

KCNE2 的两种突变体 I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道功能的调节 *

刘文娟** 邓 鹏** 程蔚蔚 邓建新 潘秉兴 姜 勇 刘 杰***

(广州南方医科大学病理生理学教研室, 广东省休克微循环重点实验室, 广州 510515)

摘要 MinK 相关蛋白 1 (MiRP1)是由 KCNE 基因家族成员 KCNE2 编码的具有一个跨膜结构的小分子蛋白质, 发生在 KCNE2 上的相关突变能够引起遗传性长 QT 间期综合征 (long QT syndrome, LQT6), 但其机制不明. 以往的工作表明, MiRP1 调节瞬间外向钾电流(transient outward current, I_{to})的功能, 对维持心电稳定性具有重要的调节作用. 在哺乳细胞系 COS-7 表达系统利用膜片钳全细胞记录方式, 研究了两种 LQT6 相关的突变体 I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道功能的影响, 从 MiRP1 对 I_{to} 功能调控的改变探讨 LQT6 引起心律失常的电生理机制. 结果表明, KCNE2 与 Kv4.3 共表达后对通道功能具有明显的调控作用, 使通道的激活和失活明显减慢, 电压依赖性失活发生正向移位, 同时加快 Kv4.3 通道从失活中的恢复. I57T 与 Kv4.3 共表达的通道, 门控动力学以及通道的恢复特性更接近 Kv4.3 单独表达的通道, 表现为丧失 KCNE2 的功能——“loss of function”, 而 V65M 的作用则与之刚好相反, 对 Kv4.3 门控动力学和恢复特性的调节较 KCNE2 更强, 同时, 使通道电流密度明显降低, 表现为增强 KCNE2 的功能——“gain of function”. 由此推论, KCNE2 对 I_{to} 功能有重要的调节作用, 发生在 KCNE2 基因上的突变, 无论是增强(V65M)还是减弱(I57T)KCNE2 的功能都可能通过改变 I_{to} 在心脏电稳定性中的贡献, 从而使心脏在某些条件下发生心律失常.

关键词 KCNE2, 瞬间外向钾电流, Kv4.3, 长 QT 间期综合征, 突变

学科分类号 R331.3*8

MinK 相关蛋白 1 (Mink-related protein 1, MiRP1)是一种由 KCNE2 基因编码的含 123 个氨基酸的小分子蛋白质^[1]. 虽然 MiRP1 只有一个跨膜片段, 单独表达并不具有通道功能, 但它却作为 β 亚基对多种参与心脏动作电位(action potential, AP)形成的电压依赖性钾通道的 α 亚基, 如 HERG (快延迟整流钾电流, rapid component of delayed rectifier potassium current, I_{Kr} 的 α 亚基)^[1]、Kv4.2 和 Kv4.3(瞬间外向钾电流, transient outward current, I_{to} 的 α 亚基)^[2]、KvLQT1(慢延迟整流钾电流, slow component of delayed rectifier potassium current, I_{Ks} 的 α 亚基)以及 HCN(心脏起搏通道电流, funny current, I_f 的 α 亚基)等^[3,4]的功能起调节作用. 发生在 KCNE2 基因上的突变, 包括 T8A、Q9E、M54T、I57T、V65M、A116V 等^[1,5~7], 引起 6 型遗传性长 QT 间期综合征(long QT syndrome, LQT), 表现为心室 AP 延长, 发生致死性室性心律失常的风险明显增高, 提示 MiRP1 在心脏动作电位形成

以及保持心电稳定性中起着重要作用. Lu 等^[8]研究了 T8A、Q9E 和 M54T 对 HERG 通道电流以及激活和失活门控动力学特性的影响, 发现 3 种突变体均对 HERG 通道的门控动力学有明显的影 响. Isbrandt 等^[7]报道了 V65M 加快 HERG 通道的失活. 这些工作对于阐明 LQT6 的发生机制具有重要的意义. 但由于 MiRP1 对电压依赖性钾通道的广泛调节作用, 以及各种通道的平衡在动作电位形成以及心电稳定性中的作用, 已有的工作尚未完全阐明 LQT6 的发生机制. 以往的研究发现, KCNE2 与 Kv4.2 在非洲爪蟾卵母细胞共表达, 减慢 Kv4.2 的激活和失活, 并使通道电压依赖性门控发生正向移位^[2]. 在 COS-7 细胞表达系统发现 KCNE2 对

* 国家自然科学基金资助项目(30570418, 30570940).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 020-61648465, E-mail: jieliu@fimmu.com

收稿日期: 2007-05-12, 接受日期: 2007-08-15

Kv4.3(人和大动物 I_{to} 的主要 α 亚基)具有相似的调节作用. 而 LQT6 相关的 KCNE2 突变体对瞬间外向钾电流 I_{to} 的调节作用尚未见报道. 因此, 该工作研究 KCNE2 的两种突变体 I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道的调节作用, 进一步探讨 LQT6 的发生机制.

