

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ МИССЕНС-МУТАЦИИ Met23Leu В ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ СУБЪЕДИНИЦЕ KCNE2 (Mirp1) СЕРДЕЧНОГО КАНАЛА Kv11.1

© 2025 г. Е.М. Пивоваров*, Б. Ли*, **, А.О. Селин*, Г.Р. Митров*, Г.С. Глухов*, **,
Д.В. Абрамочкин*, М.Г. Карлова*, А.Г. Шестак***, В.Н. Новоселецкий**,
Е.В. Заклязьминская***, К.В. Шайтан*, О.С. Соколова*, **, #

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/73, Москва, 119234, Россия

**Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэнъчжэне,
Гоцидасюэюань, 1, Даюньсиньчэн, район Лунган, Шэнъчжэнь, 518172, Китайская Народная Республика

***Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского,
Абрикосовский пер., 2, Москва, 119991, Россия

#E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 23.11.2024 г.

После доработки 23.11.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Проведен функциональный анализ миссенс-мутации с.67A>T (р.Met23Leu) в гене *KCNE2*, кодирующем дополнительную субъединицу калиевого канала Kv11.1. Вариант был выявлен у пациента с асимптомным удлинением интервала QT на электрокардиограмме. Мы искусственно ввели эту замену в плазмиду, содержащую кодирующую последовательность гена *KCNE2*, и экспрессировали мутантный ген в клетках яичника китайского хомячка вместе с геном канала Kv11.1 дикого типа, чтобы оценить влияние мутации на параметры тока I_{K1} . Мы использовали комплексный подход, включающий изучение интегрального тока I_{Kr} с помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell в режиме фиксации потенциала. В результате исследования было показано, что мутация с.67A>T (р.Met23Leu) реализуется по типу “gain of function”, однако плотность тока, переносимого каналами Kv11.1, достоверно снижается. Флуоресцентная микроскопия показала нарушение трафика канала, коэкспрессированного с мутантной субъединицей к поверхности клетки. Для изучения расположения мутантной субъединицы относительно мембранны применено молекулярное моделирование.

Ключевые слова: потенциал-зависимые калиевые ионные каналы, Kv11.1, KCNE2, синдром удлиненного интервала QT, первичные каналопатии, взаимодействие с мембраной.

DOI: 10.31857/S0006302925010113, **EDN:** LWEMMY

Ионные каналы – это порообразующие белки, которые помогают устанавливать и контролировать градиент потенциала через плазматическую мембрану клеток, обеспечивая поток ионов по электрохимическому градиенту. Их можно классифицировать по характеру, видам ионов, проходящих через эти ворота, и по количеству ворот (пор) [1]. Постоянно обновляется список генетических вариантов, которые нарушают нормальное функционирование ионных каналов и имеют значимые последствия для организма [2].

Наследственный синдром удлиненного интервала QT (LQTS – Long QT syndrome) чаще всего бывает вызван мутациями в генах, кодирующих

ионные каналы или белки, обеспечивающие сопряжение возбуждения – сокращения [3, 4], имеет частоту встречаемости 1 : 2 000 [5], ассоциирован с тяжелыми формами аритмий [6], демонстрирует хорошую корреляцию генотипа и фенотипа [7] и считается основной причиной внезапной сердечной смерти [8].

Около 30% пациентов, страдающих синдромом удлиненного интервала QT, при генетическом скрининге не имеют патологических мутаций в генах основных субъединиц ионных каналов. Кроме того, описано достаточно большое количество случаев, когда члены одной семьи, носители одинаковых патогенных вариантов в генах ионных каналов, имеют различные клинические проявления – от мягких до крайне

Сокращение: WT – дикий тип (wild type).

злокачественных. Наиболее распространенным объяснением на данный момент является представление о наличии «генов-модификаторов» [9]. Один из подходов по поиску генов-модификаторов базируется на анализе известных мишней и путей регуляции функции ионных каналов.

Модуляция свойств мембранных ионных каналов имеет фундаментальное значение для регуляции электрической активности сердца [10]. Мутации в белках-модуляторах могут изменять их взаимодействие с ионными каналами [11, 12]. В базе данных GnomAD [2] имеются данные о некоторых мутациях в белках-модуляторах Yotiao и KCNE (Mirp), однако физиологические проявления этих мутаций практически не описаны.

Белок-модулятор KCNE2 (Mirp1), кодируемый геном *KCNE2*, является вспомогательным белком, который взаимодействует с основными ионными каналами, такими как hERG (Kv11.1), и играет важную роль в регуляции их функциональной активности. В основном он присутствует в эпикарде сердца и слизистой оболочке желудка, а также в щитовидной железе, островках поджелудочной железы, печени и легких. KCNE2 (Mirp1) в сердце изменяет плотность тока Kv11.1 и стробирование [13].

Топологически белок KCNE2 состоит из трех преимущественно α -спиральных сегментов (S1–S3), из которых N-концевой S1 является внеклеточным и содержит два предсказанных сайта N-гликозилирования (по остаткам N6 и N29) [14], S2 является трансмембранным, а C-концевой S3 является внутриклеточным. Известно, что удаление участков гликозилирования делает невозможной экспрессию мутантного белка на поверхности клетки [15, 16]. Изучение молекулярной структуры белка KCNE2 человека методом ЯМР-спектроскопии показало наличие трех стабильных α -спиралей (PDB ID: 2m0q), однако использование глобулярных мицелл привело к высокой конформационной подвижности белка и большому числу вариантов взаимного расположения спиралей [17], а детальная информация о расположении белка KCNE2 в липидной мембране по-прежнему остается неизвестной.

Внеклеточный сегмент KCNE2 содержит множество сайтов фосфорилирования [18], что возможно способствует регуляции активности канала Kv11.1 [19]. Также было показано, что коэкспрессия канала с KCNE2 может нормализовать трафик мутантных каналов Kv11.1 к мембране клетки [20]. Таким образом, вопрос о влиянии мутаций в субъединице KCNE2 на I_K -токи в сердце является актуальным.

В данной работе с помощью комплексного подхода мы охарактеризовали миссенс-мутацию c.67A>T (p.Met23Leu) в дополнительной субъединице KCNE2 канала Kv11.1, которая была выявле-

на у пациента с удлинением интервала QT на электрокардиограмме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое и генетическое обследование. Обследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинской декларации и с письменного информированного согласия родителей probanda. Клиническое обследование probanda включало общий осмотр, сбор персонального и семейного анамнеза, общий и биохимический анализ крови, электрокардиограммы в покое, лежа, стоя и после физической нагрузки, ультразвуковое исследование сердца.

