

**Dottorato in Scienze Biotecnologiche
XVIII Ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università degli Studi di Napoli Federico II**

**IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE
FUNZIONALE DI MUTAZIONI DEL GENE RYR1
ASSOCIATE ALL'IPERTERMIA MALIGNA**

Alberto Zullo

Dottorando: Alberto Zullo
Relatore: Prof. Antonella Carsana
Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

INDICE

Riassunto breve	pag. 3
Short Summary	pag. 4
Riassunto	pag. 4
Summary	pag. 7
1. Introduzione	pag. 9
1.1 Ipertermia Maligna	pag. 9
1.2 Test per determinare la suscettibilità all'MH	pag. 11
1.3 Malattie associate all'ipertermia maligna	pag. 13
1.3.1 Central Core Disease (CCD)	pag. 13
1.3.2 Multiminicore Disease (MmD)	pag. 14
1.4 Fisiologia del muscolo scheletrico	pag. 14
1.5 Genetica dell'ipertermia maligna	pag. 18
1.6 RYR1	pag. 20
1.6.1 Famiglia genica di RYR	pag. 24
1.6.2 Regolazione di RyR1	pag. 25
1.7 DHPR	pag. 27
1.8 Interazione di RyR1 con DHPR	pag. 28
1.9 Proteine accessorie della triade giunzionale	pag. 29
1.10 Contributo delle indagini alla diagnosi di suscettibilità all'ipertermia maligna	pag. 32
1.11 Saggi funzionali sui canali RyR1 mutati	pag. 33
2. Materiali e metodi	pag. 35
2.1 Iter sperimentale	pag. 35
2.2 Pazienti	pag. 36
2.3 Estrazione del DNA gnomico umano	pag. 36
2.4 PCR	pag. 37
2.5 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio	pag. 44
2.6 DHPLC	pag. 44
2.7 Analisi di sequenze del DNA	pag. 47
2.8 Immortalizzazione dei linfociti B umani	pag. 47
2.8.1 Estrazione di linfociti B da sangue periferico	pag. 48
2.8.2 Colture virali da cellule B95-8	pag. 49

2.8.3	Infezione e stabilizzazione dei linfociti B	pag. 49
2.8.4	Isolamento del clone cellulare	pag. 50
2.9	Cytosensor	pag. 50
2.9.1	Premesse biologiche	pag. 50
2.9.2	Sistema microfisiometrico	pag. 53
2.10	Procedura di stimolazione dei linfociti B Immortalizzati	pag. 57
2.10.1	Reagenti utilizzati	pag. 57
2.10.2	Preparazione delle cellule	pag. 58
2.10.3	Inizio dell'esperimento con l'impostazione del Programma "cytoSoft"	pag. 58
3.	Scopo della tesi	pag. 59
4.	Risultati	pag. 61
4.1	Caratterizzazione delle mutazioni	pag. 62
4.1.1	MUTAZIONE Arg530His	pag. 62
4.1.2	MUTAZIONE Arg2163Pro	pag. 65
4.1.3	MUTAZIONE Val2212Asp	pag. 66
4.1.4	MUTAZIONE Asn2342Ser	pag. 68
4.1.5	MUTAZIONE Glu2371Gly	pag. 70
4.1.6	MUTAZIONE Arg2454His	pag. 71
4.1.7	MUTAZIONE Cys4659Arg	pag. 72
4.2	Caratterizzazione funzionale delle mutazioni	pag. 75
4.2.1	MUTAZIONE Arg530His	pag. 76
4.2.2	MUTAZIONE Arg2163Pro	pag. 78
4.2.3	MUTAZIONE Asn2342Ser	pag. 79
4.2.4	MUTAZIONE Arg2454His	pag. 81
4.2.5	MUTAZIONE Cys4659Arg	pag. 83
4.2.6	INIBIZIONE CON IL DANTROLENE	pag. 85
5.	Discussione	pag. 90
	Bibliografia	pag.

Riassunto breve

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la ricerca delle mutazioni nel gene RYR1, associate all'ipertermia Maligna (MH) e la loro caratterizzazione strutturale e funzionale (mediante saggi *in vitro*). L'MH è una malattia farmacogenetica con trasmissione autosomica dominante, causata da un'alterata regolazione del Ca^{2+} intracellulare, e si manifesta come crisi ipermetabolica potenzialmente letale in seguito alla somministrazione di anestetici e/o miorilassanti depolarizzanti. L'MH presenta elevata eterogeneità genetica; infatti sono stati identificati 6 loci associati al fenotipo MH suscettibile (MHS), ma in più del 50% dei pazienti MHS il *locus* che segrega con la malattia è MHS-1, in cui stato poi identificato e clonato il gene RYR1. Tale gene è composto da 106 esoni e codifica il recettore della rianodina (RyR1), un canale di rilascio del Ca^{2+} localizzato sul reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico. Finora sono state identificate più di 100 mutazioni puntiformi nel gene RYR1, ma solo per 40 di esse è stata dimostrata la causalità con saggi funzionali. L'ipertermia maligna è sintomatologicamente silente e finora l'unico test sensibile e specifico per la diagnosi dell'MH è un saggio di contrattura *in vitro* (IVCT) realizzato con una procedura invasiva su biopsie muscolari. In questo lavoro di tesi sono state identificate sei mutazioni nel gene RYR1 con le tecniche della HPLC in condizioni parzialmente denaturanti (DHPLC) e del sequenziamento automatico diretto. Queste alterazioni aminoacidiche sono state poi caratterizzate funzionalmente mediante saggi *in vitro* in linfociti B isolati dai pazienti portatori della mutazione e immortalizzati con il virus Epstein-Barr. I risultati ottenuti dai saggi funzionali di rilascio protonico hanno permesso di determinare che le mutazioni analizzate alterano la funzionalità del canale RyR1.

Short summary

The aim of this PhD thesis is the identification of novel mutations in the RYR1 gene associated with malignant hyperthermia (MH) and their structural and functional characterization by *in vitro* assay. MH is an autosomal dominant pharmacogenetic disease caused by an altered intracellular Ca^{2+} homeostasis. This pathology shows a life threatening hypermetabolic crisis after administration of anaesthetics and/or depolarizing muscle relaxants. MH presents wide genetic heterogeneity: six genetic *loci* associated with the MH susceptible phenotype (MHS) have been identified. In more than 50% of MHS patients the locus segregating with the pathology is MHS-1, where the RYR1 gene maps. RYR1 gene is composed of 106 exons and codifies for the ryanodine receptor type 1 (RyR1), a calcium release channel localised in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. So far more than 100 point mutations have been identified in the RYR1 gene, but only 40 mutations have been characterized by functional assays as responsible of the MHS status. MH is symptomatologic silent and until now the only sensitive and specific test for the diagnosis of MH is the *In Vitro* Contracture Test (IVCT), performed on muscle biopsies.

In this study six RYR1 gene mutations have been identified with the Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) and the automatic sequencing process. The aminoacidic substitutions were then functionally characterized by *in vitro* assays on Epstein-Barr virus immortalized B-lymphocytes from patients carrying the mutations. The results of the proton release functional assays showed functional alterations in the RyR1 channel.

Riassunto

Obiettivo di questo progetto di dottorato è quello di identificare mediante analisi genetica mutazioni nel gene RYR1 in famiglie con episodi chiari o sospetti di ipertermia maligna (MH), e di saggiarne la causatività con esperimenti su linfociti B immortalizzati da pazienti stessi.

L'MH è una malattia farmacogenetica con trasmissione autosomica dominante nell'uomo, e si manifesta con una crisi ipermetabolica potenzialmente letale in seguito alla somministrazione di anestetici o miorilassanti depolarizzanti in soggetti suscettibili (MHS). Lo sviluppo della crisi procede con un aumento della temperatura corporea, tachicardia, contrazioni muscolari, acidosi metabolica e rhabdmiolisi. Questa patologia è sintomatologicamente silente e finora l'unico test sensibile e specifico per la diagnosi dell'MH è un saggio di contrattura *in vitro* (IVCT) realizzato con una procedura invasiva su biopsie muscolari.

L'ipertermia maligna mostra eterogeneità genetica, infatti l'analisi di *linkage* ha permesso di individuare 6 *loci* genici responsabili del fenotipo MHS: MHS1 sul cromosoma 19 in posizione q13.1; MHS2 sul cromosoma 17 in posizione q11.2-q24; MHS3 sul cromosoma 7 in posizione q21-q22; MHS4 sul cromosoma 3 in posizione q13.1; MHS5 sul cromosoma 1 in posizione q32; MHS6 sul braccio corto del cromosoma 5.

In più del 50% dei pazienti MHS è stata trovata associazione con il *locus* MHS-1, dove mappa il gene RYR1. Tale gene codifica un canale di rilascio del Ca^{2+} (RyR1) dal reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico. Finora sono state identificate più di 100 mutazioni puntiformi nel gene RYR1 che segregano con il fenotipo MHS. Solo per 40 mutazioni però è stata dimostrata la causatività mediante saggi funzionali sulle proteine RyR1 mutate. Mutazioni in questo gene sono state dimostrate responsabili anche di una miopatia non progressiva, il *Central Core Disease* (CCD), e del *Multiminicore Disease* (MmD).

Il difetto molecolare proposto per l'MH e il CCD è l'alterato rilascio di calcio attraverso RyR1 che può portare o ad un episodico ed eccessivo incremento di Ca^{2+} nel mioplasma in risposta a sostanze scatenanti nei pazienti MH, o ad un cronico sovraccarico di calcio nei muscoli dei soggetti CCD.

Recentemente è stato dimostrato che i linfociti B esprimono il gene RYR1 sulla membrana del reticolo endoplasmatico. Questo ha permesso di sviluppare strategie sperimentali volte a valutare l'effetto fenotipico di mutazioni nel gene RYR1 anche in tali linee cellulari.

I principali saggi descritti in letteratura per valutare il rilascio del Ca^{2+} da parte di RyR1 in risposta ad agenti scatenanti (caffaina, alotano, 4-cloro-m-cresolo) prevedono l'utilizzo di colture di miotubi o di linfociti B immortalizzati, derivati da pazienti portatori di mutazioni in eterozigosi o transfezione ed espressione di cDNA di RyR1 mutati in cellule HEK-293 o in miotubi normali.

Nel presente progetto di tesi è stata utilizzata la tecnica dell' HPLC in condizioni parzialmente denaturanti (DHPLC) per realizzare un'analisi di mutazioni nel gene RYR1 in 20 soggetti tipizzati MHS con l'IVCT. Per realizzare saggi funzionali in grado di valutare la causatività delle mutazioni identificate nel gene RYR1 i linfociti B dei pazienti MHS portatori delle mutazioni identificate sono stati isolati da prelievo di sangue ed immortalizzati con il virus Epstein-Barr. I saggi funzionali sono stati realizzati misurando la variazione di attività metabolica cellulare (valutata come rilascio protonico nell'ambiente extracellulare) in risposta alla stimolazione con la molecola 4-CmC. Finora sono state caratterizzate nei linfociti B e con la tecnica del rilascio protonico 5 mutazioni: Arg530His; Arg2163Pro; Asn2342Ser; Arg2454His; Cys4659Arg. Queste alterazioni aminoacidiche sono localizzate nelle tre regioni di RYR1 definite "hot spot" mutazionali per l'MH ed il CCD. Gli studi funzionali hanno mostrato che tutte le mutazioni influenzano significativamente la sensibilità del canale RyR1 alle stimolazioni con 600 e 800 μM 4-cloro-m-cresolo. Per la mutazione Cys4659Arg, in particolare, le cellule linfocitarie hanno mostrato una ridotta velocità di rilascio protonico in seguito a stimolazione con tale molecola. L'utilizzo, durante le stimolazioni con 4-cloro-m-cresolo, del dantrolene, un antagonista specifico di RyR1, a concentrazioni di 80 μM ha inoltre mostrato una significativa riduzione della risposta cellulare. Questo dato conferma che gran parte del segnale metabolico registrato con la tecnica del rilascio protonico proviene dall'attività di RyR1.

Ulteriori analisi potranno chiarire il meccanismo responsabile del comportamento del canale con la mutazione Cys4659Arg ed evidenziare se le mutazioni analizzate influenzano anche differenti meccanismi, come nei miotubi l'accoppiamento eccitazione-contrazione.

Summary

The aim of this PhD project is the identification and the functional characterization of RYR1 gene mutations identified in families with clear or under-suspicion malignant hyperthermia (MH) episodes.

MH is an autosomal dominant pharmacogenetic disease in man and shows a life-threatening hypermetabolic crisis after administration of anaesthetics and/or depolarizing muscle relaxants in MH-susceptible individuals (MHS). The MH crisis develops with an increasing of body temperature, tachycardia, muscle contractures, metabolic acidosis and rhabdomyolysis. This pathology is symptomatologically silent and so far the only sensitive and specific test for the diagnosis of MH is the *In Vitro* Contracture Test (IVCT), performed on muscle biopsies.

MH is genetically heterogeneous, in fact linkage analysis identified six genetic *loci* responsible for the MHS phenotype: MHS1 on the 19q13.1 chromosome; MHS2 on the 17q11.2-q24 chromosome; MHS3 on the 7q21-q22 chromosome; MHS4 on the 3q13.1 chromosome; MHS5 on the 1q32 chromosome; MHS6 on the short arm of the 5 chromosome.

In more than 50% MHS patients it has been found linkage between the MHS phenotype and the *locus* MHS-1, where the RYR1 gene maps. The RYR1 gene codifies for a sarcoplasmic reticulum calcium release channel in the skeletal muscle (RyR1). So far more than 100 point mutations have been identified in the RYR1 gene, but only 40 mutations have been characterized by functional assays on mutated RyR1 proteins as responsible of the MHS status with.

Mutations in RyR1 gene are also responsible for a non progressive myopathy, the Central Core Disease (CCD), and for the Multiminicore Disease (MmD).

The molecular defect involved in MH and CCD is an altered calcium release *via* the RyR1 channel that can led either to an episodic and excessive increase in the myoplasmic Ca^{2+} concentration in response to triggering molecules in MH patients, or to a chronic Ca^{2+} overload in the muscles of CCD subjects.

Recently, it has been demonstrated that B-lymphocytes express the RYR1 gene in the endoplasmic reticulum. Experimental procedures have been developed to evaluate the phenotypic effect of RyR1 mutations in these cell lines.

The assays reported for evaluating the Ca^{2+} release from RyR1 in response to triggering agents (caffeine, halotane, 4-CmC) use either myotubes and EBV-immortalized B-lymphocytes from patients carrying the mutations at the heterozigous status, or transfection of mutated RYR1 cDNA in HEK-293 and myotubes.

In this study we performed a mutation analysis in the RYR1 gene of 20 MHS patients with the Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). The functional characterization of the identified mutations has been carried out on B-lymphocytes extracted from blood samples of MHS patients carrying the mutations and immortalized with the Epstein-Barr virus. The functional assays were performed measuring the variation of metabolic activity (evaluating the proton release in the extracellular environment) in response to stimulation with 4-CmC.

So far we characterized in EBV-immortalized B-lymphocytes with the proton release technique, five RyR1 mutations: Arg530His; Arg2163Pro; Asn2342Ser; Arg2454His; Cys4659Arg. These aminoacid substitutions are localized in the three RyR1 hot-spot region for MH and CCD. The functional studies showed that all the mutations significantly alter the RyR1 channel sensitivity to 600 and 800 μ M 4-CmC stimulation. These data confirm the hypotesis of MH-crisis causing mutations in the carriers patients. As for the Cys4659Arg mutation, the B-cells showed lower proton release rate in response to stimulation with 4-CmC in comparison with control cells. The stimulation with 4-CmC in presence of 80 μ M dantrolene, a specific RyR1 inhibitor, showed a significant reduction of cellular

response. This result confirms that the metabolic response to 4-CmC, measured with the proton release assay, is mainly due to RyR1 activity.

Further analyses will be able to clarify the mechanism responsible for the specific behaviour of the RyR1 channels carrying the Cys4659Arg mutation, and verify if the analyzed mutations can influence different mechanisms as well, the excitation-contraction coupling in myotubes.

1. Introduzione

1.1 Ipertermia Maligna

L'ipertermia maligna (MH, MIM#145600) è una malattia farmacogenetica e potenzialmente letale del tessuto muscolare scheletrico. Il carattere MH si trasmette nell'uomo con modalità autosomica dominante e ha un'incidenza di 1 su 10000 anestesie nei bambini e 1 su 50000 negli adulti. Il motivo di questa disuguaglianza non è noto. Questi valori riportati sono probabilmente sottostime della reale incidenza a causa della penetranza incompleta e della difficoltà nel definire le reazioni blande. Inoltre molti pazienti MH non vengono mai identificati perché non vengono mai sottoposti ad anestesia o non entrano in contatto con dosi di anestetici sufficienti a scatenare una reazione MH. Tale patologia si manifesta come crisi ipermetabolica in soggetti geneticamente suscettibili in seguito alla somministrazione di anestetici volatili (es. Cloroformio, Etere, alotano, Enflurano, Isoflurano, Sevoflurano, Deflurano) o miorelassanti depolarizzanti normalmente in uso preoperatorio (succinilcolina)¹.

Oggi la migliore conoscenza della sindrome e la terapia con l'antidoto dantrolene hanno notevolmente ridotto il tasso di mortalità correlato alle reazioni di MH (<5%).

Il meccanismo coinvolto in queste crisi ipermetaboliche è un'alterata regolazione dell'omeostasi del calcio nel muscolo scheletrico dovuta ad una condizione di ipersensibilità dei canali del calcio agli agenti scatenanti². L'interazione delle molecole *triggering* con i canali "ipersensibili" causa una prolungata apertura degli stessi, con conseguente flusso incontrollato dello ione calcio dal reticolo sarcoplasmatico al mioplasma. Tale abnorme incremento della concentrazione di calcio porta ad un'attivazione del meccanismo di contrazione muscolare che genera rigidità del corpo e spasmi del massetere, i primi segni di crisi ipermetabolica. L'attivazione di sistemi che consumano energia cellulare, porta poi ad acidosi metabolica e respiratoria (se la produzione di CO₂ aumenta). Subentrano quindi altri segni clinici come ipertonìa, aritmia, tachicardia ed ipertermia (41 °C o più). Si innescano meccanismi di compensazione dell'aumento della temperatura corporea come aumento della sudorazione e vasodilatazione cutanea. Tutti gli scompensi di una crisi di MH causano un consistente danno cellulare a livello del tessuto muscolare (rabbdomiolisi) con conseguente rilascio nel circolo sanguigno del contenuto cellulare stesso. Infatti segni di crisi di MH nell'analisi di laboratorio sono iperkalemia, aumento dei valori di creatinfosfochinasi (CPK) e mioglobina nel siero e nelle urine. Le elevate temperature ed i prodotti di degradazione cellulare possono poi irreversibilmente danneggiare sistemi multipli di organi. Un mancato o non tempestivo intervento con una specifica terapia e con l'uso dell'antidoto dantrolene può portare in pochi minuti alla morte del paziente per fibrillazione ventricolare dovuta a iperkalemia, nel giro di alcune ore per edema polmonare o coagulopatia, nel giro di giorni per danno neurologico ed edema cerebrale o per acuta compromissione renale causata dagli effetti tossici della mioglobina³. Se riconosciuti presto però, gli effetti dell'ipertermia maligna possono essere trattati con l'uso una terapia specifica e con la somministrazione di dantrolene e ridotti quindi a minimi effetti residui. In alcuni casi, invece, le reazioni indotte in individui suscettibili possono essere molto più lievi, presentandosi solo con

rigidità della muscolatura del massetere, solo con febbre o con reazioni di gravità intermedia⁴. E' fondamentale quindi, per evitare reazioni di MH, poter identificare i soggetti a rischio prima dell'anestesia, in modo da utilizzare per l'anestesia combinazioni di farmaci non scatenanti come barbiturati, narcotici, propofolo, anestetici locali etc. Tale obiettivo preventivo può essere raggiunto con lo studio anamnestico del paziente e della sua famiglia per identificare episodi non accertati di reazioni MH o segni clinici sospetti nel paziente stesso e nei suoi consanguinei. Infatti reazioni avverse agli anestetici sono documentate in soggetti portatori di diverse miopatie e valori ematologici di CPK elevati potrebbero indicare alterazioni muscolari. Sebbene però alcuni elementi clinici, anamnestici ed ematologici possano indirizzare verso un sospetto di suscettibilità all'MH (MHS), l'unico test accettato dalla comunità scientifica per la diagnosi di *status* MHS è il test di contrattura *in vitro* (IVCT). Il protocollo europeo è stato pubblicato nell'84 dal Gruppo Europeo di MH (EMHG)^{5,6} e nell'89 il gruppo nord-americano di MH (NAMHG)⁷ convenne su uno simile. Entrambi sono basati sulla differente risposta contrattile di fibre muscolari prelevate da soggetti MHS rispetto a soggetti normali (MHN) in seguito a stimolazioni con caffeina ed alotano. Il protocollo europeo prevede che due fibre muscolari prelevate siano esposte una a concentrazioni crescenti di caffeina e l'altra a concentrazioni crescenti di alotano. Nel protocollo americano, *Caffeine Halotane Contracture Test* (CHCT), invece la contrazione della fibra muscolare viene valutata a dosi crescenti di caffeina in presenza ed assenza di 1% di alotano.

1.2 Test per determinare la suscettibilità all'MH

Finora l'unico protocollo accettato dalla comunità scientifica internazionale per la diagnosi di suscettibilità all'ipertermia maligna è il test di contrattura *in vitro* (IVCT). Tale test si effettua valutando *ex vivo* la contrazione di fibre muscolari di un soggetto in seguito a stimolazione con caffeina ed alotano. In particolare si effettua un

prelievo bioptico dal muscolo *vastus lateralis* del soggetto, si isolano dalla biopsia fasci di fibre di opportuna dimensione (lunghezza 15-25 mm e spessore 2-3 mm), si alloggiavano questi fasci in un'apparecchiatura munita di bagni termostatici e di trasduttori di tensione meccanica. Si stimolano alcune fibre muscolari con una soluzione di caffeina alle concentrazioni di 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 32 mM. Altre fibre parallelamente vengono stimulate con una soluzione di alotano alle concentrazioni di 0.11, 0.22, 0.44, 0.66 mM. Nei risultati del test vengono riportate le concentrazioni più basse (concentrazioni soglia) di caffeina ed alotano in grado di innescare nelle fibre muscolari una contrazione di almeno 2 mN in forza.

In base ad i risultati ottenuti con questo test si definiscono:

-MHS, i soggetti in cui si è osservata una concentrazione soglia per la caffeina minore o uguale a 2 mM e per l'alotano minore o uguale a 0.44 mM.

-MHN, i soggetti in cui si è osservata una concentrazione soglia per la caffeina superiore a 2 mM e per l'alotano superiore a 0.44 mM.

-MHE, i soggetti in cui si è osservata solo ad una delle due sostanze scatenanti la soglia definita "di suscettibilità", in particolare MHEh se la sostanza con soglia patologica è alotano e MHEc se è la caffeina.

Questo test è stato messo a punto in modo da privilegiare la sensibilità diagnostica (99%) rispetto alla specificità diagnostica (93%), dato il carattere potenzialmente fatale della malattia, mentre il protocollo CHCT ha una sensibilità diagnostica del 97% e specificità diagnostica del 78%.

Recentemente è stata utilizzata anche la rianodina per verificare il suo uso per un test di contrattura *in vitro* (*Ryanodine Contracture Test, RCT*) che definisca un valore *cut-off* in grado di separare i soggetti MHS dagli MHN⁸. I risultati dei test di contrattura muscolare effettuati con la rianodina hanno confermato lo stato di MHS determinato in precedenza con il classico approccio dell'IVCT con caffeina ed alotano⁹.

Ad oggi sono allo studio altre metodologie diagnostiche per l'MH, data la notevole invasività di un prelievo bioptico muscolare, che sfruttano la risonanza magnetica nucleare o che misurano *in vivo* la

variazione della pressione parziale di CO₂ nel muscolo in seguito a stimolazione con caffeina¹⁰.

1.3 Malattie associate all'ipertermia maligna:

A parte gli episodi di crisi ipermetabolica indotti, i pazienti MHS non presentano nessuna miopia clinicamente rilevante. Tuttavia in alcune occasioni sono state riportati elevati livelli ematici di CPK¹¹ e *cores* o *minicores* a livello istologico. *Cores* a livello istologico e *minicore* sono classicamente associati a due miopatie congenite: *Central Core Disease* (CCD) e *Multiminicore Disease* (MmD). Infatti mutazioni nel gene RYR1 sono state identificate anche in pazienti CCD e MmD. Episodi di MH possono verificarsi inoltre in individui con patologie muscolari ereditarie come: King-Denborough Syndrome, distrofia muscolare di Duchenne, Miotonia Congenita, Miopia di Evans ed altre possibili miopatie.

