



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

### III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29  
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

#### OSASUN ZIENTZIAK

**Bektore biral terapeutiko baten  
efikazioa eta toxizitatearen  
ebaluazioa Wilson gaixotasundun  
saguetan**

*Oihana Murillo, Daniel Moreno,  
Cristina Gazquez, Miren Barberia,  
Itziar Cenzano, Iker Uriarte, Iñigo  
Navarro, Veronica Ferrer, Bernard  
Bénichou, Jean Philippe Combal,  
Ruben Hernandez-Alcoceba eta  
Gloria González Aseguinolaza*

18-23 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.02>



## Bektore biral terapeutiko baten efikazia eta toxizitatearen ebaluazioa Wilson gaixotasundun saguetan

Murillo, Oihana<sup>1,2\*</sup>; Moreno, Daniel<sup>1,2\*</sup>; Gazquez, Cristina<sup>1,2\*</sup>; Barberia, Miren<sup>1,2</sup>;  
Cenzano, Itziar<sup>1,2</sup>; Uriarte, Iker<sup>2,3</sup>; Navarro, Iñigo<sup>4</sup>; Ferrer, Veronica<sup>5</sup>; Bénichou, Bernard<sup>5</sup>;  
Combal, Jean Philippe<sup>5</sup>; Hernandez-Alcoceba, Ruben<sup>1,2f</sup>; González Aseguinolaza, Gloria<sup>1,2,5f</sup>.

<sup>1</sup> *Terapia genikoa eta geneen erregulazio programa, CIMA (ikerketa biomediko aplikaturako zentroa), Nafarroako unibertsitatea, Iruñea, Nafarroa.*

<sup>2</sup> *IDISNA, Nafarroako osasun ikerketa institutua, Iruñea Nafarroa.*

<sup>3</sup> *CIBERehd, Carlos III osasun institutua, Iruñea, Nafarroa.*

<sup>4</sup> *Kimika eta lurzoru zientziak departamentua, Nafarroako unibertsitatea, Iruñea, Nafarroa.*

<sup>5</sup> *Vivet-Therapeutics SAS, Paris, Frantzia.*

*mbarberiau@unav.es*

### Laburpena

Wilson gaixotasuna (WD), gaixotasun monogeniko arraro bat da herentzia autosomiko errezesiboa duena, non *ATP7B* genean azaltzen diren mutazioen ondorioz elikagaietatik hartzen den kobrea giblean metatzen den toxikotasuna eta kalteak eratu. Egungo tratamenduek albo ondorio handiak dituzte eta ez dute gaixotasuna sendatzen. Hori dela eta tratamendu alternatiboen ikerketa guztiz beharrezkoa da. Ikerketa honetan terapia genikoa erabiliz, 6 asteetako WD-dun saguei falta zaien *ATP7B* proteina bideratu zaie gibelera. Ikerketa tratamenduak, aztertutako parametro gehinak hobetu ditu denbora luzez. Datuek erakusten duten moduan, terapia genikoa etorkizun handiko tratamendua izan daiteke WD sendatzeko.

Hitz gakoak: Wilson gaixotasuna, terapia genikoa, *ATP7B*

### Abstract

*Wilson disease (WD) is a rare autosomal recessive disorder of copper metabolism in which mutations that appear in ATP7B gene lead to copper accumulation in the liver producing toxicity and liver damage. Treatments for WD have lots of side effects and they don't cure the disease. That's why research in alternative treatments is very necessary to find a cure for them. In this work, gene therapy has achieved to introduce the ATP7B protein in the liver of 6-week-old WD mice model. In the most of the analyzed parameters has achieved to correct them during long period of time. Data indicate that gene therapy could be encouraging treatment for WD.*

