alelické varianty Menkesovy choroby (Proud et al. 1996). Fenotypové překryvy mezi Menkesovou chorobou a syndromem týlního rohu je nutné brát v úvahu, protože obě dvě tato onemocnění jsou způsobena mutací genu ATP7A.

Za různou míru intenzity projevů Menkesovy choroby u pacientů by mohla být zodpovědná skutečnost, že přenos mědi přes membránu a přemístování proteinu po buňce jsou nezávislé. Protein tedy může například přenášet měď do nitra Golgiho komplexu a tak zásobovat proteiny, které měď vyžadují, ale nemusí být schopen přecházet k cytoplazmatické membráně. Proto případy Menkesovy choroby s určitým typem mutací mohou příznivě reagovat na léčbu mědí (Christodoulou et al. 1998, Kim et al. 2000) a jiné nikoliv. Již i nepatrná přítomnost funkčního proteinu vede k mírnému projevu choroby, syndromu týlního rohu (Moller et al. 2000 b).

Biochemický projev Menkesovy choroby je typický nízkou koncentrací mědi v séru, játrech a mozku, což je způsobeno narušením příjmu mědi ve střevech. Celkový obraz Menkesovy choroby je výsledkem poruchy funkce enzymů, které vyžadují měď a připomíná projevy nedostatku mědi (Danks et al. 1972). Jsou známy mnohé cuproenzymy a projevy poruchy jejich funkce při nedostatku mědi. Hlavním faktorem ovlivňujícím neuropatologii Menkesovy choroby je snížená aktivita cytochrom c oxidasy, důležité součásti řetězce přenosu elektronů v mitochondriích, a tím způsobený nedostatek energie, který také

vysvětluje svalovou slabost u pacientů s tímto onemocněním. Nedostatek mědi vede ke snížení pevnosti pojivových tkání, protože nedochází k propojení lysinových zbytků v elastinu a kolagenu, jež zahajuje enzym lisyloxidasa, která je závislá na mědi. Vlivem poruchy funkce tohoto enzymu dochází k výraznému snížení pevnosti pojivových tkání v mnoha orgánech a cévách.

Enzym sulfhydryloxidasa je zodpovědný za tvorbu disulfidických vazeb v keratinu. Drsnost, hrubost a třepivost vlasů je důsledek špatné tvorby disulfidických vazeb v keratinu, protože tento proces je také závislý na mědi. Nefunkční tyrosinasa, enzym, který se účastní tvorby melaninu, je zodpovědná za poruchy pigmentace vlasů a za celkovou bledost pokožky. Porucha funkce askorbát oxidasy, která přeměňuje dehydroaskorbát na askorbát, vede ke snížení obsahu minerálů v kostech. Nedostatečnost funkce enzymu dopamin β -monooxygenasy, důležitého enzymu v dráze syntézy katecholaminu, je zodpovědná za abnormální složení plazmy a mozkomíšni tekutiny. To je také nejspíše příčinou pozorované hypoglykémie, teplotní nestability a ztráty sympatických adrenergních funkcí. Cuproenzym, peptidyl-glycinmonooxygenasa, je důležitý pro odstranění posledního glycinu z karboxy-konce prekurzorů mnoha hormonů (gastrin, cholecystokinin, kortikotropin uvolňující faktor (CRF) a thyrotropin uvolňující faktor (TRF), kalcitonin a vasopresin). Pokud nedojde k úpravě na konečný produkt, jsou prekurzory biologicky neaktivní nebo aktivní jen velmi nepatrně. Nedostatečná funkce Cu/Zn superoxid dismutasy způsobuje nižší odolnost vůči volným radikálům, které mohou vážně poškozovat buňky.

Byla vyslovena i představa, že Menkesova choroba je primárně způsobena špatným hospodařením se zinkem, přesněji poruchou v domnělém proteinu vážícím zinek (Scheinberg a Collins 1989), která se neukázala být správnou. Přítomnost zinečnatých iontů v buňkách způsobuje syntézu metallothioneinu (MT), na který se zinek váže. Protože však afinita metallothioneinu k mědi je 100 000krát větší než k zinku, nahradí měď zinek v metallothioneinu a zůstane vázána. Takto vázaná měď není schopna opustit buňky a zůstává v nich. Toho se dá využít ke snížení vstřebávání mědi ve střevech podáváním zinku u pacientů Wilsonovou chorobou.

Bez včasného zahájení léčby mimostřevním podáváním mědi zpravidla dojde u klasické Menkesovy choroby k těžkým neurodegeneraci a smrti do tří let. Častou příčinou úmrtí bývají vnitřní krvácení, subdurální hematom nebo selhání dýchání při infekcích. V současné době je Menkesova choroby dobře charakterisována po stránce klinických projevů. Jsou zaznamenávány všechny zjištěné mutace. Stále ještě je třeba rozvíjet diagnostiku a samozřejmě možnosti léčby, kde by mohl pomoci myší model (Tümer a Horn 1997).

2.2.2 Molekulární podstata Menkesovy choroby

Pozorovatelné změny chromozomů nejsou u Menkesovy choroby časté, nejsou proto ani využívány v diagnostice. Přesto však studium chromozomů u osob s touto chorobou pomohlo odhalit její podstatu (Gerdes et al. 1990). K upřesnění polohy genu, jehož porucha způsobuje Menkesovu chorobu, do pruhu Xq13 pomohlo objevení vyvážené translokace $t(2;X)$ u ženy s Menkesovou chorobou, kde zlom chromozomu X nastal v oblasti Xq13.1 (Kapur et al. 1987). U jiného pacienta s Menkesovou chorobou bylo objeveno jedinečné přeuspořádání chromozomu X zahrnující inzerci úseku Xq13.3-q21.2 dlouhého raménka do oblasti Xp11.4 krátkého raménka, tedy $46,XY,ins(X)(p11.4 q13.3q21.2)$, které se vyskytovalo i u chlapcovy matky, která byla fenotypově zdravá. Mutovaný chromozom X byl přednostně inaktivován. Tento nálezný potvrzoval umístění lokusu pro Menkesovu chorobu do oblasti Xq13 a zpřesňoval polohu na Xq13.3 (Tümer et al. 1992). Vzácné jsou případy výskytu Menkesovy choroby u žen. U japonské dívky byla Menkesova choroba způsobena de novo translokací $t(X;21)$ se zlomem v oblasti Xq13.3, který přerušil gen ATP7A (Sugio et al. 1998). Typické projevy Menkesovy choroby se také vyskytly u dívky s de novo translokací $46,X,t(X;13)(q13.3;q14.3)$, která pravděpodobně narušila funkci genu (Abusaad et al. 1999).

V roce 1993 tři nezávislé skupiny (Chelly et al. 1993, Mercer et al. 1993, Vulpe et al. 1993) izolovaly kandidátní gen pro Menkesovu chorobu. Vycházelo se přímo z místa Xq13.3, kde došlo ke zlomu chromozomu při translokaci (Kapur et al. 1987). Rozsáhlý gen ATP7A (dříve MNK) se rozkládá v oblasti 150 000 bp a obsahuje 23 exonů. Exon 10 je alternativně sestřiháván (Dierick et al. 1995). Transkript je 8 500 bází dlouhý a kóduje protein o 1 500 aminokyselinách (Vulpe

et al. 1993). Počáteční kodón ATG je v druhém exonu. Důkazy nasvědčovaly tomu, že naklonovaný lokus ATP7A má spojitost se vznikem a rozvojem Menkesovy choroby. Při porovnání se známými údaji byly zjištěna vysoká míra podobnosti produktu sledovaného genu k ATPasám typu P, což je rodina integrálních membránových proteinů, které díky fosforylaci aspartátu přenášejí kationty přes membrány (Vulpe et al. 1993). Navíc tento protein vykazoval vlastnosti proteinů vázících měď. Protein ATP7A (dříve MNK, také známý jako Menkesův protein) je ATPasa P-typu 7A a podílí se na transportu mědi.

Výzkum exprese genů ukázal, že mRNA odpovídající genu ATP7A je přítomna v různých typech buněk a tkání s výjimkou jater, kde je exprese potlačena. Nález se shodoval s klinickým pozorováním, že játra jsou Menkesovou chorobou nezasažena a nedochází v nich k hromadění mědi.

Menkesův gen (ATP7A) a Wilsonův gen (ATP7B) vykazují velmi podobnou strukturu exonů (Tümer et al. 1995), což nasvědčuje jejich společnému původu. Menkesův protein obsahuje na svém amino-konci šest oblastí (HMA - heavy metal asociated), které váží těžké kovy. Je možné je najít i v bakteriálních proteinech nebo metalochaperonu ATOX1. Tyto úseky jsou vysoce konzervované a obsahují aminokyseliny GMXCXXC. Už i jedna tato sekvence stačí pro zajištění přenosu mědi přes membránu (Kodoma a Murata 1999).

Protein ATP7A se nachází v trans-síti Golgiho aparátu (TGN) (Petris et al. 1996) a v závislosti na koncentraci mědi v cytosolu se přemisťuje mezi membránou TGN a cytoplazmatickou membránou (Petris et al. 1996). Protein ATP7A, stejně jako ostatní proteiny přítomné v Golgiho aparátu, obsahují specifický lokalizační signál (Francis et al. 1998). Pomocí imunofluorescence bylo zjištěno, že Menkesův protein plné délky v normálním stavu je směřován do Golgiho aparátu, zatímco alternativně sestřižená forma, u níž chybí oblast pro transmembránové domény 3 a 4 kódované exonem 10 a která se vyskytuje u syndromu týlního rohu, je umístěn v endoplazmatickém retikulu. S využitím sekvence exonu 10 fúzované s molekulou, která se běžně v Golgiho aparátu nevyskytuje, bylo stanoveno, že sekvence 38 aminokyselin, zahrnujících transmembránovou doménu 3 proteinu ATP7A, byla dostačující pro umístění molekuly do Golgiho aparátu. Oblast proteinu kódovaná exonem 10 může tedy

být zodpovědná za rozdílné cílové nasměrování a obě izoformy mohou být vyžadovány pro úplný transport mědi uvnitř buňky (Francis et al. 1998). Pro umístění proteinu ATP7A do trans-sítě Golgiho aparátu se ukázaly být důležité dva sousední leuciny L1487 a L1488 na karboxy-konci proteinu, které nicméně nehrají roli při výdeji mědi z buňky. Pravděpodobně slouží jako cílové místo pro vyhledání proteinu při návratu do Golgiho aparátu (Petris et al. 1998). Při nízké koncentraci mědi v buňce se protein ATP7A nachází na membráně TGN. Po zvýšení koncentrace mědi v buňce se přesune na cytoplazmatickou membránu a po opětovném návratu koncentrace na základní, nízkou hladinu se vrátí zpět na membránu TGN (La Fontaine et al. 1998). Ke stálému koloběhu proteinu mezi membránami dochází i při základní koncentraci mědi. Při vyšší hladině vnitrobuněčné mědi byl protein ATP7A přesouván k cytoplazmatické membráně, ačkoli odsun proteinu od cytoplazmatické membrány nebyl potlačen a protein se stále přemísťoval mezi membránovými oddíly. Toto zjištění naznačuje, že měď spíše podporuje exocytosu a pohyb proteinu ATP7A k cytoplazmatické membráně než snížení zpětného návratu proteinu. (Petris a Mercer 1999). Protein ATP7A je tedy potřebný k přísunu mědi pro proteiny, které obsahují měď jako kofaktor, při jejich průchodu sekretorickou drahou (Petris et al. 2000) a k udržování hladiny mědi v buňce (Kuo et al. 1997).

2.2.3 Populační genetika Menkesovy choroby

Menkesova choroba je poměrně vzácné genetické onemocnění. Podle záznamů z let 1976 až 1987 z Dánska, Francie, Nizozemí, Velké Británie a Německa byla stanovena kombinovaná frekvence postižených Menkesovou chorobou na 1 z 298 000 narozených dětí. Na základě počtu zjištěných případů z tohoto období vyplývá, že mutační rychlost pro Menkesovu chorobu je $1,96 \times 10^{-6}$ (Tonnesen et al. 1991). Frekvence výskytu v Melbourne je přibližně 1 na 40000 živě narozených a spíše ještě vyšší, než se dříve předpokládalo, protože někteří pacienti mohou zemřít bez zjištění diagnózy choroby (Danks et al. 1971). V jedné třetině případů Menkesovy choroby se předpokládá nezděděné založení choroby spojené se vznikem nové mutace. Jako choroba vázaná na chromozom X se typicky vyskytuje u chlapců.

2.2.4 Diagnostika Menkesovy choroby

Mentálně retardovaní chlapci s pili torti, poruchami vývoje a růstu, hypotonií a záchvaty jsou v dnešní době již vyšetřováni s podezřením na Menkesovu chorobu. Diagnóza bývá určena u chlapců ve věku okolo šesti až deseti týdnů, nečastěji však až okolo osmého měsíce života, protože příznaky Menkesovy choroby často u novorozenců unikají pozornosti kvůli jejich nevýraznému projevu. Při diagnostice je třeba Menkesovu chorobu odlišit od onemocnění s podobnými příznaky, jako jsou například organické acidurie, aminoacidurie nebo mitochondriálními myopatie.

Vlasy a často i řasy nemocných bývají krátké řídké drsné zkroucené a většinou slabě pigmentované, bílé nebo šedé, a mohou připomínat drátěnku. Vlasy bývají kratší a tenčí na stranách hlavy. Pozorováním změn vlasů ve světelném mikroskopu lze snadno odhalit pili torti (podélné zkroucení vlasů), trichoclasia (příčnou lomivost vlasů) a trichoptilosis (podélnou lomivost vlasů).

Po dlouhodobých zkušenostech s Menkesovou chorobou bylo upozorněno na nedostatek v diagnostice podle změn vlasů, jež nemusí být vždy abnormální. Byl upřednostněn jednoduchý a spolehlivý test založený na stanovení množství mědi v séru a spolu s tím navržen nový název, vrozená hypocupraemie (Osaka et al. 1977). Byly vytvořeny i další diagnostické postupy jako zjišťování poruchy výdeje mědi z fibroblastů postižených osob nebo stanovení poškozeného metallothioneinu (Chan et al. 1978).

Dále je možno u pacientů pozorovat volnost kůže v týlu, na krku a na trupu, převislé tváře, vpadlý hrudník (pectus excavatum), časté tříselné kýly, později hypotonii, opoždění mentálního vývoje a poruchu růstu. V případě mírnější formy choroby, syndromu týlního rohu, bývají přítomny výrůstky týlní kosti v místě úponu trapézového svalu, které lze vyšetřit pohmatem nebo radiograficky. Dalšími podpůrnými pozorováními mohou být změny metafýz dlouhých kostí, zvýšená lámavost kostí a volné klouby.

Koncentrace mědi v séru nemocných bývá snižená (MD 0-60 $\mu\text{g}/\text{dl}$, OHS 40-80 $\mu\text{g}/\text{dl}$) oproti normálním hodnotám (70-150 $\mu\text{g}/\text{dl}$, novorozenci 20-70 $\mu\text{g}/\text{dl}$), stejně tak i koncentrace ceruloplasminu jsou nízké (MD 30-50 mg/dl ,

OHS 130-250 mg/dl) ve srovnání běžnými (200-450 mg/dl, novorozenci 50-220 mg/dl). Koncentrace mědi i ceruloplasminu v séru jsou nízké u všech novorozenců a rozsahy normálních koncentrací se překrývají s rozsahy koncentrací u postižených osob, takže je ztíženo využití jejich stanovení k diagnostickým účelům. Přesto mohou být jakýmsi vodítkem.

Častým podpurným testem je sledování hromadění radioaktivního izotopu mědi v kultivovaných fibroblastech nemocných, které nejsou schopny vydávat měď. Kultivované fibroblasty pacientů mají přibližně pětkrát vyšší koncentraci mědi, než je běžné (Goka et al. 1976), což pomohlo vysvětlit patologii u Menkesovy choroby na buněčné úrovni a ukázalo se být i vhodným diagnostickým postupem (Williams et al. 1978).

Možným biochemickým testem je stanovení koncentrace katecholaminu v plazmě nebo mozkomíšní tekutině, což může upozornit na změny funkce dopamin β -monoxygenasy, jejíž aktivita je u Menkesovy choroby snížena.

K diagnostice Menkesovy choroby je možno využít i molekulárně genetické metody, které jsou využívány k potvrzení diagnózy, k určení přenašečů mutací a k prenatální diagnostice tohoto onemocnění. Jediným známým genem, jehož porucha je spojena s Menkesovou chorobou a syndromem týlního rohu, je gen ATP7A. Nejčastěji využívanými metodami pro nalezení mutací jsou mnohonásobná PCR a následná přímá sekvenční analýza kódujících oblastí genu ATP7A a přilehlých intronových oblastí. U mužů je takto možno přímo zjistit rozsáhlé delece i bodové mutace. Průzkumem mezi 383 nepříbuznými pacienty postiženými Menkesovou chorobou bylo zjištěno 57 rozsáhlých delecí v genu ATP7A, což odpovídá 14,9%. U většiny z nich vedly tyto poruchy ke klasické Menkesově chorobě a úmrtí v raném dětství (Tümer et al. 2003). Je možno provádět i prenatální diagnostiku v prvním trimestru pomocí specifických DNA sond (Tümer et al. 1994). Velmi vysoká různorodost mutací ovšem zhoršuje vyhlídky na brzké vyvinutí genetického testu pro diagnostiku Menkesovy choroby (Tümer et al. 1997).

Přenašeči alely pro Menkesovu chorobu nemají klinické projevy choroby a biochemická vyšetření pro určení přenašečů jsou nespolehlivá, protože se

výsledky kryjí s normálními hodnotami. Přenašeči však mohou být někdy určeni vyšetřením vlasů na pili torti. Negativní výsledek takové prohlídky samozřejmě nemůže zcela vyloučit možnost, že zkoumaná osoba přenašečem skutečně je. Pili torti byly vždy nalezeny u všech postižených mužských pacientů a u 43 % z 28 jistých přenašeček. Podle této skutečnosti, pokud jsou pili torti přítomny, mohou být považovány za spolehlivý ukazatel heterozygotního stavu (Moore a Howell 1985).

2.2.5 Léčba Menkesovy choroby

Většina pacientů s Menkesovou chorobou, pokud není včas léčena, umírá ve věku 6 měsíců až 3 let. Byly popsány i případy, kdy se nemocní dožili i 9 let (Westman et al. 1988) a 13,5 let (Sander et al. 1988). Objevují se i formy choroby s mírnými příznaky, pravděpodobně alelické formy, u kterých je průběh onemocnění mírnější a délka života bývá vyšší (Procopis et al. 1981).