1.3.1 Central Core Disease (CCD)

Il *Central Core Disease* (MIM#117000) è una rara malattia neuromuscolare caratterizzata prevalentemente da debolezza nelle gambe, e solo occasionalmente colpisce altri gruppi muscolari. La modalità di trasmissione è autosomica dominante, ed il gene maggiormente responsabile di questa miopia non progressiva è il gene RYR1. Il nome *Central Core Disease* viene dalla presenza di "nuclei" abnormi nelle cellule muscolari che si estendono per tutta la lunghezza della fibra muscolare. Visibili solo al microscopio, questi nuclei appaiono vuoti come se non ci fosse attività metabolica, in essi sono anche assenti i mitocondri, gli organelli deputati alla produzione di energia nella cellula.

Una spiegazione per la presenza di tali nuclei deriva dall'alterazione del meccanismo di rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico nel mioplasma delle cellule muscolari. Quando un segnale di contrazione arriva dal sistema nervoso al muscolo, il calcio viene

rilasciato nel citoplasma e vi rimane il tempo necessario per innescare la contrazione muscolare, dopodichè viene ripompato nel reticolo sarcoplasmatico (SR). Nei pazienti con CCD, il calcio verrebbe rilasciato nel mioplasma anche quando il muscolo non si sta contraendo. Quindi quando arriva il segnale di contrazione, c'è meno calcio disponibile per innescare la contrazione, da cui la debolezza muscolare. La costante presenza di calcio nel citoplasma della cellula inoltre sarebbe responsabile della distruzione dei mitocondri, generando così i "nuclei". I sintomi più comuni di CCD sono debolezza nelle gambe che rendono azioni come il correre o il saltare difficili nel paziente, ma raramente sono gravemente disabilitanti. Tali sintomi si manifestano già nel primo anno di età con scarso tono muscolare e facile affaticamento, causando, con la crescita, ritardo nello sviluppo motorio. Non c'è uno specifico trattamento per la CCD ma i sintomi possono essere in parte trattati con speciali terapie fisiche. I pazienti affetti da CCD sono anche MHS.

1.3.2 Multiminicore Disease (MmD)

Il *Multiminicore Disease* (MIM#255320) è una miopatia congenita autosomica recessiva caratterizzata dalla presenza di molte piccole lesioni, note come "minicores" nella maggior parte delle fibre muscolari. Il MmD è una condizione clinicamente eterogenea le cui caratteristiche generali includono ipotonia neonatale, sviluppo ritardato del sistema motorio, debolezza muscolare generale e amiotrofia che può lentamente progredire o rimanere stabile. La biopsia muscolare mostra molteplici, piccole e non ben circoscritte aree di disorganizzazione del sarcomero e mancanza di mitocondri. In genere non sono evidenti segni distrofici.

Studi recenti hanno consentito l'individuazione di una mutazione in omozigosi che altera lo splicing del gene RYR1 in un paziente con MmD.

1.4 Fisiologia del muscolo scheletrico:

Il tessuto muscolare scheletrico nei vertebrati presiede alla funzione del movimento del corpo grazie a specializzate strutture proteiche che, mediante controllate contrazioni e rilassamenti, muovono gli elementi articolari (fig.1). Ogni fibra muscolare ha una membrana plasmatica (sarcolemma) che si invagina in numerose introflessioni tubulari (tubuli trasversi) a circondare trasversalmente le miofibrille. Addossata perimetralmente alle miofibrille c'è la fitta rete tubulare del reticolo sarcoplasmatico che, con ampie porzioni di membrana chiamate cisterne terminali, si affaccia estesamente alla membrana dei tubuli trasversi. La struttura formata dal tubulo trasverso con le estensioni delle cisterne terminali prende il nome di triade giunzionale (fig.2). Proprio a livello della triade giunzionale si articola un complesso strutturale proteico deputato alla trasmissione dell'impulso elettrico proveniente dai centri superiori, ed alla sua conversione nel fenomeno della contrazione. Tale meccanismo di conversione del segnale prende il nome di accoppiamento eccitazione-contrazione (E-C), e gli elementi proteici che ne garantiscono lo svolgimento sono:

1. La proteina canale detta recettore della diidropiridina (DHPR), un canale del calcio voltaggio-dipendente della membrana del tubulo trasverso
2. Il canale di rilascio del calcio RyR1, e proteine transmembrana come la triadina e la giunctina sulla membrana delle cisterne terminali.
3. Proteine come FKBP12, la calmodulina, la calsequestrina, proteine chinasi e fosfatasi nel citoplasma.

Le due proteine canale DHPR e RYR1 sono disposte a livello della triade giunzionale in modo da formare un'unità funzionale. Infatti ogni molecola dell'omotetramero RyR1 si giustappone a quattro canali DHPR, stabilendo con essi un'intima relazione (favorita anche da proteine accessorie, quali la giunctina e calsequestrina). E' proprio tale unità funzionale che presiede al meccanismo di accoppiamento E-C muscolare.

La contrazione muscolare è un articolato processo che ha origine nei centri superiori con un impulso elettrico. Questo impulso, raggiunto l'assone del neurone motore, si dirama nelle varie giunzioni neuromuscolari dei fascicoli muscolari, dove genera a livello postsinaptico la depolarizzazione del sarcolemma. Tale depolarizzazione della membrana si trasmette ai tubuli trasversi dove i recettori DHPR "percepiscono" la depolarizzazione della membrana tramite il sensore del voltaggio e subiscono una modifica conformazionale. Grazie a due anse proteiche (II-III e III-IV) che protrudono in direzione citoplasmatica, DHPR trasmette la variazione conformazionale al canale RyR1 (sulla cisterna terminale) che si apre e genera un flusso di calcio dal reticolo sarcoplasmatico al citoplasma. Lo ione calcio innesca a questo punto la contrazione muscolare. Il Ca^{2+} nel citoplasma si lega a siti specifici sulle molecole proteiche di troponina C ed il complesso troponinaC-tropomiosina si dissocia dall'interazione con i filamenti di actina lasciando scoperti i siti di legame per le "teste" delle molecole di miosina. Queste quindi legano l'actina, rilasciano il gruppo fosfato dal complesso ad alta energia miosina-ADP-Pi e compiono un movimento di rotazione che consente lo scorrimento dei filamenti di actina. Una volta rilasciato il gruppo fosfato e compiuto il movimento traslazionale dei filamenti di actina, le molecole di miosina possono legare nuovamente le molecole di ATP rilasciando ADP. Questo complesso miosina-ATP è un complesso a bassa affinità per i siti di legame dell'actina, e si separa quindi dai filamenti di actina. La successiva idrolisi dell'ATP rigenera il complesso ad alta affinità miosina-ADP-Pi che è pronto nuovamente per il legame ad un nuovo sito sui filamenti di actina. La reiterazione di questi cicli di legame actina-miosina, scorrimento filamenti di actina e dissociazione ponti actina-miosina genera macroscopicamente la contrazione delle fibre muscolari.

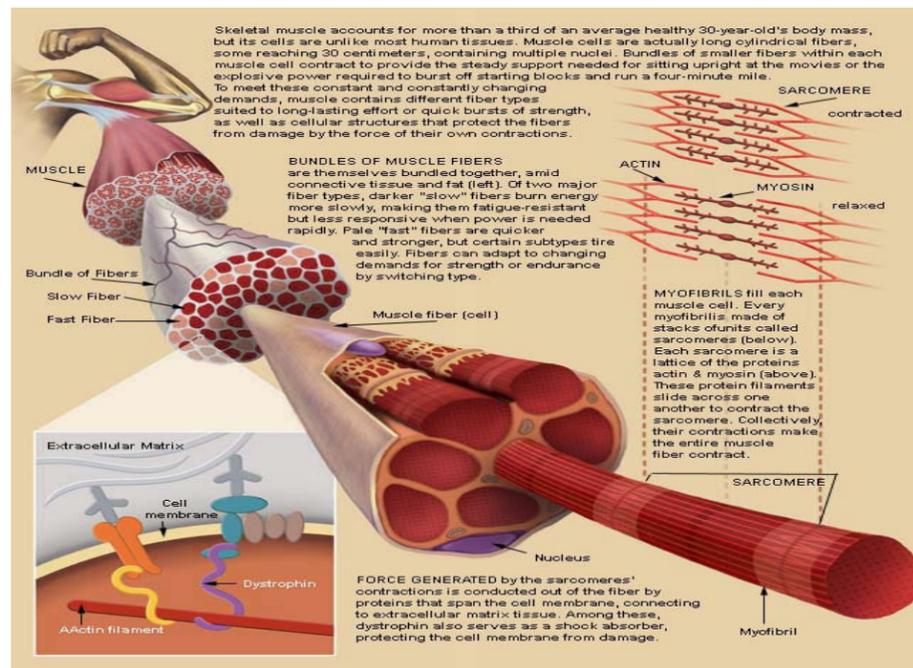


Fig.1 Struttura ed ultrastruttura del muscolo scheletrico umano.

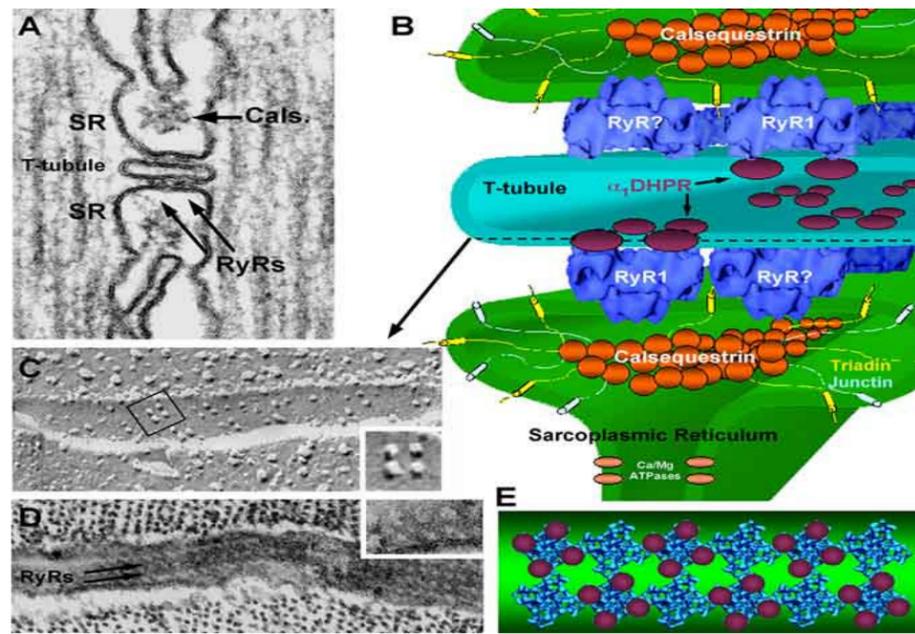


Fig.2 Schema dell'organizzazione spaziale di RyR1, DHPR e delle proteine accessorie nella triade giunzionale. Immagini al ME (A,C,D) e ricostruzione al computer in grafica tridimensionale (B,E).

1.5 Genetica dell'ipertermia maligna

L'ipertermia maligna mostra un carattere di eterogeneità genetica, infatti l'analisi di *linkage* ha permesso di individuare 6 *loci* genici responsabili del fenotipo MHS: MHS1, MHS2, MHS3, MHS4, MHS5, MHS6.

Il *locus* principale è MHS-1 (MIM#[145600](#)) sul cromosoma 19 in posizione q13.1. Infatti in circa i 2/3 delle famiglie MHS il fenotipo di suscettibilità segrega con marcatori di tale *locus*. All'interno di questa regione cromosomica è stato identificato e clonato il gene RYR1¹¹⁻¹². La maggior parte delle mutazioni nel gene RYR1 sono localizzate in tre regioni dette "hot spot" mutazionali, e corrispondono alle regioni aminoacidiche 35-614 (MH/CCD1), 2163-

2458 (MH/CCD2), e 4136-4973 (MH/CCD3) (fig.3). Questo gene codifica il recettore della rianodina, una proteina del reticolo sarcoplasmatico del muscolo scheletrico che ha la funzione di canale di rilascio del calcio.

Sul cromosoma 17 in posizione q11.2-q24 c'è il *locus* MHS2 (MIM#154275) dove mappa il gene SCN4A che codifica un canale del sodio voltaggio-dipendente altamente espresso nel muscolo. Questo canale ha la funzione di propagare a livello postsinaptico il potenziale d'azione. Mutazioni in questo gene sono state identificate in pazienti affetti da diverse miopatie come paralisi periodica iperkalemica, paramiotonia, miotonia e miastenia, ma non ancora in soggetti MHS.

Sul cromosoma 7 in posizione q21-q22 è localizzato il *locus* MHS3 (MIM#154276) dove mappa il gene CACNL2A che codifica la subunità $\alpha\delta$ del complesso eteromultimerico del canale DHPR. Tale subunità è composta da due miniproteine ($\alpha 2$ e δ) legate da ponti disolfuro, ha dimensioni di 140-170kD e si estende attraverso la membrana del sarcolemma. Questa proteina è espressa in molti tessuti, incluso il muscolo scheletrico, e ha la funzione di modulare la cinetica del canale DHPR aumentandone le capacità di rilascio del calcio. Finora non sono state individuate mutazioni in questo gene associate al fenotipo MHS.

Il *locus* MHS5 (MIM#601887) sul cromosoma 1 in posizione q32 identifica il gene CACN1AS che codifica la subunità $\alpha 1s$ del canale DHPR. In questo gene sono state identificate due mutazioni associate alla suscettibilità all'MH.

Infine nei *loci* MHS 4 (MIM#600467) e MHS 6 (MIM#601888) che mappano rispettivamente sul cromosoma 3 in posizione q13.1 e sul braccio corto del cromosoma 5 non sono stati ancora identificati i geni responsabili di alcuni casi di MH.

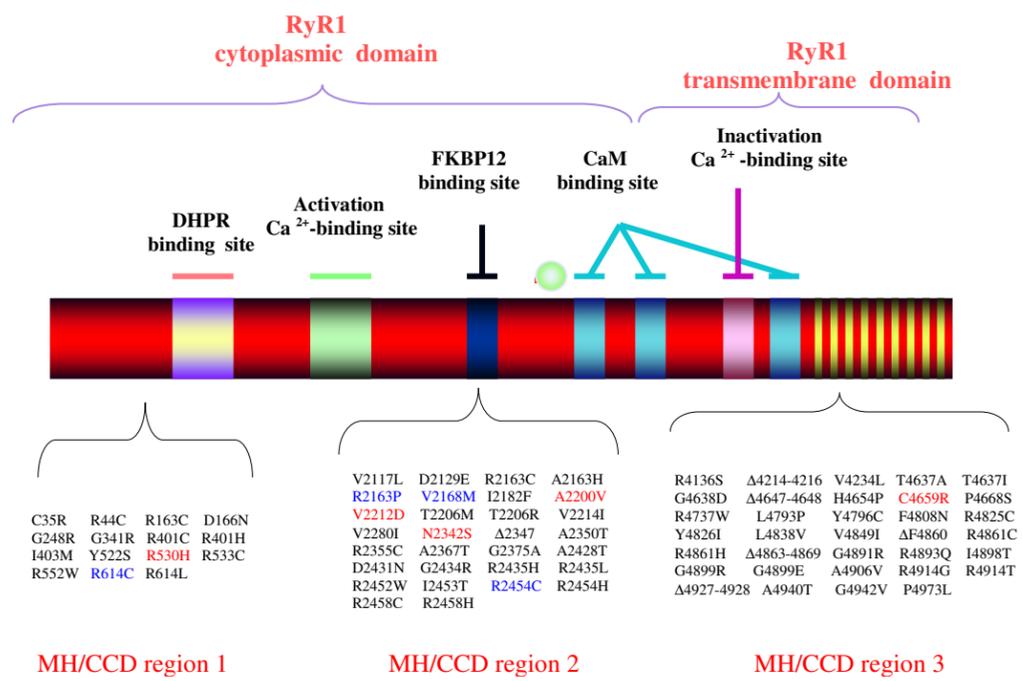


Fig. 3 Rappresentazione bidimensionale di RyR1 con le tre regioni "hot-spot" di mutazioni. In rosso sono evidenziate le mutazioni trovate in questo studio e non ancora descritte in letteratura, in blu le mutazioni trovate in questo studio e già descritte in letteratura.

1.6 RYR1

Il gene RYR1 ha un'estensione genomica di circa 160 kb e si compone di 106 esoni¹¹. Tale gene codifica una proteina di 5032 aminoacidi con una massa molecolare di 564 kD che rappresenta

l'isoforma scheletrica del recettore della rianodina (RyR1), un canale di rilascio del calcio localizzato sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico. Il ruolo di RyR1 nel muscolo scheletrico è quello di interagire funzionalmente con DHPR per l'accoppiamento E-C e di innescare il processo di contrazione muscolare attraverso il rilascio di ioni calcio nel mioplasma dai depositi del reticolo sarcoplasmatico¹³⁻¹⁴. L'identificazione del canale di rilascio del calcio RyR1 dal tessuto muscolare scheletrico è stata realizzata grazie all'uso dell'alcaloide rianodina, una molecola presente nelle radici della pianta *Ryania speciosa*. In base all'effetto paralitico che la rianodina aveva sul muscolo scheletrico è stato verificato che tale alcaloide era in grado di inibire il rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico legandosi con alta affinità ad una proteina del SR. La purificazione della proteina legante la rianodina ha permesso di chiarire, mediante esperimenti di incorporazione in doppio strato lipidico, che in realtà è un canale ionico del calcio. La struttura generale proteica è simile a quella dei recettori dell'inositolo trifosfato (InsP3R), con un'ampia regione citosolica all'N-terminale (residui 1-4500), un dominio di regolazione centrale ed un dominio C-terminale. Allineamenti della sequenza amminoacidica di RyR1 e dei InsP3R hanno mostrato un certo grado di omologia nei primi 600 aminoacidi nella regione N-terminale. Le regioni centrali di queste due classi di proteine sono dissimili e contengono probabilmente domini di regolazione e di trasduzione. Il dominio C-terminale di entrambi InsP3R e RyR contiene i segmenti transmembrana che formano il poro del canale del calcio. Dieci domini idrofobici sono stati predetti nella regione C-terminale della molecola da alcuni ricercatori¹⁵. Di questi solo 4 (corrispondenti ai domini di Zorzato M5, M6, M8, M10) sono stati considerati domini transmembrana anche da altri ricercatori¹⁶⁻¹⁷ in virtù dei loro indici di idrofobicità più alti. Le sequenze amminoacidiche che formano i domini transmembrana sono altamente conservati tra InsP3R e RyR con l'eccezione dei domini 3 e 4 (in accordo con il modello descritto da Takeshima et al.¹⁶) che mostrano il minor grado di omologia. Studi successivi di espressione eterologa di proteine di fusione RyR1-EGFP in cellule HEK293 e fibroblasti di topo embrionali hanno messo in evidenza che le sequenze transmembrana sarebbero in realtà 8 alfa-eliche organizzate in 4 *hairpin loops*¹⁸

(fig.4b). Altri studi hanno dimostrato che la regione carbossiterminale di RyR1 è importante per la corretta localizzazione e la funzionalità del canale¹⁹. E' stato poi dimostrato che M2, M7 e M10 sono coinvolti nell'assemblaggio del tetramero e nella formazione del poro del canale. Un'altra sequenza nel dominio M9 è coinvolta nella formazione del poro di RyR1²⁰.

Studi di crioelettromicroscopia elettronica hanno permesso di creare una ricostruzione tridimensionale del complesso RyR1 che mostra una struttura a quadrifoglio con un buco centrale di 1-2 nm di diametro²¹(fig.5). Recenti studi di crioelettromicroscopia hanno permesso di ottenere una ricostruzione tridimensionale di RyR1 con una risoluzione di 10 angstrom (fig.6). La porzione citoplasmatica consiste di una serie di strutture tubolari interconnesse che si fondono in 4 colonne che si estendono nella porzione transmembrana. La porzione transmembrana, che ha almeno 6 alfa-eliche transmembrana per monomero, è formata da 4 bastoncini inclinati che si slargano nel lato luminale e convergono in un anello denso a livello citoplasmatico. Un altro set di 4 bastoncini emerge da questo anello e forma la parte interna delle 4 colonne. Questa struttura garantisce una continuità diretta tra la porzione citoplasmatica e quella transmembrana²¹.

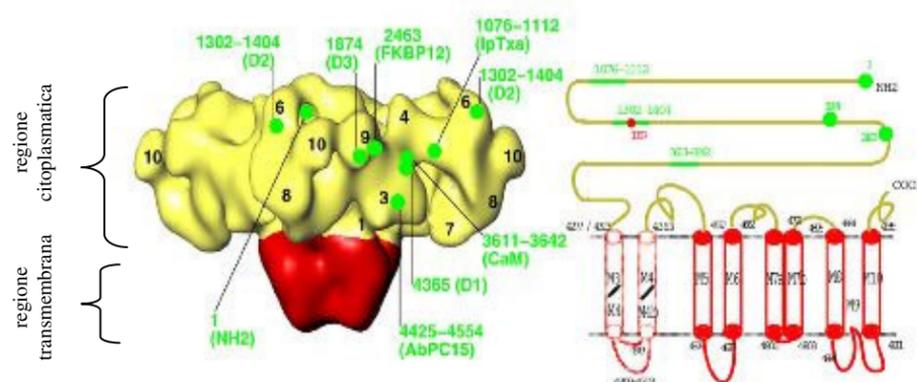


Fig. 4 Ricostruzione tridimensionale di RyR1 con alcuni siti di legame per i suoi modulatori e schema bidimensionale dei domini della sequenza proteica di RyR1.

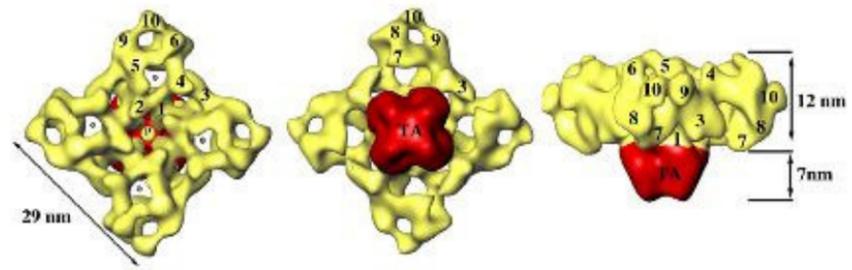


Fig. 5 Ricostruzione in tre dimensioni della struttura di RyR1.

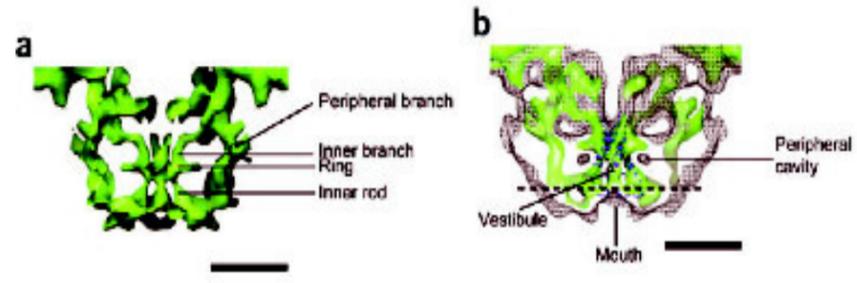


Fig. 6 Struttura della regione del poro di RyR1 con una definizione di 10 angstrom.

1.6.1 Famiglia genica di RYR

Nei mammiferi e in altre classi di organismi viventi studi di clonaggio molecolare hanno permesso di identificare, oltre all'isoforma RyR1 espressa nel muscolo scheletrico, altre due isoforme: RyR2 e RyR3²²⁻²³⁻²⁴.

Nell'uomo il gene RYR2 è localizzato sul cromosoma 1 in posizione q42 e il gene RYR3 sul cromosoma 15 in posizione q14²⁵

L'isoforma RyR2 è espressa principalmente nel muscolo cardiaco e nel cervelletto. Confrontando RyR2 con RyR1 si trova un'identità di sequenza aminoacidica del 66% e una notevole omologia nella struttura tridimensionale. La funzione di RyR2 è quella di canale del calcio implicato nel processo di rilascio di calcio indotto dal calcio (CICR), amplificando e/o rigenerando il Ca^{2+} che è localmente aumentato dal flusso in entrata via DHPR in seguito a depolarizzazione della membrana. RyR2 può essere regolato da una serie di modulatori quali il Mg^{2+} , la calmodulina (CaM), proteine chinasi, fosfatasi, ma una profonda differenza con RyR1 risiede nel fatto che il canale cardiaco ha solo il sito di attivazione dal Ca^{2+} , non quello di inibizione²⁶⁻²⁷.

