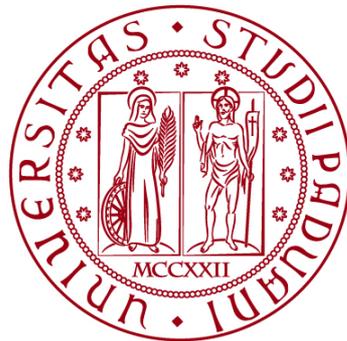


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**UTILIZZO DI MODELLI IN VITRO PER LO STUDIO  
DELLA PSEUDOMIOTONIA BOVINA E DEL SUO  
OMOLOGO NELL'UOMO, LA MIOPATIA DI  
BRODY**

**Tutor: Prof.ssa Roberta Sacchetto**

**Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

**Laureanda: Alessia Rossi**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## INDICE

ABSTRACT .....	4
1 STATO DELL'ARTE .....	5
1.1 Anatomia del muscolo scheletrico .....	5
1.2 Fisiologia del muscolo scheletrico .....	6
1.3 Pompa SERCA .....	7
1.4 Pseudomiopia congenita nei bovini .....	8
1.5 Miopatia di Brody .....	9
2 APPROCCI SPERIMENTALI .....	11
2.1 Sintesi del costrutto SERCA1 .....	11
2.2 Mutagenesi sito diretta .....	11
2.3 Plasmide pcDNA3.1 .....	12
2.4 Colture cellulari .....	13
2.5 Trasfezione .....	14
3. Risultati ottenuti mediante l'uso del costrutto SERCA1 .....	15
4 CONCLUSIONE .....	20



## ABSTRACT

La pompa SERCA trasporta ioni calcio dal citoplasma al reticolo endoplasmatico, risultando fondamentale per il rilassamento muscolare e l'omeostasi del calcio. In particolare, viene discusso un disturbo osservato fin dalla nascita in alcuni bovini, chiamato Pseudomiopia congenita (PMT), omologo alla miopatia di Brody negli esseri umani. Entrambe sono causate da mutazioni nel gene ATP2A1, che codifica per SERCA1. Nella PMT bovina, la mutazione R164H causa accumulo di SERCA1 mutata. Anche nella specie di bovini Romagnola, le mutazioni G211V/G286V riducono l'espressione di SERCA1. L'approfondimento dei meccanismi patologici richiede la creazione di costrutti di cDNA espressi in colture cellulari. Questo approccio consente di studiare in dettaglio le basi molecolari di diverse malattie. La manipolazione genetica attraverso costrutti di cDNA offre l'opportunità di esaminare gli effetti delle mutazioni e delle varianti geniche sulle vie cellulari. Questi modelli bovini potrebbero aiutare a comprendere la miopatia di Brody e sviluppare terapie adeguate, poiché attualmente non esiste una terapia specifica.

## 1 STATO DELL'ARTE

### 1.1 Anatomia del muscolo scheletrico

I muscoli scheletrici sono deputati al movimento del corpo umano e conferiscono motilità allo scheletro, rendendo possibili differenti azioni.

Il muscolo scheletrico è formato da un insieme di cellule cilindriche lunghe da 1 mm a 20 cm, con diametro di 10-100  $\mu\text{m}$ , note anche come fibre muscolari. Esse sono multinucleate e si trovano all'interno della membrana plasmatica, detta sarcolemma. All'interno delle singole fibre, le proteine contrattili miosina e actina si trovano, rispettivamente, in filamenti spessi e sottili, disposti in modelli di bande ripetute chiamati sarcomeri. I sarcomeri in serie formano le miofibrille; il numero di miofibrille, disposte in parallelo, determina la capacità di generazione della forza della fibra. Il cambiamento nella lunghezza dei singoli sarcomeri si verifica quando i filamenti spessi e sottili scorrono l'uno sull'altro.

I filamenti spessi sono composti da molecole di miosina, la quale rappresenta il motore del muscolo. La miosina è un esamero costituito da due catene proteiche che si intrecciano a formare una lunga coda e due teste globulari. Ogni testa ha due catene proteiche: una pesante e una leggera. La catena pesante è il dominio che lega l'ATP e usa l'energia del legame fosfato dell'ATP per generare il movimento; inoltre, la catena pesante contiene un sito di legame per l'actina. Le varie molecole di miosina che formano il filamento spesso sono organizzate con le teste raggruppate all'estremità, mentre il centro del filamento è un fascio di code.

L'actina è la proteina che costituisce il filamento sottile, è una proteina globulare, G-actina, che polimerizza a formare lunghe catene chiamate F-actina. Infatti, nel muscolo scheletrico, due polimeri di F-actina si avvolgono insieme per formare il filamento sottile. Ciascuna G-actina ha un sito di legame per la miosina.

I filamenti sottili e filamenti spessi sono connessi tra di loro attraverso ponti trasversali, formati dalle teste di miosina che si legano ai siti sul filamento di actina.