Již dlouho je vyvíjena snaha o vytvoření vhodné léčby založené na poznacích o metabolismu mědi (Williams et al. 1977). Terapie využívající vitamin C se ukázala být při Menkesově chorobě neúčinná (De Groot et al. 1989). Při léčbě měďnatými preparáty se síranem měďnatým, nedošlo k podstatnému klinickému zlepšení, ovšem podkožním podáváním histidinátu měďnatého, který je přirozeně přítomen v séru jako přenašeč mědi, bylo dosaženo vynikajících výsledků u pacientů s Menkesovou chorobou (Sherwood et al. 1989). Měď pravděpodobně přechází přes hematoencefalickou bariéru právě ve formě histidinátu měďnatého (Hartter a Barnea 1988).

Dlouhodobé podávání mědi může zlepšit přežívání pacientů. U pacienta s méně vážnou formou choroby, který byl dlouhou dobu léčen injekcemi histidinátu měďnatého až do svých deseti let, došlo k výraznému zlepšení stavu. Nevyvinuly se u něj žádné kosterní abnormality lebky ani dlouhých kostí končetin. (Procopis et al. 1981, Danks 1988). Dlouhodobé sledování čtyř chlapců, kteří byli od narození léčeni parenterálně histidinátem měďnatým, přineslo kladné výsledky, jelikož příbuzní tří ze čtyř chlapců měli vážné klinické projevy shodné s klasickou Menkesovou chorobou. Důsledkem včas nasazené léčby probíhal u pacientů normální nebo téměř normální intelektuální vývoj, ale vyvinulo se

mnoho velmi závažných somatických abnormalit jako u příbuzného syndromu týlního rohu, včetně těžké hypotenze. Nejstaršímu z pacientů bylo 20 let (Christodoulou et al. 1998).

Ukázalo se, že histidinát měďnatý je neúčinný, pokud je nasazen později než v prvních několika měsících života (Tümer et al. 1996). Nicméně u dvou pacientů, u nichž byla léčba zahájena včas, byla odezva příznivá (Sherwood et al. 1989) a ve věku 19 a 9 let (Tümer et al. 1996) tito pacienti trpěli slabou formou choroby s mírnými příznaky, s převažujícími poruchami pojivových tkání připomínajícími syndrom týlního rohu. Nevyřešena zůstala otázka vážnosti projevů v jednotlivých případech onemocnění. Jeden z chlapců byl podle rodinné anamnézy náchylný ke zdědění velmi vážné formy choroby. Objasnění přinesla analýza mutace v genu *ATP7A* u těchto pacientů. Jednalo se o delecii jednoho páru bází v exonu 4 u jednoho pacienta a v exonu 12 u druhého. Obě mutace vedly k posunu čtecího rámce a vytvoření předčasného terminačního kodónu ve stejném místě, což vedlo k tvorbě značně zkráceného proteinu. Postižení chlapců by proto muselo být velmi vážné. Léčba histidinátem měďnatým může být tedy účinná (Tümer et al. 1996).

Ukázalo se, že vhodným léčebným prostředkem pro zvládnutí osteoporosy u dětí s Menkesovou chorobou je pamidronát, jehož používání vedlo u tří dětí se značnou osteoporózou, způsobenou nedostatkem mědi, po roční léčbě ke zvýšení obsahu minerálů v kostech s velmi dobrými výsledky. U dvou dětí už dále nedocházelo ke zlomeninám a nebyly zaznamenány žádné nepříznivé účinky pamidronátu (Kanumakala et al. 2002). Častým zákrokem při Menkesově chorobě je chirurgické odstranění výchlipek močového měchýře a podpůrná léčba antibiotiky, aby nedocházelo k infekcím. U některých pacientů bývá také nutné pomocné zabezpečení výživy kvůli poruchám trávení.

Včas zahájená léčba podkožním podáváním měďnatých solí (chlorid, histidinát) u dětí s Menkesovou chorobou může vést k upravení vývoje a zlepšit stav nemocných. Léčba by měla udržovat koncentraci mědi v těle na normálních hodnotách (70-150 $\mu\text{g}/\text{dl}$) a doporučená dávka je 250 μg mědi podávána dvakrát denně, po prvním roce jednou denně.

Bez včasného nasazení léčby mědí postižení Menkesovou chorobou umírají v útlém dětství. Pokud je léčba nasazena až po nastoupení příznaků, není neurologické zlepšení již možné. Včasné zahájení léčby umožní vcelku normální vývoj. Výsledek léčby ovšem může být také závislý na typu mutace a kompletním genetickém pozadí.

2.2.6 Modely pro studium Menkesovy choroby

Zkoumání životních pochodů u jiných organismů pomáhá lépe pochopit i děje v lidské těle a je velmi užitečným zdrojem poznání. Je třeba mít ovšem na paměti, že využití analogie je při těchto pozorováních omezeno, vždyť dobrý modelem člověka nemusí být ani jiný člověk.

Skvrnitý (mottled) fenotyp u mutantních linií myší a u skvrnitých křečků odpovídá zřejmě Menkesově chorobě (Yoon 1973, Hunt 1974). Skvrnité myši byly použity pro sledování případů aneurysma aorty. U postižených zvířat s věkem postupně rostlo množství případů a už v šesti měsících postihlo všechna zvířata (Brophy et al. 1988).

Po srovnání myší se skvrnitým fenotypem a normálních myší byl popsán myší lokus Mnk, který odpovídá lokusu pro Menkesovu chorobu (George et al. 1994). Mutace v genu odpovídajícím lidskému ATP7A byla objevena i u myší (Das et al. 1995). To umožnilo využít linie skvrnitých myší jako model pro studium Menkesovy choroby (Cecchi et al. 1997, Reed a Boyd 1997).

Samci myší s alelou mottled-brindled (skvrnitý-strakatý) hromadí měď ve střevě, trpí poruchou přenosu mědi do jiných orgánů a umírají několik týdnů po narození. Většina mědi je u skvrnitých myší ve střevě vázána na metallothionein (MT). K objasnění funkce metallothioneinu při poruše funkce myšího proteinu Atp7a byly kříženy skvrnité myši samice a myši samci s cíleně poškozenými geny Mt1 a Mt2. Bez funkčního metallothioneinu umírali skvrnití samci i heterozygotní samice do 11. dne embryonálního vývoje. Vysvětlením umírání samic by mohla být přednostní inaktivace otcovského chromozomu X v extraembryonálních tkáních a následná toxicita přijaté mědi v nepřítomnosti metallothioneinu. Buňky s nefunkčním metallothioneinem získané z embryí skvrnitých myší jsou citlivé na měď. Metallothionein je nezbytný na ochranu buněk proti toxickým účinkům

mědi v embryonální placentě, pokud je nefunkční systém výdeje mědi z buněk. Stejně tak metallothionein chrání jaterní buňky u Wilsonovy choroby s poškozeným proteinem ATP7B, který zde plní obdobnou roli jako ATP7A mimo játra, před toxickými hladinami mědi (Kelly a Palmiter 1996). Rozbor genových produktů v různých tkáních a následná imunofluorescence ledvin odhalila roli proteinu Atp7a ve zpětném vstřebávání mědi z moči v proximálních a distálních tubulech (Grimes et al. 1997).

Zjištění podstaty mutace u skvrnitých myší je důležité pro pochopení normální role proteinu kódovaného genem ATP7A a navrhování postupů léčby Menkesovy choroby. Skvrnité myši mají deletovány pouze 2 aminokyseliny ve vysoce konzervované, nicméně funkčně necharakterizované, oblasti genu ATP7A (Grimes et al. 1997). Při zkoumání příjmu a zadržování mědi kultivovanými fibroblasty získanými ze čtyř odlišných alel pro skvrnitý fenotyp s přežíváním samců po narození, pěti různých alel pro skvrnitost spojených s prenatálním smrtí samců a kontrol se všechny mutantní alely odlišovaly v příjmu i zadržování mědi. Získané hodnoty odpovídaly dříve zjištěným hodnotám pro fibroblasty pacientů s Menkesovou chorobou. Nebyly však nalezeny žádné rozdíly mezi alelami spojenými s přežíváním nebo s prenatálním úmrtím (Masson et al. 1997).

Myši se skvrnitým (mottled) fenotypem jsou vhodným modelem pro studium Menkesovy choroby a očekává se, že by mohly být využity i pro vývoj nových léčebných postupů.

2.3 Wilsonova choroba

Wilsonova choroba je autozomálně recesivní onemocnění charakteristické nadměrným hromaděním mědi v těle, způsobené poruchou výdeje mědi z jater, s následnými jaterními a neurologickými poruchami. Wilsonova choroba získala jméno po S. A. Kinnieru Wilsonovi, který onemocnění v roce 1912 popsal.

2.3.1 Klinické projevy Wilsonovy choroby

Projevy Wilsonovy choroby zahrnují jaterní, neurologické a psychiatrické poruchy nebo jejich kombinace. Příznaky se objevují u postižených osob ve věku od tří (Thomas et al. 1995) do šedesáti let (Danks et al. 1990) a mohou se lišit i mezi příbuznými pacienty. Průměrný věk projevu Wilsonovy choroby u homozygotů pro nejčastější mutaci H1069Q je asi 20 let (Stapelbroek et al. 2004). Pokročilá molekulárně genetická vyšetření umožnila objasnit diagnózu i u osob s jinými neobvyklými klinickými a biochemickými projevy (Denning a Berrios 1989, Walshe 1989, Steindl et al. 1997).

U nemocných s Wilsonovou chorobou podstupují bazální ganglia a játra změny, které vedou k neurologickým projevům a známkám cirhózy jater. Jsou rozlišovány nejméně dva hlavní typy Wilsonovy choroby. Forma s pozdějším nástupem a spíše neurologickými projevy typická pro slovanskou populaci a forma s brzkým nástupem v dětství a převážně jaterními projevy, typická pro západní Evropu (Cox et al. 1972).

Jaterní podoba Wilsonovy choroby je proměnlivá a může připomínat příznaky akutní hepatitidy, náhlého jaterní selhání, chronické choroby jater, opakované žloutenky nebo hemolytické anémie mezi které patří únava, malátnost, bolest břicha, vyrážka, hemolýza, selhání ledvin a anorexie. Wilsonova choroba se jaterní formou projevuje spíše v nižším věku u dětí a mladších dospělých, obvykle mezi 6 a 45 lety, výjimečně i u dětí okolo 3 let (Wilson et al. 2000) nebo starších osob do šedesáti let.

Koncentrace ceruloplasminu v krvi u Wilsonovy choroby je nízká a aktivita enzymů obsahujících měď (např. cytochrom c oxidasa) je nižší (Shokeir a Shreffler 1969) a také funkce mitochondriálních enzymů jsou sníženy.

Pravděpodobnou příčinou je tvorba volných radikálů a následné oxidativní poškození mitochondrií způsobené nadměrným hromaděním mědi (Gu et al. 2000). Tvorba volných radikálů je významným prvkem z hlediska patogeneze Wilsonovy choroby. Hromadění mědi v játrech vede ke zvýšenému oxidativnímu stresu v buňkách a přináší s sebou riziko vzniku karcinomu jater. U pacientů s Wilsonovou chorobou bylo nalezeno zvýšené množství mutací v genech způsobené oxidativním poškozením DNA. Využití antioxidantů při léčbě Wilsonovy choroby by mohlo být prospěšné.

Neurologickými projevy Wilsonovy choroby jsou především poruchy pohybu a rigidní dystonie. Poruchy pohybu se většinou objevují nejdříve a zahrnují třes, špatnou koordinaci pohybu, posunčinu a ztrátu kontroly jemných pohybů (zhoršené psaní). Později se rozvíjejí křečovitě stahy svalstva (spastická dystonie) způsobující maskovitý vzhled obličeje, strnulost, poruchy chůze, poruchy artikulace a ztížené polykání (Stevell et al. 2001). Změny mozku zjištěné magnetickou rezonancí zahrnují celkovou atrofii a abnormality bazálních ganglií (Starosta-Rubinstein et al. 1987, van Wassenauer-van Hall et al. 1995). Neurologické změny u osob s převážně jaterními příznaky bývají mírnější a projevují se změnami nálad, depresí, poruchou sebeovládání, zhoršením pracovních výkonů, poruchou jemných pohybů (psaní) a celkovým ztíženým ovládním pohybu.

U pacientů s psychiatrickými projevy jsou časté deprese, neurotické chování zahrnující fobie, agresivitu a antisociální chování. Později se může rozvíjet rozklad osobnosti, úzkostlivost, náladovost, rovněž se může objevit zhoršení intelektu, potíže s abstraktním myšlením, zhoršená paměť a nepozornost.

U nemocných s Wilsonovou chorobou se často vyskytuje Kayserův - Fleischerův prstenec, což je zelený nebo měděně zbarvený prstenec na okraji rohovky a představuje místo ukládání mědi. Bylo pozorováno i zelenavé zbarvení nehtů (azure lunulae), které zřejmě vzniká podobným způsobem (Bearn a McKusick 1958). Vysoká koncentrace mědi v těle může způsobit kardiomyopatie, srdeční arytmie (Kuan 1987), chondrokalcinosis a osteoarthritis, v důsledku hromadění mědi v synovialní tekutině velkých kloubů (Menerey et al. 1988), a poškození ledvin. U pacientů s WD jsou poměrně časté hypercalciurie,

nephrocalcinosis a nephrolithiatis, někdy i proteinurie a hematurie. Osoby s Wilsonovou chorobou bývají plodné a těhotenství u léčených pacientek s Wilsonovou chorobou bývají úspěšná (Hatard a Kunze 1994, Devesa et al. 1995, Brewer et al. 1998, Furman et al. 2001).

Mutace genu ATP7B, které přerušují protein nebo znemožní jeho funkci, často vedou k rozvoji jaterních poruch již v ranném dětství (Thomas et al. 1995) a podmiňují vážnější projev Wilsonovy choroby než mutace, které pouze snižují aktivitu proteinu (Cox 1996, Liu et al. 2004, Deguti et al. 2004). Nejzávažnější mutace způsobují projev choroby již před 12 rokem a v tomto věku se jedná spíše o poruchy jaterní (Panagiotakaki et al. 2004). Nicméně vážnost průběhu choroby může být ovlivněna nejen typem mutace, ale i jinými faktory, jak je možno pozorovat u různě závažných projevů u osob se stejnými mutacemi, zvláště pak u sourozenců.

2.3.2 Molekulární podstata Wilsonovy choroby

Wilsonova choroba je autozomálně recesivní onemocnění způsobené poruchou genu ATP7B. Gen ATP7B se nachází na chromozomu 13 (Frydman et al. 1985) v části q14.3-q21.1 dlouhého raménka (Kooy et al. 1993), kde byla identifikována oblast podobná sekvenci kódující předpokládané domény vážící měď u ATPasy defektní při Menkesově chorobě (ATP7A) (Bull et al. 1993), a je exprimován hlavně v játrech a ledvinách, je členěn do 21 exonů a kóduje protein o 1465 aminokyselinách. Podobnost mezi ATP7A a objeveným ATP7B byla 78% v transdukční oblasti, 89% v oblasti kanálu a fosforylace a 79% v oblasti vazby ATP. Celková podobnost mezi oběma proteiny byla 57%. (Bull et al. 1993). Krátce na to byl nalezen homolog lidského Wilsonova genu u potkanů Long Evans Cinnmom (LEC), u nichž je porucha tohoto genu zodpovědná za hepatitidy, (Sasaki et al. 1994) a později byl homolog nalezen také u myši (Reed et al. 1995).

Z první analýzy sekvence vyplynulo, že protein zřejmě obsahuje nejméně dvě místa pro vazbu mědi, oblasti membránových domén, fosforylační místo a sekvenci společnou pro ATPasy. Protein vykazoval 62% aminokyselinovou podobnost s Menkesovým proteinem (Tanzi et al. 1993). Tyto vlastnosti ukazovaly na to, že protein by mohl mít aktivitu ATPasy přenášející měď přes

membrány a mohl by se účastnit výdeje mědi z buněk (Tanzi et al. 1993). Později se potvrdilo, že protein ATP7B je ATPasa typu P, obsahuje kationtový kanál, fosforylační doménu s vysoce konzervovaným motivem DKTGT, ve kterém je aspartát fosforylován v průběhu transportního cyklu. Šest domén vázících měď se velmi podobá doménám vyskytujícím se u bakterií. Protein má osm hydrofóbních transmembránových domén. Přesná podoba proteinu není známa, ovšem byl navržen model vycházející z podobnosti jiných ATPas (Fatemi et al. 2002, Morgan et al. 2004).

Protein ATP7B je transmembránovým přenašečem mědi, nachází se na membránách vnitřních oddílů buněk na tran síti Golgiho aparátu (Payne et al. 1998) a hraje důležitou roli v začleňování mědi do apo-ceruloplasminu a při vylučování mědi z hepatocytů do žluči. Studie na buněčných membránách potkanů ukázaly, že protein ATP7B v přítomnosti ATP přenáší měď přes membrány (Harris 2000). Mutovaný protein se může nacházet na membráně endoplazmatického retikula, je více nestabilní a je rychleji odbouráván (Payne et al. 1998). Protein ATP7B je velmi podobný proteinu ATP7A a jsou vzájemně funkčně nahraditelné. Oba proteiny tedy využívají stejný mechanismus k udržování hladiny mědi v buňce. Kolokalizační studie ukázaly, že při základní běžné koncentraci mědi v buňkách proteiny ATP7A a ATP7B jsou lokalizovány na trans síti Golgiho aparátu. Při zvýšení koncentrace mědi jsou oba proteiny v rámci jedné buňky směřovány do odlišných cílových míst. ATP7B se nahromadňuje ve váčkových strukturách připomínajících pozdní endozómy, které mohou představovat nový oddíl pro transport mědi, zatímco protein ATP7A směřuje k vnější membráně buňky (La Fontaine et al. 2001). Studie chování proteinů s aminokyselinovými záměnami ukázaly význam určitých aminokyselin pro lokalizaci nebo funkci proteinu, přičemž obě vlastnosti mohou být nezávislé. Protein může být schopen přenášet měď přes membránu při chybném umístění, nebo naopak. To by mohlo vysvětlovat velký rozsah biochemických parametrů mezi pacienty s Wilsonovou chrobou, například normální hodnoty holoceruloplasminu u některých nemocných (Fobes a Cox 2000).

2.3.3 Populační genetika Wilsonovy choroby

Celosvětová četnost výskytu Wilsonovy choroby je stanovena na 1:30 000. Tomu odpovídající frekvence nositelů mutací v populaci je 1:90. Vysoký výskyt choroby je zaznamenán v Číně, v Japonsku a v Sardinii, kde je 1:10 000. Populační studie ukazují, že v různých oblastech se vyskytují různé typy mutací častěji.