L'isoforma RYR3 codifica un canale di rilascio del calcio espresso principalmente a livello del tessuto cerebrale anche se è stata riscontrata la sua espressione in molti altri tessuti, lasciando pensare ad una forma ubiquitaria del canale di rilascio del calcio del reticolo endoplasmatico. A livello aminoacidico l'isoforma di RyR3 mostra una percentuale di identità di circa il 67% rispetto a RyR1 e 70% rispetto a RyR2. RyR3 forma omotetrameri con una struttura a quadrifoglio come le altre due isoforme, è sensibile all'azione della rianodina e la caffeina aumenta la sua sensibilità al Ca^{2+} . Alcuni esperimenti di espressione eterologa in cellule HEK293 hanno dimostrato inoltre che RyR3 mostra proprietà canale simili a RyR1, anche se con cinetiche di *gating* differenti.

Topi *knock-out* per RYR1 o RYR2 muoiono durante lo sviluppo embrionale, mentre topi *knock-out* per RYR3 vivono normalmente ed hanno una struttura muscolare scheletrica senza rilevanti anomalie. Solo il processo di CICR nelle fibre di neonati di topi

knock-out per RYR3 risulta essere alterato. Ma la funzione di RYR3 risulta comunque essere compensata da RyR1 e RyR2 durante lo sviluppo e nella vita adulta.

Analisi della sequenza amminoacidica primaria delle proteine RyR ha inoltre rilevato siti canonici di legame con vari ligandi (ATP, Ca^{2+} , caffeina, CaM) e siti di fosforilazione.

In complesso la struttura di RyR1, 2 e 3 sono abbastanza simili, ma ci sono tuttavia specifici punti di eterogeneità strutturale che riflettono probabilmente le differenze isoforma-specifiche. Studi di crioelettromicroscopia e di analisi con anticorpi sito-diretti hanno permesso poi di definire con un indice di risoluzione di 20 angstrom prima e 10 angstrom poi la struttura tridimensionale di RyR1, RyR2 e RyR3 e di localizzarvi i siti di legame per molte proteine e ligandi

64-67

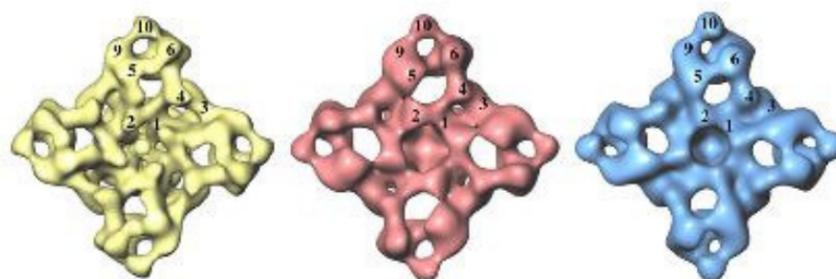


Fig. 8 Comparazione della struttura tridimensionale di RyR1 (in giallo), RyR2 (in rosa) e RyR3 in azzurro da ricostruzione computerizzata di immagini di microscopia elettronica. Sono evidenti molte differenze strutturali, probabilmente responsabili della diversa modulabilità delle tre isoforme.

1.6.2 Regolazione di RyR1

L'interazione tra una regione del dominio N-terminale (aa 590-628) e una regione del dominio centrale (aa 2442-2477) sembra regolare

la funzionalità del canale, stabilizzandone il suo stato chiuso. Infatti fattori come attivatori endogeni e farmacologici di RyR1 o mutazioni ricadenti in tali domini, destabilizzano quest'interazione favorendo lo stato aperto del canale.

L'attività di RyR1 è regolata da vari modulatori come Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP, CaM, caffeina, rianodina, rutenio rosso, FKBP12, procaina, dantrolene e polianioni. Molti tipi diversi di approcci sperimentali hanno permesso di localizzare con diversi indici di risoluzione i siti di legame dei modulatori su RyR1.

Il Ca^{2+} interagisce con la porzione C-terminale di RyR1, e precisamente con i domini EF1 (amminoacidi 4081-4092) e EF2 (amminoacidi 4116-4127)²⁶. L'effetto che questo ione esercita sull'attività di RyR1 è duplice, infatti a basse concentrazioni si lega al sito a bassa affinità e attiva il canale, favorendo il processo di CICR, mentre ad alte concentrazioni lega il sito ad alta affinità e inibisce il canale.

La rianodina ha due siti di legame nella regione a valle dell'aminoacido 4475²⁸⁻²⁹. Uno è ad alta affinità e ha la funzione di attivazione, uno è a bassa affinità ed ha la funzione di inibizione. Il sito ad alta affinità è situato nel frammento triptico carbossiterminale di 76 kDa. Questi due siti sono distinti ma allostericamente o stericamente accoppiati³⁰.

Il 4-CmC lega RyR1 nella regione 4007-4180³¹ ed esercita un'azione fortemente stimolante sul canale rianodinico³². La sua azione è infatti notevolmente superiore a quella della caffeina, la molecola più comunemente utilizzata per esperimenti di stimolazione di RyR1.

La caffeina conterrebbe i siti di legame su RyR1 nella porzione N-terminale e centrale, anche se non sono stati ancora definiti. L'effetto di tale molecola è quella di aprire il canale del calcio favorendo fuoriuscita di calcio nel citoplasma.

Il dantrolene ha il sito di legame nella porzione N-terminale del canale rianodinico, e precisamente nella regione compresa tra gli aminoacidi 590-609³³. L'effetto del dantrolene è quello di bloccare il flusso di calcio attraverso il canale RyR1, stabilizzando fortemente la conformazione chiusa dello stesso³⁴.

L'ATP interagisce con il dominio a valle del residuo 2652 e attiva il canale³⁵.

La CaM si lega alla regione degli aminoacidi 2800-3050 di RyR1³⁶⁻³⁷ e ha un'azione che dipende dalla concentrazione dello ione calcio e ne amplifica l'effetto: attiva RyR1 a basse concentrazioni di calcio e lo inattiva ad alte concentrazioni di calcio.

FKBP12 interagisce con il residuo 2461 di RyR1³⁸ con una funzione di regolazione e sincronizzazione conformazionale tra macromolecole di RyR1 vicine³⁹.

L'attività di RyR1 è inoltre regolata dallo stato ossidato-ridotto di specifici residui di cisteina, dall'effetto del processo di S-nitrosilazione (cisteina3653⁴⁰), dall'azione di chinasi endogene sui residui di serina (serina2843⁴¹) e dalla concentrazione di ioni metallici bivalenti (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) monovalenti (Li^+ , Na^+ , K^+), nucleotidi adeninici (ATP, ADP, cAMP, AMP).

La fosforilazione di RyR1 da parte di proteine chinasi associate alla membrana sposta l'equilibrio verso la forma aperta del canale (*open probability*) aumentando la sensibilità a concentrazioni micromolari di Ca^{2+} e all'ATP⁴².

1.7 DHPR

DHPR è un canale del calcio voltaggio-sensibile *L-type* con una massa di 160-273 kD. Questo canale ha una struttura eteropentamerica e deve il suo nome alla sua capacità di legare la diidropiridina. DHPR è localizzato sulla membrana sarcolemmatica delle cellule muscolari (precisamente a livello del tubulo T), si apre in seguito a depolarizzazione del sarcoplasma ed ha la funzione di accoppiatore E-C nel muscolo scheletrico, agendo da sensore del voltaggio. Le funzioni di poro e di sensore del voltaggio sono svolte fondamentalmente dalla subunità $\alpha 1s$, mentre le quattro subunità accessorie ($\alpha 2\delta$, $\beta 1$ e γ) che circondano $\alpha 1$ hanno la funzione di regolare i meccanismi di apertura e chiusura del canale. La subunità $\alpha 1s$ ha una composizione strutturale di quattro domini interni ripetuti (I-IV), ogni dominio contiene 6 regioni transmembrana ad α -elica (S1-S6). Il dominio S4 è carico positivamente e forma parte del sensore del voltaggio e due domini addizionali, tra S5 e

S6, formano la regione del poro nella membrana. L'ansa citoplasmatica tra la seconda e la terza ripetizione transmembrana (II-III *loop*) è fondamentale per l'interazione tra RyR1 e DHPR così come per l'accoppiamento E-C (fig.9).

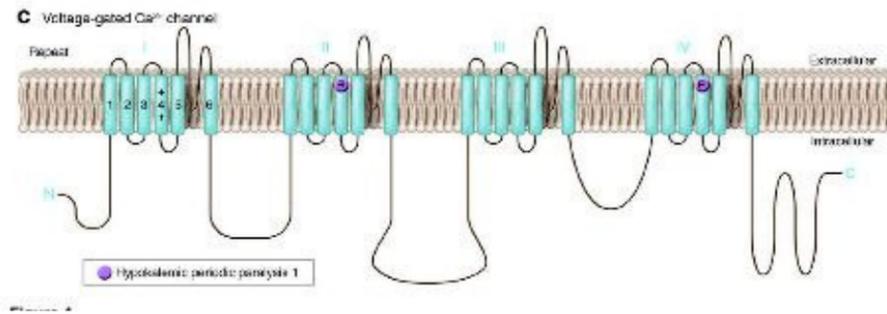


Fig. 9 Struttura della subunità α_1 del recettore DHPR

1.8 Interazione di RyR1 con DHPR

Nel muscolo scheletrico dei vertebrati il processo di accoppiamento E-C sembra essere dovuto ad un accoppiamento meccanico e funzionale tra DHPR sulla membrana del tubulo trasverso e RyR1 sulla membrana del SR. In particolare l'interazione funzionale tra RyR1 e DHPR è basata su un complesso schema di comunicazione che può svilupparsi in direzione ortograde (da DHPR a RyR1) e retrograda (da RyR1 a DHPR).

Alcuni studi hanno identificato nella regione tra i residui 1303 e 1406 (altamente divergente tra i membri della famiglia RyR) la posizione critica per l'accoppiamento E-C e per la comunicazione retrograda tra RyR1 e DHPR⁴³⁻⁴⁴.

Le membrane del tubulo T e quelle del SR sono giustapposte e separate da uno spazio di 10 nm. Il dominio citosolico di RyR1 si

estende proprio in questo spazio. Studi di microscopia elettronica mostrano che l'isoforma scheletrica di DHPR sul tubulo T è organizzata in *clusters* di 4 molecole (tetradi). Queste tetradi sono poi disposte in uno speciale schema. I canali di RyR1 nella membrana del reticolo sarcoplasmatico sono organizzati in modo corrispondente; infatti DHPR e RyR sono raggruppati e allineati in modo che ogni canale RyR1 sia associato ad una tetraide di DHPR. Nel muscolo cardiaco invece c'è circa 1 DHPR ogni 5-10 canali RyR2 e i canali DHPR e RyR2 non sono allineati in uno schema altamente ordinato.

La regione nell'ansa citosolica II-III della subunità alfa di DHPR (residui 720-765) sembra critica per l'interazione con RyR1⁴⁵⁻⁴⁶L'espressione di proteine chimeriche RyR1/RyR2 in miotubi dispedici (privi di RyR1) indicano che due regioni di RyR1 (aminoacidi 2659-3720 e 1635-2636) sarebbero coinvolte in quest'interazione. I canali RyR1 non sono tutti accoppiati con DHPR nel muscolo scheletrico, infatti una parte di RyR1 è disaccoppiato a DHPR e si attiva in seguito al processo di CICR come accade per RyR2⁴⁷⁻⁴⁸.

Differenze importanti tra l'isoforma cardiaca e scheletrica vanno rintracciate nella loro organizzazione ultrastrutturale sulla membrana sarcoplasmatica in relazione alle molecole di DHPR, e quindi sulle modalità di interazione tra questi due canali e sulla dinamica dell'accoppiamento E-C. Infatti nel muscolo cardiaco l'omotetramero RyR2 non si trova accoppiato a DHPR sulla membrana plasmatica, ed a seguito del processo di depolarizzazione il canale diidropiridinico si apre direttamente, facendo entrare ioni calcio dall'esterno ed innescando l'attivazione di RyR2 per il processo di CICR.

1.9 Proteine accessorie della triade giunzionale

La **calmodulina** o CaM è una proteina citosolica di 16,7 kDa legante il calcio che contiene 4 domini *EF-hand* per il legame del calcio nelle regioni C-terminale e N-terminale. Questa proteina lega

i canali RyR in proporzioni stechiometriche⁴⁹⁻⁵⁰ (fig.10). La CaM può sia attivare (a basse concentrazioni di Ca^{2+}) che inibire (ad alte concentrazioni di Ca^{2+}) RyR³⁶. E' stato proposto che la CaM si leghi anche a DHPR e che sia quindi implicata nell'interazione DHPR-RyR³⁷. Ogni canale RyR1 può legare 4 molecole di calmodulina nella regione di residui 3614-3643.

La **calsequestrina** è una proteina localizzata sulla faccia giunzionale della membrana del reticolo sarcoplasmatico, il suo ancoraggio alla membrana sembra legato ad altre due proteine transmembrana, la giunctina e la triadina (fig.10). L'effetto della calsequestrina è ancora controverso anche se è la principale proteina di legame del calcio nel SR⁵¹. La calsequestrina sarebbe in grado di modulare l'attività di RyR grazie anche alla presenza della triadina direttamente associata a RyR⁵². **FKBP12** è una cis-trans prolini isomerasi originariamente identificata come il recettore del farmaco FK506. La famiglia FKBP include almeno cinque membri con massa molecolare tra 12 e 52kD. Tale proteina è stata proposta esercitare un ruolo nella stabilizzazione della conformazione chiusa di RyR1 e nella regolazione dell'E-C favorendo l'interazione della coppia DHPR-RyR⁵³.

Le **proteine Homer** sono una famiglia di proteine che si legano a recettori del glutammato tramite uno speciale dominio ricco di proline. Tale dominio è stato trovato anche in RyR1 ed esperimenti vari hanno evidenziato come tale proteina sia in grado di aumentare la *open probability* del canale RyR1.

La **triadina** e la **giunctina** sono proteine integrali di membrana localizzate sulle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico (fig.10). Entrambe mostrano un singolo dominio transmembrana, un corto dominio N-terminale citoplasmatico e un lungo dominio di coda C-terminale nel lume del SR. La giunctina può legare direttamente la calsequestrina, la triadina e RyR1 con il suo dominio C-terminale. La triadina può anch'essa legare giunctina, la calsequestrina e RyR1 col suo dominio liminale. Le due proteine servirebbero come ancoraggio di calsequestrina vicino RyR1. Domini di legame per la triadina su RyR1 sono: D4878, D4907, E4908⁵⁴⁻⁵⁵.

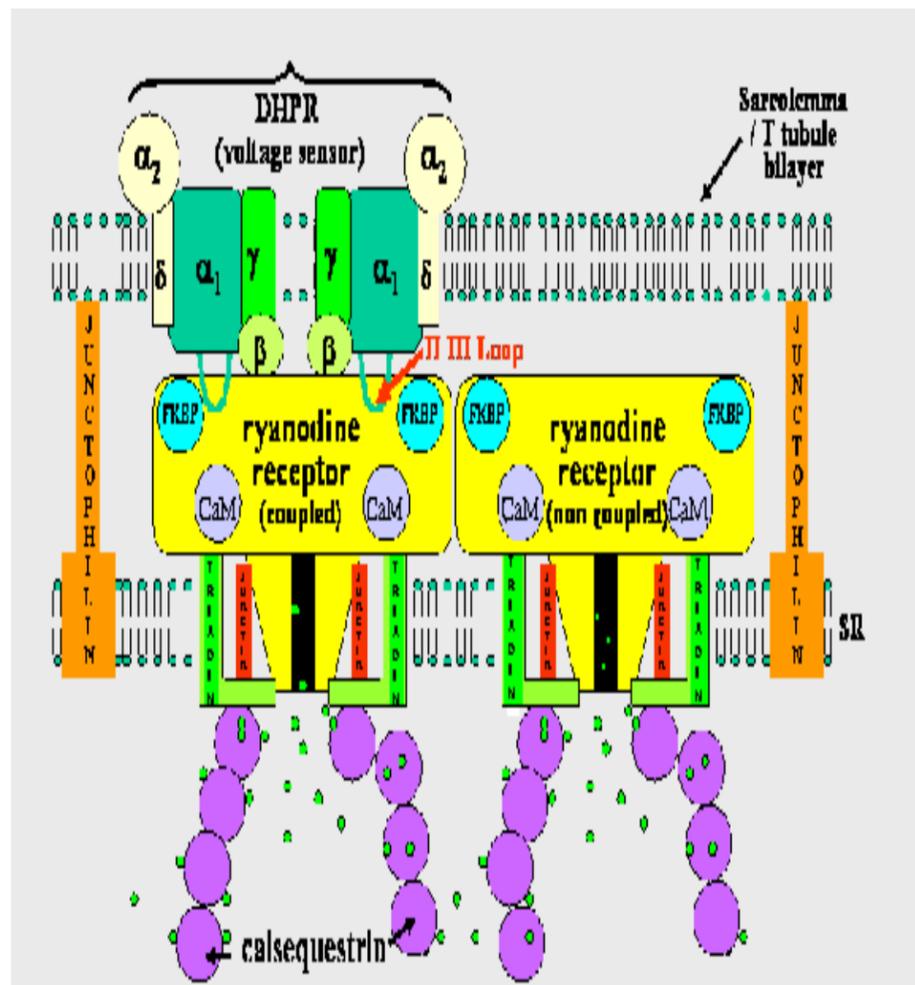


Fig. 10 RyR1 e proteine accessorie nel complesso della triade giunzionale.

1.10 Contributo delle indagini genetiche alla diagnosi di suscettibilità all'ipertermia maligna

Le indagini genetiche che possono essere attuate al fine di valutare la suscettibilità all'MH si basano su metodiche di diagnosi diretta del difetto genetico, allo scopo di analizzare l'eventuale presenza delle mutazioni note del gene RYR1, responsabili di più del 50% dei casi di MH. Il Gruppo Europeo di MH nel 2001, ha pubblicato le linee guida per i test genetici per la diagnosi di MH⁵⁻⁶.

Le linee guida suggeriscono che una mutazione del gene RYR1, può essere considerata causativa di MH, solo quando è stato dimostrato, mediante saggi funzionali *in vitro* sui canali RyR1 mutati, che essa altera le proprietà di rilascio del calcio di RyR1, e stabiliscono che un individuo portatore di tale mutazione può essere considerato MHS ai fini clinici sulla base dei soli dati genetici anche in assenza del risultato dell'IVCT su prelievo biotico. È importante sottolineare che l'inverso non è valido: soggetti appartenenti a famiglie in cui segregano mutazioni causative e che non presentano la mutazione non possono essere considerati MHN sulla base dei soli dati genetici, ma devono essere sottoposti all'IVCT. Non è possibile, infatti escludere che altre mutazioni nel gene RYR1, o in altri geni, coinvolti nell'omeostasi del calcio intracellulare, siano presenti e conferiscono suscettibilità all'MH. Nelle linee guida del 2001, sono riportate le mutazioni saggate *in vitro* e quindi ritenute causative di MH, perché alterano le proprietà del canale di rilascio del calcio. A partire da questa data però, altre mutazioni sono state caratterizzate nei diversi laboratori di ricerca e possono quindi essere considerate causative. È importante poi sottolineare che proprio grazie all'indagine genetica è stato possibile evidenziare alcune discordanze tra genotipo e fenotipo nell'MH (Robinson et al 2003 EJHG) come quelle particolarmente pericolose di soggetti tipizzati MHN con l'IVCT e dimostrati portatori di mutazioni causative di MH. In questi casi l'indagine genetica risulta determinante per una corretta diagnosi di rischio di suscettibilità all'MH.

1.11 Saggi funzionali sui canali RyR1 mutati

Per la caratterizzazione funzionale di mutazioni in RyR1 sono stati riportati diversi sistemi sperimentali.

- **espressione eterologa del cDNA mutagenizzato del gene RYR1 murino o di coniglio**
 1. nella linea cellulare HEK293, derivata da epitelio renale umano e che non esprime RyR1. Tali saggi permettono un'analisi della risposta del canale in termini di rilascio di calcio citoplasmatico in seguito a stimolazione di tipo chimico del canale stesso e la valutazione della risposta in un contesto in cui RyR1 è isolato dagli altri fattori proteici presenti nel contesto cellulare muscolare (biblio). Per la valutazione del rilascio di calcio citoplasmatico sono stati utilizzati degli indicatori fluorescenti in grado di legare il calcio come il fura-2 AM.
 2. in miotubi di topi dispedici cioè topi *knock-out* per il gene RyR1. Questi saggi permettono di analizzare la risposta del canale a stimoli chimici ed elettrici. Con tecniche elettrofisiologiche di *patch-clamp* in modalità whole-cell è infatti possibile studiare l'accoppiamento ortograde e retrogrado tra DHPR e RYR1, nonché le proprietà di *gating* del canale rianodinico stesso(biblio). Per la valutazione del rilascio di calcio citoplasmatico sono stati utilizzati degli indicatori fluorescenti in grado di legare il calcio come il fura-2 AM.
- **studio diretto del canale rianodinico da cellule e tessuti prelevati da pazienti.** In questi sistemi cellulari si superano le problematiche connesse con i processi di transfezione, sfruttando l'espressione autologa ed in eterozigosi del gene

RyR1 mutato in contesto fisiologico.

1. in linfociti B estratti da pazienti MHS e immortalizzati con il virus Epstein-Barr. La procedura di estrazione di linfociti B è semplice, poco costosa e poco invasiva. In questo sistema cellulare non è chiaro, però, se e quali proteine della triade giunzionale sono espresse. Per la valutazione del rilascio di calcio citoplasmatico sono stati utilizzati degli indicatori fluorescenti in grado di legare il calcio come il fura-2 AM e sistemi microfisiometrici che misurano la variazione di attività metabolica cellulare come rilascio protonico extracellulare.
 2. in miotubi ottenuti da cellule satelliti muscolari prelevate da pazienti MHS. In questo sistema cellulare è possibile valutare risposte a stimolazioni chimiche ed elettriche, ma l'influenza di altre proteine coinvolte nel processo di rilascio del calcio potrebbe portare ad una sovrastima o sottostima dell'effetto della mutazione presente nel canale RyR1. Per la valutazione del rilascio di calcio citoplasmatico sono stati utilizzati degli indicatori fluorescenti in grado di legare il calcio come il fura-2 AM e sistemi microfisiometrici che misurano la variazione di attività metabolica cellulare come rilascio protonico extracellulare. Inoltre le procedure standard per l'isolamento di tali cellule dal tessuto muscolare del soggetto prevedono il prelievo di una biopsia muscolare, metodica questa abbastanza invasiva e per questo non praticabile in soggetti molto giovani. Si richiede pertanto la messa a punto di tecniche di estrazione di materiale bioptico più delicate, come l'utilizzo dell'ago aspirato.
- **studio del canale RyR1 estratto dal contesto cellulare in doppio strato lipidico.** In questi esperimenti si valuta la differente capacità del canale isolato di legare specifici ligandi, come la rianodina, il dantrolene ecc.

In questo lavoro di tesi sono stati messi a punto dei saggi di rilascio

protonico extracellulare in risposta ad agenti stimolanti RyR1 in cellule linfoblastoidi provenienti da pazienti con una mutazione nel gene RYR1 ed immortalizzate con il virus Epstein-Barr.

2 Materiali e metodi

2.1 Iter sperimentale

Al fine di analizzare il DNA dei pazienti MHS per la presenza di mutazioni nel gene RYR1 è stata adoperata la seguente strategia sperimentale:

- Estrazione di DNA genomico umano.
- Utilizzo di 116 coppie di oligonucleotidi di innesco per amplificare, mediante la tecnica della PCR, tutti gli esoni del gene RYR1.
- Utilizzo delle tecniche di DHPLC (per rilevare la presenza di alterazioni nei frammenti di amplificazione).
- Sequenziamento dei prodotti di amplificazione che abbiano mostrato un pattern di eluizione anomalo al DHPLC.

Per caratterizzare funzionalmente l'effetto delle mutazioni identificate nel comportamento del canale di rilascio del calcio, è stato seguito il seguente approccio sperimentale:

- Prelievo di campione di sangue da soggetti MHS e MHN
- Estrazione di linfociti B dal prelievo.
- Immortalizzazione dei linfociti B con il virus Epstein-Barr
- Espansione dei cloni cellulari ottenuti.
- Saggi di rilascio protonico per la valutazione della risposta cellulare a sostanze stimolanti il canale RyR1.

2.2 Pazienti

L'analisi molecolare del gene RYR1 è stata condotta su 20 soggetti MHS appartenenti a famiglie dell'Italia centro-meridionale in cui sono stati identificati casi di suscettibilità di ipertermia maligna tramite IVCT o in seguito a crisi ipermetaboliche durante l'anestesia. I campioni biologici sottoposti all'analisi di mutazioni sono pervenuti dal Centro di Ipertermia Maligna dell'Italia Centro-Meridionale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Napoli "Federico II", diretto dalla Prof.ssa E. Gravino, che ha anche effettuato l'IVCT.

