



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

L'EVOLUZIONE DEL GENE ABCC6, DAI PESCI AGLI UMANI

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

CANDIDATO

- MATTEO VERCELLI

RELATORE

- DOTT. MARCO BARUCCA

Riassunto

Il gene **ABCC6** è un gene importante nella regolazione dei livelli di calcio ed interviene nello sviluppo dello scheletro osseo. Il gene codifica per una proteina trasportatrice di membrana, associata alla resistenza multifarmaco, chiamata **MRP6** e questa è coinvolta nella regolazione della calcificazione nei tessuti dei vertebrati. Le mutazioni del gene causano disturbi della mineralizzazione.

Per approfondire le conoscenze sull'evoluzione del gene è stata fatta un'analisi comparativa non solo del gene **ABCC6**, ma anche di altri due membri della stessa famiglia, **ABCC1** e **ABCC2**, studiando le relazioni in diversi vertebrati. Quindi è stato analizzato il coinvolgimento di **ABCC6** e **ABCC1** nella rigenerazione delle squame nella pelle dei pesci con il risultato che i due geni intervengono direttamente nella mineralizzazione.

Dall'analisi dei diversi genomi di diversi vertebrati il gene **ABCC6** era presente negli organismi dai pesci teleostei fino agli umani, mentre era assente negli agnati e negli invertebrati.

Sono state individuate le mutazioni aminoacidiche della **MRP6** umano che causano **PXE** e si è visto che nei pesci esse non hanno un effetto negativo.

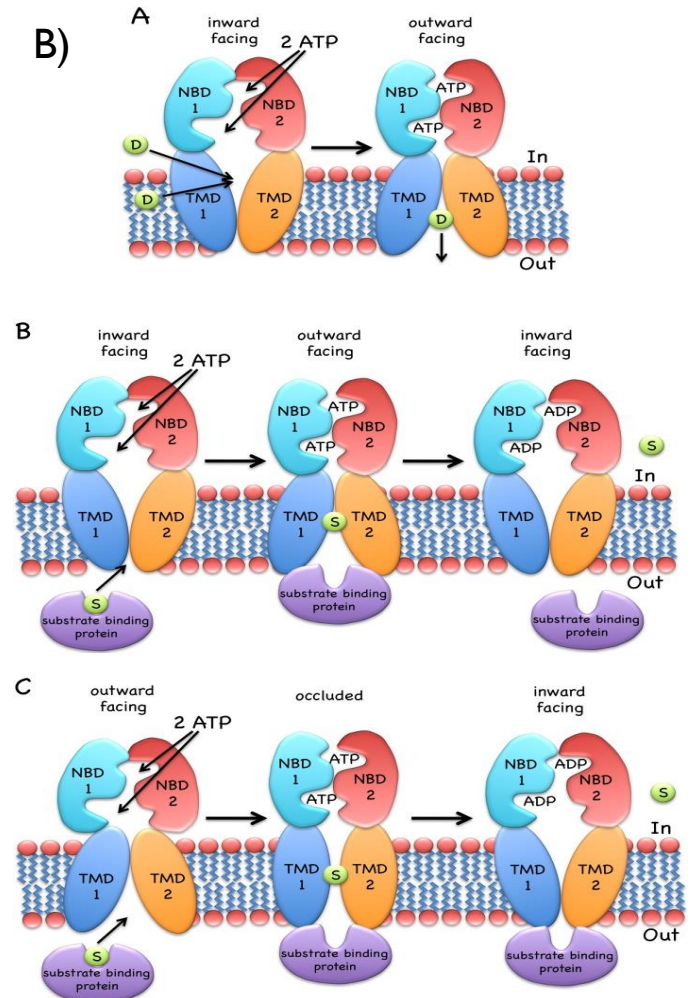
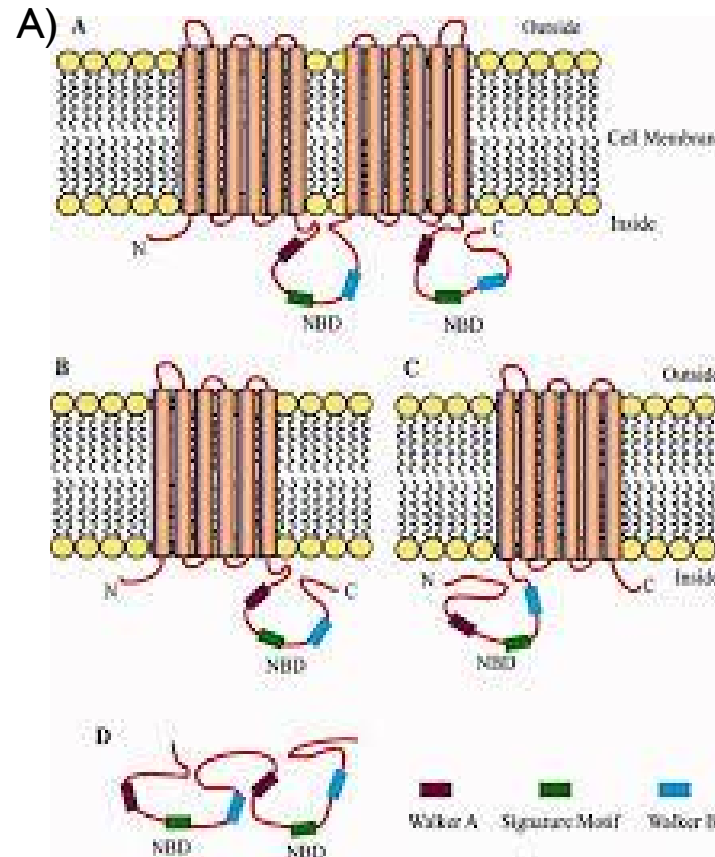
La famiglia dei geni ABC

- I trasportatori ATP-Binding Cassette sono una grande famiglia di proteine trasportatrici
- Traslocazione attraverso i compartimenti cellulari, con un meccanismo ancora poco conosciuto
- Caratterizzati da quattro domini core: due domini transmembrana (TMD) e due domini di legame nucleotidico (NBD)
- Gli NBD contengono ciascuno tre domini conservati: il Walker A, il Walker B e un motivo di firma

A) Struttura del trasportatore ABC. Ogni dominio NBD contiene un sito di legame al fosfato (Walker A), un sito di legame al magnesio (Walker B) e un motivo di firma (LSGGQ).

ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation Ge Li, Hong-Mei Gu, Da-Wei Zhang. IUBMB, 2013.

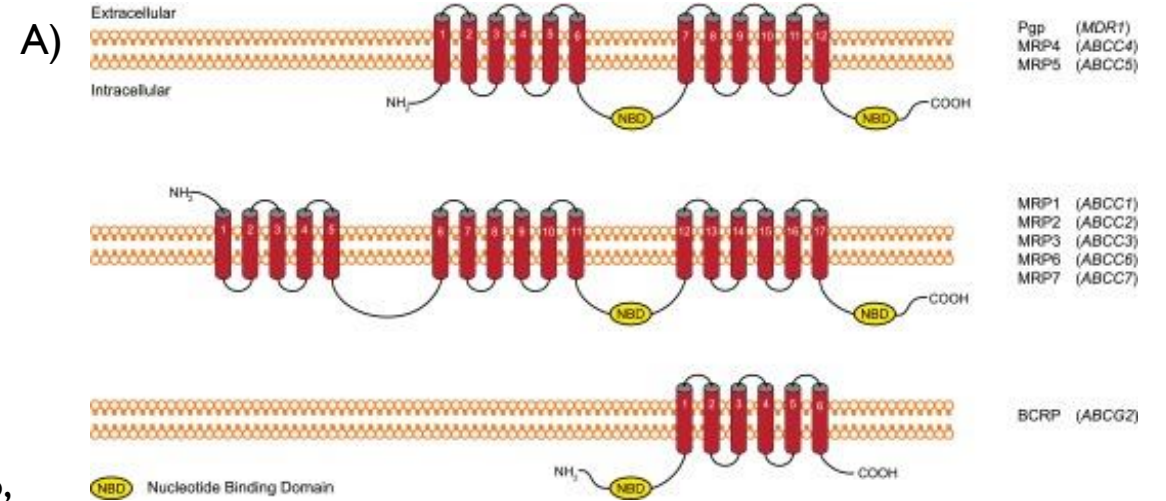
B) Meccanismi di esportazione e importazione di ABC. Structure and mechanism of ABC transporters Stephan Wilkens. 2015.



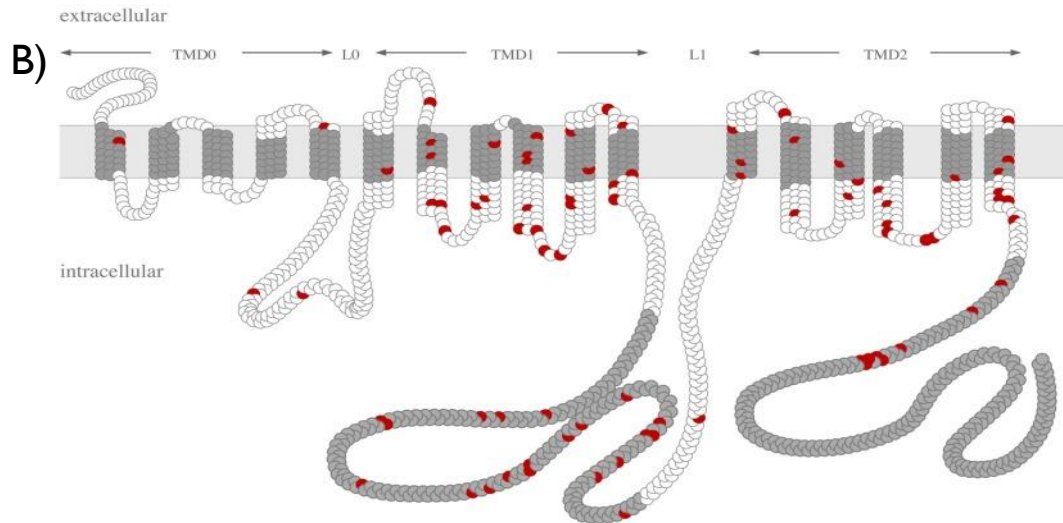
Nell'uomo sono presenti 49 membri di ABC, divisi in sette sottogruppi. Il sottogruppo ABCC codifica per proteine associate alla resistenza multifarmaco (MRP).



Importante è il gene ABCC6, codificante MRP6, che nell'uomo impedisce la calcificazione di tessuti molli.



A) Strutture delle diverse proteine ABCC. Drug Transporters and Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory Factor PSD-95/Drosophila Discs Large/ZO-1 Proteins. Dustin R. Walsh, Thomas D. Nolin, and Peter A. Friedman corresponding author Paul A. Insel. 2015.