V kavkazské populaci je nejrozšířenější mutací H1069Q (dříve popisovaná H1070Q) v exonu 14, která vede k záměně aminokyseliny ve vysoce konzervované doméně pro vazbu ATP (Tanzi et al. 1993) a k poruše vazby ATP k proteinu (Thomas et al. 1995). Tato mutace je pravděpodobně nejčastější molekulární poruchou genu ATP7B a pravděpodobně aspoň v Evropě pochází z jedné původní mutace (Figus et al. 1995, Firneisz et al. 2002). Frekvence alely se pohybuje v rozmezí 26-70% v různých populacích. U pacientů z východní Evropy představuje mutace až 37% všech alel. (Payne et al. 1998), v Německu je 42% (Ha-Hao et al. 1998), v Maďarsku 64% (Firneisz et al. 2002). Frekvence mutace v populaci je 0,285%. Pokud tedy tento typ mutace je přibližně třetinou veškerých mutací, pak frekvence heterozogotů s některou mutací Wilsonova genu je asi 0,855%, a frekvence mutovaných alel genu 0,428%. Podle těchto údajů pak vychází frekvence Wilsonovy choroby asi 1:55 000 (Olivarez et al. 2001).

Nejčastější mutací v asijské populaci je zřejmě R778L (Kim et al. 1998), jejíž frekvence dosahuje téměř 38% (Wu et al. 2001). Tato mutace ovšem dosud zřejmě nebyla zaznamenána v kavkazské populaci (Kusuda et al. 2000). Nemocní Židé s Wilsonovou chorobou jsou odlišní od ostatních skupin pacientů. Projevy nastupují později, průběh onemocnění je mírnější a hladiny mědi a ceruloplasminu v séru jsou blízké normálním hodnotám (Bearn 1960). U Arabů žijících v Izraeli je běžný dřívější nástup Wilsonovy choroby a mnohem těžší průběh než u pacienti židovského původu. To je pravděpodobně způsobeno mutacemi různého typu a jejich odděleným etnického výskytem (Passwell et al. 1977).

2.3.4 Diagnostika Wilsonovy choroby

Diagnostika Wilsonovy choroby závisí na zvažování klinických pozorování a výsledků laboratorních vyšetření naznačujících poruchu metabolismu mědi. Ovšem jednotlivá pozorování posuzovaná samostatně nemusejí být dostačující pro spolehlivé rozlišení a stanovení diagnózy kvůli rozdílnému vyjádření jednotlivých projevů Wilsonovy choroby u různých pacientů. U některých pacientů zůstávají určité hodnoty vyšetřovaných parametrů v obvyklém rozmezí a nemusejí potvrzovat diagnózu. Proto u všech pacientů s neobvyklými jaterními nebo neurologickými poruchami by mělo být pamatováno i na Wilsonovu chorobu (Gow et al. 2000). Je třeba myslet na to, že podobné projevy jako Wilsonova choroba mohou mít i jiná onemocnění jater jako například chronická virová hepatitida, autoimunitní hepatitida, porucha jater způsobená alkoholem nebo léčivými, a neurologické projevy je třeba odlišit od Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy chorey, dědičných dystonií, dědičné ataxie, účinků léků nebo toxických látek.

Wilsonova choroba se může projevit u osob různého stáří ve velmi širokém věkovém rozmezí od 3 do 60 let. Průběh choroby se u jednotlivých nemocných liší a zahrnují jaterní, neurologické a psychiatrické projevy, případně jejich kombinace. U heterozygotů nebyly klinické projevy choroby popsány. Nadbytečná měď v těle při Wilsonově chorobě se hromadí v různých tkáních. Snadno pozorovatelný je Kayserův - Fleischerův prstenec, vzniklý ukládáním mědi v rohovce oka. Pozorování Kayserova - Fleischerova prstence se nejčastěji provádí pomocí šterbinové lampy, ovšem někdy je možno prstenec vidět pouhým okem. Kayserův - Fleischerův prstenec je velmi užitečným ukazatelem při diagnostice, neboť přítomnost prstence v oku je častým příznakem Wilsonovy choroby, ale může se vyskytovat i při jiných poruchách jater s následným hromaděním mědi v těle.

Biochemická vyšetření u Wilsonovy choroby pomáhají odhalit poruchy v hospodaření s mědí. Běžně využívanými vyšetřeními jsou stanovení množství ceruloplasminu v séru a stanovení množství mědi v játrech a v moči. Koncentrace ceruloplasminu jsou u osob s Wilsonovou chorobou zpravidla velmi nízké, ale u některých pacientů mohou být jen mírně sniženy. Přibližně u 5% pacientů

s neurologickými projevy a u 40% pacientů s jaterními projevy odpovídá koncentrace ceruloplasminu v séru normálním hodnotám (Steindel et al. 1997). U dětí je třeba navíc brát v úvahu přirozené změny množství ceruloplasminu v séru. U novorozenců bývá koncentrace ceruloplasminu nízká (50-220 mg/dl) (Shokeir et al. 1971), později se zvyšuje a okolo třetího roku věku dosahuje vrcholu, kdy může být i vyšší než normy udávané pro dospělé (200-450 mg/dl). Diagnostiku Wilsonovy choroby u novorozenců umožňuje i vyšetření množství ceruloplasminu v pupečnickové krvi (Chowrimootoo et al. 1998). Snížení koncentrace ceruloplasminu v séru také není jedinečné pouze pro Wilsonovu chorobu, ale může se vyskytovat i u jiných poruch jater, u náhlého jaterního selhání a u jaterní cirhózy. Úplné chybění ceruloplasminu je přítomno u dědičného aceruloplasminemie, která ovšem vede k hromadění železa v těle. Množství ceruloplasminu není tedy kritériem, které by mohlo vést k jistému stanovení diagnózy Wilsonovy choroby.

Vyšetření množství mědi v moči je prováděno ze sběru za 24 hodin a u postižených osob obvykle překračuje 0,6 $\mu\text{mol}/24\text{hodin}$ při základních podmínkách. Podání penicillaminu vede k výraznému, až desetinásobnému, zvýšení vylučování mědi z těla močí. Tímto postupem je možno odhalit poruchy hospodaření s mědí i u některých postižených osob, které mají jinak koncentraci mědi v moči normální (Martins da Costa et al. 1992). Koncentrace mědi v játrech u nemocných s Wilsonovou chorobou je zvýšena obvykle na více než 250 $\mu\text{g/g}$ suché hmotnosti oproti normální 55 $\mu\text{g/g}$ suché hmotnosti (Nuttall et al. 2003), ovšem u některých jedinců může být nárůst koncentrace pouze mírný. Pro další potvrzení diagnózy mohou být použita pomocná vyšetření množství mědi v séru nebo začleňování radioaktivně značeného stabilního izotopu mědi do ceruloplasminu.

U heterozygotů nebyly pozorovány projevy Wilsonovy choroby, i když mívají nízké koncentrace ceruloplasminu a koncentraci mědi v moči po podání penicillaminu hraničně zvýšenou. Opatrné stanovení diagnózy v takových případech je velmi důležité, aby se předešlo nepřiměřené náročné terapii. Vyšetření koncentrací mědi a ceruloplasminu nelze použít k odlišení heterozygotních nositelů mutace od postižených nebo zdravých osob. Kvůli nedostatečné schopnosti biochemických vyšetření rozlišit heterozygoty od

presymptomatických jedinců, je vhodné využít možnosti molekulárněgenetických vyšetření.

Jediným známým genem, jehož porucha způsobuje Wilsonovu chorobu, je gen ATP7B. Molekulárně-genetické vyšetření tohoto genu umožňuje potvrzení diagnózy, určení nositelů mutací a prenatalní diagnostiku. Využití prenatalní diagnostiky pro onemocnění, které je dobře léčitelné s příznivými výsledky, je sporné. V genu ATP7B bylo nalezeno více než 40 normálních variant a více než 260 patologických mutací. Cílená mutační analýza v závislosti na etnické původu zahrnuje vyšetření mutací, které se vyskytují v daných populacích velmi často a jsou pro ně typické. Například evropská mutace H1069Q nebo asijská mutace R778L představují přibližně třetinu až polovinu všech mutovaných alel v uvedených oblastech, avšak jinde se vyskytují zřídka.

2.3.5 Léčba Wilsonovy choroby

Terapii Wilsonovy choroby je třeba zahájit co nejdříve u presymptomatických i symptomatických pacientů, neboť další hromadění mědi u postižených osob vede k rozvinutí příznaků choroby nebo ke zhoršování jejich stavu. Terapie je nutně celoživotní a nepřerušuje se ani v době těhotenství. Vysazení léčby vede k postupnému zhoršování stavu, které je už těžko přístupné dalším léčebným zásahům.

Wilsonova choroba byla jedním z prvních dědičných metabolických onemocnění, které bylo možno úspěšně léčit (Walshe 1956). V dnešní době bývá se běžně používají tři léčiva: D-penicilaminem, triethylen tetraminem nebo zinek (Brewer et al. 1987). Velké množství různorodých mutací a odlišné projevy mutací u složených heterozygotů mají za následek odlišné reakce na různé léčebné přístupy.

Nejdéle používanou látkou při léčbě Wilsonovy choroby je D-penicillamin, chelatační činidlo, které váže měď a umožňuje její vyloučení močí. Zpravidla bývá užíván několikrát denně ve formě tablet. Včasné podání léčby zpravidla mívá příznivou odezvu (Durand et al. 2001). Občas se může vyskytnout alergie na penicillamin provázená vyrážkou a horečkou. Vážné vedlejší účinky léčby se projevují asi u 30% osob a zahrnují trombocytopenii, leukopenii,

aplastickou anemii, proteinurii a závažné kožní reakce, proto je třeba provádět při léčbě penicillaminem kontroly krve a moči pro sledování této nepříznivé odezvy a případně přejít na jiný typ léčby.

Dalším užívaným chelátem je triethylen tetramin dihydrochlorid (TETA, Trientin), který se obvykle používá u osob, které nepříznivě reagují na penicillamin. Většinou bývá dobře snášen, a proto začíná celkově postupně nahrazovat penicillamin. Využití chelatačních látek, u pacientů před třetím rokem života může mít nepříznivé účinky na jejich vývoj. Dlouhodobá léčba chelatačními látkami může vést ke snížení množství mědi a jiných kovových iontů v těle a jejich nedostatek se potom projeví příslušnými poruchami, například u mědi vede ke snížení pevnosti kůže. Využití chelátů společně se zinkem není z principu léčby možné.

Dalším možným léčebným postupem je podávání zinečnatých solí, které blokují vstřebávání mědi ve střevě (Hoogenraad and van der Hamer 1983) Zvýšené množství přijímaného zinku brání příjmu mědi tím, že navozuje v enterocytech vyšší tvorbu metallothioneinu, který ovšem přednostně váže měď a tím znemožní její další využití. Měď vázaná na metallothionein je pak vylučována spolu s enterocyty při obměně sliznice střeva. Při léčbě zinkem je funkce jater chráněna před poškozením z nadbytku mědi, protože zvýšený příjem zinku navodí v játrech tvorbu metallothioneinu. Léčba zinkem je účinnější po předchozím snížení množství mědi v těle cheláty (Brewer et al. 2001). Zinečnaté soli (např. octan, síran) jsou podávány ve formě tablet několikrát denně před jídlem. Dlouhodobým sledováním léčených pacientů byla potvrzena účinnost zinečnatých solí a jejich velmi nízká toxicita a žádné vedlejší účinky (Brewer et al. 1994, Brewer et al. 1998). Takto je možno léčit i osoby, u kterých se choroba dosud nerozvinula, a díky léčbě se zpravidla ani nerozvine (Lang et al. 1993, Hoogenraad 1994). Presymptomatická diagnostika Wilsonovy choroby a podávání zinečnatých solí jsou tedy velmi vhodné (Wu et al. 2003).

Léčba pacientů s neurologickými projevy Wilsonovy choroby je obtížná, protože penicillamin často jejich stav zhorší a zinečnaté soli účinkují pomalu. Ukázalo se, že pro tyto pacienty je možno použít tetrathiomolybdanát amonný, který ve srovnání s ostatními přístupy k léčbě pacientů s neurologickými příznaky

se jeví jako velmi účinný (Brewer et al. 2003). Možností léčby Wilsonovy choroby pro osoby, u kterých není možno použít klasické postupy, je transplantace jater (Sokol et al. 1985), která obvykle vede k výraznému zlepšení stavu nemocných (Polson et al. 1987, Guarino et al. 1995). Jako pomocný prostředek proti zvýšené tvorbě volných radikálů, které v důsledku hromadění mědi při Wilsonově chorobě ohrožují buňky, se používají antioxidanty například alfa-tokoferol (vitamin E). Při léčbě Wilsonovy choroby by měla být u pacientů vyloučena jídla s vysokým obsahem mědi (játra, mozek, mořští živočichové, houby, čokoláda, ořechy).

2.3.6 Modely pro studium Wilsonovy choroby

Užitečnost zvířecích modelů spočívá v možnosti jejich využití ke studiu patologických stavů jater, pro vyvíjení nových postupů léčby Wilsonovy choroby a pro studium transportních drah mědi. Vhodným modelem pro výzkum Wilsonovy choroby jsou „toxic milk“ myši a Long- Evans Cinnamon (LEC) potkani (Li et al. 1991). Autozomálně recesivní toxikóza mědi u bedlingtonských teriérů, je zřejmě také obdobou Wilsonovy choroby u psů (Yuzbasiyan-Gurkan et al. 1993).

U LEC potkanů se rozvíjí samovolně hepatitida okolo 4. měsíce po narození, s klinickými příznaky podobnými náhlým hepatitidám u některých osob s Wilsonovou chorobou. U přeživších jedinců se obvykle později rozvine jaterní karcinom. Množství mědi v játrech je u LEC potkanů nepřirozeně vysoké. Hepatitidě je možno předcházet pomocí chelatačních činidel jako například penicillaminem (Wu et al. 1994) Delece u LEC potkanů zahrnuje více než 900 párů bází 3'-kódující oblasti včetně klíčové domény vážící ATP. Vnesení lidského ATP7B do buněk potkanů LEC vede k expresi genu v játrech. Protein je lokalizován v Golgiho aparátu a podílí se na syntéze ceruloplasminu, jehož tvorba je u potkanů LEC narušena (Terada et al. 1998).

Záměna jednoho nukleotidu (4066 A>G) u „toxic milk“ myši v genu *Atp7b* vede k nahrazení aminokyseliny (M1356V) v osmé transmembránové doméně proteinu ATP7B. Tato mutace má autozomálně recesivní projev a vede k hromadění mědi v játrech. Mláďata jsou již při narození postižena nedostatkem

mědi a nepřítomnost mědi v mléce matek vede k udržování tohoto stavu. Nedostatek mědi v mateřském mléce nebyl u lidí dosud pozorován (Theophilos et al. 1996) U myší kmene s vyřazeným genem *Atp7b* dochází k obrovskému hromadění mědi v játrech, ledvinách, mozku, placentě a mléčných žlázách, nicméně mléko těchto myší měď neobsahuje a mláďata, která se již rodí s nedostatkem mědi a která měď nepřijímají, mají opožděný růst a vývoj a projevují se u nich neurologické abnormality typické pro nedostatek mědi. Inaktivace myšího genu *Atp7b* vede k podobným projevům jako u „toxic milk“ fenotypu u myší a Wilsonovy choroby u lidí (Buiakova et al. 1999).

Studium metabolismu mědi u jiných organismů nám může pomoci lépe pochopit důležitost mědi v těle, porozumět příčinám a důsledkům chorob s poruchou metabolismu mědi a také může vést k vytvoření nových léčebných postupů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Pacienti a jejich příbuzní, zahrnutí v této práci, pocházejí z různých klinických pracovišť České republiky a Slovenské republiky.

Skupina osob s Menkesovou chorobou zahrnuje 5 nemocných (označení M1-M5) a 8 příbuzných z celkem 5 rodin. Jednalo se o čtyři chlapce s klasickými příznaky Menkesovy choroby a jednu dívku, u které byla diagnóza nejistá. U jednoho z chlapců byla diagnóza ověřována posmrtně v souvislosti s předpokládaným prenatálním vyšetřením u matky.

Soubor osob s Wilsonovou chorobou tvoří 33 pacientů (označení W1-W33), u kterých se vyskytovaly po klinické stránce velmi jasné příznaky tohoto onemocnění a u nichž byla nalezena pouze jedna alela s nejčastější mutací (H1069Q) způsobující Wilsonovu chorobu, a dále 3 příbuzní bez příznaků onemocnění z celkem 33 rodin.

Jako kontroly byly použity zdravé osoby bez příznaků Menkesovy nebo Wilsonovy choroby. K mutační analýze byla použita DNA leukocytů periferní krve. Odběr krve a molekulárně genetická vyšetření byla prováděna u jedinců, kteří podepsali informovaný souhlas s vyšetřením.