*Keywords: Wilson Disease, gene therapy, ATP7B*

## 1. Sarrera eta motibazioa

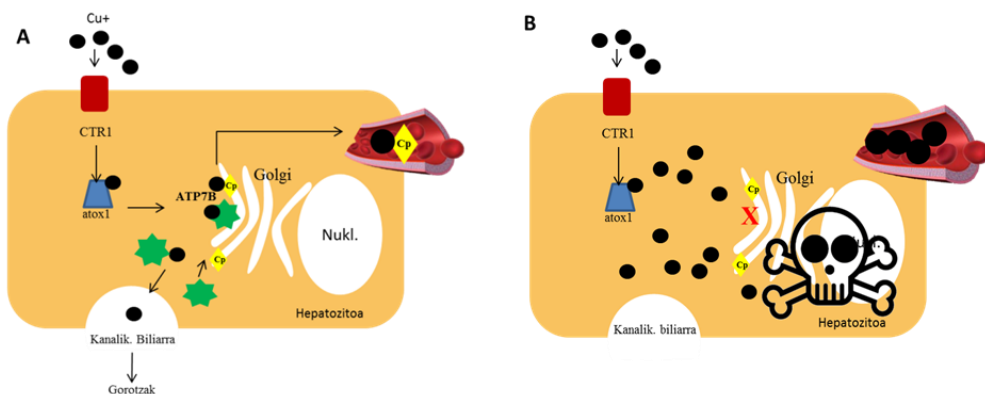
Wilson gaixotasuna (ingelesez Wilson Disease, WD), kobrearen metabolismoan eragina duen gaixotasun genetiko arraro bat da, herentzia autosomiko errezesiboa duena. Gaixotasuna, kobre garraiatzailea den *ATP7B* genean (*ATP7B*) azaltzen diren mutazioen ondorioz sortzen da, kobrearen eskrezio fisiologikoan eraginez (Patil et al., 2013 ;Roberts et al., 2003).

Kobrea, elementu esentziala da, kopuru oso txikiak beharrezkoak direlarik. Izane ere, kofaktore oso garrantzitsua da prozesu zelular ezberdinetan inplikaturik dauden entzimentzat, hala nola, arnasketa zelularrean inplikaturik daudenak, etab (Bandmann et al., 2015).

Kobrea hesteetatik hartu eta gero, gibeletara garraiatua izaten da. Behin hepatozitoetan, kobrea proteina ezberdinen bitartez garraiatua izaten da, *ATP7B* proteinara iristen den arte. *ATP7B* proteina, hepatozitoen Golgi aparatuko *trans*-bidean kokatzen da eta behin kobrea lotua duela, zeruloplasminari (Cp) igaro egiten dio, hau ere *trans*-Golgi bidean kokatuta dagoelarik (Roberts et al., 2003; Bandmann et al., 2015). Kobrea zeruloplasminari

lotuta odol zirkulaziora ateratzen da, gorputz osoko zeluletara kobrea barreiatuz modu seguruan. Hepatozitoetara gehiegizko kobrea heltzen denean, ATP7B proteina gai da *trans*-Golgi bidetik behazun hodixkaren mintzera lekualdatzeko eta behazun hodixkara eskretatzeko gehiegizko kobrea, gorotz bitarteko eskreziio fisiologikoa burutuz (1.Irudia) (Murillo et al., 2016; Lutsenko et al. 2008).

**1. irudia. Kobreakaren metabolismoa paziente osasuntsuetan eta WD pazienteetan.** A. Paziente osasuntsua. B. WD pazienteak. Cu<sup>+</sup>: kobrea. CTR1: kobre garraiatzailea 1. CP: zeruloplasmina. Patil et al. ClinExpHepatol (2013)-etik modifikatua.