Генетическое исследование было выполнено на образцах ДНК, выделенной из лейкоцитов венозной крови, согласно стандартному протоколу. Поиск редких генетических вариантов осуществляли методом секвенирования нового поколения белок-кодирующих генов на платформе DNBSEQ-G400 (MGISEQ-2000) (BGI Group, Китай) с набором для обогащения библиотек Sure-Select Human All Exon V7 (Agilent, США). Анализ данных секвенирования проходил с использованием биоинформационического пайплайна на основе индивидуальной комбинации программ общего доступа для дистрибутивов семейства операционных систем Linux. Патогенность вариантов, выявленных в генах сердечных ионных каналов и ассоциированных с ними белков, оценивалась согласно руководствам Российского общества медицинских генетиков (2018) и American College of Medical Genetics and Genomics (2015).

Плазмиды. Плазмида pSI-Kv11.1 была представлена др. G. Loussouarn (L'institut du thorax, Нант, Франция).

Для плазмиды, кодирующей субъединицу KCNE2 использовали последовательность NM_172201.2. Последовательность была синтезирована компанией Sangon bio (Китай) и клонирована в вектор pcDNA3.1a(+) по сайтам рестрикции EcoRI и NotI.

Введение точечной мутации в последовательность субъединицы KCNE2. Для внесения точечной мутации c.67A>T в последовательность субъединицы KCNE2 использовали стандартный протокол с использованием полимеразной цепной реакции и применением высокоточной полимеразы Q5 (Neb, Великобритания). В качестве прямого праймера была использована последовательность ccgaaggatttttattacttatttgacatgg, в качестве обратного праймера – последовательность aagacgtctccagcgt. Состав смеси и процесс клонирования осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя ферментов. Успешность мутагенеза проверяли с использованием секвенирования по Сенгеру («Евроген», Россия).

Эукариотические клетки. Для электрофизиологических измерений клетки СНО-K1 выращивали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глютамина, 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США), в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в воздушной смеси.

Смесь 0.5 мкг плазмид pSI-Kv11.1, pSI-Kv11.1 + + pcDNA3.1a(+)/KCNE2wt или pSI-Kv11.1 + + pcDNA3.1a(+)/KCNE2mut и 0.1 мкг pMAX с кДНК зеленого флуоресцентного белка (GFP – Green fluorescent protein) были совместно трансфицированы в клетки СНО-K1, растущие на круглых стеклах в 35 мм чашках Петри, с помощью Lipofectamine® LTX Plus™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Контрольная группа клеток (WT – wild type, дикий тип) была трансфицирована плазмидами, содержащими кДНК альфа-субъединицы Kv11.1 (pSI-hERG) и дополнительной субъединицы KCNE2 дикого типа (pcDNA3.1a(+)/KCNE2wt), экспериментальная группа была трансфицирована плазмидами, содержащими кДНК альфа-субъединицы Kv11.1 дикого типа и мутантной дополнительной субъединицы KCNE2 (pcDNA3.1a(+)/KCNE2mut). Общее количество ДНК было одинаковым во всех экспериментах. Клетки инкубировали в течение 24 ч, а затем высевали для электрофизиологических экспериментов, которые проводили через 48–54 ч после трансфекции. Через сутки среду заменяли на свежую.

Для флуоресцентной микроскопии и иммуноблота клетки СНО-K1 выращивали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (BioSera, Франция), 2 мМ глютамина, без антибиотиков. Клетки линии HEK 293 выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (BioSera, Франция). Клеточные линии выращивали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в воздушной смеси. Клетки линии СНО-K1 транзиторно трансфицировали плазмидами pSI-Kv11.1, pSI-Kv11.1 + pcDNA3.1a(+)/KCNE2wt или pSI-Kv11.1 + pcDNA3.1a(+)/KCNE2mut, используя Metafectene PRO (Biontex, Германия), в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки высевали на стеклянные покровные стекла в 24-лучиночный планшет за 24 ч до трансфекции по 100000 клеток/лунку. Плазмидную ДНК смешивали с Metafectene PRO (1 : 2), инкубировали смесь 15 мин и вносили в лунки планшета, содержащие клетки. Инкубировали в полной ростовой среде без антибиотиков в течение 48 ч, а затем фиксировали для иммуноокрашивания. Клетки линии HEK 293 трансфицировали кальций-fosфатным методом по протоколу Джордана с соавторами [21] в модификации Сэмбурука и Рассела [22].

Флуоресцентная микроскопия. Через 48 ч после трансфекции клетки фиксировали 2% параформальдегидом и инкубировали 30 мин в растворе агглютинина зародышей пшеницы, коньюгированном с меткой CF594 (WGA CF594, Biotium, США), 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. Затем клетки пермеабилизовали 0.1% тритоном X-100 в фосфатно-солевом буфере, блокировали 1%-м бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере с Tween®20 и окрашивали первичными антителами против Kv11.1 (Anti-H-ERG, ab196301, Abcam, США). В качестве вторых антител использовали коньюгированные с Alexa488 антитела осла против кролика (Abcam, США). Ядра окрашивали 4',6-диамино-2-фенилиндолом. Просматривали препараты в флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 (Zeiss, Германия).

Для количественной оценки экспрессии ионных каналов в мемbrane и цитоплазме строили профиль интенсивности по всей ширине клетки. Этот профиль был разделен на 3 участка: примерно по 15% на каждом конце профиля клетки, соответствующие плазматической мемbrane (M1 и M2, как показано на рис. 3), и оставшиеся промежуточные 70%, соответствующие цитоплазматической части. Для каждой из этих областей в каждой клетке значения интенсивности флуоресценции Kv11.1 были усреднены и нормированы на средний сигнал интенсивности флуоресценции клетки ($p < 0.05$ для мембранны по сравнению с цитозолем, парный *t*-тест Стьюдента).

Иммуноблотинг. Уровень экспрессии канала Kv11.1 в эукариотических клетках анализировали с помощью полиакриламидного геля и иммуноблотинга с антителами кролика против Kv11.1 (Abcam, США). В качестве вторичных антител использовали антитела козы против тяжелых и легких цепей IgG кролика, коньюгированные с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). Сигнал проявляли с помощью набора Clarity Max Western ECL (Bio-Rad, США), регистрировали системой гель-документирования ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии оценивали с помощью программы ImageLab (Bio-Rad, США).