2.3 Estrazione di DNA genomico umano

L'analisi del gene RYR1 è stata eseguita sul DNA genomico estratto dal sangue periferico secondo il metodo "Salting out".

A ciascun campione di sangue periferico (circa 5 ml), contenente EDTA come anticoagulante, sono stati aggiunti cinque volumi di tampone di lisi per globuli rossi (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, saccarosio 0.32 M, MgCl₂ 5 mM, Triton X-100 all'1%). I campioni sono stati successivamente sottoposti a centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti al fine di ottenere la separazione dei globuli bianchi dai detriti dei globuli rossi e dal siero. Al termine della centrifugazione, si sono separate due fasi distinte: una superiore contenente la parte sierica del sangue e i detriti cellulari, una inferiore contenente i globuli bianchi. Dopo aver rimosso il soprannatante, i leucociti sono stati raccolti e risospesi nuovamente in una soluzione di NaCl 0.15 M per pulire il sedimento. Tale operazione di lavaggio è stata ripetuta due o tre volte fino ad ottenere un sedimento pulito.

Questo sedimento è stato poi risospeso in 2,5 ml di una soluzione di lisi per globuli bianchi (Tris-HCl 0.17 M pH 8.4, EDTA 0.5 M, NaCl 6 M, SDS 0,1%) e incubato per 30 minuti in un bagnetto termostato a 37°C. Successivamente per eliminare tutte le proteine presenti sono stati aggiunti proteinasi K (2 µg/ml) e SDS (1,3%) e lasciati agire per 10 minuti a 60°C. In seguito per precipitare il DNA si sono aggiunti 1,68 ml di NaCl 6M ed i campioni sono stati poi centrifugati

a a 2500 rpm per 15 minuti. Il sovrantante è stato quindi trasferito in un nuovo tubo da 50 ml dove sono stati poi aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto freddo. Quindi si miscela delicatamente fino alla comparsa di un precipitato di DNA che, con l'aiuto di una pipetta Pasteur, viene trasferito in una nuova provetta. Il DNA viene quindi lavato più volte in etanolo 70% al fine di rimuovere eventuali tracce di sali e successivamente asciugato, prima di essere risospeso in 400 μ l di Tris-HCl 10 mM pH8 e EDTA 1 mM (TE) in tubi eppendorf da 1.5 ml e conservato alla temperatura di 4°C. Il DNA viene poi quantizzato mediante la lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm (coefficiente di estinzione a 260nm $\epsilon^{0.1\%} = 20$). Un rapporto tra i valori dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm di 1,8-2,0 è indice di elevato grado di purezza del DNA rispetto alle proteine.

2.4 PCR

Una tecnica basilare del lavoro sperimentale è stata la reazione a catena della polimerasi (PCR). Questo processo consiste nell'amplificazione specifica di una regione di DNA sfruttando l'azione di una DNA polimerasi termostabile su uno stampo di DNA in presenza di un eccesso di due oligonucleotidi sintetici di innesco, dei quattro deossiribonucleotidi (dNTP), e di un tampone di reazione (Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM). Tale miscela viene sottoposta ciclicamente ad una fase di denaturazione del DNA stampo, appaiamento DNA-oligonucleotide e polimerizzazione del filamento copia, tramite progressive incubazioni a specifiche temperature.

L'enzima usato per le reazioni di PCR è stato la Taq Polimerasi (Perkin Elmer), con il seguente protocollo di reazione:

Tabella 1 Miscela di reazione PCR

PROTOCOLLO PCR Taq Polimerasi	
REAGENTE	Concentrazione finale
Buffer AmpliTaq 10X	1X
dNTP	0,2 mM
Oligonucleotide F	0,4µg/ml
Oligonucleotide R	0,4µg/ml
DNA genomico	40ng/µl
AmpliTaq Polimerasi	0,02U/µl
Volume finale	50µl

Tale reazione è stata eseguita impiegando l'apparecchiatura per PCR GenAmp PCR System 9600 o 2400 dell'Applied Biosystem con un il seguente schema di amplificazioni:

Tabella 2 Protocollo di reazione PCR

Denaturazione iniziale	95 °C	5'	
Denaturazione	95 °C	45"	35 c i c l i
Appaiamento	Tm	45"	
Polimerizzazione	72 °C	45"	
Polimerizzazione finale	72 °C	7'	
	10 °C	Hold	

L'amplificazione di alcune regioni del gene RYR1 ha reso necessario l'utilizzo di un diverso protocollo di reazione, detto

Touch-Down (tab.3). Tale protocollo garantisce una maggiore specificità nell'appaiamento oligonucleotide-DNA stampo e quindi una elevata specificità nei prodotti di amplificazione durante i primi cicli di reazione. La maggiore rappresentatività dei filamenti di DNA così specificamente amplificati permette poi, durante gli ultimi cicli di PCR (dove l' appaiamento oligonucleotide-DNA è meno stringente), la loro espansione selettiva rispetto ad eventuali prodotti di amplificazione aspecifici.

Tabella 3 Schema PCR *touch-down*

SCHEMA PCR TOUCH-DOWN			
Denaturazione Iniziale		94 °C	5'
14 C I C L I	Denaturazione	94 °C	20''
	Appaiamento	T_m+7 °C con un Δ -0.5 °C per ogni ciclo	40''
	Polimerizzazione	72 °C	45''
25 C I C L I	Denaturazione	94 °C	20''
	Appaiamento	T_m	40''
	Polimerizzazione	72 °C	45''
Polimerizzazione Finale		72 °C	7'

Per l'analisi al DHPLC i prodotti di PCR ottenuti per ogni amplicone da un soggetto in analisi, sono stati mescolati in quantità equimolari con gli ampliconi corrispondenti ottenuti da un DNA wilde type controllato per sequenza. Le miscele dei due DNA viene denaturata e poi lasciata lentamente rinaturare per permettere la formazione di eteroduplex nel caso in cui il DNA del soggetto in analisi presenti

qualche sostituzione in omozigosi.

Tabella 4 Condizioni di PCR per gli esoni del gene RYR1

Esone	Oligonucleotidi		Ta (°C)	Lunghezza amplicone (bp)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>		
1	RYREX1F GGTATGTGGCAGGGCTCC	RYREX1R CTCAGAGACCACCAGCAAGC	48°C	396
2	RYREX2F TGTGGTATCCGGCCAGGCC	RYREX2R CACCTCCTTCAGACTCCAGAACC	59°C	269
3	RYREX3F CTC AAGAGTGTGGCATCC	RYREX3R GCCCTAAACGACCCCTGG	49°C	276
4	RYREX4F TGGAGAGTCCGGGATCTGTGC	RYREX4R GAGGTCAGCCTCCTTCTAGCAGGC	59°C	195
5	RYREX5F GAGTGCAACCTCGGTGGGCTGG	RYREX5R TCTCATGCTTGCCTTGGCGTCTGC	63°C	255
6	RYREX6F GGCAGTGATAGGAGAGTTGTGGCC	<i>RYREX6R</i> <i>ACCTGGGAGCAGGAGGAACCGC</i>	62°C	264
7	RYREX7F CTCGCCACCCCTGCAATCG	RYREX7R TATGCCTGAAGGCAACATTAAGGG	61°C	217
8	RYREX8F TCCAGCCTCCCATGACCAACTTCC	RYREX8R TCATAGGGTCCCAGCCCTCCACG	62°C	198
9	<i>RYREX9F ATTCCGGGAGCTGAACCC</i>	RYREX9R CTTCCCTCAAGACCTTTTCTGTCC	52°C	207
10	RYREX10F GGGGTCTCTGACTCCCTTGGC	RYREX10R AGTGCAGGCTGGGCTGGGACGGG	64°C	257
11	RYREX11F GCTCCCTGCTAAACACAG	<i>RYREX11R CCTGGACTCAAGCGATTCTCC</i>	63°C	279
12	<i>RYREX12F</i> <i>GGGCAAGTGCAGAACTCAAGTC</i>	<i>RYREX12R</i> <i>TTAGACAAGGGTGTGGCAAC</i>	54°C	236
13	RYREX13F CGTTGCGGCAGTTAGCGC	RYREX13R GCCCACAGGCCGCTCCG	58°C	285
14	<i>RYREX14F</i> <i>AGACAAGGAAGGGAGGCCTGG</i>	<i>RYREX14R</i> <i>GGTGTGATCCAATAGGACTGGG</i>	59°C	265
15	<i>RYREX15F</i> <i>CCAGTCCTGACTCCCTGAGAACACC</i>	<i>RYREX15R</i> <i>TGCCAGAATGAGAGTTGAAGCG</i>	62°C	218
16	<i>RYREX16F</i> <i>GAGGCTGTGGGAGGGATGG</i>	RYREX16R GGAGGAGCAGAGTTCTGGAGCCC	61°C	261
17	<i>RYREX17F</i> <i>CAGGGTCTCTGTAGAGCCTGCC</i>	RYREX17R CTGGGTCAGATGTTGAGGCC	60°C	226

18 (I)	RYREX18F(I) TTGGCTTCCTCTCTGCCTCTCCG	RYREX18R(I) TCATCGCCGACCCCGTTGCC	58°C	258
18(II)	RYREX18F(II) AGCTCAGGCCACCCACTTGCG	RYREX18R(II) GACTTAGAAAATGCTGGGGTCAATGG	60°C	202
19	RYREX19F TGGTTCTGTGGGACTGTGACG	RYREX19R GGTCTGAGGACTGGCCGTGG	61°C	282
20	RYREX20F TGATCCCATGTCTCTTACCC	RYREX20R CCTCGCCAGAAAACCTTGCAGG	62°C	278
21	RYREX21F ATGGTGGAAAGGGGTGCT	RYREX21R ATGACCCCTGACCTCCAACC	54°C	375
22	RYREX22F GTGGGAGTGGGAAGGAAAG	RYREX22R AATCCCTGTCCCTCCATCC	54°C	275
23	RYREX23F TGGAGACCCTGAGCCGTGG	RYREX23R TCGACCTCCCGACCCCTTAGC	58°C	243
24 (I)	RYREX24F(I)GCAGAGCCCGAAGTGGAGG TGAGG	RYREX24R(I) TGCTGCGCTTGGTGGCTTCATCC	64°C	341
24(II)	RYREX24F(II) CAGGGCTGGAGCTACAGCCAGTG	RYREX24R(II) ATCGGGCTGGGGTCAGAGTTGG	65°C	235
25(I)	RYREX25F(I) CCAACTTCTCGATGTCTGGGATC	RYREX25R(I) CGCATCTCGCCTGTGGTGAC	54°C	190
25(II)	RYREX25F(II) CGCATCTCCGGGCAGAGAAATCC	RYREX25R(II) TGGGAGAGACCACAGGACCTGGCAG	66°C	217
26	RYREX26F CCTTATCTCTCCATTCTCTGTGTG	RYREX26R AGAAGGGCAGTGCAGGGTTG	54°C	308
27	RYREX27F CCAACTCTCCATCCCTACCTCC	RYREX27R AGCACTGTGGAAGGAGGAGC	58°C	362
28(I)	RYREX28F(I) TATGGCTAATGGTGGCTCCGTGTG	RYREX28R(I) TTCGGTCTCTGCCTCGCTCC	61°C	376
28(II)	RYREX28F(II) GCACTTCCGTGCACTGC	RYREX28R(II) CAGGTTACTGTGGTTGCTACTTG	49°C	341
29	RYREX29F ATATTGCGGTGGGAGGGTGGGC	RYREX29R GGGCACTACTGGGACTGTACAC	66°C	291
30	RYREX30F GGGACCCGAGTCCCTGACTTC	RYREX30R AGCTCTGACTGCCTCTGCCCTC	64°C	279
31	RYREX31F TTCCGGAGCTTGGGAAGGG	RYREX31R TCCTGGGATGCTGGGACATGATGC	60°C	300
32	RYREX32F CCTCCCTCAGCCACCCGTTTG	RYREX32R CCCACTCTCCTGCCTCAGCCTG	68°C	194
33	RYREX33F CTGGAAGTGGTGTGGTGGACAGAG	RYREX33R AGGGGCACTGAGTGGGACCCAG	64°C	371
34(I)	RYREX34F(I) GATGCAGGAGGCTCATTCACTGTC	RYREX34R(I) GAAGTGGTACTCAACTCCCGG	64°C	427
34(II)	RYREX34F(II) GGAAGGACACAGAAAATGG	RYREX34R(II) TTTGGGAATGTGGGAGAAG	50°C	357
35	RYREX35F GGCCAGGGCCTGATGATG	RYREX35R TCCCCACTGCCTGAGGACGAAG	58°C	426
36	RYREX36F TTCAAGGAAGTCTGATGGTCTC	<i>RYREX36R</i> GATGTTGAGGTTGGGGTTAGACAG	60°C	318
37	RYREX37F TCTCAGAGTCTCTGCTTTG	RYREX37R CCGATACTGTAGAGGGTTGT	46°C	269
38	RYREX38F TGACAAAATAATGAGTGTGTAAGT	RYREX38R AGGCATGGGGCTACCCAC	50°C	282
39	<i>RYREX39F</i> CCATGTGCCGACCTGCCCTGCATG	RYREX39R GGGCCAGAAGTGGGAAGGGAATG	68°C	424
40	<i>RYREX40F</i> CGCTGTACAGTGGTGGCTATGGC	<i>RYREX40R</i> AGCTCCCGACACCTGCCTGG	63°C	220
41	RYREX41F CAGGGGAGGAGGACCCACAGAG	RYREX41R GGAGTGTGTTGAATGAGTGAGC	58°C	286
42	RYREX42F TACAGACCAGAGGAGGACCTGATCC	RYREX42R AGGTGTCCCAAGCAGCCGGG	61°C	279
43	<i>RYREX43F</i> GCTGAGCCCCAGGAGGAAGTGG	RYREX43R GGAGGTGTGTGACCAGTACTCCG	62°C	259
44	<i>RYREX44F</i> CATGAGACCCCTTTCCCATGCG	<i>RYREX44R</i> GGCGGGTTGCCCTATTGAGG	63°C	256
45	<i>RYREX45F</i> TGCTCCCCAACCACCCACCTTC	<i>RYREX45R</i> TGCTGCCCTCCCTCCCATCCTG	62°C	183
46	RYREX46F GCTCTACCTCCTGTGTGGTAAGGG	RYREX46R GCATCACTCCTCCCAAGTTCC	62°C	252
47(I)	RYREX47F(I) GTGACAGGGGATGGAACCTGGCG	RYREX47R(I) TGTCGGGCAGGAACCCACGTC	64°C	231

47(II)	RYREX47F(II) CATCCTTCGTGCCGGACCAAG	RYREX47R(II) TGCTGCTTACCGTGACCCATCTCC	64°C	216
48	RYREX48F CACAGTCGCTCAAGACAGGT	RYREX48R ATGTAGAATCCCCGTCCAG	48°C	430
49	RYREX49F GATTCTACATCTGTGCATTGTCCC	RYREX49R GTAGGAGGGAAGAGCAAACCACTGG	58°C	187
50	RYREX50F TGCCTGCCATTGCTGGTGCC	RYREX50R TTGCAGAACCTTCTCCTCTTGAAC	57°C	285
51	RYREX51F GGGAGGAGGGCTGATGATTGCAGTG	RYREX51R CAGCAGATGTTGGAGCTGGGGTTCC	70°C	343
52	RYREX52F CGGCCTGTGGAGACCTCAAGTG	RYREX52R GGCCTCAGGGAAGAACCAGGTC	66°C	269
53	RYREX53F TGTCTCGGCTCTCCAGGG	RYREX53R AITGCCTCACTCTCCCCGAATC	58°C	246
54	RYREX54F TGGTCAGGGTTTCTGCTTTG	RYREX54R TCTCCTCTCCATCCCTTCCC	48°C	307
55	RYREX55F GTGGAGGGGTAGAATGGAC	RYREX55R AGCTCCTGCTTCTTCTCCG	48°C	328
56	RYREX56F TTAGTGCTGTTACCTGTCCC	RYREX56R TCTACAGATGGAGAAACCGAG	52°C	302
57	RYREX57F GCAAGCAATGTTTCCGTTATTC	RYREX57R TTAGCTCTCCCTCTGGTT	45°C	396
58	RYREX58F GAGGGGAGAAGGTAAGTG	RYREX58R AGGGGAGGACGGATTGAGTG	50°C	395
59	RYREX59F ATTTCCAACTCTGCTCCA	RYREX59R GAGATAAAGGTTCAATGAG	48°C	238
60	RYREX60F CCCCTATTGACCTTTAT	RYREX60R TCAGTCCCGGTACACTAGG	49°C	320
61	RYREX61F CTGCTCTGCTCTCTTGGC	RYREX61R ATAGTCTGTCTCTCCACT	48°C	335
62	RYREX62F AGGAAGAGAGCGGTTGGGG	RYREX62R GGCAGCGGGGAACATCAG	50°C	256
63	RYREX63F GCCCACTCCACCATCATC	RYREX63R CCACATTCAAACACCCAG	49°C	431
64	RYREX64F CTGCTGCTCTTCCCACTG	RYREX64R CATCTACCTGCTTTTACC	50°C	285
65	RYREX65F GGGAGGAGCCGTTTCTATG	RYREX65R CCCAGCCAGCCACTACTAC	50°C	317
66 (I)	RYREX66(I)F TAGTGGGTTGGAGGGTGGAG	RYREX66(I)R TGAGGTGGTCAGAGGTGACA		
66 (II)	RYREX66(II)F CCCAACAGTGTGGAGGAGAT	RYREX66(II)R TGACCCCTGGTCTTTTGATG	52°C	468
67	RYREX67F GAGATGCTGTTGGGAGTCG	RYREX67R AGATCAGATGGGGCTGGAG	50°C	400
68	RYREX68F GAAACCCATCCCTCTGAC	RYREX68R CACAAAGTCTGCTCTCGC	54°C	327
69	RYREX69F AGGAGCTGTTGAGGATGGTG	RYREX69R GAGATGGGAGGAGGAGAAG	48°C	449
70	RYREX70F CCTTCTCAGGTCTCAGAGAA	RYREX70R GGGTGGGGAACAGAAGCAGG	48°C	302
71	RYREX71F CCTGGGGTGTGGATGATG	RYREX71R GGGCTCAGTGGCATTGTGG	54°C	330
72	RYREX72F AAAACCTCTTCAAGTCTCTGG	RYREX72R GTAAATGCTCAAACCTTCACTA	50°C	254
73	RYREX73F TCACCCATTGAGTCTCCCA	RYREX73R AGACCCACCCACATCCTTG	54°C	342
74	RYREX74 F TTCCTTCTGCCGTGTGAGTC	RYREX74R GTGCTTCCGACCTCCCAT	48°C	373
75	RYREX75F GAGAGTCTGGAGAATGGAGG	RYREX75R GCCCTACTTTGGTCTACTC	54°C	370
76	RYREX76F AAACCTCTCCCAAGTCTC	RYREX76R CCCAGATTGCTGGGACTACA	51°C	293
77	RYREX77F AGAGTGTGGGATTACAGGC	RYREX77R ACAAAGCAGACCCCTCCATC	62°C	259
78	RYREX78F ATTTCCCTCTCCCACTGC	RYREX78R TGCTCTGTGAACATGCTG	49°C	250
79	RYREX79F TGAGAATGTGAGGGGAAAG	RYREX79R CAAACCACAGGCATTGAGGG	52°C	354
80	RYREX80F TGGCTGTTTTCTGTTGGGTG	RYREX80R GGAGAACTGGGAGTCACAC	50°C	226
81	RYREX81F CAGGTAACAGAGGCAAAGGG	RYREX81R AAGAGCAGAATCAGAAGTGG	48°C	265

82	RYREX82F GCTAAATGGGTGGTTTCTGG	RYREX82R GGTGGAATCCCAAAGGAAGA	52°C	347
83	RYREX83F GCCTTCTCTCTGTGGGTG	RYREX83R GGGGAAAGTGAAGCTTAGGG	48°C	418
84	RYREX84F CAGTGTCTTTGGAGTGGCAG	RYREX84R GGGCGGAAACTAATCAGTC	52°C	306
85	RYREX85F CTGGCATAACAATAGGAACTC	RYREX85R CCGAGTAGTACCAGTAGAAG	48°C	313
86	RYREX86F CACGGTTCAGGTGTGACTTG	RYREX86R GCGCCCTACCTGGATGTACT	50°C	221
87	RYREX87F TGAGTACATCCAGTAGGG	RYREX87R ACTGACCAAGGGGCAAGA	46°C	310
88	RYREX88F GTAGGTGAGGAGGGGAGAA	RYREX88R CCCTACTCTGGGTGTTTA	50°C	182
89	RYREX89F CGACCTGACATCATTAGC	RYREX89R CAAACAAGGAAAGTGAGG	46°C	532
90	RYREX90F GAATTGAGGCTCTCCAGGTCACC	RYREX90R TCTGAGGGTGCAGGAAGTGAGC	62°C	467
91(I)	RYREX91-IF GCGGTGACCCCTTGTAGCTG	RYREX91-IR AGGCTGCGGTAGCTGAGGCC	55°C	405
91(II)	RYREX91-IF CCGGAGACCGACGAGGACGA	RYREX91-IIR CTCGTCGCTGGTGGGTCGG	58°C	390
91(III)	RYREX91-IIIIF TGCTCTGGGCTCGCTGTTC	RYREX91-IIIR GTGTGTGTCTCCACCAGCC	58°C	453
92	RYREX92F AAAGGAGATGAGAGGAGCAGG	RYREX92R CTACTTAGGAGGAGGCAGTG	56°C	214
93	RYREX93F GCCCTTGGTGAATGTTTG	RYREX93R GGTCTCTTAGAGACGAGC	54°C	350
94	RYREX94F TTTGATTGCAGTAAATGATGGGATG	RYREX94R CCCTGAAATTCTGATAGGGGCTGAGC	62°C	262
95	RYREX95FCCAGTCCAATCTCGGAATGGAG	RYREX95RACCCAGCCAATAAGCCCTTGC	60°C	385
96	RYREX96F TGCTGAGACTATGGTCCAGCCAAGG	RYREX96R ATTACAGGTGTGAGCCACCGTGCC	61°C	315
97	RYREX97F TGTCGTGGCTGACAGCTCTGATCCC	RYREX97R TGCCCAAGGTCACACCAAGCAAG	62°C	216
98	RYREX98F TGCACCTCCCATTTCAC	RYREX98R GAGAGATGCTTGAGTGCAGACTC	46°C	320
99	RYREX99F ATCACAGCCACAATGAGCG	RYREX99R GGAGTCATTCTTGGTCAGG	54°C	303
100	<i>RYREX100F TACCCTCCAGAGTGCTCCTCG</i>	RYREX100R GTTCACTCCCTGTGGCTCTACC	59°C	379
101(I)	RYREX101F(I) TAGAGCCACAGGACTGAACCG	<i>RYREX101R(I) CTTGTTGTAGAACTTGCGGAAGAAG</i>	58°C	187
101(II)	RYREX101F(II) TGATGACCGTGGCCTTCTG	RYREX101R(II) TATTAACCTTCAACAGATGCGAG	52°C	192
102	RYREX102F CGAATGAATGAGTGACCAGTGTGC	RYREX102R TTGACACCCGAGAGGTGACTTGCC	62°C	344
103	RYREX103F GAGGGCAAGCCCTGGAGGTAGGTAGC	RYREX103R GCAAGAGACATCAGAGTGGAGGCC	61°C	232
104	RYREX104F GGAGGATATGGAGGTAGGTATGTC	RYREX104R AGTACCCACTGCTGGCTATTG	58°C	270
105	RYREX105F TTGGGCAACATAGCAAGACTTC	RYREX105R CTTTTACTGCCACCTACTGAC	54°C	231
106(I)	RYREX106 F(I) CAACAGAGCAACACCTGTC	RYREX106R(I) ACTAAGGGGCTTGCTGTGAG	56°C	254
106(II)	RYREX106F(II) AAGAGAGATGTTGGGATTC	RYREX106R(II) GAAACAATTCTGGATGTCC	55°C	269

2.5 Elettroforesi del DNA su gel d'agarosio

Una volta effettuata la reazione di PCR è stata utilizzata l'elettroforesi su gel d'agarosio per verificare la qualità dell'amplificazione e la sua specificità. I prodotti di PCR sono stati caricati su matrici di gel al 1.5% e corsi in una camera elettroforetica con un tampone formato da Tris-borato 89mM, pH 8.3, EDTA 0.2 mM (TBE 1X) ed una differenza di potenziale stabilita agli elettrodi di 100V. La migrazione come bande su gel dei singoli ampliconi avviene con una velocità dipendente dalle dimensioni del prodotto di amplificazione stesso. La presenza di un marcatore di peso molecolare noto (DNA del fago ϕ x174 digerito con Hae III) ha permesso di identificare le dimensioni della banda in esame.