WD duen pazienteetan, *ATP7B* genean azaltzen diren mutazioen ondorioz, ATP7B proteina ez da sintetizatzen edo ez da funtzionala eta beraz, kobrea ezin da zeruloplasminari lotu, ezta behazun hodixkatik eskretatu. Hori dela eta, kobrea hepatozitoetan progresiboki metatzen doa. Metaketa honek toxizitatea eta oxigeno erradikal askeen produkzioa eragiten du, zeluletan kalteak eraginez. Kalte hauen ondorioz, hepatitisak edo/eta zirrosiak ager daitezke besteen artean. Gainera, zelulak hiltzen direnean, metatutako kobrea modu askean ateratzen da odol zirkulaziora, beste ehunetan metatuz eta kaltetuz tratatzen ez bada. Hala nola, erretinan (Kaysner Fleischer ring), garunean, desorden neurologikoak eratu (distonia, antsietatea, jokabide asaldurak etab.) edota giltzurrunetan, kobrea gerneraren bitartez kanporatzen delarik modu ez-fisiologikoan (Bandmann et al., 2015).

Tratamenduei dagokionez, helburua kobre mailak murriztea da. Horretarako, kelatzaileak erabiltzen dira absortzioa murrizteko eta diuresi bitartez eskretatzeko. Dena den erabilitako tratamenduek albo ondorio anitzak dituzte eta tratamendu sendakor bakarrik gibel transplantea da. Gibel transplantea muturreko kasuetan ematen da non pazienteek ez duten tratamenduari erantzuten. Hala ere, nahiz eta pazienteak transplantatuta izan, kobreak eragindako asaldura neurologikoak adibidez, gehienetan ez dira itzulgarriak. Hori dela eta ordezko tratamenduen beharra oso handia da (Patil et al., 2013 ;Roberts et al., 2003).

Gaixotasun monogenikoen ikerketan, etorkizun handiko tratamenduetako bat terapia genikoa da. Terapia genikoa gene mutatuaren bertsio zuzendua, beharrezkoak diren zelula edo organoetara bideratzean datza, proteinaren bertsio zuzendua espresa dadin. Geneak, zelula edo organoetara bideratzeko, bektore biralen erabilera izugarri handitu da azken urteetan. Hain zuzen ere, bektore hauen propietateak aldatu eta egokitu egin dira segurtasuna handitzeko eta gaixotasunari egokitze (Lundstrom K., 2018). Seguruaren artean bektore adeno-asoziatuak ditugu (Adeno-associated vector ingelesez, AAV), zeintzuk gaixotasun ezberdinak tratatzeko erabili diren eta entsegu klinikoetan emaitza onak eman dituzten, A-hemofilian hain zuzen ere (Greig et al., 2017). Organo jakinak infektatzeko, serotipoak erabiltzen dira, hau da, bektoreek kapsidean dituzten proteinak. Bektoreak kapsidean duen proteinen arabera, gai izango da ehun jakinak efizienteago infektatzeko besteak baino.

WD-ri erreparatuta, AAV baten bitartez, *ATP7B* genea WD duten sagu gazteetara bideratzea lortu da, eta saguen fenotipoaren zuzenketa lortu ere (Murillo et al., 2016). Erabili diren saguek, *ATP7B* genearen bigarren exoi osoa delezionatuta dute eta hori dela eta, ez dute ATP7B proteinarik sintetizatzen. Gaixotasun aldetik, oso ongi erreproduzitzen dituzte gaixoetan

ikusitako gibel sintomak. Neurologikoei dagokionez, ez dira ikerketa nahikorik burutu animalia eredu honetan (Lutsenko et al., 2008). Hala ere, bektorearen produkzioan, ATP7B genearen DNA osagarria (cDNA) nahiko handia da, bektorearen klonazio kapazitatea gaintuz. Hori dela eta, bektore terapeutikoaren produkzioaren errendimendua murrizten da (Chamberlain et al., 2016).

Laborategian, ATP7B genearen forma murriztu bat eraiki da, miniATP7B. Gene honek, Wild type (Wt) formaren 489 aminoazido delezionatu dira. Aldaketa horiei dagokionez, ikusia izan da proteinaren produkzioan eta funtzioan aparteko eraginik ez direla sortzen (Yu et al., 2017; Cater et al., 2004).

Ikerketa honetan, anc80 serotipoa duen AAV baten bitartez (AAVanc80), miniATP7B genea WD saguen gibelean espresatu nahi izan da, bektore eta gene terapeutikoaren efizientzia eta toxikotasuna aztertzeko.

