

GEN PODATNOŚCI NA STRES *RyR1* W ASPEKTCIE WYSTĘPOWANIA HIPERTERMII ZŁOŚLIWEJ U KONI*

Agnieszka Fornal, Agata Piestrzyńska-Kajtoch, Anna Radko,
Barbara Rejduch

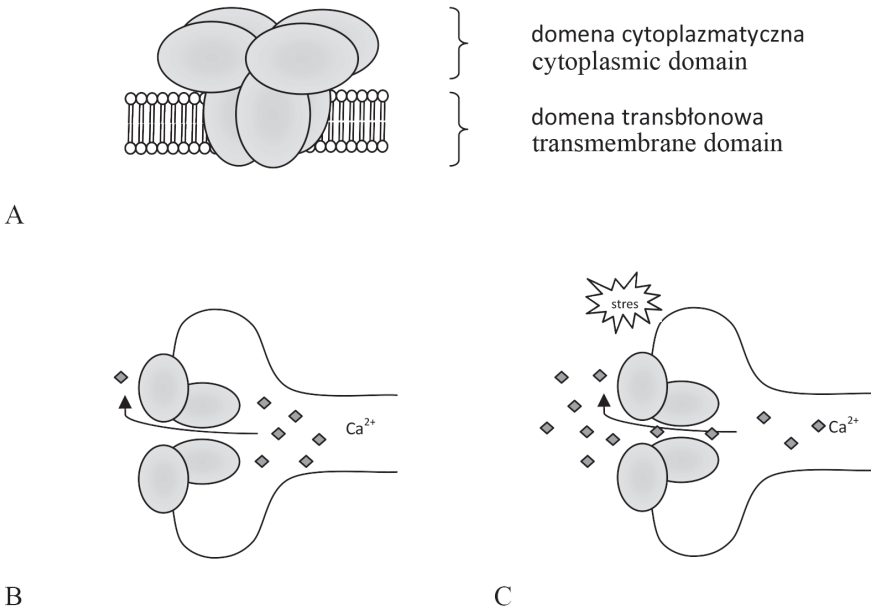
Instytut Zootechniki Państwowego Instytut Badawczy,
Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

Gen receptora rianodyny RyR1 koduje jedną z trzech izoform receptora rianodynowego odpowiedzialnego za wewnątrzkomórkową gospodarkę jonami wapnia. RyR1 jest genem kandydującym podejrzewanym o związek z hipertermią złośliwą u koni. Następstwem jego mutacji jest gwałtowne uwalnianie jonów Ca^{2+} poprzez kanał wapniowy do mięśni szkieletowych powodujące aktywację procesów metabolicznych. Szybki i trwały wzrost jonów wapnia w tej tkance prowadzi do stanu hipermetabolizmu, a nawet do śmierci. U koni podłoże hipertermii nie jest do końca poznane. Uważa się jednak, że mutacje w genie RyR1 prawdopodobnie są powiązane z tym schorzeniem. Celem artykułu jest podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmu dziedziczenia mutacji w genie RyR1 u koni.

Słowa kluczowe: RyR1, hipertermia złośliwa, konie, zaburzenia genetyczne, markery genetyczne

Receptory rianodynowe (RyR) (ryc. 1A) należą do dużej rodziny kanałów jonowych uwalnających Ca^{2+} z organelli komórkowych u eukariontów. Zlokalizowane są w siateczce endo- i sarkoplazmatycznej. Pełnią istotną rolę w kurczeniu się mięśni oraz na szlakach sygnałowych Ca^{2+} (ryc. 1B). Wyróżnia się trzy izoformy tych receptorów: RyR1, RyR2 i RyR3, kodowane przez geny o tych samych nazwach: *RyR1*, *RyR2* i *RyR3*. Każda z izoform występuje w różnych tkankach. RyR1 znaleziono głównie w mięśniach szkieletowych, RyR2 wykryto w kardiomiocytach i mózgu, a obecność RyR3 stwierdzono na niewielkim poziomie w wielu tkankach, w tym w mózgu, przeponie oraz mięśniach gładkich (Xiao i in., 2002). U koni *RyR1* jest genem kandydującym, podejrzewanym o związek z hipertermią złośliwą (McCue i in., 2009).

* Artykuł opracowany w ramach projektu statutowego IZ PIB nr 04-007.1.