1 材料与方法

1.1 试剂

LipofectAMINE2000 转染试剂盒(Invitrogen), Dynabeads M-450 CD8(Dynal Biotech Inc), 胰蛋白酶、ATP(K)、天冬氨酸、HEPES(Sigma), DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone). 鼠源单克隆抗人 c-myc-tag 抗体、HRP 偶合的马抗鼠 IgG 抗体、化学发光试剂(Cell signaling), 鼠源单克隆抗 β -actin 抗体(Calbiochem). 其余常规试剂为国产分析纯.

1.2 COS-7 细胞株培养和转染

COS-7 细胞(美国 ATCC)生长在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基, 置于 37℃, 通 5% CO_2 的培养箱. 转染前 24 h 用 0.25%胰酶消化细胞, 以 1×10^5 的密度接种于事先铺好若干 0.5 cm $\times$ 0.3 cm 盖玻片的 35 mm Petri 培养皿, 24~36 h 后, 细胞在盖玻片上的生长密度(confluency)达到 85%~90%, 将 CD8(0.2 μ g)和 Kv4.3(2.3 μ g)质粒 DNA 与以下的任一种质粒 DNA(2 μ g): WT-KCNE2, I57T-KCNE2, V65M-KCNE2 共同加入含 2 ml 液体的培养皿转染细胞, Kv4.3 构建在 pcDNA3 质粒, KCNE2 WT 和突变体(c-myc 标记)构建在 pAlter MAX 质粒(上述所有质粒均为美国 VCU 大学 Dr.Tseng 惠赠), Kv4.3 与野生型或突变型 KCNE2 的摩尔浓度比为 1:1. 转染试剂采用 LipofectAMINE 2000, 方法依照试剂盒说明书.

1.3 Western blotting 测定 KCNE2 蛋白表达量

转染 24 h 后, 用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 120 μ l 细胞裂解液(25 mmol/L HEPES pH 7.6, 137 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 3 mmol/L β -甘油磷酸盐, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 1 mg/L aprotinin(抑肽酶), 1 mmol/L PMSF), 冰上裂解 30 min, 用刮棒刮取细胞, 移至 1.5 ml 离心管, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min. 取上清, 98℃ 煮沸变性 5 min, 行 12% SDS-PAGE, 转 PVDF 膜(0.45 μ m, Millipore, USA) 45 min, 然后在封闭液中(5%脱脂奶粉+ TBST 溶液)室温下封闭 1.5 h, 洗脱之后分

别以鼠源单克隆抗人 c-myc-tag 抗体(1:1 000)和鼠源单克隆抗 β -actin 抗体(1:5 000)作为一抗 4℃ 孵育过夜, 用 HRP 偶合的马抗鼠 IgG 抗体(1:2 000)为二抗, 室温下孵育 1 h, 在美国 Kodak IS2000R 多功能影像系统采集图像进行分析.

1.4 电生理实验

细胞转染 24 h 后加入 CD8 抗体处理的磁珠, 磁珠使用前用含 0.6% FBS 的 PBS 液清洗数次. 选细胞膜上粘有数个磁珠的细胞进行电生理实验. 采用美国 Axon 公司膜片钳放大器 Axopatch 200B, 以全细胞记录方式记录通道电流. 细胞孵育液采用台式液(mmol/L: NaCl 126, $MgCl_2$ 0.5, KCl 4, $CaCl_2$ 2, HEPES 5, 葡萄糖 1 g/L, pH 7.3), 电极充灌电极液(mmol/L: KOH 120, 天冬氨酸 120, KCl 20, ATP (K) 10, EGTA 10, HEPES 10, $MgCl_2$ 1, pH 7.3) 入水后阻抗为 2~5 M Ω , 在室温下(22~25℃)用 Clampex 7.0 采集通道电流储存于电脑作脱机分析.