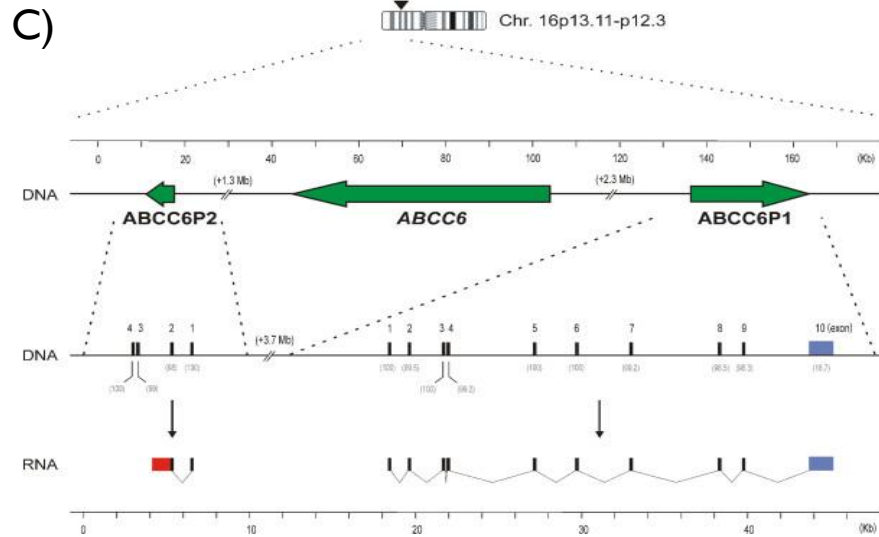
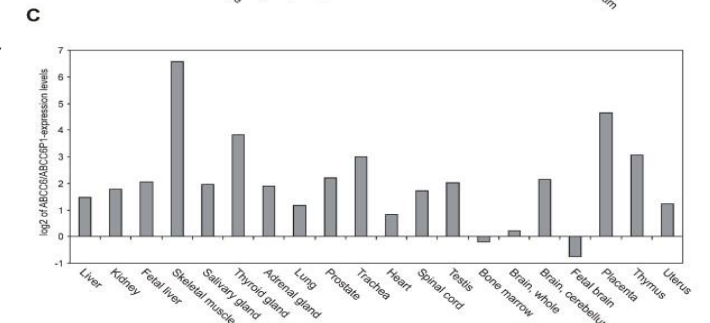
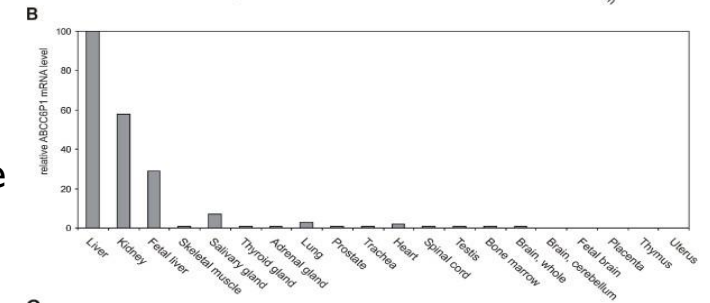
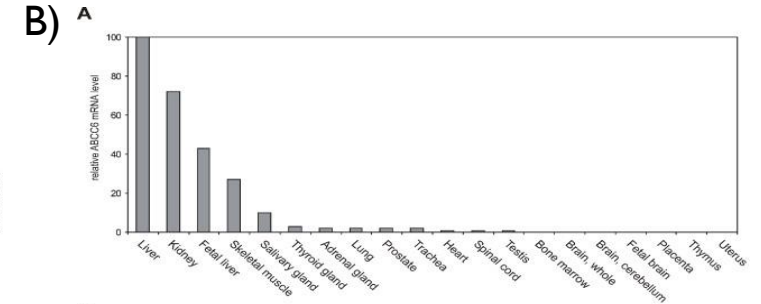
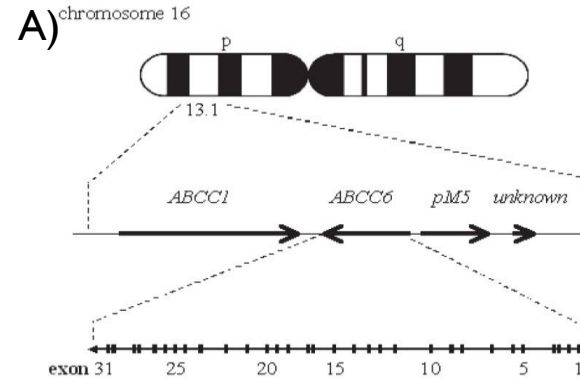


B) In rosso: principali siti di mutazioni missenso che portano all'insorgenza di PXE. The ABCC6 Transporter: A New Player in Biomineralization. Favre G, Laurain A, Aranyi T, Szeri F, Fulop K, Le Saux O, Duranton C, Kauffenstein G, Martin L, Lefthérotis G. Int J Mol Sci. 2017.

Mutazioni che inattivano ABCC6 causano Pseudoxanthoma Elasticum (PXE), una malattia rara autosomica che provoca calcificazione anomala di tessuti molli.