3.1.2 Použité chemikálie

agarosa	Serva, Německo
brom fenol	Sigma Aldrich, USA
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Larova Biochemie, Německo
dNTP mix	Sigma Aldrich, USA
DMSO (dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, USA
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)	Sigma Aldrich, USA
ethanol	Penta, ČR

ethidium bromid	Sigma Aldrich, USA
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, Litva
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, Litva
glycerol	Penta, ČR
H ₃ BO ₃ (kyselina boritá)	Lachema, ČR
HCl (kyselina chlorovodíková)	Lachema a.s. ,ČR
isopropylalkohol	Penta, ČR
KCl (chlorid draselný)	Penta, ČR
KHCO ₃ (hydrogenuhličitan draselný)	Penta, ČR
MgCl ₂ (chlorid hořečnatý)	Sigma Aldrich, USA
NaCl (chlorid sodný)	Penta, ČR
NaOH	Penta, ČR
NH ₄ Cl (chlorid amonný)	Penta, ČR
PC2 pufr	Gene Age Technologies, ČR
primery	UTHSCSA, USA
pufr bez MgCl ₂	Sigma Aldrich, USA
SDS (laurylsíran sodný)	Sigma Aldrich, USA
sodná sůl orange G	Sigma Aldrich, USA
TRIS (tris(hydroxymethyl)aminometan)	Sigma Aldrich, USA
xylén cyanol	Sigma Aldrich, USA

3.1.3 Použité enzymy

Klen Taq1 polymerasa	Gene Age Technologies, ČR
proteinasa K	Sigma Aldrich, USA
Taq polymeráza	Sigma Aldrich, USA
restrikční endonukleasy	BioLabs, USA

3.1.4 Použité roztoky

Roztoky pro izolaci DNA

lýzovací pufr LB1	150 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 1 mM EDTA
lýzovací pufr LB2	150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA
nasycený roztok NaCl	6 M NaCl
TK-1 pufr	20 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, pH 7,6
TE pufr	10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,6
TE pufr 10x	100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 7,6
roztok proteinasy K	0,1 mg/ml proteinasy K, 1% SDS, 2 mM EDTA
1 M Tris-HCl pH 8,2	
0,5 M EDTA, pH 8,0	

Roztoky pro PCR

PC2 pufr	50 mM Tris-Cl, 16 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 3,5 mM MgCl ₂ , 150 µg/ml BSA, pH 9,1
roztoky primerů:	100 µM (zásobní), 10 µM (pracovní), 3,2 µM (sekvenační)
	100 mM a 2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (směs)

Roztoky pro horizontální elektroforézu v agarosovém gelu

10x TBE:	0,9 M Tris, 0,9 M kyselina boritá, 20 mM EDTA
etidium bromid	10 µM
vzorkové pufrы:	6x: 2,5 g/l bromfenol, 0,2 g/l fikoll 400, 1 M EDTA a 1% SDS
	6x: 2,5 g/l xylen cyanol; 0,2 g/l fikoll 400; 1 M EDTA a 1% SDS
	6x: 0,35 % sodné soli orange G; 30 % sacharosy

3.1.5 Přístrojové vybavení

analytické váhy	SCALTEC, USA
autokláv	MAC 235EX, SANYO, Japonsko
automatické pipety	Nichirio, Japonsko Gilson, Francie
centrifugy	MIKRO 20, Hettich Zentrifugen, Německo; UNIVERSAL 32 R, Hettich Zentrifugen, Německo QUALITRON, Korea; CARL ROTH, Německo
digestoř	Holten, Dánsko
dokumentační systém	ALPHA DIGI DOC RT, Alpha Innotech, USA
elektrický zdroj	POWER PACK 1000, BIO-RAD, USA
elektroforéza	Liberty 1, Liberty 2, BIOEKEY, USA
film	Polaroid BLACK & WHITE 667, Sigma, USA
fotografický přístroj	Polaroid, Sigma, USA
míchadlo	Vortex Genie 2, Scientific instruments, USA
pH-metr	Acidimetr DRUOPTA ČR
spektrofotometr	240 1 PC, Shimadzu, Japonsko
spektrofotometr	UV – 240 1 PC, Shimadzu, Japonsko
termoblok	TECHNE DRI-BLOCK, Techne, GB
termocykler	DNA ENGINE DYAD, MJ Research, USA
UV-zářič	BIOBLOCK SCIENTIFIC, Francie
vyhřívané míchadlo	MS2 MINISHAKER, VELP Scientifica, Itálie

Dále bylo používáno běžné laboratorní sklo (SIMAX, USA) a plast (Axygen, USA; Eppendorf, Německo; Gilson, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Izolace DNA

Při odběru se přidává k přibližně 10 ml krve 0,5 ml 0,5 M EDTA. Takto je krev možno uchovat při teplotě 4°C nejdéle 2 až 3 týdny. Izolace DNA z lymfocytů periferní krve využívá selektivní hemolýzu erytrocytů navozenou pomocí NH₄Cl, následné rozpuštění buněčných membrán leukocytů a štěpení proteinů enzymem proteinasou K. K 10 ml krve v 50ml zkumavce se přidá 30 ml lýzovacího pufru LB1, směs se protřepe a nechá asi 30 min v ledu. Následuje centrifugace 15 min při 1500xg a 4°C. Opatrně se odstraní supernatant a peleta se rozpustí v 40 ml lýzovacího pufru LB1 a nechá 20 min v ledu, potom se centrifuguje 15 min při 1500xg a 4°C. Pelet leukocytů se opláchne pufrem TK-1, potom se přidá 20-30 ml pufru TK-1 a centrifuguje se znovu 15 min při 1500xg a 4°C. Promývání a centrifugaci je případně nutné opakovat dokud není peleta čistá. Supernatant se odlije a peleta se resuspenduje v 2,1 ml lýzovacího roztoku LB2 při intenzivním míchání (20 sekund). Poté se přidá 420 µl roztoku proteinasy K a 140 µl 10% SDS a otáčením se vše promíchá. Inkubace probíhá při 37°C přes noc (18 hod). Přidá se 0,7 ml nasyceného roztoku NaCl a silně rukou protřepe. Následně se přidá 2,1 ml lýzovacího pufru LB2 a znovu silně protřepe (vysolením zbývajících proteinů a proteinasy K vzniká bílý precipitát) Směs se centrifuguje 30 min při 2000xg a pokojové teplotě (získaný viskózní supernatant musí být čirý). Supernatant se přepipetuje do nové zkumavky a sráží se přidáním 2,5násobku objemu chlazeného (-20°C) 96% ethanolu. Precipitovaná DNA se namotá na plastový nebo skleněný háček, omyje se ethanolem a nechá se oschnout asi 10 minut, potom se vloží do zkumavky s přibližně 500 µl TE pufru nebo deionizované vody. Rozpuštění trvá asi 10 až 12 hodin a lze usnadnit zahřáním na 65°C po dobu 10 min. Získaná DNA se uchovává při 4°C. Koncentrace a čistota získané DNA v roztoku je stanovena na základě měření absorbance DNA a proteinů a spočtena podle vzorce A_{260}/A_{280} , (A_{260} -extinkce DNA; A_{280} -extinkce proteinů), přičemž vzorek s poměrem mezi 1.8 až 2.0 je považován za čistý.

3.2.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Pomnožovaná oblast DNA je vymezena oligonukleotidovými primery komplementárními k jejím okrajovým sekvencím. Tato metoda, která znamenala revoluci v metodice molekulární biologie, poskytuje dostatečné zmnožení požadovaného úseku i z malého množství DNA během několika hodin.

Primery pro namnožení vybraných úseků genu ATP7A byly navrženy podle známé nukleotidové sekvence genu a podle Tümer et al. (1997). Primery pro oblasti genu ATP7B byly navrženy nově podle standardní genové sekvence (sekvence genu ATP7A: NT_011651 a genu ATP7B: NT_024524 v <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>). K návrhu primerů byly použity programy Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) a Oligo 6 (Molecular Biology Insights, Inc). Velmi dlouhé exony, konkrétně exony 3 a 4 genu ATP7A a exon 2 genu ATP7B, byly rozděleny na více překrývajících se částí, aby bylo usnadněna zacházení s těmito úseky při jejich dalším zpracování. Primery (tab. 1, 4) byly syntetizovány v Nucleic Acid Core Facility, University of Texas Health Science Center at San Antonio.

Složení PCR bylo navrhováno s ohledem na rychlost a jednoduchost provedení amplifikace. Výsledkem je, že pro všechny úseky v rámci jednoho genu, je možno použít jednu reakci. Vzhledem k velkému množství amplifikovaných úseku jednoho genu a jejich podobným délkám není možné připravit všechny v jediné zkumavce při mnohonásobné PCR, ovšem dvojice úseků se dají namnožit společně dobře. Optimální podmínky pro PCR všech 26 úseků genu ATP7A a všech 26 úseků genu ATP7B byly zjišťovány změnami teplotních parametrů reakce a změnami koncentrací jednotlivých složek reakční směsi, případně přidáním, vynecháním či změnou některé z nich. Výsledné používané složení PCR reakčních směsí pro amplifikaci úseků genu ATP7A a program PCR jsou uvedeny v tabulkách 1,2,3; pro gen ATP7B v tabulkách 4,5,6. Objem reakce je možno podle potřeby zvolit mezi 15 μ l a 75 μ l. Nejčastěji byl využíván objem 25 μ l.

Tabulka 1: Primery použité pro amplifikaci genu ATP7A

exon	délka (bp)	přímý primer	zpětný primer
MD1	262	GGGGGTGGGAAAAGAGAAGC	CATGACCTTCTCACCACACTCGT
MD2	219	GCATGGCTGAAATTAATGAATTT	CTTCAATGGCATTGACTTCAGT
MD3a	352	TGTGATAGAATTTAATTAACACTGACTTTTG	AGCTCTTTTATCTGATTGGCATTTC
MD3b	349	AAAATTTACCCTCAGAAAAGAACTGTA	AAACTCATGCTTAAGAAGAAAGCAA
MD4a	336	GTGGTTATTGATTTAGAAAACAGAATG	CAATGCATGCCATCAATGATG
MD4b	376	CAGAAGGGTCACAGCAAAGG	CAAGTCATGCCATCAATGTTTATC
MD4c	340	GAAGATTCCCTTGAATGTAGTTAGCC	TGCCTATGAATCATTCTCATTGA
MD5	331	GATGCAATTGAATGATCAATACTGC	TGTAAGAGAACAAAAAGATGGAGCT
MD6	285	TAATATAACATTACTCTTTTTAAAAAGAA	CTTACCAAGTTTTTTTTCTGGAAGT
MD7	290	AGTGGTAACTCATGTTAATGGTGGA	GATTCACGGGAGTGCTGATTAAA
MD8	272	GTTCTTAATGACAATACCATGGCTTAG	ACCATTTTCATCCCGTATAAGGATG
MD9	342	TACCCATTAGCTATTTATGACCATGA	GCCTGCCAAATTTTGCTTATT
MD10	376	ATATATGTGAATTTACAGCATTTTTTAA	ATGTATTTCCAATGATTGGCC
MD11	182	AGACCTGAACTTTTCTTCCTTAGC	TAAAAAAGAGAAGAGGGGAAGAGTG
MD12	291	GGAGAGGTCAGGGTAGGAAGC	CTCTCTGTTTATAATTTAGTTATCATAGC
MD13	291	AACAATAATGATATGTTTCATGATAGTG	GTGAAGATTTAACTGAGAAGGCTTTA
MD14	280	TACTCTGCATTTCAGTATCAGAAAAGACTT	CCAATGAATTACTAATGCAAAAGCTC
MD15	277	ACAGCTCTAAATCAATAACCAAAAT	TTGGTGGTACAGGTTTTAGTTCT
MD16	306	TTTCTGAAAGGTGATGTGGA	TAGATTTGATCCGGGGAATTC
MD17	371	AATTAAC TAGGGGTTTTATCTTGC	CAGGGTTATAAGTTAGCCATCTG
MD18	295	GAACTGCTTCATGGGTTT	AGAGGTCTCTCAAAAATAATAAATTAAT
MD19	259	TATTTCAAGTCTTTTTATTTGTGCTG	AAATTTCTTAGCATTGAAGGCAAG
MD20	332	TATTGCTCAGTTATGTTTCACGTACT	GATTATCATTGACCACATAGGGC
MD21	258	AAGGTAGACGTAATCTCAACATACACAG	ATAACTTTAGTGAAAAAGCAGTACTACT
MD22	287	ATGCTGAAGAAGTATCAAACAAGAAA	CAAGAATAAACTACCAAGAATGAC
MD23	369	TCTCATTTACTTTTTGGTTATTGAAACT	AGTGCATGACAAGTTAACTGGC

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro amplifikaci genu ATP7A

složka	zásobní koncentrace	koncentrace v reakci
PC2 pufr	10 x	1 x
dNTP	2 mM	0,2 mM
primer F	10 µM	0,4 µM
primer R	10 µM	0,4 µM
Taq polymerasa	25 U/µl	1,25 U
templát	50 ng/ml	100 ng

Tabulka 3: Podmínky reakce pro amplifikaci genu ATP7A

teplota	čas	opakování
95°C	2 min	
95°C	30 s	30x
59°C	30 s	
72°C	2 min	
72°C	2 min	

Tabulka 4: Primery použité pro amplifikaci genu ATP7B

exon	délka (bp)	přímý primer	zpětný primer
WD1	154	CTTTAACACCCCGCTCTC	CGGGGAACAAAACCTCAC
WD2a	302	TTGGTTTCAAGGTTAAAAAATG	TGGCACATATTTACAGTGG
WD2b	253	GGCCACCAGCACAGTC	CTGGGCAGGCAAGGAC
WD2c	282	GAGGCCAGCATTGACG	AGCCACTTTGCTCTTGATG
WD2d	392	GTAATGACATGGGATTTGAAG	GCTCCATCAGGAAGAGAAAC
WD2e	288	GCCCAAGTAAAGTATGACCC	CACCGATATTTGCTGCAC
WD2f	305	GGCACATGCAGTACCACTCT	GCTCACCTATACCACCATCC
WD3	326	TTGAATATTTTCTGACATTTTATCC	CGCAGCATTCCTAAGTTCA
WD4	232	CACCAGAGTGTACAGCC	TGTAACCCCGTAACGCAC
WD5	232	CTGGGTCTGTGGGATCT	AAAGGTGACTACAATTTTTTAAATGA
WD6	202	TCTGCCAATGCATATTTTAAAC	CAGGTAGAGGAAGGGACTTAGA
WD7	274	GTAATCCAGGTGACAAGCAG	ACAGCATGGAAGGGAGAG
WD8	295	AGCCTTCACGTCCCTGTC	GGAGCAGCTCTTTTCTGAAC
WD9	240	TTTCGATAGCTCTCATTTTACA	GCCCACACTCACAAAGGTC
WD10	193	AGTGGCCATGTGAGTGATAA	CTGAGGGAACATGAAACAAG
WD11	292	CTGTCAGGTCACATGAGTGCT	GATTTCCAGAACTCTTCACA
WD12	233	GCTTGTGGTGTATTTATTTCTTC	CAACCACCATATAGCCCAAG
WD13	268	TGAACTCTCAACCTGCCTC	TCTCAGGATGGGAAAGC
WD14	305	CTCCATCTGTATTGTGGTCAG	GCAGCTAGGAGAGAAGGACAT
WD15	256	CCTTTCACCTCACCCCTCT	CAGCTGCAGAGACAAAAGC
WD16	206	GGACCATTTAGAAATAACCACAG	GAAGGAAGGCAGAAGCAGA
WD17	283	GCAAGTGTGGTATCTTGGTG	AACTGGTGCTTACTTTTGTCTC
WD18	286	CTGATACCTTTTGCCAACACTA	TCCAGCACCCACAGC
WD19	214	GGCAGACCCCTTCCTCA	CTGGGAGACAGAAGCCTTT
WD20	254	CCTAGGTGTGAGTGGCAGTT	CAGCATTTGTCCAGGT
WD21	362	GAATGGCTCAGATGCTGTT	GCTTGTGGTGAGTGGAGG

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro amplifikaci genu ATP7B

složka	zásobní koncentrace	koncentrace v reakci
PC2 pufr	10 x	1 x
dNTP	2 mM	0,2 mM
primer F	10 μ M	0,4 μ M
primer R	10 μ M	0,4 μ M
Taq polymerasa	25 U/ μ l	2,5 U
templát	50 ng/ml	100 ng

Tabulka 6: Podmínky reakce pro amplifikaci genu ATP7B

teplota	čas	opakování
95°C	2 min	
95°C	30 s	30x
60°C	30 s	
72°C	2 min	
72°C	2 min	

3.2.3 Elektroforéza DNA

Fragmenty DNA byly rozdělovány v horizontálním 1 - 4% agarosovém gelu v 1x TBE pufru při napětí 10 - 20 V.cm⁻¹ (podle koncentrace gelu a rozmezí velikostí fragmentů). Pro snadné nanášení vzorků na gel a sledování pohybu fragmentů v průběhu elektroforézy byl použit vzorkový pufr obsahující bromfenolovou modř, xylen cyanol nebo sodnou sůl orange G. Pro srovnání velikosti jednotlivých fragmentů byl používán délkový standard GeneRulerTM 100b DNA Ladder. Detekce fragmentů DNA po agarosové elektroforéze se provádí barvením gelu v roztoku etidium bromidu a následným zviditelněním na UV prosvětlovači.

3.2.4 Sekvenování DNA

Fragmenty připravené pomocí PCR byly po rozdělení na horizontální 2 % agarosové elektroforéze vyříznuty ostrým skalpelem z gelu a extrahovány pomocí soupravy QIAquick Gel Extraction kit (Quiagen, Německo) podle příloženého návodu. Kvalita a koncentrace purifikovaného PCR produktu byla kontrolována opět elektroforeticky. Přečištěné fragmenty DNA byly předlohou pro dideoxyterminační reakci. Vlastní sekence byla prováděna na automatickém sekvenátoru pracovníky Nucleic Acid Core Facility, University of Texas Health Science Center at San Antonio. Získané chromatogramy byly prohlíženy v programu Chromas Lite a Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd.). Analýza sekvencí byla prováděna s využitím programu NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pro porovnávání sekvencí.

3.2.5 Analýza délky restrikčních fragmentů

Pro ověření nalezených mutací, které vytvářejí nebo ruší restrikční místo, bylo použito štěpení mutovaných a nemutovaných molekul DNA restrikční endonukleasou. Fragment zahrnující oblast s mutací byl amplifikován pomocí PCR a následně štěpen vhodným enzymem a porovnán se štěpením kontrolního vzorku. Za účelem nalezení vhodných restrikčních endonukleas a navržení vhodných restrikčních reakcí byly využity programy Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) a Nebcutter V2.0 (<http://www.neb.com/tools/index.aspx?req=nebcutter>).

4. VÝSLEDKY

4.1 Charakteristika souboru pacientů

V průběhu řešení této práce byly vyšetřeny dva soubory osob s poruchou metabolismu mědi. Jednalo se o pacienty, u kterých se vyskytovaly klinické příznaky odpovídající Menkesově chorobě nebo Wilsonově chorobě. Vyšetření byly také příbuzní z některých rodin s výskytem těchto onemocnění. Před provedením mutační analýzy bylo třeba získat písemný souhlas od zúčastněných osob.

4.2 Mutační analýza genu ATP7A

4.2.1 Soubor pacientů s Menkesovou chorobou

Sledovaný soubor byl složen z 5 nepříbuzných pacientů s klinickými projevy Menkesovy choroby (označení M1-M5). U těchto pacientů bylo sekvenčně analyzováno všech 23 exonů genu ATP7A, pro odhalení patologických mutací způsobujících Menkesovu chorobu.

4.2.2 Výsledky mutační analýzy genu ATP7A

V souboru 5 pacientů s podezřením na Menkesovu chorobu byly nalezeny 4 mutace genu ATP7A, z toho 2 nové, dosud nepopsané. Jednalo se o 4 různé mutace, podle typu mutací šlo o 3 substituce vedoucí ke vzniku terminačního kodónu (nonsense) a 1 substituci měnící aminokyseliny (missense). Mutace nalezené u nemocných s Menkesovou chorobou jsou uvedeny v tabulce 7.

V případě pacienta M1 byla v 9. exonu nalezena záměna C na T v pozici 2173, která vede k vytvoření terminačního kodónu místo původního glutaminu na 724. místě v proteinu. Tato mutace dosud nebyla popsána (obr. 2, 3). U pacienta M2 mutace 2179 G>A v 10. exonu způsobí nahrazení 727. aminokyseliny glycinu argininem (obr. 4). Pacient M3 má mutaci v 19. exonu, která v důsledku nahrazení guaninu thyminem v této pozici zařadí na pozici 1249 v proteinu terminační kodón místo kodónu kyseliny glutamové. Tato mutace je nová, dosud nezjištěná (obr. 2, 5). Další nonsense mutace byla nalezena u pacienta M4, u kterého se

jedná o záměnu C za T v místě 1288 ve 20. exonu a následnou změnu v kodónu pro glutamin (obr. 6). U pacientky M5 analýza sekvencí exonů genu ATP7A neodhalila žádné mutace.

4.2.3 Analýza mutací genu ATP7A rodinách

V rodinách dvou pacientů M1 a M2 bylo provedeno vyšetření jejich blízkých příbuzných. Důvodem byla snaha o zjištění původu mutace a odhalení nositelů mutace. Znalost molekulární patologie u těchto rodin umožní genetické poradenství a prenatální diagnostiku.

