

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук

На правах рукописи

ЗАЙЦЕВА

Анастасия Константиновна

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ НАТРИЕВЫХ
КАНАЛОВ ПРИ КАНАЛОПАТИЯХ

1.5.5. Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Жоров Борис Соломонович

Санкт-Петербург

2024

Оглавление

Список сокращений	6
1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность исследования.....	7
Цель и задачи исследования.....	10
Основные положения, выносимые на защиту.....	11
Научная новизна исследования	11
Личный вклад автора	12
Теоретическая и практическая значимость работы.....	12
Апробация работы.....	13
Список публикаций по теме диссертации	13
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
2.1. Потенциал-зависимые ионные каналы	16
2.2. Потенциал-зависимые натриевые каналы	18
2.3 Структура Na_v	21
2.3.1. Трехмерная структура Na_vAb	22
2.3.2. Структура эукариотических Na_v	27
2.4. Гейтинг Na_v , проводимость и селективность	30
2.4.1. Потенциал-зависимая активация.....	31
2.4.2. Быстрая инактивация.....	32
2.4.3. Медленная инактивация	33
2.4.4. Ионная проводимость и селективность	34
2.5. Методы исследования Na_v	35
2.6. Потенциал-зависимые натриевые каналы сердца.....	37
2.6.1. Субъединичный состав $Na_v1.5$	39

2.6.2. Жизненный цикл Nav1.5.....	39
2.6.3. Дифференциальная экспрессия Nav1.5 в сердце	41
2.6.4. Функции Nav1.5.....	42
2.6.5. Структурные особенности Nav1.5	45
2.7. Синдромы, ассоциированные с вариантами в SCN5A.....	46
2.7.1. LQT3	48
2.7.2. Синдром Бругада.....	48
2.7.3. Смешанные синдромы	49
2.8. Физиологические механизмы развития натриевых каналопатий	51
2.8.1. Мутации, ассоциированные с синдромом LQT3	55
2.8.1.1. Увеличение постоянного тока	57
2.8.1.2. Нарушение стационарной инактивации	58
2.8.1.3. Ускорение восстановления из инактивированного состояния.....	58
2.8.1.4. Повышение пиковой плотности натриевого тока.....	59
2.8.1.5. Комплексное изменение функциональных характеристик	59
2.8.2. Мутации, ассоциированные с синдромом Бругада	65
2.8.2.1. Уменьшение плотности тока.....	66
2.8.2.2. Нарушение стационарной активации.....	69
2.8.2.3. Усиление стационарной инактивации	69
2.8.2.4. Усиление медленной и промежуточной инактивации	70
2.8.2.5. Замедление восстановления из инактивированного состояния.....	71
2.8.2.6. Комплексное изменение функциональных характеристик	71
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	74
3.1. Клинические данные.....	74

3.2. Генетический анализ, мутагенез и гетерологическая система экспрессии	74
3.3. Электрофизиология.....	75
3.4. Анализ данных.....	76
3.5. Статистический анализ.....	78
3.6. Молекулярное моделирование.....	79
3.6.1. <i>In Silico</i> Деактивация ПЧД-III.....	80
3.6.2. Моделирование ДП в открытом и закрытом состояниях	81
3.6.3. Моделирование ПЧД в состоянии покоя.....	82
3.6.4. Обозначения и визуализация остатков	82
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	83
4.1. Функциональная характеристика и структурная интерпретация генетического варианта $Na_v1.5-Y^{739}D$	83
4.1.1. Фенотипическая характеристика пациента и идентификация генетического варианта $Y^{739}D$	83
4.1.2. Биофизическая характеристика канала $Na_v1.5-Y^{739}D$	85
4.1.3. Контакты Y^{739} и $Y^{739}D$ в моделях $hNa_v1.5$	90
4.2. Функциональная характеристика и структурная интерпретация генетического варианта $Na_v1.5-A^{1294}G$	92
4.2.1. Фенотипическая характеристика и генетические данные	92
4.2.2. Биофизическая характеристика канала $Na_v1.5-A^{1294}G$, экспрессированного в клетках линии СНО-К1	93
4.2.3. Биофизическая характеристика канала $Na_v1.5-A^{1294}G$, экспрессированного в клетках линии НЕК293-Т	97
4.3. Исследование пути передачи сигнала между ПЧД-III и IVP2-S6.....	102
4.3.1. Интерфейс между IVP2-S6 и ПЧД-III в крио-ЭМ структурах	103

4.3.2. Интерфейс между ПЧД-III и IVP2-S6 в hNav1.5 является местом концентрации мутаций, ассоциированных с аритмиями	108
4.3.3. Биофизические характеристики WT и мутантных каналов.....	110
4.3.4. <i>In Silico</i> Деактивация ПЧД-III с помощью солевого моста E ¹²⁹⁵ :R ¹⁷³⁹ .	118
4.3.5. Электростатические потенциалы в интерфейсе ПЧД-III/ДП-IV, специфичные для определённых состояний канала	123
4.3.6. Возможные механизмы передачи движений от ПЧД-III к инактивационным воротам.....	130
4.4. Потенциально повреждающие варианты в hNav1.5	131
5. ОБСУЖДЕНИЕ	137
6. ВЫВОДЫ	147
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	148

Список сокращений

BrS – синдром Бругада

I_{Na} – натриевый ток

$I_{Na,L}$ – поздний натриевый ток

LQT3 – синдром удлинённого интервала QT 3го типа

Na_v - потенциал-зависимые натриевые каналы

$Na_v1.5$ - потенциал-зависимые натриевые каналы сердца

Na_vAb – потенциал-зависимые натриевые каналы *Arcobacter Butzleri*

ВД – вставочные диски

ДП – домен поры

ЛМ – латеральная мембрана

МКМ – Монте-Карло минимизация

ПД – потенциал действия

ПНСП - прогрессирующее нарушение сердечной проводимости

ПЧД – потенциал-чувствительный домен

СФ - Селективный фильтр

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ионные каналы играют ключевую роль в нормальной физиологии и патологии сердца. В физиологии ионные каналы контролируют процессы деполяризации и реполяризации кардиомиоцитов, что определяет их электрическую активность и возможность сокращения. Термин каналопатии объединяет наследственные и приобретённые заболевания различной этиологии, характеризующиеся нарушениями активности ионных каналов разных типов. Наследственные натриевые каналопатии могут быть ассоциированы с нарушением экспрессии гена *SCN5A* (кодирующего порообразующую субъединицу натриевого канала $Na_v1.5$), изменением интенсивности транспорта и интернализации $Na_v1.5$, а также изменением его электрофизиологических свойств. Перечисленные изменения могут быть следствиями мутаций в гене *SCN5A* и в генах, кодирующих белки, регулирующие активность $Na_v1.5$. Синдром удлинённого интервала QT (LQT) ассоциирован с усилением активности $Na_v1.5$ (gain-of-function), в то время как синдром Бругада (BrS), прогрессирующее нарушение сердечной проводимости (ПНСП), синдром слабости синусового узла и другие заболевания, ассоциированные с уменьшением активности натриевых каналов (loss-of-function). Изменение активности $Na_v1.5$ влияет на физиологию как кардиомиоцитов, так и всего сердца, что отражается на проводимости, возбудимости и других свойствах миокарда. Таким образом, понимание роли ионных каналов в физиологии и патологии сердца имеет важное значение для разработки новых методов лечения сердечных заболеваний и для улучшения диагностики сердечных аритмий.

Исследования функциональной активности мутантных каналов $Na_v1.5$ на модели гетерологической системы экспрессии (ооциты *Xenopus* 1, клеточные линии HEK293, CHO-K1 и др.) существенно расширили понимание молекулярных механизмов дисфункции натриевых каналов миокарда в физиологии и патологии сердца, включая развитие аритмий. Достоинством

данных модельных систем является возможность изолированно рассмотреть точечный эффект аминокислотной замены на электрофизиологические характеристики стационарной активации, стационарной инактивации, развития медленной инактивации, восстановления из инактивированного состояния. Анализ изменений на клеточном уровне является первым шагом к пониманию системных механизмов развития наследственных нарушений сердечного ритма у человека. За последние десятилетия накоплено много знаний о функциональных механизмах развития натриевых каналопатий, однако взаимосвязь между локализацией мутации, спектром изменений электрофизиологических характеристик канала и наблюдаемым у пациента клиническим фенотипом до конца неизучена.

На сегодняшний день только 10% вариантов гена *SCN5A*, обнаруженных у пациентов с наследственной патологией сердца, охарактеризованы функционально. Поэтому необходимо проводить исследования молекулярно-физиологических механизмов развития аритмий, а также разрабатывать новые подходы, которые позволят предсказывать патогенность конкретных мутаций. Большой прогресс в понимании структурно-молекулярных механизмов аритмий может быть достигнут путём интеграции теоретического и экспериментального подходов. Например, новые миссенс-варианты гена *SCN5A*, обнаруженные у пациентов, можно исследовать электрофизиологически на моделях гетерологической системы экспрессии и сделать выводы о влиянии изменений характеристик $Na_v1.5$ на физиологию кардиомиоцитов. С помощью анализа трёхмерных структур $Na_v1.5$, можно изучить межсегментные контакты мутированной аминокислоты. На основании этого анализа можно разработать структурную гипотезу о влиянии аминокислотной замены на стабильность молекулы ионного канала в закрытом, открытом или инактивированных состояниях. Предложенные гипотезы можно затем проверить экспериментально с помощью методов электрофизиологии.

Порообразующая α -субъединица каналов $Na_v1.5$ образована одной полипептидной цепью, в составе которой выделяют четыре повтора (I-IV). Каждый повтор состоит из шести трансмембранных сегментов (S1-S6), где сегменты S1-S4 образуют потенциал-чувствительный домен (ПЧД), а сегменты S5-S6, соединенные Р-петлей соспиралями P1 и P2, формируют четверть домена поры (ДП). Мы обозначаем остаток однобуквенным кодом с номером в верхнем индексе. Повтор и сегмент канала, в котором локализован остаток, указан перед номером остатка и отделен нижним подчеркиванием. Например, II S1-S2_Y⁷³⁹D обозначает замену тирозина на аспарагиновую кислоту в положении 739, локализованную в линкере S1-S2 повтора II канала.

В настоящей работе впервые проиллюстрированы преимущества подобного подхода на примере мутаций II S1-S2_Y⁷³⁹D и III S3-S4_A¹²⁹⁴G, обнаруженной у пациента со смешанным клиническим фенотипом. Охарактеризованы электрофизиологические свойства мутаций Y⁷³⁹D и A¹²⁹⁴G и предложено структурное обоснование наблюдаемых изменений функциональной активности $Na_v1.5$ при данных мутациях. Предложена структурная гипотеза о существовании межсегментного контакта E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹, изменение свойств которого рассматривается в качестве структурного обоснования наблюдаемых функциональных изменений у $Na_v1.5$ -A¹²⁹⁴G. Экспериментально показано взаимодействие между заместителями E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹. В ходе дальнейшей теоритической работы были проанализированы варианты неизвестной клинической значимости и их контакты. На основании структурных данных был предложен список потенциально-повреждающих вариантов. Таким образом, полученные данные имеют не только теоретическую значимость для развития фундаментальных представлений о структурной организации и функционировании $Na_v1.5$, но и практическую значимость в области медицинской диагностики наследственной патологии сердца.

Цель и задачи исследования

Цель исследования - изучить структурно-молекулярные механизмы развития натриевых каналопатий миокарда, ассоциированных с генетическими вариантами, идентифицированными у пациентов с аритмогенными синдромами.

Для достижения цели были поставлены следующие основные задачи:

1. Охарактеризовать изменения натриевого тока, вызванные мутацией $Y^{739}D$, обнаруженной у пациента с синдромом Бругада, в клетках линии HEK293-T с экспрессированными $Na_v1.5-WT$ или $Na_v1.5-Y^{739}D$.
2. Описать изменения натриевого тока, вызванные генетическим вариантом $A^{1294}G$, обнаруженным у пациента со смешанным клиническим фенотипом, в клетках линии HEK293-T, с экспрессированными $Na_v1.5-WT$ или $Na_v1.5-A^{1294}G$.
3. Экспериментально проверить гипотезу о взаимодействии заместителей E^{1295} и R^{1739} , локализованных, соответственно, во внеклеточных линкере III3-S4 и петле IVP2-S6. Исследовать электрофизиологические характеристики мутантных каналов $E^{1295}R$, $R^{1739}E$ и $E^{1295}R/R^{1739}E$ на модели гетерологической системы экспрессии.
4. На основе анализа структуры $Na_v1.5$ предложить список потенциально повреждающих мутаций для последующих экспериментальных исследований.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мутации $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$ и $\text{Na}_v1.5\text{-A}^{1294}\text{G}$ в натриевом канале миокарда $\text{Na}_v1.5$ приводят к уменьшению его активности, что лежит в основе развития наследственной патологии сердца.
2. Физиологические свойства исследованных мутантных каналов $\text{Na}_v1.5$ зависят от ряда конкретных междоменных и межсегментных контактов.
3. Дисфункция ряда мутантных каналов сердца $\text{Na}_v1.5$ может быть предсказана путём анализа специфических межсегментных контактов в его трёхмерной структуре.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования потенциал-зависимых натриевых каналов при каналопатиях обусловлена тем, что в настоящей работе впервые описаны функциональные механизмы развития аритмогенных синдромов, ассоциированных с генетическими вариантами канала Y^{739}D и A^{1294}G и предложено структурное обоснование наблюдаемых изменений функциональной активности $\text{Na}_v1.5$. Полученные результаты расширяют наше понимание функционирования $\text{Na}_v1.5$ в норме и патологии, в частности, о роли взаимодействий между разными сегментами $\text{Na}_v1.5$. Контакт $\text{E}^{1295}:\text{R}^{1739}$ отсутствует в крио-ЭМ структуре, где домен поры находится в инактивированном состоянии, а ПЧД находятся в активированных состояниях. На основании теоретических моделей, где ПЧД находятся в состояниях покоя, было выдвинуто предположение о существовании контакта $\text{E}^{1295}:\text{R}^{1739}$ и получено экспериментальное подтверждение существования взаимодействия между этими заместителями. Изменение контакта $\text{E}^{1295}:\text{R}^{1739}$ может быть причиной наблюдаемых функциональных изменений у $\text{Na}_v1.5\text{-A}^{1294}\text{G}$. Впервые получены свидетельства в пользу существования пути передачи сигнала от потенциал-чувствительного домена ПЧД-III к петле IVP2-S6 и роли этого взаимодействия в регуляции перехода канала в состояния быстрой и медленной инактивации. Предложены структурные обоснования

возможной патогенности генетических вариантов канала $Na_v1.5$, которые в базе данных ClinVar описаны как варианты неизвестной клинической значимости.

Личный вклад автора

Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались автором совместно с научным руководителем. Автор лично использовала молекулярно-биологические методики (сайт-специфический мутагенез), работала с клеточными культурами, проводила все электрофизиологические эксперименты, представленные в данной работе, находила и обобщала литературные данные по теме диссертации, статистически обработала и проанализировала полученные результаты и готовила публикации по результатам исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Каналопатии – это редкие наследственные заболевания, ассоциированные с мутациями в генах, кодирующих ионные каналы. В базе данных ClinVar имеются сведения о более чем 2000 вариантах гена SCN5A, ассоциированных с развитием наследственных аритмий. Более 1500 из этих вариантов являются вариантами неизвестной клинической значимости. Поиск подходов, позволяющих установить или предсказать патогенность конкретных мутаций, является важной проблемой современной медицины. Полученные данные вносят существенный вклад в фундаментальные представления о роли внеклеточных линкеров IIS1-S2 и IIIS3-S4 в гейтинге канала $Na_v1.5$ и динамике межсегментных контактов в структуре $Na_v1.5$.

В ходе дальнейшей теоретической работы были проанализированы варианты неизвестной клинической значимости и межсегментные контакты соответствующих аминокислот. На основании структурных данных предложен список потенциально повреждающих вариантов. Таким образом, полученные данные имеют как теоретическую значимость для развития представлений о структурной организации и функционировании

канала $Na_v1.5$, так и практическое значение для диагностики наследственных патологий сердца.

Результаты исследования демонстрируют преимущества комбинированного подхода, использующего методы электрофизиологии и теоретической биофизики и возможность его последующего применения в клинической практике для диагностики и стратификации риска у пациентов с наследственными аритмиями.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах из международной базы Scopus и из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ. Основные положения работы были представлены на Конгрессе Европейского общества кардиологии (ESC Congress, Paris, 2019), Международном Съезде Физиологов СНГ (Дагомыс, 2019), IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), Алмазовском Молодёжном Медицинском Форуме (Санкт-Петербург, 2022), Конгрессе CRISPR-2023.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи, опубликованные в рецензируемых изданиях, индексируемых в базе данных Scopus и перечне ВАК

1. Зайцева, А.К. Биофизические механизмы натриевых каналопатий в миокарде: синдром удлиненного интервала QT / А.К. Зайцева, А.В. Карпушев, Б.С. Жоров [и др.]// Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. Т.105(1). –С. 3-23.
2. Zaytseva, A.K. Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype. / A.K. Zaytseva, A.V. Karpushev, A.M. Kiselev, E.N. Mikhaylov, D.S. Lebedev, B.S. Zhorov, A.A. Kostareva // Biochem Biophys Res Commun. – 2019. – Vol. 516(3). – P. 777-783.
3. Khudiakov, A. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling in iPSC-derived cardiomyocytes

- generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic variants in plakophilin 2 gene. / A. Khudiakov, A. Zaytseva, K. Perepelina, N. Smolina, T. Pervunina, E. Vasichkina, A. Karpushev, A. Tomilin, A. Malashicheva, A. Kostareva // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* . – 2020. –Vol. 1866(11). – P. 165915.
4. Gusev, K. Impact of the DSP-H1684R Genetic Variant on Ion Channels Activity in iPSC-Derived Cardiomyocytes. /K. Gusev, A. Khudiakov, A. Zaytseva, K. Perepelina, S. Makeenok, E. Kaznacheeva, A.Kostareva // *Cell Physiol Biochem.* – 2020. –Vol. 54(4). – P. 696-706.
 5. Zaytseva, A.K. Possible interactions of extracellular loop IVP2-S6 with voltage-sensing domain III in cardiac sodium channel. / A.K. Zaytseva, A.S. Boitsov, A.A. Kostareva, B.S. Zhorov// *Front Pharmacol.* – 2021; –Vol. 12. – P. 742508.
 6. Korkosh, V.S. Intersegment contacts of potentially damaging variants of cardiac sodium channel. / V.S. Korkosh, A.K. Zaytseva, A.A. Kostareva, B.S. Zhorov // *Front Pharmacol.* – 2021; –Vol. 12. – P. 756415.
 7. Zaytseva, A.K. Characterization of the novel heterozygous SCN5A genetic variant Y739D associated with Brugada syndrome / A.K. Zaytseva, A.M. Kiselev, A.S. Boitsov, Y.V. Fomicheva, G.S. Pavlov, B.S. Zhorov, A.A. Kostareva // *Biochem Biophys Rep.* – 2022. – Vol.30. –P. 101249.
 8. Perepelina, K. LMNA mutation leads to cardiac sodium channel dysfunction in the Emery-Dreifuss muscular dystrophy patient. / K. Perepelina, A. Zaytseva, A. Khudiakov, I. Neganova, E. Vasichkina, A. Malashicheva and A. Kostareva// *Front. Cardiovasc.* – 2022. –Vol.9. – P. 932956.

Тезисы конференций

1. Zaytseva, A.K. Two novel mutations in SCN5A gene cause enhanced inactivation and lead to Brugada syndrome/ A.K. Zaytseva, A.V. Karpushev, Y. Fomicheva, E.S. Vasichkina, E.N. Michaylov, A.A. Kostareva, B.S. Zhorov // European Heart Journal 40(S1):P1597 2019
2. Зайцева, А.К. Стабилизация медленно-инактивированного состояния канала Nav1.5 как механизм развития синдрома Бругада при мутации Y739D/ А.К. Зайцева, Ю.В. Фомичёва, Е.Н. Михайлов, Е.С. Васечкина, Б.С. Жоров, А.А. Костарева // Acta Naturae. 2019.
3. Худяков, А.А. Изучение молекулярных механизмов аритмогенной кардиомиопатии на модели ипск-кардиомиоцитов: фокус на GSK3B киназу/ А.А. Худяков, А.К. Зайцева, К.И. Перепелина, К.О. Гусев, П.Е. Клаузен, А.В. Карпушев, А.Н. Томилин, А.Б. Малашичева, А.А. Костарева // Материалы IV Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. Москва, 20–23 ноября 2019 года
4. Худяков, А.А. Изучение молекулярных механизмов аритмогенной кардиомиопатии на модели ИПСК-кардиомиоцитов: фокус на GSK3B киназу. / А.А. Худяков, А.К. Зайцева, К.И. Перепелина, К.О. Гусев, П.Е. Клаузен, А.В. Карпушев, А.Н. Томилин, А.Б. Малашичева, А.А. Костарева // Гены и Клетки. 2019; 14 (S):250-251.
5. Зайцева, А.К. Биофизические механизмы нарушения проводимости сердца, ассоциированные с генетическим вариантом S805L в гене SCN5A. / А.К. Зайцева, Б.С. Жоров, А.А. Костарева // Гены и Клетки. 2023; материалы международного Конгресса CRISPR-2023: 15-16

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Потенциал-зависимые ионные каналы

Потенциал-зависимые ионные каналы – одно из самых многочисленных суперсемейств белков, обеспечивающих передачу сигнала (Yu and Catterall, 2003). Белки этого суперсемейства кодируются более чем 143 генами в геноме человека и являются третьим по величине семейством клеточных сигнальных молекул после рецепторов, сопряжённых с G-белками и киназ (Yu and Catterall, 2003). Эти каналы играют ключевую роль в различных фазах потенциала действия (ПД) возбудимых клеток и необходимы для передачи сигнала в ходе генерации нервного импульса, мышечного сокращения и секреции (Catterall, 2023). Представители потенциал-зависимых ионных каналов были обнаружены у прокариотических организмов и в геноме вирусов (Martinac et al., 2008), а также имеют важное значение в эволюции животных.

Суперсемейство потенциал-зависимых ионных каналов характеризуется способностью быстро переходить между конформационными состояниями в ответ на изменение мембранного потенциала. Классификация семейств, входящих в состав потенциал-зависимых ионных каналов, основана на типе проводимого каналами иона; так выделяют потенциал-зависимые натриевые (Na_v), кальциевые (Ca_v) и калиевые каналы (K_v) (Рисунок 1). Дисфункция вышеперечисленных каналов может привести к развитию наследственных каналопатий, включая эпилепсию, хронические болевые синдромы, заболевания сердечно-сосудистой системы, расстройства аутистического спектра, шизофрению и болезнь Альцгеймера (Catterall, 2023).

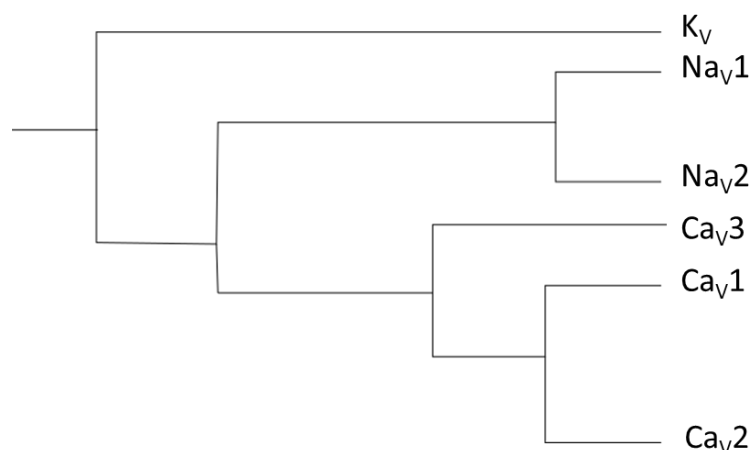


Рисунок 1 – Упрощённое филогенетическое древо, отражающее молекулярную эволюцию потенциал-зависимых ионных каналов.

Переработано по (Arendt, 2020).

Потенциал-зависимые ионные каналы имеют общие структурные особенности: модульная архитектура; ионоселективная пора с высококонсервативными остатками, выстилающими пору каналов с аналогичной селективностью; типичные принципы воротного механизма (гейтинга) с наличием заряженного мембранного сенсора напряжения (Yellen, 1998) и вспомогательные субъединицы, которые регулируют мембранный транспорт и активность (Catterall, 2000).

Начиная с 1998 года с помощью рентгеновской кристаллографии получены структуры разных ионных каналов прокариот и эукариот. После 2016 года появились многочисленные крио-ЭМ структуры более сложных каналов, в том числе асимметричных каналов эукариот (Yan et al., 2017).

Регистрация ионного тока, клеточная и тканевая электрофизиология генерируют множество данных, которые в совокупности с молекулярным и белковым химическим анализом облегчают детальную функциональную характеристику активности ионных каналов. Прогресс в изучении ионных каналов во многом был обеспечен разработкой метода образования плотного контакта с клеточной мембраной с высоким сопротивлением и низким уровнем шума (gigaseal), позволяющий производить запись тока через ионные

каналы с высокой точностью с небольших участков мембраны ионных каналов мембраны с использованием стеклянных микроэлектродов (метод patch-clamp) (Hamill et al., 1981). Эти исследования необходимы для нашего понимания влияния дисфункции ионных каналов на физиологические процессы. Кроме того, эти методы способны выявить признаки нарушения функции каналов и определить степень их участия в развитии патологии.

2.2. Потенциал-зависимые натриевые каналы

Потенциал-зависимые натриевые каналы (Na_v) обнаружены у прокариотических и эукариотических организмов (Рисунок 2). В различных типах возбудимых клеток натриевые каналы генерируют потенциалы действия в ответ на начальную деполяризацию мембраны (Gardill et al., 2020). Na_v играют решающую роль в передаче электрических сигналов и контроле активности периферической и центральной нервной систем (Catterall et al., 2005). К настоящему времени идентифицировано множество генетических вариантов в генах, кодирующих Na_v , которые ассоциированы с развитием различных каналопатий (Huang et al., 2017).

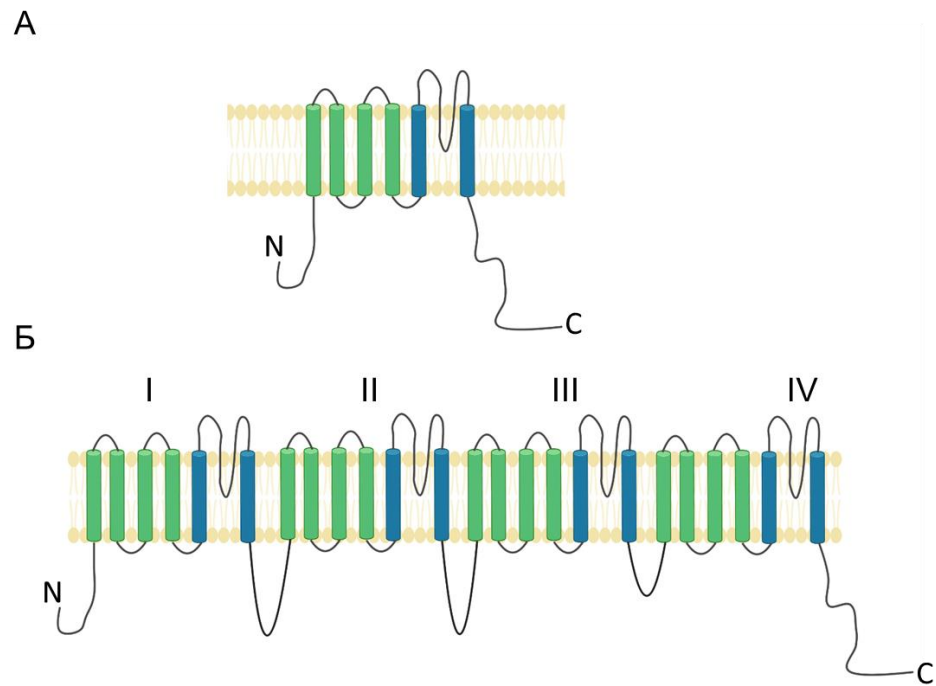


Рисунок 2 – Мембранная топология потенциал-зависимых натриевых каналов. А. Мембранная организация прокариотических потенциал-зависимых натриевых каналов. Канал Na_vAb представляет собой гомотетрамер, образованный четырьмя идентичными субъединицами, каждая из которых состоит из шести трансмембранных доменов. Б. Мембранная топология альфа-субъединицы эукариотических Na_v . $Na_v1.x$ представляют собой псевдогетеротетрамеры. В составе альфа-субъединицы выделяют 4 гомологичных домена (I-IV. Сегменты S1-S4 (зелёный цвет) образуют потенциал-чувствительный домен, а сегменты S5-S6 (синий цвет). домен поры. Изображение создано с помощью сервиса BioRender.com.

У млекопитающих существует десять различных изоформ α -субъединиц, $Na_v1.1$ – $Na_v1.9$; Na_x , которые экспрессируются тканеспецифично (Рисунок 3). Идентичность первичных последовательностей среди изоформ $Na_v1.1$ – 1.9 составляет 55-85% (Ahern et al., 2016). Каналы $Na_v1.1$ – 1.3 (кодируемые генами *SCN1A*–*SCN3A*) преимущественно экспрессируются в центральной нервной системе (ЦНС), $Na_v1.4$ (*SCN4A*) в скелетных мышцах,

Nav1.5 (*SCN5A*) в сердце, Nav1.6 (*SCN8A*) в ЦНС и периферической нервной системе (ПНС), Nav1.7, 1.8 и 1.9 (*SCN9A*, *SCN10A*, *SCN11A*) в основном экспрессируются в ПНС (Catterall, 2023).

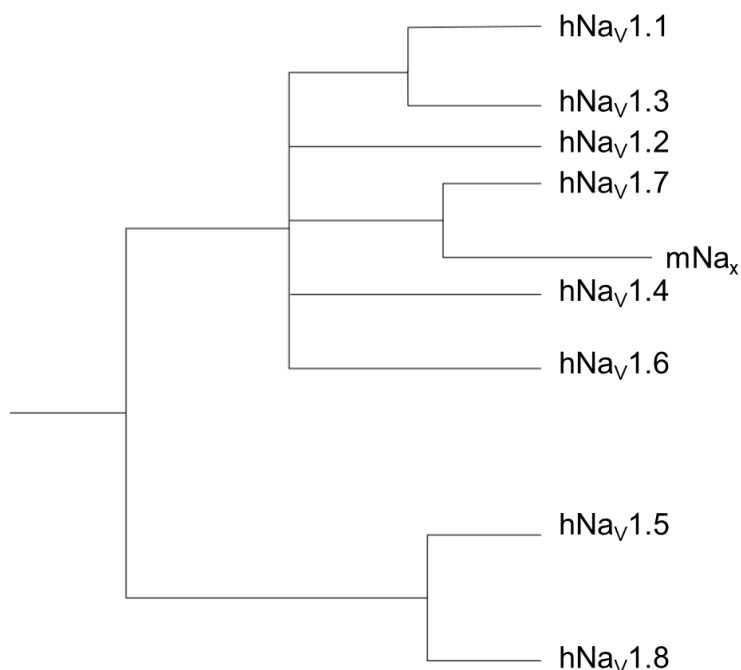


Рисунок 3 – Упрощённое филогенетическое дерево, отражающее молекулярную эволюцию потенциал-чувствительных натриевых каналов.

Переработано по (Arendt, 2020).

Nav-каналы млекопитающих состоят из одной α - и одной или двух β -субъединиц. Четыре гена кодируют пять различных β -субъединиц (Nav β 1, 1B, 2, 3 и 4, *SCN1B–SCN4B*), каждая из которых имеет один трансмембранный домен и большой иммуноглобулино-подобный домен (O'Malley and Isom, 2015). β -субъединицы экспрессируются в различных типах тканей, и участвуют в регуляции экспрессии, внутриклеточной локализации, биофизических и фармакологических свойств α -субъединиц (O'Malley and Isom, 2015).

На сегодняшний день известно более 50 заболеваний человека, которые ассоциированы с aberrантной активностью Nav-каналов (Huang et al., 2017). Генетические варианты в генах, кодирующих субъединицы каналов Nav, были

идентифицированы у пациентов с эпилепсией ($Na_v1.1-1.3$, $Na_v1.6$), болевыми синдромами ($Na_v1.7-1.9$), миотонией и периодическим параличом ($Na_v1.4$), нарушениями сердечного ритма ($Na_v1.5$), судорожными расстройствами и когнитивными нарушениями ($Na_v1.1$, 1.2 , 1.3 , 1.6) (George, 2005).

Таким образом, изучение дисфункции Na_v -каналов важно для выяснения физиологической роли Na_v -каналов в норме и при патологии, и при разработке терапевтических подходов (Ahern et al., 2016). Na_v являются мишенями для природных токсинов, различных фармакологических агентов, и инсектицидов и рассматриваются в качестве перспективных фармакологических мишеней для лечения наследственных каналопатий (Ahern et al., 2016).

2.3 Структура Na_v

В течение долгого времени исследование структурных механизмов функционирования Na_v и разработка фармакологических модуляторов, специфически действующих на конкретные изоформы, была сложной задачей из-за отсутствия кристаллических и крио-ЭМ структур комплексов белок-лиганд и высокой степени консервативности аминокислотных последовательностей поробразующей субъединицы каналов Na_v . Однако постепенно появлялись данные о рентгеновских (Payandeh et al., 2011; McCusker et al., 2012; Payandeh et al., 2012; Zhang et al., 2012b) и криоэлектронных (крио-ЭМ) структурах Na_v (Shen et al., 2017; Yan et al., 2017; Pan et al., 2018; Shen et al., 2018; Pan et al., 2019; Shen et al., 2019). Прокариотические каналы важны для понимания структурных особенностей эукариотических Na_v (Payandeh et al., 2011; McCusker et al., 2012; Payandeh et al., 2012; Zhang et al., 2012b; Shaya et al., 2014; Sula et al., 2017; Wisedchaisri et al., 2019). Следует учитывать, что существует ряд фундаментальных отличий прокариотических каналов от эукариотических: например, отсутствие асинхронного гейтинга и быстрой инактивации (Ren et al., 2001; Kuzmenkin et al., 2004). Рентгеновские структуры закрытых прокариотических натриевых каналов Na_vAb (Payandeh et al., 2011), Na_vRh (Zhang et al., 2012a) и Na_vMs

(Lenaeus et al., 2017; Sula et al., 2017) подтвердили общий характер фолдинга натриевых и калиевых каналов и выявили специфические особенности их организации (Payandeh et al., 2011).

2.3.1. Трехмерная структура Na_VAb

Открытие Na_V у прокариот позволило проводить структурные исследования данного типа каналов (Ren et al., 2001). Na_VAb (Na_V *Arcobacter Butzleri*) представляет собой белок из 285 аминокислотных остатков (Payandeh et al., 2011) и функционирует в составе гомотетрамера из субъединиц, сходных по структуре с одним повтором Na_V млекопитающих (Рисунок 4 А) (Ren et al., 2001; Payandeh and Minor, 2015). Если смотреть с внеклеточной стороны, центральная пора окружена четырьмя субъединицами, каждая из которых образована сегментами S5 и S6 и P-петлями между ними (Рисунок 4А, синий). Четыре потенциал-чувствительных домена, состоящие из трансмембранных сегментов S1-S4, расположены на периферии структуры почти симметрично (Рисунок 4А, зеленый). Если смотреть со стороны мембраны, линкеры S4-S5 в каждом домене выглядят как альфа-спиральные сегменты, расположенные параллельно плоскости мембраны (Рисунок 4Б, красный). Четыре субъединицы организованы в трёхмерную структуру, так что каждый потенциал-зависимый домен ковалентно связан с порообразующими сегментами соседней субъединицы (Payandeh et al., 2011). Эта организация обеспечивает согласованную активацию и всех четырех субъединиц одновременно.

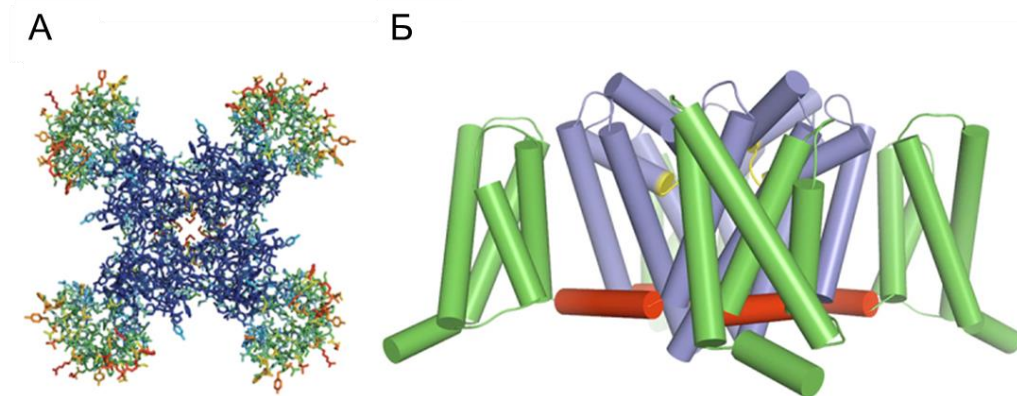


Рисунок 4 – Структура бактериального натриевого канала Na_vAb . А. Вид сверху элементов канала Na_vAb , окрашенных в соответствии с кристаллографическими температурными факторами основной цепи (от синего $<50 \text{ \AA}^2$ до красного $> 150 \text{ \AA}^2$). Домен поры в центре имеет жесткую кристаллическую структуру и поэтому окрашен в синий цвет. Четыре потенциал-чувствительных домена окружают пору и более подвижны, поэтому показаны в более теплых тонах. Б. Вид Na_vAb сбоку. Потенциал-чувствительный домен (S1-S4), зеленый; домен поры (S5, S6 и P-петля), синий; селективный фильтр, желтый; Линкер S4-S5, красный (Payandeh et al., 2011; Catterall, 2023).

Исходная структура Na_vAb выявила общую конструкцию сенсора напряжения и домена поры (Рисунок 5 (Payandeh et al., 2011)). Ключевые воротные заряды Arg, обозначенные R1-R4, расположены перпендикулярно мембране в сегменте S4. Структура сенсора напряжения предполагает, что он предназначен для перемещения воротных зарядов в сегменте S4 наружу и внутрь в ответ на изменения электрического поля и запуска конформационных изменений для открытия и закрытия поры (Payandeh et al., 2011). В полученной структуре сенсоры напряжения Na_vAb находились в активированной конформации.

Когда ион Na^+ из внеклеточного раствора приближается к поре, он попадает в широкий вестибюль, за которым следует узкий селективный

фильтр. Затем он выходит в большую заполненную водой центральную полость и в конечном итоге перемещается в цитозоль через ворота активации, образованные внутриклеточными концами четырех сегментов S6. В первой рентгеновской структуре Na_vAb пора находилась в закрытой конформации с четырьмя сегментами S6, прочно связанными друг с другом.

Структурная основа активации сенсора напряжения была выявлена путем сравнения структур высокого разрешения Na_vAb в состоянии покоя и активированном состоянии (Payandeh et al., 2011; Wisedchaisri et al., 2019). Происходит заметное перемещение сенсора напряжения (Рисунок 5 (Wisedchaisri et al., 2019)). Четыре линкера S4-S5 (Рисунок 5В, синий) окружают цитоплазматические половины сегментов S6 (Рисунок 5В, слева, красный). В активированном состоянии четыре линкера S4-S5 перемещаются на ~45° по часовой стрелке (Рисунок 5В, синий). В состоянии покоя отверстие активационных ворот, образованное внутриклеточными концами сегментов S6, полностью закрыто боковыми цепями четырех остатков I²¹⁷ (Рисунок 5Г, слева, красная штриховка), в то время как в открытом состоянии конформация их боковых цепей изменяется, оставляя путь диаметром 10,5 Å для проникновения ионов Na⁺ (Рисунок 5Г, справа, белый) (Wisedchaisri et al., 2019).