## 2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa zientifiko honen helburua Anc80 serotipoa duen eta laborategian eratu berri den miniATP7B gene terapeutikoa kodetzen duen AAV baten efizientzia eta toxikotasunaren neurketa da. Bektorearen bitartez, WD pairatzen duten saguen sendapena bilatzen da, toxikotasuna ere ezagutu nahiaz.

Helburua aurrera eramateko, hurrengo azpi-helburuak planteatzen dira:

- 1) Gene terapeutikoaren espresioaren azterketa
- 2) Saguen gernuan kobre kantitatearen murrizpena
- 3) Gibel eta garuneko kobre metaketa murriztea
- 4) Toxikotasunaren azterketa parametro biokimikoen neurketaren bitartez odol serum-ean

## 3. Ikerketaren muina

### 3.1. Ikerketaren planteamendua

Aurretik esan bezala, 6 asteetako 6 sagu eme eta 6 sagu ar erabili ziren dosi bakoitzerako ( $3 \times 10^{10}$  genoma biral/saguko (gb/sagu),  $10^{11}$  gb/sagu eta  $3 \times 10^{11}$  gb/sagu). Kontrol moduan, WT eta WD duten saguei PBSa (Phosphate buffered saline) injektatu zitzaien. Sagua injektatu eta 14 asteetara (20 aste) saguak hil eta organoen analisisia burutu zen. Analizatutako parametroak eta denbora hurrengo taulan laburbiltzen dira (1.Taula):

**1.Taula: 6 asteetako sagu ar zein emeek jasotako tratamendua (dosia), analizatutako parametroak eta laginak hartutako eta analizatutako denbora (a: astea; Gibel: gibela, Gar:garuna, Giltz: Giltzurrunak; P: parametro; Gen: genoma).**

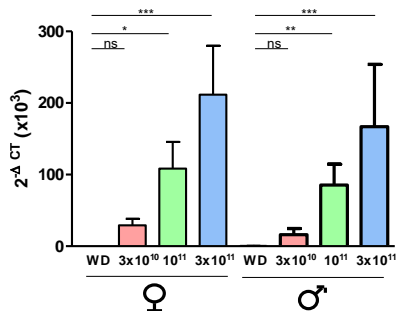
Sexua	Kopurua	Dosia (gb/sagu)	RNA	Gernua	Gib., Gar.	P. biokim
♀	6 WD	PBS	20a	6a(basala), 10a, 15a, 20a	20a	6a(basala), 10a, 15a, 20a
	6 WT	PBS				
	6 WD	$3 \times 10^{10}$				
	6 WD	$10^{11}$				
	6 WD	$3 \times 10^{11}$				
♂	6 WD	PBS	20a	6a (basala), 10a, 15a, 20a	20a	6a(basala), 10a, 15a, 20a
	6 WT	PBS				
	6 WD	$3 \times 10^{10}$				
	6 WD	$10^{11}$				
	6 WD	$3 \times 10^{11}$				

### 3.2. Gene terapeutikoaren espresioaren analisisa

Hasteko, infekzioa modu egokian eman zela ziurtatzeko, gibeledu zeluletan genoma biralen presentzia aztertu zen rt-PCR bitartez DNA genomikoa erauzi eta gero. Datuen arabera infekzioa modu egokian eman zela ziurtatu zen (datu ez eskuragarriak). Genoma biralen presentzia analizatuta, genoma biral horiek lortzen duten gene terapeutikoaren espresioa aztertu zen. Horretarako gibeledu zelulen RNA erauzketa burutu zen eta retrotranskripzioaren bitartez cDNA (DNA konplementarioa) lortu zen. Bertan, miniATP7B genearen espresioa rt-PCR

bitartez zehaztu zen. Sagu arrek, nahiz eta genoma biral kantitate txikiago batek gibela iritsi, gene terapeutikoaren espresioa zertxobait handiagoa zela ikusi zen. Gainera, genoma biralen kasuan bezala, injektatutako dosi altuenak miniATP7B espresio handiena lortu zuen, estatistikoki adierazgarria izanik (2. irudia).