1.5 数据分析和统计

数据分析采用 Clampfit 6.0 和 Peakfit、Sigmaplot、Excel 等软件. 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 ANOVA 比较组间差异性, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性指标.

2 结 果

2.1 KCNE2 野生型和突变体蛋白表达量比较

为了确定 KCNE2 的两种突变体 I57T 和 V65M 是否影响 KCNE2 蛋白的表达, 我们同时定量分析了以下 4 组细胞 KCNE2 蛋白表达量: a. 单独表达 Kv4.3 (control), b. Kv4.3 和 KCNE2-WT 共表达, c. Kv4.3 和 KCNE2-I57T 共表达, d. Kv4.3 和 KCNE2-V65M 共表达. 如图 1 所示, 单独表达

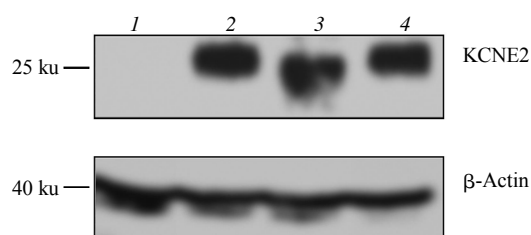


Fig. 1 Expression of KCNE2 protein in COS-7 cells transfected with wild type or mutant KCNE2

Representative Western blots of KCNE2 and β -Actin in control (without exogenous expression of KCNE2), KCNE2-WT, KCNE2-I57T and KCNE2-V65M expressed cells. 1: Control; 2: KCNE2-WT; 3: KCNE2-I57T; 4: KCNE2-V65M.

Kv4.3 细胞无蛋白质条带, 其余 3 组细胞在 25ku 有明显的蛋白质条带, 各组之间蛋白质表达量无明显差异. 说明 I57T 和 V65M 两种突变体不影响 KCNE2 的蛋白质表达量. 值得注意的是, I57T 蛋白质条带的位置较 WT 和 V65M 条带略偏前, 这可能与该突变影响了 KCNE2 蛋白的空间构象, 从而使其电泳的速度略有加快有关.

2.2 I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道电流密度和动力学的调节

细胞钳制在 -80 mV, 给予 200 ms、 $+60$ mV 刺激, 记录 $+60$ mV 时通道电流(pA), 将电流幅度除以细胞电容(pF)得出电流密度(pA/pF). Kv4.3 单独表达时电流密度为 (358.31 ± 158.75) pA/pF ($n=5$), Kv4.3 和 KCNE2 共表达电流密度有所降低 $((287.96 \pm 52.76)$ pA/pF, $n=6$), 但二者无统计学差异 ($P > 0.05$). KCNE2 的突变体 I57T 也使 Kv4.3 通道的电流密度有所降低, 但无统计学意义 $((224.15 \pm 26.17)$ pA/pF, $n=5$, $P > 0.05$), 而 V65M 则使 Kv4.3 电流密度显著降低 $((119.78 \pm 44.17)$ pA/pF, $n=7$, $P < 0.05$).

图 2a 显示, 将 Kv4.3+KCNE2-WT、Kv4.3+KCNE2-I57T 和 Kv4.3+KCNE2-V65M 在 $+60$ mV 电压刺激下所产生的电流幅度调整到与 Kv4.3 电流幅度相同大小时典型的电流曲线. KCNE2 明显减慢 Kv4.3 通道激活和失活的动力学, Kv4.3 和 KCNE2 共表达通道在 $+60$ mV 所产生电流达到峰值的时间 (time to peak, TTP) 为 (15.92 ± 1.09) ms ($n=5$), 明显慢于 Kv4.3 通道电流达到峰值的时间 TTP: (4.82 ± 0.32) ms, $n=5$, $P < 0.01$. KCNE2 也使 Kv4.3 通道电流衰减的时间明显减慢, 电流峰值衰减一半的时间 $T_{0.5}$ 由 (23.70 ± 1.81) ms 增至 (66.33 ± 8.40) ms, $P < 0.01$ (图 2b). I57T 对通道动力学的影响与 Kv4.3 单独表达时相似, TTP 和 $T_{0.5}$ 分别为 (4.25 ± 0.39) ms 和 (16.63 ± 3.90) ms ($n=5$), 与 Kv4.3 单独表达时的 TTP 和 $T_{0.5}$ 无显著差异, 但明显快于 Kv4.3 和 KCNE2 共表达的 TTP 和 $T_{0.5}$ (P 均 < 0.01). 有趣的是, V65M 对通道动力学的作用与 I57T 的正好相反, 不仅使 TTP 和 $T_{0.5}$ 的值 (分别为 (30.14 ± 5.46) ms 和 (110.71 ± 19.59) ms) 明显高于 Kv4.3 单独表达时的值 (均 $P < 0.01$), 而且也高于 Kv4.3 和 KCNE2 共表达的 TTP 和 $T_{0.5}$, 其中 TTP 在两组之间有显著差异 ($P < 0.05$).