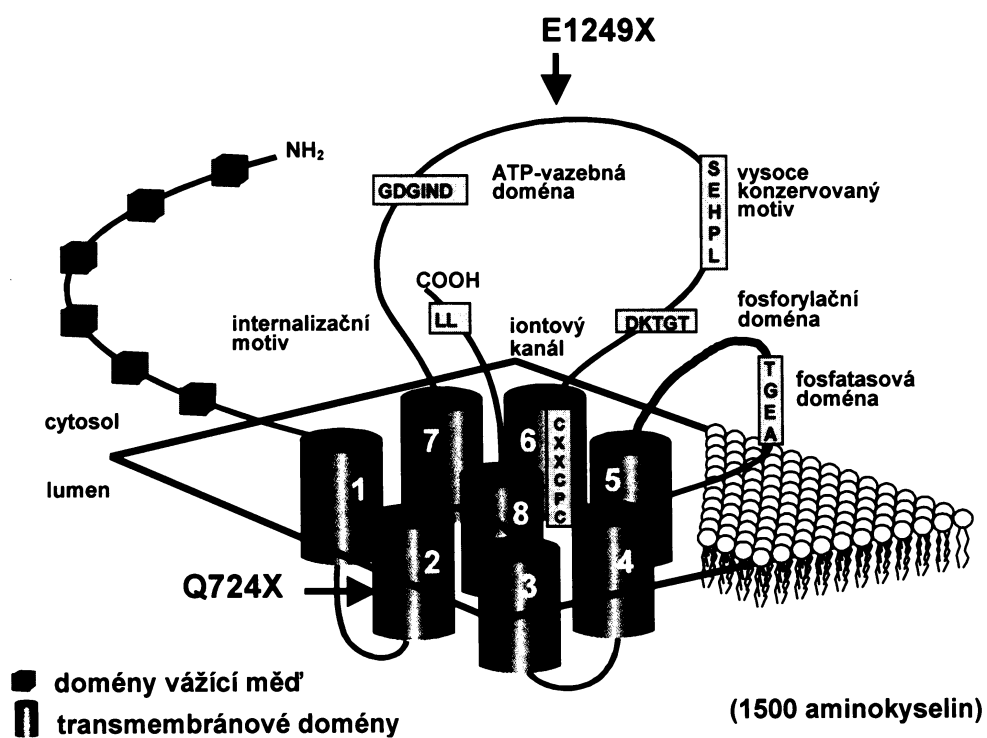
V rodině pacienta M1 byla analýza provedena u matky, otce, sestry a dále u tety, babičky a prababičky z matčiny strany, celkem u 7 osob včetně probanda. Mutace 2173 C>T byla kromě probanda nalezena i u jeho matky a sestry. Mutace se v rodině tedy vyskytla poprvé u matky probanda. K vyšetření bylo využito analýzy délky restrikčních fragmentů po štěpení endonukleasou BsrGI (obr. 3).

Rodina pacienta M2 byla vyšetřena pro přítomnost mutace 2179 G>A v genu ATP7A. Sekvenační analýza potvrdila přítomnost mutace u probanda v hemizygotním stavu a u jeho matky v heterozygotním stavu. Mutace u probanda tedy pochází od matky (obr. 4).

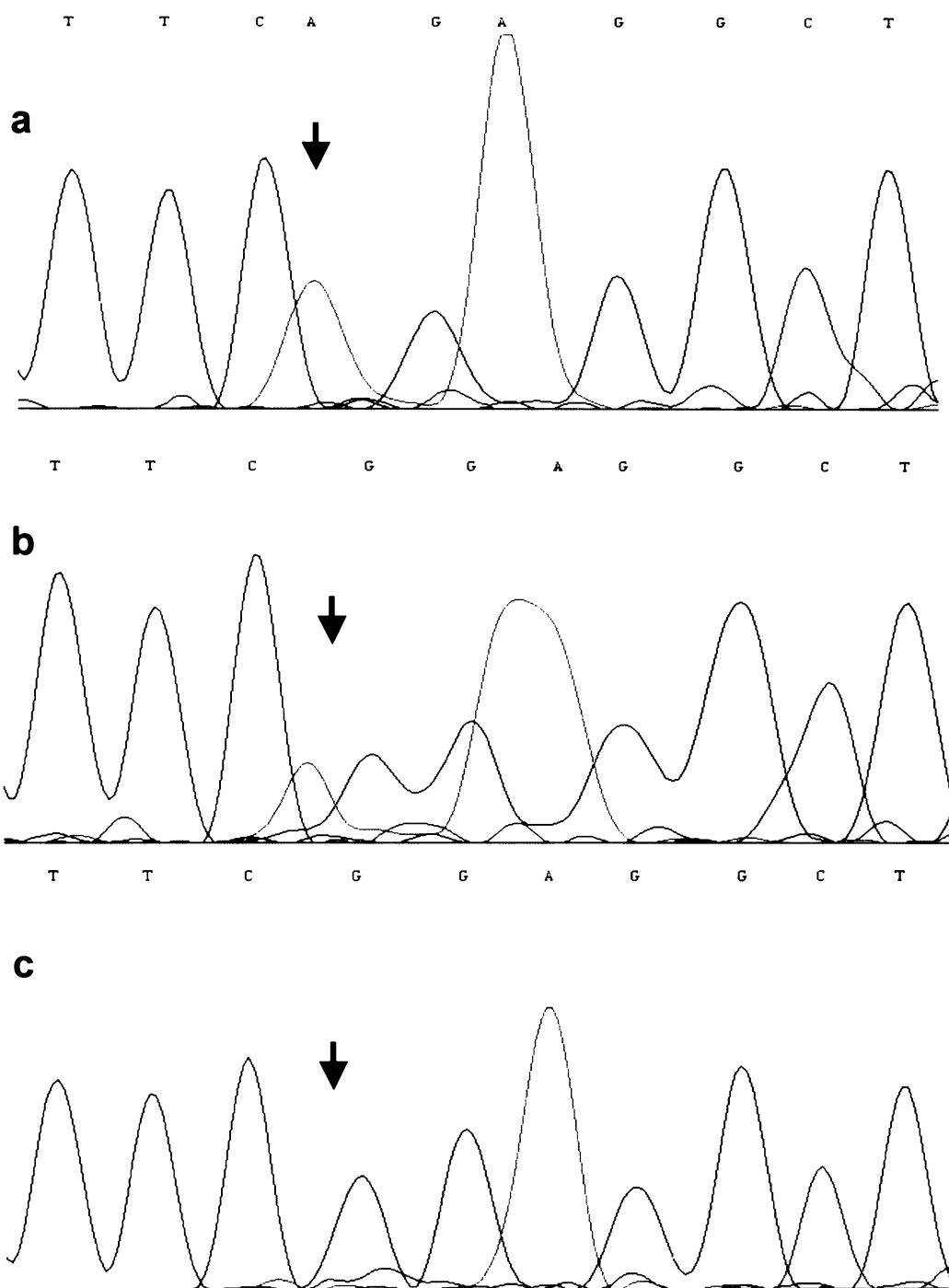


Tabulka 7: Mutace nalezené v genu ATP7A

pacienti	exon	nukleotid	kodón	publikace
M1	9	2173 C>T	Q724X	nová
M2	10	2179 G>A	G727R	Das et al. 1994
M3	19	3748 G>T	E1249X	nová
M4	20	3865 C>T	Q1288X	Seidel et al. 2001



Obrázek 2: Nové mutace nalezené v genu ATP7A a jejich projev v proteinu (schéma proteinu upraveno podle Payne et al. 1998).

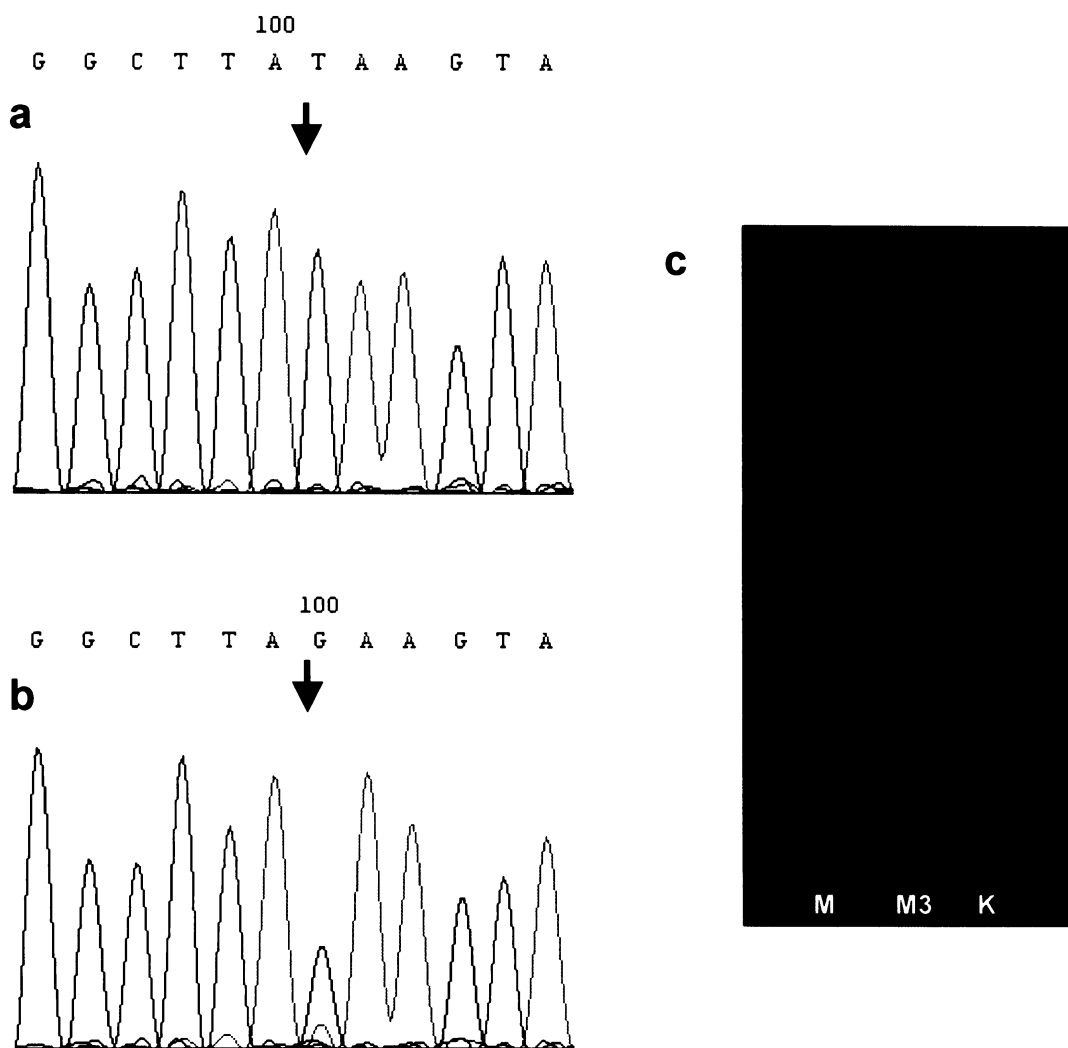


Obrázek 4: Mutace 2179 G>A, G727R (pozice vyznačena šipkou)

a) sekvenční analýza u pacienta M2

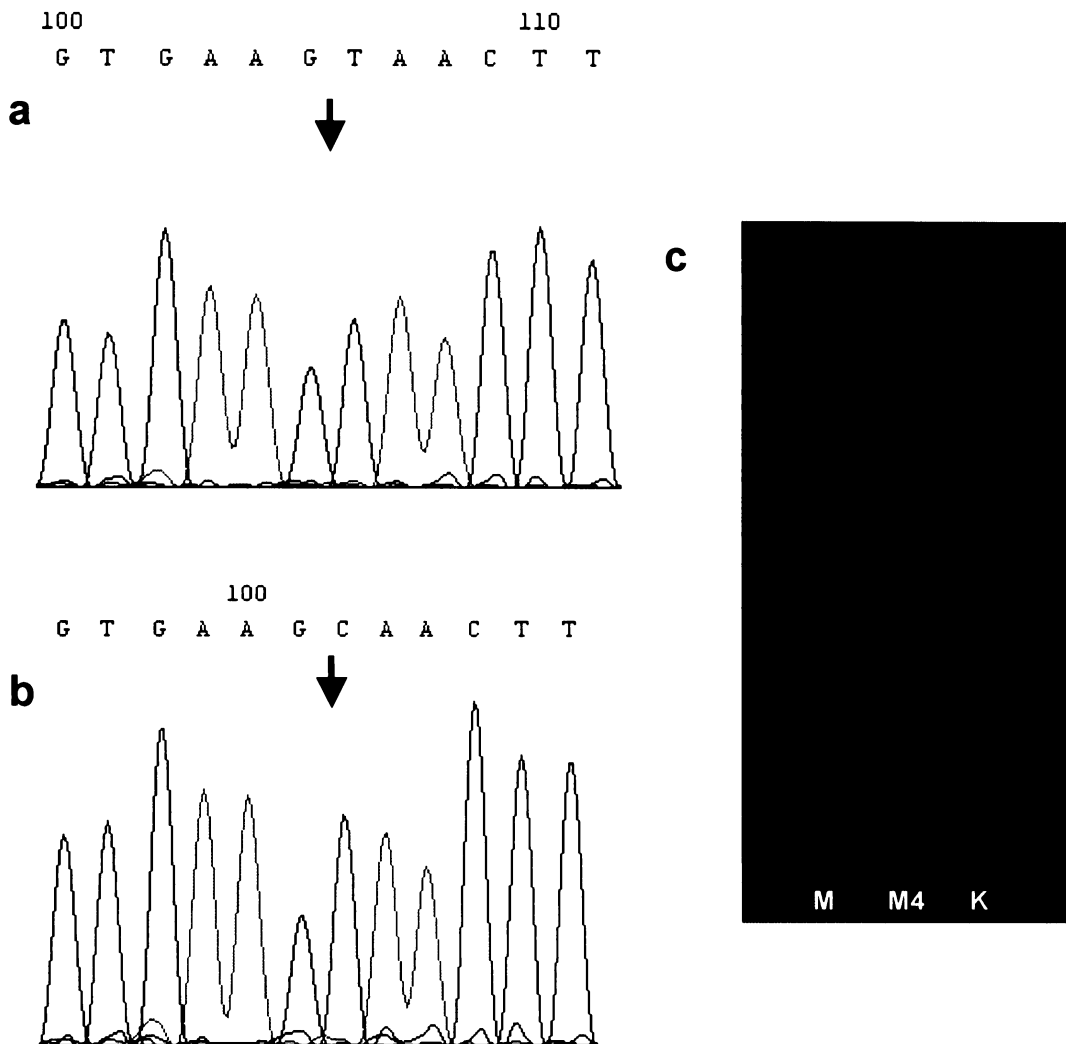
b) sekvenční analýza u matky

c) sekvenční analýza u otce



Obrázek 5: Mutace 3748 G>T, E1249X

- a) sekvenční analýza u pacienta M3 (pozice vyznačena šipkou)
- b) kontrolní sekvence
- c) restriční analýza u pacienta M3 (štěpeno Ddel)
(M-GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, M3, K-kontrola)



Obrázek 6: Mutace 3865 C>T, Q1288X

a) sekvenční analýza u pacienta M4 (pozice vyznačena šipkou)

b) kontrolní sekvence

c) restriktivní analýza u pacienta M4 (štěpeno MaeIII)
(M-GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, M4, K-kontrola)

4.3 Mutační analýza genu ATP7B

4.3.1 Soubor pacientů s Wilsonovou chorobou

Do souboru bylo zahrnuto 33 osob s projevy Wilsonovy choroby a 3 příbuzní bez příznaků onemocnění z celkem 33 rodin (označení W1-W33). U těchto osob byl dříve proveden diagnostický test na přítomnost nejčastější mutace H1069Q v genu ATP7B, který odhalil u všech vyšetřených osob přítomnost pouze jedné mutované alely.

U tohoto souboru tedy byla provedena kompletní mutační analýza všech 21 exonů genu ATP7B metodou přímého sekvenování pro odhalení druhé kauzální mutace.

4.3.2 Výsledky mutační analýzy genu ATP7B

V souboru 33 pacientů s Wilsonovou chorobou bylo u 20 z nich nalezeno celkem 21 mutací genu ATP7B, u jednoho z pacientů tedy se vyskytovaly 2 mutace. Byly objeveny 2 nové, dosud nepopsané mutace. Celkem bylo určeno 11 druhů mutací, z toho 3 jednonukleotidové delece, 1 jednonukleotidová inserce, 2 nonsense mutace a 5 missense mutací. Mutace nalezené u nemocných s Wilsonovou chorobou jsou shrnuty v tabulce 8.

U 5 pacientů (W1, W11, W23, W24, W33) byla v 8.exonu nalezena inserce cytosinu v pozici 2298_2299, která vede k posunu čtecího rámce a brzkému ukončení proteinu. Dále byla v 8. exonu nalezena u 5 pacientů (W12, W18, W25, W26, W31) nonsense mutace způsobená záměnou 2336 G>A, což změnilo kodón pro tryptofan na terminační kodón. V 10. exonu byla u pacienta W6 zjištěna mutace guaninu na adenin, která způsobí v proteinu záměnu 840. aminokyseliny prolinu na leucin. Delece adeninu v pozici 2530 v exonu 10 u pacienta W21 a delece adeninu v pozici 3140 v exonu 14 u pacienta W5 vedou k posunu čtecího rámce a předčasnému ukončení proteinu. U 4 pacientů (W1, W2, W4, W28) vede delece cytosinu 3400 v exonu 15 ke vzniku předčasného terminačního kodónu. V 15. exonu byla také nalezena u pacienta W10 mutace 3403 G>A, která způsobí záměnu alaninu za tyrosin na 1135. místě v proteinu. Tato mutace je nově popsána (obr. 7, 8). U pacienta W16 vede mutace 3527 G>A

v 16. exonu k záměně 1176. aminokyseliny glycinu za arginin. Nová mutace byla zjištěna v exonu 17 u pacienta W20. Jedná se o záměnu 3688 A>G, která zamění isoleucin za valin v místě 1230 v proteinu (obr. 7, 9). Další nukleotidová změna byla nalezena pacienta W27. Mutace guaninu na thymin v exonu 18 nahradí 3784. aminokyselinu valin za fenylalanin. V 19. exonu byla u pacienta W19 zjištěna mutace 3955 C>T, která vede ke zrušení kodónu pro arginin a vytvoření terminačního kodónu.