Электрофизиология. Клетки СНО-K1 на маленьком покровном стекле помещали в экспериментальную камеру с постоянным потоком физиологического раствора следующего состава (ммоль/л): NaCl – 150, KCl – 5.4, CaCl₂ – 1.8, MgCl₂ – 1.2, глюкоза – 10, HEPES – 10; pH доводили до 7.4 с помощью NaOH. Камера была закреплена на столике инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Токи регистрировали при комнатной температуре ($24 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) с помощью усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, США). Для регистрации отбирали только клетки, излучающие

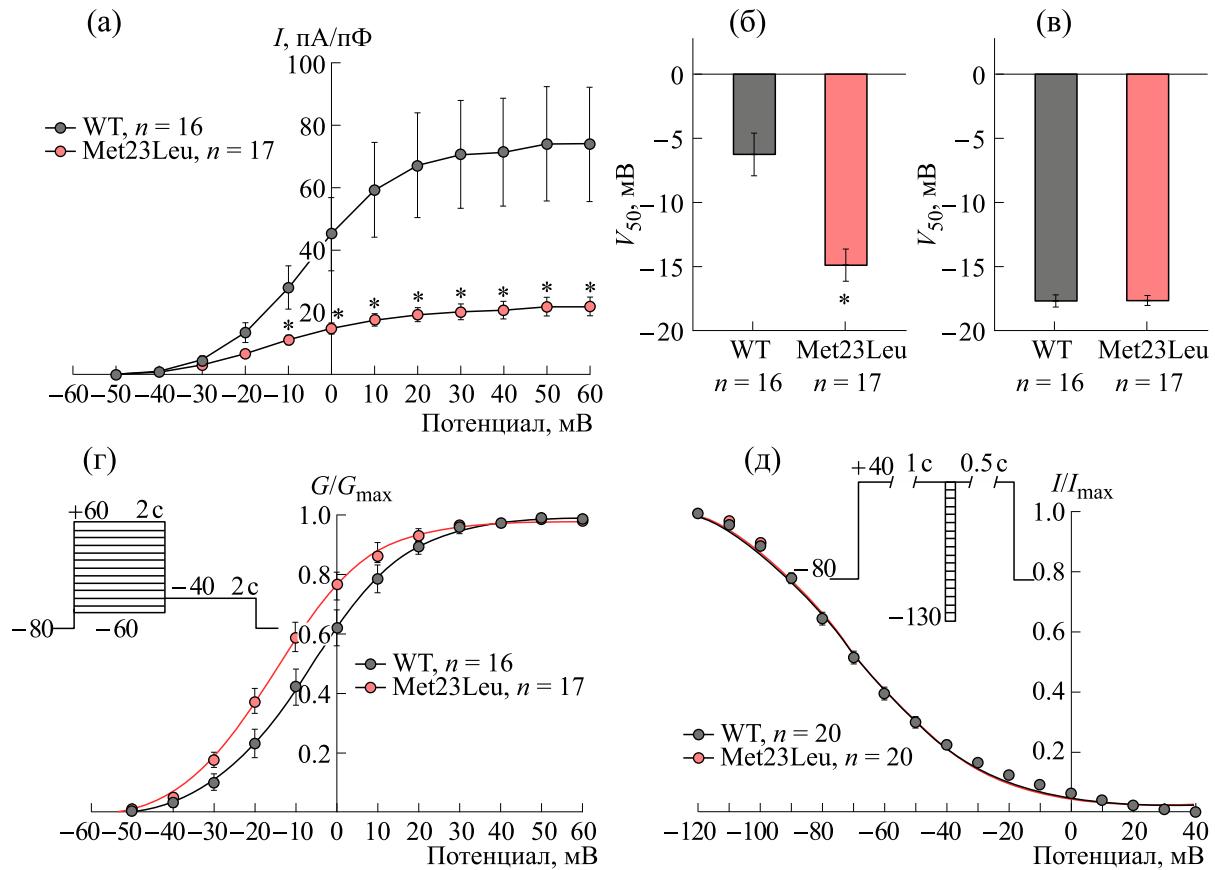


Рис. 1. Влияние замены Met23Leu в последовательности аксессорной субъединицы KCNE2 канала Kv11.1 на параметры тока, переносимого этими каналами в гетерологической экспрессионной системе – трансфицированных клетках CHO-K1. (а) – Сравнение вольт-амперных кривых хвостового тока в клетках, котрансфицированных 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.

зеленую флуоресценцию при облучении возбуждающим светом 480 нм. Пэтч-пипетки с сопротивлением 1.5–2.5 МОм изготавливали из боросиликатного стекла (Sutter Instrument, США) и заполняли следующим раствором (ммоль/л): KCl – 140, MgCl₂ – 1, EGTA – 5, MgATP – 4, Na₂GTP – 0.3, HEPES – 10; pH доводили до 7.2 с помощью KOH. Перед началом регистрации тока компенсировали емкость пипетки, емкость исследуемой клетки и сопротивление доступа. При обработке данных амплитуды токов нормировали на емкость клетки и выражали в пА/пФ.

Для получения вольт-амперной кривой и кривой стационарной активации $I_{K\text{r}}$ индуцировали двухступенчатой деполяризацией (каждые 10 с) от поддерживаемого потенциала –80 мВ. Первая ступень – деполяризация до значений от –60 до

60 мВ с шагом 10 мВ (длительность – 2 с), вторая ступень – реполяризация до –40 мВ (длительность – 2 с) для регистрации хвостового тока (см. рис. 1г, врезка). Для получения кривой стационарной инактивации использовали протокол с деполяризацией (каждые 5 с) до 40 мВ в течение 1 с с последующей кратковременной (15 мс) гиперполяризацией до потенциалов от 30 до –120 мВ с шагом 10 мВ и деполяризацией до 40 мВ в течение 0.5 с для получения пикового тока после индуцированной гиперполяризацией снятия инактивации С-типа (см. врезку на рис. 1г). Кривые активации и инактивации $I_{K\text{r}}$ были получены с использованием уравнения Больцмана.

Статистическую обработку проводили с помощью программы GraphPad Prism 7. Достовер-

ность различий в параметрах между группами клеток при различных значениях мембранныго потенциала определяли с помощью t-теста для каждого из значений потенциала, $p < 0.05$.

Молекулярная динамика. Расчет молекулярной динамики и обработку траекторий выполняли с помощью программного пакета GROMACS 2023.4. Ячейка моделирования состояла из одного спирального сегмента S1 (остатки 1–40) белка KCNE2 человека с нативной последовательностью или заменой Met23Leu, липидного бислоя симметричного состава из нескольких сотен молекул холестерина, пальмитоилолеилфосфатидилхолина и церамида C16 (d18:1/16:0) (N-пальмитоил-D-эритросфингозина, CER160) в соотношении 25 : 10 : 8, а также молекул воды и ионов (0.15 М KCl). Соотношение липидов было выбрано по литературным данным [23–25]. В качестве начальной модели сегмента S1 был выбран один из вариантов экспериментальной структуры канала (PDB ID: 2m0q, модель 6) [17], в котором этот сегмент имеет наиболее вытянутую конформацию. Сборку ячейки выполняли с помощью веб-сервиса CHARMM-GUI [26], причем для ускорения последующей релаксации модель заранее была обращена своими неполярными остатками в сторону бислоя. Длительность молекулярной динамики составила 100 нс в обоих случаях. Визуализацию молекул выполняли с помощью программы VMD [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническое и генетическое обследование. Пробанд, 11 лет, результативная гимнастка, теряла сознание по утрам в возрасте 2.5 и 6 лет. В семейном анамнезе указания на наличие наследственных заболеваний сердца, случаев внезапной смерти, а также перенесенных кардиохирургических вмешательств не выявлены, за исключением того, что у матери были потери сознания в возрасте до 17 лет.