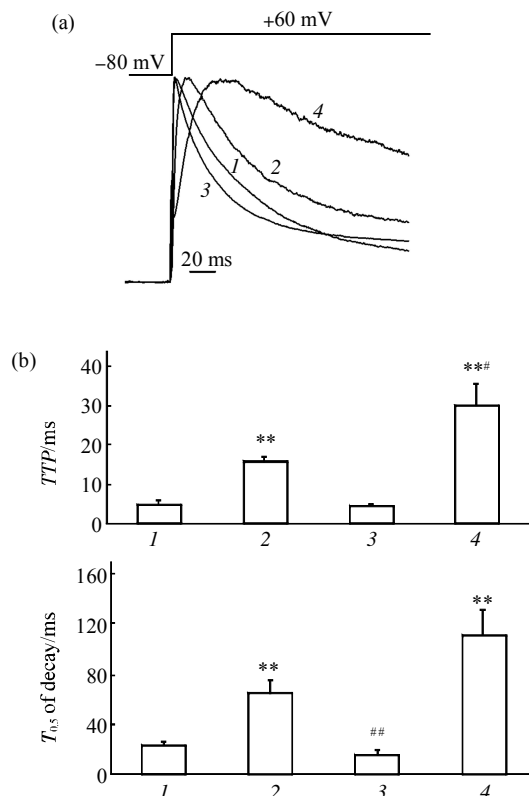


Fig. 2 Effects of WT, I57T or V65M-KCNE2 on activation and inactivation kinetics of Kv4.3 current

(a) Superimposed current traces were recorded at $+60$ mV from cells expressing Kv4.3 alone, Kv4.3+KCNE2-WT, Kv4.3+KCNE2-I57T, or Kv4.3+KCNE2-V65M. The displayed gain was adjusted so that peak current amplitude matches each other. (b) Average of time to peak (TTP) and half time ($T_{0.5}$) of decay. ** $P < 0.01$ vs Kv4.3 alone, # $P < 0.05$ vs Kv4.3+KCNE2-WT, ## $P < 0.01$ vs Kv4.3+KCNE2-WT. 1: Kv4.3 alone; 2: +KCNE2-WT; 3: +KCNE2-I57T; 4: +KCNE2-V65M.

2.3 I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道电压依赖性失活的影响

图 3a 右上角为 Kv4.3 电压依赖性失活的电压钳步骤: 将细胞钳制在 -80 mV, 给予 2 s, 从 $+30$ mV 开始以 10 mV 递减至 -120 mV 的条件电压 (V_c) 刺激, 然后电压钳至 $+60$ mV, 200 ms, 测量 $+60$ mV 时电流峰值. 以 V_c 为 -100 mV 时的电流为 1, 算出不同 V_c 下的相对电流 (fraction available, FA). 对 FA 和 V_c 进行 Boltzman 拟合: $FA = 1 / \{1 + \exp[(V_c - V_{0.5})/k]\}$, 计算出半数失活电压 $V_{0.5}$ 和斜率 k . 图 3a 显示, KCNE2 使 Kv4.3 电压依赖性失活曲线正向移位, Kv4.3 单独表达时 $V_{0.5}$ 为 $(-52.45 \pm$

