


КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.352.54+522+612.176.2

**Фенотипические проявления миссенс-мутации Val93Ile
и ее влияние на функционирование канала Kir2.1****Х. Чжан¹, Г.С. Глухов², К.Б. Пустовит³, Ю.Г. Качер², В.С. Русинова⁴,
И.И. Киселева⁵, В.Н. Комолятова⁵, Л.М. Макаров⁵,
Е.В. Заклязьминская⁴, О.С. Соколова^{1,2,*} **¹*Shenzhen MSU-BIT University, China, 517182, Shenzhen, 1 International University Park Road;*²*кафедра биоинженерии и ³кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*⁴*Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Россия, 119991, г. Москва, ГСП-1, пер. Абрикосовский, д. 2;*⁵*Центр синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков, ФМБА России, Россия, г. Москва, 115481, ул. Москворечье, д. 20***e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

Впервые у пациента с асимптомным удлинением интервала QT на электрокардиограмме была выявлена миссенс-мутация с.277G>A (p.Val93Ile) в гене *KCNJ2*, ранее описанная в литературе только как причина семейной формы фибрилляции предсердий. Соответствующая аминокислотная замена была введена в плазмиду, кодирующую канал Kir2.1, и мутантный ген был экспрессирован в клетках яичника китайского хомячка (СНО-K1), чтобы оценить влияние мутации на параметры тока I_{K1} . С помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации *whole-cell* в режиме фиксации потенциала провели изучение интегрального тока I_{K1} . В результате исследования было показано, что мутация с.277G>A (p.Val93Ile) реализуется по типу усиления функции канала Kir 2.1. Наличие стабильного активирующего влияния на функции белка свидетельствует в пользу клинической значимости выявленного варианта.

Ключевые слова: потенциал-зависимые калиевые ионные каналы, Kir2.1, *KCNJ2*, синдром удлиненного интервала QT, первичные каналопатии, электрофизиология

Ионные каналы – достаточно обширный и функционально значимый класс мембранных белков, который играет важнейшую роль в регуляции физиологического состояния клетки [1]. Нарушение функционирования ионных каналов приводит к изменению электрофизиологических свойств клеток, что на уровне организма проявляется нарушениями ритма и проводимости. Наследственные каналопатии развиваются вследствие генетически обусловленных нарушений в работе ионных каналов [2].

Калиевый канал Kir2.1, кодируемый геном *KCNJ2* на 17-й хромосоме (17q23.1 ~ 24.2), активно экспрессируется в кардиомиоцитах, а также нервной и мышечной ткани, где отвечает за фоновый калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} , поддерживающий потенциал покоя, а, следовательно, и возбудимость клеток. Генетические изменения в гене *KCNJ2*, по-разному нарушающие функционирование этого канала, формируют аллельную серию заболеваний сердца с различными электрокардиографическими проявлениями, но объединенные высоким риском внезапной сер-

дечной смерти. Мутации в гене *KCNJ2* могут приводить к семейной форме мерцательной аритмии (MIM*613980) [3], синдрому короткого интервала QT, тип 3 (MIM*609622), изолированному синдрому удлиненного интервала QT, тип 7 (MIM*170390), а также к мультисистемному заболеванию – синдрому Андерсена-Тавила: гипокалиемическому периодическому параличу с удлинением интервала QT (MIM*170390) [4].

Данные о влиянии конкретной мутации на калиевую приводимость канала Kir2.1 важны для оценки риска нарушений ритма сердца, дозирования физических нагрузок и решения вопроса об антиаритмической терапии. В настоящей работе мы провели функциональный анализ миссенс-мутации с.277G>A (p.Val93Ile) в гене *KCNJ2*, впервые выявленной у пациента с асимптомным удлинением интервала QT на электрокардиограмме (ЭКГ). Мы искусственно ввели эту замену в плазмиду, кодирующую канал Kir2.1, и экспрессировали мутантный ген в клетках яичника китайского хомячка (СНО-K1), чтобы оценить влияние мутации на параметры тока I_{K1} . Мы использовали

комплексный подход, включающий изучение интегрального тока I_{K1} с помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации *whole-cell* в режиме фиксации потенциала. В результате исследования было показано, что мутация с.277G>A(p.Val93Ile) реализуется по типу “*gain of function*” и значимо меняет функционирование канала Kir 2.1.

