

Poster P.02.18

STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY (SOCE): ROLE IN SKELETAL MUSCLE FUNCTION AND DISEASE.

Protasi F.^[1], Sorrentino V.^[2]

^[1]Univ. G. d'Annunzio Chieti-Pescara ~ Chieti ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Siena ~ Siena ~ Italy

Background and Rationale. Store operated Ca²⁺ entry (SOCE) is a Ca²⁺ entry mechanism, first described in non-excitable cells, that is triggered by depletion of intracellular Ca²⁺ stores (endoplasmic and sarcoplasmic reticulum, ER and SR) (1, 2). SOCE mediates recover of extracellular Ca²⁺ through STIM1 and Orai1 interaction (3, 4), and is modulated in muscle by Calsequestrin-1 (CASQ1) (5). Mutations in STIM1, Orai1, and CASQ1 have been linked to tubular aggregate myopathy (TAM) (6-8), a myopathy characterized by muscle pain, cramping, weakness, and presence of tubular aggregates (TAs)(9, 10). The mechanisms linking human mutations to SOCE dysfunction, dysregulation of Ca²⁺ homeostasis, and finally to development of TAM are still unknown.

Broad Objective: understand the pathophysiology of TAM, a rare disease linked to mutations in STIM1, Orai1, and CASQ1 (all proteins involved in SOCE).

Specific Aims: 1) investigate the molecular mechanisms that allow dynamic assembly of STIM1 and Orai1 in SOCE-sites; 2) understand how STIM1, Orai1, and CASQ1 accumulation in TAs leads to unbalanced Ca²⁺ homeostasis and muscle weakness/fatigue; 3) study the pathophysiology of TAM in two newly generated knock-in mice carrying human TAM mutations; 4) express CASQ1-mutants linked to TAM in muscle cells and fibers to assess their effect on intracellular Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress.

Research Design and Methods. We will combine a) highly complementary structural, molecular, cellular, and functional experimental approaches used in the laboratories and b) newly generated knock-in mice carrying TAM mutations (Orai1-G98S and CASQ1-D44N) to test the hypothesis that accrual of TAs in diseased muscle: i) is caused by altered Ca²⁺ homeostasis that leads to ER stress and ii) is a primary cause of dysfunction and disease.

Preliminary Results. We have already collected the following sets of data: a) transverse tubule (TT) plasticity drives the assembly of SOCE.sites in muscle during exercise: b) in muscles containing TAs (which stain positive for both STIM1 and Orai1) extracellular Ca²⁺ does not contributes to normal contractility; c) Orai1-G98S human mutation in knock-in mice results in formation of TAs and dysfunctional SOCE; d) mutations in CASQ1 alter Ca²⁺ homeostasis and induce ER stress response.

Anticipated Output. A deeper understanding of the molecular mechanisms that cause dysfunctional interaction between STIM1-Orai1-CASQ1 and formation of TAs could provide the basis for future development of therapeutic interventions targeted to normalize altered Ca²⁺ homeostasis in various human myopathies (including TAM).

Titolo:

Ingresso di Calcio operato dagli stores intracellulari (o SOCE): ruolo nella funzione e nella malattia del muscolo scheletrico.

Store operated Ca²⁺ entry (SOCE) è un meccanismo per l'ingresso del Ca²⁺, descritto per la prima volta in cellule non eccitabili, innescato dall'esaurimento di Ca²⁺ nei depositi intracellulari (Reticolo Endoplasmatico e Sarcoplasmatico). SOCE opera il recupero di Ca²⁺ extracellulare attraverso l'interazione fra STIM1 ed Orai1 (3,4), ed è modulato nel muscolo dalla Calsequestrina-1 (CASQ1). Mutazioni in STIM1, Orai1, e CASQ1 sono state identificate in pazienti affetti da Miopatia degli

Aggregati Tubulari (o TAM), una malattia che causa dolore muscolare, crampi, debolezza e porta in alcune persone a deformità articolari in braccia e gambe. La TAM è caratterizzata dalla presenza di aggregati tubulari (TAs), strutture anomale che rappresentano un raro, ma importante, indicatore di varie miopatie umane. I meccanismi che collegano le mutazioni nei geni sopra menzionati alla disfunzione di SOCE, alla de-regolazione dell'omeostasi del Ca²⁺, ed infine allo sviluppo della TAM sono ancora sconosciuti.