La disposizione dei filamenti spessi e sottili crea l'alternarsi di bande chiare e scure che si ripetono in tutta la lunghezza. Ogni ripetizione delle bande costituisce il sarcomero, già menzionato precedentemente. Il sarcomero è formato da filamenti che si trovano nella zona delimitata da due linee Z; queste linee, o dischi Z, sono costituite da proteine che formano una struttura a zig-zag con la funzione di attacco per i filamenti sottili. Le bande più chiare del sarcomero sono formate da bande I, composte esclusivamente da filamenti sottili; ogni disco Z attraversa a metà la banda I, per questo motivo tali bande appartengono a due sarcomeri diversi. Le bande più scure, invece, sono le bande A, all'estremità delle quali i filamenti spessi e sottili si sovrappongono. La regione centrale della banda A, la zona H, è occupata esclusivamente dai filamenti di miosina. Infine, vi è la linea M, che è costituita da proteine a cui si attaccano i filamenti spessi. Ogni linea M divide a metà una banda A. Il reticolo sarcoplasmatico (RS) avvolge ciascuna miofibrilla, è costituito da tubuli longitudinali con regioni chiamate cisterne terminali. Il reticolo sarcoplasmatico ha la funzione di concentrare o sequestrare ioni calcio con l'aiuto di una  $Ca^{2+}$ -ATPasi; gli ioni calcio sono fondamentali per la contrazione dei muscoli. Associate alle cisterne terminali ci sono i tubuli trasversi, detti tubuli T; l'insieme di un tubulo T e delle due cisterne terminali è detta triade. I tubuli T permettono la propagazione dei potenziali d'azione lungo tutta la fibra muscolare.

## 1.2 Fisiologia del muscolo scheletrico

La contrazione muscolare permette di generare forza; infatti, una fibra muscolare che si contrae esercita una tensione e si accorcia. Tale contrazione è il prodotto delle interazioni tra i filamenti spessi e filamenti sottili, attraverso la teoria dello scivolamento dei filamenti.

La contrazione muscolare è controllata attraverso una serie di eventi dal sistema nervoso. Ciascuna fibra muscolare è controllata da un motoneurone; esso rilascia i neurotrasmettitori che alterano il potenziale transmembrana del sarcolemma. L'acetilcolina rilasciata nelle sinapsi a livello della giunzione neuromuscolare, si lega ai canali recettori

dell'acetilcolina a livello della placca motrice. Quando i canali acetilcolina-dipendenti si aprono, consentono al  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  di attraversare il sarcolemma. L'ingresso di  $\text{Na}^+$  è superiore all'uscita di  $\text{K}^+$ , in questo modo la presenza di cariche positive depolarizza la membrana e dà origine al potenziale di placca. I potenziali di placca sono sempre sopra soglia e danno origine ai potenziali d'azione muscolare. Il potenziale d'azione si propaga lungo i tubuli T e sul reticolo sarcoplasmatico.

Sulla membrana del tubulo T sono presenti dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, chiamati recettori della diidropiridina (DHPR), mentre sul reticolo sarcoplasmatico sono presenti i canali di rilascio del calcio, detti recettori per la rianodina (RyR). Il potenziale d'azione instaura un cambiamento conformazionale di DHPR che provoca effetti sterici ai canali RyR, i quali si aprono. I canali RyR si chiudono in seguito all'aumento della concentrazione del calcio sul lato citosolico. Il calcio è un messaggero intracellulare fondamentale per la contrazione; infatti, la contrazione continua fino a che la concentrazione di calcio nel citoplasma rimane alta. Il rilassamento muscolare è quindi determinato dalla rimozione del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico, effettuata dalle pompe SERCA. I difetti genetici nei canali di rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$  sono associate a malattie, classificate come miopatie congenite.

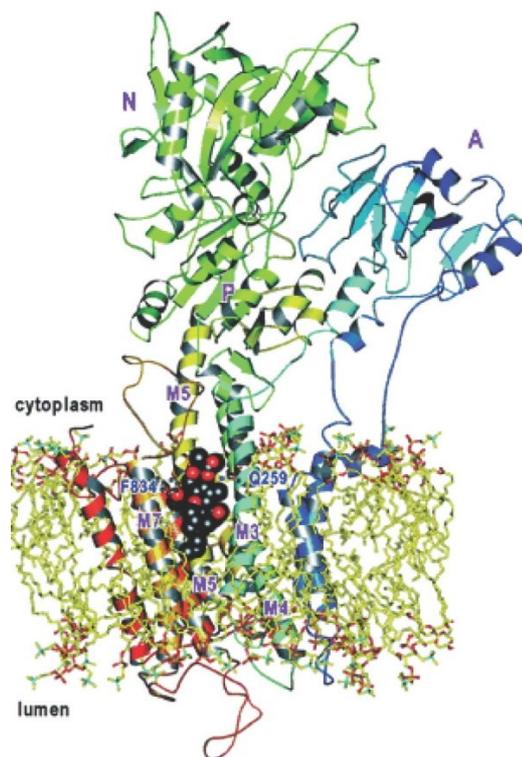
### 1.3 Pompa SERCA

SERCA è una pompa ATPasica di tipo P, appartenente alla famiglia del calcio ATPasi. La pompa SERCA è codificata da una famiglia di tre geni: SERCA 1, 2, e 3, altamente conservati. Queste isoforme sono espresse nei muscoli striati a seconda del tipo di tessuto e in base allo stadio di sviluppo.

