



En ny epilepsiassocierad mutation i en kaliumkanal orsakar multigenetisk funktionsförlust

Excitopatier, såsom epilepsi, hos barn orsakas ofta av genetiska mutationer. I takt med att världens kapacitet att screena dessa barn ökar, kommer fler mutationer av okänd signifikans att upptäckas. Det är inte möjligt att förutspå hur mutationerna orsakar sjukdom och det ligger därför i vårt intresse att utreda genotyp-fenotypkorrelationen.

Michelle Nilsson, doktorand vid Institutionen för biomedicinska och kliniska vetenskaper, Linköpings universitet, berättar mer i denna artikel.

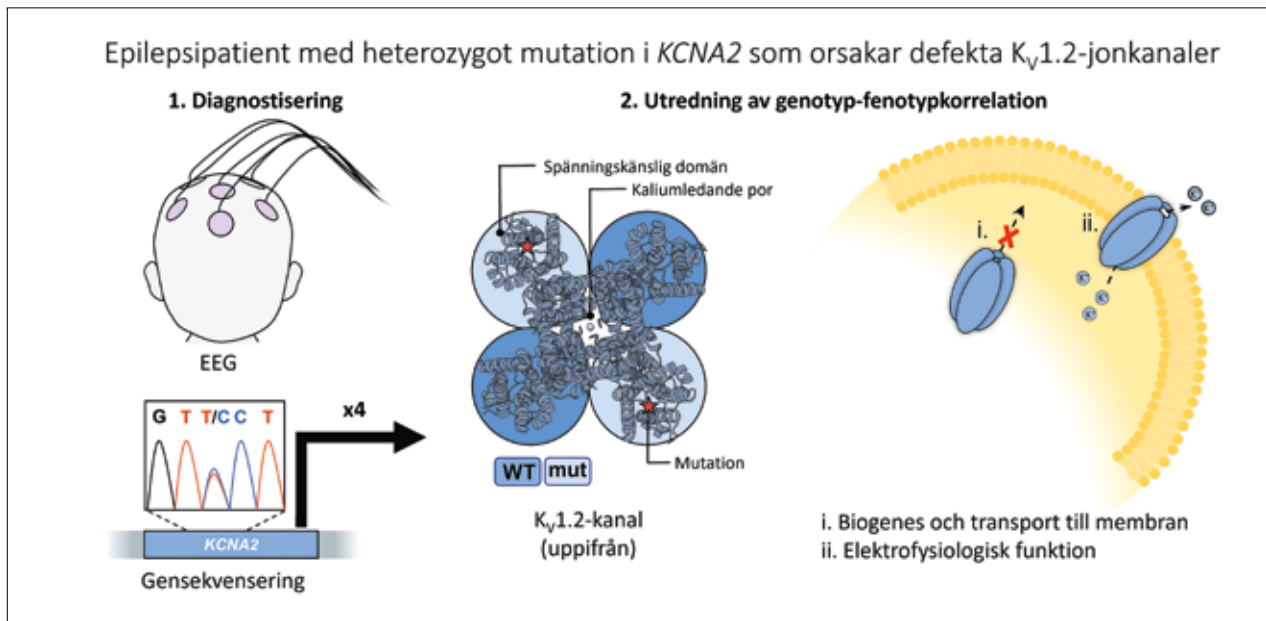
I vår senaste publikation beskriver vi en ny mutation i *KCNA2*, som kodar för den spänningkänsliga kaliumkanalen $K_v1.2$, som upptäcktes i ett barn med epilepsi [Figur 1].¹ Epilepsi som orsakas av mutationer i $K_v1.2$ är ett relativt nytt fynd och karakterisering av dessa mutationer och dess relation till den kliniska bilden är ett pågående arbete.² Det går inte att förutse den specifika effekten olika mutationer har på jonkanalsfunktionen. Dessutom kan epilepsi orsakas av både förlust av funktion (loss of function) och ökad funktion (gain of function) hos $K_v1.2$. Klassificering av dessa mutationer kan också vara intressant ur ett behandlingsperspektiv då de skulle kunna användas för att utveckla precisionsmedicin för olika typer av mutationer. Exempelvis publicerades nyligen en studie där patienter med $K_v1.2$ -gain-of-function-mutationer behandlades med en $K_v1.2$ -blockare.³