Материалы и методы

Клиническое и генетическое обследование.

Клиническое и генетическое обследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и с письменного информированного согласия совершеннолетних членов семьи. Клиническое обследование включало общий осмотр, сбор персонального и семейного анамнеза, общий и биохимический анализ крови, ЭКГ покоя, 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 мутаций был выполнен методом секвенирования таргетной панели 11 генов, ответственных за наиболее частые наследственные аритмогенные синдромы (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *SCN5A*, *SCN1B-4B*, *SNTA1*), на платформе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) с использованием набора Ion AmpliSeq™ Exome Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Первичная обработка прочтений была выполнена при помощи программного обеспечения Ion Proton Software (Thermo Fisher Scientific, США), выравнивание на референсную последовательность ДНК версии hg19 осуществили с помощью программы BWA 0.7.9. Оценку патогенности выявленных вариантов проводили с использованием критериев патогенности ACMG2015 [5]. Все выявленные варианты III–V классов патогенности были подтверждены независимым методом – прямым двунаправленным секвенированием по Сенгеру на приборе ABI 3730XL DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

Плазмиды. В работе были использованы следующие плазмиды:

– pсDNA3.1-Kir 2.1: кДНК гена *KCNJ2* в классическом векторе pсDNA3.1. для конститутивной экспрессии в различных линиях клеток млекопитающих.

– pEGFP-N1: кодирует оптимизированный вариант зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) с более яркой флуоресценцией и усиленной экспрессией в клетках млекопитающих.

Введение точечной мутации в последовательность канала Kir2.1. Точечную мутацию в последовательность канала Kir2.1 вносили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использо-

ванием высокоточной полимеразы Q5. В качестве матрицы для внесения мутаций использовали плазмиду pсDNA3.1, содержащую последовательность канала Kir 2.1 дикого типа. Использовали следующие праймеры: прямой праймер 5'-CCTGGCTTTCATCCTGTTCATGG-3' и обратный праймер 5'-CAGAAGATAACCAGCATCCACC-3'. Прямой праймер содержал замену основания G на основание A, что соответствует однонуклеотидной замене в положении 277 в гене канала. Амплификацию производили по следующему протоколу: денатурация осуществлялась на 98°C, отжиг праймеров при температуре 60 °C, элонгация при 72 °C в течение 4 мин. После проведения ПЦР продукт анализировали в 0,7%-ном агарозном геле, затем выделяли его с помощью набора QIAquick и последовательно инкубировали с нуклеазой DpnI, T4-полинуклеотидкиназой и T4-ДНК-лигазой. На последнем шаге производили трансформацию химически компетентных бактериальных клеток методом теплового шока. Посев клеток производили на агаризованную среду LB с селективным антибиотиком и инкубировали их в течение ночи при 37°C. Плазмиды из полученных клонов на предмет наличия необходимой мутации и отсутствия дополнительных однонуклеотидных замен проверяли секвенированием по Сенгеру (Евроген, Россия).

Эукариотические клетки. Клетки CHO-K1 выращивали на круглых покровных стеклах в чашках Петри диаметром 35 мм в свежей среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% телячьей сыворотки (Gibco, Великобритания), в присутствии 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, Великобритания) при температуре 37°C и 5% CO₂ в воздушной смеси.

Трансфекцию клеток производили двумя вариантами плазмиды pсDNA3.1, кодирующей мутантный и нативный варианты канала. Для визуализации клеток к плазмиде с геном канала добавляли плазмиду pEGFP-N1, кодирующую GFP в отношении 5:1 и производили трансфекцию двумя плаزمидами. Клетки трансфицировали с помощью реагента Lipofectamine LTX and Plus (Invitrogen, США). Смесь перед добавлением в среду инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, после внесения клетки помещали в инкубатор на 48 ч до проведения пэтч-кламп, через сутки среду заменяли на свежую.