SERCA è una proteina integrale di membrana di circa 110KDa, ripiegata in quattro domini principali: un dominio transmembrana M, dove sono presenti i siti di legame con il  $\text{Ca}^{2+}$  e tre domini citoplasmatici, chiamati domini Nucleotide- Binding N, Phosphorylation P e Actuator A.

La pompa SERCA trasporta due ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dal citoplasma al lume del reticolo endoplasmatico a scapito dell'idrolisi di una molecola di ATP,

svolgendo un ruolo fondamentale nel rilassamento muscolare e nel mantenimento del  $Ca^{2+}$  intracellulare a riposo. A seconda della conformazione della proteina, i siti di legame possono trovarsi in uno stato ad alta affinità, che consente l'accesso dal lato citosolico, stato E1, o in uno stato a bassa affinità, rivolto verso il lume della membrana, stato E2. L'isoforma SERCA1 è espressa nelle fibre muscolari scheletriche a contrazione rapida, mentre l'isoforma SERCA2 è espressa nelle fibre muscolari a contrazione lenta e nel cuore. SERCA 1 rappresenta l'isoforma più specializzata e ne esistono due varianti, SERCA1a e SERCA 1b; questa differenza deriva dallo splicing alternativo del trascritto del gene ATP2A1. Anche SERCA 2 presenta due isoforme diverse: SERCA2a e SERCA2b, entrambe prodotte dal gene ATP2A2.



#### 1.4 Pseudomiopia congenita nei bovini

In studi recenti è stato descritto un disturbo muscolare congenito nei bovini di razza Chianina, chiamato Pseudomiopia congenita (PMT), è una malattia ereditaria autosomica recessiva. La razza Chianina è una

razza italiana conosciuta per la qualità della carne e per la qualità del cuoio.

Questa patologia è caratterizzata da una contrattura muscolare che impedisce agli animali di svolgere attività muscolari. In particolare, gli animali mostrano la contrattura muscolare quando vengono stimolati a muoversi più velocemente o in seguito a stress. Quando gli animali vengono stimolati a muoversi velocemente, i muscoli diventano rigidi, ma tale rigidità scompare non appena l'esercizio termina. Il fenotipo clinico della pseudomiopia congenita di Chianina è simile al fenotipo della miopia di Brody nell'uomo, dovuto ad un deficit della pompa  $Ca^{2+}$  ATPasi, SERCA1. In questi studi è stato identificato il difetto genetico: si tratta di una mutazione puntiforme nell'esone 6 del gene ATP2A1, che porta alla sostituzione di un'arginina con l'istidina in posizione 164 nella proteina SERCA1 (R164H). In seguito, sono stati studiati anche altre razze di bovini, come ad esempio i bovini Romagnola. Anche questi bovini, affetti da PMT, mostrano gli stessi sintomi dei bovini di Chianina, dovuta ad una diminuzione dell'attività di SERCA1. In questa razza sono state descritte due mutazioni nell'esone 8, che portano a sostituzioni di glicina con valina in posizione 211 e 286 (V211G e V286G) nella proteina SERCA1.

La somiglianza tra la miopia di Brody e la pseudomiopia nei bovini ha portato a supporre che la rigidità muscolare sia dovuta ad un deficit della proteina SERCA1 a livello delle membrane del reticolo sarcoplasmatico. La mutazione osservata si traduce nell'incapacità di SERCA1 di sostenere il rilascio di  $Ca^{2+}$  durante il rilassamento.

### 1.5 Miopia di Brody

In seguito ai sintomi clinici del disturbo muscolare dei bovini di Chianina e Romagnola, è stata evidenziata la somiglianza con la miopia di Brody nell'uomo.

La miopia di Brody è stata descritta per la prima volta nel 1969, anno in cui Brody osservò un caso di notevole rigidità muscolare e la definì una "compromissione del rilassamento muscolare". Successivamente, nel

1986, Karpati scoprì che questo particolare fenotipo derivava da una carenza della proteina SERCA1 nel muscolo scheletrico.

La malattia di Brody è una miopatia autosomica recessiva caratterizzata da rigidità muscolare. È una malattia estremamente rara, con un'incidenza di 1 su 10 milioni. È dovuta a mutazioni nel gene ATP2A1, che codifica per la proteina  $Ca^{2+}$  ATPasi di tipo 1 (SERCA1) del reticolo sarcoplasmatico.

I pazienti colpiti da miopatia di Brody mostrano una diminuzione dell'attività  $Ca^{2+}$  ATPasi. Le mutazioni della malattia di Brody sono mutazioni nel gene ATP2A1 con perdita di funzione, in quanto si tratta di mutazioni che portano a codoni di stop prematuri o sostituzioni, impedendo alla proteina di essere espressa correttamente.

