



## Väitös

### Marcus Ewert Broman

LT, erikoislääkäri  
Skånes Universitetssjukhus, Avdelningen  
för Perioperativ och Intensivvård  
Lund, Ruotsi  
marcus.broman[a]skane.se

# ANESTESIA JA TYYPIN 1 RYANODIINI RESEPTORI

## Genetics of the ryanodine 1 receptor and anaesthesia

Marcus Ewert Broman

Lunds Universitet, Lund, Ruotsi 6.5.2011

Vastaväittäjä professori Barbara Brandom, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA

Esitarkastajat:

professori Ulf Kristoffersson, Kliininen genetiikka, Lund

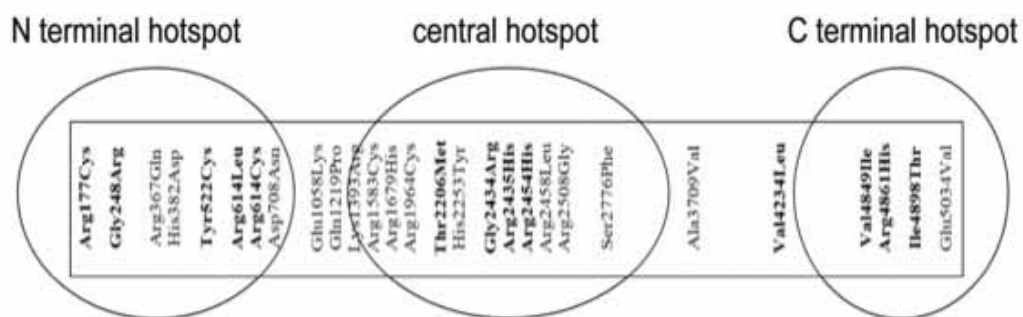
dosentti Peter Bentzer, Perioperatiivinen ja Tehohoito, Lund

dosentti Ali Reeza Moslemi, molekulaaribiologia, Göteborg

► Maligni hypertermia (MH) on erittäin harvinainen farmakogeenittinen syndrooma, jossa potilas reagoi halogenoituihin anestesiasuihin ja/tai sukkinylikoliiniin mm. lämmönnousulla, hyperkapialla ja metabolisella asidoosilla. Hoitamattomana MH johtaa kuolemaan. MH liittyy kromosomi 19:n ryanodiini 1 -geenin mutaatioihin. Geeni koodaa

tyypin 1 ryanodiinireseptoria (RyR1) poikkijuovaisen lihas-sarkoplasmissessa retikulumissa. Avautuessaan tämä reseptori muuntaa sähköisen hermoimpulssin fyysiseksi lihassupistukseksi. Reseptorin avautuminen johtaa kalsiumionien virtaukseen sarkoplasmissesta retikulumista solun sisään. Supistuksen päätyttyä kalsiumionit pumpataan toisten

ionipumppujen (mm. SERCA) avulla takaisin sarkoplasmiseen retikulumiin, johon kalsiumionit varastoituvat. Anestesia-ainemolekyylit toimii mutatoituneen RyR1:n agonistina ja aiheuttaa reseptorin avautumisen, josta seuraa lihas-sarkoplasmissen kontraktiosysteemin aktivoituminen. Reaktiosta tulee räjähtävä, koska suuri määrä kalsiumioneja virtaa



Kaavakuva kromosomissa 19 sijaitsevasta ryanodiini 1 -geenistä, johon todetut mutaatiot on merkitty. Geenissä on 159000 emäsparia jaettuna 106:een eksoniin; eksoni 1 sijaitsee N-terminaaliossa ja eksoni 106 C-terminaaliossa päädyssä. Geeni koodaa sarkoplasmissessa retikulumissa sijaitsevaa ryanodiini 1 -reseptoria (RyR1), joka koostuu 5038:sta aminohaposta. Reseptori avautuu aktiopotentiaalin vaikutuksesta ja päästää kalsiumioneja soluun. Tämä kalsiumsignaali aktivoi lihas-sarkoplasmissen kontraktiosysteemin. Mutaatio geenissä johtaa muuttuneeseen RyR1 toimintaan.

vapaasti solun sisään. Lepotilassakin mutatoitunut reseptori voi vuotaa kalsiumioneja solun sisään johtaen kohonneeseen kalsiumkonsentraatioon lihassolussa (1,2).