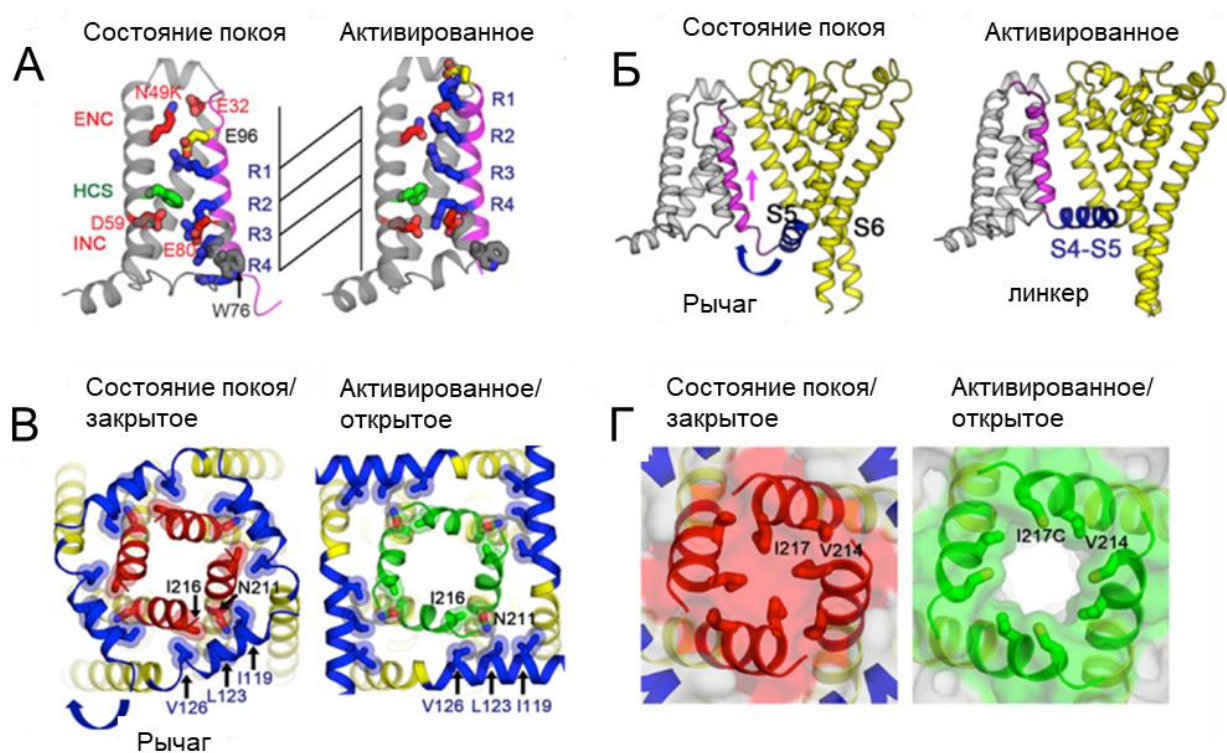


Рисунок 5 – Активация натриевых каналов и механизм закрытия пор Na_vAb . А. Движение воротного заряда. Четыре воротных заряда Arg, R1–R4 (синие); кластер внеклеточного отрицательного заряда (ENC) из E32 и N49 (К) и кластер внутриклеточного отрицательного заряда (INC) из E⁵⁹ и E⁸⁰ (красный); Phe в сайте гидрофобной перетяжки (HCS) (зеленый); а консервативные W⁷⁶ (серый) и E⁹⁶ (желтый) показаны в виде палочек. S4 (пурпурный) перемещается наружу на 11,5 Å, пропуская два воротных заряда через HCS. Сегмент S3 не показан. Б. Вид сбоку структур с фокусом на S4 (пурпурный) и линкере S4-S5 (синий), при этом сегменты S0-S3 показаны серым цветом, а поровый модуль - желтым. Сегмент S4 перемещается наружу через мембрану из состояния покоя в активированное состояние, тогда как сегменты S1–S3 остаются относительно неподвижными по отношению к мембране. Линкер S4-S5 действует как рычаг, который соединяет движение S4 для регуляции поры. В. Вид снизу (внутриклеточный) структур на (Б), S0–S4 для ясности опущен. Линкер S4-S5 (синий) претерпевает большие конформационные изменения, которые приводят к сжатию хомута вокруг сегментов S5

(желтый) и S6 (красный или зеленый) Потенциал-чувствительный домен в состоянии покоя и ослабляет хомут в активированном состоянии. Г. Объемная модель структур (В) при большом увеличении (Wisedchaisri et al., 2019; Catterall, 2023).

Ион Na^+ проходит через селективный фильтр с высокой напряженностью поля, создаваемой боковыми цепями четырех отрицательно заряженных остатков Glu (E_{177} , рисунок 6А, В (Payandeh et al., 2011) (Chakrabarti et al., 2013)). Взаимодействие с этим участком приводит к тому, что часть молекул воды из гидратной оболочки иона Na^+ вытесняется боковыми цепями Glu. Затем ион Na^+ перемещается через центральный и внутренний сайты связывания, которые образованы карбонилами основной цепи L^{176} и T^{175} (Рисунок 6Б (Payandeh et al., 2011)).

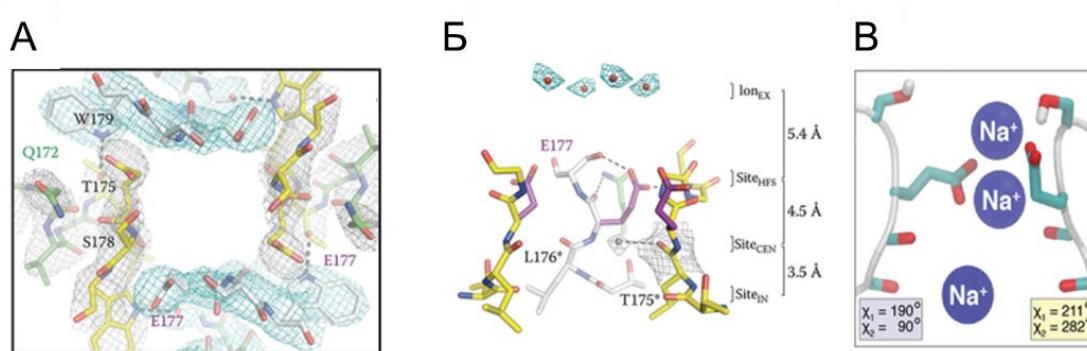


Рисунок 6 – Механизм натриевой проводимости и селективности. А. Вид сверху на ионоселективный фильтр, участок с высокой напряженностью поля, образованный четырьмя остатками E^{177} . Водородные связи между T^{175} и W^{179} обозначены серыми штрихами. Б. Ионоселективный фильтр, вид сбоку. Взаимодействия E^{177} (фиолетовый) с Q^{172} , S^{178} и основной цепью S^{180} показаны для одной субъединицы; предполагаемые катионы или молекулы воды (красные сферы). Электронная плотность вокруг L^{176} (серый) и связанная молекула воды показаны серой сеткой. Na^+ -координационные сайты: SiteHFS, SiteCEN и SiteIN. В. Погружение E^{177} . Движение Na^+ через ионоселективный фильтр, катализируемое движением внутрь (погружением) боковых цепей E^{177} через один изгиб торсионного угла (Payandeh et al., 2011; Chakrabarti et al., 2013; Catterall, 2023).

2.3.2. Структура эукариотических Na_v

Последовательность трансмембранных сегментов канала Na_v эукариот высоко консервативна (Gellens et al., 1992). Порообразующая α -субъединица служит для прохождения натриевого тока, и определяет такие свойства канала как селективность и проводимость. Структурная основа селективности принципиально отличается от таковой у K_v или прокариотических Na_v (Payandeh et al., 2011; McCusker et al., 2012). Гомология первичных последовательностей α -субъединиц млекопитающих составляет $>70\%$ (Bagal et al., 2013). Последовательность ДП высоко консервативна, в то время как

последовательности ПЧД этих каналов демонстрируют более высокую вариативность (Vetter et al., 2017).

В отсутствие рентгеновских и крио-ЭМ структур структур эукариотических Na_v большой прогресс в понимании структурной организации этих каналов был достигнут за счёт использования подходов молекулярной механики, в частности, гомологического моделирования. Основываясь на первой кристаллической структуре катионного канала KcsA (Doyle et al., 1998), Липкинд и Фоззард смоделировали центральную пору $Na_v1.4$, включающую S5, S6 и P-петли из каждого повтора (Lipkind and Fozzard, 2000). В наружном вестибуле находятся сайты связывания ТТХ и СТХ, а их гуанидиниевые группы располагаются ближе к центральной оси. В 2012 году Тихонов и Жоров построили гомологическую модель $Na_v1.4$ на основе Na_vAb с скорректированным выравниванием последовательностей и осуществили докинг ТТХ во внешнюю пору, объяснив имеющиеся экспериментальные данные (Tikhonov and Zhorov, 2012).

В 2017 году Шен и соавт. опубликовали первую крио-ЭМ структуру эукариотического Na_v (Na_vPaS) американского таракана (Shen et al., 2017; Shen et al., 2018). Эта группа впоследствии разрешила крио-ЭМ-структуры $Na_v1.1$ - $\beta4$ человека, $Na_v1.2$ - $\beta2$ человека, $Na_v1.4$ - $\beta1$ угря, $Na_v1.4$ - $\beta1$ человека, $Na_v1.5$ человека и $Na_v1.7$ - $\beta1$ человека и комплексы каналов с $\beta2$ (Yan et al., 2017; Pan et al., 2018; Pan et al., 2019; Shen et al., 2019; Li et al., 2021b; Pan et al., 2021). Структуры крысиного $Na_v1.5$ в комплексе с флекаинидом и токсином LqhIII также были опубликованы лабораторией Catterall (Jiang et al., 2020; Jiang et al., 2021c). Эти исследования значительно продвинули понимание структурных основ ионной селективности, потенциал-чувствительности, электромеханического сопряжения, быстрой инактивации и молекулярных механизмов развития каналопатий (Noreng et al., 2021).

В случае эукариотических Na_v α -субъединица формирует центральную часть канала, по которой поток ионов Na^+ проводится потенциал-зависимым образом. Каждая α -субъединица содержит одну полипептидную цепь (около

1500-2000 остатков), которая сворачивается в четыре гомологичных, но неидентичных повтора (I-IV) (Noda et al., 1986) и образует комплекс с одной или несколькими вспомогательными β -субъединицами (de Lera Ruiz and Kraus, 2015). Каждый повтор имеет шесть трансмембранных сегментов, S1-S6, и делится на два функциональных модуля: потенциал-чувствительный домен (ПЧД, S1-S4) и четверть домена поры (ДП, S5-S6) (Noda et al., 1986; Payandeh et al., 2011). ПЧД расположены в углах ДП, где соединяющиеся внутриклеточные линкеры S4-S5, которые окружают спирали S6. Каждый ПЧД представляет собой функциональный модуль, который при деполяризации мембраны активируется и передает сигнал к ДП, контролируя поток ионов Na^+ (Clairfeuille et al., 2019; Wisedchaisri et al., 2019; Xu et al., 2019).

ПЧД характеризуется наличием кластера «воротных зарядов» с четырьмя-восемью повторяющимися положительно заряженными остатками Arg/Lys в каждом S4 (сенсоре напряжения) (Yang et al., 1996). Каждый ПЧД имеет различную аминокислотную последовательность, конформации и роль в регуляции активности канала (Shen et al., 2017).

ДП включает сегменты S5-S6 и внеклеточные линкеры (P-петли), которые окружают центральную пору канала; каждая P-петля разделена на две α -спирали (P1 и P2) (Shen et al., 2017). В ДП Nav можно выделить четыре области: внеклеточный наружный вестибюль, селективный фильтр, центральную полость и активационные ворота. Сегменты S6 выстилают центральную полость и внутриклеточные активационные ворота, в то время как сегменты S5 фланкируют сегменты S6.

2.4. Гейтинг Na_v , проводимость и селективность

Каналы Na_v могут находиться в одном из трех классов конформационных состояний (закрытые, открытые или инактивированные) с различными зависящими от напряжения и времени константами скорости переходов между состояниями. В покое спираль S4 электростатически притягивается к цитоплазматической стороне гиперполяризованной мембраны, и ДП находится в закрытом состоянии. При деполяризации мембраны спираль S4 смещается во внеклеточном направлении и происходит активация канала или переход в открытое состояние. Сдвиги передаются спиральям S5 и S6 через линкеры S4-S5. Активационные ворота, образованные гидрофобными остатками на С-концевых половинах сегментов S6, открываются, и ионы натрия поступают в клетку. Через несколько миллисекунд после активации натриевый канал переходит в состояние быстрой инактивации. Деполяризация мембраны в течение сотен миллисекунд или несколько длительных деполяризаций вызывают конформационные изменения во внешней поре, и каналы переходят в состояние (состояния) медленной инактивации, тем самым уменьшая входящий поток ионов натрия (Ghovanloo et al., 2016; Chatterjee et al., 2018).

2.4.1. Потенциал-зависимая активация

В 1952 году, Ходжкин и Хаксли предположили, что потенциал-зависимая активация должна включать в себя движение наружу трёх положительно заряженных «воротных частиц», которые проходят через мембрану при деполяризации, что приводит к открытию натриевых каналов (Hodgkin and Huxley, 1952). Это предположение послужило основой для большинства последующих работ по исследованию механизма активации Na_V . Предсказанное движение наружу воротных частиц, теперь называемых «воротными зарядами», было обнаружено с помощью исследований фиксации напряжения с высоким разрешением на модели гигантского аксона кальмара в отсутствие Na^+ и других проникающих ионов (Armstrong and Bezanilla, 1973; Armstrong and Bezanilla, 1974). Позднее были обнаружены маленькие ёмкостные «воротные токи», возникающие в результате движения воротных зарядов наружу при активации натриевого канала и их последующего движения внутрь при реполяризации (Armstrong and Bezanilla, 1973; Armstrong and Bezanilla, 1974). Детальные измерения с использованием более современных методов обнаружили движение от 12 до 16 воротных зарядов в сенсорах напряжения натриевого канала (Hirschberg et al., 1995; Kuzmenkin et al., 2004). Сегменты S4 в каждом повторе содержат от четырех до семи повторов высоко-консервативного мотива из трех остатков: положительно заряженного аминокислотного остатка (обычно Arg), фланкированного двумя гидрофобными остатками (Catterall, 2010). Эта структура создает череду положительных зарядов в мембране. Согласно модели потенциал-чувствительности «скользящей спирали» (Catterall, 1986; Catterall, 2010; de Lera Ruiz and Kraus, 2015), в поляризованной мембране, положительно заряженные остатки в сегменте S4 нейтрализуются и стабилизируются за счет их взаимодействий с отрицательно заряженными аминокислотными остатками в соседних трансмембранных сегментах. При деполяризации мембраны положительно заряженные спирали S4 смещаются наружу. При этом происходит переключение ионных пар в ПЧД (Catterall, 1986; Catterall,

2010; de Lera Ruiz and Kraus, 2015). В результате этого перехода S4 в более релаксированное положение, ворота канала открываются и ионы проходят внутрь клетки (Bähring and Covarrubias, 2011). В подтверждение этого механизма, мутации, которые нейтрализуют воротные заряды, изменяют зависимость активации от напряжения (Stühmer et al., 1989; Parazian et al., 1991; Aggarwal and MacKinnon, 1996; Kontis et al., 1997). Таким образом, заряженные остатки в каждом сегменте S4 действуют как сенсор напряжения (Bezanilla, 2008), и физически перемещаются внутри мембраны к внеклеточной поверхности при деполяризации мембраны (Yang et al., 1996; Zhang et al., 2018). Линкерные спирали S4-S5 следуют этому движению, инициируя открытие активационных ворот на короткое время (<1 мс) и ток ионов Na⁺. Согласно экспериментальным данным, активационные ворота в Na_v каналах образованы заместителями в цитоплазматических частях четырёх сегментов S6 (Zhao et al., 2004; Yang et al., 2013; Shaya et al., 2014).

2.4.2. Быстрая инактивация

Устойчивая деполяризация приводит к переходу в состояние инактивации, которое ограничивает движение ионов и частично опосредовано цитоплазматическими частями канала (Stühmer et al., 1989; West et al., 1992). В Na_v переход в инактивированное состояние контролируется движением ПЧД-IV, который движется медленнее, чем ПЧД других повторов в ответ на деполяризацию. Эти движения приводят к переходу канала в состояние быстрой инактивации, в котором ключевую роль играет инактивирующая частица (или мотив IFM), локализованный в линкере III-IV (Stühmer et al., 1989; West et al., 1992; McPhee et al., 1998). Процесс восстановления из инактивированного состояния требует реполяризации мембраны, позволяющей каналу перейти в закрытое состояние. Как показали Ходжкин и Хаксли (Hodgkin and Huxley, 1952), натриевые каналы инактивируются в течение нескольких миллисекунд после открытия. С помощью исследований с антителами против внутриклеточных линкеров было установлено, что высококонсервативный линкер III-IV играет ключевую роль в процессе

быстрой инактивации (Vassilev et al., 1989). Аналогично, экспрессия натриевого канала в виде двух отдельных белков, разрезанных между повторами III и IV, нарушает быструю инактивацию (Stühmer et al., 1989). Мутации консервативного гидрофобного IFM-мотива могут полностью элиминировать быструю инактивацию (West et al., 1992), которую можно восстановить путем внутриклеточной перфузии короткого пептида, содержащего мотив IFM (KIFMK (West et al., 1992; Eaholtz et al., 1994; Eaholtz et al., 1998)). В каналах Na_v человека линкер III-IV стыкуется с ДП и является единственным внутриклеточным линкером, для которого имеются хорошо разрешенные структуры (Pan et al., 2018; Pan et al., 2019; Shen et al., 2019; Li et al., 2021a; Li et al., 2021b; Pan et al., 2021). Внутриклеточный С-концевой домен взаимодействует с линкером III-IV, играя важную роль в процессе быстрой инактивации (Shen et al., 2017; Clairfeuille et al., 2019). Структура инактивационной частицы была впервые выяснена с помощью ЯМР-анализа линкера III-IV, экспрессируемого в виде отдельного белка (Rohl et al., 1999). Эти исследования привели к модели быстрой инактивации, в которой IFM-мотив связывается со спиралями III5, III6, IV5 и IV6, смещая спирали III6 и IV6 к оси поры, ингибируя прохождение ионов (Pan et al., 2018).

2.4.3. Медленная инактивация

Na_v также имеют второй, гораздо более медленный процесс инактивации, который длится от десятков до сотен миллисекунд и регулирует генерацию ПД во время длинных последовательностей импульсов (Vilin and Ruben, 2001). Na_v переходят в состояние медленной инактивации в ответ на длительную деполяризацию или быстрые повторяющиеся стимуляции, которые происходят в течение времени от секунд до минут (Adelman and Palti, 1969). Более медленные инактивированные состояния определяются скоростью их восстановления, которое может происходить в течение десятков секунд или дольше (Chandler and Meves, 1970). На медленную инактивацию не влияет обработка внутриклеточной поверхности канала протеазами, следовательно, в этом процессе вероятно задействованы конформационные

изменения трансмембранной части белка (Rudy, 1978). Так медленная инактивация включает конформационные изменения во внешней половине поры, затрагивающие сегменты S5 и S6, а также их внеклеточные соединительные петли (Balsler et al., 1996; Xiong et al., 2006).

Таким образом, цикл гейтинга можно рассматривать как переходы из закрытого состояния в открытое состояние, а затем из инактивированного состояния в закрытое состояние.

2.4.4. Ионная проводимость и селективность

Каналы Na_v демонстрируют ~10-100-кратную избирательность к ионам Na^+ по сравнению с ионами K^+ и блокируются ионами Ca^{2+} (Heinemann et al., 1992). Первые доказательства локализации поры были получены в результате идентификации аминокислотных остатков в P-петле, соединяющей внеклеточные концы сегментов S5 и S6, как компонентов рецепторного сайта тетродотоксина (TTX) (Noda et al., 1989). TTX и сакситоксин блокируют Na_v с внеклеточной стороны, напрямую преграждая пору (Eckert and Brehm, 1979). Селективный фильтр (СФ) образует самое узкое место на пути проникновения иона в поровой области и определяет селективность по отношению к ионам Na^+ . СФ Na_v человека образован боковыми цепями мотива DEKA (Asp/Glu/Lys/Ala) в P-петлях (Pan et al., 2018). На первом витке спирали поры P2 над СФ находится внешнее электроотрицательное кольцо, Glu/Glu/Asp/Asp (EEDD), которое играет важную роль в проникновении Na^+ и связывании TTX. Высококонсервативные остатки треонина и триптофана фланкируют СФ, и мутации этих остатков в различных изоформах Na_v ассоциированы с развитием каналопатий (Huang et al., 2017). Таким образом, внеклеточный конец поры натриевого канала выстлан P-петлями в повторах I-IV, окруженных трансмембранными сегментами S5 и S6 (Schlief et al., 1996).

2.5. Методы исследования Na_v

В качестве инструментов, дополняющих экспериментальные методы, используются вычислительные подходы, которые выявляют энергетику контактов между различными сегментами Na_v и позволяют моделировать динамические процессы (молекулярная динамика, МД) (Zhorov and Tikhonov, 2016; Chen et al., 2017). В отсутствие структур высокого разрешения эукариотических натриевых каналов для предсказания таких структур используется гомологическое моделирование. Подход основан на предположении, что гомологичные белки имеют сходную укладку. Вычислительные методы используют полуэмпирические функции энергии (силовые поля) и оптимизацию энергии, которые устраняют нереалистичные столкновения атомов и способствуют притяжению атомов. Поиск оптимальной геометрии включает исследования множества трехмерных структур с использованием методов МД и/или минимизации энергии методом Монте-Карло (МКМ). В случае МД все атомы движутся одновременно, что является важным преимуществом для моделирования больших систем, например, ионных каналов в липидной и водной среде. Однако очень маленький (фемтосекундный) временной шаг требует огромных вычислительных ресурсов для моделирования миллисекундных траекторий (Jensen et al., 2012). При МКМ молекулярная система «перепрыгивает» через энергетические барьеры, что облегчает расчёт взаимодействия с лигандами (Garden and Zhorov, 2010). Многообещающим подходом является сочетание МКМ для поиска энергетически оптимальных структур и МД для моделирования движений структур (Marzian et al., 2013). Одним из важных практических применений данных методик является построение трёхмерных моделей комплексов потенциал-зависимых натриевых каналов с фармакологически значимыми лигандами (Zhorov, 2018).

Регистрация токов Na^+ , проводимые каналами Na_v , была первоначально проведена Ходжкиным и Хаксли почти семьдесят лет назад (Hodgkin and Huxley, 1952). В 1970-х годах Армстронг и Безанила прямо измерили воротные

токи, связанные с активацией канала Na_v (Armstrong and Bezanilla, 1973). Впоследствии метод локальной фиксации потенциала, разработанный Неэром и Сакманном, значительно продвинул изучение физиологии каналов Na_v , позволив измерять проводимость одиночных каналов (Sakmann and Neher, 1984). К началу 1980-х выделение белков канала Na_v из природных источников было достигнуто несколькими группами (Tamkun and Catterall, 1981; Weigele and Barchi, 1982), а позднее было сообщено о молекулярном клонировании первого гена канала Na_v (Noda et al., 1984). В целом, эти и другие прорывные открытия укрепили ранние представления о структуре и функции каналов Na_v (Ahern et al., 2016).

Использование фармакологических веществ и токсинов сыграло важную роль в исследовании Na_v . Так использование α -токсинов скорпиона и сакситоксина позволило установить субъединичный состав различных изоформ Na_v (Hartshorne et al., 1980; Hartshorne and Catterall, 1984). Также Na_v являются мишенями для различных противоэпилептических и антиаритмических лекарств (Catterall, 2023). Например, предсказание ключевых аминокислотных остатков канала $\text{Na}_v1.5$, взаимодействующих с различными антиаритмиками, и последующая экспериментальная проверка этих предположений на моделях гетерологической системы экспрессии будет способствовать выявлению структурных и молекулярных механизмов действия лекарств. Подобные исследования позволят в будущем анализировать действие отдельных препаратов на пациентов, являющихся носителями определённой мутации, что является важным шагом для развития персонализированной медицины.

2.6. Потенциал-зависимые натриевые каналы сердца

ПД кардиомиоцитов является результатом согласованной работы различных ионных каналов, генерирующих входящие (I_{Na} , I_{Ca}) и выходящие токи (I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kir}) (Рисунок 7). Фаза 0 ПД кардиомиоцитов предсердий, желудочков и волокон Пуркинье координируется преимущественно работой натриевых каналов сердца ($Na_v1.5$), которые активируются и обеспечивают быстрый входящий ток в ответ на деполяризацию мембраны (Catterall, 2023). Мембранный потенциал кардиомиоцита составляет около -90 мВ, что определяется равновесным потенциалом для K^+ . При данном потенциале $Na_v1.5$ находятся в закрытом состоянии. Во время быстрой деполяризации (или фазы 0) ПД натриевые каналы быстро открываются, обеспечивая прохождение I_{Na} (Whalley et al., 1994). После активации канал $Na_v1.5$ переходит в состояние быстрой инактивации (Kass, 2006). Инактивированные натриевые каналы не могут реагировать на другой стимул и, следовательно, инициировать второй ПД (или постдеполяризацию), пока каналы не восстановятся после инактивации. Восстановление из инактивированного состояния зависит от времени и напряжения. Последовательная активация и инактивация натриевых каналов работает как защитный механизм и предотвращает возникновение проаритмических событий (Savio-Galimberti et al., 2018). При нормальных физиологических условиях пиковый натриевый ток наблюдается в течение очень небольшого времени (<1 мс). Однако небольшая часть каналов полностью не инактивируется, и низкоамплитудный «постоянный» или «поздний» ток сохраняется на протяжении всего потенциала действия ($I_{Na,L}$) (Maltsev et al., 1998). $I_{Na,L}$ вносит значительный вклад в продолжительность ПД в кардиомиоцитах различных видов млекопитающих и может усиливаться при патологии сердца (Maltsev et al., 1998; Maltsev et al., 2007; Song and Belardinelli, 2017).

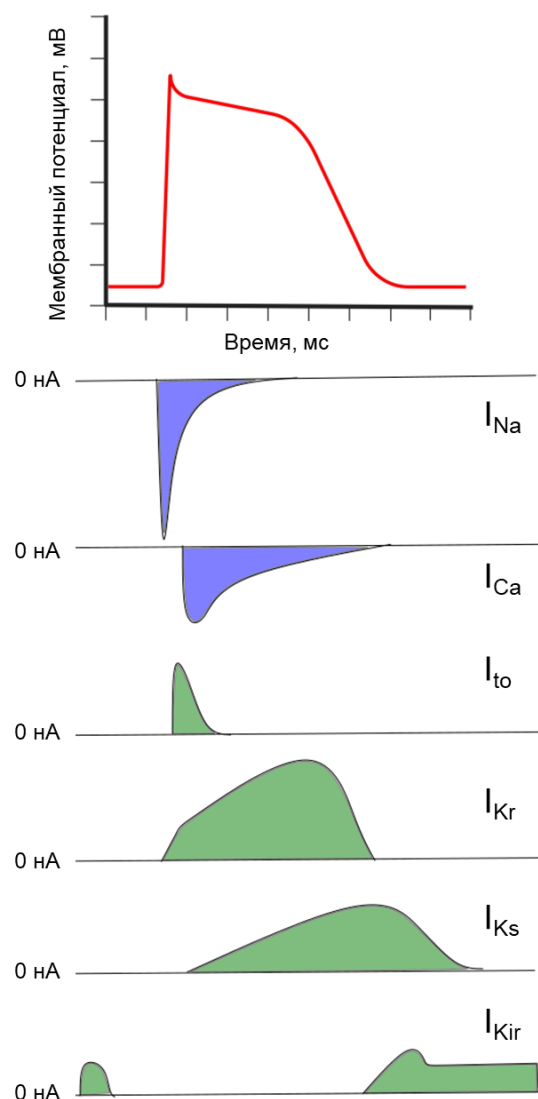


Рисунок 7 – Потенциал действия желудочковых кардиомиоцитов.

Формирование потенциала действия зависит от согласованной работы различных потенциал-зависимых ионных каналов. Натриевый ток ответственен за распространения и инициацию потенциала действия. Входящие токи обозначены синим цветом, выходящие токи зелёным. Переработано по (Amin et al., 2010).

В недавнем исследовании Jiang и др. (Jiang et al., 2020) использовали криоэлектронную микроскопию для определения структуры $Na_v1.5$ при разрешении $3,2-3,5\text{\AA}$, что позволило значительно улучшить понимание взаимосвязи между структурой канала и его функцией. Трёхмерные структуры позволяют лучше понять механизмы, которые приводят к изменениям

гейтинга и других механизмов, следовательно, к дисфункции или гиперфункции канала, которая может являться причиной возникновения аритмии.

2.6.1. Субъединичный состав Nav1.5

Канал $Na_v1.5$ человека состоит из порообразующей α -субъединицы (227 кДа) и одной или нескольких вспомогательных β -субъединиц (30 кДа) (Gavillet et al., 2006). Порообразующая ион-проводящая α -субъединица натриевого канала сердца ($Na_v1.5$) кодируется геном *SCN5A* длиной 80 т.п.н. расположенном в хромосоме 3p21 и состоит из 28 экзонов, кодирующих белок из 2016 аминокислот, α -субъединицу канала (Gellens et al., 1992). Экспрессия *SCN5A*, транспорт и электрофизиологические свойства $Na_v1.5$ регулируются различными геномными и негеномными факторами (Daimi et al., 2022). Ген *SCN5A* также экспрессируется во внесердечных клетках, таких как возбудимые клетки церебральной лимбической системы, и различных подтипах невозбудимых клеток, включая микроглию, астроциты, Т-лимфоциты, макрофаги, фибробласты и эндотелиальные клетки, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и раковые клетки (Black and Waxman, 2013; Han et al., 2018).

2.6.2. Жизненный цикл Nav1.5

От момента транскрипции *SCN5A* до доставки $Na_v1.5$ в определённые микродомены плазматической мембраны проходит несколько стадий с участием различных белков. Транскрипция мРНК *SCN5A* регулируется несколькими энхансерами и репрессорами, расположенными вблизи или внутри промотора гена *SCN5A* (van den Boogaard et al., 2012; Remme, 2013). На транскрипционную регуляцию *SCN5A* также может влиять взаимодействие генов (van den Boogaard et al., 2012). После транскрипции пре-мРНК претерпевает сплайсинг и пост-транскрипционные модификации с образованием зрелой мРНК. Сплайсинг *SCN5A* видоспецифичен, зависит от возраста и приводит к образованию сплайс-вариантов с различными функциональными характеристиками, включая пиковую плотность

натриевого тока и поздний ток (Shang et al., 2007). В результате альтернативного сплайсинга образуется несколько функциональных ($Na_v1.5a$, $Na_v1.5d$, $Na_v1.5e$ и $Na_v1.5c$) и нефункциональных ($Na_v1.5b$, $Na_v1.5f$ и укороченных) вариантов $Na_v1.5$ (Dong et al., 2020).

мРНК *SCN5A* перемещается из ядра в цитоплазму (Guan et al., 2019), где транслируется в белок и собирается в шероховатой эндоплазматической сети, а затем белок $Na_v1.5$ экспортируется в аппарат Гольджи (Dong et al., 2020). После гликозилирования в аппарате Гольджи $Na_v1.5$ транспортируется в плазматическую мембрану в область вставочных дисков (ВД) (Clark et al., 2002; Balse and Eichel, 2018) или в латеральную мембрану (ЛМ), где функционирует в Т-трубочках и в составе комплексов фокальной адгезии или костамерах, которые связывают соседние миоциты в миокарде посредством взаимодействия с внеклеточным матриксом (Clark et al., 2002; Balse and Eichel, 2018). Этот процесс характеризуется присутствием специфических белков, которые контролируют доставку и закрепление $Na_v1.5$ (Balse and Eichel, 2018). В конце своего жизненного цикла $Na_v1.5$ интернализуется с помощью протеасомного и аутофагического путей деградации (Dong et al., 2020).

В ходе своего жизненного цикла $Na_v1.5$ проходит определенные негеномные регуляторные модификации и этапы контроля качества, придающие ему уникальные конформационные и функциональные свойства (Dong et al., 2020). Эти модификации обеспечиваются множеством регуляторных белков, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с $Na_v1.5$ (Abriel, 2010). В дополнение к взаимодействующим белкам, на функцию $Na_v1.5$ влияют более многие внутриклеточные (окислительный стресс, метаболический стресс, электролитный гомеостаз и т. д.) и внеклеточные (рН, температура, гормоны и т. д.) факторы (Daimi et al., 2022). К основным пост-трансляционным модификациям $Na_v1.5$ относятся фосфорилирование, убиквитилирование и гликозилирование (Marionneau and Abriel, 2015). Таким образом, различные модулирующие механизмы могут

изменять ион-проводящие свойства $Na_v1.5$, тем самым непосредственно влияя на сердечную возбудимость и последующий аритмогенез.

2.6.3. Дифференциальная экспрессия $Na_v1.5$ в сердце

Количество каналов $Na_v1.5$ на плазматической мембране различается в зависимости от области сердца и коррелирует со скоростью проведения возбуждения в данных участках (Kleber et al., 2011; Boukens and Christoffels, 2012). Высокий уровень экспрессии *SCN5A* наблюдается в пучках Гиса и волокнах Пуркинье, где проводимость самая быстрая (до 2 м/с) (Remme et al., 2009; Kleber et al., 2011), и в работающем миокарде предсердий и желудочков (Remme et al., 2009). Кроме того, существует градиент мембранной экспрессии $Na_v1.5$ внутри миокарда: более высокий уровень экспрессии *SCN5A* наблюдается в субэндокарде относительно субэпикарда (Remme et al., 2009).

Дифференциальный паттерн экспрессии $Na_v1.5$ также существует в субклеточных микродоменах кардиомиоцита (Рис.8). Комбинация атомной силовой микроскопии и методов локальной фиксации потенциала patch-clamp показала, что каналы $Na_v1.5$ собираются на мембране в кластеры (Leo-Macias et al., 2016), причём электрофизиологические свойства каналов, входящих в разные кластеры различны. Так $Na_v1.5$, локализованные в области вставочных дисков (ВД), генерируют более высокоамплитудные токи, чем каналы латеральной мембраны (ЛМ) (Lin et al., 2011). Кроме того, для каналов ЛМ характерен отрицательный сдвиг кинетики стационарной инактивации и более медленное восстановление из инактивации относительно каналов ВД (Lin et al., 2011). В ЛМ были идентифицированы три дополнительных пула каналов $Na_v1.5$ (сарколеммальные выступы, впадины, и Т-трубочки), где выступы характеризуются наиболее высоким I_{Na} , а Т-трубочки – наименьшим (Leo-Macias et al., 2016; Rougier et al., 2019). Каналы $Na_v1.5$ взаимодействуют с другими белками, образуя специфичные для мембранного микродомена макромолекулярные комплексы (Shy et al., 2013), которые могут влиять на регуляцию активности $Na_v1.5$ и его функции в конкретной области кардиомиоцита. Функциональная значимость различных комплексов $Na_v1.5$

подтверждается тем фактом, что генетические варианты в генах, кодирующих белки, взаимодействующие с $Na_v1.5$, ассоциированы с различными аритмогенными синдромами (Kyle and Makielski, 2014).

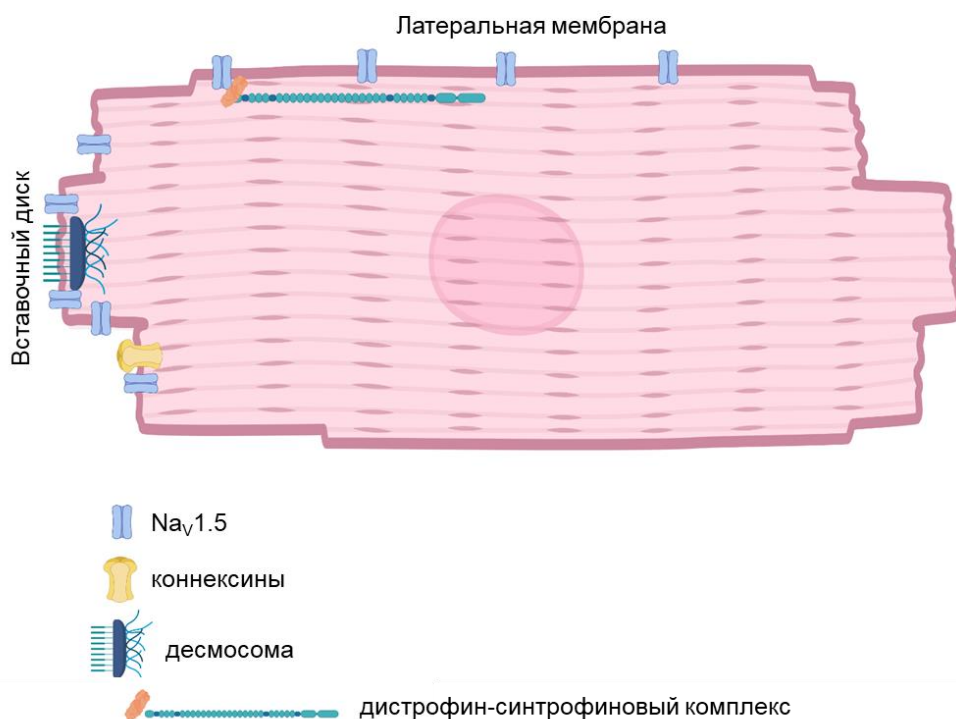


Рисунок 8 – Дифференциальное распределение $Na_v1.5$ в плазматической мембране кардиомиоцитов. Белки-партнёры $Na_v1.5$ различаются в зависимости от локализации канала. Так, например, в области вставочных дисков $Na_v1.5$ колокализован с белками десмосом и щелевых контактов, в то время как в латеральной мембране он взаимодействует с синтрофин-дистрофиновым комплексом. Переработано по (Shy et al., 2013).

2.6.4. Функции $Na_v1.5$

Разнообразие аритмогенных и структурных нарушений, ассоциированных с вариантами гена *SCN5A*, позволяет выдвинуть предположение, что функции $Na_v1.5$ не сводятся к инициации и распространению ПД в сердце. Рано и др. предложили новую классификацию функциональных ролей $Na_v1.5$, включая прямые ионные эффекты входящего тока натрия на электрофизиологию кардиомиоцитов, непрямые ионные эффекты входящего тока натрия на гомеостаз внутриклеточных ионов и

передачу сигналов, а также неионные эффекты дисфункции $\text{Na}_v1.5$, которые не зависят от входа Na^+ в клетку (Rivaud et al., 2020).

Изменение функциональных свойств $\text{Na}_v1.5$ напрямую влияет либо на деполяризацию, либо на реполяризацию кардиомиоцитов. При наследственных аритмогенных синдромах дисфункция $\text{Na}_v1.5$ может быть обусловлена уменьшением количества функциональных каналов на мембране из-за дефекта фолдинга канала и/или изменения мембранного транспорта и электрофизиологических свойств $\text{Na}_v1.5$. Дисфункция натриевых каналов приводит к снижению возбудимости сердца и замедлению проводимости. Мутации *SCN5A*, вызывающие увеличение активности натриевых каналов, могут характеризоваться увеличением позднего тока и, как следствие, продолжительным входом Na^+ в клетку в ходе ПД, что приводит к замедлению реполяризации, увеличению продолжительности ПД и ранней постдеполяризации. Эти изменения впоследствии могут привести к развитию тахикардии по типу «пируэт» и внезапной сердечной смерти.

Косвенные последствия нарушения ион-проводящей функции натриевых каналов сердца связаны с процессами, которые реализуются за счёт изменений внутриклеточной концентрации Na^+ в результате работы $\text{Na}_v1.5$. Помимо изменения внутриклеточной концентрации кальция, последствия включают метаболическую дисрегуляцию и активацию кальций-зависимых сигнальных путей. Например, увеличение $I_{\text{Na,L}}$ вследствие сердечной недостаточности или генетических вариантов в гене *SCN5A*, усиливающих активность $\text{Na}_v1.5$, увеличивает $[\text{Na}^+]_i$ и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в желудочковых кардиомиоцитах (Rivaud et al., 2018).

Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах может приводить к активации сигнальных путей CaMKII и кальциневрина, которые контролируют транскрипцию генов, приводящих к развитию гипертрофии и фиброза сердца (Bers, 2011). В этом случае последствия нарушения ион-проводящей функции натриевых каналов могут быть опосредованы увеличением $I_{\text{Na,L}}$ (Maltsev et al., 2007; Toischer et al., 2013). CaMKII также взаимодействует с

Nav1.5 и регулирует их активность (Maltsev et al., 2008) и инактивацию. Таким образом, увеличение $[Ca^{2+}]_i$ может активировать кальций-зависимые прогипертрофические сигнальные пути и воздействовать на Nav1.5 как напрямую, так и через CaM/CaMKII и способствовать развитию аритмии.

Помимо ион-проводящей, натриевые каналы сердца выполняют ряд функций, опосредованных непосредственно белком Nav1.5 или макромолекулярных комплексами, с которыми он взаимодействует. Например, взаимодействие и совместная регуляция Nav1.5 и калиевых каналов обеспечивает дополнительные пути, с помощью которых Nav1.5 может косвенно влиять на электрическую функцию кардиомиоцитов (Portero et al., 2018). Существует предположение, что дисфункция Nav1.5 приводит к изменению стабильности макромолекулярных комплексов, оказывая тем самым влияние на структуру и целостность клеток. Например, регуляция Nav1.5 различно изменяется в зависимости от микродомена при сердечной недостаточности (Rivaud et al., 2017).