Ryc. 1. Receptory rianodynowe (RyR): A. Schemat receptora rianodyny: przekrój przez błonę cytoplazmatyczną; B. Schemat pracy prawidłowego receptora rianodyny – kanał wapniowy; C. Schemat pracy zmutowanego receptora rianodyny – kanał wapniowy

Fig. Ryanodine receptors (RyR): A. Schematic of ryanodine receptor: cross-section of the cytoplasmic membrane; B. Schematic of normal ryanodine receptor activity – calcium channel, C. Schematic of mutated ryanodine receptor activity – calcium channel

Hipertermia złośliwa

Hipertermia złośliwa (ang. *malignant hyperthermia* – MH) jest groźną chorobą mięśni szkieletowych występującą u ludzi, świń, psów i koni. Choroba wywoływana jest przez stres bądź ekspozycję na anestetyki wziewne i depolaryzujące środki zwiotczające mięśnie. Na skutek działania tych czynników następuje szybki i trwały wzrost jonów wapnia w mięśniach szkieletowych (Jeong i in., 2008). Najczęstsze objawy kliniczne schorzenia to między innymi: nagły wzrost temperatury ciała (nawet do 43°C), obniżenie pH krwi, obfite pocenie, przyspieszenie oddechu, zaburzenia rytmu serca, sztywność mięśni, skurcze mięśni, niezdolność organizmu do pozbycia się zalegających metabolitów (zwłaszcza mleczanów), kwasica, w końcowym efekcie niewydolność wielonarządowa, a nawet śmierć, której może towarzyszyć stężenie pośmiertne (Aleman i in., 2004; Brislin i Theroux, 2013).

Częstość występowania MH szacuje się u ludzi na 1:15000 (dzieci) – 1:50000 (dorośli). U koni odnotowano niewiele przypadków tej choroby, co może wskazywać na niską jej częstość (Aleman i in., 2004). Po raz pierwszy opisano to schorzenie u konia w 1975 roku (Aleman i in., 2009). Do chwili obecnej stwierdzono występowanie hipertermii złośliwej u ras Quarter Horses, koni pełnej krwi angielskiej, koni Appaloosa, arabów oraz u kuców. Diagnoza opiera się na stwierdzeniu objawów klinicznych wywołanych przez środek usypiający (halotan) lub przy obserwacji

zaburzenia przykurczów badanych *in vitro* przy użyciu halotanu, sukcyńlocholin i kofeiny.

Ze względu na niską liczbę opisanych przypadków MH, etiologia schorzenia u koni nie jest wystarczająco poznana (Aleman i in., 2004). Badania histochemiczne z materiału pochodzącego z biopsji mięśni chorych koni nie wykazywały nieprawidłowości (Aleman i in., 2004; Brosnahan i in., 2010; Finno i in., 2009). Podłoże genetyczne schorzenia zostało potwierdzone u człowieka, świni oraz psa, ale jak dotąd nie potwierdzono tego u *Equus caballus* (z wyjątkiem koni rasy Quarter Horse). Uważa się natomiast, że niektóre przypadki hipertermii koni, niewywołane anestetykami, prawdopodobnie mogą być związane z rabdomiolizą (zespołem objawów chorobowych związanych z uszkodzeniem tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej) (Aleman i in., 2004). Świadczą o tym obserwacje klinicznych objawów MH wywołanych nieanestetykami wraz z rabdomiolizą, miopatią i przegrzaniem organizmu u koni rasy Quarter Horses (Aleman i in., 2009).

RyR1

Gen receptora rianodyny izoformy 1 (*RyR1*) jest jednym z największych genów u ssaków i jest wysoce konserwatywny (Aleman i in., 2004) – jego długość u *Equus caballus* wynosi 105158 pz (GenBank 2014; ENA 2014) i położony jest na chromosomie 10. U człowieka ma 104 eksony i koduje białko liczące 5038 aminokwasów (Lanner i in., 2010).

U człowieka, świni i psa stwierdzono mutacje w tym genie, które u tych gatunków są powiązane z hipertermią złośliwą (Aleman i in., 2004). U człowieka wykryto ponad 150 mutacji genu *RyR1*, które podejrzewa się o związek z hipertermią złośliwą (Lanner i in., 2010). Około 40 z nich ma charakter autosomalnie dominujący. Mutacja u psa, w wyniku której alanina zostaje zastąpiona przez walinę (FH2294: T1640C), również ma charakter dominujący, natomiast u świni pojedyncza mutacja, w wyniku której arginina zostaje zastąpiona przez cysteinę (NM_001001534: C1843T), jest recesywna (Aleman, 2008; Aleman i in., 2009; Fujii i in., 1991; Markljung i in., 2008; Roberts i in., 2001). Wszystkie mutacje w genie *RyR1* mogące mieć wpływ na występowanie hipertermii związane są z dysfunkcją uwalniania jonów wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej w mięśniach szkieletowych i zwiększają czułość kanałów jonowych na aktywację przez kofeinę, halotan oraz jony wapnia (McCue i in., 2009) (ryc. 1C). Następstwem gwałtownego uwalniania jonów jest między innymi pobudzenie procesów metabolicznych prowadzących do stanu hipermetabolizmu i kwasicy mleczanowej, a w wielu przypadkach nawet do śmierci.