Электрфизиология. Для исследования культуры клеток CHO-K1 на небольшом покровном стекле помещалась в экспериментальную камеру с постоянным протоком раствора следующего состава (ммоль/л): NaCl – 150, KCl – 5,4, CaCl₂ – 1,8, MgCl₂ – 1,2, глюкоза – 10, HEPES – 10, pH доведен до 7,6 с помощью NaOH, расположенную на столике инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Регистрация токов проводилась при комнатной тем-

пературе ($23 \pm 0,5^\circ\text{C}$) с помощью усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, США). Для регистрации выбирались только клетки, испускавшие флуоресцентный сигнал при облучении их возбуждающим светом с длиной волны 480 нм. Пэтч-пипетки сопротивлением 1,5–2,5 МОм изготавливались из боросиликатного стекла (Sutter, США) и заполнялись раствором следующего состава (ммоль/л): KCl – 140, MgCl₂ – 1, EGTA – 5, MgATP – 4, Na₂GTP – 0,3, HEPES – 10, pH доведен до 7,2 с помощью KOH. Перед началом регистрации тока компенсировались емкость пипетки, емкость исследуемой клетки и сопротивление доступа. При обработке данных амплитуды токов нормировались на емкость клетки и выражались в пА/пФ.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 7. Достоверность различий в параметрах I_{K1} между группами клеток при различных значениях мембранного потенциала определяли с помощью двухфакторного ANOVA с поправкой Тьюки.

Результаты и обсуждение

Клиническое наблюдение. Родители пациентки Д. (пробанд), результативной спортсменки (баскетбол), впервые обратились за детальным кардиологическим и генетическим обследованием,

когда в 13 лет у дочери было выявлено удлинение интервала QT на ЭКГ. Продолжительность интервала QTc в покое (до 454 мс) превышала нормальные значения (≤ 440 мс), но не достигала уровня диагностической значимости (более 480 мс у женщин) (рис. 1А). Удлинение интервала QTc при ортопробе было более значительным и достигало 568 мс (рис. 1Б). Жалоб на состояние здоровья не было, спортивные нагрузки выдерживала, обмороков и случаев внезапной смерти среди известных родственников не было. При детальном кардиологическом обследовании родственников первой степени родства умеренное асимптомное удлинение интервала QTc до 465 мс было выявлено только у отца. В семейном анамнезе указаний на наличие наследственных заболеваний сердца, случаев внезапной смерти, а также перенесенных кардиохирургических вмешательств не было выявлено. Младшему брату пациентки (жалоб нет, не обследован) также рекомендован ЭКГ-скрининг. До настоящего времени пациентка наблюдается в течение 2 лет без отрицательной динамики.

Генетическое исследование. В результате ДНК-диагностики у пробанда была выявлена редкая замена с.277G>A (p.Val93Ile) в гене *KCNJ2* в гетерозиготном состоянии (рис. 1В). В ДНК матери этой замены выявлено не было, отец от генетического