Согласно большому количеству работ, Nav1.5 функционирует в составе крупного комплекса в области ВД, который включает в себя N-кадгерин, плакофиллин-2, $\beta 1$ -субъединицу и коннексин-43, локализованные вместе и осуществляющие взаимную регуляцию для поддержания целостности межклеточной связи (Sato et al., 2011; Cerrone et al., 2012; Cerrone et al., 2014; Te Riele et al., 2017). Было показано, что дефицит Nav1.5 снижает размер и плотность кластеров N-кадгерина на мембране ВД, тем самым изменяя адгезию соседних кардиомиоцитов, что, в свою очередь, снижает I_{Na} (Leo-Macias et al., 2016). Кластеры N-кадгерина являются точками закоривания для сети микротрубочек (Shaw et al., 2007; Cerrone et al., 2014). Следовательно, косвенное изменение плотности кластеров N-кадгерина в ВД из-за дефицита натриевых каналов может нарушать перенос молекул вдоль микротрубочек в ВД. Доказательства роли Nav1.5 в клеточной адгезии дополнительно подтверждены исследованиями на пациентах с АКМ (Cerrone et al., 2014; Te Riele et al., 2017) и на моделях АКМ на мышцах (Cerrone et al., 2012). Таким

образом, последствия дисфункции $Na_v1.5$, не связанные с проведением ионов, не только модулируют электрофизиологические свойства миокарда, но также могут влиять на структуру и целостность сердца, тем самым дополнительно вызывая предрасположенность к аритмиям.

2.6.5. Структурные особенности $Na_v1.5$

Структура $Na_v1.5$ была получена как для закрытого/инактивированного, так и для открытого состояний (Jiang et al., 2020; Jiang et al., 2021a). Структуру закрытого/инактивированного состояния $Na_v1.5$ определяли с помощью конструкции, в которой крупные внутриклеточные линкеры и С-концевой домен были удалены (Jiang et al., 2021b). Полученная конструкция $Na_v1.5c$ полностью функциональна и сохраняет характерную чувствительность к токсинам и антиаритмическим препаратам (Jiang et al., 2020). Альфа-спиральный остов трансмембранного ядра $Na_v1.5c$ (Jiang et al., 2020) почти идентичен Na_vAb , со среднеквадратичным отклонением $3,2 \text{ \AA}$, что находится в пределах ожидаемого уровня неопределенности из-за пределов разрешения крио-ЭМ структуры ($3\text{--}4 \text{ \AA}$). Было показано, что данная структура обладает всеми признаками, предсказанными для закрытого/инактивированного состояния натриевого канала (Catterall, 2023).

Na_v позвоночных обычно имеют одну или две субъединицы $Na_v\beta$, связанные с их порообразующей α -субъединицей (Catterall, 2000; Ahern et al., 2016). Однако в условиях сверхэкспрессии субъединиц $Na_v\beta1$, $Na_v\beta2$ и $Na_v1.5c$, ни одна из них не разрешалась в структуре, что позволяет предположить, что эти субъединицы имеют низкое сродство к α -субъединице (Jiang et al., 2020).

Электромеханическое сопряжение сенсоров напряжения и активации/инактивации является важной проблемой физиологии ионных каналов (Horn, 2000; Bassetto et al., 2021; Cowgill and Chanda, 2021). В P-петлевых каналах наблюдается взаимодействие линкерных спиралей S4-S5 со спиралью S6 (Lu et al., 2002). Недавнее исследование выявило ряд аминокислотных остатков во внеклеточных частях S4, S5 и P-петли, которые

вносят вклад в образование функциональной связи между ПЧД и воротами медленной инактивации в СФ (Bassetto et al., 2021).

2.7. Синдромы, ассоциированные с вариантами в *SCN5A*

Генетические варианты в *SCN5A* ассоциированы с широким спектром наследственных заболеваний сердца, которые связаны с повышенным риском внезапной сердечной смерти, например, синдром удлинённого интервала QT 3 типа (LQT3), синдром Бругада 1 типа (BrS1), прогрессирующее нарушение сердечной проводимости (ПНСП), фибрилляция предсердий (ФП), синдром слабости синусного узла и др. (Рис.9) (Remme and Bezzina, 2010). Помимо этих аритмогенных синдромов дисфункция $Na_v1.5$ может также лежать в основе структурной аномалии сердца, которая варьирует от микро-структурных дегенеративных изменений в миокарде (Bezzina et al., 2003; Coronel et al., 2005; Frustaci et al., 2005) до дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) (Olson et al., 2005; Gusev et al., 2020), аритмогенной кардиомиопатии (АКМП) (Cerrone et al., 2012; Cerrone et al., 2014; Te Riele et al., 2017; Khudiakov et al., 2020) и гипертрофической кардиомиопатии (Cava et al., 2023). Нередко варианты гена *SCN5A* также приводят к комбинированной клинической картине, сочетающей элементы вышеперечисленных клинических фенотипов (Remme et al., 2006; Remme, 2013).

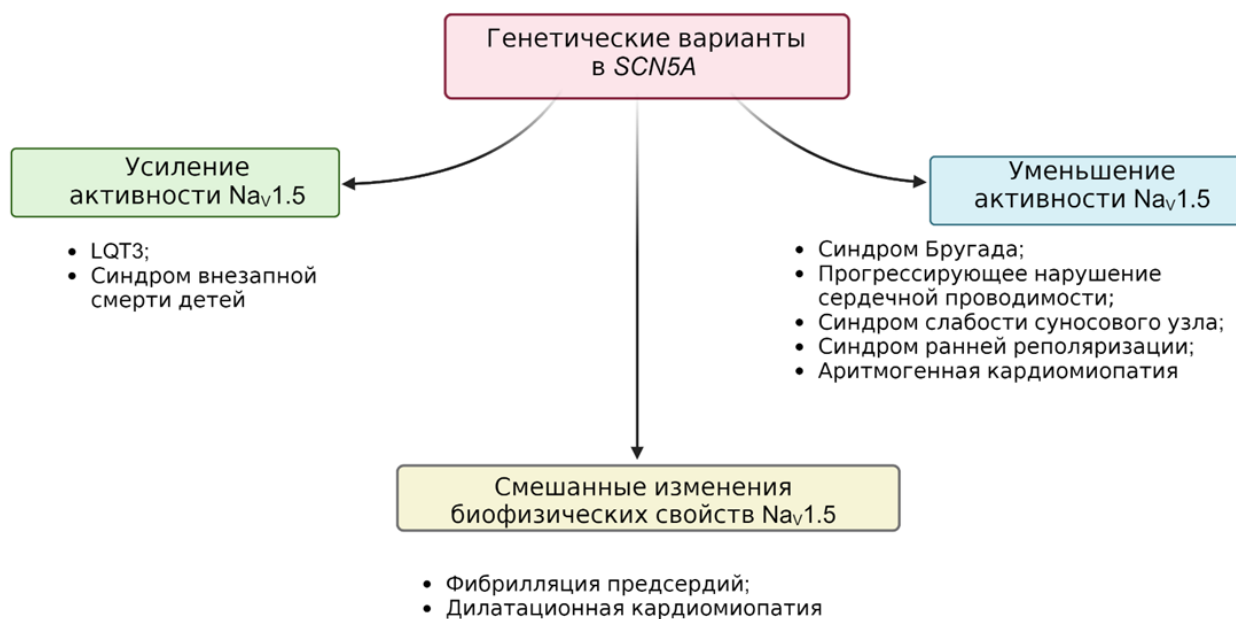


Рисунок 9 – Аберантная активность $Na_v1.5$ приводит к развитию наследственной патологии сердца.

Экспрессия и активность канала $Na_v1.5$ могут быть нарушены из-за вариантов геномной последовательности *SCN5A*, включая миссенс-, нонсенс-, нарушение сплайсинга и мутации со сдвигом рамки считывания (Kroncke et al., 2018). Согласно одной из наиболее полных открытых онлайн-баз данных генетических вариантов, идентифицированных у пациентов «ClinVar», 2437 вариантов в гене *SCN5A* ассоциированы с заболеваниями сердца, из которых 1775 являются миссенс-вариантами. Среди вышеперечисленных вариантов 65 патогенных, 72 вероятно патогенных, 181 имеют конфликт в интерпретации патогенности и 1482 являются вариантами неизвестной клинической значимости.

Например, BrS1 (Chen et al., 1998; Bezzina et al., 1999; Remme et al., 2006), ПНСП (Schott et al., 1999) и синдром слабости синусового узла (Smits et al., 2005b) являются примерами заболеваний, ассоциированных с уменьшением активности $Na_v1.5$. В то время как LQT3 (Remme et al., 2006) обусловлен

мутациями, усиливающими активность $Na_v1.5$. Наконец, сочетание признаков дисфункции и гиперфункции связано с ФП (Olson et al., 2005) и ДКМП (Bezzina et al., 2003; McNair et al., 2004; Olson et al., 2005).

2.7.1. LQT3

На сегодняшний день известно шестнадцать генов, генетические варианты в которых идентифицированы у пациентов с LQTS различных типов. Наиболее часто встречаются типы LQT1, LQT2 и LQT3 (90% генотипированных случаев LQTS). Так, распространенность LQT3, ассоциированного с мутациями в *SCN5A*, составляет 5–10% среди пациентов с LQTS (Schwartz et al., 2012).

LQT3 характеризуется удлинением интервала QT на электрокардиограмме (ЭКГ) и повышенным риском внезапной смерти из-за желудочковых тахиаритмий, в частности, тахикардии по типу «пируэт» (torsades de Pointes). У пациентов с LQT3 типа часто наблюдается брадикардия, а желудочковые аритмии возникают преимущественно в покое при низкой частоте сердечных сокращений (Schwartz et al., 2001). Как правило, наблюдается увеличение продолжительности потенциала действия ввиду увеличения $I_{Na,L}$ вследствие нарушения процесса инактивации $Na_v1.5$ (Bennett et al., 1995; Rivolta et al., 2001; Schwartz et al., 2012).

2.7.2. Синдром Бругада

Синдром Бругада – это редкое заболевание, наследуемое аутосомно-доминантным образом (Juang and Huang, 2004) и характеризующееся предрасположенностью к синкопам, желудочковым аритмиям и внезапной сердечной смерти, возникающей в основном во время отдыха или сна (Krahn et al., 2022). Характерным признаком ЭКГ-феномена Бругада 1го типа является подъем сегмента ST в правых верхних грудных отведениях (Sieira and Brugada, 2017). ЭКГ-феномен Бругада проявляется или усиливается под действием антиаритмических препаратов класса 1А или 1С (аймалин, флекаинид), блокирующих натриевые каналы. Первоначально данный синдром был задокументирован в 1992 году (Brugada and Brugada, 1992). BrS

считается ответственным за 4% всех случаев внезапной сердечной смерти и за почти 20% случаев внезапной сердечной смерти у людей со структурно нормальным сердцем (Khan et al., 2009). Нарушения сердечного ритма, такие как желудочковая тахикардия, фибрилляция желудочков, брадикардия или нарушение проводимости атриовентрикулярного узла, являются распространенными клиническими проявлениями у пациентов с BrS и наблюдаются преимущественно у мужчин (Sendfeld et al., 2019). В качестве причины развития BrS на данный момент также рассматривают нарушение проводимости, повышенную (трансмуральную) гетерогенность продолжительности потенциала действия и структурные аномалии правого желудочка (Chen et al., 1998; Hoogendijk et al., 2010; Wilde and Amin, 2018).

Было идентифицировано 23 гена, ассоциированных с развитием BrS (Cerrone et al., 2022), но их клиническая значимость в данный момент сильно оспаривается (Hosseini et al., 2018). Только ген *SCN5A* имеет достаточные доказательства, свидетельствующие о том, что он является генетической причиной развития заболевания (Hosseini et al., 2018), ответственной за 25% случаев BrS. Также пациенты с BrS, обусловленным мутациями в *SCN5A* имеют более выраженные нарушения на ЭКГ и более тяжелый прогноз (Chen et al., 2020).

2.7.3. Смешанные синдромы

Варианты гена *SCN5A* ассоциированы с широким спектром фенотипов. Появляется всё больше данных о вариантах, идентифицированных у пациентов со смешанной клинической картиной (Grant et al., 2002). Чаще всего различные элементы фенотипа уменьшения активности $Na_v1.5$ обнаруживаются в различных комбинациях внутри одной семьи (Smits et al., 2005a; Remme and Wilde, 2008). Наиболее часто встречающейся комбинацией является BrS и ПНСП (Kyndt et al., 2001; Smits et al., 2005a). Манифестация того или иного фенотипа часто зависит от генетического фона, включая модуляцию редких и распространенных вариантов, а также от эпигенетических факторов и факторов окружающей среды.

Первое доказательство того, что одиночная мутация *SCN5A* может привести к проявлениям, характерным для различных заболеваний, было получено на примере мутации ¹⁷⁹⁵insD, которая была идентифицирована в большом голландском семействе в нескольких поколениях (Bezzina et al., 1999; van den Berg et al., 2001). Вариант ¹⁷⁹⁵insD приводил к развитию синдрома слабости синусового узла, брадикардии, нарушению проводимости, BrS и LQT3 (Bezzina et al., 1999; van den Berg et al., 2001). ¹⁷⁹⁵insD, а также мутации E¹⁷⁸⁴K и delK¹⁵⁰⁰ снижают пиковую плотность натриевого тока при одновременном увеличении величины $I_{Na,L}$, что обуславливает развитие смешанного синдрома (Grant et al., 2002; Remme et al., 2006; Makita et al., 2008).

Понимание сложной генетической архитектуры наследственных заболеваний сердца значительно улучшилось за последние годы. С момента клонирования гена *SCN5A* в 1992 году ученые получили значительный объем молекулярных и клинических знаний о его роли в норме и при патологии. Это позволило разработать специфические для гена алгоритмы стратификации риска и стратегии диагностики и лечения для пациентов с генетическими вариантами в *SCN5A* (Wilde and Amin, 2018). Однако, в последние годы становится очевидным, что подавляющая часть сердечно-сосудистых фенотипов имеет сложную генетическую структуру, что говорит в пользу вероятного полигенного наследования и шкалы полигенного риска развития патологии сердца. Кроме того, генетические модификаторы, такие как распространённые генетические варианты, наследуемые наряду с патогенными, могут модулировать степень выраженности фенотипа, влияя таким образом на пенетрантность и стратификацию риска (Cerrone et al., 2019).

2.8. Физиологические механизмы развития натриевых каналопатий

Работа потенциал-зависимых натриевых каналов сердца сопровождается конформационными переходами между различными состояниями белка (Рис.10А). Патогенные мутации зачастую изменяют вероятность конформационных переходов, влияя на стабильность тех или иных состояний канала. Кривая стационарной активации позволяет оценить эффект генетического варианта на процесс перехода каналов в открытое состояние (Рис.10Б). Положительный сдвиг кривой активации отражает дестабилизацию открытого или стабилизацию закрытого состояния, в то время как отрицательный сдвиг может быть следствием стабилизации открытого или дестабилизации закрытого состояния. Кривая стационарной инактивации регистрируется с помощью двухступенчатого протокола (Рис.103В), причём зачастую длительность кондиционного импульса составляет 250-500мс. Такое значение продолжительности импульса приводит к тому, что сдвиги кривой инактивации могут быть следствием изменений как быстрой, так и медленной инактивации. Усиление медленной инактивации может наблюдаться при генетических вариантах, идентифицированных у пациентов с BrS1, и регистрируется с помощью протокола развития медленной инактивации (Рис.10Г). Кривая восстановления из инактивированного состояния (Рис.10Д) в зависимости от длительности первого импульса характеризует переход из различных инактивированных состояний в закрытое состояние. Анализ процесса восстановления из инактивации осуществляется с помощью уравнения биэкспоненциальной кривой, где характеризующими параметрами являются быстрая и медленная постоянные времени восстановления из инактивированного состояния. Развитие постоянного натриевого тока или позднего тока ($I_{Na,L}$) может быть следствием замедления перехода в быстро инактивированное состояние при мутациях, ассоциированных с синдромом LQT3 (Рис.10Е) (Amin et al., 2010). Множество генетических вариантов, идентифицированных у пациентов с BrS1, характеризуются снижением плотности I_{Na} (Рис.10Е), которое может развиваться в результате как

уменьшения числа каналов на мембране, так в результате изменения электрофизиологических свойств $Na_v1.5$ (Amin et al., 2010). При генетических вариантах, ассоциированных с LQT3 может наблюдаться стабилизация открытого состояния и дестабилизация закрытого и инактивированных состояний. Результатом этих структурных изменений является увеличение продолжительности интервала QT за счет повторной активации $Na_v1.5$ и $Ca_v1.2$ и увеличения длительности фазы плато ПД (Рис.10Ж) (Amin et al., 2010). Дестабилизация открытого состояния и/или стабилизация закрытого и инактивированных состояний могут быть причиной замедления нарастания деполяризации во время нулевой фазы ПД и приводить к развитию BrS1 (Рис.10Ж) (Amin et al., 2010).

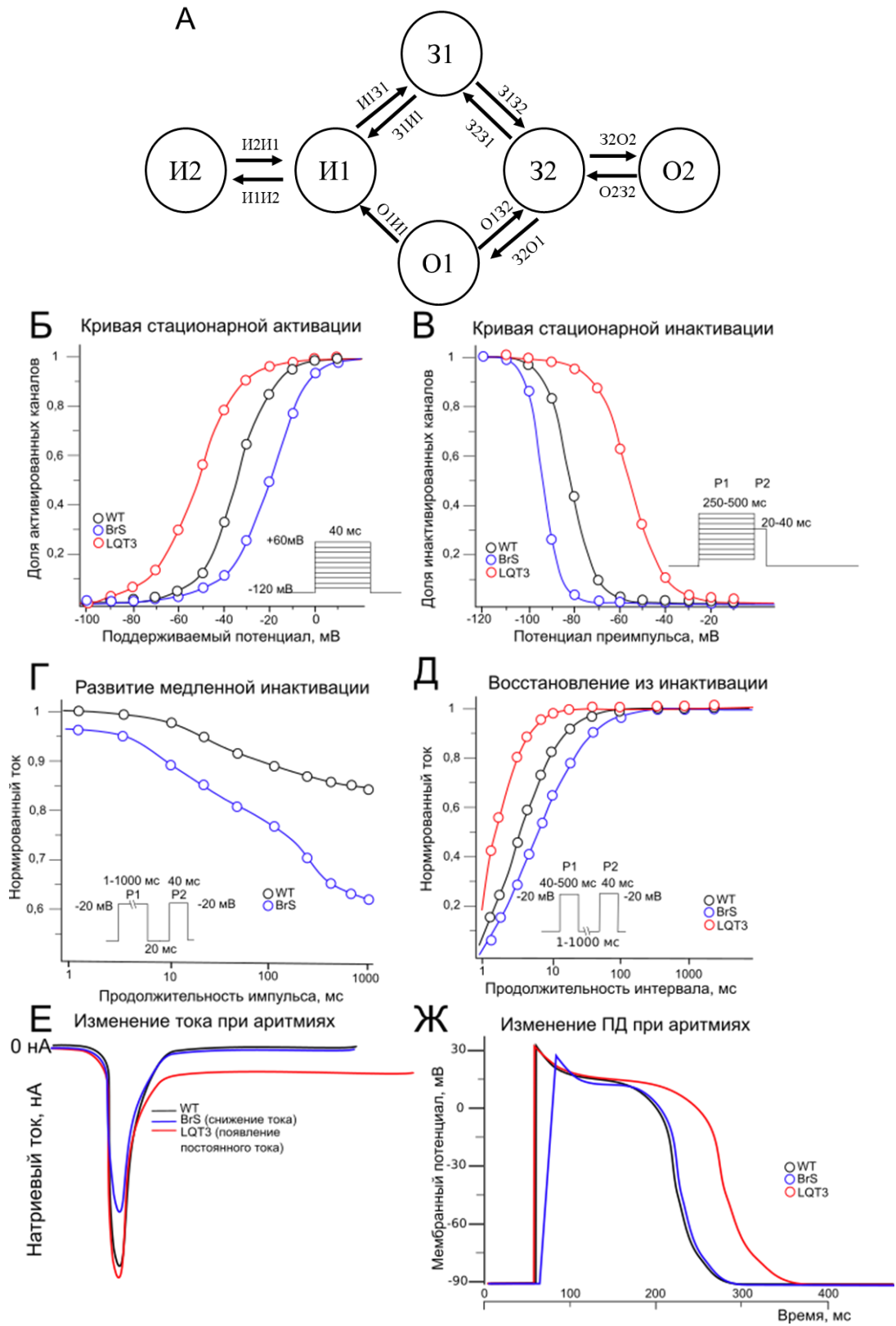


Рисунок 10 – Биофизические механизмы BrS1 и LQT3. А. Современная кинетическая модель, отражающая переходы между различными

конформационными состояниями канала. Буквы в кружках обозначают состояния канала: О – открытые, З – закрытые, И –инактивированные (Balbi et al., 2017). Б. Кривая стационарной активации. Кинетика, характерная для каналов дикого типа, обозначена черным. Красная линия (LQT) демонстрирует сдвиг в сторону гиперполяризации (стабилизация открытого или дестабилизация закрытого состояния). Синяя линия (BrS) сдвинута в сторону деполяризации (дестабилизация открытого состояния или стабилизация закрытого). В. Кривая стационарной инактивации. Для синдрома LQT3 характерна инактивация при более положительных потенциалах (дестабилизация инактивированных состояний), в то время как при мутациях в гене *SCN5A*, ассоциированных с синдромом Бругада, стационарная инактивация ускорена (стабилизация инактивированных состояний). Г. Развитие медленной инактивации. При синдроме Бругада развитие медленной инактивации в ответ на продолжительный деполяризующий импульс может быть ускорено, что отражает стабилизацию медленного инактивированного состояния. Д. Восстановление из инактивации. При мутациях, приводящих к развитию аритмий, может изменяться скорость выхода из инактивированного состояния. Так, при синдроме Бругада инактивированное состояние может быть более стабильно, что приводит к замедлению восстановления. При синдроме LQT наблюдается противоположная картина. Е. Изменение тока при аритмиях. Для синдрома Бругада характерно уменьшение плотности тока, в то время как при синдроме LQT наблюдается возникновение постоянного тока. Ж. Изменение ПД при аритмиях. Заболевания аритмогенной природы оказывают различное влияние на морфологию ПД. Так, дисфункция натриевых каналов при BrS1 приводит к замедлению нарастания деполяризации, в то время как гиперфункция $Na_v1.5$ приводит к увеличению фазы плато и продолжительности ПД за счет повторной активации натриевых и кальциевых каналов.

2.8.1. Мутации, ассоциированные с синдромом LQT3

На апрель 2023 года в базе данных Clinvar присутствует информация о более 450 мутациях *SCN5A*, идентифицированных у пациентов с LQT3, и приблизительно 15% этих замен функционально охарактеризованы в моделях гетерологических систем экспрессии или на модели КМ-иПСК (Рис.11). Большинство из них приводят к увеличению активности $Na_v1.5$ (gain-of-function phenotype) за счет дестабилизации состояния быстрой инактивации и появления $I_{Na,L}$ (Bennett et al., 1995; Amin et al., 2010).

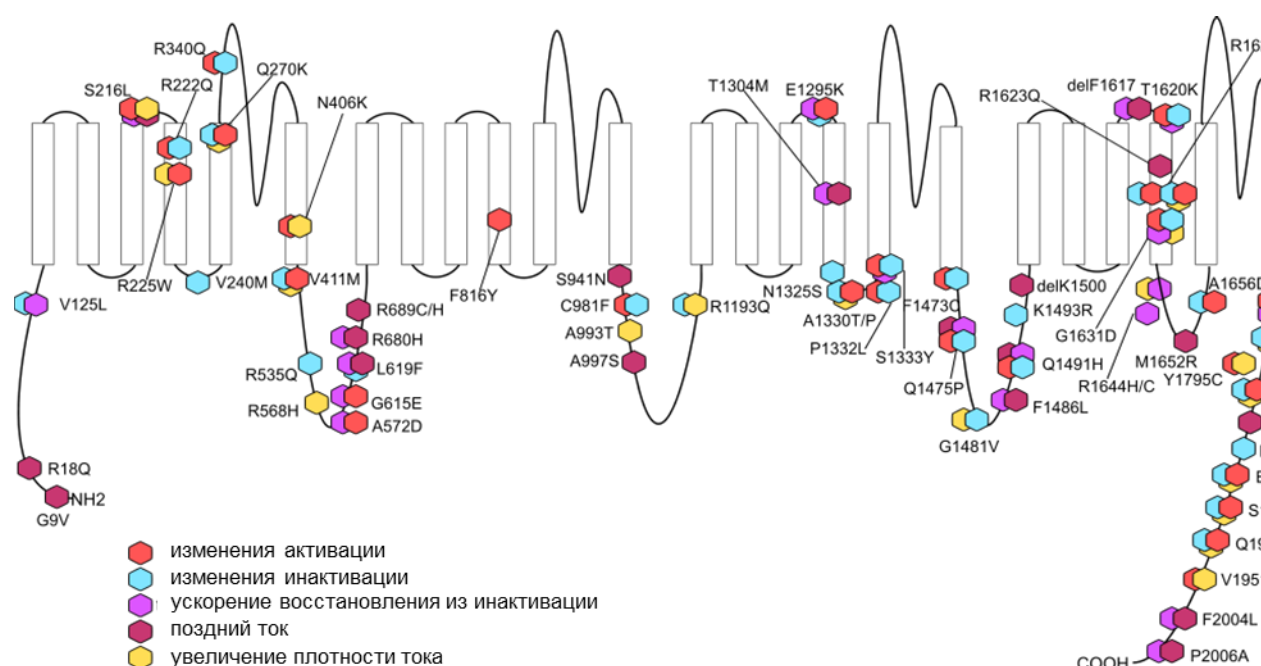


Рисунок 11 – Мутации в *SCN5A*, ассоциированные с LQT3. На рисунке приведены изменения электрофизиологических характеристик, описанные в литературе для конкретных мутации. Ссылки на источники приведены в основном тексте. При наличии более одной работы, характеризующей мутацию, приводится две и более характеристики. Рисунок взят из (Zaytseva et al., 2024).

Генетические варианты, характеризующиеся появлением $I_{Na,L}$, преимущественно локализованы в участках $Na_v1.5$, задействованных в переходе в состояние быстрой инактивации (т.е. IVS4, III S4-S5 и линкер III-IV) (Li et al., 2021a) (Tester et al., 2005; Zimmer and Surber, 2008; Potet et al.,

2009). Другая группа этих мутаций сгруппирована вокруг фенестраций соседних повторов (Gamal El-Din and Lenaeus, 2022). Третья группа аритмогенных мутаций локализована в ПЧД канала, где она вызывает воротный ток (Moreau et al., 2018). Среди изменений, которые могут лежать в основе развития LQT3, выделяют нарушение инактивации (Wedekind et al., 2001; Ruan et al., 2007), ускорение восстановления из инактивированного состояния (Clancy et al., 2003; Albert et al., 2008), увеличение пиковой плотности I_{Na} (Rivolta et al., 2001) и усиление активации, а также разнообразные комбинации перечисленных механизмов. Интересно, что одиночная аминокислотная замена в $Na_v1.5$ может приводить к множественным изменениям как в кинетике каналов, так и/или их транспорте, фолдинге, экспрессии и деградации белка. В независимости от электрофизиологических изменений, которые лежат в основе увеличения активности $Na_v1.5$, происходит сдвиг равновесия деполяризации и реполяризации в сторону деполяризации. Нарушение баланса входящих и выходящих токов во время фазы плато ПД, может приводить к быстрому иницированию ПД и появлению $I_{Na,L}$. В результате нарушения реполяризации возможна повторная активация кальциевых каналов, т.е. ранняя повторная деполяризация, особенно в миоцитах волокон Пуркинье, где длительность ПД выше (Dun and Boyden, 2008), что может приводить к эпизодам тахикардии по типу «пируэт» (Yan et al., 2001) и фибрилляции желудочков (Fredj et al., 2006). На предрасположенность к фибрилляции желудочков также влияют генетические модификаторы. Так было показано, что носителями *SCN5A*-p.Phe1617del были преимущественно члены семьи женского пола, характеризующиеся ускорением сердечного ритма, вызванным возбуждением, и удлинением реполяризации (Ter Bekke et al., 2017).

2.8.1.1. Увеличение постоянного тока

В нормальном сердце около 1–2% натриевых каналов демонстрируют замедление перехода в инактивированное состояние, что приводит к появлению $I_{Na,L}$. Выделяют несколько механизмов увеличения $I_{Na,L}$: (i) нарушение быстрой инактивации и повторное открытие каналов (Bennett et al., 1995), (ii) неполная или замедленная инактивация, приводящая к более продолжительному открытию каналов и (iii) сдвиг потенциал-зависимости стационарной инактивации с последующим увеличением диапазона потенциалов при которых наблюдается неполная инактивация (увеличение оконного тока). Кроме того, может происходить более быстрое восстановление после инактивации или увеличиваться пиковая плотность I_{Na} (Rivolta et al., 2001; Wedekind et al., 2001; Clancy et al., 2003). Значительное увеличение $I_{Na,L}$ может способствовать изменению реполяризации (Saint, 2006) и может привести к росту $[Na^+]_i$ и $[Ca^{+2}]_i$ и последующей деполяризации мембранного потенциала, увеличению продолжительности ПД и повышенному риску возникновения ранней постдеполяризации и отсроченной постдеполяризации.

Увеличение постоянного тока описано для генетических вариантов локализованных в цитоплазматических участках $Na_v1.5$: N-конец (G^{9V} , R^{18Q}) (Gütter et al., 2013), линкер I-II (R^{689C} , R^{689H}) (Sottas et al., 2013), линкер II-III (S^{941N} (Ruan et al., 2007), A^{997S} (Ackerman et al., 2001)), IVS4-S5 (M^{1652R} (Ruan et al., 2007)), C-конец (D^{1790G} (Tateyama et al., 2003b), Y^{1795C} (Tateyama et al., 2003b) и R^{1826H} (Ackerman et al., 2001)); и в IVS4 (R^{1623Q} (Makita et al., 1998)).

В отличие от других подтипов LQT, триггером для появления аритмогенных событий при LQT3 является состояние покоя; зачастую эпизоды аритмии наблюдаются во время сна, при низкой частоте сердечных сокращений. С этим согласуется то, что $I_{Na,L}$ более выражен при низкой частоте стимуляции. Таким образом поздний ток может рассматриваться как ключевая детерминанта возникновения нарушения ритма при LQT3 (Schwartz et al., 2001). Также, у пациентов с мутацией в гомозиготном состоянии

наблюдается более выраженное удлинение интервала QT и большая вероятность появления аритмогенных событий, чем в гетерозиготном. Данный эффект проявляется в том числе на уровне функциональных исследований на модели гетерологической системы экспрессии (Lupoglazoff et al., 2001).

2.8.1.2. Нарушение стационарной инактивации

Нарушение процесса инактивации характерно для генетических вариантов, локализованных в IVS6 (V¹⁷⁶³M (Chang et al., 2004) и I¹⁷⁶⁸V (Rivolta et al., 2002)) и цитоплазматических частях Nav1.5: N-конец (V¹²⁵L (Gütter et al., 2013)), IS4-S5 (V²⁴⁰M (Fatima et al., 2013)), линкер I-II (R⁵³⁵Q (Fatima et al., 2013)), III-S4-S5 (N¹³²⁵S (Yong et al., 2007)), линкер III-IV (K¹⁴⁹³R (Li et al., 2009)), и C-конец (L¹⁸²⁵P (Gardill et al., 2018), R¹⁸⁹⁷W (Olesen et al., 2012)). Отдельно, следует отметить эффект генетического варианта D¹⁷⁹⁰G (C-конец) на стационарную инактивацию, который наблюдается только на модели ко-экспрессии α - и β -субъединиц. При ко-экспрессии β -субъединицы с каналами дикого типа происходит сдвиг кривой стационарной инактивации в сторону деполяризации, для мутантных каналов, напротив, этот сдвиг отсутствует (An et al., 1998).

2.8.1.3. Ускорение восстановления из инактивированного состояния

Сокращение времени восстановления из инактивированного состояния сдвигает баланс деполяризации и реполяризации в сторону деполяризации, так как фракция каналов Nav1.5, способных к повторной активации увеличивается. Согласно электрофизиологическим экспериментам на модели ооцитов шпорцевой лягушки генетические варианты A⁵⁷²D и G⁶¹⁵E, локализованные в линкере I-II, приводили к ускорению восстановления из инактивации и небольшому усилению активации (Albert et al., 2008; Ortiz-Bonnin et al., 2016). Замена V¹⁹⁵¹L, локализованная в C-конце, сокращала время восстановления из инактивированного состояния (Wang et al., 2007). Этот механизм был также продемонстрирован на модели эндогенной экспрессии кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных

стволовых клеток, полученных от пациента с LQT3, ассоциированном с генетическим вариантом IVS4-S5_R¹⁶⁴⁴H: время восстановления из инактивированного состояния сокращалось в три раза (Malan et al., 2016).

2.8.1.4. Повышение пиковой плотности натриевого тока

Увеличение плотности I_{Na} может обуславливаться рядом причин: усиление активации, повышение количества $Na_v1.5$ на мембране в результате гиперэкспрессии *SCN5A*, интенсификации транспорта каналов на мембрану и нарушения процесса их деградации. Повышение плотности I_{Na} наблюдалось для генетических вариантов, локализованных как в трансмембранных сегментах IS6_N⁴⁰⁶K (Loussouarn et al., 2015), IIS4_F⁸¹⁶Y (Ortiz-Bonnin et al., 2016), IIS4_R¹¹⁹³Q (Wehrens et al., 2003; Wang et al., 2004), так и в линейных IS3-S4_S²¹⁶L (Olesen et al., 2012), I-II_R⁵⁶⁸H (Ortiz-Bonnin et al., 2016), II-III_A⁹⁹³T (Ortiz-Bonnin et al., 2016), и V¹⁹⁵¹M (С-конец) (Olesen et al., 2012). Повышение плотности I_{Na} может быть, как единственным электрофизиологическим изменением (R⁵⁶⁸H и A⁹⁹³T) (Ortiz-Bonnin et al., 2016), так и наблюдаться в сочетании с усилением активации (S²¹⁶L, N⁴⁰⁶K, F⁸¹⁶Y, V¹⁹⁵¹M) (Olesen et al., 2012; Loussouarn et al., 2015; Ortiz-Bonnin et al., 2016), замедлением инактивации (R¹¹⁹³Q (Wang et al., 2004)). Тот факт, что на текущий момент известно только две замены, для которых показано увеличение плотности I_{Na} в отсутствие изменения других электрофизиологических характеристик $Na_v1.5$, позволяет сделать вывод о редкой встречаемости данного механизма развития LQT3.

2.8.1.5. Комплексное изменение функциональных характеристик

В большинстве случаев генетические варианты, идентифицированные у пациентов с синдромом LQT3, приводят к сочетанию функциональных изменений. Часто наблюдается комбинация появления $I_{Na,L}$ и других изменений, в то же время есть данные о других сочетаниях (Таблица 1). Предполагается, что S²¹⁶L вызывает LQT3, из-за значительного увеличения позднего $I_{Na,L}$, а также ускорения восстановления после инактивации. Этот вариант также был выявлен у пациента с BrS1, что согласуется со

значительным снижением пиковой плотности I_{Na} . Поэтому считается, что $S^{216}L$ вызывает смешанный фенотип BrS1/LQT3. Механизмы сосуществования гиперфункции и дисфункции канала остаются неясными; исследования предполагают, что некоторые факторы окружающей среды могут играть важную роль в формировании фенотипа, или могут играть роль какие-либо невыявленные генетические варианты (Han et al., 2018).

Таблица 1 – Комплексные изменения функциональных характеристик при мутациях в *SCN5A* ассоциированных с LQT3 (Zaytseva et al., 2024)

Механизм	Мутация	Локализация
Ускорение восстановления из инактивации и увеличение позднего тока	S ²¹⁶ L	IS3-S4
	L ⁶¹⁹ F	I-II
	R ⁶⁸⁰ H	I-II
	T ¹³⁰⁴ M	III-S4
	F ¹⁴⁸⁶ L	III-IV
	R ¹⁶⁴⁴ C	IVS4-S5
	F ²⁰⁰⁴ L	C-конец
	P ²⁰⁰⁶ A	C-конец
Усиление инактивации и увеличение позднего тока	R ¹⁶²⁶ P	IVS4
	Y ¹⁷⁶⁷ C	IVS6
	L ¹⁸²⁵ P	C-конец
	E ¹⁹⁰¹ Q	C-конец
	S ¹⁹⁰⁴ L	C-конец
	Q ¹⁹⁰⁹ R	C-конец
Нарушение активации и инактивации	R ²²² Q	IS4
	R ³⁴⁰ Q	IS5-S6
	P ¹³³² L	III-S4-S5
	V ¹⁷⁷⁷ M	C-конец
Нарушение инактивации и ускорение восстановления из инактивации	V ¹²⁵ L	N-конец
	E ¹²⁹⁵ K	III-S3-S4
	A ¹³³⁰ P	III-S4-S5
Усиление активации и увеличение позднего тока	S ²¹⁶ L	IS3-S4
	N ⁴⁰⁶ K	IS6
	F ⁸¹⁶ Y	II-S4
Увеличение плотности тока и нарушение инактивации	G ¹⁴⁸¹ V	III-IV

Изменение активации, инактивации и восстановления из инактивации	$S^{1333}Y$	III4-S5
	$T^{1620}K$	IVS3-S4
	$A^{1656}D$	IVS4-S5
Нарушение инактивации и усиление активации	$F^{1473}C$	III-IV
Увеличение позднего тока, усиление инактивации и ускорение восстановления из инактивации	$G^{1631}D$	IVS4
Нарушение инактивации и увеличение позднего тока	$M^{1766}L$	IVS6

На текущий момент имеются данные только о 13 мутациях, ассоциированных с развитием аритмий, в области инактивирующей частицы IFM в линкере III-IV и её сайте связывания. Большинство этих мутаций вызывают синдром LQT3, нарушая быструю инактивацию. Это приводит к увеличению продолжительности плато ПД у кардиомиоцитов, что в конечном итоге вызывает раннюю постдеполяризацию или отсроченную постдеполяризацию.

Мутация $Q^{1491}N$ расположена на С-конце линкера III-IV ниже по течению относительно мотива IFM. Было показано, что эта мутация приводит к увеличению $I_{Na,L}$ в 6 раз и положительным сдвигам кривой стационарной активации и инактивации на 9 мВ и 20 мВ, соответственно (Plumereau et al., 2021). Таким образом, наблюдается увеличение оконного тока, которое может привести к нарушениям работы сердца и развитию LQT3. В соответствии с идеей о том, что нарушение быстрой инактивации увеличивает скорость входа в состояние медленной инактивации, мутация $Q^{1491}N$ облегчает данный переход в 3 раза по сравнению с WT со значительной задержкой восстановления из состояния медленной инактивации. Недавно опубликованная структура hNav1.5 выявила наличие водородной связи между III-IV_Q¹⁴⁹¹ и III5_N¹⁶⁵⁹. Такое же взаимодействие было ранее разрешено в структуре rNav1.5, которая показала, что Q¹⁴⁹³, который эквивалентен Q¹⁴⁹¹ в

hNav1.5, образует сильную водородную связь с N¹⁶⁶¹ (N¹⁶⁵⁹ в hNav1.5). Поскольку между Q¹⁴⁹¹ и N¹⁶⁵⁹ существует водородная связь, мутация Q¹⁴⁹¹N может привести к более слабому взаимодействию с N¹⁶⁵⁹ из-за более короткой имидазольной боковой цепи гистидина. Это ослабленное взаимодействие ухудшит быструю инактивацию и приведет к эффекту усиления функции. Аналогичным образом, мутация K¹⁴⁹³R, которая затрагивает высококонсервативный остаток в линкере III-IV и локализованная на две аминокислоты ниже по течению от Q¹⁴⁹¹, продемонстрировала значительный положительный сдвиг зависимости инактивации от напряжения, что также указывает на эффект усиления функции, такой же как при мутации Q¹⁴⁹¹N (Gade et al., 2020).

Структурная модель hNav1.5 в состоянии инактивации показала, что K¹⁴⁹³ зажат между E¹⁷⁸⁰ и E¹⁷⁸⁴ на конце IVS6. Мутация K¹⁴⁹³R может привести к усилению этих взаимодействий, что приведет к стабилизации структуры инактивационных ворот в состоянии покоя (Jiang et al., 2020). Мутация E¹⁷⁸⁴K, локализованная в С-конце, приводит к развитию смешанного фенотипа, включающего признаки BrS1 и LQT3. На уровне функциональных изменений наблюдается нарушение активации и инактивации, появление I_{Na,L} и сокращение времени восстановления из инактивированного состояния (Makita et al., 2008). Интересно, что двойной мутант K¹⁴⁹³E/E¹⁷⁸⁴K приводит к уменьшению I_{Na,L}, что подтверждает наличие взаимодействия между E¹⁷⁸⁴ и K¹⁴⁹³ (Peters et al., 2020).

Остаток F¹⁴⁷³ локализован в III S6 на двенадцать остатков выше по течению относительно мотива IFM. Мутация *de novo* F¹⁴⁷³S была обнаружена у новорожденного с удлинением интервала QT (Bankston et al., 2007). Мутация вызвала 6-кратное увеличение амплитуды I_{Na,L} по сравнению с WT, сдвиг кривой инактивации стационарной на +10 мВ и ускорение восстановления после инактивации. Эти изменения электрофизиологических характеристик отражают неправильное взаимодействие мотива IFM с его гидрофобным сайтом связывания. Аналогичная мутация F¹⁴⁷³S, также была ассоциирована с

экстремальным удлинением интервала QT, и приводила к увеличению $I_{Na,L}$ в 20 раз, сдвигу стационарной инактивации вправо на 20 мВ и ускорению восстановления после инактивации. Кроме того, эта мутация снижала I_{Na} более чем на 80% по сравнению с WT (Ruan et al., 2010).