$K_v1.2$ -kanaler återfinns i stora delar av hjärnan där de finns inbäddade i nervcellernas ytmembran. De bidrar till att stabilisera den elektriska aktiviteten i nervsystemet genom att bromsa nervimpulser. Mer specifikt initieras elektriska impulser i nervceller genom ett inflöde av natriumjoner via spänningkänsliga natriumkanaler och avslutas då kaliumjoner flödar ut ur cellen via de spänningkänsliga kaliumkanalerna. $K_v1.2$ -kanaler består av fyra likadana subenheter, där varje subenhet kodas av genen *KCNA2* [Figur 1]. Tillsammans bildar subenheterna en central kaliumjonledande kanal, om-



Klassificering av dessa mutationer

kan också vara intressant ur ett behandlingsperspektiv då de skulle kunna användas för att utveckla precisionsmedicin för olika typer av mutationer.



Figur 1: Epilepsipatient diagnostiseras efter neurologisk utredning med elektroencefalografi (EEG) och genetisk utredning med gensekvensering. Patienten är heterozygot för en missense-mutation (c.698T > C (p.Phe233Ser)) i *KCNA2*, som kodar för den spänningskänsliga kaliumjonkanalen $K_v1.2$. $K_v1.2$ -kanaler består av fyra likadana subenheter, där varje subenhet kodas av genen *KCNA2*. I patienten förväntas en blandning av friska vildtypsubenheter (WT) och muterade (mut) enheter. Utredning av genotyp-fenotypkorrelationen gjordes *in vitro* genom att studera $K_v1.2$ -kanalernas (i) transport till membranet och (ii) dess elektrofysiologiska funktion. Transporten av muterade $K_v1.2$ -subenheter till cellytan är kraftigt reducerad, en markant funktionsförlust.

ringad av fyra spänningskänsliga domäner.⁴ Mutationer som uppstår i jonkanaler kan generellt delas in i två grupper: i) de som påverkar biogenesen; produktionen och transporten till cellmembranet och ii) de som påverkar elektrofysiologiska funktionen; förmågan att leda kaliumjonströmmar [Figur 1].

GENETISK UTREDNING VISAR PUNKTMUTATION I KALIUMKANALEN $K_v1.2$

Flertalet feber-associerade epilepsianfall hos patienten ledde till diagnos efter neurologisk och genetisk utredning. Patientens elektroencefalogram (EEG) visade förlängsammad och epileptiform aktivitet. Vid den genetiska utredningen screenades 224 epilepsi-associerade gener, varpå en de novo-mutation upptäcktes i *KCNA2* som kodar för den spänningskänsliga kaliumjonkanalen $K_v1.2$. Patienten är heterozygot för en missense-mutation (c.698T > C (p.Phe233Ser)) [Figur 1]. För att etablera en genotyp-fenotypkorrelation studerade vi hur patientens mutation påverkar $K_v1.2$ -kanaler *in vitro* i isolerade cellsystem, utan bakgrund från andra jonkanaler.