4.3.3 Analýza mutací genu ATP7B rodinách

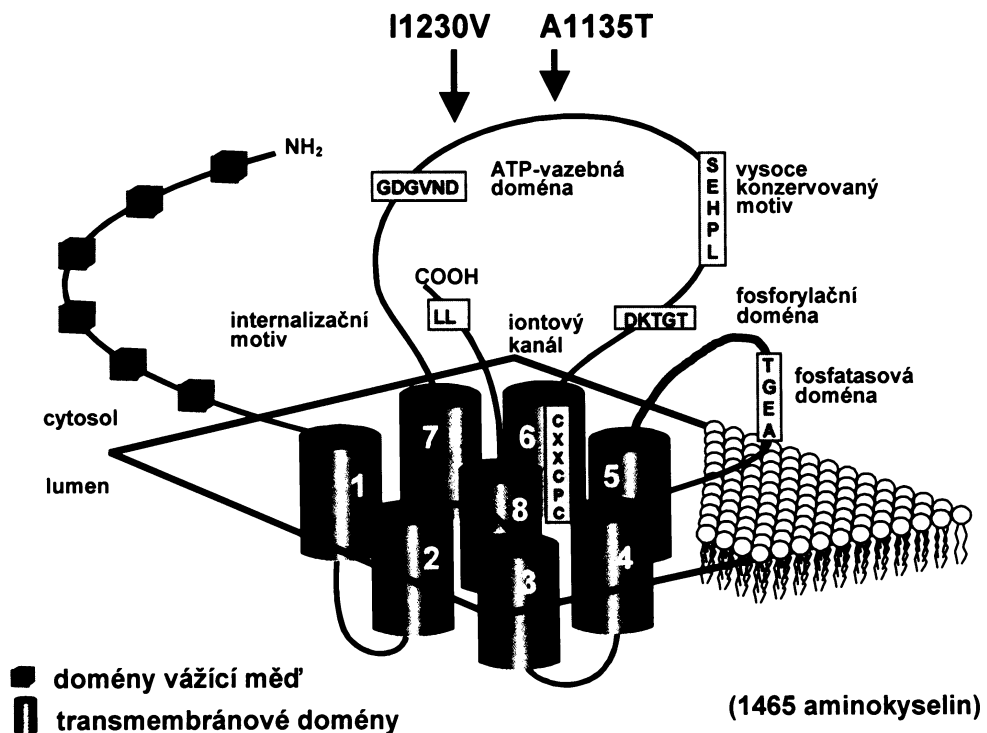
Pacienti W1, W2 jsou bratři, u obou byla v předcházejících vyšetření nalezena mutace H1069Q. Druhá patologická mutace byla hledána v této práci. U obou pacientů byla zjištěna druhá mutace 3400 delC. Ovšem u jednoho z bratrů (W1) se vyskytla ještě třetí kauzální mutace 2298 insC. Výskyt tří mutací u jednoho pacienta je poměrně vzácný a stav může mít za následek vážnější projev choroby.

Presymptomatická analýza mutací genu pro Wilsonovu chorobu byla provedena u dvou synů pacientky W10 (H1069Q/A1135T). U obou synů byly dříve nalezeny mutace H1069Q, nicméně druhá příčinná mutace nebyla objevena ani u jednoho z nich.

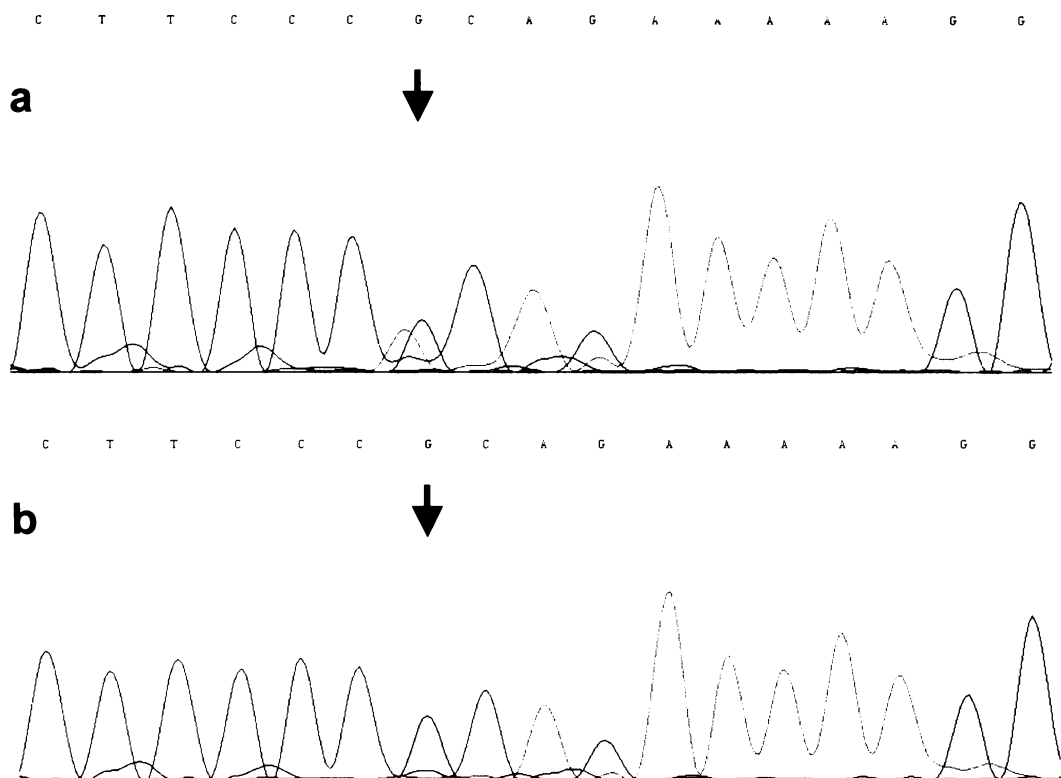
Dále byl na přítomnost mutací v genu ATP7A vyšetřen asymptomatický syn pacientky, která byla dříve určena jako homozygotní pro mutaci H1069Q. U syna byla také přítomna jedna mutovaná alela H1069Q, avšak druhá mutace u něj nebyla zjištěna.

Tabulka 8: Mutace nalezené v genu ATP7B

pacienti	exon	nukleotid	kodón	publikace
W1, W11, W23, W24, W33	8	2298 insC	P768P-fs	Thomas et al. 1995
W12, W18, W25, W26, W31	8	2336 G>A	W779X	Waldenstrom et al. 1996
W6	10	2519 G>A	P840L	Loudianos et al. 1998
W21	10	2530 delA	K844K-fs	Figus et al. 1995
W5	14	3140 delA	D1047V-fs	Vrabelova et al. 2005
W1,W2, W4, W28	15	3400 delC	P1134P-fs	Tanzi et al. 1993
W10	15	3403 G>A	A1135T	nová
W16	16	3527 G>A	G1176R	Ha-Hao et al. 1998
W20	17	3688 A>G	I1230V	nová
W27	18	3784 G>T	V1262F	Loudianos et al. 1999
W29	19	3955 C>T	R1319X	Thomas et al. 1995



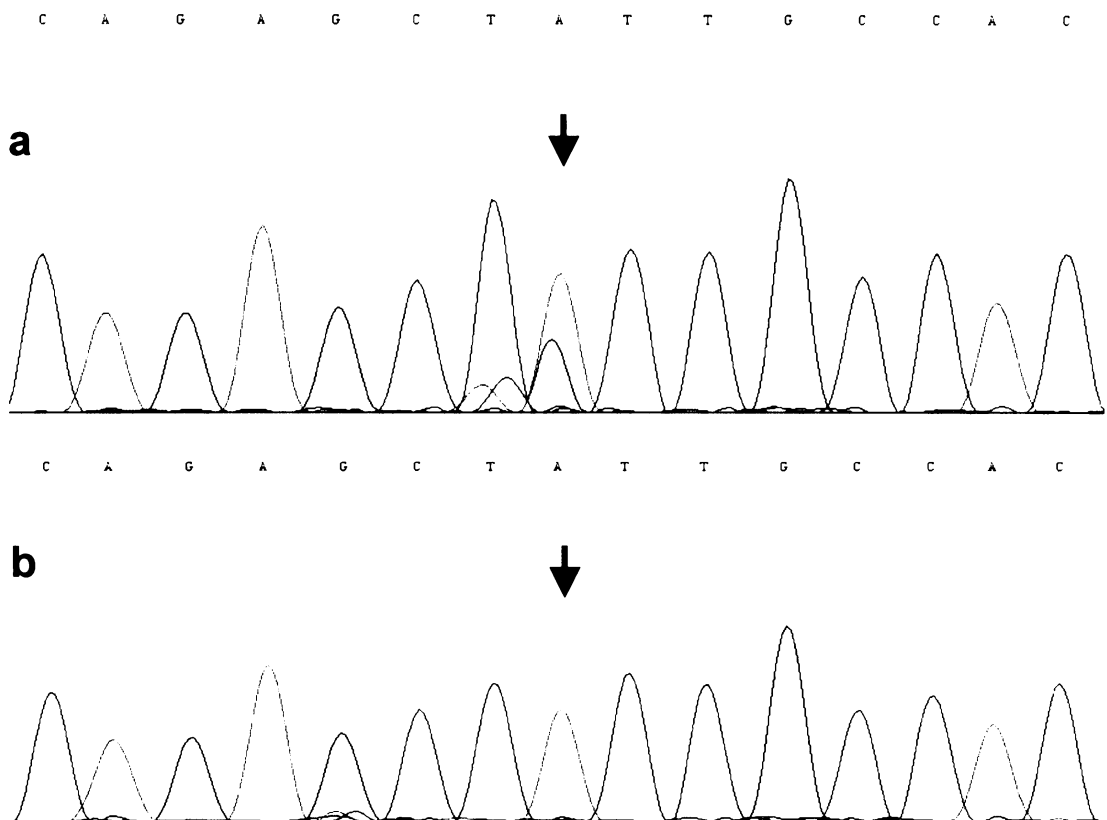
Obrázek 7: Nové mutace nalezené v genu ATP7B a jejich projev v proteinu (schéma proteinu upraveno podle Payne et al. 1998).



Obrázek 8: Mutace 3403 G>A, A1135T

a) sekvenční analýza u pacienta W10 (pozice vyznačena šipkou)

b) kontrolní sekvence



Obrázek 9: Mutace 3688 A>G, I1230V

- a) sekvenční analýza u pacienta W20 (pozice vyznačena šipkou)
- b) kontrolní sekvence

5. DISKUSE

5.1 Mutační analýza genu ATP7A

Mutační analýza genu ATP7A byla prováděna v souboru 5 nepříbuzných pacientů s podezřením na Menkesovu chorobu. Mutace vedoucí ke vzniku Menkesovy choroby byly zjištěny u 4 nemocných (tab. 7).

Přímá sekvenční analýza je spolu s PCR velmi často využívaným postupem při analýze mutací u Menkesovy choroby (Hahn et al. 2001, Liu et al. 2003). Pomocí mnohonásobné PCR je možno u postižených chlapců přímo odhalit rozsáhlé delece genu, které jsou u tohoto onemocnění časté. Patologické mutace vedoucí ke vzniku tohoto onemocnění bývají zpravidla jedinečné a rozšíření mutací je obvykle specifické pro jednotlivé rodiny s výskytem onemocnění (Tümer et al. 2003).

V případě vyšetřených čtyř chlapců byla sekvenční analýza úspěšná v zachycení mutací a bylo na základě toho možné definitivně potvrdit diagnózu Menkesovy choroby. U jedné pacientky se dosud poruchu genu najít nepodařilo. Menkesova choroba u dívek je velmi vzácná a dosud bylo zaznamenáno jen osm takovýchto případů, přičemž u většiny z nich byly nalezeny chromozómové přestavby narušující oblast genu na chromozomu X (Abusaad et al. 1999). Podezření na Menkesovu chorobu bylo u této dívky vyjádřeno ve dvanácti letech na základě klinických projevů a snížené koncentrace mědi v séru. Je velmi pravděpodobné, že molekulární příčina onemocnění pacientky je jedinečná, a nemusí poškozovat jednotlivé exony, které byly analyzovány, nýbrž gen jako celek. Jiným vysvětlením by mohlo být, že se jedná o jiné onemocnění, které se projevuje poruchou metabolismu mědi. Tato dívka byla již dříve vyšetřována pro mutace v genu ATP7B (WD) s negativním výsledkem. Zkoumání patologie u této dívky bude dále pokračovat.

Úspěšnost záchytu mutací při využití přímé sekvenční analýzy v této práci je velmi vysoká, u chlapců 100%, což potvrzuje vhodnost jejího využití při velké náročnosti na přesnost analýzy. Pro výjimečnost případu sledované dívky a nízký

počet pacientů by nebylo vhodné vyjadřovat úspěšnost záchytu mutací číselně pro celý soubor vyšetřených pacientů.

V této práci byly při vlastní analýze genu ATP7A nalezeny 2 nové mutace, které dosud nebyly popsány. Jedná se o mutaci v 9. exonu genu ATP7A, která je způsobena tranzicí 2173 C>T a vede ke změně kodónu CAG na TAG (Q724X), a tím k předčasnému ukončení proteinu. Mutace postihne protein v jeho druhé transmembránové doméně a tím zcela znemožní jeho správnou funkci. Další mutace, která se vyskytuje v 19. exonu genu ATP7A, je způsobena transverzí 3745 G>T, která mění kodón GAA na TAA (E1249X) a ukončuje protein v tomto místě (obr. 2).

V případě Menkesovy choroby je třeba začít s léčbou u nemocných co nejdříve po narození, aby bylo možné předejít trvalému neurodegenerativnímu poškození. Vytvoření postupu pro analýzu mutací genu ATP7A v této práci a jeho zavedení pro diagnostiku Menkesovy choroby v České republice má velký význam pro terapii tohoto onemocnění u postižených osob a identifikace mutací umožní jejich sledování v rodinách s výskytem choroby. Až dosud bylo třeba zasílat vzorky DNA k vyšetření do Dánska. Možnost molekulárně-genetické diagnostiky Menkesovy choroby v České republice by měla dovolit rychlé vyšetření při podezření na toto onemocnění, aby bylo možné ihned začít s léčbou.

5.2 Mutační analýza genu ATP7B

Mutační analýza genu ATP7A byla prováděna v souboru 33 pacientů s podezřením na Wilsonovu chorobu. Mutace vedoucí ke vzniku Wilsonovy choroby byly zjištěny u 20 nemocných (tab. 8). U 13 pacientů se dosud poruchu genu najít nepodařilo.

Analýza kódujících oblastí přímým sekvenováním zpravidla umožňuje odhalit mutace v genu ATP7B u více než 90% postižených osob s Wilsonovou chorobou. Nižší úspěšnost detekce mutací genu ATP7B v této práci je možno vysvětlit nepřítomností mutací v kódujících oblastech genu, i když to je málo pravděpodobné, protože i okrajové oblasti intronů jsou zahrnuty do amplifikovaných úseků a mutace v promotoru genu jsou známy pouze ze Sardinie, kde jsou velmi časté (Loudianos et al. 1999), ale jinak se téměř

neobjevují (Cullen et al. 2003). Možným vysvětlením by mohla být nesprávně stanovená diagnóza onemocnění, avšak u všech vyšetřovaných se vyskytovaly příznaky Wilsonovy choroby a všichni byli právě heterozygoti s nejčastější mutací u Wilsonovy choroby, což by spíše diagnózu potvrzovalo. Možným vysvětlením mohou být také mutace v genu, které naruší zmnožení poškozeného úseku alely a tím pak znemožní jeho sekvenční analýzu, nebo mutace, které takto není možno zachytit (rozsáhlé delece). Vyšetření těchto pacientů bude dále pokračovat.

Při vyšetření genu ATP7B byly nalezeny dvě dosud nepopsané mutace. V 15. exonu byla nalezena tranzice 3403 G>A, která způsobí záměnu kodónu GCA na ACA (A1135T). Tato mutace se nachází v oblasti smyčky s doménou pro vazbu ATP, kde by změna alaninu za tyrosin mohla způsobit snížení aktivity proteinu. Další nová mutace byla zjištěna v 17. exonu a jedná se o tranzici 3688 A>G, která zamění kodón ATT na GTT (I1230V). I když rozdíl mezi nepolárními aminokyselinami isoleucinem a valinem není velký, v oblasti domény pro vazbu ATP může mít patologický význam. Interpretace těchto výsledků je však komplikovaná, neboť dopad missense mutací na funkci proteinu se dá jen odhadovat. Bylo by proto vhodné analyzovat mutované proteiny a ověřit jejich skutečnou aktivitu. Možným způsobem analýzy je v tomto případě exprese proteinu a sledování jeho schopnosti transportovat měď v buňkách nebo v izolovaných vezikulech (Voskoboinik et al. 2003) (obr. 7).

Výběr pacientů s Wilsonovou chorobou nebyl náhodný, protože všechny vyšetřované osoby byly určeny jako heterozygoti pro nejčastější mutaci H1069Q. Nelze tedy přesně stanovit frekvence jednotlivých alel, protože frekvence alely H1069Q v souboru byla výběrem určena na 50%. Je ovšem možno předpokládat, že typy a frekvence druhé mutované alely jsou podobné jako v náhoně vybraném souboru pacientů. Součet frekvencí všech ostatních alel by pak měl představovat zbytek do 100% od frekvence alely H1069Q u pacientů s Wilsonovou chorobou. Frekvence výskytu nejčastější mutace v kavkazské populaci je průměrně asi 38% (Shah et al. 1997), nejvyšší v Polsku (73%) (Czlonkowska et al. 1997). V České republice byla stanovena frekvence mutace H1069Q v rozsahu 57% - 66% (Vrábelová et al 2002, 2005). Pokud se použijí tyto hodnoty, pak frekvence mutací identifikovaných v této práci (ve srovnání s frekvencemi mutací podle analýzy Vrábelová et al. 2002, 2005 uvedenými v závorkách) je přibližně pro

mutace 2298_2299 insC 6% (1,1%; 1,25%), pro mutaci W779X 6% (2,6%; 2,75%), pro mutaci 3400 delC 4,8% (4,6%; 3,5%). Odchyly frekvencí mutací v analyzovaném souboru od již dříve zjištěných jsou dosti výrazné, avšak pravděpodobně mohou být způsobeny pouze nedostatečně velkým souborem sledovaných alel. Přesto například frekvence 6% je uváděna pro mutaci 2298_2299 insC v Itálii (Loudianos et al. 1999). Je také možné, že právě tyto mutace ovlivnily projevy choroby u pacientů způsobem, který umožnil přesné určení klinické diagnózy a začlenění do vyšetřeného souboru. Frekvence tří častých zjištěných mutací dohromady je v populaci nejméně 7,2% (Vrábelová et al. 2002, 2005). Pro rychlou analýzu u nových pacientů bude tedy možno, po vyšetření nejčastější alely H1069Q, využít restriční test (PCR/RFLP), který by mohl u pacientů odhalit mutace asi v pětině zbývajících alel.

Postupy analýzy méně častých mutací genu ATP7B využité v této práci umožní přesné stanovení diagnózy u nemocných a vyšetřování presymptomatických pacientů v rodinách s výskytem Wilsonovy choroby, aby bylo možno včas zahájit léčbu a předcházet závažným projevům onemocnění.