На N-концевой стороне мотива IFM есть четыре глициновых остатка, которые играют важную роль в поддержании гибкости инактивирующей частицы. Мутация G¹⁴⁸⁹K в гене *SCN1A* (эквивалентная G¹⁴⁷⁶K в *Nav1.5*) вызывает ускоренное в 2-4 раза восстановление после быстрой инактивации. G¹⁴⁸¹, на пять остатков ниже по течению от G¹⁴⁷⁶, который расположен на изгибе III-S6 и начале линкера III-IV, также имеет решающее значение для поддержания гибкости цепочки между III-S6 и мотивом IFM. Мутация G¹⁴⁸¹V приводит к двукратному увеличению $I_{Na,L}$, положительному сдвигу стационарной инактивации на 7 мВ и ускорению восстановления после инактивации (Plumereau et al., 2021). Было показано, что другая мутация, G¹⁴⁸¹E, увеличивает плотность тока и усиливает оконный ток, что приводит к симптомам LQT3 (Tester et al., 2005). Большинство функциональных изменений мутаций LQT3 на N-концевой стороне мотива IFM сходятся к одному и тому же фенотипу: положительный сдвиг кривой стационарной инактивации, увеличение $I_{Na,L}$ и ускорение восстановления после инактивации. Все эти электрофизиологические изменения указывают на неправильное связывание мотива IFM с его гидрофобным рецептором. Это приведет к увеличению $I_{Na,L}$ и, в конечном итоге, кальциевого тока, что приведет к симптомам ранней постдеполяризации или отсроченной постдеполяризации. Мутации, локализованные с C-концевой стороны относительно мотива IFM, имеют тенденцию вызывать большое количество функциональных изменений, например, более быстрый вход в медленную инактивацию и замедление восстановления после нее. Большинство этих изменений электрофизиологических характеристик связаны с уменьшением активности канала, что в конечном итоге приведет к снижению натриевого тока, уменьшая амплитуду и скорость потенциала действия. Некоторые из

этих вариантов вызывают смешанный фенотип, сочетающий признаки LQT3 и синдрома Бругада, что редко наблюдается для мутаций выше по течению от мотива IFM. Классификация различных аритмогенных мутаций является первым шагом на пути к персонализированной точной медицине, где медицинские вмешательства и/или лекарства должны быть адаптированы к генотипу пациента, а не только к его фенотипу.

2.8.2. Мутации, ассоциированные с синдромом Бругада

На текущий момент в базе данных ClinVar зарегистрировано более 1100 генетических миссенс-вариантов, идентифицированных у пациентов с BrS1. В то же время электрофизиологические характеристики были исследованы только для 10% мутаций (Рис.12). Принципиально можно выделить несколько механизмов, которые могут лежать в основе развития BrS1: снижение I_{Na} (Valdivia et al., 2004; Pérez-Hernández et al., 2018), нарушение активации, усиление инактивации и/или медленной инактивации и замедление восстановления из инактивированного состояния (Zhang et al., 2007). Дисфункция $Na_v1.5$ у пациентов с BrS может приводить к сокращению продолжительности ПД (Wilde and Amin, 2018). Аминокислотные замены в $Na_v1.5$ могут также нарушать взаимодействие с белками-партнёрами, изменять регуляцию, снижать интенсивность транспорта канала на мембрану и приводить к усилению белковой деградации каналов. Большинство генетических вариантов в *SCN5A*, идентифицированных у пациентов с BrS1, являются миссенс-вариантами, причём наиболее высокая концентрация генетических вариантов локализована в области P-петель (Zimmer and Surber, 2008).

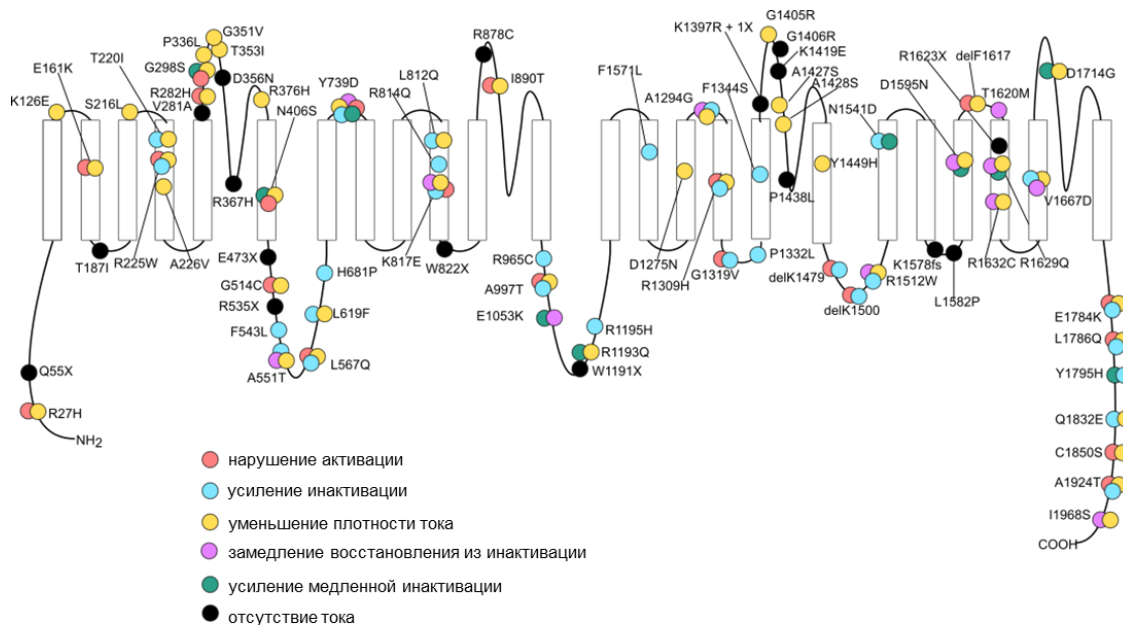


Рисунок 12 – Мутации в *SCN5A*, ассоциированные с BrS1. На рисунке приведены изменения функциональных характеристик, описанные в литературе для конкретной мутации. Ссылки на источники приведены в основном тексте. При наличии более одной работы, характеризующей мутацию, приводится две и более характеристики. Рисунок взят из (Zaytseva et al., 2024).

2.8.2.1. Уменьшение плотности тока

В основе снижения плотности I_{Na} может лежать как уменьшение количества каналов на мембране, так и нарушение активации. Уменьшение плотности I_{Na} может наблюдаться при одиночной замене, или при двух гетерозиготных мутациях ($P^{336}L-I^{1660}V$) (Cordeiro et al., 2006). Миссенс-варианты, при которых наблюдается отсутствие I_{Na} или его существенное снижение, можно классифицировать следующим образом: (1) варианты, приводящие к образованию функционально неактивного канала или существенному уменьшению Na^+ проводимости; и (2) замены, вызывающие нарушение мембранного транспорта $Na_v1.5$.

Формирование функционально неактивных каналов, было показано для генетических вариантов, локализованных в P-петлях канала (IS5-S6_R³⁶⁷H (Takehara et al., 2004); IIS5-S6_R⁸⁷⁸C (Zhang et al., 2008); IIS5-

S6_G¹⁴⁰⁶R (Kyndt et al., 2001; Tan et al., 2006); и III5-S6_P¹⁴³⁸L (Six et al., 2008)). Таким образом, можно предположить, что основным механизмом, в данном случае, является блокирование прохождения ионов Na⁺ через внешнюю пору канала.

Существует ряд генетических вариантов, идентифицированных у пациентов с BrS, которые приводят к существенному снижению I_{Na}, не оказывая влияния на другие функциональные характеристики. Часть этих замен также локализуется в P-петлях IS5-S6_G³⁵¹V, IS5-S6_R³⁷⁶H и III5-S6_A¹⁴²⁷S, III5-S6_A¹⁴²⁸S (Vatta et al., 2002; Rossenbacker et al., 2004; Xiong et al., 2014; Zhu et al., 2015). Вероятно, для вышеперечисленных замен снижение тока также обусловлено затруднением прохождения ионов Na⁺ через внешнюю пору канала. Интересно, что существенное уменьшение плотности I_{Na} было продемонстрировано для варианта IS4_A²²⁶V (Tan et al., 2016), а также для замен IS1-S2_K¹²⁶E (Gütter et al., 2013) и IS3-S4_S²¹⁶L (Marangoni et al., 2011), локализованных во внеклеточных линкерах.

Генетические варианты, нарушающие плотность каналов на плазматической мембране локализованы в различных участках канала и могут оказывать влияние как на фолдинг, так и на сайты связывания с различными внутриклеточными белками, которые влияют на локализацию Na_v1.5. Для ряда мутаций была показана преимущественная локализация каналов в мембране эндоплазматического ретикулума: R¹⁰⁴W, R¹²¹W и R¹⁰⁴K (N-терминальный домен) (Clatot et al., 2012), IS5-S6_T³⁵³I (Pfahnl et al., 2007), IS5-S6_P³³⁶L/IVS5_I¹⁶⁶⁰V (Cordeiro et al., 2006), III3_D¹²⁷⁵N (Olson et al., 2005), III5-S6_R¹⁴³²G (Baroudi et al., 2001) и IVS5-S6_G¹⁷⁴³R (Valdivia et al., 2004). Интересно, что описанный выше эффект может наблюдаться или не наблюдаться в зависимости от используемого модельного объекта. Так, мутантные каналы R¹⁴³²G в модели гетерологической системы экспрессии tsA201 приводили к ко-локализации Na_v1.5-R¹⁴³²G с кальнексином в ЭПР и отсутствию детектируемого натриевого тока (Baroudi et al., 2001), в то время как в модели ооцитов *Xenopus l.* детектировался I_{Na} нормальной амплитуды.

Можно предположить, что результат, полученный в системе экспрессии tsA-201, обусловлен нарушением транспорта мутантного канала.

В случае мутации E¹⁰⁵³K (линкер II-III), локализованной в анкирин-связывающем мотиве, нарушается транспорт каналов на мембрану кардиомиоцитов (Mohler et al., 2004), в то время как в исследованиях на модели клеточной линии HEK293 не наблюдается дефекта транспорта Na_v1.5, как и снижения плотности тока. Таким образом, вероятно, генетический вариант E¹⁰⁵³K не влияет на фолдинг. Данный случай иллюстрирует важность обоснованного выбора используемой модели для проведения электрофизиологических исследований, так как модели гетерологической системы экспрессии не учитывают тканеспецифичные особенности кардиомиоцитов.

В качестве другого примера мутации, ассоциированной с синдромом Бругада, которая вызывает нарушение взаимодействия Na_v1.5 с различными белками, можно привести I-II_R⁵²⁶H. Этот генетический вариант приводит к изменению сайта узнавания протеинкиназы A (PKA), что оказывает влияние на работу сигнальных путей, регулирующих транспорт канала на мембрану. В целом, последствия замены R⁵²⁶H совпадают с последствиями элиминирования сайта фосфорилирования PKA (S⁵²⁸A) (Aiba et al., 2014). Следует отметить, что функциональные характеристики R⁵²⁶H не изменились (Aiba et al., 2014). Известны мутации, при которых меняется регуляция каналов в ответ на изменения внешней среды. Например, генетический вариант III-IV_R¹⁵¹²W приводит к уменьшению плотности I_{Na} на 30% при физиологических значениях pH и на 50% при ацидозе (pH 7.0) (Zheng et al., 2016).

Таким образом, формирование функционально неактивных каналов и уменьшение плотности I_{Na} является широко распространенным механизмом развития синдрома Бругада при миссенс-мутациях.

2.8.2.2. Нарушение стационарной активации

Положительный сдвиг кривой стационарной активации является следствием роста порога активации $Na_{v1.5}$ и приводит к замедлению нарастания деполяризации в ходе ПД. Наиболее значительные сдвиги кривой стационарной активации были продемонстрированы для генетических вариантов в сенсорах напряжения IS4_E¹⁶¹K (Smits et al., 2005a) и PIS4_K817E (Kinoshita et al., 2016). Меньшие по амплитуде сдвиги кривых были показаны для замен, локализованных в линкерах IVS3-S4 и PIS4-S5 и PIS5: PIS4-S5_G¹³¹⁹V вызывала небольшой положительный сдвиг стационарной активации (Casini et al., 2007), а варианты IVS3-S4_T¹⁶²⁰M и PIS5_F¹³⁴⁴S приводили к существенному замедлению активации при повышении температуры (Baroudi et al., 2000; Keller et al., 2006). Замена I-II_G⁵¹⁴C также может препятствовать переходу канала в открытое состояние (Tan et al., 2001). Таким образом, замедление активации приводит к сокращению времени пикового тока и к снижению I_{Na} в правом желудочке (Amin et al., 2010). Предполагается, что уменьшение I_{Na} приводит к невозможности активации быстрого выходящего калиевого тока (Amin et al., 2010).

2.8.2.3. Усиление стационарной инактивации

Отрицательный сдвиг кривой инактивации отражает уменьшение доли каналов, способных активироваться при определенных потенциалах, что вносит вклад в замедление нарастания деполяризации во время фазы 0 ПД сердца. Ускорение инактивации может наблюдаться в отсутствии изменения других электрофизиологических параметров: IS5_T²²⁰I (Olesen et al., 2012), II-III_R⁹⁶⁵C (Hsueh et al., 2009) и II-III_R¹¹⁹⁵H (Medeiros-Domingo et al., 2009). Стабилизация инактивированного состояния $Na_{v1.5}$ обуславливает снижение I_{Na} , замедление нарастания ПД и приводит к замедлению проведения в предсердиях и желудочках, что нарушает баланс входящих и выходящих токов во время фазы 1 ПД и сокращает фазу плато (Wang et al., 2015).

2.8.2.4. Усиление медленной и промежуточной инактивации

Стабилизация состояний промежуточной и медленной инактивации также является одним из предполагаемых механизмов дисфункции $Na_v1.5$ при BrS1. Впервые данный механизм был показан для генетического варианта $^{1795}insD$ (Veldkamp et al., 2000). Усиление медленной инактивации приводит к увеличению числа инактивированных каналов и, как следствие, снижению I_{Na} , в особенности при высоких частотах стимуляции т. е. при высокой частоте сердечных сокращений. Это согласуется с значительным увеличением подъема сегмента ST во время физической нагрузки у пациентов с $^{1795}insD$ (Veldkamp et al., 2000). При этом $^{1795}insD-Na_v1.5$ приводит к $I_{Na,L}$, однако, значимое удлинение интервала QT было зарегистрировано только при удлиненных RR интервалах. Предполагается, что успешно восстановившиеся из инактивированного состояния каналы приводят к появлению не инактивирующейся фракции каналов. Усиление медленной инактивации было продемонстрировано для небольшого числа генетических вариантов и во всех случаях наблюдалось в сочетании с изменениями других электрофизиологических характеристик. Усиление медленной инактивации было показано для замен IS5-S6_G²⁹⁸S (Wang et al., 2002), IS6_N⁴⁰⁶S (Itoh et al., 2007), II-III_E¹⁰⁵³K (Mohler et al., 2004), II-III_R¹¹⁹³Q (Wang et al., 2004), III4-S5_G¹³¹⁹V (Casini et al., 2007), III-IV_K¹⁵²⁷R/IVS2_A¹⁵⁶⁹P (Yokoi et al., 2005), IVS3_D¹⁵⁹⁵N (Wang et al., 2002), IVS3-S4_T¹⁶²⁰M (Wang et al., 2000), IVS4_R¹⁶²⁹Q (Zeng et al., 2013), IVS5-S6_S¹⁷¹⁰L (Shirai et al., 2002), IVS5-S6_D¹⁷¹⁴G (Amin et al., 2005) и Y¹⁷⁹⁵H (С-конец) (Rivolta et al., 2001). Однако ускорение перехода в состояние медленной инактивации не может рассматриваться в качестве распространенного механизма развития синдрома Бругада вследствие того, что внезапная смерть в большинстве случаев происходит во время сна при низкой частоте сердечных сокращений, когда переход в данное состояние канала наименее вероятен (Amin et al., 2010). Тем не менее нельзя исключать, что небольшое по амплитуде нарушение

активности $Na_v1.5$ при низкой ЧСС также может вносить вклад в клинические проявления.

2.8.2.5. Замедление восстановления из инактивированного состояния

Снижение скорости восстановления из инактивации может приводить к возникновению аритмогенных событий за счет снижения I_{Na} во время повторных деполяризующих импульсов. В большинстве случаев, замедление восстановления из инактивированного состояния было показано наряду с другими функциональными изменениями, за исключением генетического варианта $G^{35}S$ (N-терминальный домен) для которого увеличение времени восстановления из инактивированного состояния было единственным показанным изменением электрофизиологических характеристик (Gütter et al., 2013).

2.8.2.6. Комплексное изменение функциональных характеристик

Большинство генетических вариантов, ассоциированных с BrS1, приводят к сочетанию изменений различных электрофизиологических свойств. Усиление инактивации в сочетании с изменениями других функциональных характеристик $Na_v1.5$ наблюдается наиболее часто (см. Таблицу 2).

Таблица 2 – Комплексные изменения функциональных характеристик при мутациях в *SCN5A*, ассоциированных с BrS1 (Zaytseva et al., 2024)

Механизм	Мутация	Локализация
Снижение плотности тока, нарушение активации и усиление инактивации	R ²⁷ H	N-конец
	R ²²⁵ W	IS4
	H ⁶⁸¹ P	I-II
	A ⁹⁹⁷ T	II-III
	R ¹³⁰⁹ H	IIIS4
	L ¹⁷⁸⁶ Q	C-конец
	A ¹⁹²⁴ T	C-конец
Снижение плотности тока и усиление инактивации	T ²²⁰ I	IS4
	L ⁸¹² Q	IIIS4
	R ¹⁰²³ H	II-III
	Q ¹⁸³² E	C-конец
Нарушение активации и усиление медленной инактивации	N ⁴⁰⁶ S	IS6
	G ⁷⁵² R	IIIS2
	S ¹⁷¹⁰ L	IVS5-S6
Снижение плотности тока и нарушение активации	E ¹⁶¹ K	IS2
	R ²⁸² H	IS5-S6
	L ³²⁵ R	IS5-S6
Снижение плотности тока и замедление восстановления из инактивации	A ⁵⁵¹ T	I-II
	delF ¹⁶¹⁷	IVS4
	R ¹⁶³² C	IVS3
Нарушение активации и замедление восстановления из инактивации	A ⁷³⁵ V	IIIS1
	delK ¹⁴⁷⁹	III-IV
Нарушение активации и усиление инактивации	A ¹⁶⁴⁹ V	IVS4-S5
	delK ¹⁵⁰⁰	III-IV

Усиление инактивации, усиление медленной инактивации и замедление восстановления из инактивации	R ¹⁵¹² W R ¹⁶²⁹ Q	III-IV IVS4
Снижение плотности тока и усиление медленной инактивации	G ²⁹⁸ S	IS5-S6
Снижение плотности тока, усиление медленной инактивации и замедление восстановления из инактивации	D ¹⁵⁹⁵ N V ¹⁶⁶⁷ D	IVS3 IVS5
Нарушение активации, усиление инактивации и замедление восстановления из инактивации	L ⁵⁶⁷ Q	I-II
Усиление инактивации и усиление медленной инактивации	N ¹⁵⁴¹ D	IVS1

Современное знание генетического и молекулярного патогенеза наследственных аритмогенных синдромов ограничено отсутствием золотого стандарта, который решал бы вопросы стратификации риска и терапии. Учитывая недостаток данных, крайне важно стратифицировать риск, используя все применимые инструменты/методы, которые доказали свою прогностическую ценность. Таким образом, разработка и проверка модельного показателя риска, которая интегрирует различные клинические, генетические, электрокардиографические и электрофизиологические маркеры, а также факторы окружающей среды могут улучшить прогнозирование развития аритмии и внезапной сердечной смерти и подбор терапии.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Клинические данные

Исследования выполнены в соответствии с Хельсинкской декларацией и получено одобрение Этического комитета Национального медицинского исследовательского центра им. Алмазова. До проведения исследований от пациентов было получено письменное информированное согласие.

3.2. Генетический анализ, мутагенез и гетерологическая система экспрессии

Целевое секвенирование пациентов с генетическими вариантами $Y^{739}D$ и $A^{1294}G$ было выполнено на Illumina MiSeq с использованием набора Haloplex с панелью из 108 генов, связанных с наследственными заболеваниями сердца, как описано ранее (Kostareva et al., 2016). Все генетические варианты, ассоциированные с заболеванием, были подтверждены секвенированием по Сэнгеру и классифицированы в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики (Richards et al., 2015).

Вектор pcDNA3.1 с $hNa_v1.5$ -WT и GFP ($hH1$ -pcDNA3.1) был любезно предоставлен профессором Хьюго Абриэлем (Институт биохимии и молекулярной медицины, Бернский университет, Берн, Швейцария). Сайт-направленный мутагенез осуществляли методом ПЦР-амплификации по стандартному протоколу мутагенеза с перекрывающимися праймерами (Таблица 3) после чего верифицировали с помощью секвенирования по Сэнгеру. $hH1$ -pcDNA3.1 (1 мкг) или pcDNA3.1 с исследуемой заменой (1 мкг) трансфицировали в клетки HEK293T или CHO-K1, растущие на чашках диаметром 3 см, с использованием водного раствора гидрохлорида линейного полиэтиленimina с концентрацией 1 мг/мл. (PEI, MW 40,000, Polysciences) в соотношении 2:1 с плазмидной ДНК. После трансфекции клетки культивировали в среде DMEM для линии HEK293T или среде DMEM/F-12 CHO-K1 с добавлением 2 mM глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific) в CO₂-инкубаторе при +37°C в

течение 24 часов, а затем пересеивали на стёкла, покрытые полилизинном (Sigma Aldrich) для последующих электрофизиологических экспериментов.

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности праймеров, использовавшихся в ходе сайт-специфического мутагенеза

Мутация	Используемые праймеры
Y ⁷³⁹ D	TGTTGTCGTGCTCCAGCGCCATGAAGAGTGT TGGAGCACGACAACATGACAAGTGAATTCG
A ¹²⁹⁴ G	GGCTTTGGCGAGATGGGCCCCATCAAGTCACTGCGG ACGC CATCTCGCCAAAGCCCAGGGTGTGGCCACCAGGCT GACC
N ¹⁷³⁶ R	AGCAGAGGCTCTCGGGGGGACTGCGGGAGCCCAGC C CCGAGAGCCTCTGCTGTTGGGCAGAGTGGG
E ¹²⁹⁵ R	GGCCAACACCCTGGGCTTTGCCAGGATGGG AGTGACTTGATGGGGCCCATCCTGGCAAAG
R ¹⁷³⁹ E	TGCCCAACAGCAATGGCTCTGAGGGGGACT CGGCTGGGCTCCCGCAGTCCCCCTCAGAGC

3.3. Электрофизиология

Натриевый ток I_{Na} регистрировали с использованием метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «целая клетка» (whole-cell). Все измерения проводили при комнатной температуре. Внеклеточный раствор содержал (ммоль/л): 140 NaCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 глюкозы. (pH 7,4 CsOH). Внутриклеточный раствор содержал (ммоль/л): 130 CsCl, 10 NaCl, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7,3 CsOH). Микроэлектроды изготавливали из боросиликатного стекла с помощью пуллера (P-1000, Sutter Instrument). Сопротивление электродов составляло от 1,8 до 2,5 МОм. Последовательное сопротивление компенсировалось на уровне 75-80%. Сбор данных осуществлялся с помощью усилителя Axopatch 200B (Molecular

devices) и программного обеспечения Clampfit версии 10.3 (Molecular devices). Токи регистрировались с частотой 20-50 кГц с фильтрации низких частотами на 5 кГц с использованием аналого-цифрового интерфейса (система сбора данных Digidata 1440A, Molecular devices). Для проведения электрофизиологических экспериментов использовалось не менее трех независимых трансфекций.

3.4. Анализ данных

Поддерживаемый потенциал для всех используемых протоколов составлял -100 мВ. Вольтамперная характеристика (ВАХ) регистрировалась с помощью протокола с прямоугольными импульсами от -80 до 60 мВ в течение 40 мс с шагом 5 мВ при частоте 1 Гц. Максимальное значение I_{Na} было зарегистрировано для каждого потенциала, далее рассчитывалась проводимость (G) в соответствующих точках по следующему уравнению:

$$G = \frac{I_{Na}}{V - V_{rev}}$$

где V — мембранный потенциал, а V_{rev} — потенциал реверсии. Потенциал реверсии определялся посредством решения уравнения прямой для линейного участка графика ВАХ. График кривой стационарной активации представлен в виде зависимости нормированной G от напряжения. Аппроксимация кривой стационарной активации проводилась с помощью функции Больцмана:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{1/2} - V}{k}}}$$

, где G_{max} — максимальная натриевая проводимость, $V_{1/2}$ — потенциал 50% активации, k — коэффициент наклона. Плотность тока вычисляли с помощью нормирования значений I_{Na} на емкость клетки.

Зависимость стационарной инактивации от напряжения была получена с использованием двухступенчатого протокола с первым импульсом длительностью 500 мс, варьирующим от -120 до 0 мВ с шагом 5 мВ, и тестирующим импульсом -15 мВ продолжительностью 20 мс. График

стационарной инактивации представляет собой зависимость нормированного I_{Na} в ответ на тестирующий импульс от напряжения первого импульса. Кривые стационарной инактивации аппроксимировали функцией Больцмана. Потенциал-зависимость быстрой инактивации оценивали аналогичным образом, но длительность первого импульса составляла 20 мс. Данные стационарной промежуточной инактивации получали, используя первый импульс длительностью 1000 мс, за которым следовала гиперполяризация при -100 мВ длительностью 20 мс, чтобы обеспечить восстановление после быстрой инактивации. Зависимость стационарной медленной инактивации от напряжения регистрировалась с использованием 10-секундного первого импульса с последующей гиперполяризацией в течение 20 мс до -100 мВ, чтобы обеспечить восстановление из состояния быстрой инактивации.

Кинетику восстановления после инактивации определяли с использованием двухступенчатого протокола с первым импульсом длительностью 500 мс при -15 мВ, за которым следовал интервал гиперполяризации при -100 мВ различной продолжительности от 1 мс до 3000 мс и тестирующий импульс -15 мВ продолжительностью 20 мс. I_{Na} , зарегистрированный в ответ на тестирующий импульс, был нормализован относительно максимального значения тока ($I_{Na(max)}$) и была построена зависимость от времени восстановления из инактивации (продолжительности интервала гиперполяризации). Кривые аппроксимировались двойной экспоненциальной функцией:

$$y = A_{fast} \times 1 - e^{-\frac{t}{t_{fast}}} + A_{slow} \times 1 - e^{-\frac{t}{t_{slow}}}$$

, где A_{fast} и A_{slow} — фракции компонент быстрой и медленной инактивации соответственно, а t_{fast} и t_{slow} — их постоянные времени. Кинетика восстановления после быстрой или промежуточной инактивации была получена с использованием аналогичных протоколов, но с длительностью первого импульса 20 мс или 1000 мс соответственно.

Развитие промежуточной инактивации определяли с помощью двух-импульсного протокола, с варьирующей продолжительностью от 1 до 3000 мс первого деполяризующего импульса -15 мВ с последующим 20 мс интервалом гиперполяризации при -100 мВ и тестирующим импульсом (-15 мВ). I_{Na2} , полученный от второго импульса был нормирован на значение амплитуды I_{Na1} , зарегистрированной в ответ на первый деполяризующий импульс и была построена зависимость I_{Na2}/I_{Na1} от длительности первого импульса. Кривые аппроксимировались с помощью моно-экспоненциальной функции: $y=y_0+A \times \exp(-t/\tau)$, где τ – постоянная времени. Развитие медленной инактивации оценивали с помощью двух-импульсного протокола с варьирующей продолжительностью (1-45 с) первого импульса до -40 мВ (P1) и тестирующим импульсом -15 мВ в течение 40 мс (P2). I_{Na2} , полученный от второго тестирующего импульса (P2) при -15 мВ, был нормализован относительно тока, зарегистрированного в ответ на P1 (I_{Na1}), и была построена зависимость I_{Na2}/I_{Na1} от длительности первого импульса.

Для исследования влияния стимуляции на активность каналов использовалась подача повторяющихся деполяризующих 500 мс импульсов до -15 мВ на разных частотах (0,66 Гц и 1,92 Гц). I_{Na} , вызываемый каждым импульсом, нормировался на ток, зарегистрированный в ответ на первый импульс.

3.5. Статистический анализ

Данные электрофизиологических экспериментов представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Статистические сравнения проводились с использованием двухвыборочного t-критерия для независимых выборок, где $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Коррекция множественных сравнений проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга.

3.6. Молекулярное моделирование

Методология нашего подхода к молекулярному моделированию с помощью программы ZMM описана в ряде работ (Bruhova and Zhorov, 2010; Garden and Zhorov, 2010; Tikhonov and Zhorov, 2017). Невалентные взаимодействия рассчитывались с помощью силового поля AMBER (Weiner et al., 1986) с предельным расстоянием 9 Å и функцией сдвига (Brooks et al., 1985). Для расчёта электростатических взаимодействий использовали диэлектрическую функцию, зависящую от расстояния и окружения (Garden and Zhorov, 2010), без ограничения расстояния для взаимодействий с участием ионизированных групп. Для построения гомологических моделей hNa_v1.5 и hNa_v1.5-Y⁷³⁹D использовалась крио-ЭМ структура канала rNa_v1.5, ближайший к hNa_v1.5 канал, чья структура была опубликована ко времени наших экспериментов (Jiang et al., 2020). Для построения моделей мутантных каналов hNa_v1.5 (E¹²⁹⁵R, R¹⁷³⁹E, E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E) мы использовали крио-ЭМ структуру канала Na_v1.5 человека (Li et al., 2021b). Модели были оптимизированы с помощью метода минимизации энергии Монте-Карло (МКМ) (Li and Scheraga, 1987) в пространстве обобщенных координат (Zhorov, 1981), включающих торсионные углы и валентные углы пролинов. Расчёт траекторий МКМ прекращался, когда 2000 последовательных минимизаций не уменьшали энергию предполагаемого глобального минимума. Помимо полноценной модели hNa_v1.5, мы использовали уменьшенные модели, включающие только ПЧД-III и ДП-IV.

Крио-ЭМ структуры натриевых каналов выравнивались путем минимизации среднеквадратичных отклонений атомов Са в спиральях P1 относительно кристаллической структуры калиевого канала K_v1.2-K_v2.1 (PDB ID: 2R9R), первого эукариотического P-loop канала, для которого была получена кристаллическая структура с высоким разрешением (2,4 Å) (Long et al., 2007).

Для сохранения общего фолдинга каналов, мы использовали ограничительные функции «pin» (pin constraints). Это параболические

функции с плоским дном, которые вносят вклад в полную энергию модели. Эти функции позволяют альфа-углероду аминокислотного остатка отклоняться в пределах 1 Å от соответствующего экспериментального положения без штрафа и не допускают более значительные отклонения. Для всех ограничений энергетический штраф был рассчитан с силовой постоянной 10 ккал моль⁻¹ Å⁻².

Электростатический потенциал на доступных растворителям поверхностях ПЧД-III и ДП-IV визуализировали с помощью расчетов Пуассона-Больцмана с плагином (APBS) для PyMol (Baker et al., 2001). Атомные заряды и радиусы генерировались сервером PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004).

3.6.1. *In Silico* Деактивация ПЧД-III

Крио-ЭМ структуры канала rNa_v1.5 в апо- и токсин-связанной фазе (Jiang et al., 2021c) показывают, что токсин-индуцированная деактивация ПЧД-IV вызывает большие сдвиги спирали IVS4 и значительные конформационные изменения в петле IVS3-S4 и С-концевой части спирали III3, но довольно небольшие структурные изменения в других сегментах ПЧД-IV. На основании этих данных мы зафиксировали атомы Cα в спиральях III1 и III2 и цитоплазматической половине спирали III3, в то время как другие части канала могли свободно сдвигаться. Крио-ЭМ структура hNa_v1.5 (идентификатор PDB: 6lqa), в которой активированы все ПЧД, использовалась в качестве исходной конформации для деактивации *in silico*. Атомы Cα пяти основных остатков в спирали III4 последовательно продвигали через 21 набор плоскостей, перпендикулярных оси поры канала. Две соседние плоскости находились на расстоянии 0,5 Å друг от друга. На каждом этапе *in silico* деактивации атомы Cα основных остатков могли перемещаться в пределах соответствующей плоскости, но не покидать её пределы. Траектория МКМ на каждый шаг протокола деактивации прерывалась, когда последние 200 последовательных минимизаций энергии не улучшали предполагаемый глобальный минимум, полученный на соответствующем шаге. Исходная

конформация для следующего шага дезактивации соответствовала минимизированной МК конформации предыдущего шага. Во время этих расчетов солевой мостик между E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹ был зафиксирован. Аналогичная методология была использована для *in silico* дезактивации ПЧД-II в натриевом канале насекомых при связывании токсина скорпиона (Zhorov et al., 2021).

3.6.2. Моделирование ДП в открытом и закрытом состояниях

Структура hNa_v1.5 в комплексе с хинидином (идентификатор PDB: 6lqa) имеет ДП в вероятно, инактивированном состоянии, а ПЧД — в активированном состоянии (Li et al., 2021b). Для моделирования ДП в активированном и закрытом состояниях мы использовали в качестве шаблонов структуры с открытыми и закрытыми порами канала Na_vAb (коды PDB 5vb8 и 5vb2 соответственно) (Lenaeus et al., 2017). Фолдинг спиралей P1, которые являются наиболее 3D-консервативными элементами каналов P-петли (Tikhonov and Zhorov, 2012), совпадает с таковым в K_v1.2/K_v2.1, первом эукариотическом канале P-петли, кристаллическая структура которого была получена с относительно высоким разрешением ниже 2,5 Å (идентификатор PDB: 2R9R) (Long et al., 2007). Каналы Na_vAb и hNa_v1.5 имеют довольно сходную укладку трансмембранных (ТМ) и P1 спиралей, но разную укладку внеклеточных петель, особенно в области ДП. Поэтому мы установили ограничения по расстоянию между атомами C α в спиральных ТМ и P1 hNa_v1.5 и соответствующими атомами C α шаблона, тогда как для внутри- и внеклеточных петель ограничений по расстоянию не было. Ограничение расстояния представляет собой параболическую функцию с плоским дном, которая налагает энергетический штраф с силовым ограничением в 10 ккал·моль⁻¹ Å⁻², если атом C α в модели отклоняется от атома, соответствующего шаблону, более чем на 2 Å. Трехмерное выравнивание осуществлялось путем пошагового уменьшения расстояний между атомами C α в модели и шаблоне. На каждом шаге энергия минимизировалась по методу МКМ со всеми степенями свободы, допускаемыми изменением. Более

подробные методологические сведения о преобразованиях ДП описаны в работе (Korkosh et al., 2019).

3.6.3. Моделирование ПЧД в состоянии покоя

Для моделирования ПЧД в состоянии покоя мы использовали в качестве шаблона кристаллическую структуру прокариотического натриевого канала Na_vAb с деактивированными ПЧД (идентификатор PDB: 6r6x) (Wisedchaisri et al., 2019). Методика аналогична той, что используется для моделирования канала с открытым и закрытым ДП.

3.6.4. Обозначения и визуализация остатков

Мы обозначаем остаток однобуквенным кодом с номером остатка в верхнем индексе. Повтор и сегмент канала, в котором локализован остаток, указан перед номером остатка и выделен нижним подчёркиванием. Экспериментальные структуры и модели были визуализированы с помощью системы молекулярной графики PyMol, версия 0.99rc (Шредингер, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Функциональная характеристика и структурная интерпретация генетического варианта $Na_v1.5-Y^{739}D$

В ходе генетических исследований пациентов с наследственными аритмиями с применением целевого секвенирования кандидатных генов был идентифицирован новый генетический вариант $Na_v1.5-Y^{739}D$, обнаруженный у пациента мужского пола с BrS1. Мы создали соответствующую мутантную конструкцию, гетерологически экспрессировали её в системе экспрессии HEK293-T и обнаружили, что генетический вариант $Na_v1.5-Y^{739}D$ существенно изменил электрофизиологические характеристики по сравнению с каналом WT. Высоко консервативный тирозин Y^{739} локализован во внеклеточной петле IIS1-S2 в ПЧД-II. Мы построили гомологические модели каналов $hNa_v1.5-WT$ и $hNa_v1.5-Y^{739}D$, сравнили межсегментные контакты Y^{739} и $Y^{739}D$ и предложили возможные механизмы, с помощью которых генетический вариант может влиять на электрофизиологические характеристики $Na_v1.5$.

4.1.1. Фенотипическая характеристика пациента и идентификация генетического варианта $Y^{739}D$

У мальчика 4-х лет диагностирован синдром Бругада на основании типичной ЭКГ-картины, проявившейся во время приступа лихорадки – $38,4^{\circ}C$ в течение 4 ч и синкопического анамнеза. В семейном анамнезе случаев внезапной сердечной смерти не зарегистрировано, и ни у одного из братьев и сестер не было выявлено сходного ЭКГ-паттерна или обмороков. Генетический анализ с использованием панели из 108 генов, ассоциированных с развитием наследственных заболеваний сердца, выявил новый генетический вариант $SCN5A$ (chr3: 38639267:A>C NM_001160161.2.; c.2215T>G, p.Y739D), расположенный во внеклеточной петле IIS1-S2 (Рисунок 13А, Б). Ни у одного из родственников не было идентифицированного варианта, поэтому его следует рассматривать как вариант *de novo*. Этот вариант не зарегистрирован в базе данных gnomAD, ClinVar или любых других базах данных. На

основании руководства ACMG этот вариант был классифицирован как вариант неизвестной клинической значимости. С помощью инструментов прогнозирования *in silico*, таких как Mutation Tester, Mutation Assessmentor, Provean, FIFT и LRT новый генетический вариант был классифицирован как патогенный.

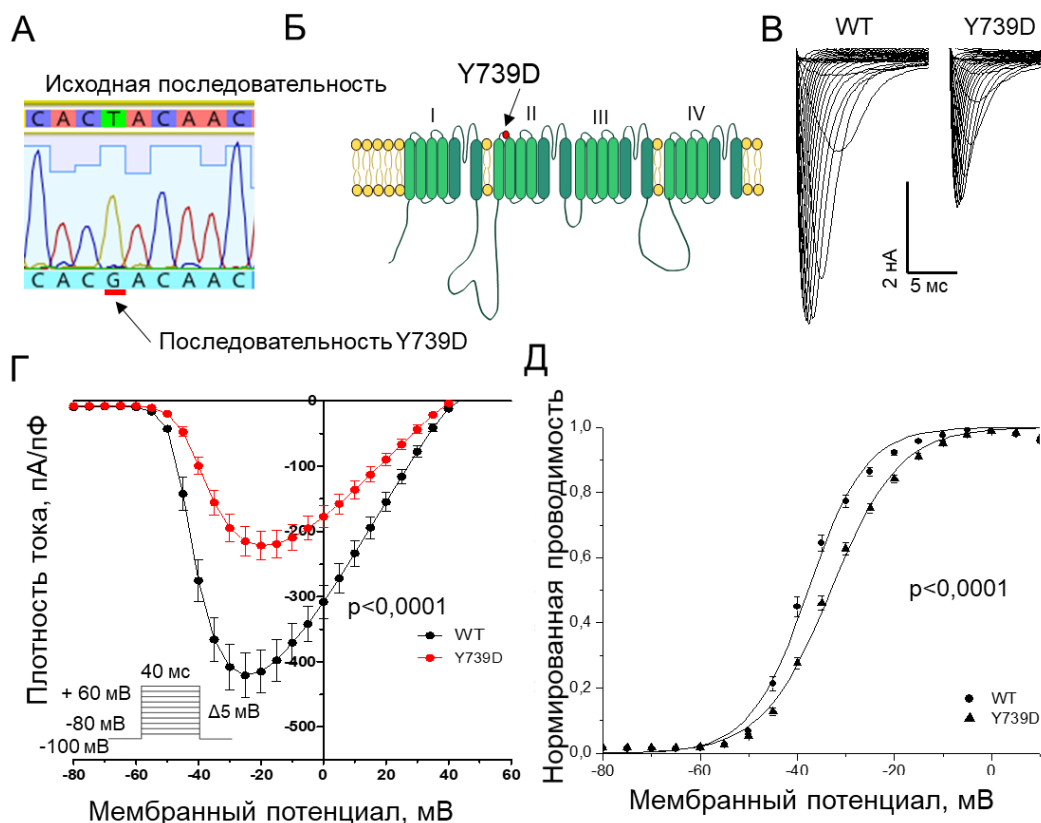


Рисунок 13 – Идентификация нового генетического варианта. А.