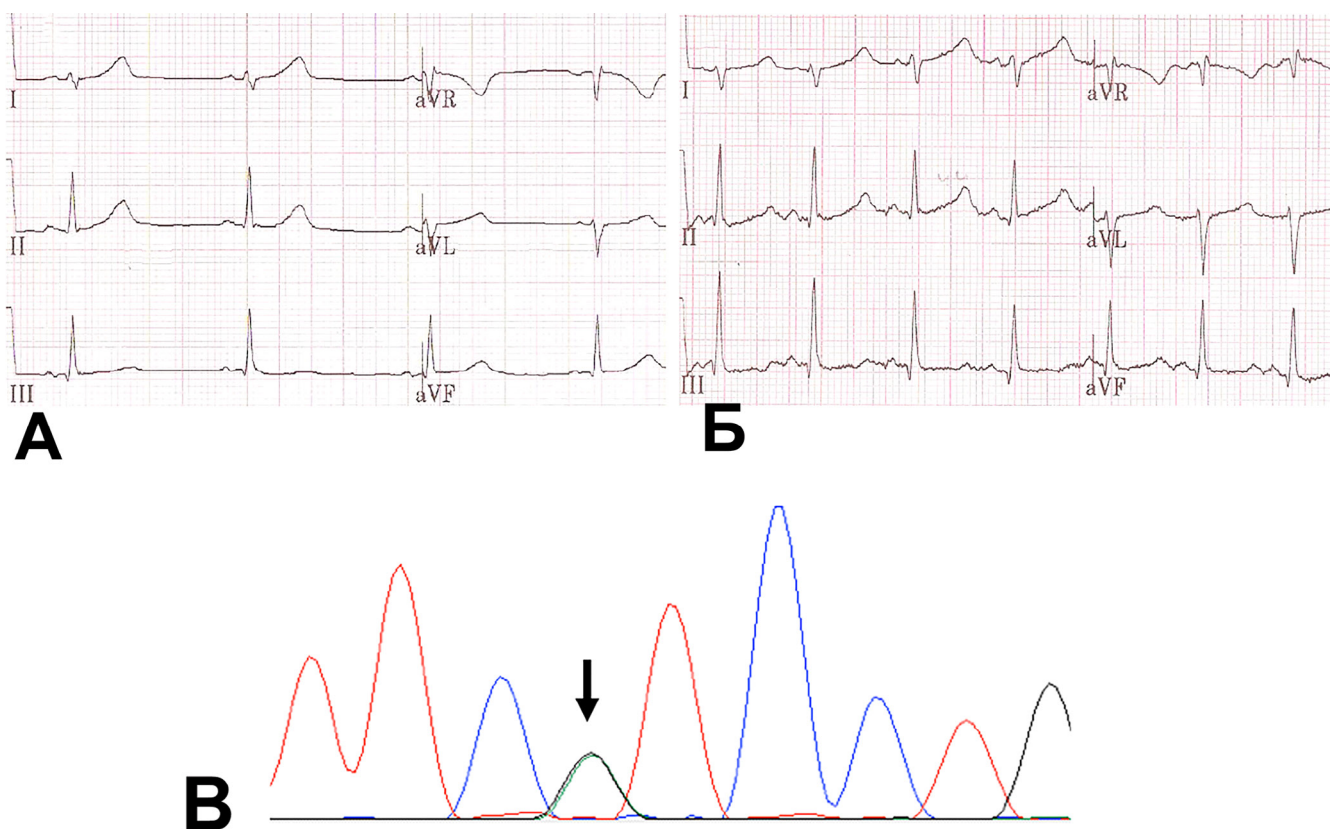


Рис. 1. А. Фрагмент ЭКГ покоя пациентки Д. (лежа). Выраженная синусовая брадиаритмия, средняя частота сердечных сокращений (ЧСС) – 59 уд./мин, средний QTc – 449 мс. Б. Фрагмент ЭКГ в ортопробе. Избыточный прирост ЧСС, ЧСС средняя – 74 уд./мин, QTc – 568 мс. Скорость регистрации ЭКГ 25 мм/с (1 мм = 0,04 с), вольтаж 1 см = 1 мВ (мВ). В. Фрагмент хроматограммы прямого секвенирования гена *KCNJ2*. Замена с.277G>A (p.Val93Ile) в гетерозиготном состоянии указана стрелкой.

обследования отказался. Ранее эта же замена была описана как причина другой каналопатии – семейной формы фибрилляции предсердий [6, 7]. Популяционная частота встречаемости этого варианта по данным gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) составляет 0,000155 аллелей (0,0155% аллелей), или 31:100 000 человек, что ниже, чем оценочная встречаемость наследственных аритмогенных синдромов (1:2000 населения, или 50:100000 населения).