Tale patologia porta a rigidità muscolare indotta dall'esercizio; inoltre, i crampi muscolari possono peggiorare con l'esposizione al freddo. La maggior parte dei pazienti affetti da miopatia di Brody hanno riportato l'insorgenza dei sintomi già durante l'infanzia, nella prima decade di vita. I gruppi muscolari maggiormente colpiti sono gli arti inferiori, gli arti superiori e le palpebre.

## 2 APPROCCI SPERIMENTALI

### 2.1 Sintesi del costrutto SERCA1

Per studiare il ruolo delle mutazioni che causano una ridotta espressione nella proteina SERCA1, sono stati creati tre diversi costrutti di cDNA.

Il cDNA di SERCA1 bovino adulto a lunghezza intera è stato generato sinteticamente sulla base della sequenza di database dell'mRNA. I siti di restrizione, Hind III e NotI, sono stati aggiunti a monte dell'ATG e a valle del codone di stop rispettivamente, per consentire il clonaggio del frammento nel vettore di espressione pcDNA 3.1.

### 2.2 Mutagenesi sito diretta

La mutagenesi sito diretta è uno strumento per modificare le sequenze di DNA e per studiare le relazioni struttura- funzione delle proteine. Questa metodica si ottiene grazie all'impiego di kit commerciali prodotti da varie ditte. Il protocollo utilizzato permette di effettuare mutazioni puntiformi e sostituzioni amminoacidiche, eliminare o inserire singoli o multipli amminoacidi. Questa tecnica permette di generare mutanti con elevata efficienza, superiore all'80%. Allo scopo di studiare l'effetto delle mutazioni che causano la pseudomiopia congenita del bovino, le mutazioni introdotte sono R264H, G211V e G286V. La procedura utilizza un vettore di DNA a doppio filamento con l'inserito di interesse, due primer oligonucleotidici sintetici, entrambi contenenti la mutazione desiderata e una polimerasi termostabile, la PfuTurbo DNA polimerasi, che replica entrambi i filamenti plasmidici senza rimuovere i primer mutati. Dopo l'appaiamento degli oligonucleotidi la DNA polimerasi estende i primer generando il plasmide mutato; il sistema prevede la digestione del DNA mediante l'endonucleasi DpnI. Questa endonucleasi, Dpn I, con sequenza 5'-Gm6ATC-3', è specifica per il DNA metilato ed emimetilato, viene usata per digerire il DNA parentale e per selezionare il DNA che presenta le mutazioni. Il vettore mutato viene purificato con la resina e trasformato in cellule competenti XL1- Blue. La piccola quantità di DNA stampo iniziale

richiesta per effettuare questo metodo, l'alta fedeltà della DNA polimerasi, il basso numero di cicli termici e la bassa probabilità di avere mutazioni casuali, contribuiscono all'alta efficienza di questa procedura. Per una maggiore probabilità di riuscita dell'esperimento, si devono tenere presenti alcuni accorgimenti:

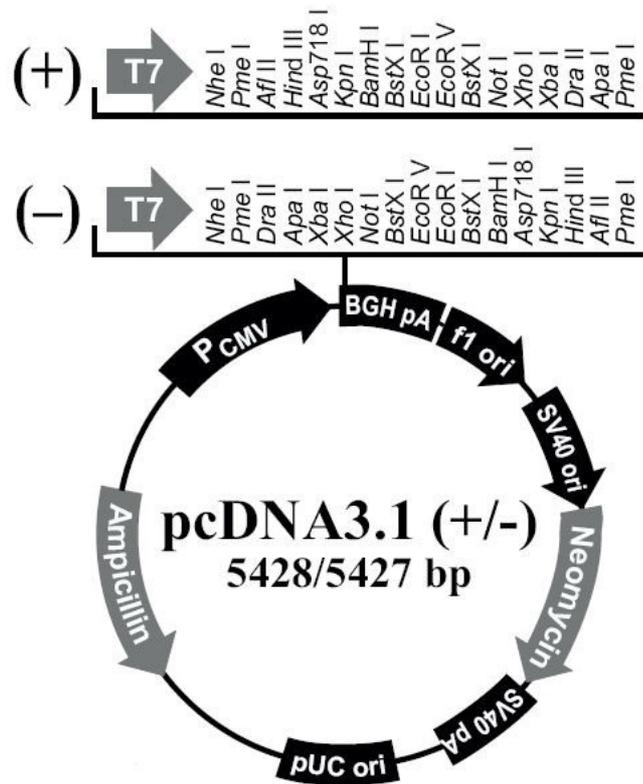
- il plasmide viene sintetizzato a partire dai primers mutagenici che devono essere progettati con una temperatura di fusione ( $T_m$ ) maggiore o uguale a  $78^\circ\text{C}$  ed una lunghezza compresa tra 25 e 45 basi;
- la mutazione desiderata deve trovarsi al centro del primer mutagenico e la regione del mismatch deve avere sia a destra che a sinistra 10-15 basi correttamente appaiate;
- per ottenere un primer efficiente, questo deve contenere il 40% di basi G e C e deve terminare con più di una G o C.