Генетическая характеристика пробанда. Электрофорограмма, полученная в результате анализа последовательности гена *SCN5A*. Стрелкой обозначен нуклеотид в позиции 2209 гена *SCN5A* ((NM_198056.2:c.2209A<G, p.Y⁷³⁹D), где была идентифицирована замена у пробанда. Б. Мембранная топология *Nav1.5*. Вариант Y⁷³⁹D локализован в петле II_S1–S2 (обозначен стрелкой).

В. Записи натриевых токов от каналов *Nav1.5*-WT и *Nav1.5*-Y⁷³⁹D.

Репрезентативные записи натриевых токов в ответ на протокол с прямоугольным деполяризующим импульсом от -80 мВ до +60 мВ с шагом в 5 мВ при поддерживаемом потенциала -100 мВ. на модели клеточной

линии HEK293-Т, с экспрессированными $\text{Na}_v1.5\text{-WT}$ или $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$. Г. Вольтамперная характеристика для $\text{Na}_v1.5\text{-WT}$ (чёрные круги, $n=42$) и Y^{739}D (красные круги, $n=33$). Е. Потенциал-зависимость стационарной активации для $\text{Na}_v1.5\text{-WT}$ (чёрные круги, $n=42$) и Y^{739}D (чёрные треугольники, $n=33$). Сплошные линии соответствуют функции Больцманна для WT и Y^{739}D , подобранной с помощью метода наименьших квадратов (Zaytseva et al., 2022).

4.1.2. Биофизическая характеристика канала $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$

Для выяснения функциональных характеристик генетического варианта Y^{739}D мы создали плазмидный вектор с соответствующей заменой/ каналы $\text{Na}_v1.5\text{-WT}$ или $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$ были экспрессированы в клетках HEK293-Т, после чего проводилась регистрация натриевых токов. Мутант Y^{739}D демонстрировал типичный натриевый ток, напоминающий ток для канала дикого типа (Рисунок 13В). Плотность I_{Na} канала Y^{739}D , измеренная при -20 мВ при поддерживающем потенциале -100 мВ, была значительно меньше, чем у WT (Рисунок 13Г, таблица 4). Мы также наблюдали, что генетический вариант приводит к небольшому деполяризующему сдвигу и увеличению константы наклона кривой потенциал-зависимости стационарной активации (Рисунок 13Д, таблица 4). Таким образом, для активации каналов Y^{739}D требуется более положительные потенциалы чем для каналов WT.

Таблица 4 – Биофизические характеристики $Na_v1.5-Y^{739}D$

		WT	n	$Y^{739}D$	n
Плотность тока при -20 мВ	пА/пФ	-415,0 ± 33,8	42	-221,8 ± 22,1***	33
	$V_{1/2}$, мВ	-37,8 ± 0,6		-33,1 ± 0,6***	
Стационарная активация	$V_{1/2}$, мВ	-37,8 ± 0,6	42	-33,1 ± 0,6***	33
	k	5,3 ± 0,2		6,7 ± 0,2***	
Стационарная инактивация	$V_{1/2}$, мВ	-82,3 ± 1,3	18	-86,9 ± 1,0*	21
	k	5,8 ± 0,2		5,9 ± 0,15	
Стационарная быстрая инактивация	$V_{1/2}$, мВ	-62,6 ± 1,3	10	-68,9 ± 1,4**	15
	k	9,0 ± 0,4		10,6 ± 0,3**	
Восстановление из быстрой инактивации	τ , мВ	17,32 ± 2,07	11	24,35 ± 5,68	8
Восстановление из инактивации	τ_{fast} , мс	16,5 ± 1,5	24	23,2 ± 5,5	9
	A_{fast}	0,89 ± 0,03		0,91 ± 0,06	
	τ_{slow} , мс	227,0 ± 28,6		548,7 ± 289,3	
	A_{slow}	0,21 ± 0,02		0,17 ± 0,04	
Восстановление из медленной инактивации	τ_{fast} , мс	10,5 ± 0,9	15	18,1 ± 3,6*	9
	A_{fast}	0,86 ± 0,018		0,79 ± 0,06	
	τ_{slow} , мс	133,9 ± 12,5		172,7 ± 29,3	
	A_{slow}	0,21 ± 0,016		0,24 ± 0,05	
Развитие медленной инактивации	τ , мс	1851,0 ± 175,8	8	1085,1 ± 254,5*	6
	A	0,32 ± 0,05		0,37 ± 0,05	

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Также мы зарегистрировали зависимость стационарной инактивации от напряжения. Наблюдался и отрицательный сдвиг кривой стационарной инактивации без изменений константы наклона (Рисунок 14А, таблица 4). Однако этот протокол не позволяет выявить, на какой процесс влияет $Y^{739}D$: на переход в состояние быстрой инактивации, медленной

инактивации или на оба. В связи с этим, нами был проведён ряд дополнительных экспериментов, по итогам которых мы продемонстрировали усиление как быстрой, так и медленной инактивации (Рисунок 14Б и В, таблица 4). Затем мы проанализировали время восстановления из инактивированного состояния, из состояний быстрой инактивации и медленной инактивации (Рисунок 14Г-Е). Мутация Y⁷³⁹D не приводила к изменению характеристик восстановления из состояния инактивации и быстрой инактивации, но нарушала процесс восстановления из состояния медленной инактивации (таблица 4).

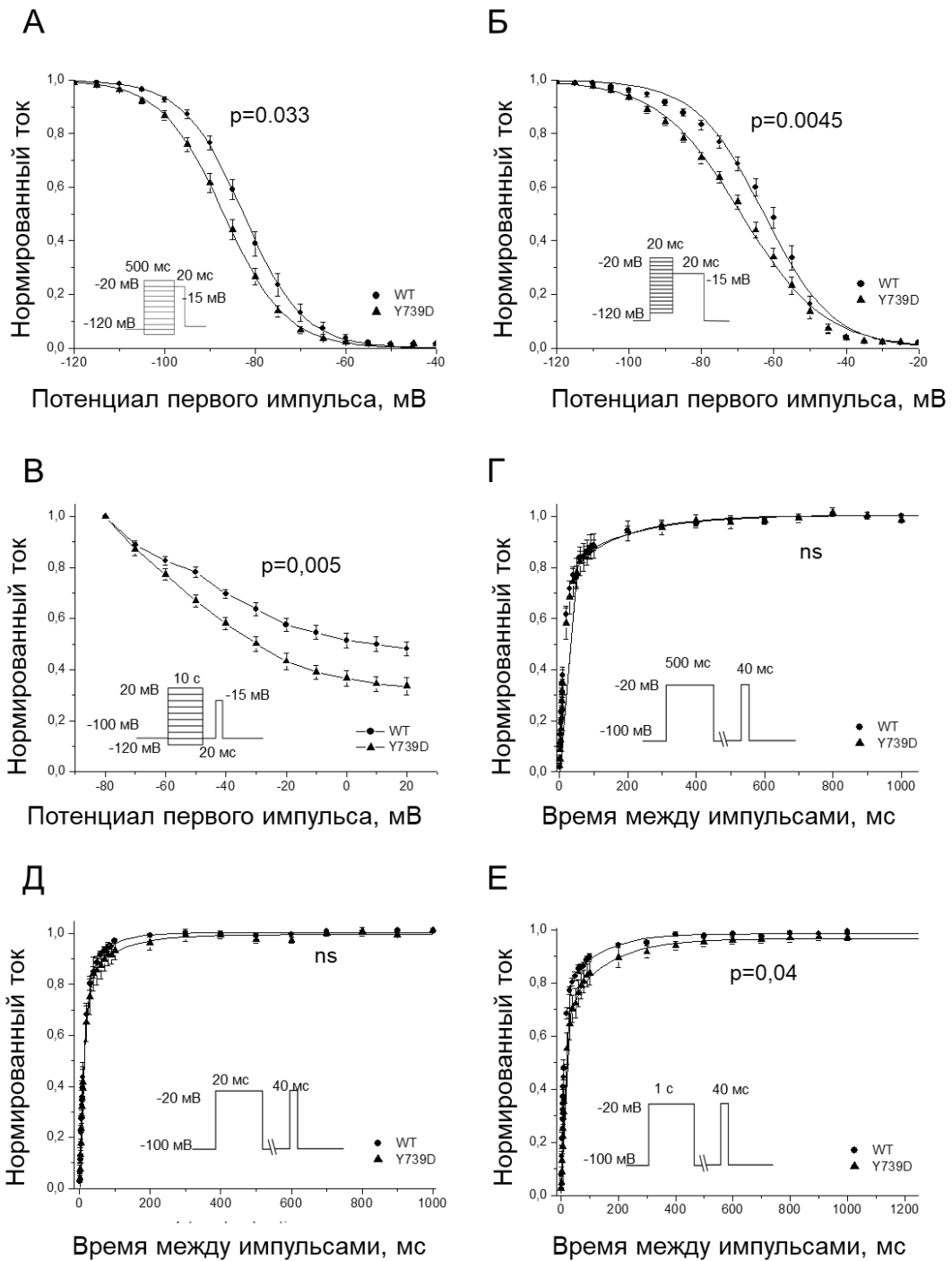


Рисунок 14 – Биофизические свойства $Na_V1.5$ -Y⁷³⁹D. А. Потенциал-зависимость стационарной инактивации. Сплошные линии соответствуют функции Больцманна для WT и Y⁷³⁹D, подобранной с помощью метода наименьших квадратов. Б. Потенциал-зависимость стационарной быстрой инактивации. В. Потенциал-зависимость стационарной медленной инактивации. $Na_V1.5$ -Y⁷³⁹D продемонстрировали усиление медленной

инактивации по сравнению с $\text{Na}_v1.5\text{-WT}$ ($I_{\text{Na}}/I_{\text{Na}\text{max}}$ при +20mV WT: $0,48 \pm 0,03$; $n=12$; Y739D: $0,33 \pm 0,03$, $n=15$, $p=0,005$). Г. Кинетика восстановления из инактивации: WT (чёрные круги, $n=24$) и Y⁷³⁹D (чёрные треугольники, $n=9$). Д. Кинетика восстановления из быстрой инактивации: WT (чёрные круги, $n=13$) и Y⁷³⁹D (чёрные треугольники, $n=10$). Е. Кинетика восстановления из медленной инактивации: WT (чёрные круги, $n=13$) и Y⁷³⁹D (чёрные треугольники, $n=10$). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2022).

Мы обнаружили значительное изменение постоянной времени промежуточной инактивации (Рисунок 15А, таблица 4). Далее мы проанализировали влияние стимуляции при различных частотах на активность потенциал-зависимых натриевых каналов. Нормированные уровни тока, зарегистрированные при 30-м импульсе частотой 0,66 Гц, составили $99,0 \pm 1,3\%$ для WT и $97 \pm 1,4\%$ для Y⁷³⁹D ($p = 0,26$) (Рисунок 15Б). Нормированные уровни тока, зарегистрированные при 100-м импульсе с частотой 1,92 Гц, составили $44 \pm 4,2\%$ ($n = 8$) для WT и $27 \pm 2,7\%$ для Y⁷³⁹D ($n = 6$) (Рисунок 15Б).

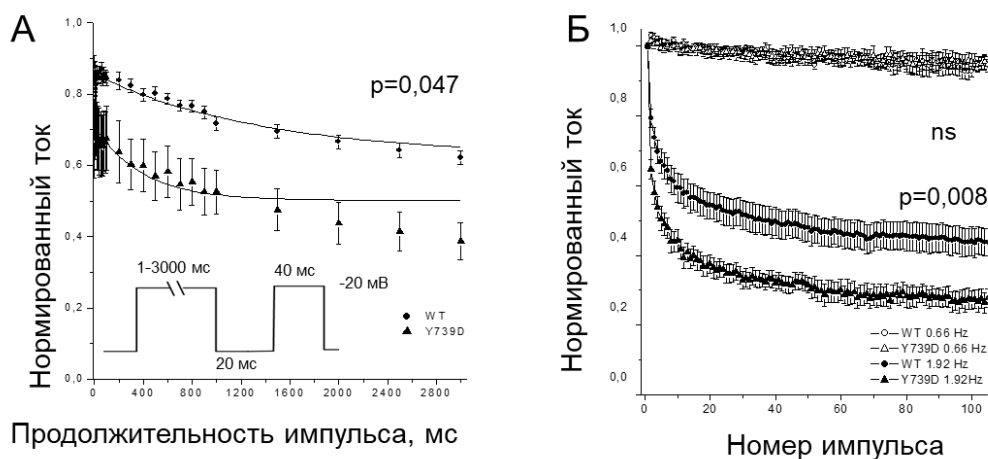


Рисунок 15 – Медленная инактивация $\text{Nav1.5-Y}^{739}\text{D}$. А. Кинетика развития медленной инактивации. Сплошная линия соответствует моно-экспоненциальной функции, аппроксимированной с помощью метода наименьших квадратов. Б. Нормированный ток, зарегистрированный при стимуляции с частотой 0.66 Гц для WT (полые круги) и Y^{739}D (полые треугольники) и при 1.92 Гц для WT (чёрные круги) и Y^{739}D (чёрные треугольники). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2022).

4.1.3. Контакты Y^{739} и Y^{739}D в моделях hNav1.5 построенных на основе структуры rNav1.4

В крио-ЭМ структуре канала rNav1.5 (Jiang et al., 2020) Y^{739} (использована нумерация UNIPROT hNav1.5) образует несколько контактов с большой внеклеточной петлей ПИС5-P1. К ним относятся Н-связи с солевыми мостиками K^{1381} и E^{1435} , а также пи-катионное взаимодействие Y^{739} с K^{1397} , не образующее других прочных контактов (Рисунок 16А). Подобные контакты могут быть визуализированы в Монте-Карло минимизированной модели hNav1.5 . В МКМ модели $\text{hNav1.5-Y}^{739}\text{D}$ аспарат D^{739} образовал Н-связь с Y^{1434} и солевой мостик с K^{1397} (Рисунок 16Б). Таким образом, замена Y^{739}D значительно изменила контакты между внеклеточными петлями в ПЧД-II (ПИС1-S2) и доменом поры (ПИС5-P1).

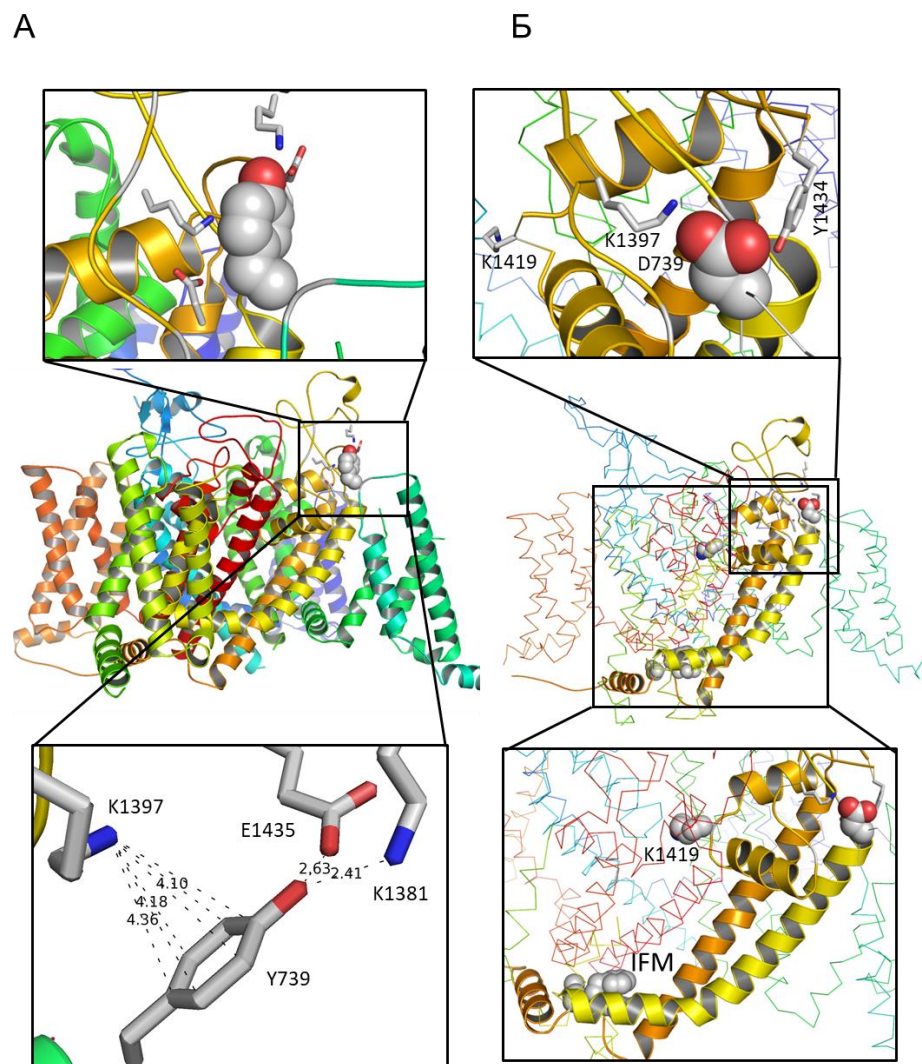


Рисунок 16 – Контакты Y^{739} и D^{739} . А. В крио-ЭМ структуре $rNav1.5$ Y^{739} образует водородные связи с K^{1381} и E^{1435} и пи-катионный контакт с K^{1397} . Последний остаток также образует водородную связь с G^{1358} на С-конце $III5$ (не показано для ясности). Б. В модели $hNav1.5-Y^{739}D D^{739}$ принимает Н-связи от K^{1397} и Y^{1434} , в то время как Н-связь K^{1397} с $O=G^{1358}$ отсутствует. Существенно разные контакты Y^{739} и D^{739} с петлей $III5-P1$ будут по-разному преобразовывать аллостерические сигналы от ПЧД-II через $III5$ к трипептиду IFM, играющему ключевую роль в процессе быстрой инактивации и через спираль $III1$ к лизину K^{1418} в области селективного фильтра, где локализованы ворота медленной инактивации. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2022).

4.2. Функциональная характеристика и структурная интерпретация генетического варианта Nav1.5-A¹²⁹⁴G

Мы идентифицировали новый генетический вариант гена *SCN5A*, приводящий к замене A¹²⁹⁴G, локализованной во внеклеточной петле III_{S3-S4}. Вариант был обнаружен у молодого пациента мужского пола со смешанным аритмогенным фенотипом. Согласно классификации Американского колледжа медицинской генетики (ACMG) этот генетический вариант относится к вариантам с неизвестной клинической значимости (VUS – variant of unknown significance). Далее мы функционально охарактеризовали Nav1.5-A¹²⁹⁴G в гетерологических системах экспрессии, клеточных линиях CHO-K1 и HEK293-T и выявили изменения в электрофизиологических свойствах мутантных каналов, которые могут приводить к развитию клинического фенотипа.

4.2.1. Фенотипическая характеристика и генетические данные

У пациента 28-ми лет были диагностированы атриовентрикулярная блокада II типа, ЭКГ-феномен Бругада без признаков обострения на фоне лихорадки, фиброз межжелудочковой перегородки, дилатация правого желудочка и снижение сократительной способности левого желудочка (фракция выброса 42%). В семье не было сообщений о внезапной сердечной смерти или других сердечных заболеваниях. Анализ с использованием целевого секвенирования следующего поколения выявил вариант гена *SCN5A* (NM_198056.2:c.3881C<G, p.A¹²⁹⁴G) (Рисунок 17А), расположенный во внеклеточной петле III_{S3-S4} (Рисунок 17Б). Этот вариант был зарегистрирован в базе данных gnomAD с заявленной частотой $2,859 \cdot 10^{-5}$ (rs754933998). На основе руководства ACMG вариант был классифицирован как вариант неизвестной клинической значимости (variant of unknown significance). Биоинформатический анализ выявил, что аланин в позиции 1294 консервативен среди ортологов Nav1.5 у мышей и крыс, что указывает на возможное патогенное влияние этой замены.

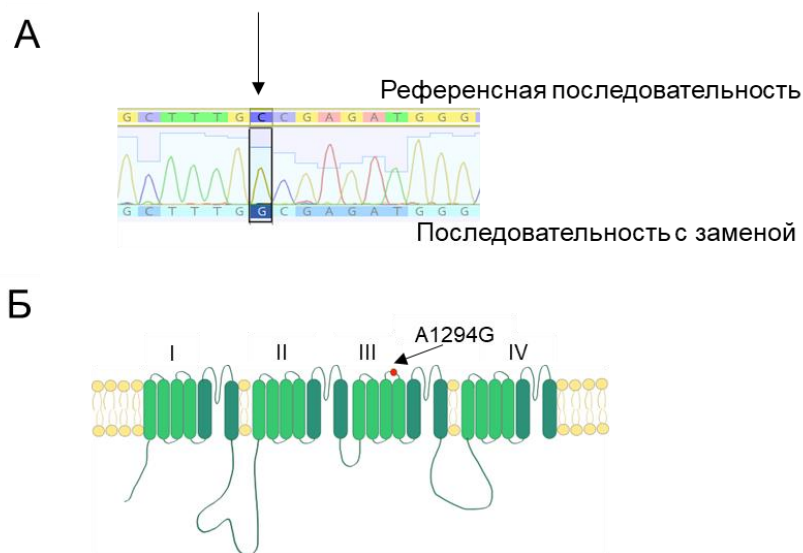


Рисунок 17 – Идентификация нового генетического варианта. А. Генетическая характеристика пробанда. Участок электрофореграммы, полученной после анализа последовательности *SCN5A*. Стрелкой указано положение нуклеотида 3881 в гене *SCN5A*, где в ДНК пробанда была обнаружена замена (гетерозиготная замена С на G, с.3881 С<G). Б. Мембранная топология канала $Na_v1.5$. Относительное положение мутации $A^{1294}G$ в петле S3–S4 повтора III обозначено стрелкой. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2019).

4.2.2. Биофизическая характеристика канала $Na_v1.5$ - $A^{1294}G$, экспрессированного в клетках линии CHO-K1

Клетки линии CHO-K1, трансфицированные кДНК мутантного натриевого канала $A^{1294}G$, экспрессировали функционально активный натриевый канал и не приводили к значимым изменениям пиковой плотности тока по сравнению с клетками, экспрессировавшими $Na_v1.5$ -WT (Рисунок 18А и таблица 5). Генетический вариант $A^{1294}G$ не влиял на зависимость стационарной активации от напряжения (Рисунок 18Б). В то время как $V_{1/2}$ для инактивации был значительно смещен в отрицательную сторону для $A^{1294}G$ по сравнению с каналами WT без значительного изменения константы наклона

(Рисунок 18Б и таблица 5). Далее была изучена зависимость быстрой и медленной инактивации от напряжения с помощью различных протоколов. Для A^{1294G} $V_{1/2}$ быстрой инактивации был значительно смещен в сторону отрицательных потенциалов (Рисунок 18В и таблица 5). Доля каналов, входящих в состояние медленной инактивации для A^{1294G} , была немного больше, чем для WT, но разница не была статистически значимой (Рисунок 18В). Также мы проанализировали кинетику развития промежуточной инактивации и восстановления из инактивированного состояния. A^{1294G} не выявил статистически значимых изменений промежуточной инактивации (Рисунок 18Г, таблица 5). Восстановление A^{1294G} было значительно замедлено по сравнению с каналами WT (Рисунок 18Д, таблица 5). Наконец, была проведена оценка влияния A^{1294G} на активность канала $Nav1.5$ при различной частоте стимуляции, которая не показала изменений как при медленной (0,66 Гц), так и при быстрой (1,92 Гц) частоте стимуляции (Рисунок 18Е).

Таблица 5 – Биофизические характеристики генетического варианта $A^{1294}G$ в CHO-K1

		WT	n	$A^{1294}G$	n
Плотность тока	пА/пФ	-537,3 ± 49,2	21	-510,0 ± 48,3	18
Стационарная активация	$V_{1/2}$ (мВ)	-22,5 ± 0,6	21	-23,9 ± 0,5	18
	k	7,2 ± 0,2		7,7 ± 0,1	
Стационарная инактивация	$V_{1/2}$ (мВ)	-62,9 ± 1,1	19	-66,5 ± 0,7*	13
	k	5,8 ± 0,3		5,5 ± 0,3	
Стационарная быстрая инактивация	$V_{1/2}$ (мВ)	-51,6 ± 1,3	16	-58,5 ± 0,9**	12
	k	7,6 ± 0,3		8,1 ± 0,3	
Стационарная промежуточная инактивация	$V_{1/2}$	-60,0 ± 2,1	12	-63,3 ± 2,0	11
	k	13,9 ± 0,8		12,1 ± 0,6	
Восстановление из инактивации	τ_{fast} (мс)	4,0 ± 0,3	13	5,04 ± 0,34*	7
	A_{fast}	0,83 ± 0,02		0,78 ± 0,02	
	τ_{slow} (мс)	91,6 ± 13,5		129,0 ± 7,6*	
	A_{slow}	0,22 ± 0,01		0,23 ± 0,01	
Развитие промежуточной инактивации	τ (мс)	1390,1 ± 132,2	6	1225,3 ± 73,2	4
	A	0,56 ± 0,04		0,63 ± 0,01	

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

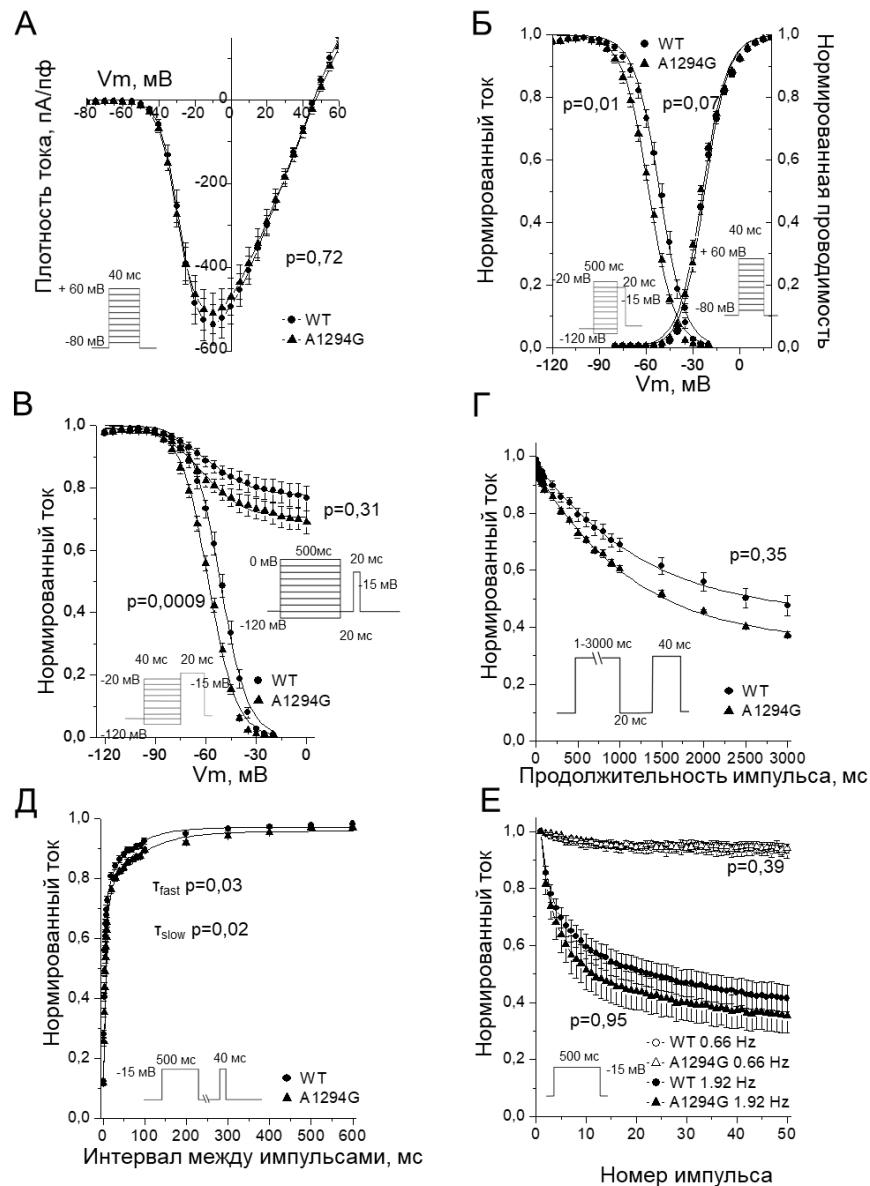


Рисунок 18 – Биофизические свойства натриевых каналов, экспрессируемых в клетках CHO-K1 для WT (круги) и A¹²⁹⁴G (треугольники). А. Вольтамперная характеристика. Б. Зависимость стационарной активации и инактивации от напряжения. В. Зависимость стационарной быстрой инактивации и стационарной промежуточной инактивации от напряжения. Г. График развития медленной инактивации. Д. Кинетика восстановления после инактивации. Е. Стимуляция для WT (закрашенные кружки/треугольники, n=9) и A¹²⁹⁴G (закрашенные кружки/треугольники, n=6) при 0,66 Гц (круги, p = 0,39) и при 1,92 Гц (треугольники, p = 0,95). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2019).

4.2.3. Биофизическая характеристика канала Nav1.5-A¹²⁹⁴G, экспрессированного в клетках линии HEK293-T

Дополнительные эксперименты были проведены на клетках линии HEK293-T, чтобы исключить возможность того, что наши результаты могут быть обусловлены особенностями гетерологической системы экспрессии СНО-K1. Пиковая плотность I_{Na} , измеренная при -15 мВ, была снижена относительно клеток, экспрессирующих канал WT. (Рисунок 19А, таблица 6). Мы также наблюдали небольшой отрицательный сдвиг зависимости A¹²⁹⁴G от напряжения стационарной кривой активации по сравнению со значениями, зарегистрированными для WT (Рисунок 19Б, таблица 6). Таким образом, степень деполяризации, необходимая для активации, была несколько снижена для каналов Nav1.5-A¹²⁹⁴G.

Кривая стационарной инактивации была существенно смещена (~ -7 мВ), при этом изменений константы наклона не наблюдалось (Рисунок 19Б, таблица 6). Данный сдвиг отражает усиленную инактивацию каналов A¹²⁹⁴G. К сожалению, этот протокол не позволяет выявить, какой из процессов протекает ускорено: быстрая и/или медленная инактивация. Поэтому мы использовали ряд дополнительных протоколов. Мы исследовали зависимость быстрой инактивации от напряжения и обнаружили сдвиг на ~ -10 мВ (Рисунок 19В, таблица 6), что указывает на то, что ускорение быстрой инактивации может вносить вклад в развитие клинических проявлений у пациента. Исследование зависимости промежуточной инактивации от напряжения показало, что каналы A¹²⁹⁴G демонстрируют усиление процесса промежуточной инактивации относительно каналов дикого типа для широкого диапазона деполяризованных потенциалов (от -95 до +10 мВ) (Рисунок 19В). Развитие промежуточной инактивации для мутантных каналов происходило значительно быстрее, чем для каналов дикого типа (Рисунок 19Г, таблица 6). Кроме того, A¹²⁹⁴G не оказывал влияния на параметры восстановления из инактивированного состояния (Рисунок 19Д, таблица 6). Это позволяет предположить, что данный вариант нарушает процесс релаксации из

активированного состояния, а не повышает стабильность инактивированного состояния. Кроме того, генетический вариант A¹²⁹⁴G продемонстрировал уменьшение амплитуды тока в ответ на стимуляцию (Рисунок 19Е) как при высокой (1,92 Гц), так и при медленной (0,66 Гц) частоте стимуляции. Таким образом, эти данные показали, что промежуточное инактивированное состояние стабилизируется в канале Na_v1.5-A¹²⁹⁴G.

Таблица 6 – Биофизические характеристики генетического варианта $A^{1294}G$ в НЕК293Т

		WT	n	$A^{1294}G$	n
Плотность тока	пА/пФ	-375,8 ± 23,5	39	-303,6 ± 30,1*	16
Стационарная активация	$V_{1/2}$, мВ	-34,2 ± 0,5	39	-36,5 ± 0,7**	16
	k	6,6 ± 0,2		6,4 ± 0,2	
Стационарная инактивация	$V_{1/2}$, мВ	-81,5 ± 1,1	30	-87,7 ± 0,9***	13
	k	5,8 ± 0,2		5,8 ± 0,2	
Стационарная быстрая инактивация	$V_{1/2}$, мВ	-60,4 ± 1,3	12	-70,8 ± 1,1***	10
	k	9,1 ± 0,3		10,5 ± 0,3**	
Восстановление из инактивации	τ_{fast} , мс	11,20 ± 2,1	8	14,6 ± 1,6	7
	A_{fast}	0,93 ± 0,03		0,79 ± 0,04*	
	τ_{slow} , мс	137,0 ± 23,8		209,9 ± 39	
	A_{slow}	0,19 ± 0,03		0,28 ± 0,03	
Развитие промежуточной инактивации	τ , мс	1652 ± 269,8	7	1006 ± 102,7*	7
	A	0,36 ± 0,06		0,43 ± 0,05	
Восстановление промежуточной инактивации	τ_{fast} , мс	8,3 ± 1	10	11,2 ± 2,4	8
	A_{fast}	0,8 ± 0,03		0,7 ± 0,05	
	τ_{slow} , мс	170,0 ± 16,8		227,5 ± 24*	
	A_{slow}	0,3 ± 0,03		0,4 ± 0,04	

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Кроме того, мы исследовали кинетику восстановления из состояния

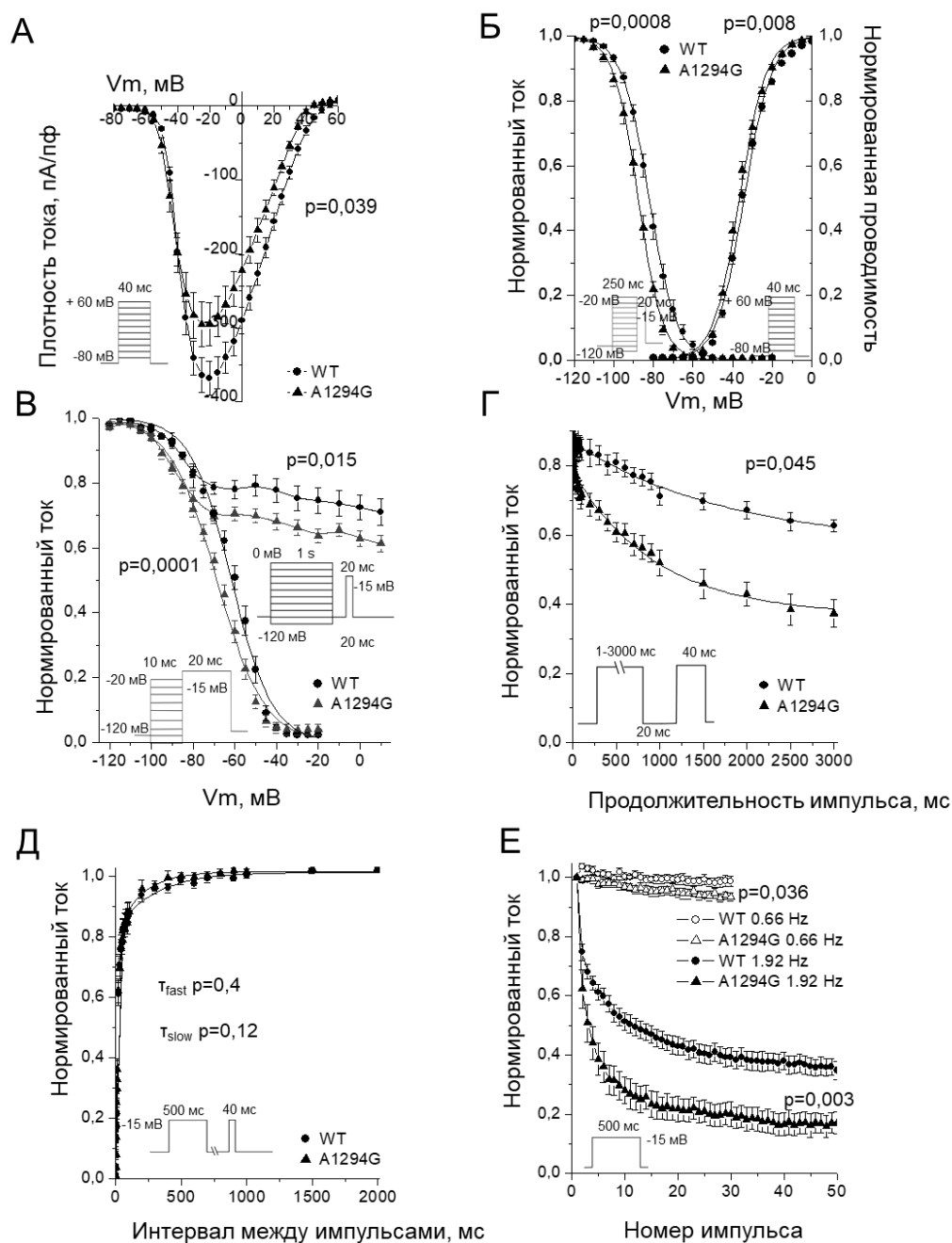


Рисунок 19 – Биофизические свойства натриевых каналов, экспрессированных в клетках HEK293-T для WT (круги) и A¹²⁹⁴G (треугольники). А. Вольтамперная характеристика. Б. Зависимость стационарной активации и инактивации от напряжения. В. Зависимость стационарной быстрой инактивации и стационарной промежуточной инактивации от напряжения. Г. Кинетика развития промежуточной инактивации. Д. Время восстановления промежуточной инактивации и показали, что постоянная времени

после инактивации. Е. График стимуляции натриевых каналов.

Нормированные уровни остаточного тока, зарегистрированные на 30-м импульсе, составили $100,0 \pm 0,02$ % для WT (светлые кружки, $n = 10$) и 93 ± 1 % для $A^{1294}G$ (светлые треугольники, $n = 10$) ($p = 0,036$) при 0,66 Гц и на 50-м импульсе они составили 35 ± 3 % (закрашенные кружки, $n=10$), а для $A^{1294}G$ (закрашенные треугольники, $n = 10$) 17 ± 4 % ($p = 0,003$) на частоте 1,92 Гц.

Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2019).

инактивации (τ_{slow}) была значительно больше для канала $A^{1294}G$ (Рисунок 20А, таблица 6). Замедление восстановления из состояния промежуточной инактивации предполагает стабилизацию промежуточного инактивированного состояния. Наконец, мы обнаружили, что генетический вариант $Nav1.5-A^{1294}G$ ускоряет развитие медленной инактивации (Рисунок 20Б). В совокупности эти данные указывают на то, что замена $A^{1294}G$ влияет как на быструю, так и на медленную инактивацию.

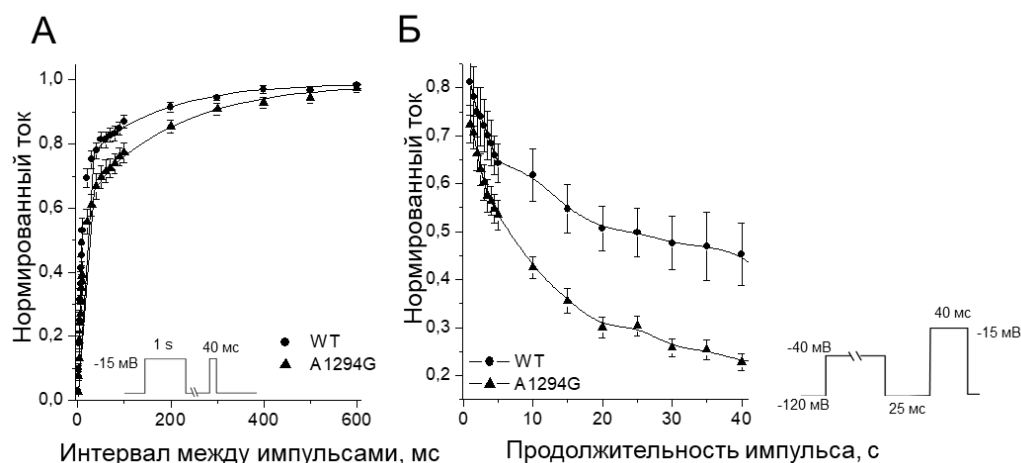


Рисунок 20 – Кинетика медленной инактивации в клетках HEK293-T. А. Каналы A^{1294G} демонстрируют замедленную кинетику восстановления после промежуточной инактивации. WT (круги, n=7) и A^{1294G} (треугольники, n=11). Б. Развитие медленной инактивации WT (кружки, n=13) и A^{1294G} (треугольники, n=7). Медленная инактивация канала A^{1294G} значительно усиливалась относительно значений для WT (p=0,029 в течение 40 с). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2019).