Электрофизиология. Ток I_{K1} индуцировали с помощью изменения мембранного потенциала по линейному протоколу от +60 до -120 мВ: резкий сдвиг от поддерживаемого потенциала -80 мВ до +60 мВ с последующим линейным сдвигом до -120 мВ (рис. 2, вставка). В ходе сдвига потенциала регистрировали ток с характерной для I_{K1} вольтамперной зависимостью. При потенциалах негативнее калиевого равновесного в обеих группах клеток наблюдался

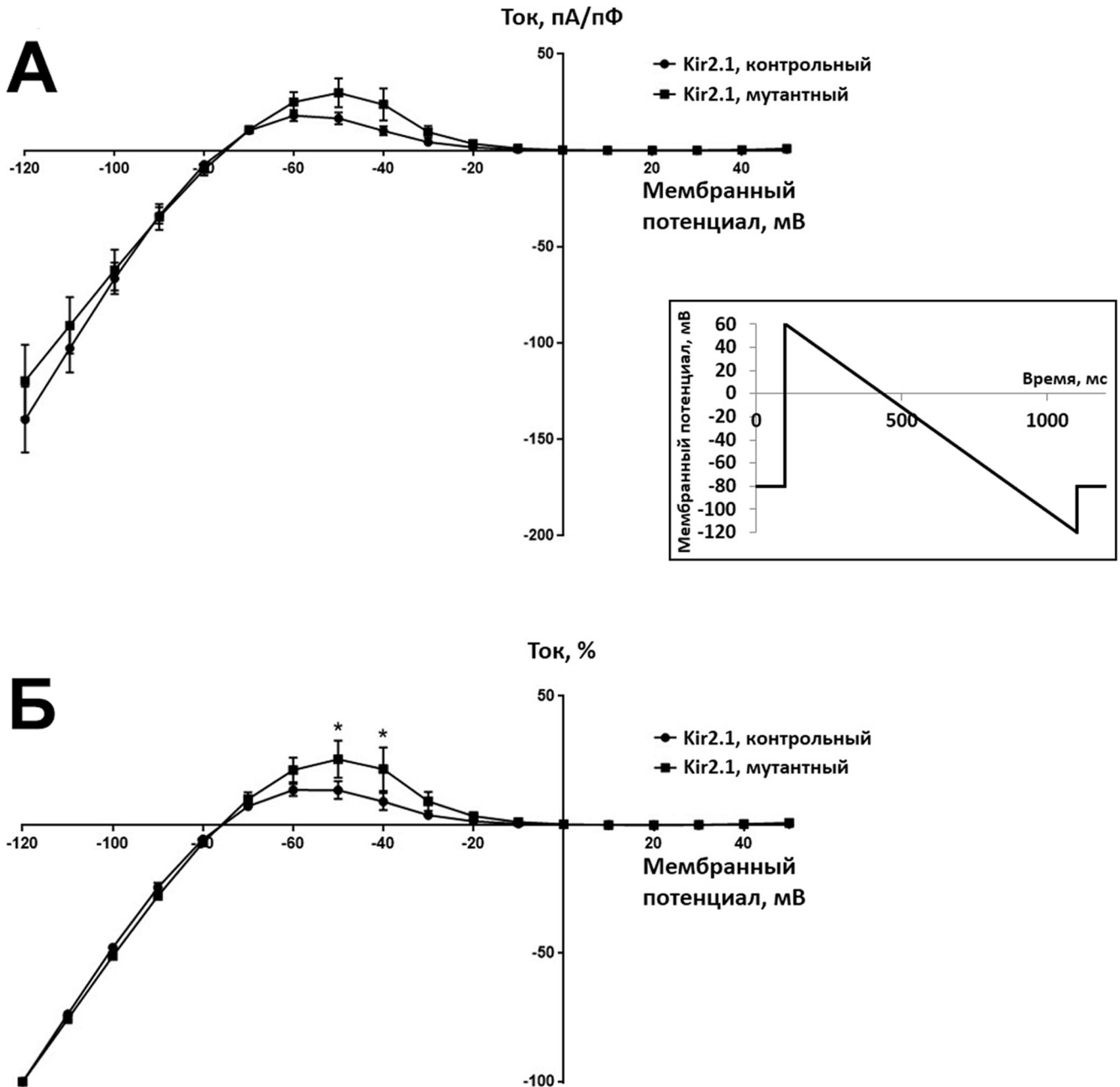


Рис. 2. Сравнение вольтамперных кривых тока I_{K1} в клетках линии CHO-K1, трансфицированных плазмидами с геном *KCNJ2* дикого типа ($n = 10$) и мутантным геном ($n = 10$). Приведены средние значения тока \pm стандартная ошибка среднего. А – сравнение абсолютных значений I_{K1} в диапазоне мембранного потенциала от -120 до +50 мВ. Б – сравнение нормированных значений I_{K1} в процентах от максимума входящего тока при -120 мВ. Нормирование было проведено для каждой клетки в отдельности, затем полученные значения усреднялись. Ток индуцировали с помощью изменения мембранного потенциала по пилообразному протоколу (см. вставку) от поддерживаемого потенциала -80 мВ. * – достоверность различий ($p < 0,05$) между двумя группами клеток, двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки.

входящий ток с практически линейной зависимостью от потенциала. При потенциалах позитивнее калиевого равновесного регистрировался выходящий ток, уменьшающийся при приближении потенциала к 0 мВ и практически отсутствующий при положительных значениях потенциала (рис. 2А). Таким образом, трансфекция как контрольной, так и мутантной плазмидой приводит к экспрессии в клетках СНО-К1 полностью функциональных калиевых каналов Kir2.1, генерирующих ток I_{K1} .

В связи с существенным разбросом в амплитуде тока I_{K1} в исследуемых клетках нам не удалось обнаружить достоверных различий между контрольной и опытной группами клеток ($n=10$, $n=10$, $p>0,05$) по величине входящей или выходящей компоненты I_{K1} (рис. 2А). Поскольку в физиологических условиях мембранный потенциал всегда позитивнее калиевого равновесного потенциала, функциональное значение имеет лишь выходящая компонента I_{K1} . Поэтому нормирование амплитуды I_{K1} было проведено по величине незначимой входящей компоненты при -120 мВ [6]. Выходящая компонента нормированного тока в клетках, трансфицированных мутантной плазмидой, была существенно больше, чем в контрольной группе клеток ($n=10$, $n=10$, $p<0,05$), при -40 и -50 мВ (рис. 2Б).

Это различие позволяет заключить, что исследуемая мутация в гене канала Kir2.1 приводит к усилению выходящей компоненты тока I_{K1} , иными словами – к усилению физиологической функции канала (*gain of function*). С точки зрения

