

Исследование функциональных проявлений миссенс-мутации Met23Leu в дополнительной субъединице KCNE2 сердечного канала Kv11.1

Научный руководитель – Соколова Ольга Сергеевна

Пивоваров Егор Максимович

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

E-mail: egor.pivovarov.2013@gmail.com

Наследственный синдром удлиненного интервала QT (LQTS) связан с мутациями в генах ионных каналов и регулирующих их белков-модуляторов [6]. KCNE2 участвует в регуляции основных калиевых ионных каналов сердца: в частности, влияет на плотность тока и открытие/закрытие канала Kv11.1 [1], а также на его транспорт к мембране клетки [5]. На данный момент физиологические проявления мутаций белков KCNE практически не описаны [3].

В данной работе мы комплексно охарактеризовали миссенс-мутацию с.67A>T (p.Met23Leu) в субъединице KCNE2 канала Kv11.1, выявленную у пациента с LQTS. Мы ввели замену в плазмиду с геном *KCNE2* с помощью ПЦР-мутагенеза и экспрессировали мутантный ген в клетках линии CHO вместе с геном канала Kv11.1 дикого типа для оценки влияния мутации на параметры тока I_{K1} . С помощью метода локальной фиксации потенциала в режиме whole-cell обнаружено почти двухкратное снижение плотности тока (рис. 1А), однако изменения на графике проводимости (рис. 1Г) наравне со снижением времени полуактивации (рис. 1Б) позволяют рассматривать данную мутацию по типу «gain-of-function». Мы не обнаружили выраженного изменения в экспрессии канала при оценке с помощью иммуноблоттинга (рис. 2), однако данные флуоресцентной микроскопии позволяют заключить, что мутация в субъединице KCNE2 приводит к нарушению трафика канала Kv11.1 к плазматической мембране (рис. 3). Наконец, проведенное молекулярное моделирование нативной и мутантной форм KCNE2 на поверхности липидного бислоя сложного состава показало заметные изменения положения внеклеточного N-концевого сегмента относительно бислоя (рис. 4), что предположительно может отражаться на возможности гликозилирования прилежащих остатков [5], приводя тем самым к снижению экспрессии KCNE2 [4] и последующему нарушению трафика Kv11.1.

Подобный комплексный подход в будущем поможет оптимизировать пути лечения аритмий.

Работа поддержана грантом РНФ 22-14-00088

Источники и литература

- 1) Anantharam, A. and Abbott, G. W. In The hERG Cardiac Potassium Channel: Structure, Function and Long QT Syndrome. Novartis Foundation Symposium 266. Ed. by D. J. Chadwick and J. Goode (Novartis Foundation, 2005) pp. 100-12; discussion 112-7, 155-8.
- 2) Bohnen, M. S., Peng, G., Robey, S. H., Terrenoire, C., Iyer, V., Sampson, K. J., and Kass, R. S. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol. Rev.*, 2017, 97, 89-134.
- 3) Eldstrom, J., and Fedida, D. The voltage-gated channel accessory protein KCNE2: multiple ion channel partners, multiple ways to long QT syndrome. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2011, 13, e38.

- 4) Liu, L., Tian, J., Lu, C., Chen, X., Fu, Y., Xu, B., Zhu, C., Sun, Y., Zhang, Y., Zhao, Y., and Li, Y. Electrophysiological Characteristics of the LQT2 Syndrome Mutation KCNH2-G572S and Regulation by Accessory Protein KCNE2. *Front. Physiol.*, 2016. 7, 650.
- 5) Malaby, H. L. H., and Kobertz, W. R. The Middle X Residue Influences Cotranslational N-Glycosylation Consensus Site Skipping. *Biochemistry*, 2014, 53, 4884-4893.
- 6) База данных GnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org/>