Kliinisesti mutaation kantaja on terve ja tietämätön ominaisuudeltaan. Joskus todetaan epäselviä lieviä lihasoireita kuten lihaskipua, jäykkyyttä ja lihasten nopeaa väsymistä. MH ilmaantuu useimmiten

ilman ennakkoepäilyä rutiininukutuksessa. Reaktio voi nopeasti johtaa hengenvaaraan ja kuolemaan mikäli anestesiaa ei lopeteta (3). Dantroleeni sitoutuu vuotavaan reseptoriin ja sulkee sen. Lihassolujen kalsiumionipitoisuus alenee koska takaisinpumpausmekanismit toimivat. Täten dantroleeni sammuttaa räjähtävän reaktion.

Diagnoosi tehdään yleensä in vitro lihasbiopsiatestillä (IVCT)(4), mutta voidaan tehdä myös toteamalla klassinen mutaatio ryanodiini 1 -geenisä. Ryanodiini 1 -geeni on kuitenkin ihmisen suurimpia geenejä eli sen sekvensointi on teknisesti vaikeaa ja kallista. RyR1:ssä tunnetaan noin 200 aminohappomuunnosta. Useimmat esiintyvät yksittäin ja ne voivat olla vain neutraaleja polymorfismeja (5).

Mutaatioprevalenssi on suurempi isooiduissa populaatioissa kuten Pohjois-Ruotsissa, tietyissä alppi-laaksoissa Sveitsissä, Etelä-Afrikassa sekä Uudessa-Seelannissa. Prevalenssit ovat kuitenkin erittäin matalia ja useimmat anesthesiologit eivät koskaan kohtaa mutaation kantajaa leikkaussalissa. MH, erittäin harvinaisen ”kuumekrappi ja kuolema” -syndrooma, kuvattiinkin ensimmäisen kerran vasta 1960-luvulla.

### Aineisto, menetelmät ja tulokset

Väitöskirjassani olen halunnut 1. tutkia miten geneettinen tausta voi vuorovaikuttaa anestesian kanssa 2. määrittää tieteellisesti malignin hypertermian 3. yksinkertaistaa näytteiden logistiikkaa niin että potilaat antavat verinäytteen omassa terveyskeskuksessaan 4. kehittää geneettisiä ja solubiologisia menetelmiä, jotka soveltuvat erittäin ison ja kompleksin ryanodiini 1 -geenin sekä tämän kohdeproteiinin RyR1:n analysoimiseen.

**Osatyö I.** Ryanodiini 1 -geenin keskimäinen osa (eksonit 17, 39, 40, 45 ja 46) sekvensoitiin 27

pohjoismaiselta indeksipotilaalta, joilla oli ollut hengenvaarallinen MH ja jotka olivat voimakkaasti positiivisia IVCT-testissä. Viidesosalla tutkituista indeksipotilaista todettiin klassinen mutaatio. Vastaavassa geeniosassa löytyy mutaatio keskieurooppalaisessa väestössä noin puolelta samassa potilasryhmässä. Pilottityön johtopäätös on, että tunnettuja mutaatioita esiintyy pohjoismaisessa väestössä.

**Osatyö II.** Ryanodiini 1 -geeni kokonaisuudessaan (eksonit 1–106) sekvensoitiin 15 pohjoismaiselta MH-potilaalta. Potilaat antoivat verinäytteet omassa terveyskeskuksissaan PAXgene-koeputkiin, joissa hauras RNA fraktio stabiloituu. Putket lähetettiin laboratorioomme Saksaan, jossa ryanodiini 1 mRNA -fraktio eristettiin, ja siitä syntetisoitiin ryanodiini 1 cDNA. Tämä DNA, joka edustaa ryanodiini 1 -geeniä pelkistetystä muodosta ilman introneja, sekvensoitiin. Tällä menetelmällä erittäin suurikokoinen ryanodiini 1 -geeni voitiin sekvensoida perifeerisestä verinäytteestä. Tulosten mukaan puolet indeksihenkilöistä oli mutaation kantajia. Todetuista mutaatioista viisi oli aiemmin raportoimattomia, uusia kandidaattimutaatioita.