электрофизиологии сердца усиление тока I_{K1} приводит, с одной стороны, к стабилизации потенциала покоя и подавлению потенциальных эктопических очагов автоматии, а с другой – к ускорению заключительных стадий реполяризации и укорочению потенциалов действия, которое может рассматриваться как проаритмический эффект (по крайней мере – в наджелудочковых отделах сердца).

Ранее эта же замена в гене канала *KCNJ2* была ассоциирована только с фибрилляцией предсердий [7, 8]. При синдроме удлиненного интервала QT нарушена реполяризация в желудочках, поэтому нам было так интересно изучить электрофизиологические характеристики мутантного ионного канала Kir2.1. Полученные нами данные согласуются с описанными в соответствующих публикациях [7, 8]. Наличие стабильного активирующего влияния на функции белка свидетельствует в пользу клинической значимости выявленного варианта. В настоящее время отцу и дочери в программе динамического наблюдения проводятся ежегодные ЭКГ-обследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-15004). Клиническое и генетическое обследование пациента было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и с письменного информированного согласия совершеннолетних членов семьи. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколова О.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. и др. Современные методы изучения структуры и функции ионных каналов. М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2020. 316 с.
2. Imbrici P., Liantonio A., Camerino G.M., De Bellis M., Camerino C., Mele A., Giustino A., Pierno S., De Luca A., Tricarico D., Desaphy J.F., Conte D. Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery // *Front. Pharmacol.* 2016. Vol. 7. P. 121.
3. Munger T.M., Wu L.-Q., Shen W.K. Atrial fibrillation // *J. Biomed. Res.* 2014. Vol. 28. N 1. P. 1–17.
4. Plaster N.M., Tawil R., Tristani-Firouzi M., et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome // *Cell.* 2001. Vol. 105. N 4. P. 511–519.
5. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genet. Med.* 2015. Vol. 17. N 5. P. 405–424.
6. Lopez-Izquierdo A., Ponce-Balbuena D., Ferrer T., Sachse F.B., Tristani-Firouzi M., Sanchez-Chapula J.A. Chloroquine blocks a mutant Kir2.1 channel responsible for short QT syndrome and normalizes repolarization properties *in silico* // *Cell. Physiol. Biochem.* 2009. Vol. 24. N 3–4. P. 153–160.
7. Xia M., Jin Q., Bendahhou S. et al. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 332. N 4. P. 1012–1019.
8. Kharche S., Garratt C.J., Boyett M.R., Inada S., Holden A.V., Hancox J.C., Zhang H. Atrial proarrhythmia due to increased inward rectifier current (I(K1)) arising from *KCNJ2* mutation – a simulation study // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008. Vol. 98. N 2–3. P. 186–197.