1.61) mV, $n=5$, 而 Kv4.3 与 KCNE2 共表达时 $V_{0.5}$ 为 (-43.52 ± 1.64) mV, $n=6$, $P < 0.01$ (图 3b). k 值两组之间无明显差异, Kv4.3 单独表达和与 KCNE2 共表达时分别为 (4.96 ± 0.37) 和 (5.31 ± 0.22) , 说明 KCNE2 不改变 Kv4.3 的离子选择性. I57T 使电压依赖性失活曲线更靠近 Kv4.3 电压依赖性失活曲线, 甚至有轻微的负向移位, $V_{0.5}$ 为 (-57.82 ± 3.89) mV, $n=5$, 与单独表达的 Kv4.3 无显著差异, 但其负值明显大于 Kv4.3 与 KCNE2 共表达的 $V_{0.5}$ ($P < 0.01$). 而较之 Kv4.3 与 KCNE2 共表达通道, V65M 使电压依赖性失活曲线向正方向移位, $V_{0.5}$ 为 (-35.59 ± 1.04) mV, $n=6$, 其负值明显小于 Kv4.3 单独表达时的 $V_{0.5}$ ($P < 0.01$), 较 Kv4.3 与 KCNE2 共表达的 $V_{0.5}$ 也减小, 但缺乏显著性意义 ($P = 0.07$). I57T 和 V65M 对通道的 k 值同样没有明显影响.

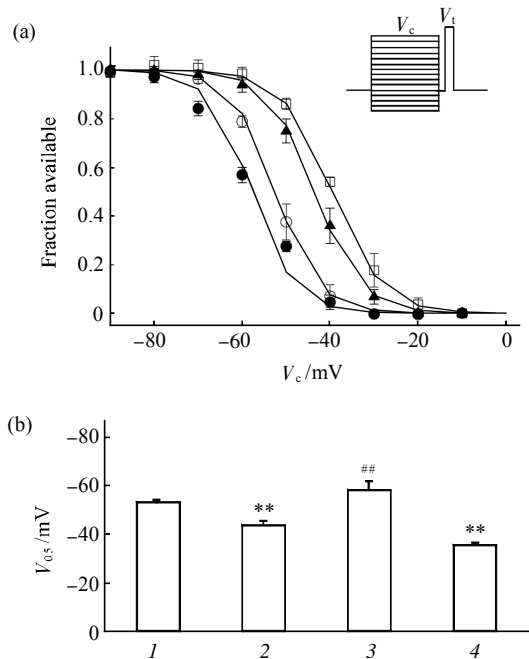


Fig. 3 Effects of WT, I57T or V65M-KCNE2 on voltage dependence of Kv4.3 inactivation

(a) Voltage-clamp protocol (right upper panel) was as follows: from V_h of -80 mV, conditioning pulses (V_c) were applied for 2 s from $+30$ mV to -120 mV in 10 mV decrements. Each V_c was followed by a test pulse (V_t) to $+60$ mV. Peak current amplitudes during V_t pulse after various V_c levels were normalized to that after V_c to -100 mV. This gave an estimate of fractions of channels available for activation after various V_c levels. $\circ-\circ$: Kv4.3 alone; $\blacktriangle-\blacktriangle$: +KCNE2-WT; $\bullet-\bullet$: +KCNE2-I57T; $\square-\square$: +KCNE2-V65M. (b) Average of voltage of half inactivation ($V_{0.5}$). ** $P < 0.01$ vs Kv4.3 alone, # $P < 0.01$ vs Kv4.3 + KCNE2-WT. 1: Kv4.3 alone; 2: +KCNE2-WT; 3: +KCNE2-I57T; 4: +KCNE2-V65M.

2.4 I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道从失活中恢复特性的影响

Kv4.3 通道在去极化刺激激活后迅速失活, 在回到静息膜电位恢复一定时间后可再次被激活, 随着恢复时间延长, 恢复的通道越多, 直至达到失活前水平, 甚至出现超射(overshoot)现象, 即再次激活的电流大于失活前的电流. 本实验给予双电压步(pulse) (V_1 、 V_2 , $+60$ mV)刺激, V_1 到 V_2 的时间 (V_1 - V_2 interval)从 12 ms 到 1 s 递增(图 4a 显示电压钳步骤和 Kv4.3 单独表达时, V_1 - V_2 从 12~192 ms 期间典型的通道电流恢复曲线), 测量 V_1 、 V_2 刺激所产生的电流峰值 P_1 、 P_2 , 用 P_2/P_1 比值反映通道