ABCC6 nell'uomo

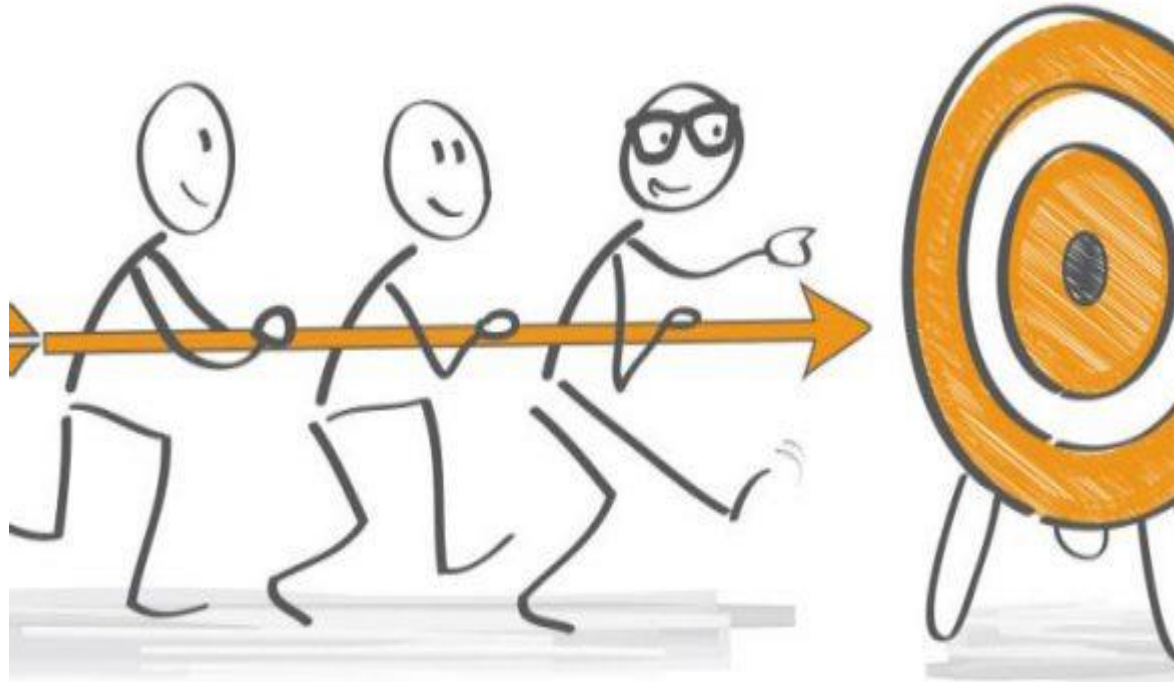
- Lo studio «Persistenza del gene ABCC6 e la comparsa dello scheletro osseo negli umani» ha analizzato la struttura e le caratteristiche di questo gene
- ABCC6 si trova sul cromosoma umano 16, è composto da 31 esoni e si estende per 74,56kb
- È posto tra i suoi due pseudogeni ABCC6P1 e ABCC6P2, entrambi nati da duplicazioni segmentali, essi sono quasi identici (somiglianza del 95%) e vanno a regolare l'espressione del gene funzionale



- Il gene è espresso principalmente nel fegato e poi da qui trasportato
- Omologhi del gene trovati anche in pesci teleostei con stesso numero di esoni e stessa struttura genica
- Nei pesci però *abcc6* è espresso solo nei tessuti coinvolti nella mineralizzazione, non viene trasportato dal fegato

A) ABCC6 Mutation in Patients with Angioid Streaks. Mizutani YI, Nakayama T, Asai S, Shimada H, Yuzawa M. 2006.

B-C) The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference. Piehler API, Hellum M, Wenzel JJ, Kaminski E, Haug KB, Kierulf P, Kaminski WE. 2008.



Obiettivi

- Approfondire l'evoluzione e il coinvolgimento nella calcificazione dei tessuti del gene
- Fare un'analisi comparativa del gene *ABCC6* dei vertebrati
- Analizzare il coinvolgimento di *ABCC6* e *ABCC1* nella rigenerazione delle squame nella pelle dei pesci
- Tracciare l'origine evolutiva del gene

I genomi di vertebrati sono stati analizzati per trovare gli omologhi dei geni umani ABCC6, ABCC1 e ABCC3



Grazie all'algoritmo BLAST, cercati diversi rappresentanti vertebrati di diverse classi (uomo, gorilla, topo, pollo, lucertola, luccio, pesce zebra, lampreda...)



Usando il programma ClustalW sono state allineate le proteine MRP6, per mappare gli amminoacidi mutati responsabili di PXE, e le sequenze nucleotidiche dei geni per valutare la somiglianza tra geni omologhi



Gli allineamenti di sequenza dei tre geni utilizzati come input per costruire l'albero filogenetico Bayesian inference (BI) e l'albero Maximum Likelihood (ML)

```

A) Human -----MVHLTPPEEKSAVTALWGKVN--VDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLST 51
Horse -----VQLSGEEKAAVLALWDKVN--EEVVGGEALGRLLVVYPWTQRFFDSFGDLSN 50
Homo -----MVLSPADKTNVKAANGKVGAGHAGEYGAEALERMFSLFPTTKTYFPHF-DLS- 50
Equis -----MVLSAADKTNVKAAWSKVGGHAGEYGAEALERMFLGFPTTKTYFPHF-DLS- 50
Petma PIVDTGSVAPLSAAEKTKIRSAWAPVYSTYETSGVDILVKFFTSTPAAQEFFPKFKGLTT 60
Phyca -----VLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETLEKFDKFKHLKT 51
Lupin -----GALTESQAALVKSSWEEFNANIPKHTRFFILVLEIAPAAKDLFSFLKGTSE 52
          *:  :  :  *  .          :  .:  *  :  *  :  .

Human PDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLDN-----LKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRL 106
Horse PGAVMGNPKVKAHGKKVLHSGEGVHHLDN-----LKGTFAAALSELHCDKLHVDPENFRL 105
Homo  ----HGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDD-----MPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKL 101
Equis ----HGSAQVKAHGKKVGDALTLAVGHLDD-----LPGALSNLSDLHAHKLRVDPVNFKL 101
Petma ADQLKKSADVRWHAERIINAVNDAVASMDDT--EKMSMKLRDLGKHAKSFQVDPQYFKV 118
Phyca EAEMKASEDLKKHGVTVLTALGAILKKKGH----HEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEF 106
Lupin VP--QNNPELQAHAGKVFKLVEAAIQLVTVVVVTDATLKNLGSVHVSKG-VADAHFPV 109
          . .:: *. : .          :  *. * . :  : .
    
```

A) Esempio di allineamento di sequenza con ClustalW.