Поступила в редакцию 18.05.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята в печать 18.06.2021 г.

SHORT COMMUNICATION

Phenotypic manifestations of Val93Ile missense mutation and its influence on Kir2.1 channel functioning

H. Zhang¹, G.S. Glukhov², K.B. Pustovit³, Yu.G. Kacher², V.S. Rusinova⁴, I.I. Kiseleva⁵, V.N. Komolyatova⁵, L.M. Makarov⁵, E.V. Zaklyazminskaya⁴, O.S. Sokolova^{1,2,*} 

¹Shenzhen MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Shenzhen, 517182, China;

²Department of Bioengineering and ³Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁴V.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery, 2 Abrikosovsky Ln., Moscow, 119991, Russia;

⁵Center for Syncopal Conditions and Cardiac Arrhythmias in Children and Adolescents, FMBA of Russia, 20 Moskvorechye st., Moscow, 115481, Russia

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

A patient with asymptomatic QT interval prolongation was found to have missense mutation c.277G>A (p.Val93Ile) in the KCNJ2 gene, previously described in the literature as the cause of a familial form of atrial fibrillation only. The corresponding amino acid substitution was introduced into the plasmid encoding the Kir2.1 channel and the mutant gene was expressed in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) to evaluate the effect of the mutation on IK1 current parameters. Using the whole-cell patch-clamp technique in the potential fixation mode, the integral current of IK1 was studied. As a result of the study, it was shown that the c.277G>A (p.Val93Ile) mutation is implemented according to the “gain of function” type and significantly changes the functioning of Kir 2.1 channel. The presence of a stable activating effect on protein function argues in favor of the clinical significance of the identified variant.

Keywords: voltage-dependent potassium ion channels, Kir2.1, KCNJ2, prolonged QT interval syndrome, primary channelopathies, electrophysiology

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number № 20-54-15004.

Сведения об авторах

Чжан Хань — аспирант биологического факультета МГУ-ППИ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: zhang.han100@qq.com

Глухов Григорий Сергеевич — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: gluhovg@gmail.comkache

Пустовит Ксения Борисовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Качер Юлия Генриховна — студент магистратуры кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: juliakacher007@gmail.com

Русинова Валерия Сергеевна — науч. сотр. Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В.Петровского, тел.: 8-499-248-15-55; e-mail: rusinovavaleria@yandex.ru

Киселева Ирина Ивановна — канд. мед. наук, врач—детский кардиолог Центра синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков. Тел.: 8-499-324-34-64; e-mail: info@kidsfmba.ru

Комолятова Вера Николаевна — докт. мед. наук, врач—детский кардиолог Центра синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков. Тел.: 8-499-324-34-64; e-mail: verakom@list.ru

Макаров Леонид Михайлович — докт. мед. наук, рук. Центра синкопальных состояний и сердечных аритмий у детей и подростков. Тел.: 8-499-324-34-64; e-mail: info@kidsfmba.ru

Заклязьминская Елена Валерьевна — докт. мед. наук, зав. лаб. медицинской генетики Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В.Петровского, Тел.: 8-499-248-15-55; e-mail: zhelene@mail.ru

Сokolova Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4678-232X>