4.3. Исследование пути передачи сигнала между ПЧД-III и IVP2-S6

Как описано ранее, генетический вариант A^{1294G} в гене *SCN5A* был обнаружен у пациента с комбинированным клиническим фенотипом, и было показано, что этот вариант приводит к отрицательному сдвигу кривой стационарной инактивации, ускорению быстрой и медленной инактивации и замедлению выхода из состояния промежуточной инактивации (Zaytseva et al., 2019). Мы предположили, что замена A¹²⁹⁴ на глицин, расположенная во внеклеточном линкере PIS3-S4, увеличивает гибкость линкера и, предположительно, таким образом, оказывает влияние на межсегментные контакты с участием линкера и фланкирующих внеклеточных остатков в спиральях S3 и S4. Во всех доступных крио-ЭМ структурах каналов Nav1.x полужесткая дисульфидно-связанная петля IVP2-S6 из 15 аминокислот располагается над потенциал-чувствительным доменом III (ПЧД-III). Многие генетические варианты, зарегистрированные в базе данных ClinVar, приводят

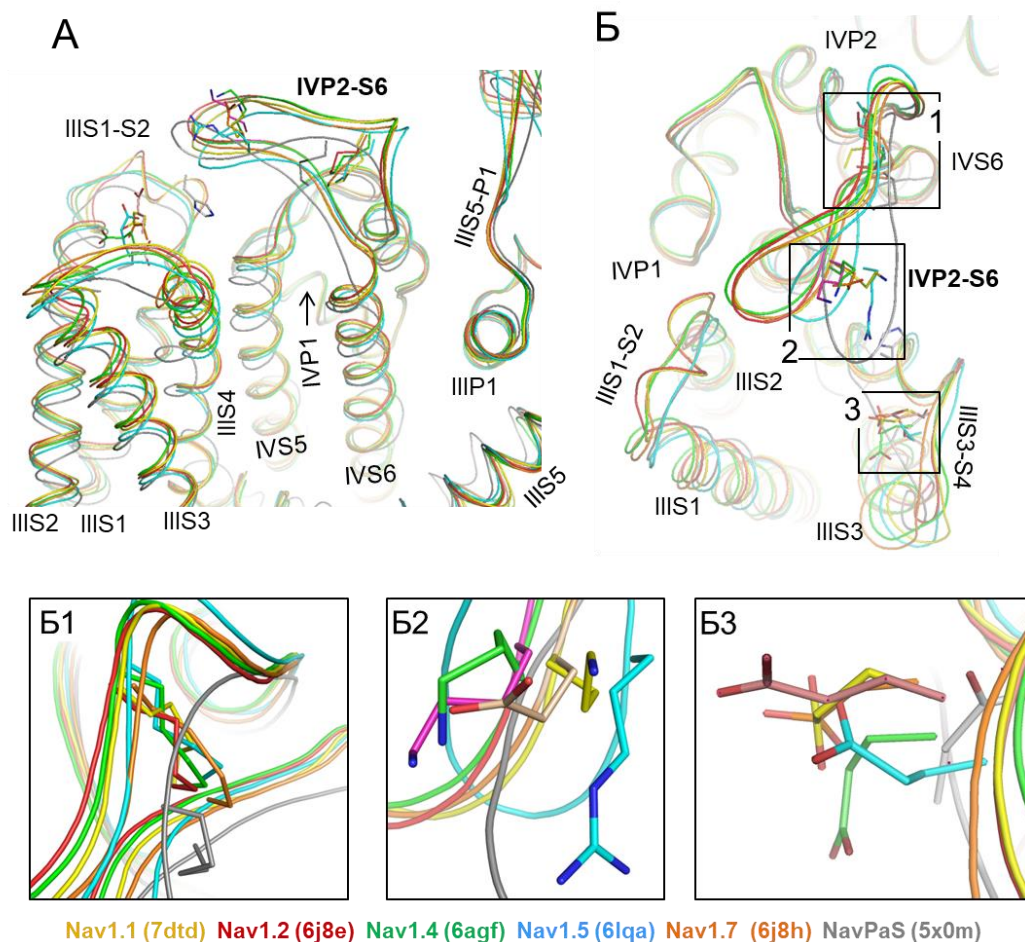
к аминокислотным заменам в интерфейсе, образованном ПЧД-III и внеклеточной петлей IVP2-S6, что указывает на функциональную важность этих участков белка. В частности, согласно ClinVar, варианты E¹²³⁰K и E¹²³¹K в линкере III S1-S2, E¹²⁹⁵K в линкере III S3-S4 и R¹⁷³⁹W/Q в петле IVP2-S6 ассоциированы с развитием BrS.

В крио-ЭМ структуре канала hNa_v1.5 (PDB: 6lqa) остатки E¹²³⁰ и E¹²⁹⁵ в составе ПЧД-III сближены с остатками N¹⁷³⁶ и R¹⁷³⁹ в петле IVP2-S6, соответственно. Прямые контакты между остатками отсутствуют, но молекулярное моделирование показывает, что такие контакты могут быть образованы при минимальных деформациях фолдинга модели. В данной работе мы создали модельные мутантные конструкции E¹²⁹⁵R, R¹⁷³⁹E, E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E и N¹⁷³⁶R и исследовали их электрофизиологические свойства в гетерологической системе экспрессии НЕК-293Т. Далее мы сконструировали молекулярные модели мутантов *in silico* деактивировали ПЧД-III. Наши экспериментальные данные и молекулярные модели предполагают, что электростатические взаимодействия между ПЧД-III и петлей IVP2-S6 могут способствовать передаче сигнала от ПЧД-III к воротам СФ на N-конце спирали IVP2 и воротам быстрой инактивации на С-конце спирали IVS6.

4.3.1. Интерфейс между IVP2-S6 и ПЧД-III в крио-ЭМ структурах эукариотических натриевых каналов

В настоящее время в базе данных Protein Data Bank имеются 19 крио-ЭМ-структур эукариотических Na_v. На рисунках 21 А,Б показан интерфейс между ПЧД-III и ДП-IV в трехмерно выровненных структурах шести каналов: hNa_v1.1 (Pan et al., 2021), hNa_v1.2 (Pan et al., 2019), hNa_v1.4 (Pan et al., 2018), hNa_v1.5 (Li et al., 2021b) и канале таракана Na_vPaS (Shen et al., 2017). В этих (и во всех других крио-ЭМ структурах эукариотических Na_vs) петля IVP2-S6 расположена над ПЧД-III. Геометрия трансмембранных спиралей и спиралей P1 и P2 довольно консервативна, тогда как внеклеточные петли III S1-S2, III S3-S4 и IVP1-P2 более разнообразны по структуре. В четырех каналах петля IVP2-S6 близко подходит к петле III S1-S2, но в Na_v1.5 и особенно в Na_vPaS петля

расположена ближе к III3-S4, хотя прямые контакты между петлями отсутствуют (Рисунок 21Б).



В

Channel	III S1-S2	III S3-S4	IVP2-S6
hNav1.1	EDIYIDQR -2	NALGYS EL GAIKSL 0	PPDCD PN KVNPSSV RG DCGNPS -1
hNav1.2	EDIYIEQR -2	NALGYS EL GAIKSL 0	PPDCD PKD HPGSSV KG DCGNPS -2
hNav1.3	EDIYIEQR -2	NALGYS EL GAIKSL 0	PPDCD PD TIHGSSV KG DCGNPS -2
hNav1.4	EDIYIEQR -2	NWLGYS EL GPIKSL 0	PPDCD PN LENPGT SV KGDCGNPS -3
hNav1.5	EDIYLEER -3	NTLGFA EM GPIKSL 0	PPYCD PT LPNS-NGSR GD CGSPA -1
hNav1.6	EDIYIEQR -2	NALGYS EL GAIKSL 0	PPDC SLD KEHPGSG FG DCGNPS -1
hNav1.7	EDIYIERK -1	NTLGYS DL GPIKSL 0	PPDCD PKV HPGSSV EG DCGNPS -1
hNav1.8	EDYYLDQK -2	KILEYS EV APIKAL 0	PPDCD PKV HPGSSV EG DCGNPS -1
	****:::	. **:::***	** *** : ..:****:
hNav1.9	EDVHLENQ -2	TLTNLM EL KSFRTL 1	KESC NSSS E-NCHLPG -2
NavPaS	EDIYLPQR -1	MCAGIE AL QTLRLL 0	EEDCRAPD HE LGYP--GNCGSRA 1

Рисунок 21 – В крио-ЭМ структурах шести натриевых каналов эукариот внеклеточная петля IVP2-S6 нависает над ПЧД-III. А, Б. Вид со стороны мембраны (А) и внеклеточный (Б) вид крио-ЭМ структур, выравненных путем минимизации среднеквадратичных отклонений атомов Ca в спиральях P1 от кристаллической структуры канала K_v1.2-K_v2.1. Следует отметить

консервативную геометрию спиралей P1 и P2 и довольно консервативную геометрию трансмембранных спиралей. Во всех структурах петля IVP2-S6 нависает над ПЧД-III, что указывает на функциональную значимость междоменных взаимодействий. Б1. Дисульфидные связи, стабилизирующие петлю IVP2-S6. Б2. Ионизируемые остатки в петле IVP2-S6. Б3. Кислотные остатки в петле III3-S4. В. Выравнивание последовательности петель III1-S2, III3-S4 и IVP2-S6. Остатки, гомологичные E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹ в канале hNav1.5, выделены рамкой. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Последовательности петель III1-S2, III3-S4 и IVP2-S6 в достаточной степени консервативны среди каналов hNav1.1–hNav1.8 (Рисунок 21B). Исключением является канал hNav1.9, который имеет короткий линкер IVP2-S6 и изменённую относительно других изоформ Nav медленную инактивацию (Dib-Hajj et al., 2002; Zhou et al., 2017). У Nav млекопитающих структура петель стабилизируется дисульфидной связью (Рисунок 21B1). Остовы петель содержат остатки пролина (Рисунок 21B), которые могут работать как шарниры во время конформационных переходов в этой области. Консервативному С-концу петли IVP2-S6 (GDCGNPS) в большинстве каналов предшествует Lys или Arg. Однако каналы hNav1.7 и hNav1.8 имеют Glu в соответствующих положениях (Рисунок 21B2). Тем не менее, суммарный заряд петли отрицателен во всех каналах Nav1.x (Рисунок 21B). Положительно заряженный остаток в петле IVP2-S6 каналов Nav1.1–Nav1.6 может электростатически притягиваться к высококонсервативному глутамату в центре петли III3-S4 (Рисунок 23B). В крио-ЭМ структурах каналов hNav1.5 (PDB ID: 6lqa) и NavPaS (PDB ID: 5x0m) расстояние между этими остатками намного меньше, чем в других каналах.

В двух крио-ЭМ структурах канала hNav1.5 конформации петли IVP2-S6 несколько отличаются (Рисунок 22 А, Б). Конформации кольца внешних карбоксилатов (EEDD) также существенно различаются (Рисунок 22B). В связанном с хинидином канале Nav1.5 (PDB ID: 6lqa) расстояние между E¹²⁹⁵

и R¹⁷³⁹ (9,3 Å) почти вдвое меньше, чем в апо-hNav1.5 (PDB ID: 7dtc). В интерфейсе между ПЧД-III и петлей IVP2-S6 разрешение крио-ЭМ структуры 6lqa выше, чем у 7dtc. Крио-ЭМ структура канала rNav1.5 показывает ДП в предположительно инактивированном состоянии и ПЧД в частично активированном состоянии (Jiang et al., 2020). Выравненные трёхмерные структуры hNav1.5 и rNav1.5 очень похожи, что свидетельствует в пользу того, что оба канала находятся в состоянии инактивации. Однако неясно, находятся ли апо- и флекаинид-связанные каналы в функционально различных состояниях инактивации.

Экспериментальные структуры эукариотических каналов с деактивированным ПЧД-III отсутствуют. Однако крио-ЭМ структуры rNav1.5 в апо-форме и в комплексе с токсином скорпиона (Jiang et al., 2021c) показывают, что индуцированная токсином деактивация ПЧД-IV резко сдвигает в сторону цитоплазмы IVS4 и вызывает большие конформационные изменения в петле IVS3-S4 (Рисунок 22Г). Важно отметить, что петля IVS3-S4 переместилась намного ближе к петле IS5-P1. Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что потенциал-зависимая деактивация ПЧД-III также может резко уменьшить расстояние между петлями III-S4 и IVP2-S6.

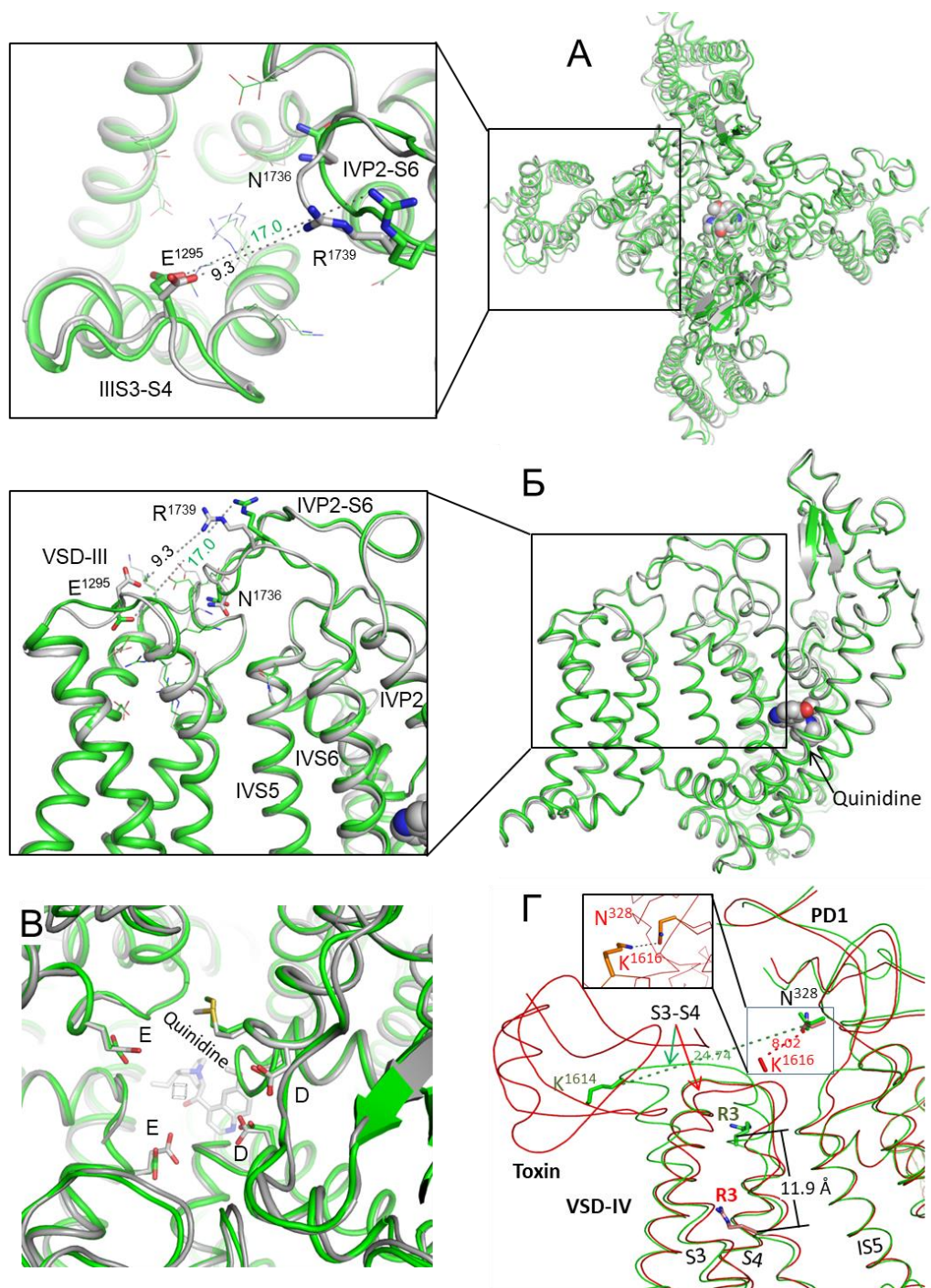


Рисунок 22 – Внеклеточные петли в двух крио-ЭМ структурах канала $hNa_v1.5$. А, Б. Внеклеточный (А) и боковой (Б) виды $hNa_v1.5$ в апо-форме (зеленый; идентификатор PDB: 7dtc) и в комплексе с хинидином (серый, идентификатор PDB: 6lqa). Следует отметить разную конформацию петель III S3-S4 и IVP2-D6 и разницу в расстоянии между остатками E^{1295} и R^{1739} .

В. Внеклеточный вид внешней поры. Следует отметить разные

конформации внешних карбоксилатов (кольцо EEDD). Г. Крио-ЭМ структуры канала $\text{rNa}_v1.5$ в апо-форме (зеленый; PDB ID: 6uz3) и в комплексе с токсином скорпиона Deathstalker (красный; PDB ID: 7k18). Токсин смещается вниз по IVS4; расстояние между атомами C β аргинина R3 в двух состояниях составляет 11,9 Å. Петля IVS3-S4 перемещается значительно ближе к петле IS5-P1, так что расстояние между атомами C β K¹⁶¹⁴ и N³²⁸ уменьшается с 24,7 до 8,0 Å (нумерация $\text{hNa}_v1.5$). В то же время спирали IVS1, IVS2 и IVS3 при связывании токсина претерпевают лишь небольшие сдвиги: в среднем атомы C α этих спиралей смещаются на ~ 1 Å (не показано). В модели с минимизацией MC и жесткими каркасами K¹⁶¹⁴ и N³²⁸ связаны H-связями. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

4.3.2. Интерфейс между ПЧД-III и IVP2-S6 в $\text{hNa}_v1.5$ является местом концентрации мутаций, ассоциированных с аритмиями

Крио-ЭМ структуры показывают, что интерфейс между ПЧД-III и IVP2-S6 является гибким (Рисунок 22 А, Б, Рисунок 23 В, Г). Генетические варианты множества остатков в петлях IVP2-S6, III1-S2 и III3-S4 и спирали IVP2 ассоциированы с развитием аритмий (Рисунок 23 А, Б). Замены глутаматов на лизины E¹²²⁵K, E¹²³⁰K, E¹²³¹K и E¹²⁹⁵K, которые меняют заряд остатка, а также большинство других мутаций, показанных в увеличенном виде на рисунке 27В, могут влиять на электростатические взаимодействия между ПЧД-III и петлей IVP2-S6. Приведенные выше данные побудили нас сгенерировать модельные мутации E¹²⁹⁵R, R¹⁷³⁹E, N¹⁷³⁶R и E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E и изучить их электрофизиологические характеристики.

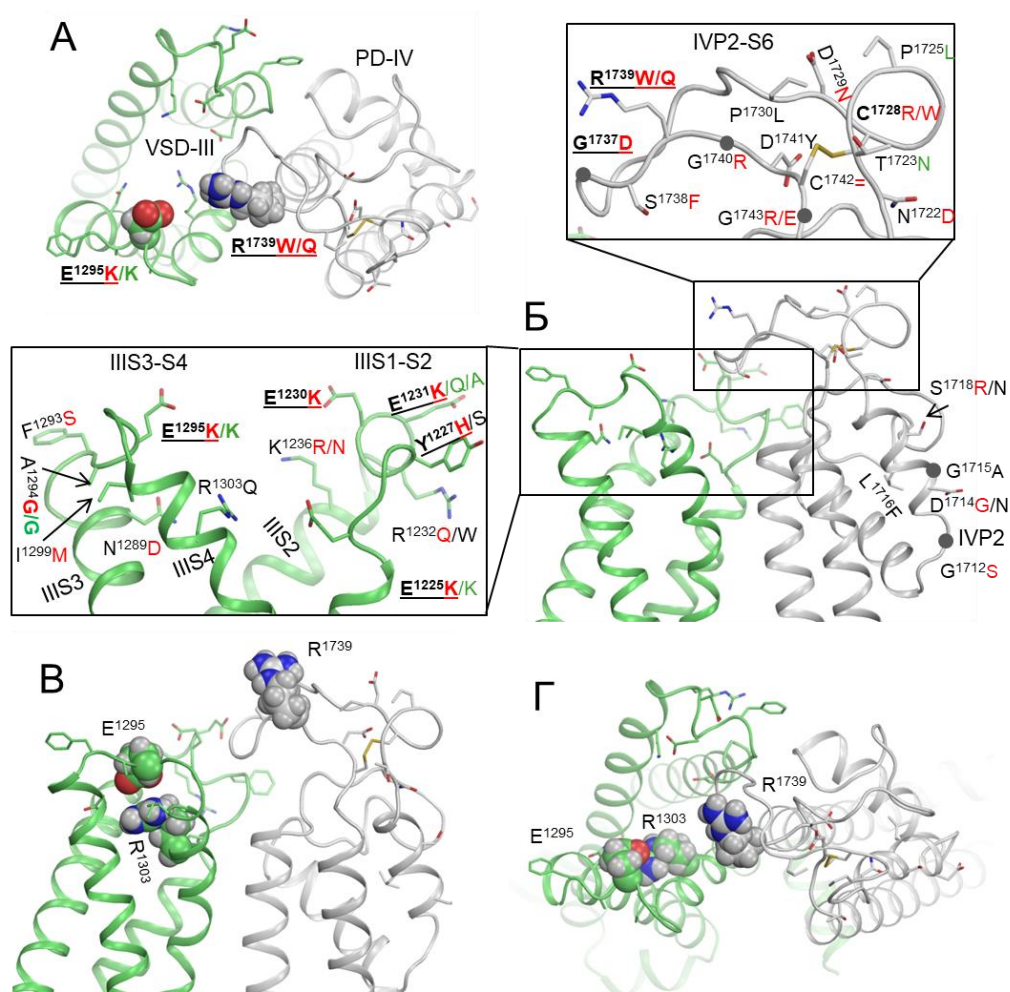


Рисунок 23 – Интерфейс между ПЧД-III и IVP2-S6 содержит множество генетических вариантов, ассоциированных с синдромом Бругада. А, Б. Внеклеточные и боковые виды крио-ЭМ структуры хинидин-связанного канала $hNa_v1.5$. На увеличенной панели Б отмечены остатки, для которых описаны генетические варианты в базе данных ClinVar. Варианты, ассоциированные с BrS1 и LQT3, обозначены красными и зелеными буквами соответственно. В, Г. Боковые и внеклеточные виды крио-ЭМ структуры $hNa_v1.5$ в апо-состоянии (7dtc). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

4.3.3. Биофизические характеристики WT и мутантных каналов

Мы экспрессировали WT и мутантные каналы в клетках линии HEK293-T. Никаких существенных изменений пикового натриевого тока у мутантов по сравнению с каналом WT не наблюдалось (Рисунок 24А-Г и таблица 7), что позволяет предположить, что мутации не влияли на транспорт или фолдинг белка. Все мутантные каналы приводили к образованию функционально активных натриевых каналов (Рисунок 24Д).

Таблица 7 – Биофизические характеристики модельных мутаций

		WT	E ¹²⁹⁵ R	R ¹⁷³⁹ E	E ¹²⁹⁵ R/ R ¹⁷³⁹ E	N ¹⁷³⁶ R
Пиковая плотность тока	пА/п	-400,5 ±	-397,2 ±	-307,7	-364,4 ±	-500,7 ±
	Φ	37,8	32,8	± 46,4	27,0	81,9
		n = 34	n = 29	n = 19	n = 16	n = 15
Стационарная активация	V _{1/2} , мВ	-38,3 ± 0,8 n = 34	-34,6 ± 0,9 * n = 29	-39,2 ± 1,1 n = 19	-35,4 ± 1,6 n = 16	-36,6 ± 0,9 n = 15
	k	5,5 ± 0,2 n = 34	5,1 ± 0,2 n = 29	5,5 ± 0,3 n = 19	4,9 ± 0,2 n = 16	5,4 ± 0,4 n = 15
Стационарная инак-тивация	V _{1/2} , мВ	-85,2 ± 1,2 n = 30	-77,6 ± 1,0** n = 24	-88,5 ± 1,5* n = 19	-80,7 ± 2,0 n = 16	-82,0 ± 1,0 n = 15
	k	5,5 ± 0,1 n = 30	4,8 ± 0,2* n = 24	5,7 ± 0,2 n = 19	4,7 ± 0,2* n = 16	5,2 ± 0,2 n = 15
Стационарная быстрая инактивация	V _{1/2} , мВ	-70,8±1,6 n = 30	-61,0 ± 1,379** n = 21	-76,0 ± 2,1* n = 19	-67,4 ± 2,6 n = 16	-65,1 ± 1,1* n = 15
	k	9,6 ± 0,3 n = 30	7,4 ±0,3 * n = 21	10,0 ± 0,3 n = 19	7,9 ± 0,3* n = 16	9,1 ± 0,4 n = 15
	A	0,12 ± 0,01 n = 30	0,18 ± 0,03 n = 21	0,18 ± 0,03 n = 19	0,18 ± 0,04 n = 16	0,17 ± 0,02 n = 15

* обозначает статистически достоверную разницу между группами мутантных каналов и значениями для $Na_v1.5$ -WT после применения коррекции множественных сравнений методом Бенджамини-Хохберга.

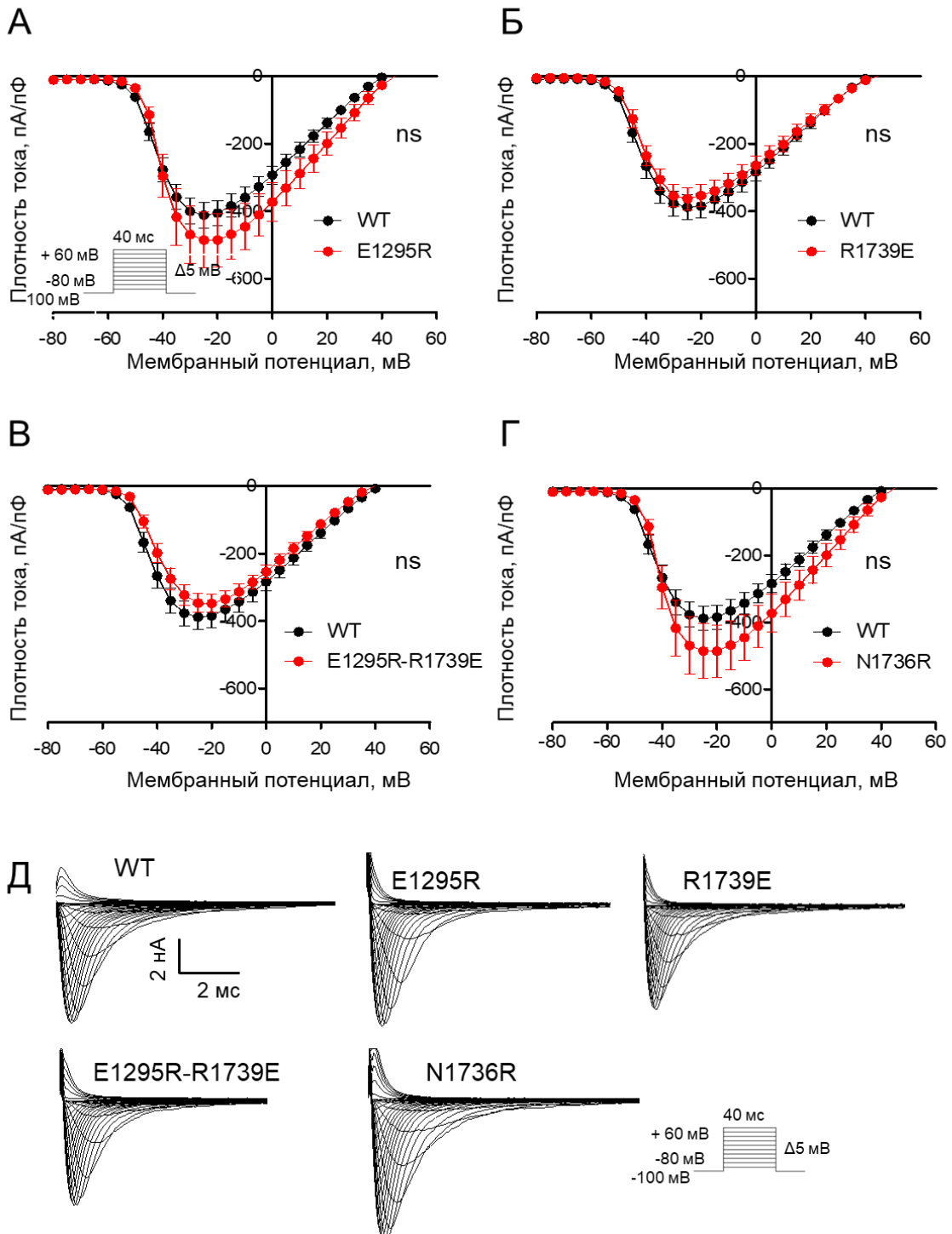


Рисунок 24 – Модельные мутации оказывают небольшое влияние на зависимость плотности натриевого тока от напряжения. Данные см. в

дополнительной таблице S1. А. Плотность тока мутанта $E^{1295}R$ незначительно увеличилась по сравнению с каналом WT. Б, В. Плотность тока мутанта $R^{1739}E$ и двойных мутантов $E^{1295}R/R^{1739}E$ аналогична плотности тока канала WT. Г. Плотность тока мутанта $N^{1736}R$ незначительно увеличилась по сравнению с каналом WT. Д. Примеры репрезентативных записей натриевого тока для $Na_v1.5$ -WT и мутантных каналов. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Мутантный канал $E^{1295}R$ продемонстрировал положительный сдвиг кривой стационарной активации на 4 мВ (Рисунок 25А, таблица 7). Для мутантных каналов $R^{1739}E$ (Рисунок 25Б, таблица 6), $E^{1295}R/R^{1739}E$ (Рисунок 25В, таблица 7) или $N^{1736}R$ (Рисунок 25Г, таблица 7) не наблюдалось статистически значимых изменений стационарной активации, что указывает на то, что сдвиг стационарной активации в сторону деполяризации, вызванный $E^{1295}R$ восстанавливался в случае двойной мутации $E^{1295}R/R^{1739}E$. Кривая стационарной инактивации в мутантном канале $E^{1295}R$ была сдвинута в сторону деполяризации на 7,6 мВ (Рисунок 25Д, таблица 7). Мутантный канал $R^{1739}E$ продемонстрировал небольшой, но статистически значимый сдвиг стационарной инактивации в сторону гиперполяризации (Рисунок 25Е, таблица 7). Статистически значимого изменения стационарной инактивации не наблюдалось для двойного мутантного канала $E^{1295}R/R^{1739}E$ (Рисунок 25Ж, таблица 7) или мутантного канала $N^{1736}R$ (Рисунок 25З, таблица 7).

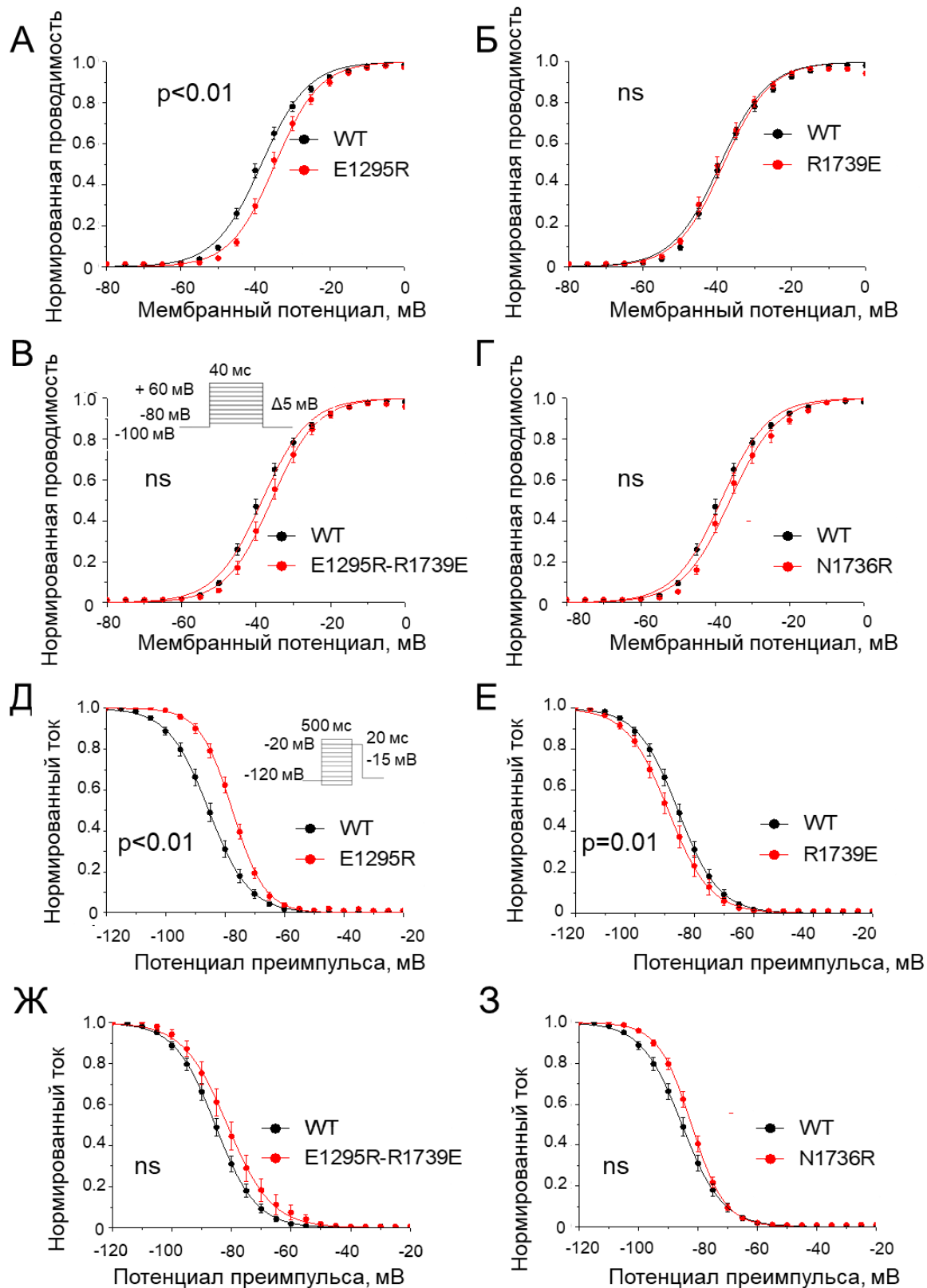


Рисунок 25 – Зависимость стационарной активации и стационарной инактивации от напряжения. Данные см. в таблице 7. Сплошными линиями

обозначены аппроксимации функции Больцмана методом наименьших квадратов для канала WT (черный) и мутантных каналов (красный). А-Г.

Зависимость стационарной активации от напряжения. А. Замена E¹²⁹⁵R вызывает нарушение активации. Б. Мутация R¹⁷³⁹E не оказывает влияния на активацию. В, Г. Двойная мутация E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E (В) и мутация N¹⁷³⁶R (Г) незначительно изменили активацию. Д-З. Стационарная инактивация. Д.

Мутация E¹²⁹⁵R нарушает процесс инактивации. Е. Мутация R¹⁷³⁹E несколько облегчила инактивацию. Ж, З. Двойная мутация E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E (Ж) и мутация N¹⁷³⁶R (З) незначительно нарушали инактивацию. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Мутация E¹²⁹⁵R вызвала деполяризующий сдвиг стационарной быстрой инактивации примерно на 10 мВ (Рисунок 26А, таблица 7). Мутация R¹⁷³⁹E ускоряла стационарную быструю инактивацию и характеризовалась отрицательным сдвигом примерно на 5 мВ (Рисунок 26Б, таблица 7). Стационарная быстрая инактивация двойного мутанта E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E была аналогична таковой для канала WT (Рисунок 26В, таблица 7). Мутантный канал N¹⁷³⁶R препятствовал стационарной быстрой инактивации, демонстрируя положительный сдвиг примерно на 4 мВ (Рисунок 26Г и таблица 7).

Мутация E¹²⁹⁵R значительно усиливала стационарную медленную инактивацию (Рисунок 26Д), тогда как замена R¹⁷³⁹E приводила к её нарушению (Рисунок 26Е). У двойных мутантов E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E зависимость стационарной медленной инактивации от напряжения была аналогична таковой для канала дикого типа (Рисунок 26Ж). Замена N¹⁷³⁶R, по-видимому, приводила к нарушению медленной инактивации (Рисунок 26З), однако, эффект был статистически незначимым.

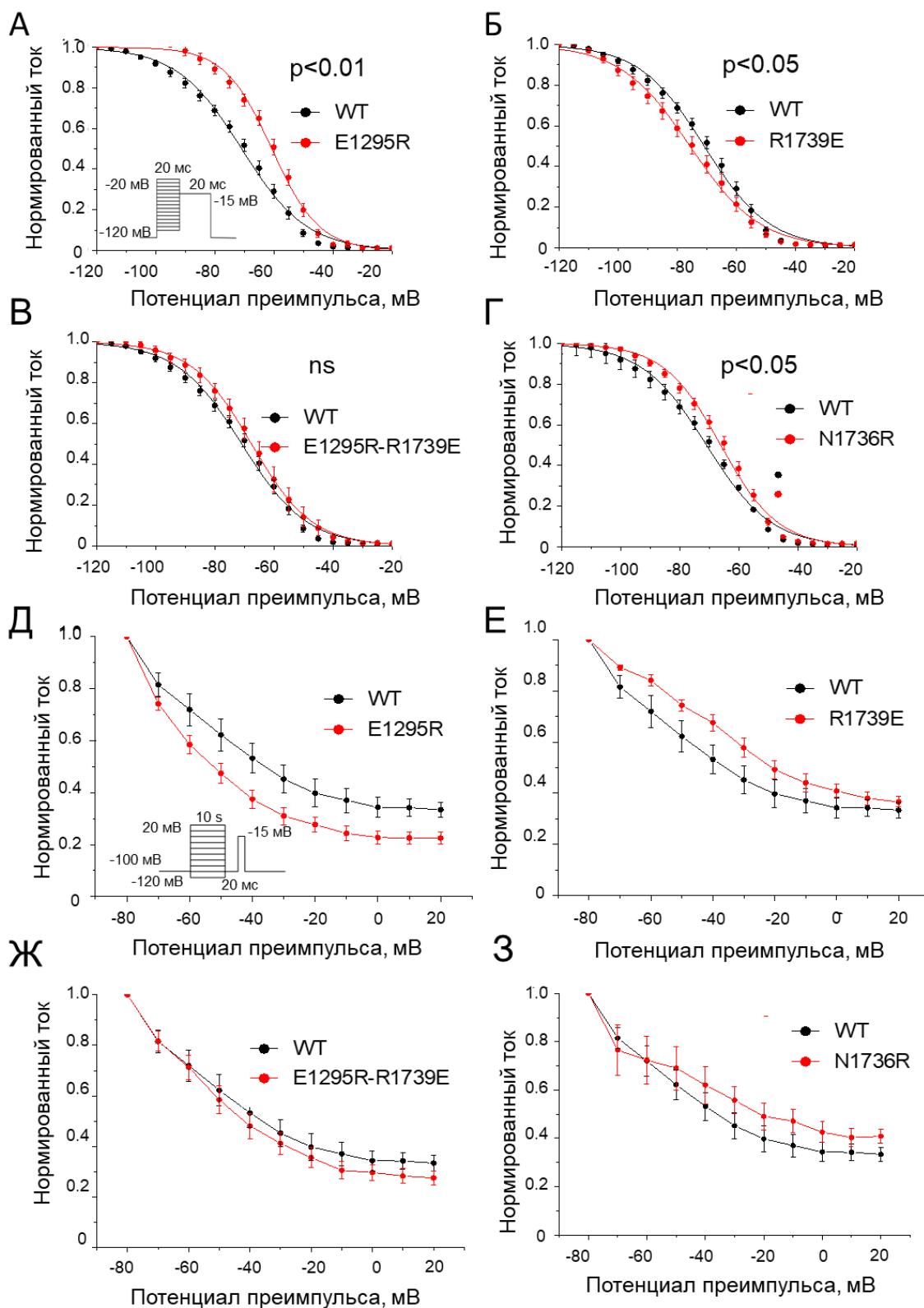


Рисунок 26 – Зависимость стационарной быстрой и медленной инактивации от напряжения. А-Г. Зависимость стационарной быстрой инактивации от напряжения. Сплошными линиями обозначены

аппроксимации функции Больцмана методом наименьших квадратов. А. Мутация E¹²⁹⁵R нарушает процесс быстрой инактивации. Б. Мутация R¹⁷³⁹E слегка усиливает быструю инактивацию. В. Быстрая инактивация двойного мутанта E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E аналогична таковой у канала WT. Г. Мутация N¹⁷³⁶R вызывала положительный сдвиг кривой стационарной быстрой инактивации. Д-3. Зависимость стационарной медленной инактивации от напряжения. Сравнение проводили с использованием I_{Na} при напряжении 20 мВ. Характеристики канала WT: I_{Na}/I_{max} = 0,32±0,02, n=11. Д. Мутация E¹²⁹⁵R незначительно усиливала стационарную медленную инактивацию (I_{Na}/I_{max} = 0,23 ± 0,02; p=0,0074, n=12). Е. Мутация R¹⁷³⁹E существенно не влияла на стационарную медленную инактивацию (I_{Na}/I_{max} = 0,37 ± 0,02; p=0,15, n=8). Ж. Двойная мутация E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E слегка усиливала стационарную медленную инактивацию (I_{Na}/I_{max} = 0,28 ± 0,03; p = 0,36, n = 11). З. Мутация N¹⁷³⁶R существенно усиливала стационарную медленную инактивацию (I_{Na}/I_{max} = 0,18 ± 0,05; p = 0,037, n = 7). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Приведенные выше данные указывают на функциональную значимость остатков E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹. Однако, поскольку точечные мутации E¹²⁹⁵R и R¹⁷³⁹E сдвигают кривые потенциал-зависимости инактивации в разные стороны, взаимно-компенсирующий эффект двойного мутанта может свидетельствовать об аддитивных эффектах каждой замены. Структурная интерпретация экспериментальных данных осложняется тем, что E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹ располагаются довольно близко к другим ионизируемым остаткам в ПЧД-III и петле IVP2-S6 (Рисунок 21В, Рисунок 22Б). Для дальнейшего изучения возможных взаимодействий между ПЧД-III и петлей IVP2-6 мы использовали методы структурной биологии, как описано ниже.