Inoltre si è studiato il ruolo dei geni *abcc1* e *abcc6* nella rigenerazione delle squame della pelle di orata



Orate anestetizzate e poi rimozione delle squame solo dal fianco sinistro



A 0, 5, 10 e 28 giorni raccolta di campioni di pelle intatta (fianco destro) e danneggiata (fianco sinistro)



Preparazione di primer specifici per geni *abcc6* e *abcc1* di orata



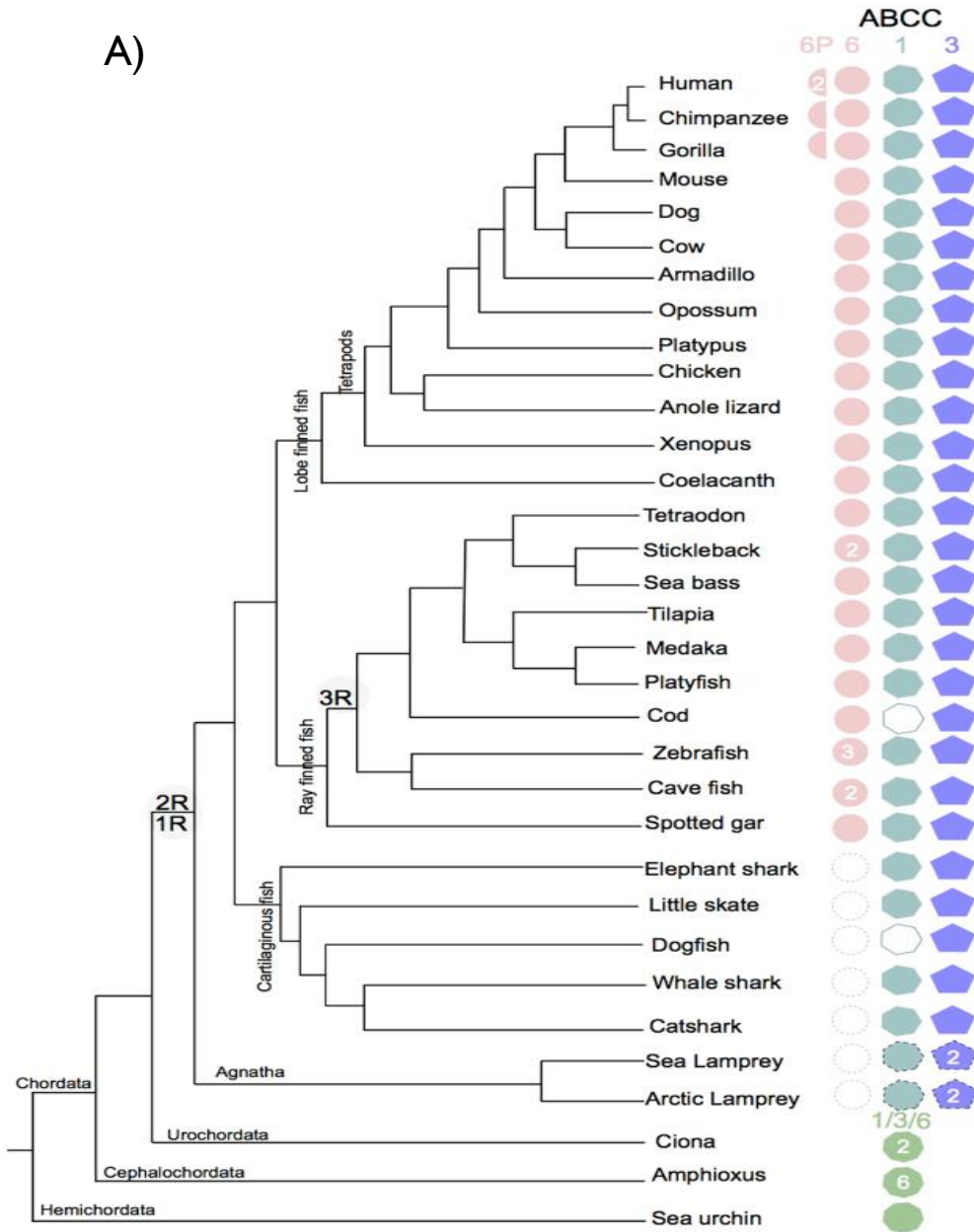
Analisi preliminare dell'espressione dei geni, usando DNA di ossa e pelle, mediante PCR con termociclo di 95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec ciclato 40 volte con estensione finale a 72°C per 5 min



I prodotti di PCR sequenziati per confermare la loro identità



Analisi per valutare il coinvolgimento dei geni nella rigenerazione delle squame, usando pelle sia danneggiata che intatta, mediante qPCR con sistema di rilevamento in tempo reale



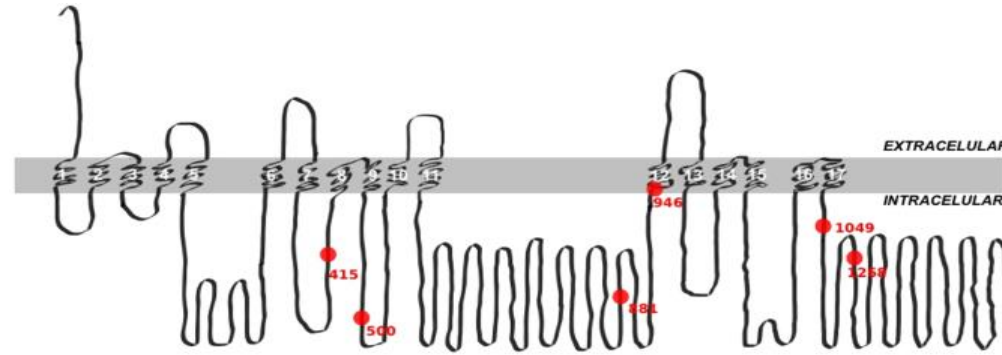
A) Dendrogramma che rappresenta i geni ABCC6, ABCC1 e ABCC3 identificati in diverse specie di animali. I simboli non colorati indicano che il gene non è stato identificato e i cerchi a metà rappresentano gli pseudogeni.