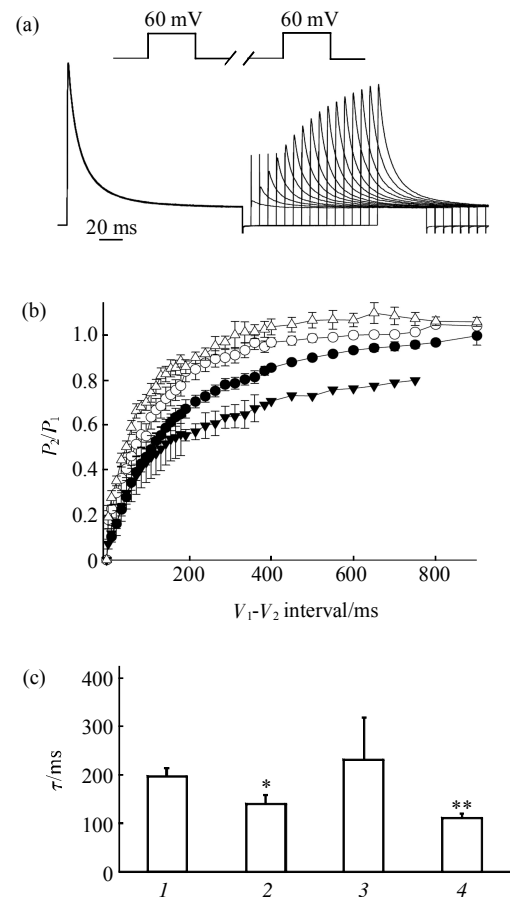


Fig. 4 Effects of WT, I57T, or V65M-KCNE2 on Kv4.3 restitution

(a) Typical current traces of Kv4.3 recovery from inactivation during V_1 - V_2 (recovery) interval ranged from 12 to 192 ms. The upper panel demonstrated the voltage-clamp protocol: double pulse (V_1 and V_2) each to $+60$ mV for 500 ms applied once every 10 s. (b) Time course of change in P_2/P_1 against V_1 - V_2 interval. P_1 and P_2 are peak current amplitudes during V_1 and V_2 pulse. The V_1 - V_2 interval ranged from 12 to 1 000 ms. $\bullet-\bullet$: Kv4.3; $\circ-\circ$: KCNE2; $\blacktriangle-\blacktriangle$: I57T; $\triangle-\triangle$: V65M. (c) Average of time constant (τ) of recovery. τ value was estimated by one exponential fit. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Kv4.3 alone. 1: Kv4.3 alone; 2: +KCNE2-WT; 3: +KCNE2-I57T; 4: +KCNE2-V65M.

电流从失活中恢复的程度. 以 V_1 - V_2 interval 为横坐标, P_2/P_1 为纵坐标绘制恢复曲线(图 4b), 对 P_2/P_1 和 V_1 - V_2 interval(t) 进行单指数拟合: $P_2/P_1 = A \times (1 - \exp(-t/\tau)) + (1-A)$, 计算出通道恢复的时间常数 τ . 图 4c 显示 KCNE2 使 Kv4.3 从失活中恢复的速度加快, 时间常数 τ 由 Kv4.3 单独表达时的 (193.43 ± 17.98) ms 降为 (137.42 ± 18.14) ms, $n = 7$, $P < 0.05$. KCNE2 不引起 Kv4.3 出现明显的超射现象. 与 WT 相比, I57T 减慢 Kv4.3 从失活中恢复, 恢复曲线的时间常数 τ 为 (230.33 ± 75.08) ms, $n = 4$, 但与 Kv4.3 和 Kv4.3+KCNE2-WT 相比都缺乏显著性意义. 而 V65M 与 WT 相比能进一步加快 Kv4.3 从失活中恢复, 恢复曲线的时间常数 τ 为 (100.75 ± 10.85) ms, $n = 4$, 虽然与 Kv4.3+KCNE2-WT 相比无显著性意义, 但明显小于 Kv4.3, $P < 0.01$.

3 讨 论

瞬间外向钾电流 I_{to} 是一种电压依赖性的钾通道电流, 膜电位去极化时激活, 具有快速激活和快速失活的特性, 因此是构成 AP 复极化 1 期的主要钾电流. 同时它通过对复极化 2 期膜电位的影响间接影响钙电流进而对 AP 全程产生一定的影响. 在心肌肥大、心衰等病理条件下发现 I_{to} 功能明显下调, 是引起心室 AP 延长, 继而导致室性心律失常发生的重要原因^[9]. Tseng 等^[2]在爪蟾卵母细胞表达系统发现, MiRP1 对 Kv4.2 的激活和失活门控动力学以及恢复时程有明显的调节作用, 使通道电流更接近心室 I_{to} 电流特性. 最近, 他们在心肌梗塞狗的模型发现 MiRP1 表达减少, 是引起电压依赖性钾通道功能改变的重要原因^[10]. 因此, 改变 MiRP1 的功能可以通过改变 AP 的形成继而影响心肌电稳定性, 从而引起致死性室性心律失常.