Родители обратились за консультацией в Российской научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского. У probanda было выявлено транзиторное мягкое удлинение интервала QT, 427–488 мс (в среднем 455 мс). В результате ДНК-диагностики была выявлена в гетерозиготном состоянии редкая замена NM_172201.2(KCNE2):c.67A>T (p.Met23Leu) в гене KCNE2 дополнительной субъединицы калиевого канала Kv11.1. Мать также была носителем этого варианта. Популяционная частота встречаемости варианта по данным GnomAD v.4.1.0 [2] составляет 0.0000109 аллелей, что не превышает порог минимальной частоты для клинически значимых аллелей (MAF < 0.000011) для LQTS.

Электрофизиологические характеристики комплекса hERG/KCNE2. Для изучения влияния мутантной субъединицы KCNE2 на активность канала Kv11.1 мы использовали метод whole-cell patch clamp. Для этого мы котрансфицировали клетки CHO-K1 плазмидами, кодирующими ДНК ионного канала Kv11.1 и субъединицу KCNE2 дикого типа, либо мутантную субъединицу KCNE2.

Амплитуда тока, переносимого каналами Kv11.1, коэкспрессированными с мутантной субъединицей KCNE2, оказалась приблизительно в 2 раза меньше по сравнению с субъединицей дикого типа (рис. 1а). При этом кривая активации тока, переносимого каналами, коэкспрессированными с мутантной добавочной субъединицей, была почти на 8 мВ сдвинута в сторону более негативных потенциалов (рис. 1б,г). Кривые стационарной инактивации не различались у двух групп клеток (рис. 1в,д).

Исследование уровня экспрессии белка и внутриклеточного распределения комплексов Kv11.1 с субъединицей KCNE2. Чтобы проверить, влияет ли точечная мутация в субъединице KCNE2 на экспрессию канала Kv11.1, уровень экспрессии белка анализировали методом иммуноблота. Для этого равное количество клеток (100 000/лунку) подвергали трансфекции, лизировали непосредственно в лунках планшета равными объемами буфера, содержащего додецилсульфат натрия, и наносили на полиакриламидный гель с последующим выявлением количества белка канала иммуноблотингом (рис. 2а). Для нормирования количества образца на дорожку использовали альфа-тубулин. Анализ (рис. 2б) не выявил статистических различий в уровне экспрессии белка Kv11.1 в лизатах клеток HEK 293, коэкспрессирующих канал отдельно (Kv11.1), с субъединицей дикого типа (KCNE2wt) или с введенной мутацией Met23Leu (KCNE2mut).

Для определения влияния мутации Met23Leu в субъединице KCNE2 на мембранный экспрессию канала Kv11.1 проводили флуоресцентную микроскопию клеток (рис. 3). Анализ интенсивности флуоресцентного сигнала в клетках показал наличие мембранный экспрессии как для канала дикого типа без субъединицы, так и с субъединицей дикого типа. Однако при коэкспрессии канала с мутантной субъединицей KCNE2 канал оставался в цитоплазме. Эти данные указывают на то, что мутация в KCNE2 нарушает мембранный трафик при коэкспрессии с Kv11.1.

Моделирование молекулярной динамики сегмента S1 субъединицы Mirp1 (KCNE2) на поверхности липидного бислоя. Моделирование молекулярной динамики нативного сегмента (S1-WT) и сегмента с мутацией Met23Leu (S1-M23L) показало заметное различие в их конформационной

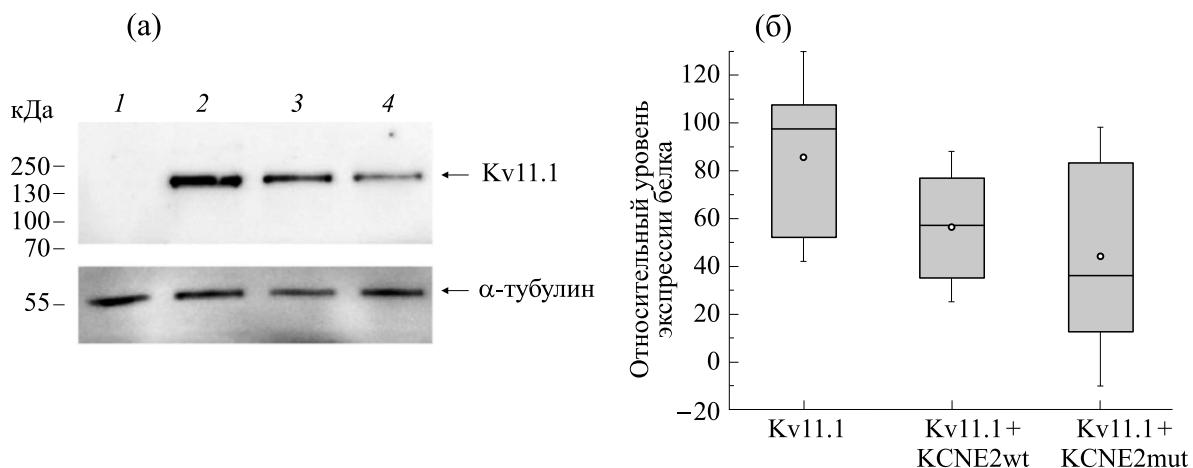


Рис. 2. Экспрессия белка Kv11.1 в клетках линии HEK 293, (а) – Иммуноблотинг: 1 – лизат контрольных клеток, 2 – трансфекция клеток плазмидой, кодирующей только альфа-субъединицу Kv11.1, 3 – трансфекция двумя плазмидами – кодирующими Kv11.1 и KCNE2wt, 4 – трансфекция двумя плазмидами – кодирующими Kv11.1 и KCNE2mut, несущей замену с.67A>T (p.Met23Leu). (б) – Статистический анализ экспрессии белка Kv11.1 ($N = 3$ – блота для трех независимых трансфекций).