Risultati

- Omologhi del gene ABCC6 umano trovati in tutti i genomi dai teleostei, assenti negli agnati
- Nei teleostei identificati più di un gene ABCC6
- Pseudogeni trovati solo in primati
- ABCC1 e ABCC3 correlati a ABCC6 perché sono simili e perché nel genoma ABCC1 si trova vicino ad ABCC6

- Dall'allineamento delle sequenze aminoacidiche delle proteine MRP6 si sono osservate diverse regioni altamente conservate (es. uomo e pollo identità del 52%)
- Identificate 138 mutazioni missenso associate alla malattia PXE, la maggior parte all'interno della regione citoplasmatica della proteina
- Dal confronto delle posizioni degli aminoacidi con quelli degli omologhi vertebrati si è osservato che le posizioni in cui si verificano le mutazioni sono ben conservate
- Inoltre nei pesci si trovano posizioni in cui normalmente gli aminoacidi corrispondono agli aminoacidi mutati nella proteina umana

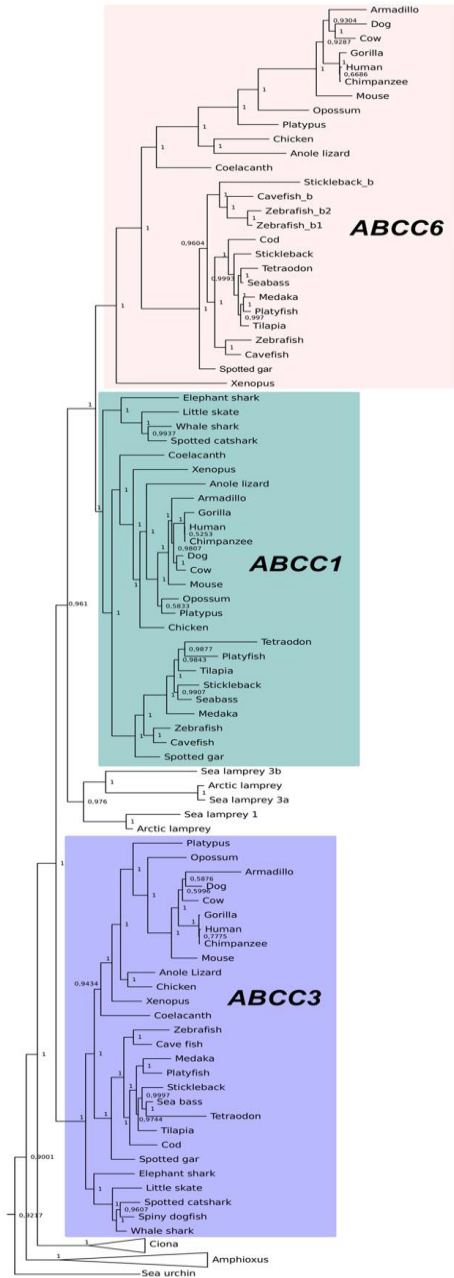
A)



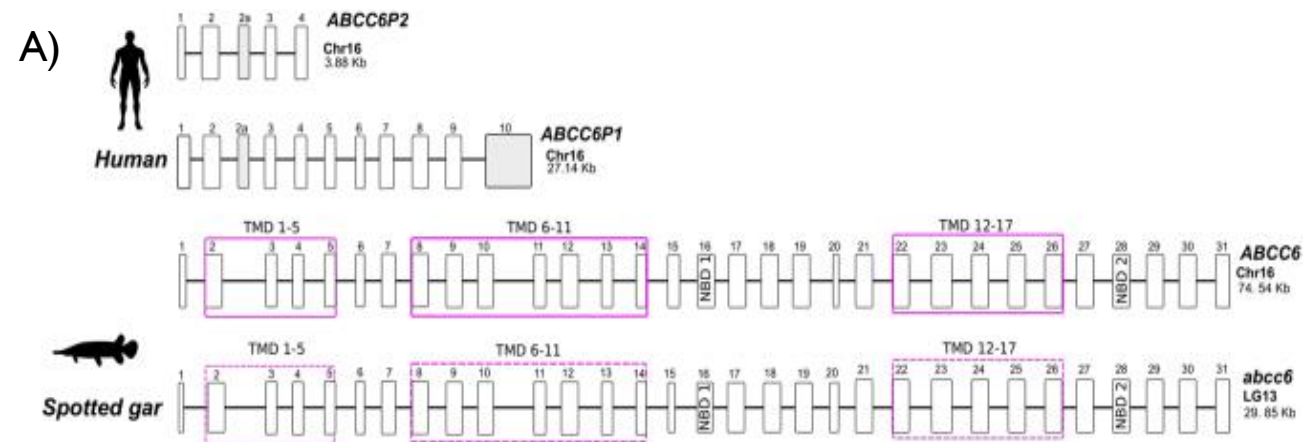
	CTD			TMD	CTD	
aa position	415	500	881	946	1049	1268
Codon change	GTG GCG	ACC CCC	AGG AGT	CTC ATC	TCC GCC	CGG CAG
Variation in PXE	A	I	S	I	A	Q
Mammal						
Human	V	T	R	L	S	R
Chimpanzee	V	T	R	L	S	R
Gorilla	V	T	R	L	S	R
Mouse	V	T	G	L	S	R
Dog	V	M	E	L	S	R
Cow	V	T	G	L	S	R
Armadillo	V	L	G	L	S	R
Opossum	V	I	-	I	S	R
Platypus	V	I	S	G	S	R
Bird/Reptile/Amphibia						
Chicken	V	V	-	L	S	R
Anole lizard	V	T	S	A	S	R
Xenopus	T	V	-	Y	A	Q
Fish						
Coelacanth	V	V	T	L	S	R
Tetraodon	A	I	-	I	A	Q
Stickleback_a	A	I	S	I	S	E
Stickleback_b	A	I	N	I	S	Q
Sea bass	A	I	S	I	A	Q
Tilapia	A	I	S	I	A	Q
Medaka	A	I	S	I	V	Q
Platyfish	A	I	S	I	A	Q
Cod	A	I	E	L	A	Q
Zebrafish_a	A	I	S	L	A	Q
Zebrafish_b1	A	I	-	F	S	Q
Zebrafish_b2	-	-	S	L	S	Q
Blind cave fish_a	A	I	S	L	A	Q
Blind cave fish_b	A	I	S	L	S	Q
Spotted gar	A	I	S	L	S	R