**Osatyö III.** Tässä osatyössä kandidaattimutaatiot osatyöstä II (p.Glu1058Lys, p.Arg1679His, p.His382Asn, p.Lys1393Arg, p.Arg2508Gly) tutkittiin solutasolla. Aiemmin on osoitettu B-lymfosyyttien ekspressoivan RyR1:a, vaikka reseptorin tarkka tehtävä lymfosyyteissä on epäselvä (6). Luultavasti reseptori osallistuu solun vasta-ainetuotantoon. Potilaat antoivat verinäytteet omassa terveyskeskuksissaan. Näytteistä viljeltiin B-lymfosyyttiklooneja, jotka infektoitiin Epstein Barr -viruksella. Näin kloonit saatiin rajattomasti säilyviksi. Tämän jälkeen kalsiumionipitoisuus lepotilassa mitattiin

## Väitöskirja ja osatyöt

Broman, Marcus Ewert. *Anaesthesia and Genetics of the Ryanodine 1 Receptor*. Lunds universitet 2011. ISBN: 978-91-86671-86-0.

- I Broman M, Islander G, Müller CR, Ranklev-Twetman E. *Malignant hyperthermia and central core disease causative mutations in Swedish patients*. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007; 51: 50-3.
- II Broman M, Gehrig A, Islander G, Bodelsson M, Ranklev-Twetman E, Ruffert H, Müller CR. *Mutation screening of the RYR1-cDNA from peripheral B-lymphocytes in 15 Swedish malignant hyperthermia index cases*. *Br J Anaesth* 2009; 102: 642-9.
- III Vukcevic M, Broman M, Islander G, Bodelsson M, Ranklev-Twetman E, Müller CR, Treves S. *Functional properties of RYR1 mutations identified in Swedish patients with malignant hyperthermia and central core disease*. *Anesth Analg* 2010; 111: 185-90.
- IV Broman M, Heinecke K, Islander G, Schuster F, Glahn K, Bodelsson M, Treves S, Müller C. *Screening of the ryanodine 1 gene for malignant hyperthermia causative mutations by high resolution melt curve analysis*. *Anesth Analg* 2011; 113: 1120-8.

## Osatöihin liittyvät pääkirjoitukset

- Osatyö III. Parness J, Hogan KJ. *Out of a cell into this darkened space*. *Anesth Analg* 2010; 111: 13-6.
- Osatyö IV. Rosenberg H. *Mining for mutations in malignant hyperthermia*. *Anesth Analg* 2011; 113: 975-6.

kandidaattimutaatiota kantavien B-lymfosyyttien klooneista. Näissä lymfosyyteissä intrasellulaarinen kalsiumionipitoisuus oli merkittävästi korkeampi kuin normaaleissa B-lymfosyyteissä. Tämän jälkeen verrattiin RyR1 -agonististimulaation vaikutusta kalsiumionipitoisuuden nousuun mutaation kantajan soluissa verrattuna normaaleihin soluihin. Kalsiumionipitoisuuden nousu oli merkittävästi voimakkaampi mutaation kantajan soluissa.