2.6 DHPLC

La "Denaturing High Performance Liquid Chromatography" è una modernissima tecnica di analisi del DNA che consente di separare frammenti di DNA di dimensioni differenti, di misurarne la lunghezza e di identificare variazioni puntiformi (di singoli nucleotidi).

Il principio attorno a cui gravitano tutti gli elementi di questa metodica sperimentale è il seguente: nel DHPLC viene mescolato il frammento di DNA di controllo con quello da analizzare. Tali frammenti vengono denaturati e lasciati poi rinaturare a formare la doppia elica. In questo modo possono appaiarsi sia con il loro filamento complementare, originando un omoduplex che con quello non perfettamente complementare, generando un eteroduplex. Si possono formare due eteroduplex diversi e due omoduplex diversi. Va notato però che non sempre le condizioni di corsa sul DHPLC sono in grado di risolvere un eteroduplex dall'altro, così come un omoduplex dall'altro dando picchi distinti. Questo non pregiudica comunque la sensibilità della tecnica nel rilevare le alterazioni nucleotidiche perché un tracciato diverso da quello di un DNA controllato per sequenza e che viene inserito in ogni analisi cromatografica è indizio di una differenza nella sequenza del DNA.

Gli eteroduplex mostrano alcune porzioni di singola elica per il difettoso appaiamento (*mismatch*) delle basi non complementari affacciate nel doppio filamento. Proprio questo *mismatch* costituisce la chiave di volta del sistema DHPLC. Infatti i frammenti di DNA corrono nella colonna a temperature di parziale denaturazione, in modo che gli eteroduplex abbiano una porzione maggiore di singola elica nella zona di mismatch rispetto agli omoduplex. La proprietà fondamentale di tali bolle di denaturazione nel DNA a doppia elica è quella di avere una minore densità di gruppi fosfato e quindi una minore densità di carica rispetto al doppio filamento. Questa caratteristica viene sfruttata per ottenere una separazione degli eteroduplex dagli omoduplex. Infatti la quantità di carica presente per unità di superficie influisce direttamente sul numero di molecole-ponte di acetato di trietilammonio (TEAA) presenti nel tampone di corsa e capaci di legarsi elettrostaticamente ai gruppi fosfato del DNA. Il TEAA infatti è una molecola anfipatica con un N quaternario carico positivamente e gruppi alchilici che interagiscono con la resina apolare. Il processo di eluizione avviene con un gradiente di acetonitrile, una molecola che compete con il DNA-TEAA per il legame con la colonna. Il processo di separazione cromatografica si risolve in funzione del numero di cariche negative della molecola del DNA (valore proporzionale alle dimensioni delle molecole di DNA) e della densità di carica delle molecole di DNA. Pertanto la presenza di una bolla nella doppia elica del DNA, in opportune condizioni di corsa, garantisce una minore ritenzione della molecola di acido desossiribonucleico sulla matrice stazionaria e quindi un tempo di eluizione inferiore a quello dell'omoduplex.

Addentrando ora più nel dettaglio dell'apparecchiatura per il DHPLC è utile descrivere i suoi elementi più importanti.

Sistema cromatografico formato da:

- una colonna cromatografica contenente una fase stazionaria formata da particelle di polistirene-divinilbenzene (di dimensioni di $2.1\mu\text{m}$) sottoposte alla reazione di alchilazione, necessaria per un'analisi ad alta risoluzione degli acidi nucleici.
- Un sensore spettrofotometrico di rilevamento del DNA.

- Pompa che assicuri un flusso costante attraverso la colonna di separazione cromatografica.

Il sistema cromatografico utilizza un tampone di corsa formato da una miscela di due soluzioni A e B. La soluzione A consiste di 0.1M di TEAA, pH 7.0, mentre la seconda di 0.1M di TEAA e 25% di acetonitrile pH 7.0. E' presente anche la soluzione D, che contiene acetonitrile al 70% e serve per il lavaggio della colonna, e la soluzione di acetonitrile all'8% (soluzione C) che serve per il lavaggio della siringa di iniezione dei campioni nella colonna.

Tutte le fasi dell'analisi nell'apparecchiatura Transgenomic WaveSM DNA Fragment Analysis System sono di seguito riportate:

- I campioni di DNA dopo la reazione di PCR vengono posizionati nella piastra del DHPLC.
- La siringa preleva 4 µl del campione e lo immette nel flusso di tampone di corsa pompato verso la colonna.
- Il campione attraversa la colonna e subisce il processo di separazione cromatografica.
- Un rivelatore agli UV registra il passaggio delle molecole di DNA.
- Eluizione dei frammenti di DNA dal sistema.
- Lavaggio della colonna e della siringa.
- Equilibratura della colonna con tampone 50% A e 50% B.

Le percentuali relative delle due soluzioni A e B nel tampone di corsa variano durante la migrazione dei frammenti nella colonna: al momento di caricamento del campione le percentuali sono 58% A e 42% B, mentre al termine della corsa si registrano valori di 25% A e 75% B. La durata di ogni singola corsa si aggira intorno ai 6 minuti, ma il metodo può essere ottimizzato per tempi minori.

Un tipico cromatogramma in uscita dal sistema si compone di vari picchi. I primi due, in ordine di tempo di eluizione, raccolgono gli eteroduplex, i successivi contengono gli omoduplex. Il rilevamento di una alterazione nella sequenza del DNA scaturisce dalla

presenza di picchi di eteroduplex.

La DHPLC è una tecnica la cui sensibilità dipende dalla temperatura alla quale l'analisi è effettuata, che viene scelta considerando che la denaturazione non deve essere superiore al 10-20%. Il programma WaveMaker, data la sequenza nucleotidica da analizzare, fornisce automaticamente il profilo di denaturazione termica. Spesso, per alcune sequenze non si ottiene un profilo di denaturazione omogeneo, per cui l'analisi è effettuata a varie temperature, che permettono di analizzare regioni della sequenza con profili di denaturazione diversi.

2.7 Analisi di sequenza del DNA

Tutti i campioni che hanno presentato un pattern di eluizione diverso da quello di un campione controllo sono stati poi analizzati per sequenza. La sequenza è stata eseguita presso il CEINGE con un sequenziatore automatico e utilizzando la chimica dei dideossi NTP fluoresceinati e gli stessi oligonucleotidi di innesco utilizzati per le reazioni di PCR.

2.8 Immortalizzazione dei linfociti B umani

Il processo di immortalizzazione dei linfociti B umani, mediante l'infezione con il virus di Epstein-Barr (EBV), permette di ottenere una linea cellulare linfoblastoide EBV positiva continua, cioè in grado di crescere ininterrottamente in vitro⁵⁹. Tale aspetto risulta essere di estrema importanza nell'ambito delle biotecnologie cellulari in quanto, la stessa linea cellulare non infettata dal virus, è in grado di sopravvivere per poco tempo in vitro. Tutte le linee cellulari, comprese quelle ematopoietiche, possono essere conservate in azoto liquido, mediante l'uso di provette dedicate alla crioconservazione. L'utilizzo di tale sistema permette il mantenimento delle caratteristiche biologiche del campione quali la vitalità, il fenotipo ed il genotipo ed offre la possibilità di riavvalersi in qualsiasi momento dell'identico materiale.

Per l'allestimento delle colture cellulari di linfociti B immortalizzati è

stata la seguente strategia:

- A. Estrazione da sangue periferico di linfociti B di pazienti portatori di mutazioni nel gene RYR1 e linfociti B di pazienti controllo,
- B. Colture virali da cellule B95-8,
- C. Infezione dei linfociti B con EBV, immortalizzazione e stabilizzazione della linea cellulare dei linfociti B,
- D. Isolamento del clone cellulare.

2.8.1 Estrazione di linfociti B da sangue periferico

Il campione biologico, rappresentato da sangue periferico dei pazienti portatori delle mutazioni del gene RYR1 (Arg530His; Arg2163Pro; Val2212Asp; Asn2342Ser; Glu2371Gly; Arg2454His; Cys4659Arg), viene sottoposto alla separazione cellulare su gradiente di densità costituito da Ficoll-Hypaque (densità = 1.077 g/dl). L'intera procedura che riguarda tale separazione, viene eseguita con soluzioni ed utensili sterili, nonché mediante l'utilizzo di una cappa a flusso laminare di tipo II. Il campione di sangue periferico viene diluito nella proporzione 1:2 con una soluzione di *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sterile 1X, per portare il numero di globuli bianchi a circa $10 \times 10^6 - 20 \times 10^6$ cellule/ml. Successivamente, all'interno di ciascuna provetta da 15 ml, in cui sono già stati depositi 3 ml di Ficoll, si procede alla lenta stratificazione di 7 ml della sospensione cellulare precedentemente diluita. Le provette così allestite vengono centrifugate a 1500 rpm alla temperatura di 18°C per 30 minuti. Al termine della centrifugazione la sospensione cellulare risulta così stratificata (procedendo dall'alto verso il basso): plasma, cellule mononucleate, piastrine, granulociti ed eritrociti. Si raccolgono le cellule mononucleate e si risospendono delicatamente in una appropriata quantità di PBS 1X, tale da operare una diluizione 1:10 rispetto al volume iniziale. In seguito, quest'ultima sospensione cellulare è centrifugata per 10 minuti ed il pellet è lavato con PBS per due volte. Successivamente si effettua la conta e la misurazione della vitalità cellulare, mediante l'impiego della camera di Bürker e del colorante Trypan Blue, le cellule sono risospese alla concentrazione di circa 1.0×10^7 cellule in 3 ml di terreno Iscove Modified

Dulbecco's Medium (IMDM) (Biochrom KG, Berlin Germany) con 20% di siero fetale bovino (Gibco BRL Life Technologies, Paisley, UK) e 1% di L-Glutamina (Gibco BRL Life Technologies, Paisley, UK).

2.8.2 Colture virali da cellule B95-8

Il virus di Epstein-Barr appartiene alla famiglia degli Herpes Virus e normalmente infetta la linea cellulare B95-8 che secreta un alto titolo di particelle virali, in grado di infettare in vitro i linfociti B isolati da pazienti donatori. Quindi, inizialmente è necessario coltivare la linea cellulare B95-8 seguendo le linee guida riportate sulla relativa scheda tecnica. Al termine del periodo di duplicazione cellulare è necessario raccogliere e contare le cellule per poterle piastrare successivamente alla concentrazione di 200.000 cellule/ml in terreno RPMI 1640 (Seromed, Biochrom KG, Berlin Germany), con 10% di siero fetale bovino e 1% di L-Glutamina, incubandole ad una temperatura di 33°C e in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, per un periodo di 3 settimane. Al termine del periodo di incubazione si raccoglie la sospensione cellulare, si centrifuga a 2000 rpm per 10 minuti, si raccoglie il sovrnatante contenente le particelle virali e lo si utilizza successivamente.

2.8.3 Infezione e stabilizzazione dei linfociti B

Si opera una diluizione 1:2 della sospensione cellulare proveniente dai pazienti utilizzando 3 ml di sovrnatante contenenti le particelle virali di Epstein-Barr, ottenuto precedentemente. Si coltiva la sospensione cellulare in fiasche sterili T-25, incubandola ad una temperatura di 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Si osserva accuratamente la coltura con un microscopio a contrasto di fase e si procede con il cambio di terreno colturale una oppure due volte a settimana. La presenza di aggregati cellulari all'interno della coltura, è indice dell'avvenuta infezione virale, si può quindi procedere alla stabilizzazione, criopreservazione mediante l'uso di provette specifiche, e al mantenimento della stessa linea cellulare

attraverso cambi a giorni alterni del terreno di coltura completo, piastrandole ad una concentrazione di 500.000 cellule/ml. Seguendo tale protocollo, abbiamo infettato i linfociti B dei pazienti portatori delle mutazioni Arg530His, Arg2163Pro, Val2212Asp, Asn2342Ser, Glu2371Gly, Arg2454His e Cys4659Arg.

2.8.4 Isolamento del clone cellulare

Avvenuta la stabilizzazione della linea cellulare si prosegue piastrandole le cellule in piastre da più pozzetti, effettuando delle diluizioni scalari della concentrazione iniziale nel terreno di coltura. Procedendo in questo modo si arriva ad isolare un'unica cellula, la quale duplicandosi si espanderà dando origine ad un clone cellulare che deriva da un'unica cellula madre.

I cloni cellulari ottenuti sono stati caratterizzati per tempo di duplicazione (48h circa) e per la presenza delle mutazioni del gene RYR1.

2.9 Cytosensor

2.9.1 Premesse biologiche

Le cellule eucariotiche per la loro vita necessitano di energia sotto forma di ATP. Tale molecola è continuamente formata e idrolizzata nei normali processi metabolici. Le reazioni chimiche di formazione delle molecole di ATP, attraverso i processi di respirazione cellulare e glicolisi, portano all'accumulo nel citoplasma di ioni H^+ .

I sistemi cellulari hanno sviluppato apparati molto sofisticati per mantenere sotto controllo il pH nel citoplasma, in quanto tale parametro influisce notevolmente sull'attività di tutto il complesso proteico cellulare. Il principale strumento che le cellule hanno a disposizione per ridurre la concentrazione protonica cellulare, è la pompa ad antiporto Na^+/H^+ . Tale pompa si attiva nel momento in cui si raggiunge una certa soglia di pH nella cellula e sfrutta il gradiente

chimico favorevole dello ione Na^+ per riversare nello spazio extracellulare gli ioni H^+ . Tale attività anche se indirettamente, consuma energia sotto forma di ATP (fig11).

Lo ione Ca^{2+} è uno ione molto importante nella cellula in quanto funge da secondo messaggero per la trasmissione di specifici segnali cellulari dall'ambiente extracellulare ed intracellulare. Pertanto la sua concentrazione nel citoplasma è finemente regolata. Esistono numerose vie di ingresso di Ca^{2+} nel citoplasma: dall'esterno tramite i canali diidropiridinici ed acetilcolinici; dai depositi interni tramite i recettori dell'inositolo trifosfato e i canali rianodinici sul reticolo endoplasmatico. Vie di fuga del Ca^{2+} dal citoplasma sono poi le pompe attive del calcio SERCA (sul reticolo endoplasmatico) e PMCA (sulla membrana plasmatica).

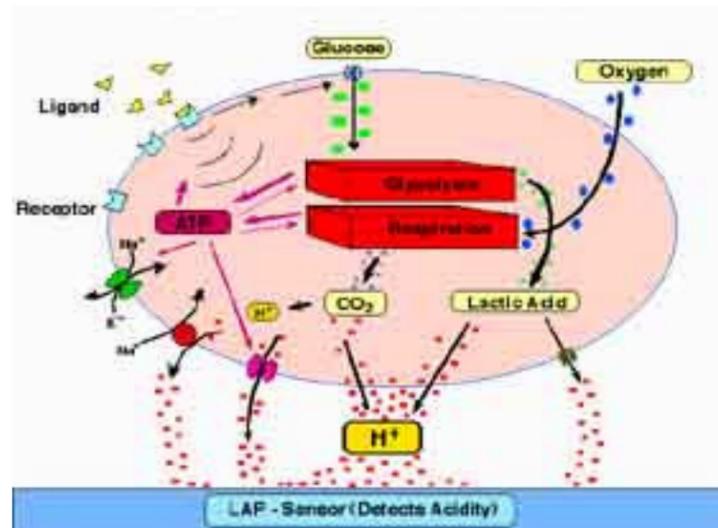


Fig 11 Schema dei sistemi di canali ionici maggiormente interessati nelle risposte cellulari a stimolazioni chimiche esterne gli scambi ionici tra la cellula e l'ambiente extracellulare.

La stimolazione del canale RyR1 con agenti scatenanti (come il 4-CmC, la caffeina, l'alotano e la rianodina ad opportune concentrazioni) genera l'apertura del canale stesso e la fuoriuscita di calcio nel citoplasma. Tale evento innesca una repentina reazione cellulare. Il Ca^{2+} , infatti, per equilibrio omeostatico deve essere nuovamente pompato negli organelli di riserva attraverso le specifiche pompe ATPasiche. Il consumo di ATP che ne scaturisce porta, come abbiamo visto, ad un'acidificazione del citoplasma e quindi ad un rilascio protonico extracellulare (fig.12).

Gli esperimenti con i linfociti B sono stati condotti intrappolando le cellule in low melting agarose al 6% sciolto in terreno di coltura RPMI 1640 senza sodio bicarbonato.

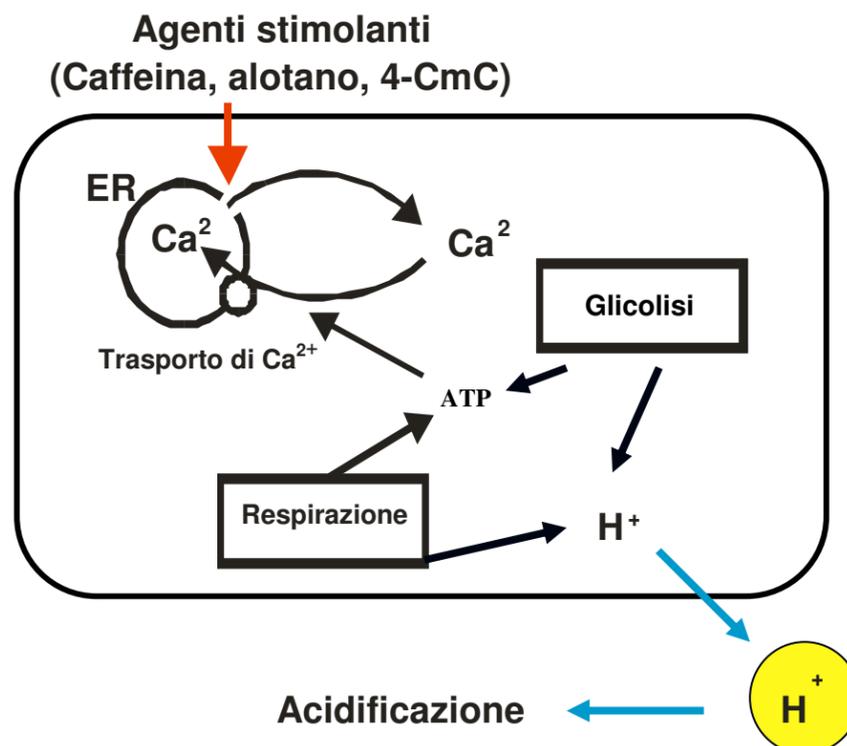


Fig.12 Schema della risposta metabolica cellulare alla stimolazione di RyR1

2.9.2 Sistema microfisiometrico

Il sistema microfisiometrico Cytosensor è dotato di speciali camerette con alloggiamenti per le cellule e sistemi accoppiati di pompe che sono in grado di far fluire all'interno delle camerette stesse le soluzioni appositamente preparate. Con un sistema di due valvole controllato dal computer è possibile programmare cicli continui (da una delle due sorgenti) in cui si alternano una fase di pompaggio ed una fase di misurazione (fig.13).

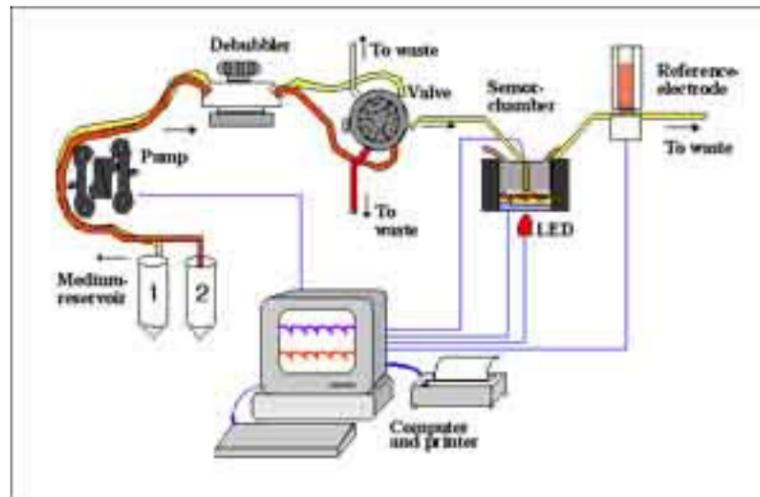


Fig.13 Schema dello strumento Cytosensor

La superficie inferiore di questi alloggiamenti è formata da chip di silicio rivestiti da una superficie isolante che presenta gruppi Si-NH₂

e Si-OH sensibili al pH e che sono a diretto contatto con la soluzione acquosa. I chip al silicio funzionano come *light-addressable potentiometric sensor* (LAPS). Quando una differenza di potenziale elettrico è applicata attraverso lo strato isolante, si genera un campo elettrico nello strato isolante e all'interfaccia tra lo strato di silicio e quello isolante.

Se impulsi di luce vengono indirizzati da un diodo che emette luce (LED) sul chip di silicio LAPS, questo assorbe la luce e produce coppie di cariche elettriche che si muovono in direzioni opposte quando un campo elettrico è applicato agli estremi del chip di silicio, generando una fotocorrente. L'intensità della fotocorrente dipende dall'intensità del campo elettrico nel chip di silicio. A sua volta l'intensità del campo elettrico nel chip dipende dalla somma di due differenze di potenziale: il potenziale applicato dall'esterno e il potenziale sulla superficie del chip pH-dipendente (fig.14). Ogni secondo il sistema varia il potenziale applicato producendo una curva di fotocorrente in funzione del voltaggio applicato. Il voltaggio nel punto di flesso della curva della fotocorrente è misurato dal sistema per produrre un grafico dei *raw data*.

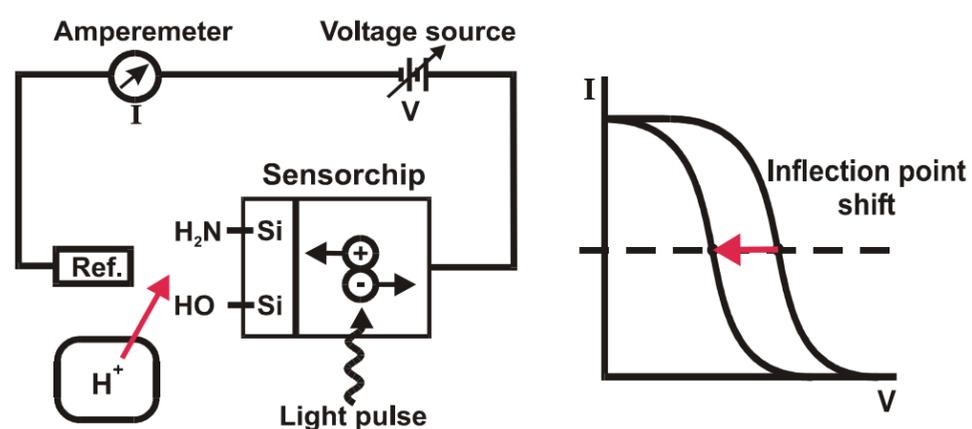
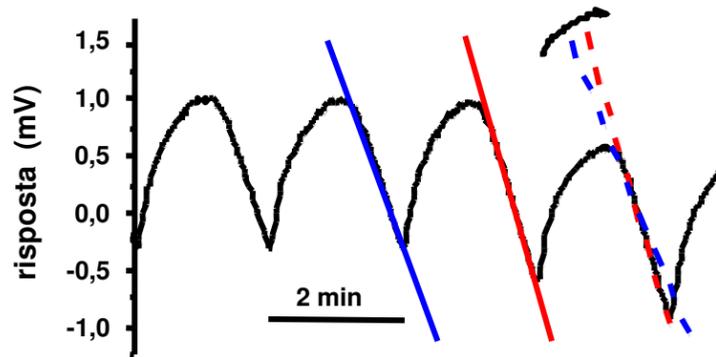


Fig.14 Principio del biosensore di protoni

Quando il pH è relativamente costante, il voltaggio nel punto di flesso della curva di fotorisposta non cambia ed il grafico dei *raw data* si presenta come una linea relativamente piatta. Quando il pH nella camera cambia (per esempio per l'attività metabolica delle cellule), il voltaggio nel punto di flesso della curva cambia, e di conseguenza il grafico dei *raw data* non si presenta più come una linea piatta (se il pH diminuisce nella camera, il voltaggio nel punto di flesso diminuisce e il grafico dei *raw data* subisce una diminuzione).