U człowieka występowanie hipertermii złośliwej zostało także powiązane z występowaniem mutacji w genie kodującym receptor dihydropirydynowy (DHPR) (*CACNA1S*, NM_000069.2: 3257G→A, R1086H), z którego zbudowane są potencjało-zależne kanały typu L. Lokalny wzrost stężenia jonów wapnia powoduje aktywację kanałów rianodynowych, a mechanizm sprzężenia zwrotnego z udziałem jonów wapniowych (CIRC) aktywuje białka kurczliwe kardiomiocytów. Jednak w mięśniach szkieletowych, w których następuje ekspresja genu *RyR1*, oba receptory są bezpośrednio sprzężone (Aleman i in., 2004; Hulanicka i in., 2013; Weiss i in., 2004).

W genie *RyRI* u konia zidentyfikowano między innymi mutacje w eksonach 15, 17 oraz 46. Mutacje w eksonach 15 i 17 to mutacje ciche (ekson 15, AY375480: 228G→A; ekson 17, AY375481: 9C→T). Substytucja w eksonie 46 u konia (AY375484: 148C→G) jest mutacją zmiany sensu (ryc. 2), co prowadzi do zmiany aminokwasów w kodowanym białku (arginina zostaje zastąpiona przez glicynę). Tę samą mutację stwierdzono także u człowieka (NM_000540: 7360C→G), u którego arginina zostaje zastąpiona przez cysteinę lub histydynę (Aleman i in., 2004; Brosnahan i in., 2010). Tego typu mutacje często wpływają na funkcje białka, z tego względu największa liczba badań ukierunkowanych na MH u koni poświęcona jest właśnie analizom polimorfizmu w kodonie 46.

	mRNA	
Koń	43731	CTAATCCAAGCCGGCAAAGGCGAAGCTCTGAGGATCGCGCCATCCTGCGCTCCCTCGTGC 43851
Koń MH	43731	CTAATCCAAGCCGGCAAAGGCGAAGCTCTGAGGATCGCGCCATCCTGCGCTCCCTCGTGC 43851
		↑

Ryc. 2. Porównanie sekwencji obejmującej ekson 46 z zaznaczeniem alternatywnego nukleotydu C→G (AY375484) w sekwencji mRNA genu *RyRI* (wg Aleman i in., 2004)

Fig. 2. Comparison of the sequence of exon 46 with an alternative C→G (AY375484) nucleotide in *RyRI* mRNA sequence (acc. to Aleman et al., 2004)

W przypadkach dwóch osobników rasy Quarter Horses, u których wystąpiły objawy choroby, a w konsekwencji zgon, stwierdzono mutację w genie *RyRI* (AY375484: 148C→G). Zmutowany allel był dominujący, a przebadane osobniki były heterozygotami. Do tej pory potwierdzono przypadki zależności mutacji w genie *RyRI* ze zdiagnozowaniem hipertermii złośliwej jedynie u koni tej rasy (Aleman i in., 2009). Częstość występowania mutacji dla Quarter Horses nie jest jeszcze znana. Nie stwierdzono także związku pomiędzy tym zaburzeniem genetycznym a nawracającą wysiłkową rhabdomyolizą (Dranchak i in., 2006).

Pomimo przeprowadzonych badań dla rasy Quarter Horses nadal nie ma pewności, że to mutacja *RyRI* w eksonie 46 odpowiada za zachorowalność na hipertermię złośliwą u koni (Aleman i in., 2004). Na niejednoznaczność dotychczasowych wyników badań może mieć wpływ niewielka odległość *RyRI* oraz genu *GYSI*. Kodujący syntazę glikogenową *GYSI* oraz *RyRI* położone są na chromosomie 10 w odległości 10,5 Mpz. Mutacja w *GYSI* (EU373801: ACB14276, 926G→A) jest przyczyną przewlekłego mięśniochwatu porażennego u koni. Schorzenie to dotyczy głównie ras Quarter Horses, American Paint i Appaloosa. W badaniach prowadzonych dla spokrewnionych koni rasy Quarter Horses, wykazujących fenotyp przewlekłego mięśniochwatu porażennego, poszukiwano także mutacji w genie *RyRI*. Wśród zgenotypowanych osobników stwierdzono zarówno mutacje w genie *RyRI* lub *GYSI*, jak również w obu badanych genach jednocześnie. Jednoczesna mutacja w obu genach może prowadzić do przewlekłego mięśniochwatu porażennego o bardzo ostrym przebiegu (McCue i in., 2009).