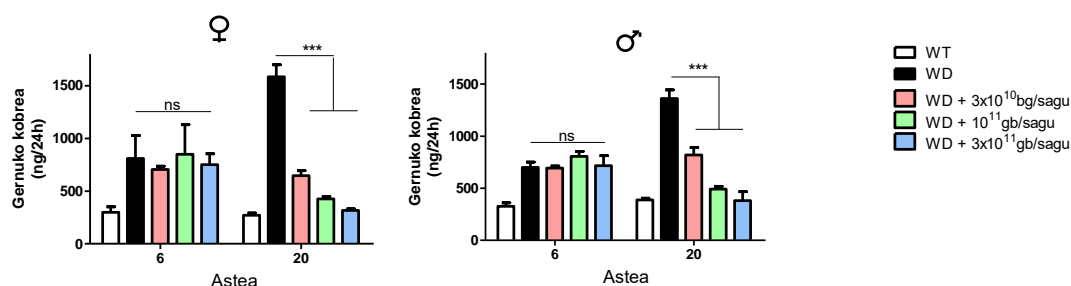
**2. irudia. Gene terapeutikoaren espresioaren analisia WD pairatzen duten saguek AAVanc80-miniATP7B bektorearekin infektatu eta 14 asteetara.** Espresio genikoa GAPDH-ren bitartez normalizatu da. Datuen konparaketarako anova test-a erabili da; ns: ez adierazgarria, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .



### 3.3. Gernuko kobrearen analisia

Gernuko kobrearen analisia, grafito kamara metodo kimiko-analitikoaren bitartez burutu zen. Sagua injektatu eta 4 asteetara (10 aste) gernuko kobrearen kontzentrazioa tratatutako saguetan murriztu zen, dosi dependentzia aurkeztuz (datu ez eskuragarriak). Tendentzia berdina azaldu zen injektatutatik 8 asteetara (15 asteko bizitza denbora) (datu ez eskuragarriak). Esperimentuaren azken neurketan, injektatutatik 14 asteetara (20 aste), WD zuten saguek gernuko kobrean emendapen bat jasan zuten, denboran zeharreko metaketaren ondorio. Trataturakoek aldiz, kobre kantitate gutxiago aurkeztu zuten gernaldosi arteko ezberdintasunak azalduz. Murrizpena estatistikoki adierazgarria izan zen sagu eme zein arretan (3. Irudia).

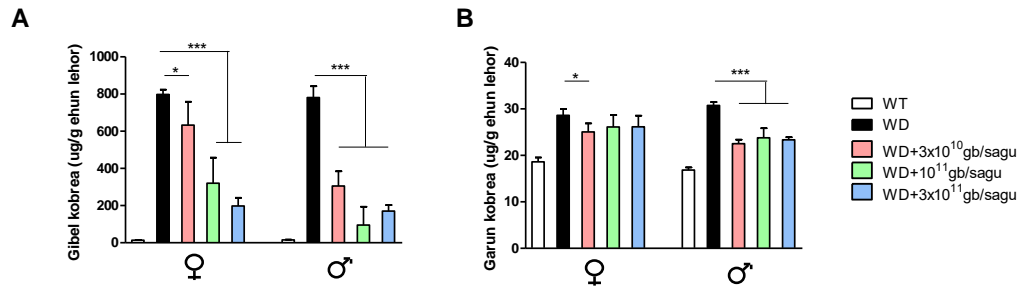
**3. irudia. Gernuko kobrearen neurketa saguak injektatu aurretik (6 aste) eta 14 asteetara (20 aste).** Gene terapeutikoaren espresioa gernuko kobre mailak murriztea eragiten du. Gernuko kobrea ng/24h-ko neurketa dago. Datuak Anova test estatistikoaren bitartez analizatu ziren. Ns: ez adierazgarria, \*\*\*:  $p < 0.001$ .