Иллюстрации

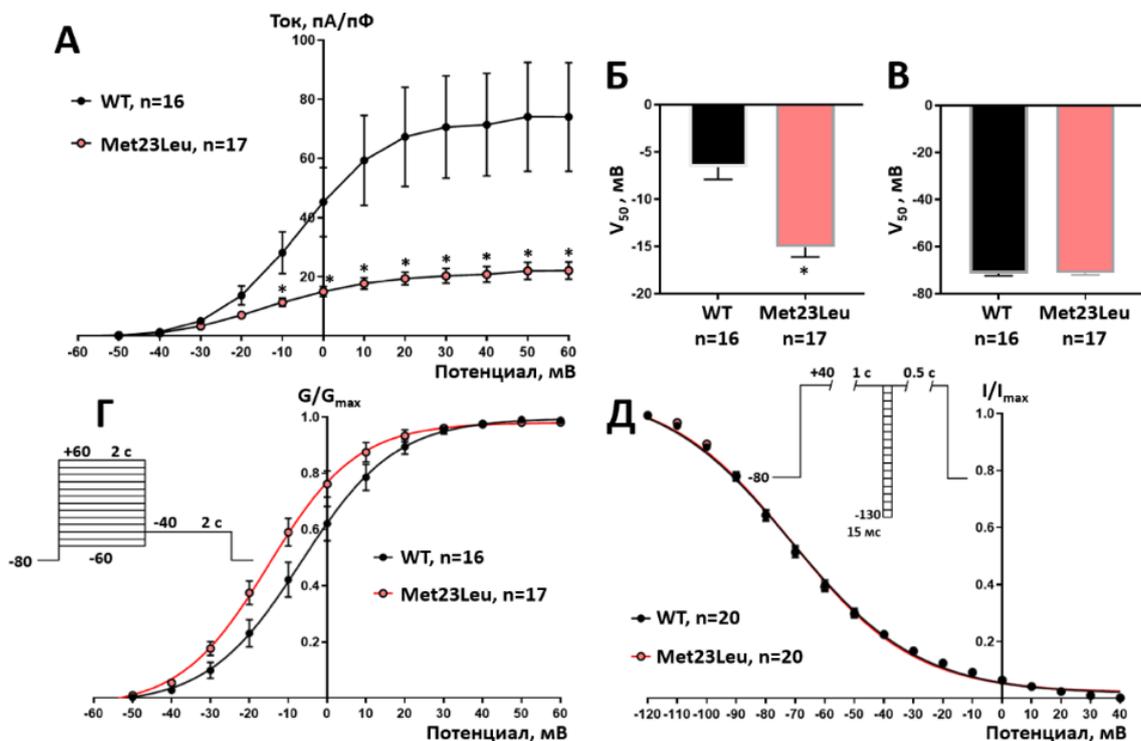


Рис. : 1. Влияние замены Met23Leu в структуре аксессуарной субъединицы KCNE2 каналы KV11.1 на параметры тока, переносимого этими каналами в гетерологической экспрессионной системе – трансфицированных клетках CHO-K1. А – сравнение вольт-амперных кривых хвостового тока в клетках, котрансфицированных плазмидой с геном KCNE2 дикого типа (WT), и в клетках, котрансфицированных плазмидой, содержащей мутантный ген KCNE2 (Met23Leu). Ток зарегистрирован по протоколу, представленному в пункте Г. * - достоверность различия в плотности тока между 2 группами клеток, $p < 0,05$, множественный t-тест. Б, В – сравнение потенциала полуактивации (Б) и потенциала полуинактивации (В) в двух группах клеток. * - $p < 0,05$, t-тест. Г – кривые стационарной активации для 2 групп клеток. Значения G/G_{max} получены из величин хвостового тока, зарегистрированного по представленному протоколу. Д – кривые стационарной инактивации для 2 групп клеток. Кривые построены по относительной величине пикового тока, регистрируемого сразу после гиперполяризующей ступеньки в представленном протоколе.