4.3.4. *In Silico* Деактивация ПЧД-III с помощью солевого моста

E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹

Сравнение крио-ЭМ структур канала rNav1.5 и его комплекса с токсином скорпиона (Jiang et al., 2021c) показывает большое смещение спирали IVS4 вниз, обусловленное связыванием с токсином и значительный сдвиг петли IVS3-S4 в сторону ДП-IV (Рисунок 22Г). В этом канале внеклеточная петля IP2-S6 с N329 на вершине петли располагается над петлей IVS3-S4 с K¹⁶¹⁶ на вершине петли. Расстояние между C β _K¹⁶¹⁶ и C β _N³²⁹ уменьшается с 27,7 Å в структуре апо (PDB ID: 6uz3) до 8,0 Å в структуре индуцированным токсином деактивированным состоянием ПЧД-IV (PDB ID: 7k18). Боковая цепь K¹⁶¹⁶ не разрешена в канале, связанном с токсином, но молекулярное моделирование предсказывает ее зависимую от состояния водородную связь с N329 (вход на Рисунок 22Г). В то же время деактивация ПЧД-IV приводила к минимальным сдвигам спиралей IVS1, IVS2 и IVS3. Это пространственное расположение петель IP2-S6 и IVS3-S4 во многом схоже с расположением петель IVP2-S6 и IIS3-S4. Связывание протоксина-II перуанского зеленого бархатного птицеда с химерным каналом NavPaS/Nav1.7-ПЧД-II (Xu et al., 2019) и связывание модифицированного хувентоксина-IV китайского птицеда-птицеда с химерным каналом NavAb/Nav1.7-ПЧД (Wisedchaistri et al., 2021) также вызывает существенное смещение спирали IIS4 вниз под действием токсина и перестройки в петле IIS3-S4.

Гиперполяризация мембраны должна вызывать большое смещение IIS4 вниз наряду с движением петли IIS3-S4. Остатки E¹²⁹⁵ в IIS3-S4 и R¹⁷³⁹ в IVP2-S6 расположены довольно далеко друг от друга в крио-ЭМ структурах (Рисунок 22А). Однако МКМ связанного с хинидином hNav1.5 (идентификатор PDB: 6lqa) с ограниченным солевым мостиком E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹ позволила построить модель, в которой ни один атом C α не отклонялся более чем на 1 Å от крио-ЭМ структуры. Чтобы выяснить, может ли солевой мостик E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹ сохраняться в при гиперполяризации, мы *in silico* деактивировали

ПЧД-III (см. Методы) с помощью функции, которая ограничивала перемещения солевого мостика. Смещение вниз ПIS4 вызвало большие изменения в петлях ПIS3-S4 и IVP2-S6 (Рисунок 27А, Б и 28А), в линкерной спирали ПIS4-S5 и в линкере III-IV, который включает трипептид быстрой инактивации IFM (Рисунок 30В) и некоторое понижение положения IVS5 (Рисунок 28Б). Движение ПIS4 вдоль IVS5 переключало несколько межсегментных контактов, но гидрофобный интерфейс между этими спиралями минимизировал бы трение. Значительные изменения в основном гидрофобных контактов наблюдаются на интерфейсах ПIS4-S5/IVS5 и ПIS4-S5/IVS6 (Рисунок 28Д), а также между трипептидом быстрой инактивации IFM и спиралями ПIS4-S5, IVS5 и IVS6 (Рисунок 28В,Г). Спираль IVS6 смещена относительно IVS5 и ПIS4-S5 (Рисунок 28Д), что указывает на путь передачи движения между ПЧД-III и связывающими IFM остатками в IVS6.

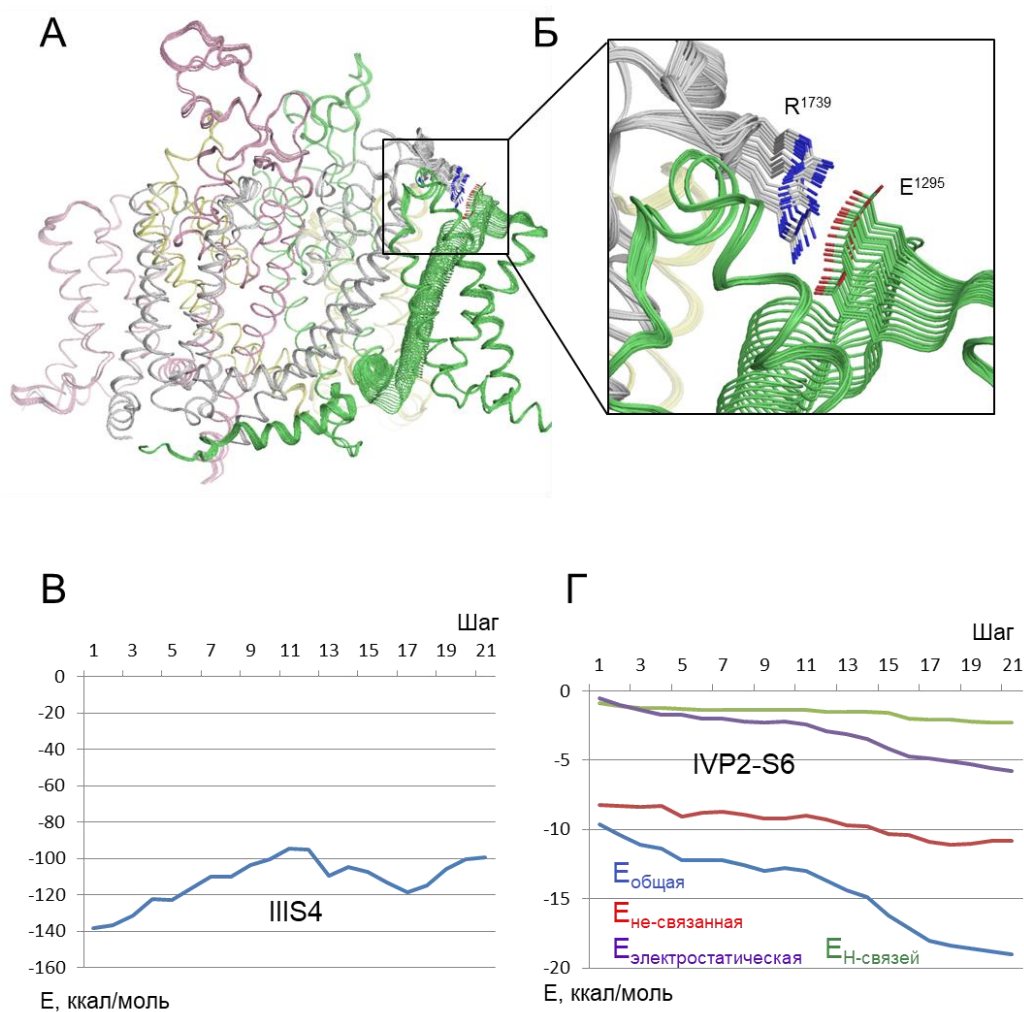


Рисунок 27 – Деактивация ПЧД-III *in silico*. А. Внутримембранный вид канала Б. Увеличенный вид солевого мостика, рассчитанного с помощью введения функций, фиксирующих расстояние между R¹⁷³⁹ и E¹²⁹⁵. E¹²⁹⁵ в линкере III S3-S4 значительно перемещается, а III S4 и R¹⁷³⁹ следуют за ним. В. Энергия взаимодействия III S4 с остальной частью канала. Г. Энергия взаимодействия (E_{total}) и ее компоненты петли IVP2-S6 (остатки 1722-1743) с ПЧД-III. Энергия фланкирующих остатков в петлях не учитывается. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Другой путь передачи движения III S4 может включать петлю IVP2-S6, которая связана со спиралью IVS6 (Рисунок 28А). Индуцированное ПЧД-III отклонение петли IVP2-S6 вызвало заметное изменение структуры в области

селективного фильтра (Рисунок 28Е), что указывает на путь передачи движения от ПЧД-III к селективному фильтру.

Энергия взаимодействия спирали ПIS4 с остальным каналом увеличилась при деактивации ПЧД-III (Рисунок 27В), что согласуется с представлением о том, что в отсутствие гиперполяризующего мембранного потенциала активированные состояния ПЧД более предпочтительны, чем деактивированные состояния. Однако энергия взаимодействия петли IVP2-S6 с остальной частью канала уменьшалась (становилась более благоприятной) в случае нахождения ПIS4 в «нижнем положении» (Рисунок 27Г), подтверждая возможность солевого мостика E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹ в покоящемся ПЧД-III. Мы предполагаем, что во время циклов деполяризации/реполяризации мембраны петля IVP2-S6 будет перемещаться вместе с ПIS4, тем самым нарушая область селективного фильтра, которая в конечном итоге будет переходить в закрытое состояние.

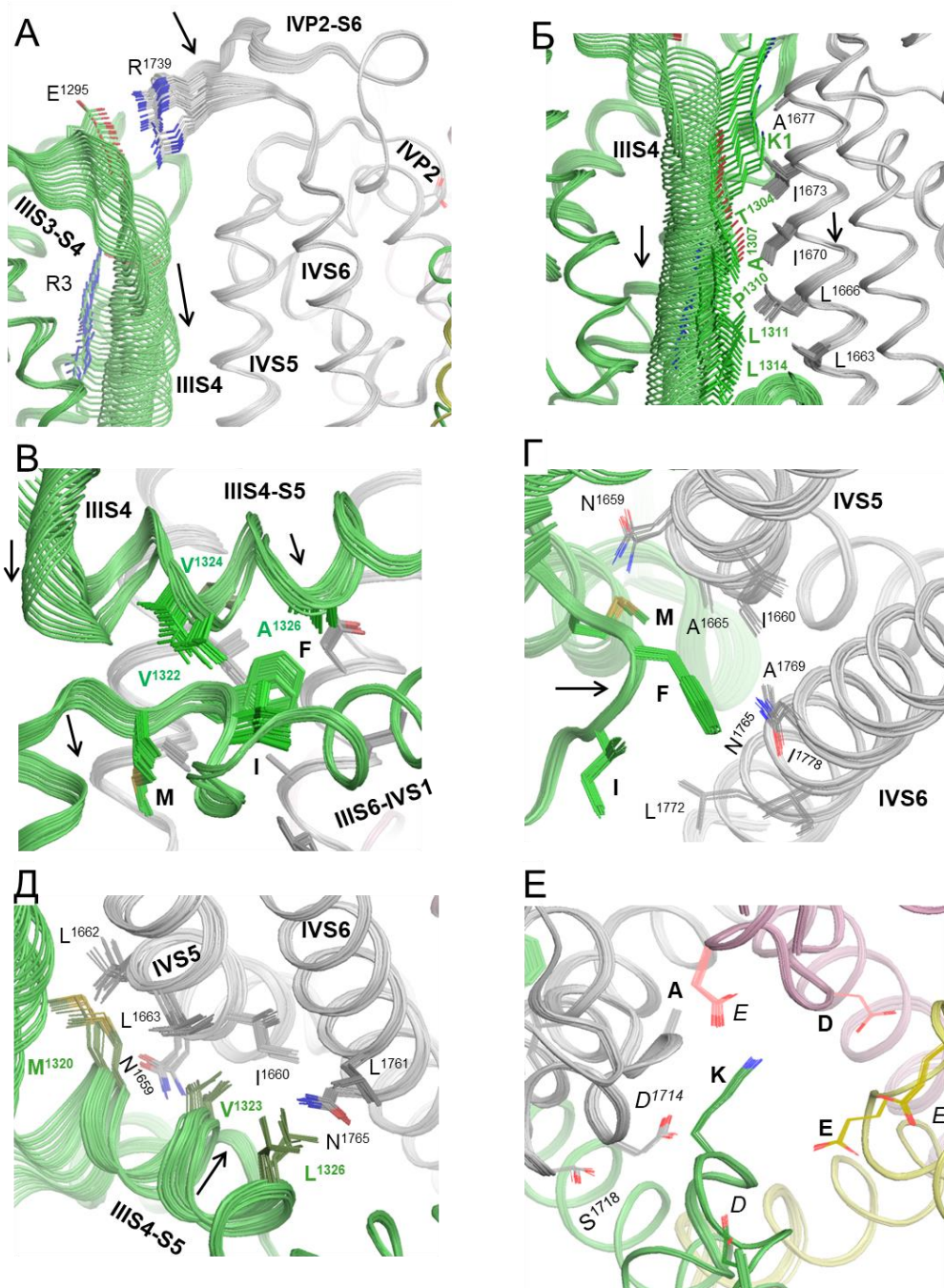


Рисунок 28 – Деактивация ПЧД-III *in silico*. А. Сдвиг спирали III S4 вниз значительно смещает петли III S3-S4 и петли IVP2-S6 благодаря солевому мостику E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹. Структура спиралей IVP2 и IVS6 на N- и C-концах петли также нарушается, хотя и менее существенно, чем сама петля. Б. Смещение спирали III S4 вниз перемещает спираль IVS5. Когда III S4 скользит по IVS5, пять контактов между III S4 и IVS5 переключаются, но из-за гидрофобной природы остатков на границе раздела междоменное

трение невелико. В. Сдвиг вниз N-концевой части линкера-спирали III-S4-S5 перемещает межповторный линкер III-IV и влияет на контакты гидрофобных остатков спирали III-S4-S5 с трипептидом быстрой инактивации IFM. Г. Движение IVS5, IVS6 и III-S3-S4 влияют на их контакты с трипептидом быстрой инактивации IFM. Д. Движения IVS5, IVS6 и III-S3-S4 влияют на контакты между этими спиралями. Е. Боковые цепи внешних карбоксилатов (EEDD) смещаются сильнее, чем боковые цепи DEKA-кольца селективного фильтра. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

4.3.5. Электростатические потенциалы в интерфейсе ПЧД-III/ДП-IV, специфичные для определённых состояний канала

R¹⁷³⁹ является единственным положительным остатком в петле IVP2-S6, который расположен в непосредственной близости с E¹²⁹⁵ в активированном ПЧД-III (Рисунок 29 А, Б). Однако другие ионизируемые остатки также могут участвовать в электростатических взаимодействиях между IVP2-S6 и ПЧД-III. Мы использовали метод Пуассона-Больцмана для расчета карт электростатического потенциала на доступных растворителю поверхностях изолированных ПЧД-III и ДП-IV, а также в комплексе активированных ПЧД-III и ДП-IV (см. Методы). В одиночном активированном ПЧД-III внеклеточная поверхность III-S3-S4 имеет преимущественно положительный потенциал из-за K1 и R2 в III-S4 с участком отрицательного потенциала от E¹²⁹⁵ (Рисунок 29В). Большая часть одиночного ДП-IV имеет отрицательный потенциал с электроположительным участком от R¹⁷³⁹ (Рисунок 29Г). Последний притягивает E¹²⁹⁵, но отталкивает K1 и R2. Это может объяснить, почему солевой мостик R¹⁷³⁹:E¹²⁹⁵, хотя стерически возможен (Рисунок 27В,Г), не наблюдается в крио-ЭМ структурах Nav1.5 с активированным ПЧД-III. В деактивированном ПЧД-III, K1, R2 и другие основные остатки в III-S4 смещаются вниз, и электростатический потенциал на поверхности III-S3-S4 становится сильно отрицательным (Рисунок 29Д) и более привлекательным

для R¹⁷³⁹. Преимущественно отрицательный поверхностный потенциал ДП-IV (Рисунок 29Г) компенсируется преимущественно положительным потенциалом активированного ПЧД-III (Рисунок 29В). В результате в модели активированного ПЧД-III/ДП-IV с солевым мостиком E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹ электростатический потенциал скорее нейтрален (Рисунок 29Е). Таким образом, расчеты методом Пуассона-Больцмана подтверждают предположение о зависимом от состояния солевого мостике E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹.

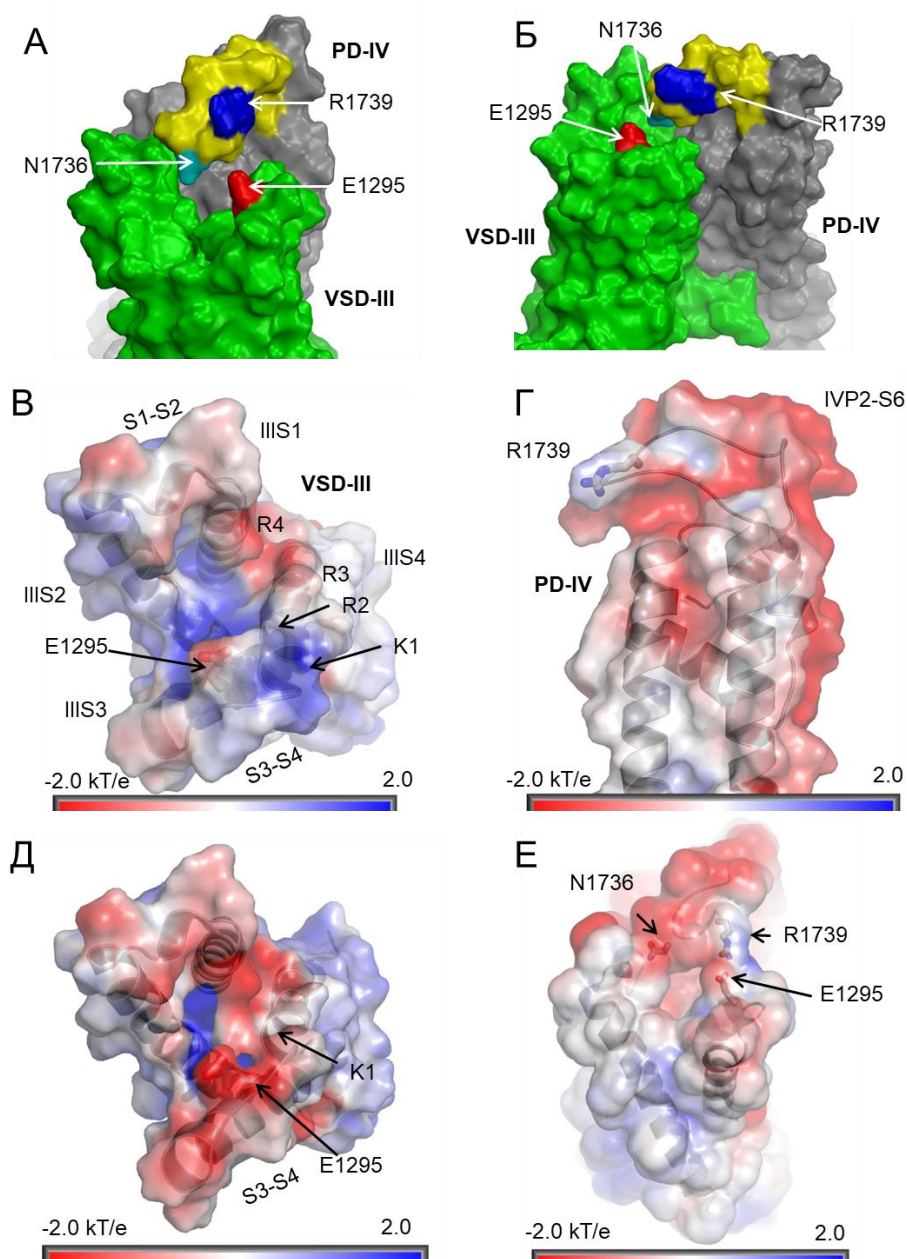


Рисунок 29 – Внеклеточная петля IVP2-S6 расположена над ПЧД-III. А, Б. Ортогональные виды ПЧД-III и ДП-IV. Петля IVP2-S6 (желтая с синим

R¹⁷³⁹ и голубым N1736) приближается к линкерам ШS1-S2 и ШS3-S4, но не образует контактов с E¹²⁹⁵ (красная). В. Внеклеточный вид карты электростатического потенциала, нанесенной на доступную для растворителя поверхность ПЧД-III в крио-ЭМ-структуре (ID PDB: 6lqa). Положительный потенциал (синий) на внеклеточной поверхности ПЧД-III обусловлен основными остатками в ШS4. Г. Вид сбоку карты электростатического потенциала, нанесенной на доступную для растворителя поверхность ДП-IV. Обратите внимание на положительно заряженный R¹⁷³⁹ на отрицательно заряженном контуре IVP2-S6. Д. Внеклеточный вид карты электростатического потенциала, нанесенной на доступную для растворителя поверхность *in silico* деактивированного ПЧД-III. Сдвиг ШS4 во внутриклеточном направлении снижает положительный потенциал на внеклеточной стороне ПЧД-III, делая его более привлекательным для R¹⁷³⁹. Е. Вид сбоку карты электростатического потенциала, построенной на доступной для растворителя поверхности активированного ПЧД-III, связанного с ДП-IV. Из-за близости ПЧД-III и ДП-IV их положительный и отрицательный потенциалы снижены. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Моделирование мутантных каналов

Конформации боковых цепей остатков E¹²⁹⁵, N¹⁷³⁶, R¹⁷³⁹ и других полярных остатков в интерфейсе ПЧД-III/IVP2-S6 в апо-Na_v1.5 (Рисунок 30А) и связанном с хинидином Na_v1.5 (Рисунок 30Б) существенно различаются. Мы использовали крио-ЭМ структуру Na_v1.5, связанного с хинидином, где боковые цепи E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹ относительно сближены друг с другом, для моделирования четырех мутантов, рассматриваемых в данном исследовании.

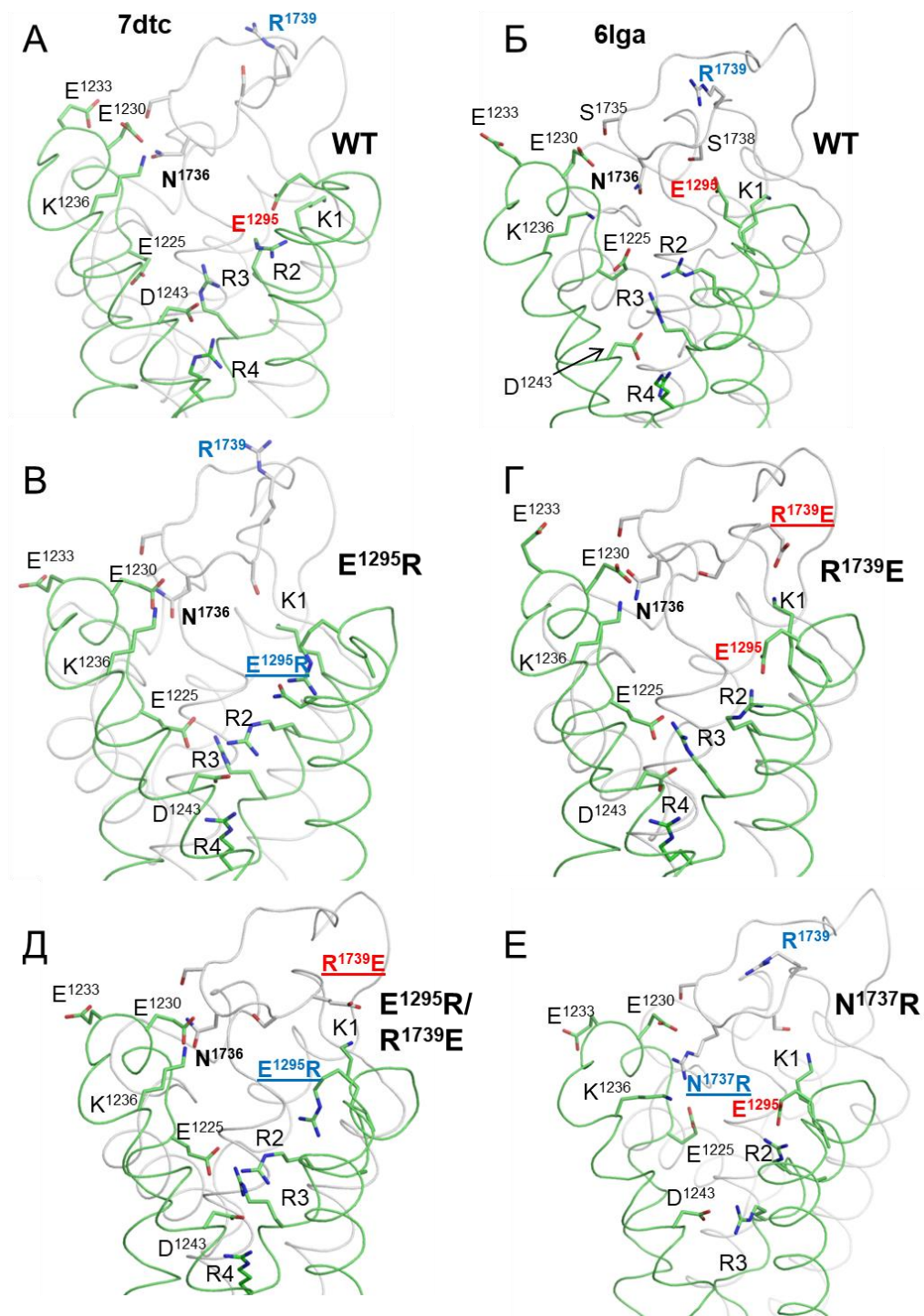


Рисунок 30 – Ионизируемые остатки и N1736 в крио-ЭМ структуре hNav1.5 (А, Б) и МКМ моделях мутантов (В-Д). Для наглядности показаны только части ПЧД-III и ДП-IV. А, Б. Крио-ЭМ структуры hNav1.5 с флекаинидом (идентификатор PDB: 6lga) и hNav1.5-E¹⁷⁸⁴K (идентификатор PDB: 7dtc).
 Различные конформации полярных остатков (в том числе E¹²⁹⁵, R¹⁷³⁹ и

N¹⁷³⁶) указывают на их высокую гибкость. В. Мутация E¹²⁹⁵R уменьшала электростатическое притяжение R¹⁷³⁹ к ПЧД-III и вызывала уменьшение активности Nav1.5 (усиливала медленную инактивацию, замедляла активацию и усиливала быструю инактивацию). Это согласуется с данными о том, что различные мутации, уменьшающие электростатическое притяжение между ПЧД-III и IVP2-S6, ассоциированы с развитием BrS (Рисунок 23Г). Мутация R¹⁷³⁹E, которая увеличивает взаимодействие между IVP2-S6 и ПЧД-III (обратите внимание на солевой мостик K1:R¹⁷³⁹), замедляет медленную инактивацию и демонстрирует эффект противоположный эффекту E¹²⁹⁵R (Рисунок 26Д). В двойном мутантном канале R¹⁷³⁹E соединен солевым мостиком с K1, тогда как E¹²⁹⁵R поворачивается во внутриклеточном направлении. Измененные контакты, вероятно, ответственны за восстановление медленной инактивации в случае двойной мутации. Е. Мутация N¹⁷³⁶R, которая увеличивает электростатическое притяжение петли IVP2-S6 к глутаматам E¹²²⁵ и E¹²³⁰, замедляет медленную инактивацию. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

В мутантном канале E¹²⁹⁵R основные группы E¹²⁹⁵R и R¹⁷³⁹ удалены друг от друга (Рисунок 30В). Отталкивание R¹⁷³⁹ от E¹²⁹⁵R, K1 и R2 может дестабилизировать активированное состояние ПЧД-III. Это может объяснить деполяризующий сдвиг кривой стационарной активации (Рисунок 25А). Такое же отталкивание может также объяснить усиленную стационарную инактивацию (Рисунок 25Д) и стационарную быструю инактивацию (Рисунок 26А) мутанта. Деполяризующий сдвиг стационарной инактивации у мутанта E¹²⁹⁵R (Рисунок 25Д) согласуется со сдвигом в том же направлении, наблюдаемым для генетического варианта E¹²⁹⁵K, ассоциированного с развитием LQT3, для которого было показано увеличение активности Nav1.5 на модели гетерологической системы экспрессии HEK293-T (Abriel et al., 2001). Мутация E¹²⁹⁵R также вызвала отрицательный сдвиг потенциал-зависимости медленной инактивации (Рисунок 26Д). Мы предполагаем, что

после единичного события активации ПЧД-III отталкивание R^{1739} от основных остатков в ПИС4 будет сдвигать IVP2-S6 во внеклеточном направлении, передавая сигнал активации к селективному фильтру (Рисунок 28Е). Открытое и закрытое состояния селективного фильтра должны быть разделены высоким энергетическим барьером. Вероятность преодоления барьера увеличивается с увеличением количества циклов активации и инактивации канала. Возврат селективного фильтра в открытое состояние потребует дополнительного времени.

В модели мутантного канала $R^{1739}E$ солевой мостик между $R^{1739}E$ и самым «верхним» положительно заряженным заместителем в спирали S4 (лизин K1) стабилизировал активированное состояние ПИС4 (Рисунок 32Г). Более «нижние» положительно заряженные заместители в спирали S4 обозначаются соответственно R2, R3 и R4. Кривые потенциал-зависимой активации (Рисунок 29Б), стационарной инактивации (Рисунок 29Е) и стационарной быстрой инактивации (Рисунок 30Б) сместились в направлениях, противоположных наблюдаемым для мутантного канала E^{1295} ; эффекты были небольшими, но статистически значимыми. Вероятная причина заключается в том, что солевой мостик $R^{1739}E$ -K1 вносит небольшой вклад в энергетически предпочтительное активированное состояние ПИС4 при деполяризации. Относительно большой гиперполяризующий сдвиг медленной инактивации (Рисунок 30Е) был противоположен деполяризованному сдвигу у мутанта $E^{1295}R$ (Рисунок 30Д), вероятно, потому, что солевой мостик $R^{1739}E$ -K1 удерживает петлю IVP2-S6 ближе к ПЧД-III, ослабляя передачу сигнала активации ПЧД-III к селективному фильтру и, таким образом, снижает вероятность закрытия поры канала.

В модели двойного мутантного канала $E^{1295}R/R^{1739}E$ замена на глутамат $R^{1739}E$ также приводила к формированию солевого мостика с K1, в то время как R^{1295} отталкивался от K1 (Рисунок 31Д). Электростатическое взаимодействие между ПЧД-III и IVP2-S6 было слабее, чем в мутантном канале $E^{1295}R$, и больше похоже на таковое в канале WT.

В модели N¹⁷³⁶R образовавшийся аргинин был связан солевыми мостиками с E¹¹²⁵ и E¹²³⁰, в то время как R2 и R3 образовывали солевые мостики с E¹²⁹⁵ и D¹²⁴³ соответственно (Рисунок 31Е). Структурные механизмы, с помощью которых эти перестройки влияют на активацию канала и стационарную инактивацию, неясны.

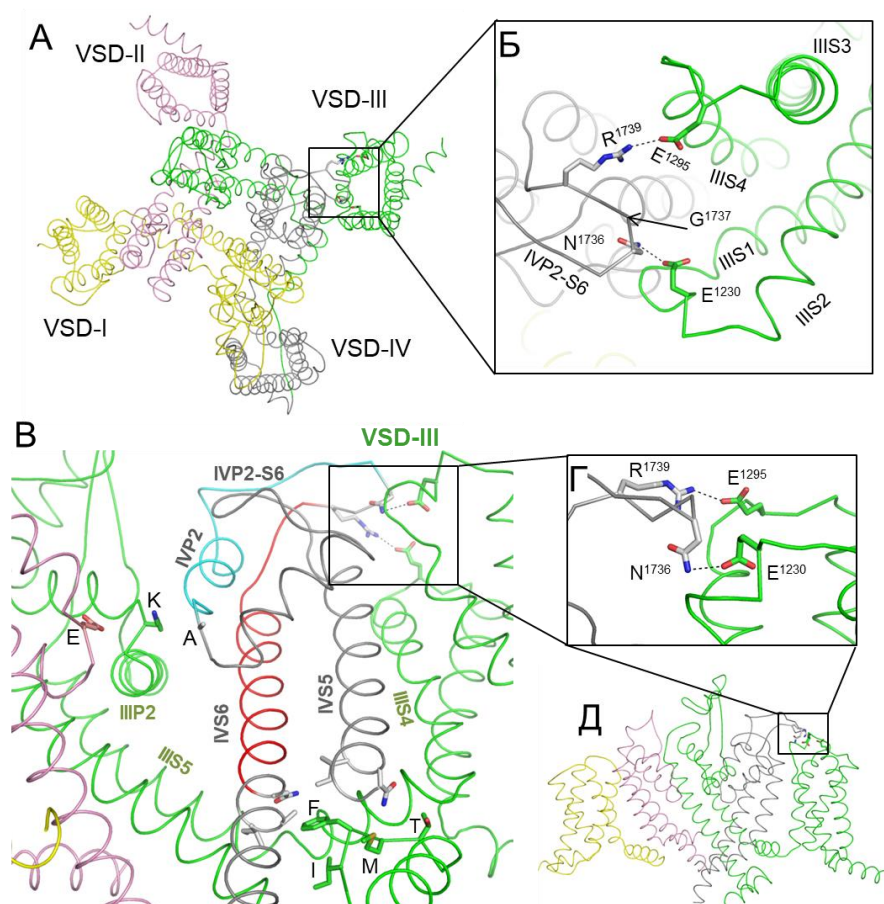


Рисунок 31 – Предполагаемые пути передачи аллостерического сигнала от ПЧД-III к воротам быстрой и медленной инактивации. Повторы I, II, III и IV обозначены желтым, розовым, зеленым и серым цветами соответственно. А. Внеклеточный вид крио-ЭМ структуры hNav_v1.5 (ID PDB: 6lqa), которая МК-минимизирована с атомами C α , прикрепленными к экспериментальным позициям. Б. Увеличенное внеклеточное изображение интерфейса ПЧД-III и IVP2-S6. Солевой мостик E1295:R1739 был смещен из-за ограничения расстояния. Это уменьшило расстояние между N η R1739 и O ϵ E1295 с 9,3 Å в крио-ЭМ-структуре до 3,0 Å в структуре с МКМ.

Однако ни один атом Са не отклонился более чем на 1 Å от экспериментального положения. В. Внутримембранный вид канала, некоторые части которого удалены для ясности. Спираль IVP2 и N-концевая часть линкера IVP2-S6, которые, как предполагается, передают аллостерические сигналы от ПЧД-III к воротам фильтра селективности, имеют голубой цвет. Остатки глутамата (E), лизина (K) и аланина (A) в кольце селективного фильтра ДЕКА показаны палочками. С-концевая часть линкера IVP2-S6 и спирали IVS6, которые, как предполагается, способствуют передаче движения от ПЧД-III к воротам быстрой инактивации, отмечены красным. Боковые цепи тетрапептида быстрой инактивации IFM в линкере III-IV и некоторые остатки, которые могут взаимодействовать с тетрапептидом, показаны палочками. Г. Увеличенный вид сбоку на интерфейс между IVP2-S6 и ПЧД-III. Д. Общий внутримембранный вид канала, некоторые части которого удалены для наглядности. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

4.3.6. Возможные механизмы передачи движений от ПЧД-III к инактивационным воротам

Результаты наших расчетов показывают, что петля IVP2-S6 может передавать зависящие от напряжения движения ПЧД-III к остатку аланина в кольце селективного фильтра ДЕКА и к D¹⁷¹⁴ в кольце внешних карбоксилатов (Рисунок 28E). Известно, что мутации в данных кольцах влияют на медленную инактивацию (Tikhonov and Zhorov, 2007). Мутация в Р-петле повтора IV влияет на ионную селективность и прохождение ионов в канале Na_v1.4, указывая на высокую гибкость этой петли (Tsushima et al., 1997a; Tsushima et al., 1997b). Эти данные согласуются с нашим предположением о том, что передача движений ПЧД-III на спираль IVP2 через петлю IVP2-S6 может переключать селективный фильтр в состояние медленной инактивации (Рисунок 31)

Другой конец петли IVP2-S6 может передавать движения ПЧД-III на N-концевую часть спирали IVS6 (Рисунок 31) и, возможно, по этой спирали на

трипептид IFM (Рисунок 28Г, 33). Однако смещение PIS4 также передаётся на мотив IFM через спирали IVS5 и PIS4-S5 (Рисунок 28 Б, В, 31). Степень вклада IVS6 в передачу движения от ПЧД-III к воротам быстрой инактивации неясна, но наши данные демонстрируют, что E¹²⁹⁵R приводит к замедлению стационарной инактивации (Рисунок 25Д) и стационарной быстрой инактивации (Рисунок 26А), что подтверждает роль этого пути.

4.4. Потенциально повреждающие варианты в hNav1.5

Более 1500 миссенс-вариантов hNav1.5, зарегистрированных в базе данных ClinVar, ассоциированы с патологией сердца (Landrum et al., 2016). Большинство этих замен относятся к вариантам неизвестной клинической значимости (VUS), не имеют данных о клинической значимости (NP) или имеют противоречивые интерпретации патогенности (CIP). Реклассификация этих вариантов в патогенные/вероятно патогенные (P/LP) варианты важна для правильной диагностики и стратификации риска пациентов с наследственными натриевыми каналопатиями. С помощью биоинформатических подходов и метода аннотации паралогов было предсказано, что 74 варианта VUS/NP/CIP 54 остатков дикого типа (список w54) являются потенциально повреждающими вариантами (Tarnovskaya et al., 2020). Атомные механизмы, лежащие в основе дисфункции потенциально повреждающих вариантов, неизвестны.

Мы использовали крио-ЭМ-структуру канала hNav1.5 с, вероятно, инактивированным ДП и активированными ПЧД (Li et al., 2021b), а также построенные нами модели канала с закрытым или открытым ДП, а также с ПЧД в состоянии покоя. Для поиска контактов заместителей, для которых известны потенциально повреждающие варианты, был использован PyMol. Мы отобрали те аминокислоты, которые в аминокислотной последовательности белка удалены не менее чем на 5 позиций от исследуемого остатка, а в 3D-структуре имеют боковые цепи, обращенные к боковой цепи остатка. Мы обнаружили, что 44 остатка из набора w54 связываются с 84 остатками, для которых в ClinVar описано 118 миссенс-вариантов. К ним

относятся 104 варианта VUS/NP/CIP, большинство из которых ассоциированы с BrS1 или с LQT3 (Korkosh et al., 2021).

Матричное представление потенциально повреждающих вариантов в контактах (Рис.32) способствовало распознаванию мутаций, ассоциированных с одним и тем же заболеванием. В частности, связанные с BrS1 мутации, которые нарушают область Р-петель с воротами медленной инактивации, могут вызвать дисфункцию канала. Другие вероятные причины дисфункции каналов включают ассоциированные с BrS1 варианты в пределах ПЧД, которые дестабилизируют их активированные состояния, и связанные с LQT3 варианты, которые стабилизируют открытые ДП или активированные ПЧД. Механизмы дисфункции каналов для множества вариантов, ассоциированных с BrS1 и LQT3 рассмотрены подробнее в (Korkosh et al., 2021). Мы подтвердили статус 82% потенциально повреждающих вариантов и предположили повреждающий статус для вариантов их контактов, которые в настоящее время классифицируются как варианты VUS/NP/CIP.

На рисунке 32 показаны Р-петли с некоторыми контактами, которые, по-видимому, стабилизируют фолдинг, и матрица соответствующих вариантов контактов. Пять гидрофобных остатков (IS6_M³⁹⁰, IS6_M³⁹⁷, IVS5_M¹⁶⁶⁸, IVP1_M¹⁷⁰¹ и L¹⁷⁰⁴) образуют плотный кластер (Рисунок 32А, Б). В вариантах M³⁹⁰I/V, M³⁹⁴I, M¹⁶⁶⁸T и M¹⁷⁰¹I замены метионина остатками меньшего размера (Рисунок 32В) будут приводить к дестабилизации кластера и повышать гибкость спирали IVP1. Замена IVP1_L¹⁷⁰⁴H и IS6_I³⁹⁷T также увеличивает гибкость этой спирали. С-конец спирали IVP1 сближен с аланином кольца ДЕКА в области СФ (Рисунок 32Б). Внешняя пора NavAb претерпевает изменения в процессе медленной инактивации (Chatterjee et al., 2018). В канале Nav1.4 Р-петля повтора IV более гибкая, чем в других повторах (Tsushima et al., 1997a; Tsushima et al., 1997b). Вышеупомянутые мутации должны увеличивать гибкость спирали IVP1 и облегчает переход канала в состояние медленной инактивации. Это предположение согласуется с тем, что большинство вариантов в Р-петлях ассоциировано с синдромами,

характеризующимися снижением активности $Na_v1.5$, в частности с BrS1 (Рисунок 32В).