TMD: Transmembrane domain; CTD: Cytoplasmic domain

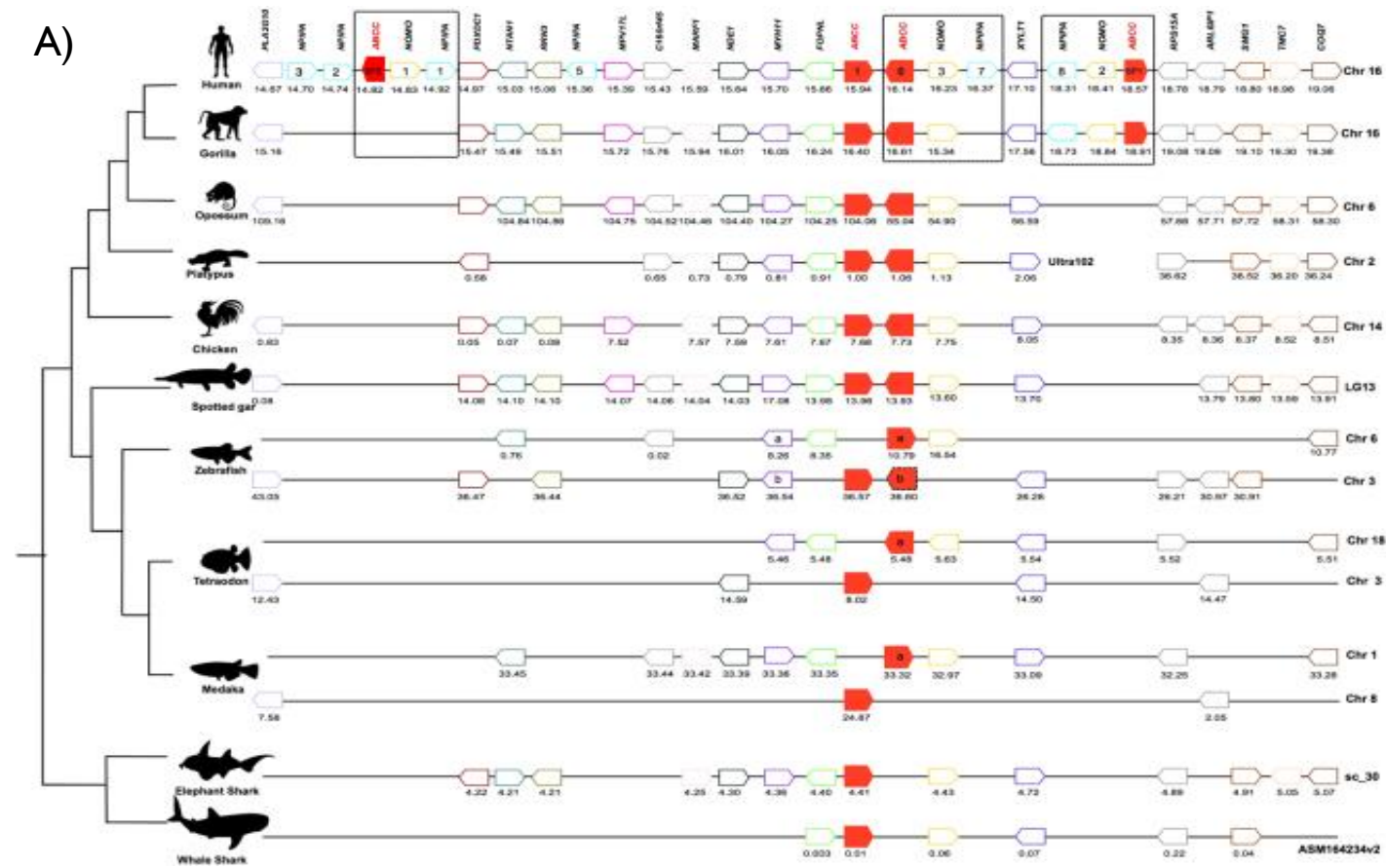
A) In rosso: le posizioni degli aminoacidi che causano PXE e che sono comuni in altri vertebrati.



- Gli alberi filogenetici mostrano che i geni si raggruppano in modo indipendente ma che condividono la discendenza
- Inoltre si nota che ABCC3 differisce prima di ABCC1 e ABCC6 che invece sono sorti da un evento di duplicazione genica successivo
- Nello spinarello presenti due geni *abcc6* (*abcc6a* e *abcc6b*) nati dalla duplicazione del genoma; nel pesce zebra c'è anche un terzo gene (*abcc6a*, *abcc6b1* e *abcc6b2*) risultato di una duplicazione di *abcc6b*
- Struttura genica di ABCC6 umano e di luccio sono identiche (stesso numero di esoni e stessi motivi proteici)