подвижности несмотря на идентичную стартовую конформацию (рис. 4а,г). В частности, заметную часть времени S1–WT был разделен на две спирали (остатки 5–17 и 19–38), причем N-концевая спираль слабо взаимодействовала с мембраной, а угол между спиралами доходил до 90° (результаты не приведены). Напротив, S1–M23L стабильно оставался в виде единой спирали и в целом продемонстрировал более тесное взаимодействие с мембраной, что подтверждается и сопоставлением репрезентативных конформаций (рис. 4б,в,д,е) и анализом контактов между сегментами и молекулами липидов (результаты не приведены). Отличия во взаимодействии сегментов с липидным бислоем оказались сопряжены и с различным углом поворота сегментов относительно их продольных осей. А именно, для сегмента S1–WT в сторону гидрофобного слоя («строго вниз») оказались направлены остатки Gln9, Arg16, Arg27, Gln34, в то время как в случае S1–M23L таким образом направлены были остатки Leu4, Phe15, Trp26, Leu37. Это различие сочетается с менее тесным прилеганием S1–WT к липидному бислою и большей экспонированности N-конца в растворитель (рис. 4б,в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мутация Met23Leu в субъединице KCNE2 была впервые опубликована 10 лет назад в работе Центра сердечных аритмий Датского национального исследовательского фонда как вариант с неопределенной значимостью [28]. С тех пор в базе данных GnomAD [2] появился небольшой массив упоминаний этих мутаций, найденных у пациент-

тов с удлинением интервала QT и с фибрилляцией предсердий. Во всех случаях замена была характеризована как вариант с неопределенной значимостью.

Мы определили наличие этого варианта у probanda, спортсменки 11 лет, при проведении ДНК-диагностики в связи с выявленным удлинением интервала QT на электрокардиограмме. Методы полнозомного секвенирования (WES – whole exome sequencing), которые могли бы объяснить удлинение QTc, не выявили других редких генетических вариантов. Для определения физиологических проявлений этой мутации мы ввели соответствующую замену в плазмиду, кодирующую последовательность субъединицы KCNE2 и экспрессировали ее в клетках CHO-K1, котрансфицированных генами KCNH2 и KCNE2 (дикого типа или с мутацией с.67A>T, обуславливающей замену Met23Leu). Результаты электрофизиологического исследования характеристик тока, генерируемого каналами Kv11.1 показали, что плотность тока в клетках совместно трансфицированных геном канала дикого типа и геном мутантной субъединицы существенно ниже (рис. 1а). Важно отметить, что уменьшение плотности тока может быть связано как с дисфункцией канала, так и с уменьшением количества каналов, вынесенных на плазматическую мембрну. Дальнейший анализ свойств каналов Kv11.1, спаренных с нормальными и мутантными субъединицами KCNE2, показал, что замена в дополнительной субъединице не вызывает дисфункции канала. Наоборот, в клетках, совместно трансфицированных кДНК мутантной субъединицы KCNE2 и Kv11.1, наблюдался сдвиг кривой активации тока влево (рис. 1г) со статистически достоверной негативиза-

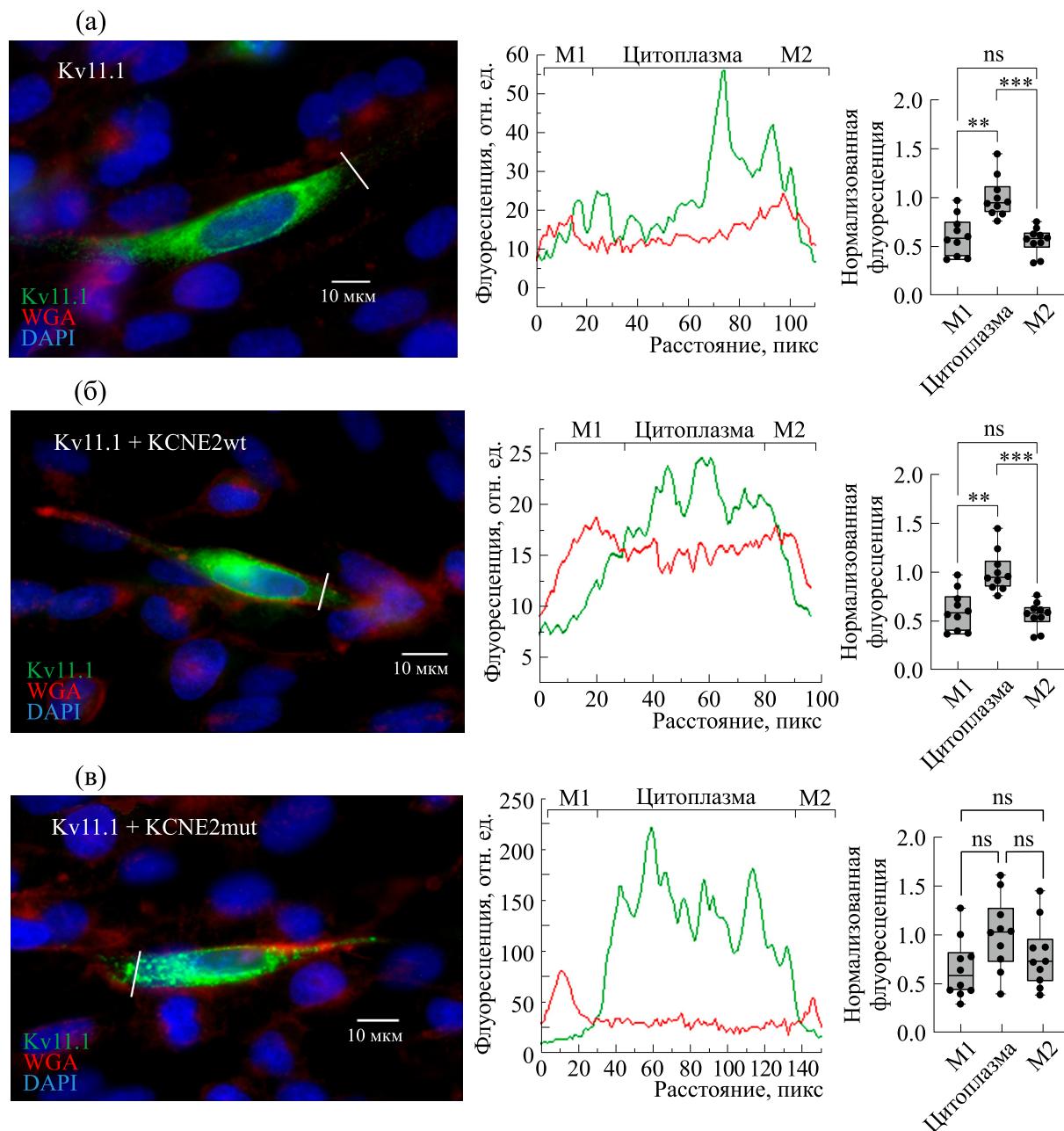


Рис. 3. Влияние субъединицы KCNE2 на экспрессию белка канала Kv11.1. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток CHO-K1, трансфицированных плазмидами, кодирующими канал Kv11.1 (а) и дополнительную субъединицу KCNE2 в двух вариантах (б) и (в) для дикого и мутантного типа соответственно. Слева – флуоресцентное изображение клеток: синий цвет – 4',6-диамино-2-фенилиндол, красный цвет – окрашивание мембранны, зеленый цвет – канал Kv11.1. Масштабный отрезок – 10 мкм. В центре – соответствующий профиль интенсивности зеленого и красного сигналов вдоль белых линий на изображении слева. M1 и M2 – области, соответствующие плазматической мемbrane клеток. Справа – результаты однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA с поправкой Уэлча для неравенства дисперсий и Тьюки для попарных сравнений) профилей распределения флуоресцентного сигнала (объем выборки в каждом случае – 10 клеток).