Niezbędne są dalsze badania mechanizmu dziedziczenia mutacji w *RyRI* u koni ze względu na niską liczbę opisanych zachorowań oraz brak informacji o częstości przypadków hipertermii złośliwej u koni wywołanych obecnością mutacji w tym genie (Aleman i in., 2004). Szczególnie istotne wydaje się objęcie badaniami innych

ras koni oraz weryfikacja, czy potencjalnie występujące u nich mutacje w genie *RyR1* można powiązać z przypadkami hipertermii złośliwej.

Piśmiennictwo

- Aleman M. (2008). A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular Disord.: NMD*, 18 (4): 277–87.
- Aleman M., Riehl J., Aldridge B.M., Lecouteur R.A., Stott J.L., Pessah I.N. (2004). Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve*, 30 (3): 356–365.
- Aleman M., Nieto J.E., Magdesian K.G. (2009). Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *J. Vet. Inter. Med.*, 23: 329–334.
- Brislin R.P., Theroux M.C. (2013). Core myopathies and malignant hyperthermia susceptibility: a review. *Paediatr. Anaesth.*, 23 (9): 834–41.
- Brosnahan M.M., Brooks S.A., Antczak D.F. (2010). Equine clinical genomics: A clinician's primer. *Equine Vet. J.*, 42 (7): 658–70.
- Dranchak P.K., Valberg S.J., Onan G.W., Gallant E.M., Binns M.M., Swinburne J.E., Mickelson J.R. (2006). Exclusion of linkage of the RYR1, CACNA1S, and ATP2A1 genes to recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.*, 67 (8): 1395–1400.
- ENA European Nucleotide Archive (2014.04.28) <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AH015510>
- Finno C.J., Spier S.J., Valberg S.J. (2009). Equine diseases caused by known genetic mutations. *Vet. J. (London, England: 1997)*, 179 (3): 336–47.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., MacLennan D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253 (5018): 448–451.
- GenBank (2014.04.28) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AH015510.2>
- Hulanicka M., Garncarz M., Parzeniecka-Jaworska M., Jank M. (2013). Molekularne mechanizmy niewydolności serca u psów. *Życie Weter.*, 88 (12): 1029–1031.
- Jeong S.-K., Kim D.-C., Cho Y.-G., Sunwoo I.-N., Kim D.-S. (2008). A double mutation of the ryanodine receptor type 1 gene in a malignant hyperthermia family with multimimicore myopathy. *J. Clin. Neurol.*, 4 (3): 123–130.
- Lanner J.T., Georgiou D.K., Joshi A.D., Hamilton S.L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.*, 2 (11): a003996.
- Markljung E., Braunschweig M.H., Karlskov-Mortensen P., Bruun C.S., Sawera M., Cho I.C., Andersson L. (2008). Genome-wide identification of quantitative trait loci in a cross between Hampshire and Landrace II: meat quality traits. *BMC Genetics*, 9 (1), pp. 22.
- McCue M.E., Valberg S.J., Jackson M., Borgia L., Lucio M., Mickelson J.R. (2009). Polysaccharide storage myopathy phenotype in quarter horse-related breeds is modified by the presence of an RYR1 mutation. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 19 (1): 37–43.
- Roberts M.C., Mickelson J.R., Patterson E.E., Nelson T.E., Armstrong P.J., Brunson D.B., Hogan K. (2001). Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RYR1). *Anesthesiology*, 95 (3): 716–725.
- Weiss R.G., O'Connell K.M., Flucher B.E., Allen P.D., Grabner M., Dirksen R.T. (2004). Functional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. *Am. J. Physiol.-Cell Ph.*, 287 (4): C1094–C1102.
- Xiao B., Masumiyi H., Jiang D., Wang R., Sei Y., Zhang L., Murayama T., Ogawa Y., Anthony Lai F., Wagenknecht T., Chen, S.W. (2002). Isoform-dependent formation of heteromeric Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *J. Biol. Chem.*, 277 (44): 41778–41785.

AGNIESZKA FORNAL, AGATA PIESTRZYŃSKA-KAJTOCH, ANNA RADKO,
BARBARA REJDUCH

Ryanodine receptor gene (*RYRI*) in the context of equine malignant hyperthermia

SUMMARY

The ryanodine receptor gene (*RYRI*) encodes one of three isoforms of ryanodine receptor responsible for intracellular metabolism of calcium ions. *RyRI* is a candidate gene for equine malignant hyperthermia. Its mutation results in Ca^{2+} ions being rapidly released through the calcium channel to skeletal muscles, which activates the metabolic processes. The rapid and steady increase of calcium ions in this tissue leads to hypermetabolism and even death. In horses, the underlying mechanism of hyperthermia is not completely understood, although mutations in the *RyRI* gene are thought to be related to this condition. The aim of the paper was to summarize current knowledge about the mechanism of the mutation inheritance in the equine *RyRI* gene.

Key words: *RyRI*, malignant hyperthermia, horses, genetic disorders, genetic markers