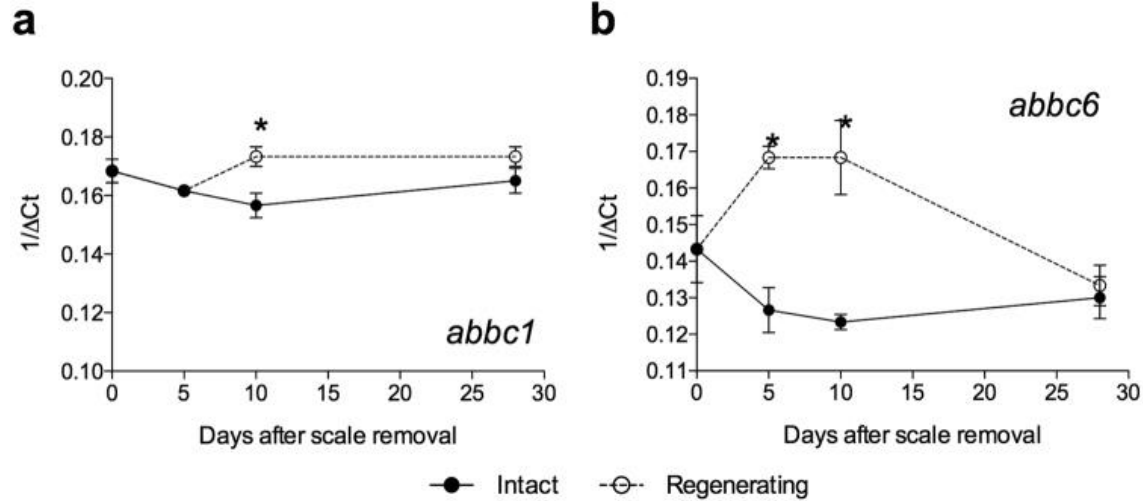


A) Confronto tra ABCC6 umano e di luccio macchiato. Le caselle indicano gli esoni numerati, mentre la linea indica i tratti di introni.



A) In rosso: posizioni dei geni ABCC6 (e dei suoi pseudogeni) e ABCC1. Le caselle colorate rappresentano i geni vicini.

Dall'analisi dell'ambiente genico di ABCC6, confrontato con quello degli altri vertebrati, è emerso che ci sono altri 18 geni fiancheggiati ABCC6 conservati, con alcune differenze (es. i due pseudogeni presenti nell'uomo derivati da duplicazione segmentale; eliminazione del gene nei pesci cartilaginei).



Nella rigenerazione della pelle d'orata espressi sia *abcc6* che *abcc1*. Alla fine dei 28 giorni le squame del fianco danneggiato erano come quelle del lato intatto.

Abcc1: al giorno 10 dopo la rimozione aumento dell'espressione nella pelle rigenerante.

Abcc6: aumento dell'espressione al giorno 5 e 10 nella pelle rigenerante

Discussione

- Dallo studio è emerso che i geni *ABCC6* umani e di altri vertebrati condividono origini comuni. I tetrapodi e i teleostei presentano un singolo gene (tranne in spinarello e pesce zebra); durante la radiazione dei vertebrati ci sono stati eventi di duplicazione ed eliminazione che hanno modellato il genoma.
- Identificate comuni posizioni di mutazioni che portano all'insorgenza di PXE, ma non nei pesci.
- L'analisi evolutiva filogenetica ha mostrato una comune origine ancestrale tra *ABCC6*, *ABCC1* e *ABCC3* prima della radiazione dei vertebrati. Una duplicazione del genoma avvenuta all'inizio della comparsa dei vertebrati ha originato i geni *ABCC3* e *ABCC1/6*, poi una successiva duplicazione ha dato origine a *ABCC1* e *ABCC6*. A conferma di ciò è stato analizzato anche il gene *ABCC2* ed è risultato che esso divergeva prima di *ABCC1/3/6*.
- I due pseudogeni nell'uomo, trovati anche in altri primati, suggerisce che essi si sono formati recentemente, durante l'evoluzione che ha portato ai primati.
- Nell'esperimento di rigenerazione delle squame di orata si è visto che *abcc6* e *abcc1* erano up-regolati rispetto alla pelle non danneggiata e questo aumento di espressione coincideva con il periodo di crescita e mineralizzazione delle squame; ciò evidenzia il ruolo del gene nella regolazione dei livelli di calcio.

Conclusioni

- Da questo studio è stato possibile ottenere una panoramica sul gene *ABCC6* e sulla sua storia evolutiva confrontandolo con i genomi di altri vertebrati.
- Si è capito che *ABCC6*, come altri membri della sua famiglia, intervengono nella formazione dello scheletro osseo, ma resta ancora da comprendere il suo meccanismo d'azione.
- I geni *ABCC6* e *ABCCI* hanno un ruolo importante all'interno dell'evoluzione perché, grazie a eventi di duplicazione ed eliminazione di tratti del genoma, si è arrivati alla formazione della struttura scheletrica umana che ha permesso lo sviluppo dei primati.

Referenze

- Persistence of the ABCC6 genes and the emergence of the bony skeleton in vertebrates. Bruna Parreira, João C. R. Cardoso, Rita Costa, Ana Rita Couto, Jácome Bruges-Armas & Deborah M. Power. Scientific Reports volume 8, Article number: 6027 (2018)
- The ABCC6 Transporter: A New Player in Biomineralization. Favre G, Laurain A, Aranyi T, Szeri F, Fulop K, Le Saux O, Durantou C, Kauffenstein G, Martin L, Lefthériotis G. Int J Mol Sci. 2017 Sep 11;18(9). pii: E1941. doi:10.3390/ijms18091941.
- Drug Transporters and Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory Factor PSD-95/Drosophila Discs Large/ZO-1 Proteins. Dustin R. Walsh, Thomas D. Nolin, and Peter A. Friedman corresponding author Paul A. Insel, ASSOCIATE EDITOR Pharmacol Rev. 2015 Jul; 67(3): 656–680. Published online 2015 Jul. doi: 10.1124/pr.115.010728
- ABCC6 Mutation in Patients with Angioid Streaks. Mizutani YI, Nakayama T, Asai S, Shimada H, Yuzawa M. Int J Biomed Sci. 2006 Feb;2(1):7-12.
- The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference. Piehler AP, Høllum M, Wenzel JJ, Kaminski E, Haug KB, Kierulf P, Kaminski WE. BMC Genomics. 2008 Apr 11;9:165. doi: 10.1186/1471-2164-9-165.
- Structure and mechanism of ABC transporters. Stephan Wilkens F1000Prime Rep. 2015; 7: 14. Published online 2015 Feb 3. doi: 10.12703/P7-14
- ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation Ge Li, Hong-Mei Gu, Da-Wei Zhang. IUBMB Life Volume 65, Issue 6, pages 505-512, 23 AUG 2013 DOI: 10.1002/iub.1165