L'incidenza di TAM nella popolazione è ancora sconosciuta e non è ancora disponibile alcuna cura per i pazienti. L'obiettivo principale di questo progetto è aumentare le conoscenze attuali della fisiopatologia della TAM.

Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo ora generato i primi modelli murini al mondo che presentano mutazioni umane in *Orai1-G98S* e in *CASQ1-D44N* legate a TAM. I modelli murini sono essenziali per lo studio delle patologie e per il possibile sviluppo di farmaci.

Abbiamo già collezionato Risultati Preliminari che rendono il topo *Orai1-G98S* un buon modello animale per lo studio della TAM.

Il lavoro proposto in questo progetto ha il potenziale di a) migliorare le nostre conoscenze dei meccanismi che portano mutazioni umane alla formazione dei TAs nel muscolo e b) fornire le basi per il futuro sviluppo di interventi terapeutici.

Questo progetto si adatta alla missione Telethon ONLUS in quanto: i) potrebbe diventare rilevante per la cura di varie malattie di comprovata origine genetica che attualmente non hanno cura; e ii) potrebbe potenzialmente identificare nuovi targets terapeutici per lo sviluppo di strategie finalizzate a migliorare la funzione muscolare, limitare la fatica muscolare, debolezza, e a disfunzione in varie miopatie umane causate dall'alterazione dell'omeostasi del Ca²⁺ (inclusa la TAM).

1. Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 1986; 7(1):1-12.
2. Parekh AB and Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*. 1997; 77(4):901-930.
3. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr. and Meyer T. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺ store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*. 2005; 15(13):1235-1241.
4. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R and Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*. 2006; 312(5777):1220-1223.
5. Shin DW, Pan Z, Kim EK, Lee JM, Bhat MB, Parness J, Kim DH and Ma J. A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2003; 278(5):3286-92.
6. Böhm J, Chevessier F, Koch C, Peche GA, Mora M, Morandi L, Pasanisi B, Moroni I, Tasca G, Fattori F, Ricci E, Pénisson-Besnier I, Nadaj-Pakleza A, Fardeau M, Joshi PR, Deschauer M, Romero NB, Eymard B and Laporte J. Clinical, histological and genetic characterisation of patients with tubular aggregate myopathy caused by mutations in *STIM1*. *J Med Genet*. 2014; 51(12):824-833.
7. Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I and Nishino I. Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(3):637-648.
8. Barone V, Del Re V, Gamberucci A, Polverino V, Galli L, Rossi D, Costanzi E, Toniolo L, Berti G, Malandrini A, Ricci G, Siciliano G, Vattemi G, Tomelleri G, Pierantozzi E, Spinozzi S, Volpi N, Fulceri R, Battistutta R, Reggiani C and Sorrentino V. Identification and characterization of three novel mutations in the *CASQ1* gene in four patients with tubular aggregate myopathy. *Hum Mutat*. 2017; 38(12):1761-1773.
9. Jain D, Sharma MC, Sarkar C, Suri V, Sharma SK, Singh S and Das TK. Tubular aggregate myopathy: a rare form of myopathy. *J Clin Neurosci*. 2008; 15(11):1222-1226.
10. Pierobon-Bormioli S, Armani M, Ringel SP, Angelini C, Vergani L, Betto R and Salviati G. Familial

neuromuscular disease with tubular aggregates. Muscle Nerve. 1985; 8(4):291-298.

Miopatia degli Aggregati Tubulari

Coordinator: Feliciano Protasi

Partner: Vincenzo Sorrentino

Duration (N. Years): 3

Starting date: October 2019

Telethon Project (nr):

GGP19231

Disease Name:

Tubular Aggregate Myopathy

Keywords:

Skeletal Muscle, Tubular Aggregate Myopathy (TAM), Store Operated Calcium Entry (TAM)