### 3.4. Kobre metaketa gibelean eta garunean

Organo ezberdinetan egindako kobrearen neurketa, grafito kamara metodo kimiko-analitikoaren bitartez burutu zen. Kobrearen metaketa organo hauetan eta tratatu gabeko WD saguetan progresiboa izan zen (datu ez eskuragarriak). Aldaketarik nabarmenak gibelean eman ziren, dosiaren arabera kobre jaitsiera aztertuz sagu ar zein emeen gibeletan, emaitzak adierazgarriak izanik (4. Irudia A). Garunean, arren kasuan kobre mailak murriztu ziren tratamendurekin, estatistikoki adierazgarriak izanik emaitzak. Emeen kasuan jaisterako tendentzia aurkitu zen, nahiz eta kasu guztietan adierazgarriak ez izan (4. Irudia B).

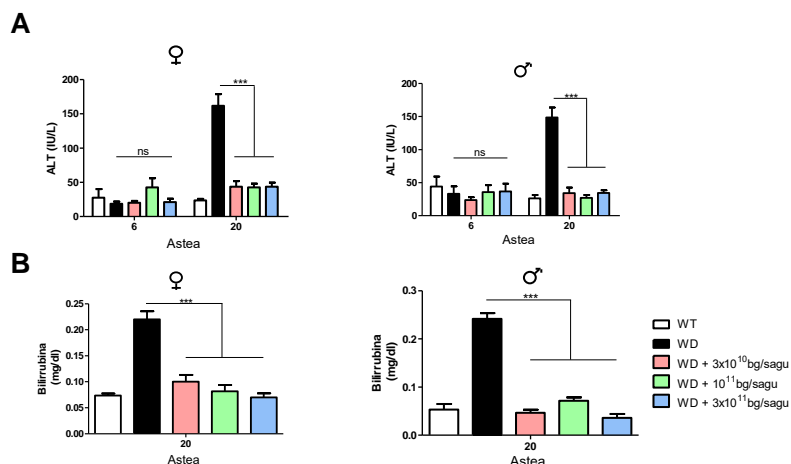
**4. irudia. Kobre neurketak organo ezberdinetan.** Tratamendu dosi guztiek kobre mailak jaitsi zituzten aztertutako organo guztietan. Neurketak ug kobre/g ehun lehor-etan eman ziren. Datuak Anova test estatistikoaren bitartez analizatu ziren. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .



### 3.5. Parametro biokimikoen analisia

Toxikotasunaren azterketarako, serum-eko parametro biokimiko batzuen analisia burutu zen. Horien artean, alanina aminotransferasa (ALT) entzimaren mailak saguak tratatu aurretik aztertzean (6 aste), ez ziren aldaketa adierazgarriak azaldu taldeen artean. Izan ere, kobre metaketaren ondoriozko kalteak 6 asteetatik aurrera antzematen dira sagu eredu honetan. Hala ere 14 aste ondoren, tratamendurik jaso ez zuen taldeak (WD), ALT mailak izugarri emendatuta zituzten. Aldiz, tratatutako taldeen kasuan mailak murriztu ziren bai eme zein arretan (5. Irudia A). Transaminasen igoera gibelesko kalteekin zuzenki erlazionatuta dago, beraz tratamenduak guztiz murrizten du toxikotasunaren ondoriozko kalteak. Bestetik, bilirubinaren aztertzean, azido biliarren sintesiaren markatzailea izanik, neurketak azken puntuak burutu ziren soilik (20 aste). Aztertu daitekeenez, bilirubina mailak murriztazkoak izan ziren tratamendua jaso zuten taldeetan, gibelean funtzioa hobetzen dela adieraziz bai sagu eme zein arretan (5. Irudia B). Toxikotasunari dagokionez, datu hauek zein aztertutako beste parametro batzuen arabera (datuak ez eskuragarri), toxikotasunarik ez dagoela aztertutako talde zein dosien artean aditzera ematen dute.