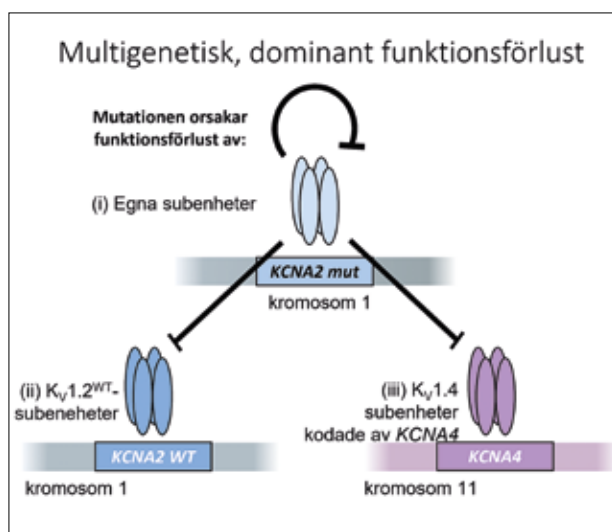
” De första elektrofysiologiska experimenten visade överraskande nog en avsaknad av kaliumströmmar i celler med muterade $K_v1.2$ -kanaler.

$K_v1.2$ -MUTATIONEN ORSAKAR MARKANT FUNKTIONSFÖRLUST

De första elektrofysiologiska experimenten visade överraskande nog en avsaknad av kaliumströmmar i celler med muterade $K_v1.2$ -kanaler. Vi ville därför utreda huruvida jonkanalerna transporterats till cellmembranet. För att kunna studera detta konjugerade vi varje $K_v1.2$ -subenhet med en intracellulär fluoroför som rapporterar total jonkanalsproduktion, samt en extracellulär tagg som kan färgas in med en fluorescerande antikropp enbart om jonkanalerna befinner sig på cellytan. Vi kunde då utvärdera andelen jonkanaler som transporterats till cellens yta både i individuella celler med mikroskopi, samt i tusentals celler med den optiska tekniken flödescytometri. Medan vildtypvarianten (WT) av $K_v1.2$ i hög grad transporterades till cellytan, detekterade vi nästan inga muterade $K_v1.2$ -kanaler på ytan. Det skulle kunna förklara avsaknaden av kaliumströmmar och tyder på en markant funktionsförlust.

$K_v1.2$ -kanaler består som nämnt av fyra $K_v1.2$ -subenheter. Patienten är heterozygot och förväntas ha jonkanaler som består av både $K_v1.2$ (WT)- och muterade $K_v1.2$ -subenheter. Vi bestämde oss för att imitera detta tillstånd *in vitro*, genom att förse celler med genetiskt material för båda allelerna ($K_v1.2$ (WT)- och muterade $K_v1.2$ -subenheter). Vi upptäckte att enbart 20 procent av kaliumströmmar producerades i de ”heterozygota” cellerna, jämfört med celler med två $K_v1.2$ (WT)-alleler. I celler med enbart en WT-allel (alltså en halv ”dos” WT) kunde drygt 50 procent av strömnivåerna detekteras. Detta tyder på att de muterade subenheterna även hindrar transporten av $K_v1.2$ (WT)-subenheter till cellytan. Studier med flödescytometri bekräftade att muterade $K_v1.2$ -

” Mutationen orsakar därmed en dominant, multigenetisk funktionsförlust, vilket skulle kunna förklara den elektriska obalans som ligger till grund för patientens epilepsi.



Figur 2: Muterade $K_v1.2$ -subenheter leder till en multigenetisk funktionsförlust genom att de reducerar transporten till cellytan av dess egna subenheter, friska vildtypsubenheter (WT) och $K_v1.4$ -subenheter som kodas av *KCNA4*.

subenheter till stor del hindrar $K_v1.2$ (WT)-subenheter från att ta sig till ytan. Vi observerade dock även att $K_v1.2$ (WT) till viss del hjälpte muterade $K_v1.2$ -subenheter att ta sig till ytan.