6. SHRnutí

Stanovení správné diagnózy je u Menkesovy choroby i Wilsonovy choroby nezbytné pro včasné zahájení léčby. Molekulárně-genetická analýza mutací genu ATP7A, respektive ATP7B, které jsou zodpovědné za vznik těchto onemocnění, pomohla u pacientů potvrdit diagnózu stanovenou podle klinických a biochemických pozorování. Identifikace mutací u postižených osob umožnila vyšetření mutací u příbuzných v rodinách s výskytem onemocnění.

Přímá sekvenční analýza genu ATP7A odhalila u 4 postižených chlapců s projevy Menkesovy choroby mutace ve všech případech a je tedy vhodným postupem při vyšetření tohoto onemocnění. Zavedení molekulární diagnostiky Menkesovy choroby v České republice umožní rychlé a přesné stanovení diagnózy tohoto onemocnění, sledování mutací v rodinách s výskytem Menkesovy choroby, genetické poradenství a prenatální diagnostiku. Výrazně se urychlí diagnostika choroby, protože vzorky DNA k analýze již nebude třeba zasílat do zahraničí, kde byla vyšetření prováděna dosud. Včasné stanovení diagnózy je v tomto případě naprosto určující pro brzké zahájení léčby, které ovlivní další průběh choroby.

Vyšetření 33 nepříbuzných pacientů s Wilsonovou chorobou pro přítomnost mutací v genu ATP7B odhalilo mutace u 20 z nich a umožnilo tak potvrzení klinické diagnózy. V rodinách postižených osob s určenou mutací bude pak možno provést presymptomatickou diagnostiku, zahájit léčbu ještě před nástupem příznaků choroby a předejít tak závažným komplikacím.

7. SEZNAM LITERATURY

- Abusaad, I.; Mohammed, S. N.; Ogilvie, C. M.; Ritchie, J.; Pohl, K. R. E.; Docherty, Z.: Clinical expression of Menkes disease in a girl with X;13 translocation. *Am. J. Med. Genet.* 87: 354-359; 1999.
- Amaravadi, R.; Glerum, D. M.; Tzagoloff, A.: Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17 a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment. *Hum. Genet.* 99: 329-333; 1997.
- Andrews, N. C.: Mining copper transport genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 6543-6545; 2001.
- Bearn, A. G.: A genetical analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ann. Hum. Genet.* 24: 33-43; 1960.
- Bearn, A. G.; McKusick, V. A.: Azure lunulae: an unusual change in the fingernails in two patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *J. Am. Med. Assoc.* 166: 904-906; 1958.
- Borm, B.; Moller, L. B.; Hausser, I.; Emeis, M.; Baerlocher, K.; Horn, N.; Rossi, R.: Variable clinical expression of an identical mutation in the ATP7A gene for Menkes disease/occipital horn syndrome in three affected males in a single family. *J. Pediatr.* 145: 119-121; 2004.
- Brewer, G. J.; Dick, R. D.; Johnson, V. D.; Brunberg, J. A.; Kluin, K. J.; Fink, J. K.: Treatment of Wilson's disease with zinc. XV. Long-term follow-up studies. *J. Lab. Clin. Med.* 132: 264-278; 1998.
- Brewer, G. J.; Dick, R. D.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Johnson, V.; Wang, Y.: Treatment of Wilson's disease with zinc XIII: therapy with zinc in presymptomatic patients from the time of diagnosis. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 849-858; 1994.
- Brewer, G. J.; Hedera, P.; Kluin, K. J.; Carlson, M.; Askari, F.; Dick, R. B.; Sitterly, J.; Fink, J. K.: Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate. III. Initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy. *Arch. Neurol.* 60: 379-385; 2003.
- Brewer, G. J.; Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Young, A. B.: The treatment of Wilson's disease. *Semin. Neurol.* 7: 209-220; 1987.
- Brophy, C. M.; Tilson, J. E.; Braverman, I. M.; Tilson, M. D.: Age of onset, pattern of distribution, and histology of aneurysm development in a genetically predisposed mouse model. *J. Vasc. Surg.* 8: 45-48; 1988.
- Buiakova, O. I.; Xu, J.; Lutsenko, S.; Zeitlin, S.; Das, K.; Das, S.; Ross, B. M.; Mekios, C.; Scheinberg, I. H.; Gilliam, T. C.: Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum. Molec. Genet.* 8: 1665-1671; 1999.
- Bull, P. C.; Cox, D. W.: Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.* 10: 246-252; 1994.
- Bull, P. C.; Thomas, G. R.; Rommens, J. M.; Forbes, J. R.; Cox, D. W.: The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet.* 5: 327-337; 1993.
- Casareno, R. L.; Waggoner D.; Gitlin J. D.: The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273: 23625-23628; 1998.

- Cecchi, C.; Biasotto, M.; Tosi, M.; Avner, P.: The mottled mouse as a model for human Menkes disease: identification of mutations in the *Atp7a* gene. *Hum. Molec. Genet.* 6: 425-433; 1997.
- Cox, D. W.: Molecular advances in Wilson disease. *Prog. Liver Dis.* 14: 245-264; 1996.
- Cox, D. W.; Fraser, F. C.; Sass-Kortsak, A.: A genetic study of Wilson's disease: evidence for heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 24: 646-666; 1972.
- Cullen, L. M.; Prat, L.; Cox, D. W.: Genetic variation in the promoter and 5-prime UTR of the copper transporter, *ATP7B*, in patients with Wilson disease. *Clin. Genet.* 64: 429-432; 2003.
- Culotta, V. C.; Klomp L. W.; Strain J.; Casareno R. L.; Krems B.; Gitlin J. D.: The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272: 23469-23472; 1997.
- Czlonkowska, A.; Rodo, M.: Late onset of Wilson's disease: report of a family. *Arch. Neurol.* 38: 729-730; 1981.
- Danks, D. M.: The mild form of Menkes disease: progress report on the original case. *Am. J. Med. Genet.* 30: 859-864; 1988.
- Danks, D. M.; Campbell, P. E.; Stevens, B. J.; Mayne, V.; Cartwright, E.: Menkes' kinky hair syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects. *Pediatrics* 50: 188-201; 1972.
- Danks, D. M.; Cartwright, E.; Campbell, P. E.; Mayne, V.: Is Menkes' syndrome a heritable disorder of connective tissue?. (letter) *Lancet* 2: 1089; 1971.
- Danks, D. M.; Metz, G.; Sewell, R.; Prewett, E. J.: Wilson's disease in adults with cirrhosis but no neurological abnormalities. *Brit. Med. J.* 301: 331-332; 1990.
- Das, S.; Levinson, B.; Whitney, S.; Vulpe, S.; Packman, S.; Gitschier, J.: Diverse mutations in patients with Menkes disease often lead to exon skipping. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 883-889; 1994.
- Das, S.; Levinson, B.; Vulpe, C.; Whitney, S.; Gitschier, J.; Packman, S.: Similar splicing mutations of the Menkes/mottled copper-transporting *ATPase* gene in occipital horn syndrome and the blotchy mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 570-576; 1995.
- De Groot, C. J.; Wijburg, F. A.; Barth, P. G.; Bolhuis, P. A.; Peelen, W.; Abeling, N. G. G. M.; van den Hamer, C. J. A.: Vitamin C treatment in Menkes' disease: failure to affect biochemical and clinical parameters. *J. Inherit. Metab. Dis.* 12 (suppl. 2): 389-392; 1989.
- Deguti, M. M.; Genschel, J.; Cancado, E. L.; Barbosa, E. R.; Bochow, B.; Mucenic, M.; Porta, G.; Lochs, H.; Carrilho, F. J.; Schmidt, H. H.: Wilson disease: novel mutations in the *ATP7B* gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum. Mutat.* 23: 398; 2004.
- Dening, T. R.; Berrios, G. E.: Wilson's disease. Psychiatric symptoms in 195 cases. *Arch. Gen. Psychiatry* 46: 1126-1134; 1989.
- Devesa, R.; Alvarez, A.; de las Heras, G.; de Miguel, J. R.: Wilson's disease treated with trientine during pregnancy. *J. Pediat. Gastroent. Nutr.* 20: 102-103; 1995.
- Dierick, H. A.; Ambrosini, L.; Spencer, J.; Glover, T. W.; Mercer, J. F. B.: Molecular structure of the Menkes disease gene (*ATP7A*). *Genomics* 28: 462-469; 1995.
- Durand, F.; Bernuau, J.; Giostra, E.; Mentha, G.; Shouval, D.; Degott, C.; Benhamou, J. P.; Valla, D.: Wilson's disease with severe hepatic insufficiency: beneficial effects of early administration of D-penicillamine. *Gut* 48: 849-852; 2001

- Fatemi, N. ; Sarkar, B.: Structural and functional insights of Wilson disease copper-transporting ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34: 339-49; 2002.
- Figus, A.; Angius, A.; Loudianos, G.; Bertini, C.; Dessi, V.; Loi, A.; Deiana, M.; Lovicu, M.; Olla, N.; Sole, G.; De Virgiliis, S.; Lilliu, F.; et al. : Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1318-1324; 1995.
- Firneisz, G.; Lakatos, P. L.; Szalay, F.; Polli, C.; Glant, T. T.; Ferenci, P.: Common mutations of ATP7B in Wilson disease patients from Hungary. *Am. J. Med. Genet.* 108: 23-28; 2002.
- Forbes, J. R.; Cox, D. W.: Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum. Molec. Genet.* 9: 1927-1935; 2000.
- Francis, M. J.; Jones, E. E.; Levy, E. R.; Ponnambalam, S.; Chelly, J.; Monaco, A. P.: A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. *Hum. Molec. Genet.* 7: 1245-1252; 1998.
- Freedman, J. H.; Ciriolo, M. R.; Peisach, J.: The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605; 1989.
- Frydman, M.; Bonne-Tamir, B.; Farrer, L. A.; Conneally, P. M.; Magazanik, A.; Ashbel, S.; Goldwirth, Z.: Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82: 1819-1821; 1985.
- Furman, B.; Bashiri, A.; Wiznitzer, A.; Erez, O.; Holcberg, G.; Mazor, M.: Wilson's disease in pregnancy: five successful consecutive pregnancies of the same woman. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 96: 232-234; 2001.
- George, A. M.; Reed, V.; Glenister, P.; Chelly, J.; Tümer, Z.; Horn, N.; Monaco, A. P.; Boyd, Y.: Analysis of Mnk, the murine homologue of the locus for Menkes disease, in normal and mottled mice. *Genomics* 22: 27-35; 1994.
- Gerdes, A.-M.; Tonnesen, T.; Horn, N.; Grisar, T.; Marg, W.; Muller, A.; Reinsch, R.; Barton, N. W.; Guiraud, P.; Joannard, A.; Richard, M. J.; Guttler, F.: Clinical expression of Menkes syndrome in females. *Clin. Genet.* 38: 452-459; 1990.
- Glerum, D.M., Shtanko A., Tzagoloff A.: Characterization of COX17: a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 271, 14504-14509; 1996.
- Goka, T. J.; Stevenson, R. E.; Hefferan, P. M.; Howell, R.: Menkes disease: a biochemical abnormality in cultured human fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 604-606; 1976.
- Gow, P. J.; Smallwood, R. A.; Angus, P. W.; Smith, A. L.; Wall, A. J.; Sewell, R. B.: Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut* 46: 415-419; 2000.
- Grimes, A.; Hearn, C. J.; Lockhart, P.; Newgreen, D. F.; Mercer, J. F. B.: Molecular basis of the brindled mouse mutant (Mo-br): a murine model of Menkes disease. *Hum. Molec. Genet.* 6: 1037-1042; 1997.
- Gu, M.; Cooper, J. M.; Butler, P.; Walker, A. P.; Mistry, P. K.; Dooley, J. S.; Schapira, A. H. V.: Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 356: 469-474; 2000.
- Guarino, M.; Stracciari, A.; D'Alessandro, R.; Pazzaglia, P.: No neurological improvement after liver transplantation for Wilson's disease. *Acta. Neurol. Scand.* 92: 405-408; 1995.

- Gunshin, H., Mackenzie B., Berger U.V.: Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F. et al., Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488; 1997.
- Ha-Hao, D.; Hefter, H.; Stremmel, W.; Castaneda-Guillot, C.; Hernandez, A. H.; Cox, D. W.; Auburger, G.: His1069-to-gln and six novel Wilson disease mutations: analysis of relevance for early diagnosis and phenotype. *Europ. J. Hum. Genet.* 6: 616-623; 1998.
- Hahn, S., Cho, K., Ryu, K., Kim, J., Pai, K., Kim, M., Park, H., Yoo, O.: Identification of four novel mutations in classical menkes disease and successful prenatal DNA diagnosis. *Mol. Genet. Met.* 73: 86-90; 2001
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem. J.* 219, 1-4; 1984.
- Harris, E. D.: Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 291-310; 2000.
- Hartard, C.; Kunze, K.: Pregnancy in a patient with Wilson's disease treated with D-penicillamine and zinc sulfate: a case report and review of the literature. *Europ. Neurol.* 34: 337-340; 1994.
- Hartl, U. F.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580; 1996.
- Harterter, D. E.; Barnea, A.: Brain tissue accumulates (64)copper by two ligand-dependent saturable processes. *J. Biol. Chem.* 263: 799-805; 1988.
- Hoogenraad, T. U.: Dangers of interrupting decoppering treatment in Wilson's disease. (letter) *Arch. Neurol.* 51: 972-973; 1994.
- Hoogenraad, T. U.; van den Hamer, C. J. A.: 3 years of continuous oral zinc therapy in 4 patients with Wilson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 67: 356-364; 1983.
- Hunt, D. M.: Primary defect in copper transport underlies mottled mutants in the mouse. *Nature* 249: 852-854; 1974.
- Chan, W.-Y.; Garnica, A. D.; Rennert, O. M.: Cell culture studies of Menkes kinky hair disease. *Clin. Chim. Acta* 88: 495-507; 1978.
- Chelly, J.; Tümer, Z.; Tonnesen, T.; Petterson, A.; Ishikawa-Brush, Y.; Tommerup, N.; Horn, N.; Monaco, A. P.: Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genet.* 3: 14-19; 1993.
- Chowrimootoo, G. F. E.; Scowcroft, H.; Seymour, C. A.: Caeruloplasmin isoforms in Wilson's disease in neonates. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 79: F198-F201; 1998.
- Christodoulou, J.; Danks, D. M.; Sarkar, B.; Baerlocher, K. E.; Casey, R.; Horn, N.; Tümer, Z.; Clarke, J. T. R.: Early treatment of Menkes disease with parenteral copper (cis)-histidine: long-term follow-up of four treated patients. *Am. J. Med. Genet.* 76: 154-164; 1998.
- Jankov, R. P.; Boerkoel, C. F.; Hellmann, J.; Sirkin, W. L.; Tümer, Z.; Horn, N.; Feigenbaum, A.: Lethal neonatal Menkes' disease with severe vasculopathy and fractures. *Acta Paediat.* 87: 1297-1300; 1998.
- Kaler, S. G.; Gallo, L. K.; Proud, V. K.; Percy, A. K.; Mark, Y.; Segal, N. A.; Goldstein, D. S.; Holmes, C. S.; Gahl, W. A.: Occipital horn syndrome and a mild Menkes phenotype associated with splice site mutations at the MNK locus. *Nature Genet.* 8: 195-202; 1994.
- Kanumakala, S.; Boneh, A.; Zacharin, M.: Pamidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25: 391-398; 2002.

- Kapur, S.; Higgins, J. V.; Delp, K.; Rogers, B.: Menkes syndrome in a girl with X-autosome translocation. *Am. J. Med. Genet.* 26: 503-510, 1987.
- Kelly, E. J.; Palmiter, R. D.: A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nature Genet.* 13: 219-222, 1996.
- Kim, B.-E.; Smith, K.; Meagher, C. K.; Petris, M. J.: A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase: suppression by copper supplementation. *J. Biol. Chem.* 277: 44079-44084; 2002.
- Kim, E. K.; Yoo, O. J.; Song, K. Y.; Yoo, H. W.; Choi, S. Y.; Cho, S. W.; Hahn, S. H.: Identification of three novel mutations and a high frequency of the arg778-to-leu mutation in Korean patients with Wilson disease. *Hum. Mutat.* 11: 275-278; 1998.
- Klomp, L. W.; Lin, S. J.; Yuan D. S.; Klausner, R. D.; Culotta, V. C.; Gitlin, J. D.: Identification and functional expression of HAH1: a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* 272: 9221-9226; 1997.
- Kodama, H.; Murata, Y.: Molecular genetics and pathophysiology of Menkes disease. *Pediatrics International* 41: 430-435; 1999.
- Kooy, R. F.; Van der Veen, A. Y.; Verlind, E.; Houwen, R. H. J.; Scheffer, H.; Buys, C. H. C. M.: Physical localisation of the chromosomal marker D13S31 places the Wilson disease locus at the junction of bands q14.3 and q21.1 of chromosome 13. *Hum. Genet.* 91: 504-506; 1993.
- Kuan, P.: Cardiac Wilson's disease. *Chest* 91: 579-583; 1987.
- Kusuda, Y.; Hamaguchi, K.; Mori, T.; Shin, R.; Seike, M.; Sakata, T.: Novel mutations of the ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease. *J. Hum. Genet.* 45: 86-91; 2000.
- La Fontaine, S.; Firth, S. D.; Lockhart, P. J.; Brooks, H.; Parton, R. G.; Camakaris, J.; Mercer, J. F. B.: Functional analysis and intracellular localization of the human Menkes protein (MNK) stably expressed from a cDNA construct in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1). *Hum. Molec. Genet.* 7: 1293-1300; 1998.
- La Fontaine, S.; Theophilos, M. B.; Firth, S. D.; Gould, R.; Parton, R. G.; Mercer, J. F. B.: Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase. *Hum. Molec. Genet.* 10: 361-370, 2001.
- Lang, C. J. G.; Rabas-Kolominsky, P.; Engelhardt, A.; Kobras, G.; Konig, H. J.: Fatal deterioration of Wilson's disease after institution of oral zinc therapy. (letter) *Arch. Neurol.* 50: 1007-1008, 1993.
- Larin, D., Mekios C., Das K., Ross B., Yang A.S., Gilliam T.C.: Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic chaperone, HAH1. *J. Biol. Chem.* 274: 28497-28504; 1999.
- Li, Y.; Togashi, Y.; Sato, S.; Emoto, T.; Kang, J.-H.; Takeichi, N.; Kobayashi, H.; Kojima, Y.; Une, Y.; Uchino, J.: Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis: a model of Wilson's disease. *J. Clin. Invest.* 87: 1858-1861; 1991.
- Lin, C. M.; Kosman, D. J.: Copper uptake in wild type and copper metallothionein-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.* 265: 9194-9200; 1990.
- Linder, M. C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N.: Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 965S-971S; 1998.