цией потенциала полуактивации (рис. 1б), что говорит об облегчении активации каналов, спаренных с мутантной KCNE2 по сравнению с каналами с диким типом KCNE2. Ранее авторы работы [29] также

указали, что данная мутация приводит к усилению функции канала Kv11.1.

С помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что коэкспрессия мутантной субъеди-

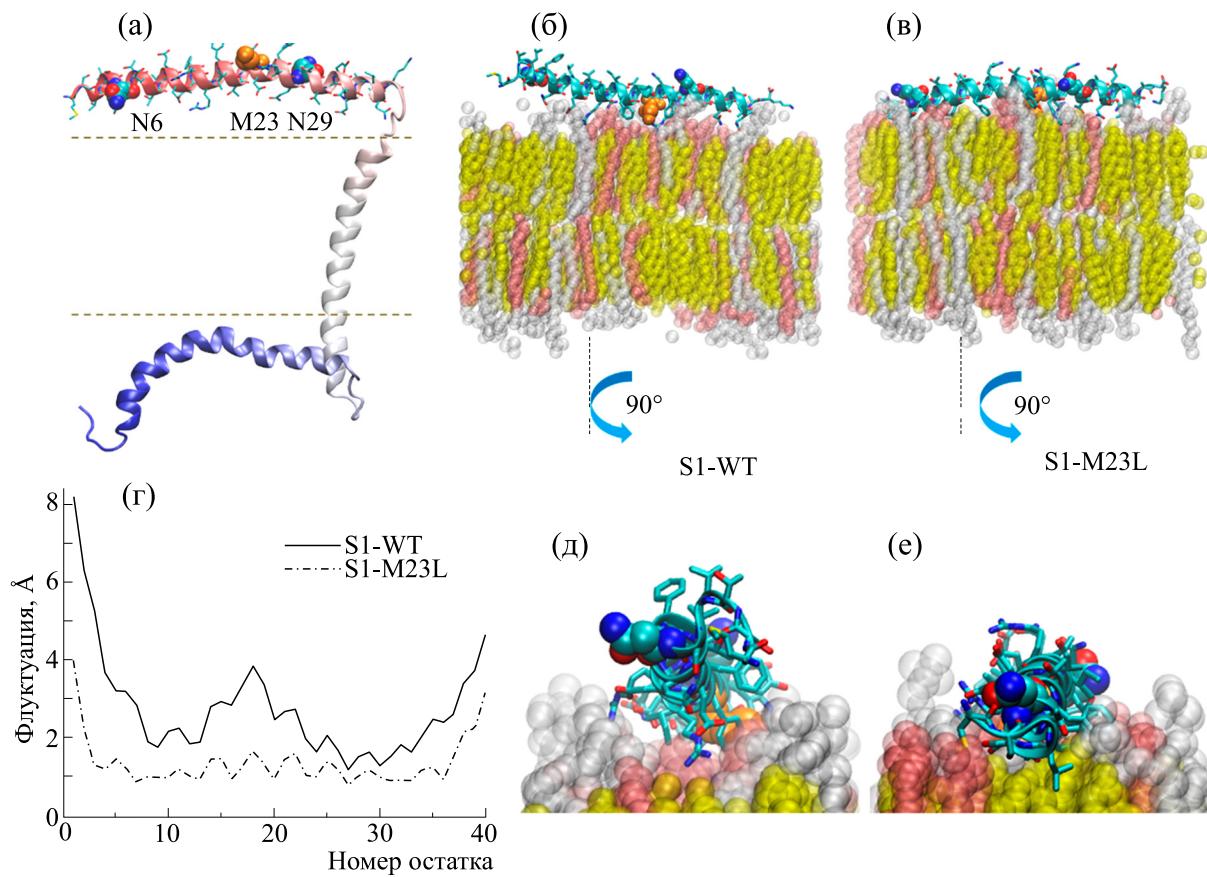


Рис. 4. (а) – Гипотетическое расположение одного из вариантов экспериментальной структуры белка KCNE2 человека (PDB ID: 2moq, модель 7) относительно мембраны. N-конец показан красным, C-конец – синим. Остатки сегмента S1 показаны в стержневом и (N6, M23, N29) объемном представлении. Границы гидрофобного слоя показаны пунктиром. (б)–(е) – Сопоставление репрезентативных конформаций S1-WT и S1-M23L, их положения относительно липидного бислоя и подвижности. Атомы липидов показаны желтым (холестерин), розовым (церамид C16) и белым (пальмитоилолеофосфатидилхолин). Остатки N6, M(L)23 и N29 в 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 Са-атомов сегмента в процессе молекулярной динамики.

ници действительно приводит к нарушению трафика канала Kv11.1 к плазматической мембране (рис. 3), причем выраженные изменения в экспрессии канала в клетках найдены не были (рис. 2).

Вместе с тем представляют интерес молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушения трафика канала. С одной стороны, аминокислоты метионин и лейцин достаточно близки по свойствам, поэтому маловероятно, что замена Met23Leu приводит к заметному изменению структуры сегмента S1 и связанным с этим последствиям. С другой стороны, лейцин является несколько более гидрофобным, чем метионин, поэтому если остаток в позиции 23 участвует в каком-то гипотетическом взаимодействии, то замена Met23Leu могла бы повлиять на его аффинность и, как следствие, на локализацию канала Kv11.1 в целом. Однако анализ публикаций не

позволил нам выявить какого-либо белка-партнера, который мог бы взаимодействовать с сегментом S1 белка KCNE2, что заставило нас более пристально взглянуть на взаимодействие этого сегмента с мембраной. И в самом деле: не может ли замена Met23Leu отразиться на взаимодействии с клеточной мембраной?