Per ottenere l'isoforma SERCA1 a lunghezza intera, in cui è stata rimossa l'estensione C-terminale, è stata eseguita una PCR con i seguenti primer: forward 5'-CAAG AAGCTT GCGCAATGGAG, e reverse 5'-CTTTCGAATTCTTAACCTTCCAGGTAGTTCC. Il forward primer contiene un sito di restrizione HindIII a monte del codone di ATG per facilitarne la clonazione. Mentre il reverse primer permette di cambiare la codifica della tripletta glutammato in glicina, tale tripletta è un codone di stop e introduce un sito di restrizione EcoRI per la clonazione. Dopo la digestione, il frammento è stato clonato nel vettore di espressione pcDNA3.1.

### 2.3 Plasmide pcDNA3.1

Il plasmide utilizzato per questo progetto è pcDNA3.1, ha una lunghezza di 5,4 Kb ed è stato progettato per l'espressione stabile nelle cellule di mammifero. Il vettore contiene un promotore immediato del citomegalovirus umano (CMV) per l'espressione di un'ampia gamma di cellule, possiede siti di clonazione multipli, è presente un gene per la resistenza di neomicina e ha anche sito di replicazione per linee cellulari infettate da SV40. Una volta identificato il clone corretto, si procede purificando la colonia e si conserva una scorta di DNA del plasmide a -

20°C. Si distribuisce la colonia su una piastra contenente terreno solido addizionato con 50 µg/ml di ampicillina, in seguito la piastra viene incubata a 37°C per tutta la notte. Una volta generato il clone, è necessario isolare il DNA plasmidico per la trasfezione, il quale deve essere precedentemente purificato in quanto i contaminanti possono uccidere le cellule, mentre il cloruro di sodio (NaCl) interferisce con l'aggregazione lipidica, riducendo così l'efficienza di trasfezione.



Utilizzo del costrutto SERCA1.

Il costrutto SERCA1 è stato principalmente usato per trasfettare linee cellulari eterologhe.

#### 2.4 Colture cellulari

Le cellule utilizzate in questi studi sono HEK293, esse sono una linea cellulare derivata dal rene embrionale umano, isolate negli anni 70' da

Alex Van derEb. Questa linea cellulare è stata prodotta tramite trasfezione utilizzando come vettore l'adenovirus 5, nel cromosoma 19 del genoma delle cellule fetali. Grazie alla sua capacità di trasfezione, HEK293 viene utilizzata per l'espressione proteica.

Le procedure di coltura e manipolazione di linee cellulari devono essere effettuate nelle apposite strutture, BSL-2, e ogni piano di lavoro deve essere sterilizzato con etanolo al 70%. Le cellule HEK293 sono state contate, seminate e coltivate in terreno con un elevato contenuto di glucosio DMEM integrato con siero bovino fetale (FBS) al 10%. Le cellule sono conservate a  $-70^{\circ}\text{C}$  e per scongelarle occorre agitare delicatamente la fiala a bagnomaria a  $37^{\circ}\text{C}$ . Successivamente si centrifuga il contenuto a 125 g per circa 5-7 minuti e si risospende il pellet di cellule con il terreno di crescita. Per evitare un'eccessiva alcalinità del terreno si preferisce incubare nuovamente il terreno di coltura completo per circa 15 minuti, in questo modo si raggiunge il pH 7-7,6. Infine, bisogna incubare la coltura a  $37^{\circ}\text{C}$  in un incubatore adeguato in un'atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$ .

## 2.5 Trasfezione

Le cellule HEK 293 vengono trasfettate con cDNA mutanti wild type e con vettore mutante contenente le mutazioni G211V, G286V, utilizzando il reagente apposito: TransIT-293, seguendo le istruzioni riportate dal produttore, MirusBio. Tale reagente è in grado di fornire un'elevata efficienza di trasfezione del DNA plasmidico, una bassa tossicità, semplicità di utilizzo e riproducibilità, inoltre le trasfezioni non richiedono dei cambi di terreno. Di seguito viene descritta la procedura da eseguire per la trasfezione: riscaldare il reagente TransIT-293 a temperatura ambiente e agitare delicatamente prima dell'uso; mettere 250  $\mu\text{l}$  di Opti-MEM1 Reduced Serum Medium in una provetta sterile, aggiungere poi 2,5  $\mu\text{g}$  di DNA plasmidico e miscelare il tutto. Successivamente aggiungere 7,5  $\mu\text{g}$  di reagente TransIT-293, pipettare per mescolare il contenuto e incubare a temperatura ambiente. Sedici ore dopo la trasfezione, le cellule sono state incubate per otto ore con gli inibitori del proteasoma MG132, lactacystin o bortezomib e poi sciolto in DMSO.

