

Poster P.16.111

ENZYMATIC PHENOTYPE AND RESPONSE TO VITAMIN B6 OF ORNITHINE AMINOTRANSFERASE VARIANTS ASSOCIATED WITH GYRATE ATROPHY OF THE CHOROID AND RETINA

Montioli R.*^[1], Sgaravizzi G.^[4], Desbats M.^[2], Grottelli S.G.^[4], Paiardini A.P.^[3], Giardina G.^[3], Zanzoni S.^[5], Cutruzzolà F.^[3], Borri Voltattorni C.^[1], Salviati L.S.^[2], Cellini B.^[4]

^[1]Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, Section of Biological Chemistry, University of Verona ~ Verona ~ Italy, ^[2]Clinical Genetics Unit, Department of Woman and Child Health ~ Padova ~ Italy, ^[3]Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli", Sapienza University of Rome ~ Rome ~ Italy, ^[4]Department of Experimental Medicine, University of Perugia ~ Perugia ~ Italy, ^[5]Centro Piattaforme Tecnologiche, University of Verona ~ Verona ~ Italy

Human ornithine aminotransferase (OAT) is a pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent mitochondrial enzyme that catalyzes the α -transamination of L-ornithine to glutamate semialdehyde with the concomitant conversion of α -ketoglutarate to L-glutamate (1). Mutations of the OAT gene cause gyrate atrophy of the choroid and retina (GA), a condition characterized by the degeneration of retinal epithelium cells leading to blindness in the fifth decade of life (2). Herein, we investigated the consequences of selected missense mutations present in homozygous patients and involving residues spread over the enzyme structure. By analyzing the biochemical properties of the purified enzymes we distinguished variants with a mere or predominant catalytic defect (R180T, P199Q, G237D, R154L), from those retaining significant catalytic efficiency but showing a structural defect (Q90E, R271K, E318K, C394Y). Among the first group, we performed a detailed structural, spectroscopic and kinetic analysis of the R180T variant. We found that the variant shares a similar overall conformation with wild-type OAT, with slight structural alterations at the active site and at the dimeric interface, consistent with the increased Km for L-ornithine and altered PLP binding mode and affinity. R180T also exhibits a remarkable loss of catalytic activity, probably due to an improper collocation of L-ornithine that undergoes not only an α -transamination, but also a β -transamination reaction (3).

Hence, we expressed variants endowed with significant catalytic activity but showing structural defects in a cellular model of GA consisting of HEK293 cells knocked-out for the OAT gene (4). We observed distinct behaviors. Q90E and R271K showed a strongly reduced specific activity and expression level, probably due to an increased susceptibility to intracellular degradation, while the E318K mutation did not significantly affect activity and expression level in cells, but produced a protein prone to aggregation. Finally, C394Y retained >50% of the wild-type expression level, but showed a reduced activity, due to a substrate-inhibition phenomenon. Upon culturing cells in the presence of pyridoxine (PN), a precursor of PLP employed as pharmacological treatment, only the Q90E variant was slightly responsive, as shown by a statistically significant increase of transaminase activity. Overall, the data allowed us to (i) unravel the variety of enzymatic phenotypes associated with the disease and (ii) suggest the responsiveness to PN of patients bearing the examined mutations.

L'ornitina aminotransferasi umana (OAT) è un enzima mitocondriale dipendente dal piridossal-5'-fosfato (PLP) (un derivato della Vitamina B6) che catalizza una reazione importante per il catabolismo dell'ornitina (1). Mutazioni del gene OAT causano atrofia girata della coroide e della retina (GA), una malattia rara che ha come sintomo principale la degenerazione delle cellule dell'epitelio della retina e che porta a progressiva perdita della vista fino alla cecità intorno ai 50 anni (2). Le terapie disponibili per pazienti affetti da GA sono limitate al consumo di una dieta che riduca la produzione di ornitina, o alla somministrazione di Vitamina B6. Tuttavia, sono stati poco studiati gli effetti delle mutazioni su

OAT e la possibile risposta delle forme mutate alla Vitamina B6. Nel corso del nostro progetto abbiamo studiato le conseguenze di alcune mutazioni missenso presenti in pazienti omozigoti mediante una duplice strategia basata su analisi di mutanti in forma purificata e su un modello cellulare di malattia. Analizzando le proprietà biochimiche degli enzimi mutanti abbiamo distinto quelle con un difetto funzionale (R180T, P199Q, G237D, R154L), da quelle che conservano una significativa capacità di compiere la reazione di transaminazione ma mostrano un difetto strutturale (Q90E, R271K, E318K, C394Y). All'interno del primo gruppo, abbiamo eseguito un'analisi dettagliata della variante R180T e abbiamo scoperto che tale variante non presenta grosse alterazioni conformazionali rispetto all'OAT wild-type, ma possiede un sito di legame dell'ornitina lievemente alterato. Tali alterazioni non permettono di legare l'ornitina in modo corretto, né di far procedere la reazione ad una velocità sufficiente (3).

Le varianti appartenenti al secondo gruppo invece sono state studiate in un modello cellulare di GA (4) e abbiamo osservato comportamenti variegati. Due varianti (Q90E e R271K) sono presenti a livelli fortemente ridotti nella cellula, probabilmente perché sono più suscettibili a degradazione. La mutazione E318K invece rende la proteina soggetta all'aggregazione. Infine, la variante C394Y è presente a livelli elevati ma mostra un'attività ridotta, a causa di un difetto funzionale. Quando abbiamo cresciuto le cellule in presenza di Vitamina B6, abbiamo osservato una limitata risposta solo per la variante Q90E. Nel complesso, i dati ci hanno permesso di (i) conoscere la varietà di fenotipi enzimatici associati alla malattia e (ii) avere indicazioni sulla possibile risposta alla Vitamina B6 dei pazienti portatori delle mutazioni esaminate.

- 1) Montioli R. et al. (2017) Protein J., 36(3):174-185.
- 2) Ginguay A. et al. (2017) Biology, 6(1), 18
- 3) Montioli R. et al. (2019) FEBS J., 286(14):2787-2798.
- 4) Montioli R. et al. (2018) BBA Mol Bas Dis 1864(11):3629-3638

Atrofia girata della coroide e della retina

Coordinator: Barbara Cellini

Partner: Leonardo Salviati

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

GPP15114

Disease Name:

Gyrate Atrophy of the Choroid and Retina

Keywords:

Gyrate atrophy, Vitamin B6, Molecular defects