Для проверки этой гипотезы мы провели моделирование молекулярной динамики сегмента S1 в нативной и мутантной формах на поверхности липидного бислоя сложного состава (см. раздел «Материалы и методы»). Оказалось, что несмотря на незначительные отличия в свойствах остатков метионина и лейцина, замена Met23Leu приводит к заметному изменению положения сегмента S1 на поверхности липидного бислоя. Между тем доступность остатков N6 и N29 для гликозилирования зависит в том числе и от их положения относительно мембраны. Действительно, рассмотре-

ние мембрано-ассоциированного фермента олигосахарилтрансферазы PglB, который осуществляет гликозилирование остатка N6 [30] и для которого известна пространственная структура (PDB ID: 3RCE) [31], показывает, что сайт гликозилирования должен находиться в непосредственной близости от мембраны, но в водном окружении. Это наблюдается в случае остатка N6 сегмента S1-WT (дикий тип), а в случае сегмента S1-M23L (мутация Met23Leu) остаток N6 окружен полярными головами липидов, что делает его недоступным для взаимодействия с олигосахарилтрансферазой. В свою очередь, снижение вероятности гликозилирования белка KCNE2 приводит к снижению его экспрессии [14]. Предположительно, аналогичный механизм лежит и в основе эффекта мутации T10M [14]: замена полярного остатка на неполярный приводит к более тесному взаимодействию N-конца сегмента S1 с мембраной и снижению доступности остатка N6 для олигосахарилтрансферазы.

Таким образом, примененный комплексный подход, включающий генетический поиск мутаций, электрофизиологию, флуоресцентную микроскопию и молекулярное моделирование позволяет выявить новые, до сих пор неизвестные закономерности во взаимодействии белка-модулятора KCNE2 с каналом Kv11.1 и липидами, что может помочь в будущем оптимизировать пути лечения аритмий у пациентов. Полученные данные также свидетельствуют в пользу возможной клинической значимости носительства варианта p.Met23Leu в гене KCNE2, выявленного у пациентки с умеренным удлинением интервала QT.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят др. Loussouarn G. (CNRF) за предоставление плазиды pSI-Kv11.1 и ценные замечания. О.С.С. является руководителем инновационной команды по разработке инновационных лекарственных препаратов на основе структурной биологии и биоинформатики в Шэнчжэньском университете МГУ-ППИ, провинция Гуандун, КНР (2022KCXTD034). Б.Л., Г.С.Г., В.Н.Н. являются членами этой команды. Б.Л. благодарен университету МГУ-ППИ в Шэнчжэне за финансовую помощь.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00088).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Клиническое и генетическое обследование пациента было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и с письменного информированного согласия совершенно-летних членов семьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколова О. С., Кирпичников М. П., Шайтан К. В., Антонов М. Ю., Волынцева А. Д., Глухов Г. С., Горделий В. И., Деркачева Н. И., Карлова М. Г., Кузьмичёв П. К., Люкманова Е. Н., Моисеенко А. В., Мышикин М. Ю., Некрасова О. В., Новоселецкий В. Н., Охрименко И. С., Парамонов А. С., Попинако А. В., Станишнева-Коновалова Т. Б., Трифонова Е. С., Феофанов А. В., Чупин В. В., Шевцов М. Б. и Шенкарёв З. О. *Современные методы изучения структуры и функций ионных каналов* (Товарищество научных изданий КМК, М., 2020). EDN: ICASCW
2. Chen S., Francioli L. C., Goodrich J. K., Collins R. L., Kanai M., Wang Q., Alföldi J., Watts N. A., Vittal C., Gauthier L. D., Poterba T., Wilson M. W., Tarasova Y., Phu W., Grant R., Yohannes M. T., Koenig Z., Farjoun Y., Banks E., Donnelly S., Gabriel S., Gupta N., Ferriera S., Tolonen C., Novod S., Bergelson L., Roazen D., Ruano-Rubio V., Covarrubias M., Llanwarne C., Petrillo N., Wade G., Jeandet T., Munshi R., Tibbets K., Genome Aggregation Database (gnomAD) Consortium, O'Donnell-Luria A., Solomonson M., Seed C., Martin A. R., Talkowski M. E., Rehm H. L., Daly M. J., Tiao G., Neale B. M., MacArthur D. G., and Karczewski K. J. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes. *Nature*, **625**, 92–100 (2024). DOI: 10.1038/s41586-023-06045-0
3. Schwartz P. J., Ackerman M. J., George A. L., Jr., and Wilde A. A. M. Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **62** (3), 169–180 (2013). DOI: 10.1016/j.jacc.2013.04.044
4. 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.*, **97** (1), 89–134 (2017). DOI: 10.1152/physrev.00008.2016
5. Schwartz P. J., Stramba-Badiale M., Crotti L., Pedrazzini M., Besana A., Bosi G., Gabbarini F., Goulene K., Insolia R., Mannarino S., Mosca F., Nespoli L., Rimini A., Rosati E., Salice P., and Spazzolini C. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*, **120** (18), 1761–1767 (2009). DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.863209
6. Schwartz P. J. and Ackerman M. J. The long QT syndrome: a transatlantic clinical approach to diagnosis and therapy. *Eur. Heart J.*, **34** (40), 3109–3116 (2013). DOI: 10.1093/euroheartj/eht089