Le analisi con il sistema Cytosensor sono strutturate in una ripetizione continua di cicli composti da una fase di pompaggio del terreno RPMI-1640 ed una di riposo durante la quale si ha una continua misurazione del voltaggio. Quando le cellule sono presenti nelle camerette di misurazione, il grafico dei *raw data* si presenta come in fig.15. Le cellule per la loro attività metabolica di base producono continuamente protoni nella cameretta. Il flusso continuo del terreno di coltura nelle camerette mantiene costante la concentrazione di protoni nelle camerette ma, quando le pompe si fermano, gli ioni H^+ si accumulano, il pH nella cameretta diminuisce e il voltaggio diminuisce. Durante questa fase di blocco del pompaggio viene misurata la pendenza della curva di diminuzione del voltaggio, e quindi la velocità di produzione degli ioni H^+ da parte delle cellule (e quindi la loro attività metabolica). In fig 15 si nota che in condizioni normali la velocità di produzione degli ioni H^+ non cambia nel tempo, ma facendo fluire (tramite il cambio delle valvole) nella cameretta il terreno di coltura con l'agente stimolante 4-CmC, la velocità di rilascio protonico aumenta, la pendenza del grafico dei *raw data* aumenta e *nel rate data* si registra una variazione positiva.

Il sistema calcola poi la pendenza del grafico dei *raw data* negli intervalli programmati di misurazione e riporta questi valori (*rate data*) in un nuovo grafico (fig16).



VALVE SCHEDULE

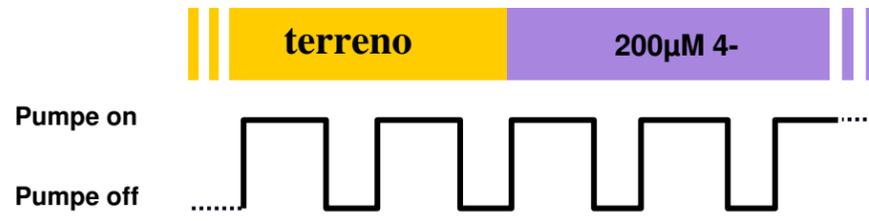


Fig15 risposta cellulare alle stimolazioni nel grafico del *raw data*

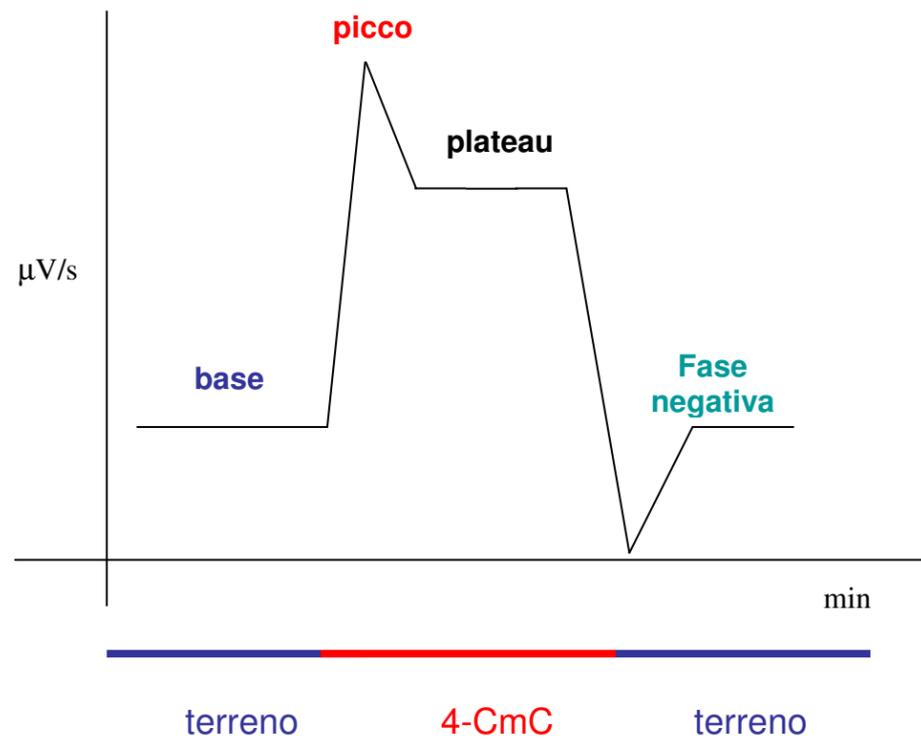


Fig 16 risposta cellulare alle stimolazioni nel grafico del *rate data*

2.10 Procedura di stimolazione dei linfociti B immortalizzati

2.10.1 Reagenti utilizzati

- terreno RPMI 1640 senza sodio bicarbonato + 1% FCS (RPMIc)
- l' RPMIc + 6% low melting agarose (si prepara sciogliendo la soluzione a 77°C , per 30 minuti circa, in una piastra riscaldata)

- soluzioni stimolanti di 4-CmC (Sigma-Aldrich) in RPMIc
- soluzione di dantrolene (Calbiochem) 80 μ M in RPMIc
- soluzione di dantrolene 80 μ M in RPMIc con 4-CmC

2.10.2 Preparazione delle cellule

Per la preparazione delle cellule prima dell'esperimento è necessario si stimano la concentrazione e vitalità delle cellule. Un cattivo stato delle cellule infatti pregiudica l'attendibilità dei risultati ottenuti. Circa 3×10^6 cellule vengono prelevate dalla fiasca di coltura per l'esperimento e centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare viene lavato in 10 ml di terreno RPMIc. Dopo il lavaggio il pellet viene nuovamente risospeso in 87,5 μ l di RPMIc. A questo punto alle cellule risospese in RPMIc vengono aggiunti 12,5 μ l di soluzione RPMIc al 6% di agar low melting temperature (precedentemente sciolta). Aliquote da 15 μ l di mix cellule-agar vengono quindi inseriti in apposite capsule monouso che vengono poi assemblate nelle camerette di registrazione con il chip di silicio. Dopo aver montato le camerette di registrazione nello strumento Cytosensor può avere inizio l'esperimento.

2.10.3 Inizio dell'esperimento con l'impostazione del programma "cytosoft"

Ogni ciclo è stato impostato con 120" di pompaggio e 30" di misurazione, e ogni stimolazione con una durata di 5 cicli ed intervallata con la successiva da altri 5 cicli di trattamento con terreno RPMIc. Prima delle stimolazioni è stato lasciato alle cellule un tempo di circa 60 minuti per regolarizzare la loro attività metabolica.

Per ogni esperimento le cellule sono state stimolate in successione con tutte le concentrazioni di 4-CmC, e negli esperimenti di inibizione con il dantrolene, le cellule sono trattate con l'inibitore per

30 minuti prima della prima stimolazione. Tutte le stimolazioni e i periodi interstimolazioni sono stati poi condotti in presenza dell'inibitore alla concentrazione di 80 μ M.

Come risultato di tutti gli esperimenti realizzati con i linfociti B immortalizzati il grafico dei rate data ad ogni stimolazione con 4-CmC si è presentato con un andamento nel tempo come in figura 16. Per il calcolo della risposta cellulare, sono stati utilizzati dei fogli di calcolo excel (Microsoft) con cui si sono misurate le variazioni in percentuale del segnale metabolico (dal grafico dei *rate data*) dal punto della linea di base precedente la stimolazione al punto di *plateau* della stimolazione stessa.

3 Scopo della tesi

L'ipertermia maligna è una patologia con elevata eterogeneità genetica e il numero di mutazioni del gene RYR1 potenzialmente causative di MH è elevatissimo per cui risulta impossibile, ad oggi, realizzare un test diagnostico basato esclusivamente sull'indagine genetica. Tuttavia l'identificazione in un soggetto di mutazioni già dimostrate causative di MH (tramite specifici saggi *in vitro*) e validate dal Gruppo Europeo di MH è un elemento per la diagnosi di stato di suscettibilità all'MH del soggetto stesso. Inoltre l'individuazione in un soggetto di una mutazione causativa di MH permette di individuare i rari ma pericolosi casi di discordanza tra genotipo e fenotipo tipizzato MHN all'IVCT.

Recenti studi hanno individuato la presenza di RyR1 anche sul reticolo endoplasmatico dei linfociti B⁶⁰. Il ruolo di tale canale nelle cellule linfocitarie è di innescare, tramite flussi di calcio nel citoplasma, il rilascio di citochine in risposta a specifici stimoli esterni.

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quindi l'analisi di mutazioni nel gene RYR1, maggiormente coinvolto nei casi di MH, in soggetti appartenenti a famiglie con episodi conclamati di crisi MH o con sospetto di suscettibilità all'MH al fine di identificarne le cause

genetiche. Una volta identificate mutazioni nel gene RYR1, queste sono state caratterizzate. Per le alterazioni nucleotidiche che hanno mostrato evidenze indirette di causatività di MH, è stato messo a punto un saggio funzionale sui linfociti B dei pazienti portatori delle mutazioni per studiarne l'effetto fenotipico sull'attività di RyR1 in un contesto cellulare. Il riscontro di un'alterazione nel comportamento di RyR1 mutato dimostra che l'alterazione genetica identificata può essere responsabile della suscettibilità all'ipertermia maligna nei soggetti della famiglia recanti la mutazione e permette di definire quindi per ognuno di essi il livello di rischio suscettibilità. Inoltre l'identificazione di mutazioni nuove porta all'arricchimento dell'indagine genetica dell'MH e ad una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici delle alterazioni nel canale RyR1. Tali studi permettono inoltre di delineare un interessante approccio sperimentale per lo studio di mutazioni potenzialmente causative di ipertermia maligna e suggerire un metodo diagnostico non invasivo per l'ipertermia maligna.

Per la caratterizzazione delle mutazioni identificate è stato adottato il seguente schema sperimentale:

- Analisi di ricerca e caratterizzazione di mutazioni nel gene RYR1 dei soggetti delle famiglie.
- Valutazione della casuatività tramite dati indiretti (segregazione col fenotipo MHS nella famiglia, assenza in soggetti sani, conservazione dell'aminoacido presente nella proteina *wilde-type* nelle differenti isoforme e in specie diverse)
- Valutazione della causatività tramite dati diretti, ovvero saggi funzionali in cellule linfocitarie di tipo B immortalizzate con il virus Epstein-Barr.

4 Risultati

Lo *screening* dei 106 esoni del gene RYR1 mediante DHPLC e sequenziamento degli esoni che presentano un *pattern* di eluzione alterato rispetto ad un controllo *wilde-type* ha portato all'identificazione di 9 alterazioni nucleotidiche in 9 diverse famiglie MHS e di numerosi polimorfismi (dati non mostrati).

Le mutazioni identificate in questo lavoro di tesi, descritte nella tabella 5 , sono tutte mutazioni di senso.

Tabella 5 Mutazioni identificate nel gene RyR1

Esoni	Sostituzione nucleotidica	Cambio aminoacidico
15	c1589G>A	Arg530His
95	c13975T>C	Cys4659Arg
43	c7025 A>G	Asn2342Ser
* ¹ 39	c6488G>C	Arg2163Pro
* ² 46	c7361A>G	Arg2454His
40	c6635 T>A	Val2212Asp
* ³ 17	c1840 C>T	Arg614Cys
* ⁴ 39	c6502 G>A	Val2168Met
44	c7122 A>G	Glu2371Gly

In rosso sono rappresentate le mutazioni nuove

* Sostituzioni già note in letteratura

Le mutazioni Arg614Cys e Val2168Met sono state già caratterizzate funzionalmente e ne è stata dimostrata la causatività mediante saggi *in vitro*⁶¹⁻⁶²

4.1 Caratterizzazione delle mutazioni

4.1.1 MUTAZIONE Arg530His

L'analisi di mutazioni con il DHPLC dei 106 esoni del gene RYR1 ha rivelato un pattern di eluizione anomala solo nell'esone 15 dei soggetti I:1 ed II:1 (MHS9), ma non nel soggetto II:2 (MHN10) e II:3 della famiglia Na-33.

L'analisi della sequenza nucleotidica ha permesso di identificare una mutazione di senso in eterozigosi nell'esone 15 del gene RYR1 dei soggetti MH8 ed MHS9. Questa mutazione è localizzata nel gene RYR1 in posizione c1589 e consiste in una transversione di un residuo di guanina in uno di adenina e comporta la trasformazione del codone CGT codificante una arginina nel codone CAT codificante una istidina.

La mutazione Arg530His

- segrega col fenotipo MHS (fig17.).
- è assente in 100 soggetti MHN non correlati tra loro da legami di parentela (dati non mostrati)
- cambia un residuo aminoacidico conservato in tutte le isoforme di RYR di specie differenti (fig18).

Tutti questi dati indiretti supportano l'ipotesi che tale mutazione possa essere causativa dell'alterazione della funzionalità del canale RyR1 e quindi delle crisi ipermetaboliche.

Famiglia NA-33

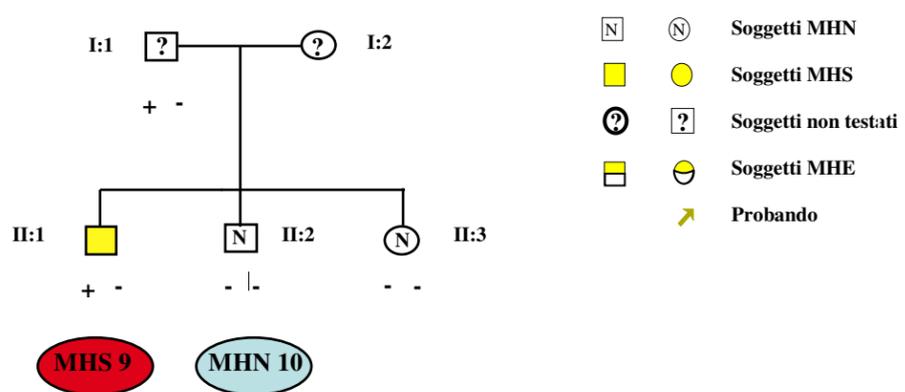


Fig17. *pedigree* della famiglia NA-33

		Arg530
		↓
	HUMAN	A S L I R G N R S
	PIG A
RyR1	RABBIT A
	BULLFROG α
	MAKAIRA A
	HUMAN	. A K
RyR2	RABBIT	. A K
	HUMAN	. A N
	RABBIT	. A N
RyR3	MINK	. A N
	BULLFROG β A
	CHICKEN β	. A N

Fig 18 conservazione del residuo aminoacidico

4.1.2 MUTAZIONE Arg2163Pro

La mutazione Arg2163Pro è stata già identificata e pubblicata dal gruppo di ricerca in cui ho svolto il Dottorato di Ricerca (Fortunato et al. 2002). La famiglia in cui sono stati trovati soggetti portatori di questa mutazione è la famiglia Na-3 (fig.19), in cui recentemente sono stati tipizzati MHN tramite IVCT altri due soggetti: III:4 e III:5. Questa sostituzione ricade nello stesso codone in cui sono state identificate altre due mutazioni: Arg2163Cys e Arg2163His. Per la sostituzione Arg2163His è stata dimostrata la causatività mediante saggi in vitro su cellule⁶³

Tutti questi dati indiretti supportano l'ipotesi che tale mutazione possa essere responsabile di un'alterazione funzionale di RyR1 e quindi dello stato di suscettibilità all'MH.

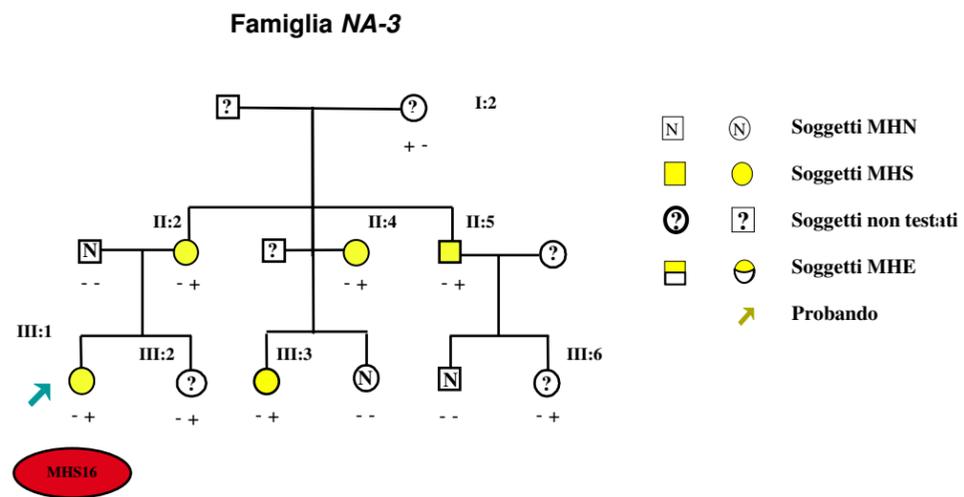


Fig19 pedigree della famiglia Na-3

4.1.3 MUTAZIONE Val2212Asp

L'analisi mutazionale mediante il DHPLC dei 106 esoni del gene RYR1 ha evidenziato un pattern di eluizione anomala solo nell'esone 40 dei soggetti II:1, II:3, II:5 (non tipizzati con l'IVCT) e dei soggetti di terza generazione III:1, III:2, III:3, III:6 (tipizzati MHS), ma non nel soggetto III:4 (tipizzato MHE), III:5 e III:6 della famiglia Na-12. Il soggetto III:5 è il probando della famiglia che ha sviluppato una crisi di MH durante un'anestesia.

L'analisi della sequenza nucleotidica ha rivelato poi la presenza di una mutazione di senso in eterozigosi nell'esone 40 del gene RYR1 nei soggetti II:1, II:3, II:5, III:1, III:2, III:3, III:6. Questa mutazione è localizzata nel cDNA del gene RYR1 in posizione 6635 e consiste in una transversione di un residuo di timina in uno di adenina. Questa sostituzione comporta la trasformazione del codone GTC codificante una valina nel codone GAC codificante un residuo di acido aspartico.

La mutazione Val2212Asp

- segrega col fenotipo MHS (fig.20)
- è assente in 100 soggetti MHN non correlati tra loro da legami di parentela (dati non mostrati)
- cambia un residuo aminoacidico conservato in tutte le isoforme di RYR in specie differenti (fig.21)

Tutti questi dati indiretti supportano l'ipotesi che tale mutazione possa essere responsabile dell'alterazione funzionale di RyR1 e quindi dello stato di suscettibilità all'MH.

Famiglia NA-12

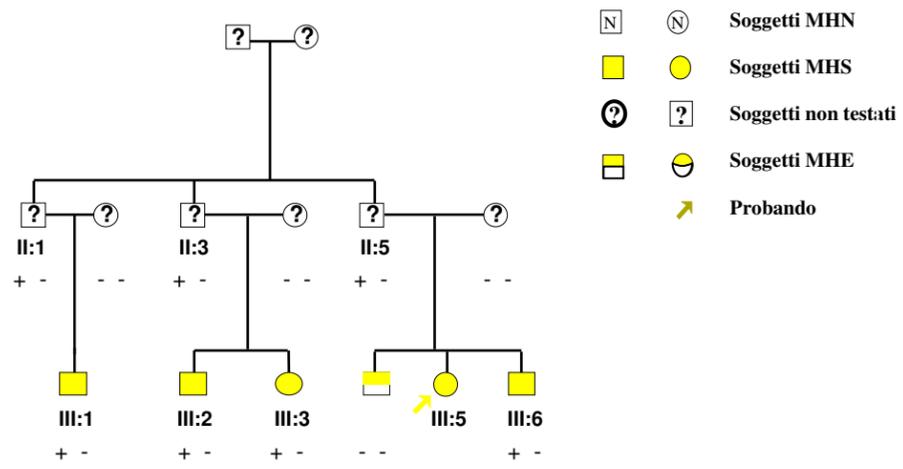


Fig.20 pedigree della famiglia Na-12

		Val2212 ↓
	HUMAN	T V M E V M V N V L G G
	PIG
RyR1	RABBIT
	BULLFROG α
	MAKAIRA
	HUMAN
RyR2	RABBIT
	HUMAN T
	RABBIT T
RyR3	MINK D A
	BULLFROG β	... D
	CHICKEN β D

Fig 21 conservazione del residuo aminoacidico

4.1.4 MUTAZIONE Asn2342Ser

L'analisi mutazionale mediante il DHPLC dei 106 esoni del gene RYR1 ha evidenziato un pattern di eluizione anomala solo nell'esone 43 dei soggetti I:2, II:1 (MHS342) e II:2, ma non nel soggetto I:1 (MH341) della famiglia Na-2. Il soggetto II:2 è il probando della famiglia che ha sviluppato una crisi di MH durante un'anestesia.

L'analisi della sequenza nucleotidica ha rivelato poi la presenza di una mutazione di senso in eterozigosi nell'esone 43 del gene RYR1 nei soggetti MHS342, I:2 e II:2. Questa mutazione è localizzata nel cDNA del gene RYR1 in posizione 7025 e consiste in una transversione di un residuo di adenina in uno di guanina. Questa

sostituzione comporta la trasformazione del codone AAC codificante una asparagina nel codone AGC codificante una serina. La mutazione Asn2342Ser

- è presente nel probando che ha sviluppato una crisi di MH
- segrega col fenotipo MHS (fig.22)
- è assente in 100 soggetti MHN non correlati tra loro da legami di parentela (dati non mostrati)
- cambia un residuo aminoacidico conservato in tutte le isoforme di RYR in specie differenti (fig.23).

Tutti questi dati indiretti supportano l'ipotesi che tale mutazione possa essere responsabile dell'alterazione funzionale di RyR1 e quindi dello stato di suscettibilità all'MH.

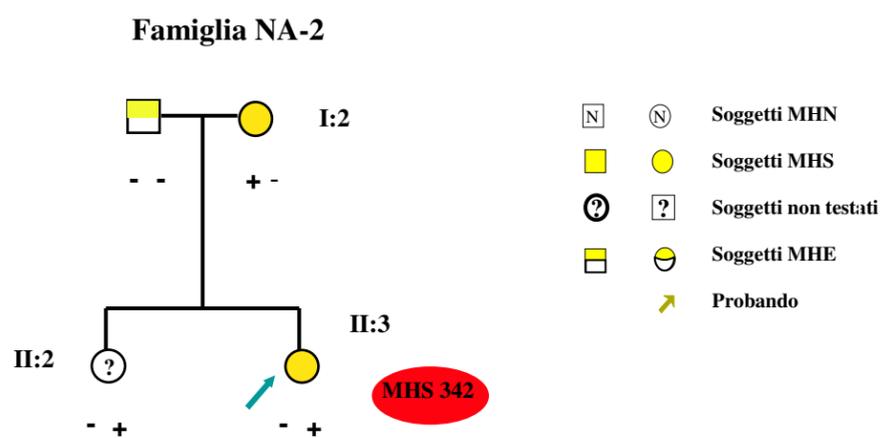


Fig22 pedigree della famiglia NA-2

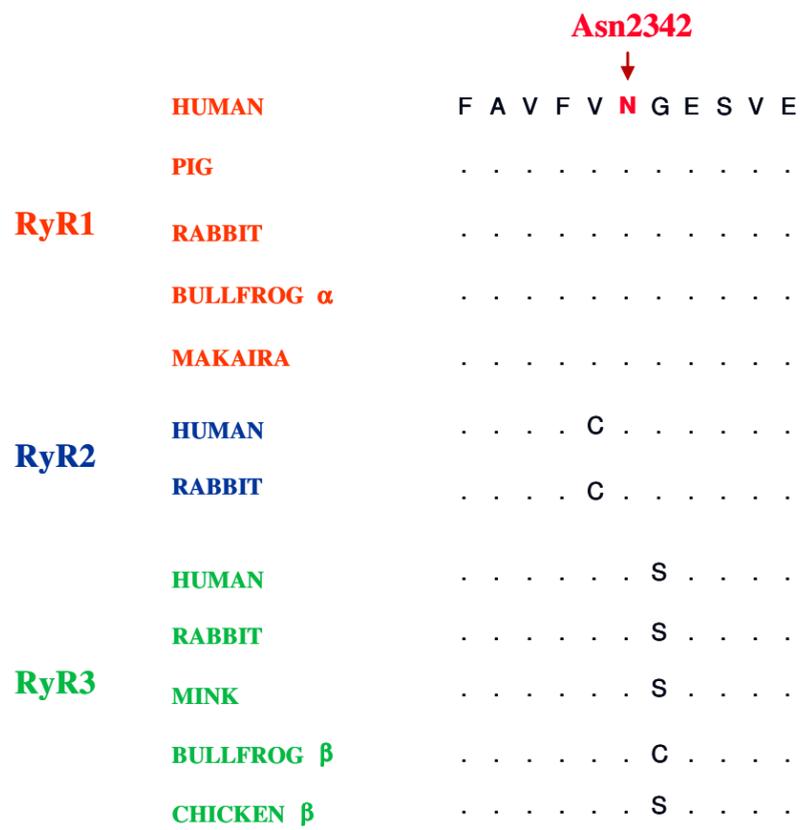


Fig 23 conservazione del residuo aminoacidico

4.1.5 MUTAZIONE Glu2371Gly

L'analisi mutazionale mediante il DHPLC dei 106 esoni del gene RYR1 ha evidenziato un pattern di eluzione anomala solo nell'esone 44 del soggetto identificato con la sigla 423 e tipizzato MHS.