**5. irudia. Serumeko ALT eta bilirubina mailen neurketa.** Tratamenduak mailak murrizten ditu. Neurketak unitate internacional/ml-ko eta mg/dl-ko eman ziren. Datuak Anova test estatistikoaren bitartez analizatu ziren. Ns: ez adierazgarria, \*\*\*:  $p < 0.001$ .



### 4. Ondorioak

- 1) Anc80 serotipodun AAV bektore biralak efizienteeki infektatzen du WD-dun sagu eme zein arrak eta *miniATP7B* gene terapeutikoaren espresioa infekzio mailen arabera da.
- 2) Sagu eme zein arretan gernuko kobre mailak murriztea lortu da tratamendurekin, baita maila horiek denboran zehar mantendu ere.
- 3) Gibelean eta garunean kobrea progresiboki akumulatuz doa sagu eredu honetan. Tratamenduak aldiz, metaketa murrizten du batez ere gibelean.

- 4) Serum-eko ALT eta bilirrubina mailak murriztu egin dira tratamenduari esker, toxikotasun eza adieraziz eta gibelego egoera hobetuz.

## 5. Etorkizunerako planteamendua

Behin ikusita 6 asteetako WD-dun saguekin tratamenduak funtzionatzen duela, sagu helduago batzuekin probatzea izango litzateke hurrengo pausoa. Izan ere, klinikan diagnostikatzen diren pazienteek jadanik gibelego eta garuneko asaldurak dituzte, kasu batzuetan itzulkorrak ez direnak eta benetan tratamendua behar dutenek paziente huraxek dira. Bestetik ere, toxikotasun azterketa gehiago egin beharko dira bestelako animalia ereduetan (*Macaca fascicularis* adib.) bektorea segurua dela ziurtatzeko. Behin ikusita bektorea segurua dela gizakion gertuko espezieetan, Wilson gaixotasuna pariatzen duten pazienteekin entsegu klinikoa egitea izango litzateke hurrengo pausoa eta bide batez, bestelako gaixotasun monogenikoen sendapenerako ate irekiera.

## 6. Bibliografia

- Cater, M. A., Forbes, J., La Fontaine, S., Cox, D. & Mercer, J. F. B. (2004): *Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites*. *Biochem. J.* 380, 805–813.
- Roberts, E. A. & Schilsky, M. L. (2003): *A practice guideline on Wilson disease*. *Hepatology*. Baltimore, Md 37, 1475–1492
- Bandmann, O., Weiss, K. H. & Kaler, S. G. (2015): *Wilson's disease and other neurological copper disorders*. *Lancet Neurol.* 14, 103–113
- Murillo, O. et al. (2016): *Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy*. *J. Hepatology*. 64, 419–426
- Lutsenko S. (2008): *Atp7b<sup>-/-</sup> mice as a model for studies of Wilson's disease*. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1233–1238
- Lundstrom K. (2018): *Viral Vectors in Gene Therapy*. *Diseases* 6
- Greig, J. A. et al. (2017): *Characterization of Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Human Factor VIII Gene Therapy in Hemophilia A Mice*. *Hum. Gene Ther.* 28, 392–402
- Chamberlain, K., Riyad, J. M. & Weber, T. (2016): *Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids*. *Hum. Gene Ther. Methods* 27, 1–12
- Yu, C. H., Dolgova, N. V. & Dmitriev, O. Y. (2017): *Dynamics of the metal binding domains and regulation of the human copper transporters ATP7B and ATP7A*. *IUBMB Life* 69, 226–235
- Patil, M., Sheth, K. A., Krishnamurthy, A. C. & Devarbhavi, H. (2013): *A Review and Current Perspective on Wilson Disease*. *J. Clin. Exp. Hepatology*. 3, 321–336

## 7. Eskerrak

Benetako eskerrak lan honetan parte hartu duten guztiei eskeinitako denboragatik.