7. Schwartz P. J., Priori S. G., Spazzolini C., Moss A. J., Vincent G. M., Napolitano C., Denjoy I., Guicheney P., Breithardt G., Keating M. T., Towbin J. A., Beggs A. H., Brink P., Wilde A. A., Toivonen L., Zareba W., Robinson J. L., Timothy K. W., Corfield V., Wattanasirichaigoon D., Corbett C., Haverkamp W., Schulze-Bahr E., Lehmann M. H., Schwartz K., Coumel P., and Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*, **103** (1), 89–95 (2001). DOI: 10.1161/01.cir.103.1.89
8. Schwartz P. J. and Crotti L. Long and short QT syndromes. In: *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)*, Ed. by D. P. Zipes, J. Jalife, and W. G. Stevenson (Elsievier, 2018), pp. 893–904. DOI: 10.1016/B978-0-323-44733-1.00093-6
9. Schwartz P. J., Crotti L., and George A. L. Jr. Modifier genes for sudden cardiac death. *Eur. Heart J.*, **39** (44), 3925–3931 (2018). DOI: 10.1093/eurheartj/ehy502
10. Lundby A., Andersen M. N., Steffensen A. B., Horn H., Kelstrup C. D., Francavilla C., Jensen L. J., Schmitt N., Thomsen M. B., and Olsen J. V. *In vivo* phosphoproteomics analysis reveals the cardiac targets of beta-adrenergic receptor signaling. *Sci. Signal.*, **6** (278), rs11 (2013). DOI: 10.1126/scisignal.2003506
11. Marx S. O., Kurokawa J., Reiken S., Motoike H., D'Armento J., Marks A. R., and Kass R. S. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*, **295** (5554), 496–499 (2002). DOI: 10.1126/science.1066843
12. Chen L., Marquardt M. L., Tester D. J., Sampson K. J., Ackerman M. J., and Kass R. S. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** (52), 20990–20995 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0710527105
13. 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. 100–112; discussion 112–7, 155–8.
14. 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.*, **13**, e38 (2011). DOI: 10.1017/S1462399411002092
15. Takumi T., Moriyoshi K., Aramori I., Ishii T., Oiki S., Okada Y., Ohkubo H., and Nakanishi S. Alteration of channel activities and gating by mutations of slow ISK potassium channel. *J. Biol. Chem.*, **266** (33), 22192–22198 (1991). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)54553-1
16. Gage S. D. and Kobertz W. R. KCNE3 truncation mutants reveal a bipartite modulation of KCNQ1 K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.*, **124** (6), 759–771 (2004). DOI: 10.1085/jgp.200409114
17. Li P., Liu H., Lai C., Sun P., Zeng W., Wu F., Zhang L., Wang S., Tian C., and Ding J. Differential modulations of KCNQ1 by auxiliary proteins KCNE1 and KCNE2. *Sci. Rep.*, **4**, 4973 (2014). DOI: 10.1038/srep04973
18. Li Z., Li S., Luo M., Jhong J. H., Li W., Yao L., Pang Y., Wang Z., Wang R., Ma R., Yu J., Huang Y., Zhu X., Cheng Q., Feng H., Zhang J., Wang C., Hsu J. B., Chang W. C., Wei F. X., Huang H. D., and Lee T. Y. dbPTM in 2022: an updated database for exploring regulatory networks and functional associations of protein post-translational modifications. *Nucl. Acids Res.*, **50** (D1), D471–D479 (2022). DOI: 10.1093/nar/gkab1017
19. Zhang M., Wang Y., Jiang M., Zankov D. P., Chowdhury S., Kasirajan V., and Tseng G. N. KCNE2 protein is more abundant in ventricles than in atria and can accelerate hERG protein degradation in a phosphorylation-dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **302** (4), H910–H922 (2012). DOI: 10.1152/ajpheart.00691.2011
20. 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.*, **7**, 650 (2016). DOI: 10.3389/fphys.2016.00650
21. Jordan M., Schallhorn A., and Wurm F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucl. Acids Res.*, **24** (4), 596–601 (1996). DOI: 10.1093/nar/24.4.596
22. Sambrook J. and Russell D. W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.-Y., 2001).
23. Pogozheva I. D., Armstrong G. A., Kong L., Hartnagel T. J., Carpino C. A., Gee S. E., Picarello D. M., Rubin A. S., Lee J., Park S., Lomize A. L., and Im W. Comparative molecular dynamics simulation studies of realistic eukaryotic, prokaryotic, and archaeal membranes. *J. Chem. Inf. Model.*, **62** (4), 1036–1051 (2022). DOI: 10.1021/acs.jcim.1c01514
24. Miranda W. E., Guo J., Mesa-Galloso H., Corradi V., Lees-Miller J. P., Tielemans D. P., Duff H. J., and Noskov S. Y. Lipid regulation of hERG1 channel function. *Nature Commun.*, **12** (1), 1409 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-21681-8
25. Lomize M. A., Pogozheva I. D., Joo H., Mosberg H. I., and Lomize A. L. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucl. Acids Res.*, **40** (Database issue), D370–376 (2012). DOI: 10.1093/nar/gkr703
26. Jo S., Kim T., Iyer V. G., and Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.*, **29** (11), 1859–1865 (2008). DOI: 10.1002/jcc.20945
27. Humphrey W., Dalke A., and Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, **14** (1), 33–38 (1996). DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
28. Olesen M. S., Andreasen L., Jabbari J., Refsgaard L., Haunso S., Olesen S. P., Nielsen J. B., Schmitt N., and Svendsen J. H. Very early-onset lone atrial fibrillation patients have a high prevalence of rare variants in genes previously associated with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, **11** (2), 246–251 (2014). DOI: 10.1016/j.hrthm.2013.10.034
29. Nielsen J. B., Bentzen B. H., Olesen M. S., David J. P., Olesen S. P., Haunso S., Svendsen J. H., and Schmitt N. Gain-of-function mutations in potassium channel subunit KCNE2 associated with early-onset lone atrial fibrillation. *Biomark Med.*, **8** (4), 557–570 (2014). DOI: 10.2217/bmm.13.137

30. Malaby H. L. H. and Kobertz W. R. The Middle X Residue Influences Cotranslational N-Glycosylation Consensus Site Skipping. *Biochemistry*, **53** (30), 4884–4893 (2014). DOI: 10.1021/bi500681p
31. Lizak C., Gerber S., Numao S., Aebi M., and Locher K. P. X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature*, **474** (7351), 350–355 (2011). DOI: 10.1038/nature10151

Study of Functional Manifestations of Met23Leu Missense Mutation in the Auxiliary Subunit KCNE2 (Mirp1) of Cardiac Channel Kv11.1

E.M. Pivovarov*, B. Li*, **, A.O. Selin*, G.R. Mitrov*, G.S. Glukhov*, **, D.V. Abramochkin*, M.G. Karlova*, A.G. Shestak***, V.N. Novoseletsky**, E.V. Zaklyazminskaya***, K.V. Shaitan*, and O.S. Sokolova*, **

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

**Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road, 1, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, People's Republic of China

***Russian Scientific Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky, Abrikosovsky per. 2, Moscow, 119991 Russia

In the present study, we functionally analyzed a missense mutation c.67A>T (p.Met23Leu) in the KCNE2 potassium channel Kv11.1 complementary subunit gene identified in a patient with asymptomatic QT interval prolongation on electrocardiogram. We artificially introduced this substitution into the plasmid encoding the KCNE2 subunit and expressed the mutant gene in Chinese hamster ovary cells together with the wild-type Kv11.1 channel gene to evaluate the effect of the mutation on I_{K1} current parameters. We used a comprehensive approach including the study of the integrated I_{Kr} current using the patch-clamp method in a whole-cell configuration in potential fixation mode. The study showed that the c.67A>T mutation (p.Met23Leu) is realized in a gain-of-function type, but the current density carried by Kv11.1 channels is significantly reduced. Fluorescence microscopy showed impaired trafficking of a channel coexpressed with the mutant subunit to the cell surface. We applied molecular modeling to examine the location of the mutant subunit relative to the membrane.

Keywords: voltage-gated potassium ion channels, Kv11.1, KCNE2, long QT syndrome, primary channelopathies, membrane interaction