L'analisi della sequenza nucleotidica ha rivelato poi la presenza di una mutazione di senso in eterozigosi nell'esone 44 del gene RYR1 nel soggetto 423. Questa mutazione è localizzata nel cDNA del gene RYR1 in posizione 7112 e consiste in una transversione di un residuo di adenina in uno di guanina. Questa sostituzione comporta la trasformazione del codone GAG codificante un residuo di acido glutammico nel codone GGG codificante una glicina.

La mutazione Glu2371Gly

- è assente in 100 soggetti MHN non correlati tra loro da legami di parentela (dati non mostrati)
- cambia un residuo aminoacidico conservato in tutte le isoforme di RYR in specie differenti

In questo caso non è possibile verificare la segregazione della mutazione con il fenotipo MHS in quanto non sono disponibili altri componenti della famiglia.

Tutti questi dati indiretti supportano l'ipotesi che tale mutazione possa essere responsabile dell'alterazione funzionale di RyR1 e quindi dello stato di suscettibilità all'MH.

4.1.6 MUTAZIONE Arg2454His

Nell'ambito della famiglia Na-32 è stata condotta l'analisi di mutazioni mediante il DHPLC dei 106 esoni del gene. Il risultato ha evidenziato un pattern di eluizione anomala solo nell'amplicone dell'esone 46 di tutti i soggetti della famiglia analizzati (fig. 24).

L'analisi della sequenza nucleotidica ha rivelato la presenza di una mutazione di senso in eterozigosi nell'esone 46 del gene RYR1 nei soggetti I:1 (MHS13), II:1, e II:2.

Questa mutazione, già identificata e pubblicata in letteratura, comporta la trasformazione del residuo di arginina 2454 in uno di istidina e non è stata ancora caratterizzata funzionalmente.

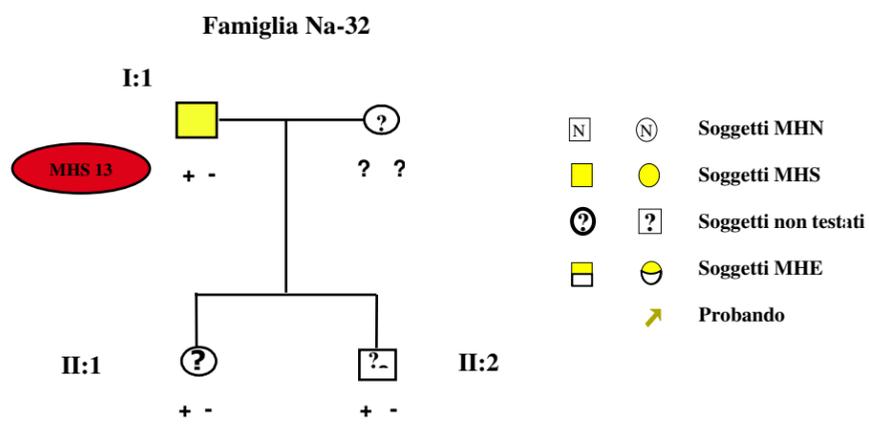


Fig 24 *pedigree* famiglia Na-32

4.1.7 MUTAZIONE Cys4659Arg

L'analisi mutazionale tramite la DHPLC dei 106 esoni del gene RYR1

ha mostrato un pattern di eluizione anomala solo nell'esone 95 dei soggetti I:2 e II:1, II:2 e II:3.

L'analisi della sequenza nucleotidica ha rivelato la presenza di una mutazione di senso in eterozigosi nell'esone 95 del gene RYR1 nei soggetti I:2, II:1 (MHS5), II:2 (MHS6) e II:3 (MHS7). Questa mutazione è localizzata nel cDNA del gene RYR1 in posizione 13975 e consiste in una transversione di un residuo di timina in uno di citosina. Questa sostituzione comporta la trasformazione del codone TGT codificante una cisterna nel codone CGT codificante una arginina.

La mutazione Cys4659Arg

- segrega col fenotipo MHS (fig.25)
- è assente in 100 soggetti MHN non correlati tra loro da legami di parentela (dati non mostrati)
- cambia un residuo aminoacidico conservato in tutte le isoforme di RYR in specie differenti (fig.26.).

Tutti questi dati indiretti supportano l'ipotesi che tale mutazione possa essere causativa dell'alterazione della funzionalità di RyR1 e quindi delle crisi MH.

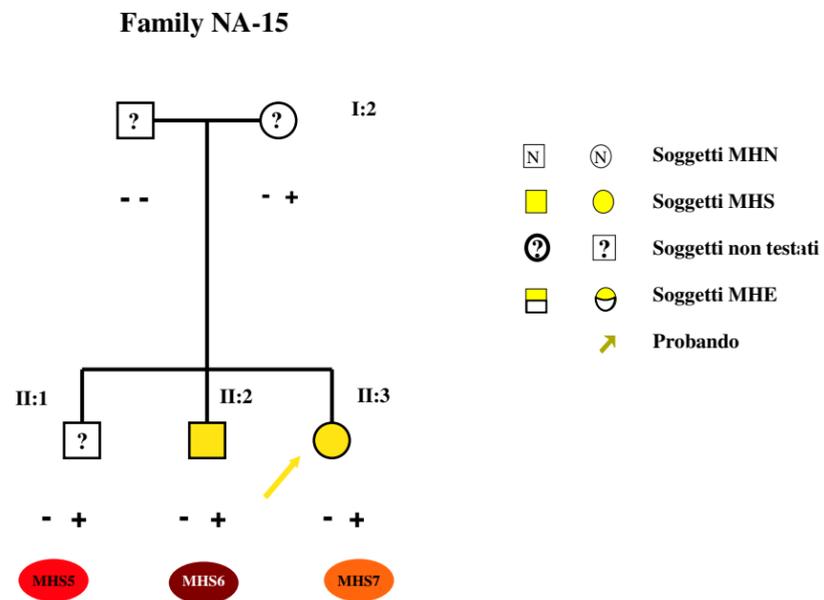


Fig.25 pedigree della famiglia NA-15

		Cys4659
		↓
	HUMAN	I I G Y N C L K V P
	PIG
RyR1	RABBIT
	BULLFROG α
	MAKAIRA I .
	HUMAN Y
RyR2	RABBIT Y
	HUMAN	V V . . Y
	RABBIT	V V . . Y
RyR3	MINK	V V . . Y
	BULLFROG β	V . . . Y
	CHICKEN β	V . . . Y

Fig 26 conservazione del residuo aminoacidico

4.2 Caratterizzazione funzionale delle mutazioni

Per la caratterizzazione funzionale delle mutazioni è stato utilizzato un saggio *in vitro* di rilascio protonico⁶⁴. Tale metodologia misura l'attività metabolica delle cellule e rappresenta quindi una valutazione indiretta dell'attività di rilascio di calcio del canale RyR1. Infatti la stimolazione del canale RyR1 con agenti scatenanti (come il 4-CmC, la caffeina, l'alotano e la rianodina ad opportune concentrazioni) genera l'apertura del canale stesso e la fuoriuscita di calcio nel citoplasma. Tale evento innesca una repentina reazione cellulare. Il Ca²⁺, infatti, per equilibrio omeostatico, deve essere nuovamente accumulato negli organelli di riserva attraverso le specifiche pompe ATPasiche. Il consumo di ATP che ne scaturisce porta ad un'acidificazione del citoplasma e quindi ad un rilascio protonico extracellulare.

Il sistema cellulare utilizzato è rappresentato dai linfociti B estratti ed immortalizzati con il virus Epstein-Barr dai soggetti portatori delle mutazioni nel gene RYR1 identificate in questo studio e da soggetti MHN quali controlli.

Con il sistema microfisiometrico Cytosensor® è stata analizzata quindi la variazione di attività metabolica che i linfociti B immortalizzati subiscono in seguito a stimolazione con 4-CmC.

Le mutazioni Arg530His, Arg2163Pro, Asn2342Ser, Arg2454His e Cys4659Arg sono state funzionalmente caratterizzate per verificare se inducono alterazioni funzionali nei canali RyR1 recanti le mutazioni identificate.

Per la mutazione Val2212Asp, a causa di ragioni ancora non definite, non è stato possibile ottenere cloni cellulari stabili di linfociti B immortalizzati. Invece per la mutazione Glu2371Gly il processo di immortalizzazione dei linfociti B dei soggetti della famiglia è ancora in corso.

4.2.1 MUTAZIONE Arg530His

I linfociti B dei due soggetti MHS9 ed MHN10 sono stati stimolati con 4-CmC alle concentrazioni di 200, 400, 600, 800, 1000 μ M, e la risposta in termini di velocità di rilascio protonico è stata misurata ad ogni stimolazione.

Come mostrato nella fig.28 la risposta metabolica dei linfociti B del soggetto MHS9 è risultata più alta rispetto a quella registrata da linee cellulari di controllo ad ogni stimolazione con 4-CmC. Le risposte della linea cellulare MHN10 invece sono risultate tutte comparabili a quelle di controllo. Le differenze tra i valori di risposta metabolica delle cellule del soggetto MH9 e delle cellule di controllo ad ogni concentrazione di 4-CmC sono statisticamente significative, come evidenziato dal t-test (con un valore di $p < 0,05$).

Questi risultati dimostrano che tale mutazione nel gene RYR1 altera la funzionalità del canale rianodinico rendendolo iper reattivo in seguito alla stimolazione con 4-CmC. Questo comportamento può spiegare quindi la suscettibilità all'MH nei membri della famiglia.

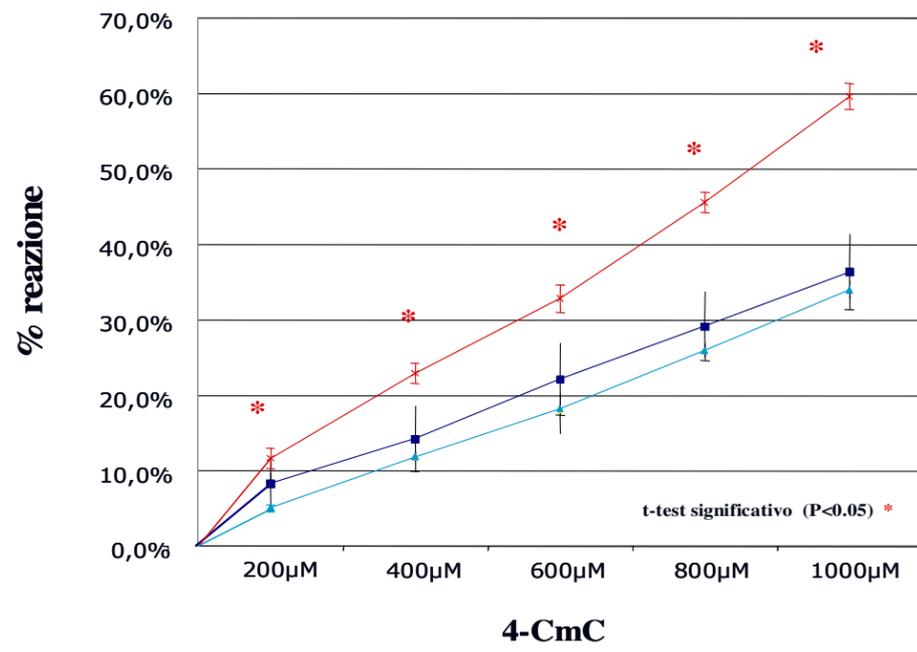


Fig. 28 Stimolazione con 4-CmC dei linfociti B immortalizzati del soggetto MHS9 (in rosso) portatore della mutazione Arg530His, del soggetto MHN10 (in azzurro) della Na-33 e di una linea cellulare di controllo da una famiglia non correlata (in blu). Le risposte delle cellule del soggetto MH9 sono significativamente più alte delle cellule di controllo a tutte le stimolazioni con 4-CmC. In grafico sono riportati i valori medi ottenuti e la deviazione standard (n=5 per MHS9 ed MHN10; n=11 per controllo).

4.2.2 MUTAZIONE Arg2163Pro

I linfociti B del soggetto MH16 sono stati stimolati con 4-CmC alle concentrazioni di 200, 400, 600, 800, 1000 μ M, e la risposta in termini di velocità di rilascio protonico è stata misurata ad ogni stimolazione.

Come evidenziato nella fig.29 la risposta metabolica dei linfociti B del soggetto MHS16 è risultata più alta rispetto a quella registrata da linee cellulari di controllo alle stimolazioni con 400, 600, 800, 1000 μ M 4-CmC. Le differenze tra i valori di risposta metabolica delle cellule del soggetto MHS16 e di controllo alle stimolazioni con 600, 800 e 1000 μ M 4-CmC sono statisticamente significative, come evidenziato dal t-test (con un valore di $p < 0,05$).

Questi risultati dimostrano che tale mutazione nel gene RYR1 altera la funzionalità del canale rianodinico rendendolo iper reattivo in seguito alla stimolazione con 4-CmC. Questo comportamento può spiegare quindi la suscettibilità all'MH nei membri della famiglia.

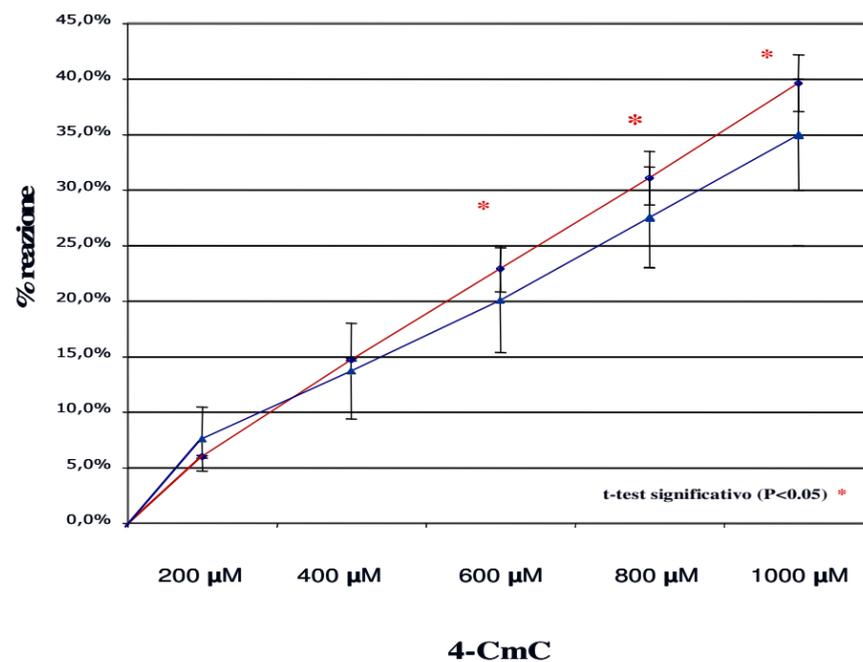


Fig.29 Stimolazione con 4-CmC dei linfociti B immortalizzati del soggetto MHS16 (in rosso) portatore della mutazione Arg2163Pro, dalla famiglia Na-3 e di una linea cellulare di controllo da una famiglia non correlata (in blu). Alle stimolazioni con 600, 800 e 1000 μM 4-CmC, le risposte metaboliche delle cellule del soggetto MHS16 sono significativamente più alte del controllo. In grafico sono riportati i valori medi ottenuti e la deviazione standard (n=7 per MHS16; n=11 per controllo).

4.2.3 MUTAZIONE Asn2342Ser

I linfociti B del soggetto MHS342 sono stati stimolati con 4-CmC alle concentrazioni di 200, 400, 600, 800, 1000 μM, e la risposta in termini di velocità di rilascio protonico è stata misurata ad ogni stimolazione.

Come mostrato nella fig.30 la risposta metabolica dei linfociti B del soggetto MHS342 è risultata più alta rispetto a quella registrata da

linee cellulari di controllo alle stimolazioni con 4-CmC. Le differenze tra i valori di risposta metabolica delle cellule del soggetto MH342 e di controllo alle stimolazioni con 200, 400, 600, 800 μM 4-CmC sono statisticamente significative, come evidenziato dal t-test (con un valore di $p < 0,05$). Questi risultati dimostrano che tale mutazione nel gene RYR1 altera la funzionalità del canale rianodinico rendendolo iper reattivo in seguito alla stimolazione con 4-CmC. Questo comportamento può spiegare quindi la suscettibilità all'MH nei membri della famiglia.

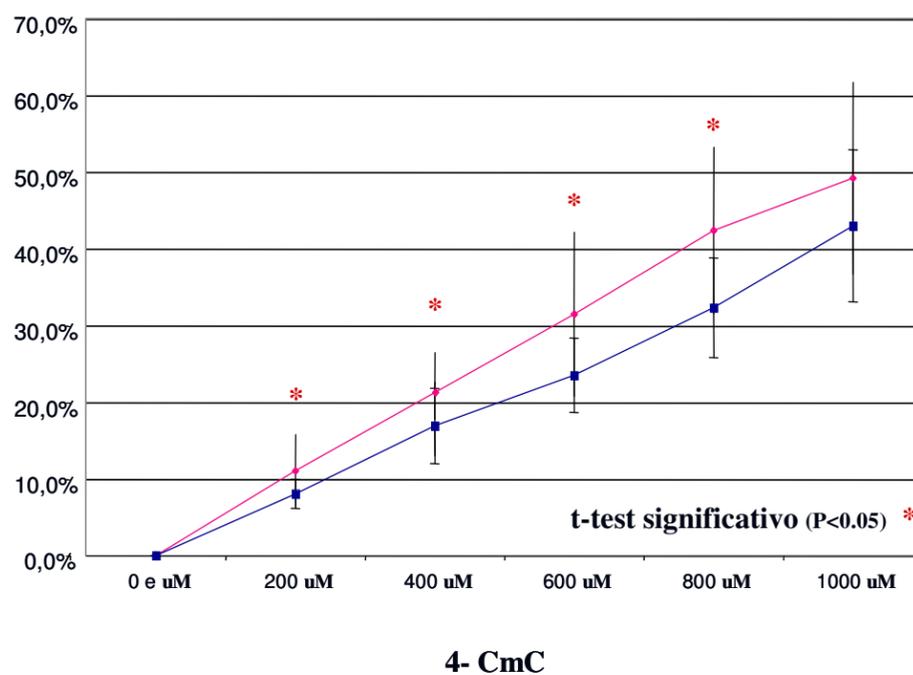


Fig. 30 Stimolazione con 4-CmC dei linfociti B immortalizzati del soggetto MHS342 (in rosso) portatore della mutazione Asn2342Ser, dalla famiglia Na-2 e di una linea cellulare di controllo da una famiglia non correlata (in blu). Le risposte delle cellule del soggetto MHS342 sono significativamente più alte di quelle di controllo alle stimolazioni con 200, 400, 600 e 800 μM 4-CmC. In grafico sono riportati i valori medi ottenuti e la deviazione standard (n=22 per MHS342; n=19 per controllo).

4.2.4 MUTAZIONE Arg2454His

I linfociti B del soggetto MH13 sono stati stimolati con 4-CmC alle concentrazioni di 200, 400, 600, 800, 1000 μM , e la risposta in termini di velocità di rilascio protonico è stata misurata ad ogni stimolazione.

Come evidenziato nella fig.31 la risposta metabolica dei linfociti B del soggetto MHS13 è risultata più alta rispetto a quella registrata da linee cellulari di controllo alle stimolazioni con 400, 600, 800, 1000 μM 4-CmC. Le differenze tra i valori di risposta metabolica delle cellule del soggetto MHS13 e di controllo alle stimolazioni con 600, 800 e 1000 μM 4-CmC sono statisticamente significative, come evidenziato dal t-test (con un valore di $p < 0,05$). Questi risultati dimostrano che tale mutazione nel gene RYR1 altera la funzionalità del canale rianodinico rendendolo iper reattivo in seguito alla stimolazione con 4-CmC. Questo comportamento può spiegare quindi la suscettibilità all'MH nei membri della famiglia.

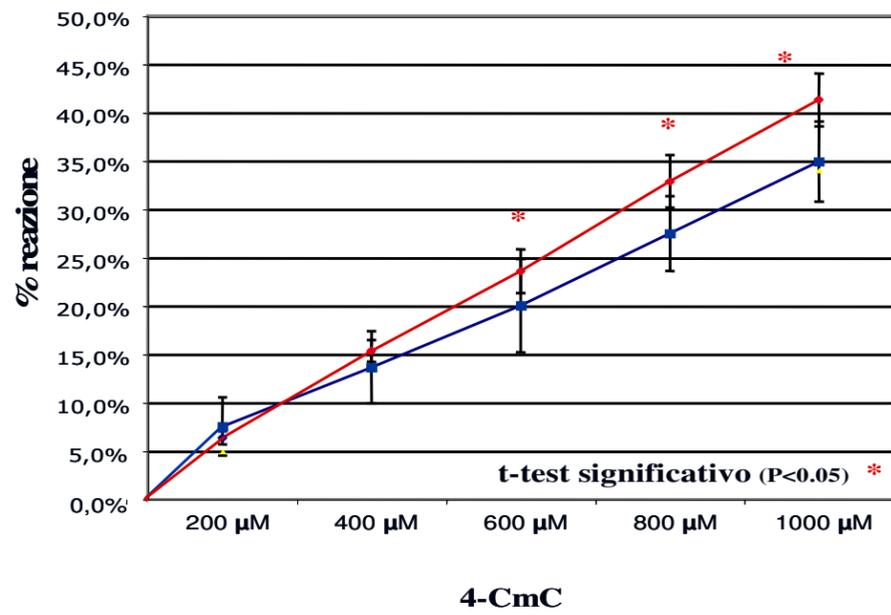


Fig. 31 Stimolazione con 4-CmC dei linfociti B immortalizzati del soggetto MHS13 (in rosso) portatore della mutazione Arg2454His, dalla famiglia Na-2 e di una linea cellulare di controllo da una famiglia non correlata (in blu). Le risposte delle cellule del soggetto MHS13 alle stimolazioni con 600, 800 e 1000 μM 4-CmC sono significativamente più alte rispetto al controllo. In grafico sono riportati i valori medi ottenuti e la deviazione standard (n=6 per MHS13; n=11 per controllo).

4.2.5 MUTAZIONE Cys4659Arg

I linfociti B dei tre soggetti MHS5, MHS6 ed MHS7 sono stati stimolati con 4-CmC alle concentrazioni di 200, 400, 600, 800 1000 μM , e la risposta in termini di velocità di rilascio protonico è stata misurata ad ogni stimolazione.

Come evidenziato nella fig.32 la risposta metabolica dei linfociti B dei soggetti MHS5, MHS6 ed MHS7 è risultata più bassa rispetto a quella registrata da linee cellulari di controllo alle stimolazioni con 4-CmC. Le differenze tra i valori di risposta metabolica delle cellule dei soggetti MHS5, MHS7 (a tutte le stimolazioni con 4-CmC) e MHS6 (a 200, 400 e 600 μM 4-CmC) ed i valori di risposta metabolica delle cellule di controllo sono altamente significative, come evidenziato dal t-test (con un valore di $p < 0,05$).

Tali risultati di iporeattività delle cellule recanti la mutazione Cys4659His alle stimolazioni con 4-CmC hanno inizialmente suggerito l'ipotesi che queste cellule abbiano un'attività metabolica basale più bassa. Come evidente in fig.33 l'attività metabolica delle cellule dei soggetti MHS5, MHS6 e MHS7 è comparabile a quella della linea cellulare di controllo, lasciando aperta la spiegazione di tale effetto della mutazione su RyR1.

Ulteriori esperimenti dovranno essere condotti al fine di chiarire l'anomalo comportamento delle cellule con la mutazione Cys4659His, ma comunque i dati finora collezionati su questa mutazione dimostrano un'alterata funzionalità del canale RyR1 mutato.