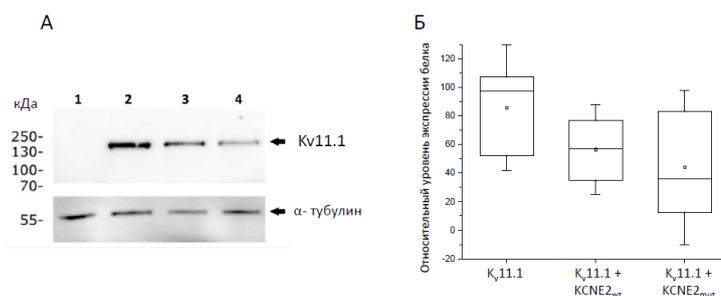


Рис. : 2. Экспрессия белка Kv11.1 в клетках линии НЕК293, (А) иммуноблот. 1 - лизат контрольных клеток, 2 - трансфекция клеток плазмидой, кодирующей только альфа субъединицу Kv11.1, 3 - трансфекция двумя плазмидами - кодирующими Kv11.1 и KCNE2wt, 4 - трансфекция двумя плазмидами - кодирующими Kv11.1 и KCNE2mut, несущей замену с.67А>Т (р.Met23Leu). (Б) Статистический анализ экспрессии белка Kv11.1 (N = 3 блота для трех независимых трансфекций).

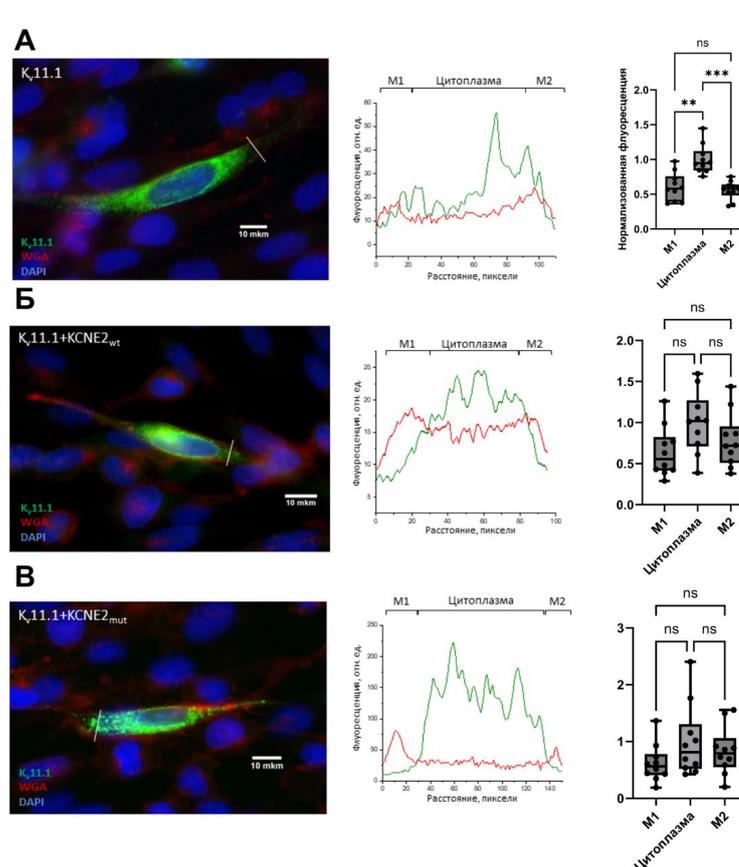


Рис. : 3. Влияние субъединицы KCNE2 на экспрессию белка канала Kv11.1. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток CHO-K1, трансфицированных плазмидами, кодирующими канал Kv11.1 (А) и дополнительную субъединицу KCNE2 в двух вариантах (Б и В для дикого и мутантного типа соответственно). Слева – флуоресцентное изображение клеток, синий – DAPI, красный – окрашивание мембраны, зелёный – канал Kv11.1. Центр – соответствующий профиль интенсивности зеленого и красного сигналов вдоль белых линий на изображении слева. M1 и M2 – области, соответствующие плазматической мембране клеток. Справа – результаты one-way ANOVA с поправкой Уэлча для неравенства дисперсий и Тьюки для попарных сравнений для профилей распределения флуоресцентного сигнала (объём выборки в каждом случае – 10 клеток)