Kv4.3 是人和大动物 I_{to} 的主要 α 亚基^[11]. 我们以往的工作^[12]和本研究在 COS-7 细胞系发现, MiRP1 对 Kv4.3 的调节作用与对 Kv4.2(啮齿类等小动物主要的 α 亚基) 类似, 包括减慢通道的激活和失活, 使电压依赖性的失活发生正向移位, 同时加快通道从失活中的恢复. 因此, MiRP1 同样是人和大动物 I_{to} 的一个重要调节亚基.

与 MiRP1 WT 相比, I57T 对 Kv4.3 激活和失活动力学无明显影响, 电压依赖性失活非但不发生正向移位, 反而有轻微的负向移位(~ -5 mV). 此外, I57T 与 Kv4.3 共表达通道从失活中恢复较

Kv4.3+MiRP1 通道明显减慢, 甚至慢于 Kv4.3 单独表达的通道. 因此, 我们认为, I57T 是一种 “loss of function” 突变, 丧失了 MiRP1 WT 对 I_{to} 的调节作用. 与 I57T 作用刚好相反, V65M 对 Kv4.3 门控动力学有明显的影响, 其方向与 MiRP1 WT 一致, 表现为进一步减慢 Kv4.3 激活与失活的速度, 引起通道电压依赖性失活发生明显的正向移位($\sim +15$ mV), 同时加快通道从失活中恢复. 与 MiRP1 相比, V65M 对 Kv4.3 的调节作用更强, 因此是一种 “gain of function” 突变.

I57T 和 V65M 对 Kv4.3 通道激活与失活动力学的调控存在如此巨大的差异, 但它们为何都能引起 LQT 综合症? I_{to} 对 AP 的贡献决定于其电流密度、激活、失活以及恢复等多种因素. 各种因素综合作用后如使 I_{to} 功能下调, 将引起 AP 延长, 继而导致 LQT 综合症. V65M 使 Kv4.3 电流密度减小, 下调通道功能; 但另一方面它又使通道在较正的电压下才失活以及加快从失活中恢复, 似乎对通道的功能有上调作用. I57T 对通道功能也表现出正反两方面的调控, 一方面通过加快通道失活、使通道电压依赖性失活轻微负向移位以及减慢通道从失活中恢复, 从而下调通道功能, 而它同时加快通道激活似乎起着相反的作用. 因此, 两种突变对 Kv4.3 通道电流密度、激活/失活门控动力学等综合作用的结果可能均是下调 I_{to} 的功能.

虽然理论上推导参与 AP 形成的电压依赖性钾通道功能下调引起 AP 延长, 从而导致 LQT. 但是, 以往的研究发现无论是使 HERG(3 期 AP 复极化的主要电压依赖性钾通道) 功能下调(loss of function)还是上调(gain of function)的突变均能引起 LQT^[13,14]. 因此, 我们也不能排除 I57T 或 V65M 上调 I_{to} 电流的可能性. 无论 I57T 和 V65M 是上调还是下调 I_{to} 电流, 两者引起 I_{to} 的变化是一致还是相反, 他们的共同之处都是可通过改变 I_{to} 电流, 破坏心电稳定性, 引起 LQT.

值得注意的是, MiRP1 对其他几种电压依赖性的钾通道也有调控作用, LQT6 相关 MiRP1 突变体对这些电压依赖性钾通道的功能以及心脏心电稳定性如何影响, 将是我们下一步关注的目标.