### 3. Risultati ottenuti mediante l'uso del costrutto SERCA1

La mutazione missenso porta ad uno scambio di amminoacidi all'interno di un dominio altamente conservato di SERCA1. La mutazione osservata influenza la funzione e la struttura della proteina; infatti, è stata analizzata una riduzione dell'attività di SERCA1 nel muscolo scheletrico affetto da pseudomiopia congenita.

Nello studio preso in esame, si è sviluppato un modello cellulare adeguato a indagare il ruolo del sistema ubiquitina - proteasoma (UPS) nella pseudomiopia congenita nei bovini di Chianina. A tal fine, sono state trasfettate cellule HEK293 con cDNA che codifica per la proteina SERCA1 di tipo selvatico (WT) e per la sua variante mutata R164H.

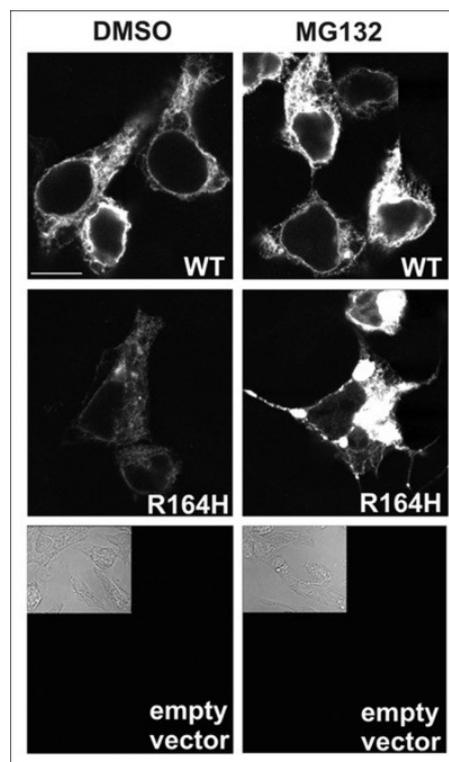
L'analisi mediante immunofluorescenza ha dimostrato che nella linea WT-HEK293, la SERCA1 si localizzava nel reticolo endoplasmatico e anche la variante mutante R164H era correttamente indirizzata, ma il livello di espressione era inferiore rispetto alla forma selvatica. La riduzione dell'immunoreattività di SERCA1 è stata confermata dall'analisi di immunoblotting del lisato cellulare.

Successivamente è stato testato il ruolo dell'UPS nella ridotta espressione della proteina mutante. Per questo motivo le cellule WT-HEK293 e R164H-HEK293 sono state trasfettate con MG132, ossia un inibitore del proteasoma. Le cellule che esprimevano la proteina mutante R164H SERCA1 hanno mostrato un significativo aumento dell'immunoreattività per la SERCA1. Inoltre, i risultati ottenuti mediante immunofluorescenza sono stati ulteriormente confermati anche dall'analisi immunoblotting del lisato cellulare totale con lo stesso anticorpo.

Ulteriori evidenze a favore dell'ipotesi che l'UPS sia coinvolto nella ridotta espressione della proteina mutante R164H SERCA1 sono state ottenute incubando le cellule WT-HEK293 e R164H-HEK293 con altri inibitori specifici del proteasoma, come la lactacistina e il bortezomib. L'analisi immunoblot del lisato cellulare totale con gli anticorpi per la SERCA1 ha confermato che il livello di espressione della proteina mutante aumentava dopo il trattamento con i diversi inibitori. Questi risultati supportano l'ipotesi

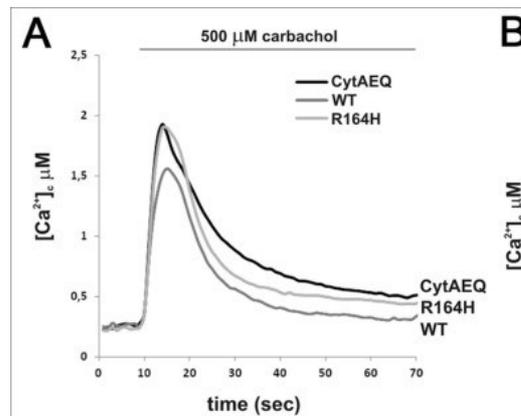
che la proteina mutante SERCA1 venga degradata in modo selettivo dall'UPS. L'ubiquitinazione è il primo passo della degradazione proteica mediata dall'UPS, il trattamento con MG132 consente l'accumulo di forme poliubiquitinate della proteina destinata alla degradazione. È stato dimostrato che la proteina mutante R164H SERCA1 accumulava una grande quantità di poliubiquitinazione dopo il trattamento con MG132, mentre la proteina WT SERCA1 mostrava solo un lieve incremento di ubiquitinazione.