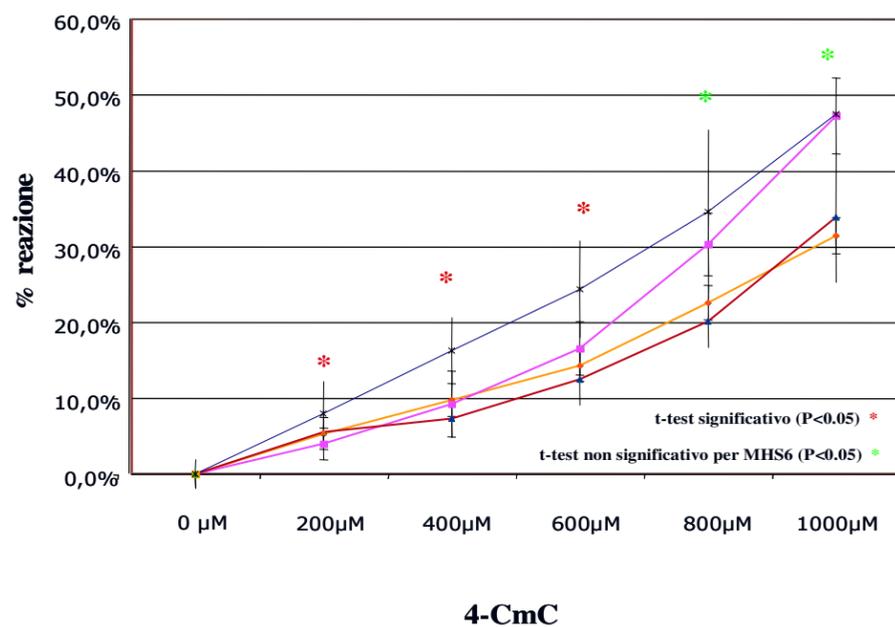


Fig. 32 Stimolazione con 4-CmC dei linfociti B immortalizzati dei soggetti della famiglia Na-15 MHS5 (in rosso), MHS6 (in arancione) e MHS7 (in marrone) portatori della mutazione Cys4659Arg e di una linea cellulare di controllo da una famiglia non correlata (in blu). Le differenze tra i valori di risposta metabolica delle cellule dei soggetti MHS5 e MHS7 sono significativamente più basse rispetto a quelle di controllo a tutte le stimolazioni con 4-CmC. Per la linea MHS6 le risposte metaboliche a 600 e 800 μM 4-CmC non risultano significativamente diverse da quelle delle linee cellulari di controllo. In grafico sono riportati i valori medi ottenuti e la deviazione standard (n=9 per MHS5 e MHN6; n=8 per MHS7; n=11 per controllo).

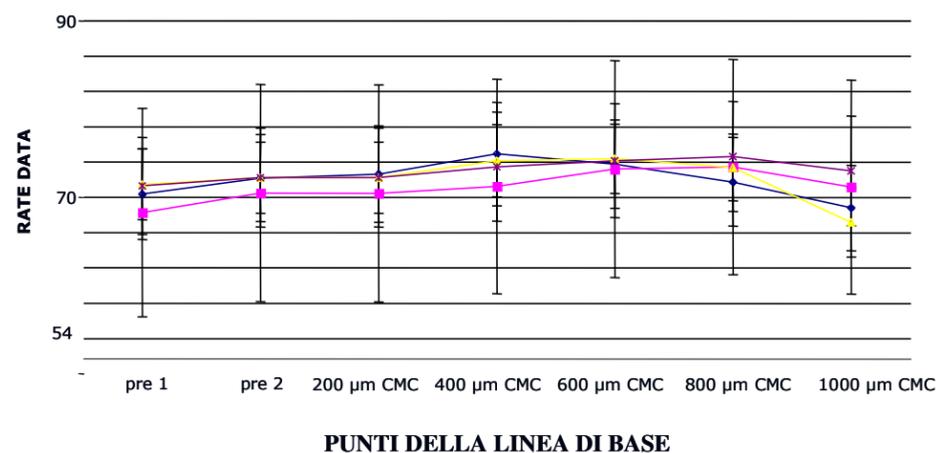


Fig. 33 Attività metabolica di base delle cellule dei soggetti MHS5 (linea gialla), MHS6, (linea blu), MHS7(linea viola), e di controllo (linea rossa).

4.2.6 INIBIZIONE CON IL DANTROLENE

Al fine di verificare che il segnale di attività metabolica registrato con il sistema microfisiometrico in risposta alle stimolazioni fosse dovuto all'attività del canale RyR1, sono stati realizzati esperimenti di stimolazione con 200, 400, 600, 800, 1000 µM 4-CmC in presenza di 80 µM dantrolene, un antagonista specifico di RyR1.

In fig. 34 è riportata la risposta cellulare a 600 µM 4-CmC (stimolazione a cui tutte le cellule con le mutazioni identificate hanno dato una risposta significativamente diversa dalle cellule di controllo) in presenza ed assenza di 80 µM dantrolene. È evidente la significativa riduzione nella risposta cellulare alla stimolazione in presenza di quest'inibitore.

In particolare:

- le cellule di controllo, quelle del soggetto MHN10 e del soggetto con la mutazione Cys4659Arg (MHS6) hanno

- mostrato una riduzione del segnale metabolico del 60-70%
- Le cellule del soggetto con la mutazione Arg2454His (MH13) e del soggetto con la mutazione Asn2342Ser hanno mostrato una riduzione del segnale metabolico del 60% circa
- Le cellule del soggetto con la mutazione Arg2163Pro (MH16) e del soggetto con al mutazione Arg530His (MH9) hanno mostrato una riduzione del segnale metabolico compresa del 35-40%

Questi risultati confermano che la misurazione del rilascio protonico extracellulare con il sistema microfisiometrico sia dovuto in gran parte all'attività del canale RyR1.

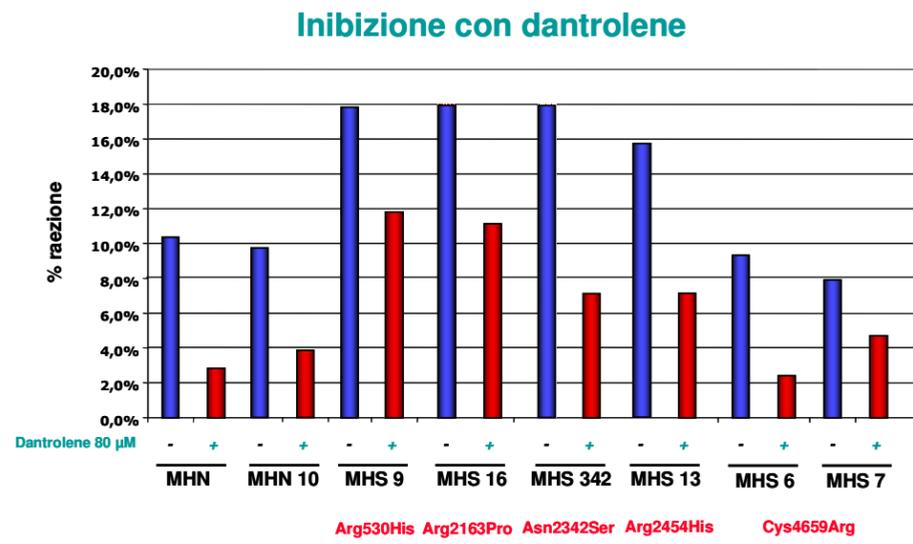


Fig.34 Risposta metabolica dei linfociti B immortalizzati da soggetti tipizzati MHN e MHS portatori delle mutazioni identificate in questo studio alle stimolazioni con 600 μ M 4-CmC in presenza ed assenza di 80 μ M Dantrolene.

5 Discussione

L'obiettivo di questo studio è stato quello di identificare e di caratterizzare funzionalmente le mutazioni nel gene RYR1 presenti in soggetti di famiglie con episodi chiari o sospetti di MH, o comunque tipizzati MHS mediante IVCT.

L'analisi di mutazioni ha permesso di identificare 9 mutazioni di senso in 20 famiglie non correlate: Arg530His; Arg614Cys; Arg2163Pro; Val2168Met; Val2212Asp; Asn2342Ser; Glu2371Gly; Arg2454His; Cys4659Arg. Quanto ottenuto è in pieno accordo con i dati della letteratura scientifica che stimano il gene RYR1 come il principale responsabile di mutazioni causative di MH.

Le mutazioni Arg530His, Val2212Asp, Asn2342Ser, Glu2371Gly e Cys4659Arg sono mutazioni mai identificate prima, per cui contribuiscono significativamente ad arricchire l'indagine genetica per l'MH.

Le mutazioni Arg2163Pro e Arg2454His sono state già identificate, ma non caratterizzate funzionalmente, mentre le mutazioni Arg614Cys, Val2168Met sono state già identificate e caratterizzate funzionalmente, per cui la loro identificazione nelle famiglie studiate ha permesso di definire geneticamente le cause dello stato di MHS e quindi il rischio relativo di tutti i componenti delle due famiglie.

Per valutare quindi se le mutazioni identificate e non caratterizzate funzionalmente conferiscono un'alterazione nel comportamento del canale RyR1 sono stati messi a punto dei saggi di rilascio protonico extracellulare in risposta ad agenti stimolanti RyR1 sulle cellule linfoblastoidi immortalizzate con il virus Epstein -Barr e provenienti dai pazienti con le mutazioni.

E' stata effettuata una caratterizzazione funzionale di quasi tutte le nuove mutazioni identificate (Arg530His; Asn2342Ser; Cys4659Arg) e di quelle già identificate ma non ancora caratterizzate mediante saggi *in vitro* (Arg2163Pro e Arg2454His). Non è stato possibile caratterizzare con il saggio di rilascio protonico la mutazione Val2212Met, in quanto per motivi non ancora chiariti, non è andato a buon fine il processo di immortalizzazione dei linfociti B) e la mutazione Glu2371Gly, per la quale il processo di immortalizzazione dei linfociti B è ancora in corso. Comunque tutti i dati indiretti analizzati sostengono l'ipotesi che possono alterare la struttura e la funzione del canale RyR1, e quindi essere causative di MH.

Per tutte le mutazioni saggiate con il sistema microfisiometrico è stata registrata una risposta significativamente alterata alle stimolazioni con 600 e 800 μ M 4-CmC. In particolare le mutazioni Arg530His, Arg2163Pro, Asn2342Ser e Arg2454His hanno conferito ai canali RyR1 un comportamento di iper-reattività alle stimolazioni con 4-CmC. Questa condizione di ipersensibilità dei canali recanti queste mutazioni sarebbe la spiegazione delle crisi ipermetaboliche dell'MH.

Negli esperimenti sulle cellule con la mutazione Cys4659Arg si è registrata invece una significativa riduzione della risposta metabolica alla stimolazione con 4-CmC. Non sono chiare le basi metaboliche di tale anomalo comportamento, ma in letteratura sono riportate mutazioni localizzate nella porzione C-terminale di RyR1 che conferiscono ai canali RyR1 mutati iporeattività alle stimolazioni chimiche⁶⁵. I canali RyR1 con queste mutazioni sono canali *leaky*, che rilasciano Ca^{2+} anche in assenza di stimolazione, per cui in presenza di sostanze stimolanti, i depositi del SR liberano minori quantità di Ca^{2+} . Comunque il sito di legame del 4-CmC è stato localizzato nella regione C-terminale di RyR1, nella regione tra gli aminoacidi 4007-4180, quindi è anche possibile che la mutazione Cys4659Arg possa alterare in qualche modo l'affinità di legame con la molecola stimolante.

L'utilizzo di altre molecole attivatrici come la caffeina e la rianodina che si legano in siti differenti della proteina RyR1 potrebbero fornire ulteriori informazioni sul comportamento del canale RyR1 con la mutazione Cys4659Arg.

La dimostrazione che le mutazioni identificate producono alterazioni funzionali permette di fornire informazioni molto utili per la comprensione della relazione struttura-funzione di una proteina così complessa come RyR1, e fornisce anche maggiore spettro d'azione all'indagine genetica. Infatti per le mutazioni riconosciute come causative di MH da saggi *in vitro*, il test genetico sostituisce l'IVCT. Tali studi permettono di delineare un interessante approccio sperimentale per lo studio di mutazioni potenzialmente causative di ipertermia maligna e suggerire un metodo diagnostico non invasivo per l'ipertermia maligna. Infatti con uno studio mirato sarà possibile, collezionando esperimenti da un numero elevato di campioni cellulari da soggetti MHN, definire il *range* di risposta normale nella popolazione e definire quindi dei valori soglia per ogni stimolazione con 4-CmC al di sopra dei quali considerare il soggetto a rischio di suscettibilità all'MH. Questo permetterà di poter utilizzare questa metodologia sperimentale come test diagnostico semplice e non invasivo per identificare i soggetti MHS, almeno quelli in cui la malattia è dovuta a mutazioni del gene RYR1; infatti non è ancora noto se gli altri geni, e in particolare CACNA1S, coinvolti nell'MH siano espressi nei linfociti B.

BIBLIOGRAFIA

- 1 **Nelson T.E** : "Malignant Hyperthermia: a pharmacogenetic disease of Ca²⁺regulating proteins".*Curr.Molec. Med.*2: 347-369; 2002.
- 2 Prof Henry Rosemberg, Dr Mark Davis, Mr Danielle James,Dr Neil Pollok, Dr.Kathryn Stowell: "Malignant Hyperthermia". Orphanet Encyclopedia, November 2004.
- 3 Lydia R. Christiansen, MD, and Kim A. Collins, MD: "Pathologic Findings in Malignant Hyperthermia. A Case Report and Review of Literature". *The Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2004; 25: 327-333.
- 4 Scriver C.H., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. "The metabolic and molecular bases of inherited disease". McGraw-Hill 1:225-233; 2001
- 5 Thierry Girard, Susan Treves, Evgueni Voronkov, Martin Siegemund, Albert Urwyler: "Molecular Genetic Testing for Malignant Hyperthermia Susceptibility" *Anesth.* 100:1076–80; 2004. European Malignant Hyperthermia Group. *Br. J. Anesth.*56:267-1269;1984
- 6 Ording H., Brancadoro V., Glauber V., Ellies F.R., Wappler F.: "In-vitro contracture test for diagnosis of Malignant Hyperthermia following the protocol of the European Malignant Hyperthermia Group: results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects". *European Malignant Hyperthermia Group. Acta Anesthesiol.Scand.*41: 955-66;1997.
- 7 Larach M.G., for the North American malignant group. "Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test". *Anesth.Analg.*69:511-515; 1989.
- 8 Daniel A. Reuter MD, Martin Anetseder MD, Rainer Müller MD, Norbert Roewer MD PhD, Edmund J. Hartung MD PhD: "The ryanodine contracture test may help diagnose susceptibility to

malignant hyperthermia" *Can. J. Anesth.* 2003; 50; 7 ;pp 643–648.

9 Ording H, Bendixen D.: "Sources variability in halothane and caffeine contracture tests for susceptibility to Malignant Hyperthermia".*Eur. J. Anesthesiol.* 9: 367-76;1992.

10 Anesteder M., Hager M., Muller C.R., Roewer N.: "Diagnosis of susceptibility to Malignant Hyperthermia by use of a metabolic test". *Lancet.* 359:1579-80;2002.1

Sei Y. et al. "Patients with malignant hyperthermia demonstrate an altered calcium control mechanism in B lymphocytes" *Anesth.* 97: 1052-8. 2002.

12 Zorzato F.; Fujii J.; Otsu K.; Phillips M.; Green M. "Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of RYR of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum". *Jbc* 265: 2244-56; 1989.

13 Berchtold M.V.; Brenkmeier H., and Muntener M.: "Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity and disease". *Physiol.Rev.*80:1215-1265;2000.

14 Fill. M. Copello JA: "Ryanodine receptor calcium release channel." *Phys Rev* 2002; 82; 893-922

15 Zorzato F. et al "molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of RyR1 skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *JBC* 265:2244-56.1989"

- 16 Takeshima H., Nisshimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Ueda M., Hanaoka M., Hirose T., Numa S.: "Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor". *Nature*.339:439-445;1989.
- 17 Zorzato F. et al "molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of RyR1 skeletal muscle sarcoplasmic reticulum" *JBC* 265:2244-56.1989"
- 18 Guo Guang Du; Bimal Sandhu; Vijay K. Khanna; Xing Hua Guo; David H. MacLennan* "Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1)" *PNAS* vol.99; no.26: 16725-16730; December 24; 2002
- 19 Guo Guang Du, Xinghua Guo, Vijay K. Khanna, and David H. MacLennan: "Functional Characterization of Mutants in the Predicted Pore Region of the Rabbit Cardiac Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor Isoform 2)". *Vol. 276, No. 34, Issue of August 24, pp. 31760–31771, 2001*
- 20 Du G.G., Avila G., Sharma P., Khanna V.K., Dirkesen R.T., MacLennan D.H.: "Role of sequence surrounding predicted transmembrane helix M4 in membrane association and function of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (Ryanodine Receptor Isoform 1)". *J.Biol.Chem.*279:37566-75; 2004.
- 21 Montserrat Samsò, Terence Wagenknecht & P D Allen: "Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM". *Nature Structural & Molecular Biology*. Vol.12;no.6; June 2005
- 22 Daniela rossi, Vincenzo Sorrentino: "The ryanodine receptors gene family: expression and functional meaning". *Basic Appl. Myol.* 14 (5);323-343; 2004
- 23 Flucher B. E., Conti A., Takeshima H. and Sorrentino V. "Type 3 and Type 1 ryanodine receptors are localized in triads of

the same mammalian skeletal muscle fibres". J. Cell. Biol. 146: 621-629; 1999.

24 Lopez J.R.; Alamo L.; Caputo C.; Winiski J.; Ledzema D. Muscle and nerve 8: 355-58; 1985.

25 Flucher BE et al "Type3 and type 1 ryanodine receptors are localized in triads of the same mammalian muscle fibres" J cell boil 146:621-629. 1999

26 James D. Fessenden, Wei Feng, Isaac N. Pessah, P.D. Allen: "Mutational analysis of putative calcium binding motifs within the skeletal ryanodine receptor isoform, RyR1". J.Biol.Chem. Vol.279, No. 51; october 2004

26 Rodney GG, Williams BY, Strasburg GM, Beckingham K, Hamilton SL: "Regulation of RYR1 activity by Ca(2+) and calmodulin". Biochemistry. 2000 Jul 4;39(26):7807-12.

27 Meissner G.: "Regulation of mammalian ryanodine receptors". Frontiers in Bioscience 7, d2072-2080; november 2002

28 Carroll S, Skarmeta JG, Yu X, Collins KD, & Inesi G (1991). Interdependence of ryanodine binding, oligomeric receptor interactions, and Ca²⁺ release regulation in junctional sarcoplasmic reticulum. Arch Biochem Biophys 290, 239-247.

29 Shoshan-Barmatz V & Ashley RH (1998). The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels. *Int Rev Cytol* 183, 185-270.

30 Callaway C., Seryshev A., Wang J.P., Slavik K.J., Needleman D.H., Cantu C., Wu Y., Jayaraman T., Marks A.R. Hamilton S.: "Localization of the high and low affinity [³H]Ryanodina binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel." JBC; Vol. 269; Issue 3; pp. 15876-15884; 1994

31 James D. Fessenden, Claudio F. Perez, Sam Goth, Isaac N. Pessah, P.D. Allen: "Identification of a key determinant of

ryanodine Receptor type 1 required for activation by 4-chloro-m-cresol". J.Biol.Chem. Vol.278, No. 31; august 2003.

32 Herrmann-Frank A, Richter M, Sarkozi S, Mohr U, Lehmann-Horn F. 4-Chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. 1: Biochim Biophys Acta. 1996 Feb 9;1289(1):31-40.

33 Kalanethee P.P., Takeshi Y., Manjunatha B.B., Jianjie Ma, Noriaki I., Leslie S.J., Hiromi M., Philip G.W., Jerome P.: "Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor." JBC; Vol 277; No 38; pp 34918-34923; 2002

34 Shigeki K., Mark L.B., Jaya P.G., Tamoyo H., Jerome P., Noriaki I.: "Dantrolene stabilizes domain interaction within the ryanodine receptor" JBC; (2005) ; Vol. 280; No 8; (6580–6587)

35 Meissner G. "Regulation of ryanodine receptors" 2002

36 M. Samsó, T. Wagenknecht: "Apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor." J. Biol. Chem. 277 (2002) 1349–1353.

37 G.G. Rodney, C.P. Moore, B.Y. Williams, J.Z. Zhang, J. Krol, S.E. Pedersen, S.L. Hamilton, Calcium binding to calmodulin leads to an N-terminal shift in its binding site on the ryanodine receptor, J. Biol. Chem. 276 (2001) 2069–2074.

38 Lee E.H., Rho S., Kwon S., Eom S.H., Allen P.D., Kim D H.: "N-terminal region of FKBP12 is essential for binding to the skeletal ryanodine receptor". J. Biol.Chem. 279:26481-8; 2004.

39 Avila G., Lee E.H., Perez C.F., Allen P.D., Dirksen R.T.: "FKBP12 binding to RYR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes". J. Biol. Chem. 278:22600-8;2003

40 Sun JC et al "Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle modulation" PNAS USA 98:11 159-162

- 41 Varsanyi M et al "Sarcoplasmic reticular Calcium release channel is phosphorilated in the serine 2843 in intact rabbit skeletal muscle" *Biol Chem H-P* 376:45-9 1995
- 42 Hain J et al 1994
- 43 C. Paolini, James D. Fessenden, Isaac N. Pessah, and C. Franzini-Armstrong: "Evidence for conformational coupling between two calcium channels" *PNAS*; August 24, 2004 ; vol. 101; no. 34; 12748–12752
- 44 Protasi.F.: "Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells". *Frontiers in Bioscience* 7:650-58; 2002.
- 45 Leong P., Mac Lennan D.H. : "A 37 aminoacid sequence in the skeletal muscle RYR interacts with the cytoplasmic loop between domains II-III in the skeletal muscle DHPR". *J. Biol. Chem* 273:7791-94; 1998.
- 46 Nakai, J., N. Sekiguchi, T. A. Rando, P. D. Allen, and K. G. Beam. a.: "Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels." *J. Biol. Chem.* 273; 1998; 13403–13406.
- 47 Feliciano Protasi, Cecilia Paolini, Junichi Nakai, Kurt G. Beam, Clara Franzini-Armstrong, and Paul D. Allen: "Multiple Regions of RyR1 Mediate Functional and Structural Interactions with α_{1s} -Dihydropyridine Receptors in Skeletal Muscle." *Biophysical Journal*; Volume 83; December 2002; 3230–3244
- 48 Proenza, C., J. J. O'Brien, J. Nakai, S. Mukherjee, P. D. Allen, and K. G. (Lond.). 336:134–139. Beam.: "Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the α_{1s} (CaV1.1) II-III loop." *J. Biol. Chem*; 277; 2002; 6530–6535.
- 49 Zhu X., Ghanta J., Walker J.W., Allen P. D., Valdivia H. "The calmodulin binding region of skeletal ryanodine receptor acts as self-modulatory domain". *Cell Calcium*. 35: 165-177; 2004.

- 50 George G. Rodney, Gerald M. Wilson, and Martin F. Schneider: "A Calmodulin Binding Domain of RyR Increases Activation of Spontaneous Ca²⁺ Sparks in Frog Skeletal Muscle." JBC; Vol. 280; No. 12; Issue of March 25; pp. 11713–11722; 2005
- 51 Nicole A. Beard, Magdalena M. Sakowska, Angela F. Dulhunty, Derek R. Laver: "Calsequestrin Is an Inhibitor of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Calcium Release Channels." Biophysical Journal; Vol.82; January 2002; 310–320
- 52 Ohkura M., Furukawa K., Fujimori H., Kuruma A., Kawano S., Hiraoka M., Kuniyasu A., Nakayama H., Ohizumi Y.: "Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin." Biochemistry. 1998 Sep 15;37(37):12987-93.
- 53 Gaburjakova M., Reiken S., Huang F., Marks A.R.: "FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating". J. Biol. Chem. 276:16931-5; 2001
- 54 Kobayashi Y.M. and Jones L.R.: "Identification of triadin 1 as predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium". J. Biol. Chem. 274: 28660-28668; 1999.
- 55 Tong J., McCarthy T.V. MacLennan D.H.: "Measurement of resting cytosolic Ca²⁺ concentrations and Ca²⁺ store size in HEK-293 cells transfected with malignant hyperthermia or central core disease mutant Ca²⁺ release channels". J.Biol.Chem. 274:693-702;1999.

- 55 Jae Man Lee, Seong-Hwan Rho, Dong Wook Shin, Chunghee Cho, Woo Jin Park, Soo Hyun Eom, Jianjie Ma, and Do Han Kim: "Negatively Charged Amino Acids within the Intraluminal Loop of Ryanodine Receptor Are Involved in the Interaction with Triadin." *JBC* Vol. 279; No. 8; Issue of February 20; pp. 6994–7000; 2004
- 56 Avila G., Dirksen R.T.: "Functional effects of central core disease mutations in the cytoplasmic region of skeletal muscle ryanodine receptor". *J.Gen.Physiol.*118:277-290; 2001.
- 57 Girard T., Cavagna D., Padovan E., Spagnoli G., Urwyler A., Zorzato F., Treves S.: "B-lymphocytes from malignant hyperthermia susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators". *J. Biol. Chem.* 276: 48077-48082; 2001.
- 58 Censier K., Urwyler A., Zorzato F., Treves S.: "Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals: Effect of overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors." *J.Clin. Invest.*101:1233-1242; 1998.
- 59 Li Q., Spriggs M.K., Turk S.M. Comeau M.R., Nepom B., Hutt-Fletcher L.M.: "Epstein-Barr Virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes". *J.Virology.*71:4657-4662; 1997.
- 60 Xiao W., Oefner P.J.: "Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: a review". *Human Mutation* 17:439-474; 2001.