MUTATIONEN MINSKAR TRANSPORTEN AV EN ANNAN SUBENHET, $K_v1.4$, TILL YTAN

Vår hjärna är mycket komplex och nervcellerna som bygger upp den har stor mångfald. Nervcellernas funktion kan specialiseras bland annat genom att kombinera olika typer av jonkanaler, som ger dem möjlighet att kommunicera via unika elektriska impulser.⁵ $K_v1.2$ kan modifiera sin funktion genom att byta ut en eller flera av dess fyra subenheter med subenheter från andra jonkanalgener. De kan bilda dessa heterotetramerer med subenheter som tillhör samma jonkanalfamilj (K_v1 -familjen), men som har andra egenskaper. Ett intressant exempel är $K_v1.4$, som bland annat mycket effektivt kan transporteras till cellens yta.⁶ Vi spekulerade att $K_v1.4$ -subenheter skulle kunna rädda transporten av de muterade $K_v1.2$ -subenheter till cellmembranet. Vi kunde till viss del observera detta med elektrofysiologi- och flödescytometristudier. Däremot visade flödescytometrin samtidigt att $K_v1.4$ -subenheter till stor utsträckning hindras från att

transporteras till cellytan när muterade $K_v1.2$ -subenheter är närvarande.

SLUTSATS

En patient med epilepsi upptäcktes ha en punktmutation i *KCNA2* som kodar för den spänningkänsliga kaliumjonkanalen $K_v1.2$. För att utreda huruvida mutationen är av signifikans och etablera en genotyp-fenotypkorrelation, studerade vi effekten av mutationen *in vitro*. Funktionella, elektrofysiologiska, studier visade initialt en total avsaknad av kaliumströmmar. Vidare utredning visade att detta berodde på att muterade jonkanalerna inte transporterades till ytan, en markant funktionsförlust. Vid imitering av patientens heterozygota tillstånd såg vi dessutom att muterade $K_v1.2$ -subenheter minskar strömmar från $K_v1.2$ (WT) genom att hindra dem från att transporteras till cellytan. Vi kunde även visa att muterade $K_v1.2$ -subenheter hindrade en annan subenhet från samma familj, $K_v1.4$, från att transporteras till cellytan. Vi spekulerar att detta även kan påverka andra subenheter inom K_v1 -familjen. Sammanfattningsvis hindrar mutationen transporten till cellytan av sina egna subenheter, $K_v1.2$ (WT)-subenheter samt andra besläktade $K_v1.4$ subenheter [Figur 2]. Mutationen orsakar därmed en dominant, multigenetisk funktionsförlust, vilket skulle kunna förklara den elektriska obalans som ligger till grund för patientens epilepsi.



MICHELLE NILSSON

Doktorand vid Institutionen för biomedicinska och kliniska vetenskaper, Linköpings universitet
michelle.nilsson@liu.se

REFERENSER

1. Nilsson M, Lindström SH, Kaneko M, Wang K, Minguez-Viñas T, Angelini M, Steccanella F, Holder D, Ottolia M, Olcese R, Pantazis A. An epilepsy-associated K V 1.2 charge-transfer-center mutation impairs K V 1.2 and K V 1.4 trafficking. *Proc Natl Acad Sci* 2022; 119:e2113675119. doi:10.1073/PNAS.2113675119.
2. Masnada S, Hedrich UBS, Gardella E, Schubert J, Kaiwar C, Klee EW, Lanpher BC, Gavrilova RH, Synofzik M, Bast T, et al. Clinical spectrum and genotype-phenotype associations of *KCNA2*-related encephalopathies. *Brain* 2017; 140:2337–2354. doi:10.1093/brain/awx184.
3. Hedrich UBS, Lauxmann S, Wolff M, Synofzik M, Bast T, Binelli A, Serratos JM, Martínez-Ulloa P, Allen NM, King MD, et al. 4-Aminopyridine is a promising treatment option for patients with gain-of-function *KCNA2*-encephalopathy. *Sci Transl Med* 2021; 13:1-14. doi:10.1126/scitranslmed.aaz4957.
4. Long SB, Tao X, Campbell EB, MacKinnon R. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 2007; 450:376–382. doi:10.1038/nature06265.
5. Bean BP. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:451–465. doi:10.1038/nrn2148.
6. Manganas LN, Trimmer JS. (2000). Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J Biol Chem* 2000; 275:29685–29693. doi:10.1074/jbc.M005010200.