L'inibizione dell'UPS nelle cellule R164H-HEK293 provoca l'accumulo della proteina SERCA1. Inoltre, è stato dimostrato che il ripristino dei livelli di proteina mutante tramite il trattamento con MG132 ripristina la funzionalità della SERCA1, come evidenziato dall'aumento dell'attività Ca<sup>2+</sup>-ATPasi misurata nelle frazioni di membrane microsomiali isolate dalle cellule trasfettate.



Per indagare ulteriormente l'effetto funzionale del recupero della SERCA1 mutata tramite trattamento con inibitori del proteasoma, è stata monitorata la capacità della WT- SERCA1 o R164H di contrastare le transizioni del

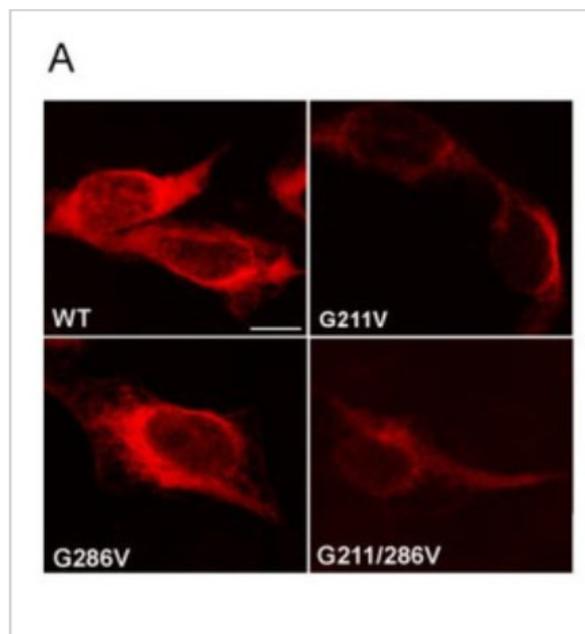
calcio citosolico indotte dalla stimolazione cellulare nelle cellule HEK293, sia prima che dopo il trattamento con MG132.



L'ampiezza del picco del transitorio del calcio e la cinetica di decadimento più rapida nelle cellule WT-HEK293 riflettono chiaramente una maggiore densità della pompa del calcio rispetto alle cellule native HEK293. Si può inoltre notare che l'altezza del picco del calcio non è influenzata dalla sovraespressione della SERCA1 R164H, ma la cinetica della fase di decadimento delle tracce del calcio nella fase iniziale immediatamente dopo il picco è più rapida rispetto alle cellule native HEK293 e molto simile a quella delle cellule WT-HEK293. Le cellule che sovraesprimono la SERCA1 R164H sono meno efficienti rispetto alle WT-HEK293 nel contrastare il picco del transitorio di concentrazione di calcio indotto dalla stimolazione, ma ripristinano i livelli basali di calcio più rapidamente rispetto alle cellule native HEK293. Questi dati confermano che l'introduzione della mutazione R164H non abolisce l'attività della pompa, in accordo con gli esperimenti in cui è stata misurata l'attività della  $Ca^{2+}$ -ATPasi in microsomi, e suggeriscono che la capacità compromessa di contrastare il transitorio del picco dipenda dalla minore quantità di espressione della pompa SERCA. Insieme, questi risultati dimostrano che l'omeostasi fisiologica del calcio nelle cellule che esprimono la SERCA1 mutata può essere ripristinata bloccando l'UPS.

Un ulteriore studio si concentra sulle sostituzioni amminoacidiche G211V e G286V che causano una ridotta espressione della proteina SERCA1 nei bovini Romagnola. Sono stati creati tre diversi costrutti di cDNA, che

hanno permesso di studiare l'espressione cellulare e la funzione enzimatica. Le mutazioni di SERCA1 sono state introdotte nel cDNA a lunghezza intera che codifica per l'isoforma adulta di SERCA1 a contrazione rapida. Tramite la tecnica di mutagenesi sito specifica, le mutazioni sono state trasfettate in cellule HEK293 con cDNA wild-type di origine bovina o con cDNA mutato G211V, G286V e G211/286V per SERCA1. L'espressione di SERCA1 è stata valutata tramite analisi di immunofluorescenza; le cellule trasfettate sono state immunomarcate con anticorpi monoclonali contro SERCA1. È stato osservato che le varianti mutanti G211V e G211/286V di SERCA1 presentavano un livello di espressione significativamente inferiore rispetto alla forma selvatica (WT), mentre il singolo mutante G286V mostrava un pattern di espressione simile a WT.



Si è riscontrato che le varianti G211V e G211/286V avevano una capacità di pompare il calcio notevolmente inferiore rispetto a WT, indicando una ridotta funzionalità delle pompe mutanti.

Successivamente è stato studiato il coinvolgimento del sistema ubiquitina-proteasoma nell'espressione ridotta di SERCA1 che trasporta la mutazione G211V. Le cellule HEK293 sono state trattate con l'inibitore

dell'UPS con MG132, ciò ha portato ad un aumento significativo dell'espressione delle varianti G211V e G211/286V, mentre l'espressione della proteina wild-type è rimasta inalterata. Si è scoperto che il G211V SERCA1 trattato con MG132 ha mostrato un'attività di pompa del calcio più elevata rispetto a quella non trattata, indicando che la mutazione G211V non elimina completamente la funzione della pompa SERCA1.