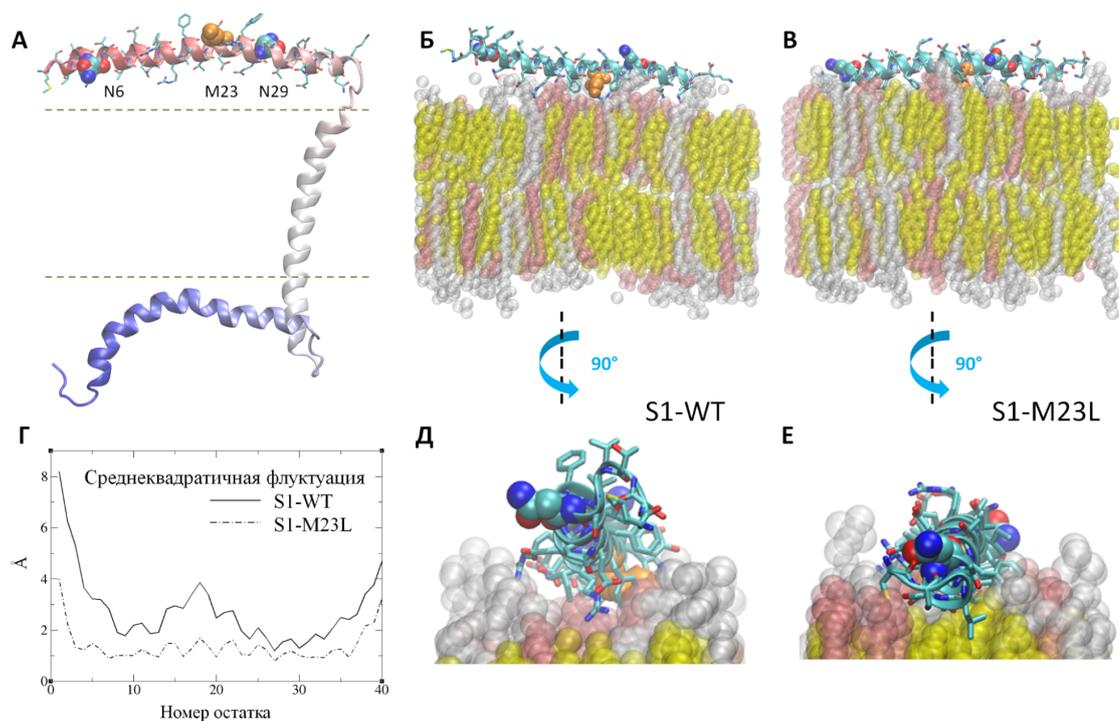


Рис. : 4. (А) Гипотетическое расположение одного из вариантов экспериментальной структуры белка KCNE2 человека (pdb id 2moq, модель 7) относительно мембраны. N-конец показан красным, С-конец синим. Остатки сегмента S1 (N6, M23, N29) показаны в стержневом и объемном представлении. Границы гидрофобного слоя показаны пунктиром. (Б, В, Г, Д, Е) Сопоставление репрезентативных конформаций S1-WT и S1-M23L, их положения относительно липидного бислоя и подвижности. Атомы липидов показаны желтым (холестерин), розовым (CER160) и белым (ПОФХ). Остатки N6, M(L)23 и N29 объемном представлении, остальные остатки сегмента показаны в стержневом представлении. Остаток M(L)23 показан оранжевым, остальные остатки окрашены согласно типу атомов. (Б, В) Вид сбоку. (Д, Е). Вид с торца спирали. (Г) Среднеквадратичная флуктуация α -атомов сегмента в процессе МД.