- Liu, P. C.; McAndrews, P. E.; Kaler, S. G.: Rapid and robust screening of the Menkes disease / occipital horn syndrome gene. *Genet. Test.* 6: 255-260; 2002.
- Liu, X. Q.; Zhang, Y. F.; Liu, T. T.; Hsiao, K. J.; Zhang, J. M.; Gu, X. F.; Bao, K. R.; Yu, L. H.; Wang, M. X.: Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J. Gastroenterol.* 10: 590-593; 2004.
- Loudianos, G.; Dessi, V.; Lovicu, M.; Angius, A.; Altuntas, B.; Giacchino, R.; Marazzi, M.; Sartorelli, M. R.; Sturniolo, G. C.; Kocak, N.; Yuce, A.; Akar, N.; Pirastu, M.; Cao, A.: Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations. *J. Med. Genet.* 36: 833-836, 1999.
- Loudianos, G.; Dessi, V.; Lovicu, M.; Angius, A.; Kanavakis, E.; Tzetis, M.; Kattamis, C.; Manolaki, N.; Vassiliki, G.; Karpathios, T.; Cao, A.; Pirastu, M.: Haplotype and mutation analysis in Greek patients with Wilson disease. *Eur J Hum Gen* 6: 487-491, 1998.
- Lutsenko, S.; Petris, M. J.: Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: Insight from biochemical and cell biological approaches. *J. Membrane Biol.* 191: 1-12; 2002.
- Martins da Costa, C.; Baldwin, D.; Portmann, B.; Lolin, Y.; Mowat, A.P.; Mieli-Vergani, G.: Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology* 15: 609-615; 1992.
- Masson, W.; Hughes, H.; Papworth, D.; Boyd, Y.; Horn, N.: Abnormalities of copper accumulation in cell lines established from nine different alleles of mottled are the same as those found in Menkes disease. *J. Med. Genet.* 34: 729-732; 1997.
- Menerey, K. A.; Eider, W.; Brewer, G. J.; Braunstein, E. M.; Schumacher, H. R.; Fox, I. H.: The arthropathy of Wilson's disease: clinical and pathologic features. *J. Rheum.* 15: 331-337; 1988.
- Menkes, J. H.: Kinky hair disease: twenty five years later. *Brain Dev.* 10: 77-79; 1988.
- Menkes, J. H.; Alter, M.; Steigleder, G. K.; Weakley, D. R.; Sung, J. H.: A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 29: 764-779; 1962.
- Mercer, J. F. B.; Livingston, J.; Hall, B.; Paynter, J. A.; Begy, C.; Chandrasekharappa, S.; Lockhart, P.; Grimes, A.; Bhave, M.; Siemieniak, D.; Glover, T. W.: Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nature Genet.* 3: 20-25; 1993.
- Moller, L. B.; Petersen, C.; Lund, C.; Horn, N.: Characterization of the hCTR1 gene: genomic organization, function, expression and identification of a highly homologous processed gene. *Gene* 257: 13-22; 2000. a
- Moller, L. B.; Tumer, Z.; Lund, C.; Petersen, C.; Cole, T.; Hanusch, R.; Seidel, J.; Jensen, L. R.; Horn, N.: Similar splice-site mutations of the ATP7A gene lead to different phenotypes: classical Menkes disease or occipital horn syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1211-1220; 2000. b
- Moore, C. M.; Howell, R. R.: Ectodermal manifestations in Menkes disease. *Clin. Genet.* 28: 532-540; 1985.
- Morgan, C. T.; Tsivkovskii, R.; Kosinsky, Y. A.; Efremov, R. G.; Lutsenko, S.: The distinct functional properties of the nucleotide-binding domain of ATP7B, the human copper-transporting ATPase: analysis of the Wilson disease mutations E1064A, H1069Q, R1151H, and C1104F. *J Biol Chem.* 2004. 279:36363-71.
- Nuttall, K. L.; Palaty, J.; Lockitch, G.: Reference limits for copper and iron in liver biopsies. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 33: 443-50; 2003.

- O'Halloran, T. V.; Culotta, V. C.: Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275: 25057-25060; 2000.
- Olivarez, L.; Caggana, M.; Pass, K. A.; Ferguson, P.; Brewer, G. J.: Estimate of the frequency of Wilson's disease in the US Caucasian population: a mutation analysis approach. *Ann. Hum. Genet.* 65: 459-463; 2001.
- Osaka, K.; Sato, N.; Matsumoto, S.; Ogino, H.; Kadama, S.; Yokoyama, S.; Sugiyama, T.: Congenital hypocupraemia syndrome with and without steely hair: report of two Japanese infants. *Dev. Med. Child Neurol.* 19: 62-68; 1977.
- Panagiotakaki, E.; Tzetis, M.; Manolaki, N.; Loudianos, G.; Papatheodorou, A.; Manesis, E.; Nousia-Arvanitakis, S.; Syriopoulou, V.; Kanavakis, E.: Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am. J. Med. Genet.* 131: 168-173; 2004.
- Papadopoulou, L. C.; Sue, C. M.; Davidson, M. M.; Tanji, K.; Nishino, I.; Sadlock, J. E.; Krishna, S.; Walker, W.; Selby, J.; Glerum, D. M.: Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, COX assembly gene. *Nature Genet.* 23: 333-337; 1999.
- Passwell, J.; Adam, A.; Garfinkel, D.; Streiffler, M.; Cohen, B. E.: Heterogeneity of Wilson's disease in Israel. *Israel J. Med. Sci.* 13: 15-19; 1977.
- Payne, A. S.; Kelly, E. J.; Gitlin, J. D.: Functional expression of the Wilson disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 10854-10859; 1998.
- Petris, M. J.; Camakaris, J.; Greenough, M.; LaFontaine, S.; Mercer, J. F. B.: A C-terminal di-leucine is required for localization of the Menkes protein in the trans-Golgi network. *Hum. Molec. Genet.* 7: 2063-2071; 1998.
- Petris, M. J.; Mercer, J. F. B.: 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; 1999.
- Petris, M. J.; Mercer, J. F. B.; Culvenor, J. G.; Lockhart, P.; Gleeson, P. A.; Camakaris, J.: Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J.* 15: 6084-6095; 1996.
- Petris, M. J.; Strausak, D.; Mercer, J. F. B.: The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum. Molec. Genet.* 9: 2845-2851; 2000.
- Polson, R. J.; Rolles, K.; Calne, R. Y.; Williams, R.; Marsden, D.: Reversal of severe neurological manifestations of Wilson's disease following orthotopic liver transplantation. *Quart. J. Med.* 64: 685-691; 1987.
- Portnoy, M. E.; Schmidt, P. J.; Rogers, R. S.; Culotta, V. C.: Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genom.* 265: 873-882; 2001.
- Poulos, T. L.: Helping copper find a home. *Natur. Struct. Biol.* 709-711; 1999.
- Procopis, P.; Camakaris, J.; Danks, D. M.: A mild form of Menkes steely hair syndrome. *J. Pediat.* 98: 97-99; 1981.
- Proud, V. K.; Mussell, H. G.; Kaler, S. G.; Young, D. W.; Percy, A. K.: Distinctive Menkes disease variant with occipital horns: delineation of natural history and clinical phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 65: 44-51; 1996.
- Puig, S.; Thiele, D. J.: Molecular mechanism of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 171-180; 2002.

- Rae, T. D.; Schmidt, P. J.; Pufahl, R. A.; Culotta, V. C.; O'Halloran, T. V.: Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808; 1999.
- Reed, V.; Boyd, Y.: Mutation analysis provides additional proof that mottled is the mouse homologue of Menkes' disease. *Hum. Molec. Genet.* 6: 417-423; 1997.
- Reed, V.; Williamson, P.; Bull, P. C.; Cox, D. W.; Boyd, Y.: Mapping of the mouse homologue of the Wilson disease gene to mouse chromosome 8. *Genomics* 28: 573-575; 1995.
- Sander, C.; Niederhoff, H.; Horn, N.: Life-span and Menkes kinky hair syndrome: report of a 13-year course of this disease. *Clin. Genet.* 33: 228-233; 1988.
- Sasaki, N.; Hayashizaki, Y.; Muramatsu, M.; Matsuda, Y.; Ando, Y.; Kuramoto, T.; Serikawa, T.; Azuma, T.; Naito, A.; Agui, T.; Yamashita, T.; Miyoshi, I.; Takeichi, N.; Kasai, N.: The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog to the human Wilson disease gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 512-518; 1994.
- Scott, K. C.; Turnlund, J. R.: Compartment model of copper metabolism in adult men. *J. Nutr. Biochem.* 5: 342-350; 1994.
- Seidel, J.; Moller, L. B.; Mentzel, H. J.; Kauf, E.; Vogst, S.; Patzer, S.; Willina, U.; Zintl, F.; Horn, N.: Disrupted copper transport in humans. Part 1: mutations of the ATP7A gene lead to Menkes disease and occipital horn syndrom. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 47 Online Pub: OL 141-148; 2001.
- Shah, B. A.; Chernov, I.; Zhang, H. T.; Ross, B. M.; Das, K.; Lutsenko, S.; Parano, E.: Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 317-328; 1997.
- Sherwood, G.; Sarkar, B.; Sass Kortsak, A.: Copper histidinate therapy in Menkes' disease: prevention of progressive neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.* 12 (suppl. 2): 393-396; 1989.
- Shokeir, M. H. K.: Investigations on the nature of ceruloplasmin deficiency in the newborn. *Clin. Genet.* 2: 223-227; 1971.
- Shokeir, M. H. K.; Shreffler, D. C.: Cytochrome oxidase deficiency in Wilson's disease: a suggested ceruloplasmin function. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 62: 867-872; 1969.
- Scheinberg, I. H.; Collins, J. C.: Menkes' disease: a disorder of zinc metabolism? (letter) *Lancet* 1: 619; 1989.
- Sokol, R. J.; Francis, P. D.; Gold, S. H.; Ford, D. M.; Lum, G. M.; Ambruso, D. R.: Orthotopic liver transplantation for acute fulminant Wilson disease. *J. Pediat.* 107: 549-552; 1985.
- Stapelbroek, J. M.; Bollen, C. W.; van Amstel, J. K.; van Erpecum, K. J.; van Hattum, J.; van den Berg, L. H.; Klomp, L. W.; Houwen, R. H.: The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J. Hepatol.* 41: 758-63; 2004.
- Starosta-Rubinstein, S.; Young, A. B.; Kluin, K.; Hill, G.; Aisen, A. M.; Gabrielsen, T.; Brewer, G. J.: Clinical assessment of 31 patients with Wilson's disease: correlations with structural changes on magnetic resonance imaging. *Arch. Neurol.* 44: 365-370; 1987.
- Steindl, P.; Ferenci, P.; Dienes, H. P.; Grimm, G.; Pabinger, I.; Madl, C.; Maier-Dobersberger, T.; Herneth, A.; Dragosics, B.; Meryn, S.; Knoflach, P.; Granditsch,

- G.; Gangl, A.: Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 113: 212-218; 1997.
- Steinebach, O. M.; Wolterbeek, H. T.: Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology* 92, 75-90; 1994.
- Sugio, Y.; Sugio, Y.; Kuwano, A.; Miyoshi, O.; Yamada, K.; Niikawa, N.; Tsukahara, M.: Translocation t(X;21)(q13.3;p11.1) in a girl with Menkes disease. *Am. J. Med. Genet.* 79: 191-194; 1998.
- Suzuki, K. T.; Karasawa, A.; Sunaga, H.; Kodama, H.; Yamanaka, K.: Uptake of copper from the blood-stream and its relation to induction of metallothionein synthesis in the rat. *Compar. Biochem. Physiol.* 94: 93-97; 1989.
- Svetel, M.; Kozic, D.; Stefanova, E.; Semnic, R.; Dragasevic, N.; Kostic, V.S.: Dystonia in Wilson's disease. *Mov. Disord.* 16: 719-723; 2001.
- Tanzi, R. E.; Petrukhin, K.; Chernov, I.; Pellequer, J. L.; Wasco, W.; Ross, B.; Romano, D. M.; Parano, E.; Pavone, L.; Brzustowicz, L. M.; Devoto, M.; Peppercorn, J.; Bush, A. I.; Sternlieb, I.; Pirastu, M.; Gusella, J. F.; Evgrafov, O.; Penchaszadeh, G. K.; Honig, B.; Edelman, I. S.; Soares, M. B.; Scheinberg, I. H.; Gilliam, T. C.: The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet.* 5: 344-350; 1993.
- Terada, K.; Nakako, T.; Yang, X.-L.; Iida, M.; Aiba, N.; Minamiya, Y.; Nakai, M.; Sakaki, T.; Miura, N.; Sugiyama, T.: Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *J. Biol. Chem.* 273: 1815-1820; 1998.
- Theophilos, M. B.; Cox, D. W.; Mercer, J. F. B.: The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1619-1624; 1996.
- Thomas, G. R.; Forbes, J. R.; Roberts, E. A.; Walshe, J. M.; Cox, D. W.: The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genet.* 9: 210-217; 1995.
- Tonnesen, T.; Garrett, C.; Gerdes, A.-M.: High (64)Cu uptake and retention values in two clinically atypical Menkes patients. *J. Med. Genet.* 28: 615-618; 1991.
- Tonnesen, T.; Kleijer, W. J.; Horn, N.: Incidence of Menkes disease. *Hum. Genet.* 86: 408-410; 1991.
- Tümer, Z.; Horn, N.: Menkes disease: recent advances and new aspects. *J. Med. Genet.* 34: 265-274; 1997.
- Tümer, Z.; Horn, N.; Tonnesen, T.; Christodoulou, J.; Clarke, J. T. R.; Sarkar, B.: Early copper-histidine treatment for Menkes disease. (letter) *Nature Genet.* 12: 11-13; 1996.
- Tümer, Z.; Lund, C.; Tolshave, J.; Vural, B.; Tonnesen, T.; Horn, N.: Identification of point mutations in 41 unrelated patients affected with Menkes disease. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 63-71; 1997.
- Tümer, Z.; Moller, L. B.; Horn, N.: Screening of 383 unrelated patients affected with Menkes disease and finding of 57 gross deletions in ATP7A. *Hum. Mutat.* 22: 457-464; 2003.
- Tümer, Z.; Tommerup, N.; Tonnesen, T.; Kreuder, J.; Craig, I. W.; Horn, N.: Mapping of the Menkes locus to Xq13.3 distal to the X-inactivation center by an intrachromosomal insertion of the segment Xq13.3-q21.2. *Hum. Genet.* 88: 668-672; 1992.

- Tümer, Z.; Tonnesen, T.; Bohmann, J.; Marg, W.; Horn, N.: First trimester prenatal diagnosis of Menkes disease by DNA analysis. *J. Med. Genet.* 31: 615-617; 1994.
- Tümer, Z.; Vural, B.; Tonnesen, T.; Chelly, J.; Monaco, A. P.; Horn, N.: Characterization of the exon structure of the Menkes disease gene using vectorette PCR. *Genomics* 26: 437-442; 1995.
- Turnlund, J. R.; Keyes, W. R.; Erson, H. L.; Acord, L. L.: Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper using the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 870-878; 1989.
- van Wassenaeer-van Hall, H. N.; van den Heuvel, A. G.; Jansen, G. H.; Hoogenraad, T. U.; Mali, W. P. T. M.: Cranial MR in Wilson disease: abnormal white matter in extrapyramidal and pyramidal tracts. *Am. J. Neuroradiol.* 16: 2021-2027; 1995.
- Voskoboinik, I.; Mar, J.; Camakaris, J.: Mutational analysis of the Menkes copper P-type ATPase (ATP7A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 4888-494; 2003.
- Vrábelová, S.; Letocha, O.; Borský, M.; Kozák, L.: Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol. Gen. Metab.* 86: 277-285; 2005.
- Vrábelová, S.; Váňová, P.; Kopečková, L.; Trunečka, P.; Smolka, V.; Procházková, D.; Vejvalková, Š.; Šuláková, A.; Kupčová, V.; Bzdúch, V.; Kozák, L.: Molekulární analýza Wilsonovy choroby. *Čas. Lék. Čes.* 141: 642-645; 2002.
- Vulpe, C.; Levinson, B.; Whitney, S.; Packman, S.; Gitschier, J.: Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet.* 3: 7-13; 1993.
- Wakai, S.; Ishikawa, Y.; Nagaoka, M.; Okabe, M.; Minami, R.; Hayakawa, T.: Central nervous system involvement and generalized muscular atrophy in occipital horn syndrome: Ehlers-Danlos type IX – a first Japanese case. *J. Neurol. Sci.* 116: 1-5; 1993.
- Waldenstrom, E.; Lagerkvist, A.; Dahlman, T.; Westermarck, K.; Ladegren, U.: Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing. *Genomics* 37: 303-309; 1996.
- Walshe, J. M.: Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am. J. Med.* 21: 487-495; 1956.
- Walshe, JM. Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients. *Q. J. Med.* 70: 253-263; 1989.
- Wernimont A. K.; Huffman D. L.; Lamb A. L.; O'Halloran T. V.; Rosenzweig A. C.: Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nature Struct. Biol.* 7: 766-771; 2000.
- Westman, J. A.; Richardson, D. C.; Rennert, O. M.; Morrow, G., III : Atypical Menkes steely hair disease. *Am. J. Med. Genet.* 30: 853-858; 1988.
- Williams, D. M.; Atkin, C. L.; Frens, D. B.; Bray, P. F.: Menkes kinky hair syndrome – studies of copper metabolism and long term copper therapy. *Pediatr. Res.* 11: 823-826; 1977.
- Williams, R. S.; Marshall, P. C.; Lott, I. T.; Caviness, V. S., Jr.: The cellular pathology of Menkes' steely hair syndrome. *Neurology* 28: 575-583; 1978.
- Wilson, D. C.; Phillips, M. J.; Cox, D. W.; Roberts, E. A.: Severe hepatic Wilson's disease in preschool-aged children. *J. Pediat.* 137: 719-722; 2000.
- Wirth, P. L.; Linder, M. C.: Distribution of copper among multiple components of human serum. *J. Natl. Cancer. Inst.* 75: 277-284; 1985.

- Wu, J.; Forbes, J. R.; Chen, H. S.; Cox, D. W.: The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genet.* 7: 541-545; 1994.
- Wu, Z.-Y.; Lin, M.-T.; Murong, S.-X.; Wang, N.: Molecular diagnosis and prophylactic therapy for presymptomatic Chinese patients with Wilson disease. *Arch. Neurol.* 60: 737-741; 2003.
- Wu, Z.-Y.; Wang, N.; Lin, M.-T.; Fang, L.; Murong, S.-X.; Yu, L.: Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of arg778leu mutation in Chinese patients with Wilson disease. *Arch. Neurol.* 58: 971-976; 2001.
- Yamaguchi, Y.; Heiny, M. E.; Gitlin, J. D.: Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 271-277; 1993.
- Yoon, C. H.: Recent advances in Syrian hamster genetics. *J. Hered.* 64: 305-307; 1973.
- Yuzbasiyan-Gurkan, V.; Wagnitz, S.; Blanton, S. H.; Brewer, G. J.: Linkage studies of the esterase D and retinoblastoma genes to canine copper toxicosis: a model for Wilson disease. *Genomics* 15: 86-90; 1993.
- Zhou, B., Gitschier J.: hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7481-7486; 1997.