#### 4 CONCLUSIONE

La pseudomiopia bovina congenita è una rara malattia descritta per la prima volta nei bovini di razza Chianina. I bovini affetti da tale patologia sono caratterizzati da rigidità muscolare; i sintomi somigliavano a quelli presenti nei pazienti colpiti da miopatia di Brody. Le somiglianze tra i fenotipi clinici hanno portato a ipotizzare che il ritardo nel rilassamento muscolare osservato nei bovini potrebbe essere la conseguenza di un'elevata concentrazione di calcio citoplasmatico e che un difetto genetico di SERCA1 potrebbe anche essere alla base della PMT Chianina.

Questa ipotesi è stata confermata grazie al sequenziamento del DNA nei vitelli affetti da PMT, in cui era possibile osservare una mutazione missenso nell'esone 6 del gene ATP2A1. La mutazione comporta una sostituzione dell'arginina 164 con un'istidina in una regione altamente conservata. Utilizzando, perciò un approccio sperimentale attraverso l'utilizzo di un modello cellulare eterologo HEK293, che sovraesprime il mutante R164H di SERCA1. Infatti, grazie ad inibitori del proteasoma, utilizzati per bloccare l'UPS, si osserva che il mutante R164H subisce ubiquitinazione e che la proteina R164H si accumula nelle cellule HEK293 a livelli paragonabili alle cellule che esprimono il wild type.

La mutazione R164H non interferisce con la corretta localizzazione della pompa SERCA1, poiché la proteina recuperata viene correttamente indirizzata verso il reticolo endoplasmatico. Si ritiene che il sistema UPS sia principalmente coinvolto nella rimozione delle mutazioni mal ripiegate, anche quando i cambiamenti conformazionali non influenzano le proprietà catalitiche. Poiché la  $Ca^{2+}$ -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico è un elemento chiave nella regolazione dell'omeostasi del calcio nelle fibre muscolari scheletriche, è plausibile che anche minime alterazioni nel ripiegamento possano essere riconosciute dal sistema UPS e che l'enzima difettoso possa essere quindi indirizzato verso la degradazione.

Inoltre, la PMT è stata descritta anche nei bovini Romagnola, in questa razza le mutazioni missenso nel gene ATP2A1 portano a sostituzioni

G211V o G286V nella proteina SERCA1, in cui si nota un basso livello di espressione della proteina SERCA1 nelle membrane del reticolo sarcoplasmatico. Come per i bovini di razza Chianina, anche per i bovini di razza Romagnola è stato utilizzato un modello cellulare eterologo trasfettato con i costrutti che trasportano le mutazioni G211V e G286V.

Le mutazioni G211V/G286V trovate nella Romagnola presumibilmente originano in una proteina SERCA1 difettosa nel ripiegamento che viene riconosciuta e indirizzata alla degradazione dall'UPS, pur essendo ancora cataliticamente funzionale. La struttura tridimensionale della proteina suggerisce che la sostituzione di un residuo di glicina con una catena laterale voluminosa possa destabilizzare la struttura proteica.

La pseudomiopia bovina potrebbe rappresentare un modello per studiare la miopia di Brody e per testare potenziali terapie farmacologiche, poichè non esistono modelli murini adeguati. Attualmente non esiste ancora una terapia specifica per la miopia di Brody nell'uomo; infatti, i pazienti affetti vengono trattati con farmaci miorilassanti generici che impediscono il rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico; tuttavia, questa terapia viene sospesa per l'insorgenza di effetti collaterali. Il mantenimento delle caratteristiche funzionali dell'enzima rappresenta il presupposto fondamentale per eventuali terapie farmacologiche innovative basate sul ripristino dei livelli normali di SERCA1.

## BIBLIOGRAFIA

- Akyurek, E. E., et al.(2022). Differential analysis of Gly211Val and Gly286Val mutations affecting Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase (SERCA1) in congenital pseudomyotoniaRomagnola cattle. *International Journal of Molecular science*, 23.
- Bianchini E. et al. Inhibition of Ubiquitin Proteasome System rescues the defective sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA1) protein causing Chianina cattle pseudomyotonia. (2014). *Journal of Biological Chemistry*, (289), 48, 33073–33082.
- Bottinelli, R., and Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibers: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, (73), 195-262.
- Drögemüller, C., et al (2008). Identification of a missensemutation in the bovine ATP2A1 gene in congenitalpseudomyotonia of Chianina cattle: An animalmodel of human Brody disease.
- Molenaar, J. P. et al. (2020). Clinical, morphological and genetic characterization of Brody disease: an international study of 40 patients. *BRAIN, a journal of neurology*, (143), 452-466.
- Sacchetto R. et al. A defective SERCA1 protein is responsible for congenital pseudomyotonia in Chianina cattle. (2009). *The American journal of pathology*, (174), 2.