参 考 文 献

- Abbott G W, Sesti F, Splawski I, *et al.* MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, 1999, **97**(2): 175~187
- Zhang M, Jiang M, Tseng G N. MinK-related peptide 1 associates

- with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel?. *Circ Res*, 2001, **88** (10): 1012~1019
- 3 Yu H, Wu J, Potapova I, *et al.* MinK related peptide 1: a beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res*, 2001, **88**(12): E84~87
 - 4 Tinel N, Diochot S, Borsotto M, *et al.* KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J*, 2000, **19**(23): 6326~6330
 - 5 Sesti F, Abbott G, Wei J, *et al.* A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(19): 10613~10618
 - 6 Splawski I, Shen J, Timothy K W, *et al.* Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes: *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*. *Circulation*, 2000, **102**(10): 1178-1185
 - 7 Isbrandt D, Friederich P, Solth A, *et al.* Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J Mol Med*, 2002, **80**(8): 524~532
 - 8 Lu Y, Mahaut-Smith M P, Huang C L H, *et al.* Mutant MiRP1 subunits modulate HERG K⁺ channel gating: a mechanism for pro-arrhythmia in long QT syndrome type 6. *J Physiol*, 2003, **551** (PT1): 253~262
 - 9 Oudit G Y, Kassiri Z, Ramirez R J, *et al.* The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33**(5): 851~872
 - 10 Jiang M, Zhang M, Tang D, *et al.* KCNE2 protein is expressed in ventricles of different species, and changes in its expression contribute to electrical remodeling in diseased hearts. *Circulation*, 2004, **109**(14): 1783~1788
 - 11 Dixon J E, Shi W, Wang H S, *et al.* Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res*, 1996, **79**(4): 659~668.
 - 12 刘杰, 邓建新, 潘秉兴, 等. KCNE2 4.3 通道功能的调节作用. 南方医科大学学报, 2006, **26**(12): 1754~1756
Liu J, Deng J, Pan B, *et al.* Journal of Southern Med University, 2006, **26**(12): 1754~1756
 - 13 Curran M E, Splawski I, Timothy K W, *et al.* A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, 1995, **80**(5): 795~803
 - 14 Lees-Miller J P, Duan Y, Tseng G Q, *et al.* Novel gain-of-function mechanism in K⁺ channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG N629D mutant. *Circ Res*, 2000, **86**(5): 507~513

Functional Regulation of Kv4.3 by I57T and V65M, Two Kinds of LQT6 Associated Mutations in KCNE2*

LIU Wen-Juan**, DENG Peng**, CHENG Wei-Wei, DENG Jian-Xing,
PAN Bing-Xin, JIANG Yong, LIU Jie***

(Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Shock and Microcirculation of Guangdong Province,
Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract MiRP1 is encoded by KCNE2, which contains a single membrane-spanning domain. Inherited mutations in KCNE2 have been identified in patients with long QT syndrome (LQT6). However the mechanism by which KCNE2 mutations increase the risk of arrhythmias in patients remains unclear. Previous work has reported that MiRP1 plays an important role in regulating transient outward current (I_{to}) function and maintaining the ventricular electrical stability. The role of two kinds of long QT syndrome (LQT6)-associated mutations in KCNE2, I57T and V65M in regulation of Kv4.3, the major α subunit of I_{to}, was investigated in COS-7 cells to elucidate the mechanism for pro-arrhythmia induced by these two inherited mutations. The results demonstrate that coexpression of KCNE2 with Kv4.3 slowed the rate of activation and inactivation, and caused a positive shift of voltage-dependence of inactivation of Kv4.3 channel. Moreover, KCNE2 accelerated recovery of Kv4.3 channel from inactivation. This is in agreement with previous study. In comparison with the effect of wild type KCNE2, I57T exerted no significant effect on Kv4.3 gating kinetics and recovery property. The phenotype of I57T and Kv4.3 coexpressed channel was similar to that of Kv4.3 expressed alone. In contrast, V65M enhanced all the effects of KCNE2 on Kv4.3, including slower activation and inactivation, more positive shift of voltage-dependence of inactivation and faster recovery from inactivation versus Kv4.3+KCNE2. Furthermore,

V65M dramatically decreased Kv4.3 current amplitude. These results suggest that I57T causes “loss of function” while V65M results in “gain of function” of KCNE2. It is therefore proposed that KCNE2 is an important modulator of I_{to} . LQT6-associated mutations in KCNE2 may perturb the contribution of I_{to} to electrical stability in the heart through changing KCNE2 regulation of Kv4.3, predisposing the heart to arrhythmia under certain conditions.

Key words KCNE2, transient outward current, Kv4.3, long QT syndrome, mutation

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570418, 30570940).

**These authors contribute equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-20-61648465, E-mail: jieliu@fimmu.com

Received: May 12, 2007 Accepted: August 15, 2007