Julkaisussa on selvitetty tarkasti myös potilaitten kliiniset MH-reaktiot. Esimerkkinä mainittakoon mutaation p.Glu1058Lys kantaja. Hän oli terve nainen, jolla oli epäselvää lihas-ten väsymistä. Potilas tuli raskaaksi ja raskaus purettiin hätäsektiolla. Propofoli-sukkinyyliikoliini-induktion jälkeen potilas sai voimakkaan mas- seterspasmin. Intubaatio kuitenkin onnistui ja anestesiaa jatkettiin isofluraanilla. Syntynyt poikalapsi oli terve, mutta äidin lämpö nousi 40 °C:een, hän oli takykardinen ad 140 /min ja hiilidioksidi nousi 12 kPa:iin. Potilaalle kehittyi molempiin yläraa- joihin lihasaitiopainesyndrooma. Kahden päivän tehohoidon jälkeen hänet ekstuboitiin. Hän toipui, mutta toiseen yläraajaan jäi invalidisoiva lihasheikkous.

**Osatyö IV.** Koska osatyössä II laboratoriomenetelmä on tekni- sesti vaikea ja sisältää instabiilin RNA:n käsittelyä, käytettiin tässä osatyössä High Resolution Melting (HRM) DNA Sequencing tekniikkaa 20 MH potilaalla. HRM-tekniikka perustuu stabiiliin genomiseen DNA:han. Fluoresoiva aine liitetään kaksoiskierteiseen DNA:han. PCR:n avulla syntetoidaan PCR-tuotteita, jotka vastaavat ryanodiini 1 -geenin eksoneja. Nämä lämmitetään kontrol- loidusti, mikä johtaa kaksoiskiirteen avautumiseen ja fluoresoivan aineen vapautumiseen. Jos eksonissa on mutaatio tai polymorfismi, fluore- senssikäyrä muuttuu. Näin voidaan nopeasti selvittää, onko eksonissa mutaatioepäily. Vain epäilyttävät

eksonit sekvensoidaan (7,8). Aines- tossamme 194 eksonissa 2520:sta oli mutaatioepäily. Sekvensoimalla löysimme 80%:lla potilaista joko klassisen mutaation tai kandidaatti- mutaation. Pystyimme osoittamaan, että HRM-sekvensointitekniikka soveltui hyvin potilasmateriaaliimme ja erittäin suuren ryanodiini 1 -geenin tutkimiseen. Näin saimme työmää- rän pudotettua 20%:iin verrattuna perinteisellä tekniikalla tehtyyn koko ryanodiini 1 -geenin sekvensointiin.

### Johtopäätökset

Tässä väitöstutkimuksessa todettiin yhteensä 28 erillistä mutaatiota. Kuvassa 1 mutaatiot on merkitty ryanodiini 1 -geeniin. Mutaatiot esiintyvät aikaisemmin kuvatuissa N terminaalissa, keskeisessä sekä C-terminaalissa hotspotissa. Kolme- toista mutaatiota (kuvassa lihavoitu) 28:sta oli aikaisemmin tiedossa. Osatyössä III viisi kandidaattimu- taatiota testattiin funktionaalisesti ja osoitettiin mutaatioiden liittyvän B-lymfosyyttien intrasellulaarisen kalsiumtasapainon häiriöön.

Tässä väitöstutkimuksessa osoitettiin, että malignia hyperter- miaa aiheuttavia mutaatioita löytyy pohjoismaisessa väestössä. Nämä mutaatiot voidaan löytää analysoi- malla terveystutkimuksessa annettu tavallinen verinäyte. ■

### Viitteet

1. Hopkins PM. Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis. *Br J Anaesth* 2000; 85: 118-28.
2. Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S, ym. In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. The European Malignant Hyperthermia Group. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 955-66.
3. Larach MG, Localio AR, Allen GC, ym. A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 1994; 80: 771-9.
4. Robinson R, Carpenter D, Shaw MA, ym. Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* 2006; 27: 977-89.

5. Girard T, Cavagna D, Padovan E, ym. B-lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators. *J Biol Chem* 2001; 276: 48077-82.
6. Rossi AE, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 2006; 33: 715-31.
7. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009; 30: 857-9.
8. Grievink H, Stowell KM. Identification of ryanodine 1 single nucleotide polymorphisms by high-resolution melting using the LightCycler 480 System. *Anal Biochem* 2008; 2: 396-404.
9. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 2008; 26: 1135-45.