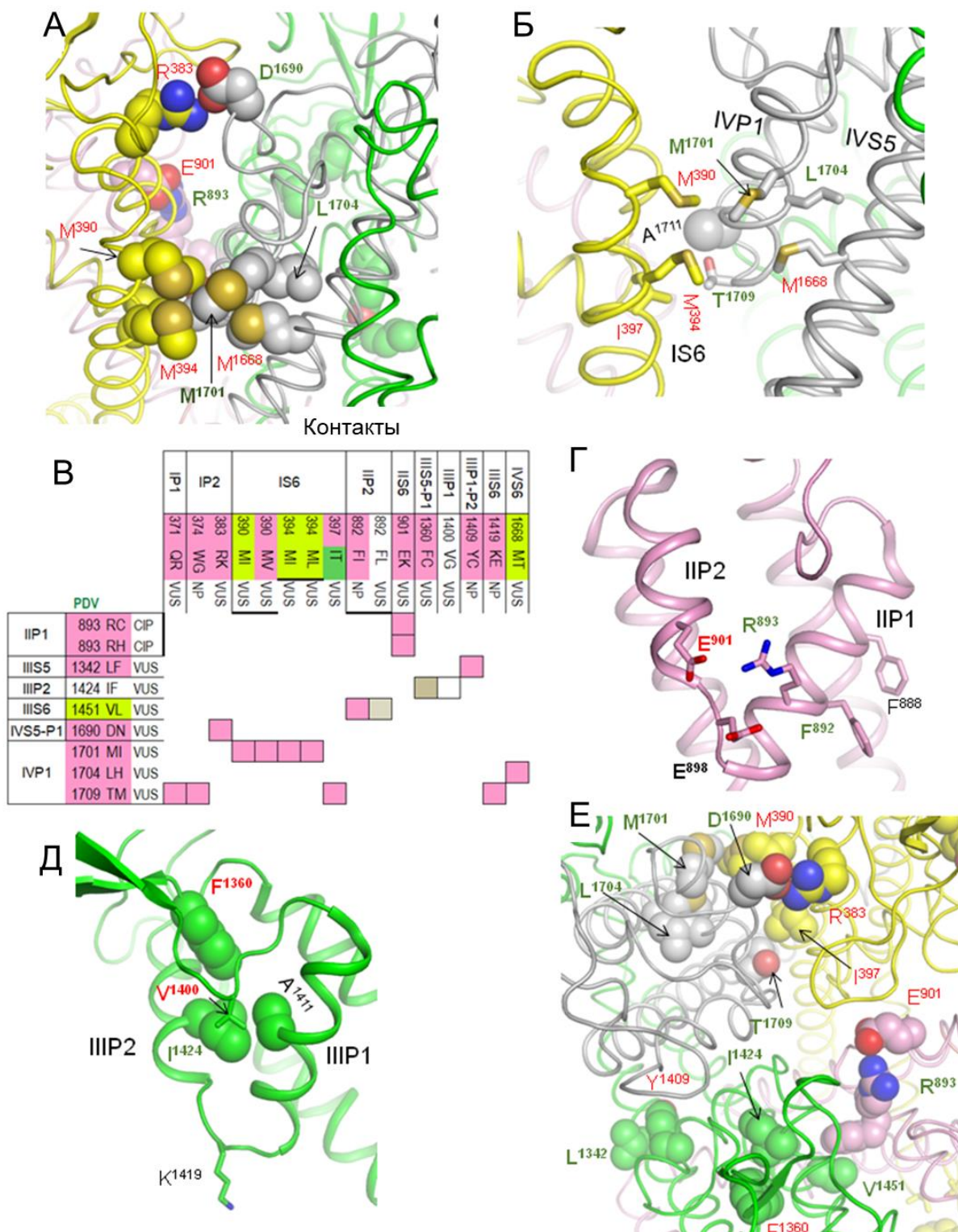


Рисунок 32 – Контакты остатков, стабилизирующие Р-петли в крио-ЭМ структуре. Повторы I, II, III и IV окрашены желтым, розовым, зеленым и

серым цветами, соответственно. Остатки w54 и их контакты пронумерованы зеленым и красным цветами, соответственно. (А, Б) Виды со стороны мембраны. Остатки M³⁹⁰, M³⁹⁴, M¹⁶⁶⁸, M¹⁷⁰¹ и L¹⁷⁰⁴ образуют плотный гидрофобный кластер, который, по-видимому, стабилизирует взаимное расположение спиралей IS6, IVS5 и IVP1. (В) Матрица вариантов контактов в Р-петлях. Поля сверху и слева от матрицы обозначают повторы/сегменты, где локализованы варианты (окрашены) и их клиническая значимость (VUS, NP, CIP). Варианты, ассоциированные с более чем одним заболеванием, показаны двумя цветами. Ячейки в теле матрицы обозначают наличие контакта между соответствующими дикими заместителями. Ячейки окрашены в зависимости от того, ассоциированы ли соответствующие варианты с одним и тем же или разными заболеваниями. Варианты, связанные с BrS1, LQT3 или неуточненной аритмией, окрашены, соответственно, розовым, зеленым или желтым цветом. Варианты, связанные с иными заболеваниями, не окрашены. Большинство связанных вариантов ассоциированы с развитием BrS1 и аритмий, которые также могут быть вызваны уменьшением активности Nav1.5. (Г) Внутримембранный вид спиралей ПР1 и ПР2, взаимное расположение которых стабилизировано солевым мостиком R⁸⁹³:E⁹⁰¹. Конформация боковой цепи глутамата ДЕКА E⁹⁰¹, входящего в состав селективного фильтра, стабилизируется его солевым мостиком с R⁸⁹⁸. Спиральная структура спирали ПР1 стабилизирована π-стекингом F⁸⁸⁸ и F⁸⁹². (Д) Внутримембранный вид спиралей ПП1 и ПП2, взаимное расположение которых стабилизировано кластером из четырех гидрофобных остатков. Лизин K¹⁴¹⁹, входящий в состав селективного фильтра ДЕКА показан палочками. (Е) Внеклеточный вид солевых мостиков R³⁸³:D¹⁶⁹⁰, R⁸⁹³:E⁹⁰¹ и гидрофобных контактов I³⁹⁷:T¹⁷⁰⁹, L¹³⁴²:Y¹⁴⁰⁹ и I¹⁴²⁴:F¹³⁶⁰. Рисунок взят из статьи (Korkosh et al., 2021).

Несколько других мутаций, локализованных в Р-петлях, также могут изменять их гибкость. Например, в крио-ЭМ структуре ПР1_F⁸⁹² и ПР1_F⁸⁸⁸

образуют стэкинг-пару (Рисунок 32Г), которая может стабилизировать α -спираль (Butterfield et al., 2002). Мутация PP1_F⁸⁹²L влияет на межсегментный контакт с PIS6_V¹⁴⁵¹ и разрушает стэкинг-пару с вероятной дестабилизацией спирали PP1. Соседняя аминокислота F⁸⁹², PP1_R⁸⁹³, образует несколько прочных контактов, в том числе солевой мостик с PP2_E⁹⁰¹, который стабилизирует взаимное расположение спиралей PP1 и PP2 (Рисунок 32Г). Другой сильный контакт PP1_R⁸⁹³ включает глутамат СФ PP1-P2_E⁸⁹⁸, который может изменять конформацию при прохождении иона натрия (Zhorov, 2021). Крио-ЭМ структура Nav1.5 получена в комплексе с хинидином (Li et al., 2021b). Неизвестно, открыты или закрыты ворота медленной инактивации в этой структуре. Сильное электростатическое притяжение к PP1_R⁸⁹³ может стабилизировать конформацию E⁸⁹⁸.

Несколько других контактов также стабилизируют структуру Р-петлей. Примером может служить контакт PIP2_I¹⁴²⁴:PIP1_A¹⁴¹¹, который стабилизирует положение лизина PIP1-P2_K¹⁴¹⁹ в СФ (Рисунок 32Д). Мутация I¹⁴²⁴F изменяет контакт с A¹⁴¹¹ и влияет на контакты с PIS5-P1_F¹³⁶⁰ и PIS5-P1_V¹⁴⁰⁰, затрагивающие аминокислоты, варианты которых ассоциированы с заболеваниями. Другим примером является солевой мостик IVS5-P1_D¹⁶⁹⁰:IP2_R³⁸³ (Рисунок 32 А,Е), который отсутствует в BrS1-ассоциированных вариантах IVS5-P1_D¹⁶⁹⁰N и R³⁸³K. В функциональном исследовании вариант D¹⁶⁹⁰N снижал I_{Na} и сдвигал стационарную активацию на 7 мВ в сторону деполяризации (Zeng et al., 2016).

Таким образом, большинство мутаций, влияющих на спирали P1 и P2, связаны со снижением активности каналов. По-видимому, эти мутации искажают структуру СФ и увеличивают фракцию медленно инактивированных каналов. Для сравнения, два остатка за пределами спиралей P1 и P2, PIS5-P1_M⁸⁸¹ и PIS5_G⁸⁵⁷, образуют контакт, который не влияет непосредственно на область СФ. Таким образом, VUSs PIS5-P1_M⁸⁸¹I, и PIS5_G⁸⁵⁷D могут быть реклассифицированы как потенциально повреждающие варианты. Однако, в отличие от описанных выше вариантов,

связанных с BrS1, которые влияют на укладку Р-спиралей, M⁸⁸¹I связан с увеличением активности и LQT3, тогда как G⁸⁵⁷D связан с BrS1.

Контакты в моделях канала с открытым и закрытым ДП, а также контакты в активированных ПЧД и ПЧД в состоянии покоя подробно рассмотрены в нашей публикации (Korkosh et al., 2021).

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование наследственных аритмогенных синдромов с помощью модели гетерологической системы экспрессии (клеток линий НЕК293, СНО-K1) остаётся незаменимым инструментом для исследования электрофизиологических и молекулярных механизмов развития патологии сердца.

Мы показали, что натриевый ток в клетках НЕК293-Т, экспрессировавших $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$, характеризовался рядом изменений функциональных свойств: снижение пиковой плотности тока, нарушение активации и усиление инактивации. В частности, вариант Y^{739}D приводил к отрицательному сдвигу стационарной инактивации и стационарной быстрой инактивации. Он также ускорял промежуточную инактивацию и замедлял активацию. Сдвиг стационарной быстрой инактивации может обуславливаться тем, что мутированный канал развивает медленную инактивацию в масштабе времени, характерном для быстрой инактивации канала WT (Du et al., 2018). Таким образом, мы полагаем, что усиление медленной инактивации является основным механизмом развития BrS1 в случае варианта Y^{739}D . Наконец, мы обнаружили замедление восстановления $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$ из состояния медленной инактивации и значительное снижение зависящей от активности канала при определенных частотах. Таким образом, снижение плотности тока $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$ может быть связано с измененной кинетикой $\text{Na}_v1.5$, а не с аномалиями в транспорте канала. Резюмируя, $\text{Na}_v1.5\text{-Y}^{739}\text{D}$ продемонстрировал фенотип снижения активности, что согласуется с нашим пониманием молекулярных механизмов BrS1.

В крио-ЭМ структуре $\text{rNa}_v1.5 \text{ Y}^{739}$ (нумерация для $\text{hNa}_v1.5$) образует H-связи с K^{1381} и E^{1435} и пи-катионные контакты с K^{1397} (Рисунок 16А). Последний также взаимодействует с посредством водородной связи с карбонилем основной цепи G^{1358} на С-конце III S5. Подобные контакты между петлями II S1-S2 и III S5-P1 также наблюдаются в основанной на $\text{rNa}_v1.5$ модели

hNav1.5. В модели hNav1.5-Y⁷³⁹D аспарат Y⁷³⁹D образует H-связи с K¹³⁹⁷ и Y¹⁴³⁴ (Рисунок 16Б), тогда как H-связь K¹³⁹⁷ с G¹³⁵⁸ теряется. Существенные различия в контактах Y⁷³⁹ и Y⁷³⁹D с петлей IIS5-P1 обуславливают разницу в передаче аллостерических сигналов от ПЧД-II в двух направлениях. Первое направление – через IIS5 к трипептиду быстрой инактивации IFM (Рисунок 16Б), фенилаланин в составе которого образует тесные контакты с V¹³²³ и A¹³²⁶ на N-конце IIS5. Второе направление – по спирали III P1 к K¹⁴¹⁹ в области СФ (Рисунок 16Б), где расположены ворота медленной инактивации.

Y⁷³⁹ консервативен среди паралоогов и ортологов Nav1.5, что указывает на его важную роль. Согласно базе данных ClinVar, петля IIS1-S2 и окружающие ее аминокислоты представляют собой "горячее место" для BrS1-ассоциированных генетических вариантов (A⁷³⁵E, A⁷³⁵V, A⁷³⁵T, L⁷³⁶P, H⁷³⁸P и E⁷⁴⁶K) (Huang et al., 2017). Более того, важная роль петель S1-S2 в функционировании канала согласуется с тем, что мутация T³⁵³I в IIS1-S2, выявленная у пациентов с BrS1, приводит к снижению плотности тока и сдвигу стационарной инактивации в сторону гиперполяризации (Pfahnl et al., 2007).

Замены, влияющие на кинетику медленной инактивации, были идентифицированы в разных частях канала, что свидетельствует о вовлечении в этот процесс множества межсегментных контактов. Влияние BrS1-ассоциированных генетических вариантов на переход в медленно инактивированное состояние описано лишь для нескольких генетических вариантов. В соответствующих исследованиях сообщается об усилении медленной инактивации для замен, локализованных в С-концевом домене (D¹⁵⁹⁵N (Wang et al., 2002), R¹⁶²⁹Q (Zeng et al., 2013), Y¹⁷⁹⁵H (Rivolta et al., 2001)), в поровом домене (G²⁹⁸S (Wang et al., 2002), D¹⁷¹⁴G (Amin et al., 2005)) и в линкере между трансмембранными сегментами (G¹³¹⁹V (Casini et al., 2007)). Здесь мы продемонстрировали, что петля IIS1-S2 также участвует в процессе медленной инактивации.

Таким образом, мы идентифицировали новый вариант $Na_v1.5$ -Y739D у пациента с BrS1 и продемонстрировали, что снижение активности $Na_v1.5$ -Y739D, экспрессируемого в клетках HEK293T, связано с ускоренной медленной и быстрой инактивацией. В гомологических моделях WT и мутантных каналов внеклеточные петли PIS1-S2 в ПЧД-II и PIS5-P1 в поровом домене имеют существенно разные контакты. Анализ различных моделей позволяет предположить, что спирали PIS5 и PIP1 участвуют в передаче аллостерического сигнала от ПЧД-II к воротам быстрой и медленной инактивации, соответственно.

Мы идентифицировали пациента мужского пола со смешанным аритмогенным фенотипом и заменой A¹²⁹⁴G в белке $Na_v1.5$. Функциональная характеристика канала $Na_v1.5$ -A¹²⁹⁴G проводилась с использованием двух различных гетерологических систем экспрессии: клеток линий CHO-K1 и HEK293T, трансфицированных конструкциями с $Na_v1.5$ -WT или $Na_v1.5$ -A¹²⁹⁴G. Использование различных систем позволяло оценить, являются ли полученные результаты независимыми от системы экспрессии. Общими электрофизиологическими изменениями для обеих клеточных линий были следующие: отрицательный сдвиг кривой стационарной инактивации и усиление стационарной быстрой инактивации. Тенденция к ускорению развития инактивации и снижению активности канала при стимуляции с частотой 1,92 Гц была показана для клеток CHO-K1, тогда как для HEK293-T параметры этих кривых достоверно изменились. Также мы выявили некоторые различия в изменении электрофизиологических свойств в двух системах экспрессии. В клетках CHO-K1 восстановление из инактивированного состояния замедлялось, а в клетках HEK293-T не менялось. Дополнительные экспериментальные протоколы были использованы для клеток HEK293-T. Они показали, что развитие медленного инактивированного состояния усиливается, а восстановление после длительной деполяризации замедляется. Пиковая плотность тока не изменилась в клетках CHO-K1, тогда как в клетках HEK293-T она была

снижена. Это различие может быть объяснено специфичными для клеточного типа особенностями транспорта белков. Тем не менее, выявленные функциональные изменения, вызванные заменой A¹²⁹⁴G, могут быть определены как снижение активности (loss-of-function) в обеих экспрессионных системах и потенциально могут способствовать развитию клинических проявлений, наблюдаемых у пациента с выявленным генетическим вариантом.

Дисфункция натриевых каналов сердца связана с различными аритмогенными синдромами, включая синдром удлинённого интервала QT, BrS, ПНСП, атриовентрикулярную блокаду и др. Эти синдромы могут быть связаны с различными электрофизиологическими изменениями. Например, две мутации *SCN5A*, ассоциированные с атриовентрикулярной блокадой IS5-S6_G²⁹⁸S и IVS3_D¹⁵⁹⁵N, характеризовались нарушением быстрой инактивации, усилением медленной инактивации и снижением пикового натриевого тока (Wang et al., 2002). Несмотря на то, что изначально наследственные аритмии считались отдельными клиническими фенотипами, в настоящее время описаны различные смешанные фенотипы, обусловленные одиночными вариантами *SCN5A* (Bezzina et al., 1999).

В настоящее время отсутствует четкая корреляция локализации замен и их клинического или функционального фенотипа. Для нескольких миссенс-вариантов была описана взаимосвязь, преимущественно ассоциированная с локализацией в домене поры (Lupoglazoff et al., 2001). Более систематическое исследование в настоящее время затруднено из-за небольшого процента функционально охарактеризованных вариантов. Сообщалось, что аминокислотные замены, затрагивающие остатки в петлях S3-S4 различных повторов (S²¹⁶L, E¹²⁹⁵K, T¹⁶²⁰K и T¹⁶²⁰M), были идентифицированы у пациентов с синдромом LQT3 и BrS1. Функциональные последствия этих вариантов включают изменения параметров инактивации (E¹²⁹⁵K и T¹⁶²⁰K), восстановления из инактивированного состояния (S²¹⁶L, E¹²⁹⁵K и T¹⁶²⁰M) и активации (S²¹⁶L, T¹⁶²⁰K) (Baroudi et al., 2000; Abriel et al., 2001; Wang et al.,

2007; Surber et al., 2008; Ortiz-Bonnin et al., 2016). Схожим с вышеперечисленными вариантами образом, $A^{1294}G$ влияет на процессы инактивации и восстановления из инактивированного состояния, что указывает на возможную роль линкеров S3-S4 $Na_v1.5$ в конформационных переходах между различными состояниями канала.

Механизмы электромеханической связи между чувствительными к напряжению доменами и доменом поры являются важной проблемой физиологии ионных каналов (Horn, 2000). Триптофановое сканирование $Na_v1.4$ показало, что остатки в линкере S4-S5 в цитоплазматической половине канала способствуют связыванию ПЧД-III с доменом поры (Muroi et al., 2010). Здесь мы продемонстрировали, что вариант $A^{1294}G$ усиливает быструю и медленную инактивацию и замедляет восстановление из инактивированного состояния. Интересно, что известно несколько генетических вариантов, ассоциированных с патологией сердца, которые локализованы в петле S3-S4. Это указывает на то, что этот участок канала важен для нормального функционирования канала. В данном исследовании мы описали новый генетический вариант $A^{1294}G$, ассоциированный со сложной клинической картиной, который увеличивает гибкость петли S3-S4 и, таким образом, может влиять на процессы быстрой и медленной инактивации.

В заключение, мы идентифицировали новый генетический вариант $Na_v1.5$ $A^{1294}G$ у пациента с комбинированным клиническим фенотипом и исследовали электрофизиологические характеристики этого варианта. В совокупности, наши данные свидетельствуют о том, что замена $A^{1294}G$ делает линкер S3-S4 более гибким и, таким образом, изменяет движение потенциал-чувствительной спирали S4. Это, в свою очередь, приводит к небольшому усилению активации и более быстрой релаксации из активированного состояния для процессов как быстрой, так и для медленной инактивации. Эти сложные электрофизиологические изменения могут способствовать проявлению комбинированного фенотипа.

Аминокислотные последовательности петли IVP2-S6, консервативны в ряду каналов $Na_v1.1$ - $Na_v1.8$ и содержат 13-14 остатков между цистеинами, связанными дисульфидной связью (Рисунок 21В). Исключением является канал $Na_v1.9$, чья петля IVP2-S6 имеет только шесть остатков между фланкирующими цистеинами. Взаимодействие такой короткой петли с ПЧД-III является маловероятным. Интересно, что канал $Na_v1.9$ обладает уникальными электрофизиологическими свойствами среди каналов $Na_v1.x$ (Dib-Hajj et al., 2002), например, чрезвычайно медленно переходит в состояние инактивации (Zhou et al., 2017). Ввиду нашего предположения, что петля IVP2-S6 опосредует передачу сигнала от ПЧД-III к селективному фильтру, сверхмедленная инактивация $Na_v1.9$ может указывать на то, что движение ПЧД-III не передаётся к селективному фильтру, а инактивация запускается другим механизмом.

Наши экспериментальные данные показывают функциональную важность остатков R^{1739} , E^{1295} и N^{1736} . Однако тот факт, что электрофизиологические характеристики двойного мутанта $E^{1295}R/R^{1739}E$ довольно схожи с характеристиками канала WT, свидетельствует, что R^{1739} и E^{1295} необязательно образуют солевой мостик, когда ПЧД-III находится в состоянии покоя. Дальнейшие эксперименты, такие как блокировка ПЧД-III в деактивированном состоянии с помощью дисульфидных мостиков или мостиков с ионами металлов, необходимы для демонстрации прямого взаимодействия этих остатков. Между тем возможность существования солевого мостика подтверждается следующими косвенными свидетельствами: 1) Аминокислотные замены, сопровождающиеся потерей заряда, при BrS1-ассоциированных вариантах $R^{1739}Q/W$ или обратные изменения в патогенном варианте $E^{1295}K$ (Рисунок 23В) предполагают участие этих остатков в функционально важных электростатических взаимодействиях. В крио-ЭМ структуре $Na_v1.5$ E^{1295} является ближайшим кислотным остатком, способным притягиваться к R^{1739} . 2) Согласно нашим расчетам, IVP2-S6 скорее способствует, чем сопротивляется совместному смещению вместе с PIS4

(Рисунок 27Г). 3) В состоянии покоя ПЧД-III E^{1295} создает потенциал, притягивающий R^{1739} (Рисунок 29Д). 4) Некоторую аналогию зависимых от состояния контактов между ПЧД-III и петлей IVP2-S6 можно найти в крио-ЭМ структурах $rNa_v1.5$, где петли IP2-S6 и IVS3-S4 расположены достаточно далеко друг от друга в активированном состоянии IVS4, но образуют тесный контакт в состоянии покоя (Рисунок 22Г). 5) Предлагаемый механизм объясняет, почему множественные мутации в предполагаемом пути передачи движения от ПЧД-III к селективному фильтру связаны со снижением активности $Na_v1.5$ и развитием синдрома Бругада (Рисунок 23Б).

Таким образом, мы создали четыре мутантных конструкции, локализованных в интерфейсе ПЧД-III и внеклеточной петли IVP2-S6, экспрессировали данные мутанты в клетках HEK293-T и исследовали их электрофизиологические свойства. Мутация $E^{1295}R$ в петле III S3-S4 продемонстрировала наиболее сильное влияние на зависимость активации и инактивации каналов от напряжения. Основываясь на молекулярном моделировании, мы предполагаем, что E^{1295} образует зависимый от состояния канала солевой мостик с R^{1739} , единственным основным остатком в спирали IVP2-S6, который приближается к E^{1295} в крио-ЭМ-структуре связанного с хинидином $hNa_v1.5$. Мы также предполагаем, что контакты между ПЧД-III и петлей IVP2-S6 опосредуют передачу зависимых от напряжения движений от ПЧД-III к селективному фильтру и способствуют передаче движения от ПЧД-III к воротам быстрой инактивации. Наше исследование предполагает возможность аллостерической передачи сигнала между ПЧД-III и воротами инактивации в натриевом канале сердца. Мутации многих остатков в данном пути передачи сигнала ассоциированы с развитием аритмии.

Несмотря на актуальность исследований эффектов мутаций в $Na_v1.5$ на модели гетерологической системе экспрессии существует ряд факторов, которые ограничивают интерпретацию данных электрофизиологических экспериментов в контексте взаимосвязи между генотипом и фенотипом пациента.

Во-первых, наблюдается существенный недостаток информации о клинической значимости большинства генетических вариантов *SCN5A*, в связи с их низкой частотой встречаемости. Следовательно, в случае таких вариантов нет возможности исключить влияние таких факторов как возраст, пол и гормональный статус пациента (Zimmer and Surber, 2008).

Во-вторых, в гетерологической системе экспрессии отсутствует ряд кардио-специфичных белков, которые могут влиять на экспрессию *SCN5A*, транспорт $Na_v1.5$ на мембрану и регуляцию его функциональных свойств. Например, генетические варианты могут затрагивать взаимодействие с белками цитоскелета (анкирин-G, анкирин-B), кальций-связывающими белками (кальмодулин), убиквитин-лигазами, синтрофином и др. (Mohler et al., 2004; Balse and Eichel, 2018). Амплитуда $I_{Na,L}$ для ряда вариантов определяется уровнем активности протеинкиназ A и C (Tateyama et al., 2003a; Tateyama et al., 2003b).

В-третьих, системы экзогенной экспрессии не позволяют проанализировать долговременный эффект экспрессии генетического варианта *SCN5A* в миокарде. Например, установлено изменение экспрессии 33 генов у трансгенной мыши с мутацией $N^{1325}S$, в частности, транскрипционного фактора STAT1, вовлеченного в процессы программируемой клеточной гибели и интерферонового ответа (Wu et al., 2007). Таким образом, изменение функции *SCN5A* способно вызвать многоуровневый клеточный ответ, который оказывает комплексный эффект на фенотип. Это предположение согласуется с информацией о структурных изменениях проводящей системы, ассоциированных с гетерозиготными мутациями $W^{156}X$ и $R^{225}W$ (Bezzina et al., 2003).

В-четвертых, исследования на модели гетерологической системы экспрессии ведётся без учёта окружения генетического варианта. В большинстве случаев исследуемый вариант рассматривается в отрыве от полиморфизмов *SCN5A*, носителем которых является пациент, несмотря на то, что для многих полиморфизмов показано их действие на

электрофизиологические свойства, транспорт канала или же известна их кардио-протективная роль. Однако, было проведено несколько функциональных исследований подобных сочетаний генетических вариантов (Ye et al., 2003; Ackerman et al., 2004). Также следует отметить, что, изменение электрофизиологических характеристик $Na_v1.5$ может быть следствием альтернативного сплайсинга (Tan et al., 2006; Wang et al., 2007).

В-пятых, часто дизайн функциональных исследований предполагает измерения при комнатной температуре, что способно осложнить выявление изменений электрофизиологических характеристик и транспорта канала. Так изменения электрофизиологических свойств при повышении температуры были показаны для вариантов delKPQ (Nagatomo et al., 1998); T¹⁶²⁰M (Baroudi et al., 2000); Y¹⁷⁹⁵H (Rivolta et al., 2001); G¹⁹³⁵S (Coronel et al., 2005); Y¹⁷⁹⁵C, A¹³³⁰P (Berecki et al., 2006).

Функциональные исследования, выполненные на модели гетерологической системы экспрессии остаются высокоинформативным методом для выявления корреляции между генотипом и фенотипом пациента. Актуальность данного подхода для клинической практики во многом заключается в том, что метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) позволяет выявлять эффективность коррекции электрофизиологических изменений, обусловленных генетическими вариантами, с помощью различных антиаритмиков и оценивать влияние факторов внешней среды, таких как ацидоз и температура. Таким образом, выявление молекулярных механизмов аритмии может находить применение в разработке комплекса индивидуальных терапевтических мер для пациентов с конкретным генетическим вариантом *SCN5A*, что определяет ценность данного направления для развития персонализированной медицины. Кроме того, при вариантах, ассоциированных с развитием смешанного фенотипа, который объединяет симптомы LQT3 и BrS1 (например, E¹⁷⁸⁴K), выявлены как изменения функциональных характеристик, характерные для увеличения, так

и для уменьшения активности $Na_v1.5$. Таким образом, данные исследования улучшают наше понимание феномена смешанных фенотипов.

Исследование электрофизиологических механизмов *SCN5A*-ассоциированных натриевых каналопатий позволяет установить роль конкретных аминокислотных остатков в различных конформационных переходах $Na_v1.5$, таким образом, вносит существенный вклад в понимание механизмов функционирования натриевого канала в норме и патологии.

Данная работа иллюстрирует эффективность интеграции экспериментального и теоретического подходов в изучении общей физиологии ионных каналов и расширяет наше понимание структурных основ функционирования $Na_v1.5$ в норме и патологии и позволяет реклассифицировать ряд генетических варианты *SCN5A* неизвестной клинической значимости как потенциально повреждающие варианты. Полученные данные имеют потенциальную практическую значимость, так как улучшают стратификацию риска для пациентов с наследственными нарушениями сердечного ритма.

6. ВЫВОДЫ

1. Мутация $Y^{739}D$ в натриевом канале $Na_v1.5$, который играет ключевую роль в передаче возбуждения в миокарде, вызывает ослабление активации и усиление инактивации, что приводит к дисфункции $Na_v1.5$ и может лежать в основе развития синдрома Бругада.
2. Мутация $A^{1294}G$ приводит к усилению быстрой и медленной инактивации канала $Na_v1.5$. Это свидетельствует об уменьшении активности канал, которая нарушает нормальную физиологическую функцию сердца и может лежать в основе развития смешанной клинической картины у пациента.
3. Физиологическая дисфункция канала $Na_v1.5$ при мутациях $E^{1295}R$ в потенциал-чувствительном домене III (ПЧД-III) и $R^{1739}E$ в петле IVP2-S6 порового домена компенсируются у двойного мутанта $E^{1295}R/R^{1739}E$. Это свидетельствует о взаимодействии между заместителями E^{1295} и R^{1739} и его участии в передаче сигнала от ПЧД-III к инактивационным воротам порового домена.
4. На основе анализа структуры $Na_v1.5$ и матричного представления контактных вариантов предложен список потенциально повреждающих вариантов гена *SCN5A* для последующих экспериментальных исследований.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abriel, H. Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology/ H. Abriel // J Mol Cell Cardiol. -2010. – Vol. 48(1). – P. 2-11.
2. Abriel, H. Novel arrhythmogenic mechanism revealed by a long-QT syndrome mutation in the cardiac Na(+) channel/ H. Abriel, C. Cabo, X.H. Wehrens [et al.] // Circ Res. -2001. – Vol. 88(7). – P. 740-745.
3. Ackerman, M.J. Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome / M.J. Ackerman, B.L. Siu, W.Q. Sturner [et al.] // Jama. -2001. – Vol. 286(18). – P. 2264-2269.
4. Ackerman, M.J. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing / M.J. Ackerman, I. Splawski, J.C. Makielski [et al.] // Heart Rhythm. -2004. – Vol. 1(5). – P. 600-607.
5. Adelman, W.J. Jr. The effects of external potassium and long duration voltage conditioning on the amplitude of sodium currents in the giant axon of the squid, *Loligo pealei* / W.J. Jr. Adelman, Y. Palti // J Gen Physiol. -1969. – Vol. 54(5). – P. 589-606.
6. Aggarwal, S.K. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel/ S.K. Aggarwal, R. MacKinnon // Neuron. -1996. – Vol. 16(6). – P. 1169-1177.
7. Ahern, C.A. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy / C.A. Ahern, J. Payandeh, F. Bosmans [et al.] // J Gen Physiol. -2016. – Vol. 147(1). – P. 1-24.
8. Aiba, T. A mutation causing Brugada syndrome identifies a mechanism for altered autonomic and oxidant regulation of cardiac sodium currents/ T. Aiba, F. Farinelli, G. Kostecky [et al.] // Circ Cardiovasc Genet. -2014. – Vol. 7(3). – P. 249-256.

9. Albert, C.M. Cardiac sodium channel gene variants and sudden cardiac death in women / C.M. Albert, E.G. Nam, E.B. Rimm [et al.] // *Circulation*. -2008. – Vol. 117(1). – P. 16-23.
10. Amin, A.S. Cardiac sodium channelopathies / A.S. Amin, A. Asghari-Roodsari and H.L. Tan. // *Pflugers Arch*. -2010. – Vol. 460(2). – P. 223-237.
11. Amin, A.S. Novel Brugada syndrome-causing mutation in ion-conducting pore of cardiac Na⁺ channel does not affect ion selectivity properties / A.S. Amin, A.O. Verkerk, Z.A. Bhuiyan [et al.] // *Acta Physiol Scand*. -2005. – Vol. 185(4). – P. 291-301.
12. An, R.H. Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between alpha- and beta1-subunits / R.H. An, X.L. Wang, B. Kerem [et al.] // *Circ Res*. -1998. – Vol. 83(2). – P. 141-146.
13. Arendt D. The Evolutionary Assembly of Neuronal Machinery / D. Arendt // *Curr Biol*. -2020. – Vol. 30(10). – P. R603-r616. doi: 10.1016/j.cub.2020.04.008
14. Armstrong, C.M. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels / C.M. Armstrong, F. Bezanilla // *Nature*. -1973. – Vol. 242(5398). – P. 459-461.
15. Armstrong, C.M. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels / C.M. Armstrong, F. Bezanilla // *J Gen Physiol*. -1974. – Vol. 63(5). – P. 533-552.
16. Bagal, S.K. Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective / S.K. Bagal, A.D. Brown, P.J. Cox [et al.] // *J Med Chem*. -2013. – Vol. 56(3). – P. 593-624.
17. Bähring, R. Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels / R. Bähring, M. Covarrubias // *J Physiol*. -2011. – Vol. 589(Pt 3). – P. 461-479.
18. Baker, N.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome / N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2001. – Vol. 98(18). – P. 10037-10041.

19. Balbi, P. A single Markov-type kinetic model accounting for the macroscopic currents of all human voltage-gated sodium channel isoforms / P Balbi, P Massobrio, J. Hellgren Kotaleski. // *PLoS Comput Biol.* -2017. – Vol. 13(9). – P. e1005737.
20. Balse, E. The Cardiac Sodium Channel and Its Protein Partners / E. Balse, C. Eichel // *Handb Exp Pharmacol.* -2018. – Vol. 246. – P. 73-99.
21. Balsler, J.R. External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels / J.R. Balsler, H.B. Nuss, N. Chiamvimonvat [et al.]. // *J Physiol.* -1996. – Vol. 494 (Pt 2)(Pt 2). – P. 431-442.
22. Bankston, J.R. A novel and lethal de novo LQT-3 mutation in a newborn with distinct molecular pharmacology and therapeutic response / J.R. Bankston, M. Yue, W. Chung [et al.] // *PLoS One.* -2007. – Vol. 2(12). – P. e1258.
23. Baroudi, G. SCN5A mutation (T1620M) causing Brugada syndrome exhibits different phenotypes when expressed in *Xenopus* oocytes and mammalian cells / G. Baroudi, E. Carbonneau, V. Pouliot [et al.] // *FEBS Lett.* -2000. – Vol. 467(1). – P. 12-16.
24. Baroudi, G. Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G) / G. Baroudi, V. Pouliot, I. Denjoy [et al.] // *Circ Res.* -2001. – Vol. 88(12). – P. E78-83.
25. Bassetto, C.A. Molecular basis for functional connectivity between the voltage sensor and the selectivity filter gate in Shaker K(+) channels / C.A. Bassetto, J.L. Carvalho-de-Souza, F. Bezanilla // *Elife.* -2021. – Vol. 10. – P. e63077.
26. Bennett, P.B. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia / P.B. Bennett, K. Yazawa, N. Makita [et al.] // *Nature.* -1995. – Vol. 376(6542). – P. 683-685.
27. Berecki, G. Long-QT syndrome-related sodium channel mutations probed by the dynamic action potential clamp technique / G. Berecki, J.G. Zegers, Z.A. Bhuiyan [et al.] // *J Physiol.* -2006. – Vol. 570(Pt 2). – P. 237-250.

28. Bers, D.M. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II regulation of cardiac excitation-transcription coupling / D.M. Bers // *Heart Rhythm*. -2011. – Vol. 8(7). – P. 1101-1104.
29. Bezanilla, F. How membrane proteins sense voltage / F. Bezanilla // *Nat Rev Mol Cell Biol*. -2008. – Vol. 9(4). – P. 323-332.
30. Bezzina, C. A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes / C. Bezzina, M.W. Veldkamp, M.P. van Den Berg [et al.] // *Circ Res*. -1999. – Vol. 85(12). – P. 1206-1213.
31. Bezzina, C.R. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system / C.R. Bezzina, M.B. Rook, W.A. Groenewegen [et al.] // *Circ Res*. -2003. – Vol. 92(2). – P. 159-168.
32. Black, J.A. Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels / J.A. Black, S.G. Waxman // *Neuron*. -2013. – Vol. 80(2). – P. 280-291.
33. Boukens, B.J. Electrophysiological patterning of the heart / B.J. Boukens, V.M. Christoffels // *Pediatr Cardiol*. -2012. – Vol. 33(6). – P. 900-906.
34. Brooks, C.L. Structural and energetic effects of truncating long ranged interactions in ionic and polar fluids / C.L. Brooks, B.M. Pettitt, M. Karplus // *The Journal of Chemical Physics*. -1985. – Vol. 83(11). – P. 5897-5908.
35. Brugada, P. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report / P. Brugada, J. Brugada // *J Am Coll Cardiol*. -1992. – Vol. 20(6). – P. 1391-1396.
36. Bruhova, I. A homology model of the pore domain of a voltage-gated calcium channel is consistent with available SCAM data / I. Bruhova, B.S. Zhorov // *J Gen Physiol*. -2010. – Vol. 135(3). – P. 261-274.
37. Butterfield, S.M. Contribution of aromatic interactions to alpha-helix stability/ S.M. Butterfield, P.R. Patel, M.L. Waters // *J Am Chem Soc*. -2002. – Vol. 124(33). – P. 9751-9755.

38. Casini, S. Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada syndrome reveals involvement of DIIS4-S5 linker in slow inactivation / S. Casini, H.L. Tan, Z.A. Bhuiyan [et al.] // *Cardiovasc Res.* - 2007. – Vol. 76(3). – P. 418-429.
39. Catterall, W.A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels / W.A. Catterall // *Annu Rev Biochem.* -1986. – Vol. 55. – P. 953-985.
40. Catterall, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels // *Neuron.* -2000. – Vol. 26(1). – P. 13-25.
41. Catterall, W.A. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology/ W.A. Catterall // *Neuron.* -2010. – Vol. 67(6). – P. 915-928.
42. Catterall, W.A. Voltage gated sodium and calcium channels: Discovery, structure, function, and Pharmacology/ W.A. Catterall // *Channels (Austin).* - 2023. – Vol. 17(1). – P. 2281714.
43. Catterall, W.A. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels / W.A. Catterall, A.L. Goldin, S.G. Waxman // *Pharmacol Rev.* -2005. – Vol. 57(4). – P. 397-409.
44. Cava, F. Long QTc in hypertrophic cardiomyopathy: A consequence of structural myocardial damage or a distinct genetic disease?/ F. Cava, C. Micolonghi, M.B. Musumeci [et al.] // *Front Cardiovasc Med.* -2023. – Vol. 10. – P. 1112759.
45. Cerrone, M. The Genetics of Brugada Syndrome / M. Cerrone, S. Costa, M. Delmar. // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* -2022. – Vol. 23. – P. 255-274.
46. Cerrone, M. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype / M. Cerrone, X. Lin, M. Zhang [et al.] // *Circulation.* -2014. – Vol. 129(10). – P. 1092-1103.
47. Cerrone, M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency / M. Cerrone, M. Noorman, X. Lin [et al.] // *Cardiovasc Res.* -2012. – Vol. 95(4). – P. 460-468.

48. Cerrone, M. Beyond the One Gene-One Disease Paradigm: Complex Genetics and Pleiotropy in Inheritable Cardiac Disorders / M. Cerrone, C.A. Remme, R. Tadros [et al.] // *Circulation*. -2019. – Vol. 140(7). – P. 595-610.
49. Chakrabarti, N. Catalysis of Na⁺ permeation in the bacterial sodium channel Na(V)Ab / N. Chakrabarti, C. Ing, J. Payandeh [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2013. – Vol. 110(28). – P. 11331-11336.
50. Chandler WK. Sodium and potassium currents in squid axons perfused with fluoride solutions/ W.K. Chandler, H. Meves // *J Physiol*. -1970. – Vol. 211(3). – P. 623-652.
51. Chang, C.C. A novel SCN5A mutation manifests as a malignant form of long QT syndrome with perinatal onset of tachycardia/bradycardia / C.C. Chang, S. Acharfi, M.H. Wu [et al.] // *Cardiovasc Res*. -2004. – Vol. 64(2). – P. 268-278.
52. Chatterjee, S. The voltage-gated sodium channel pore exhibits conformational flexibility during slow inactivation / S. Chatterjee, R. Vyas, S.V. Chalamalasetti [et al.] // *J Gen Physiol*. -2018. – Vol. 150(9). – P. 1333-1347.
53. Chen, C. Brugada syndrome with SCN5A mutations exhibits more pronounced electrophysiological defects and more severe prognosis: A meta-analysis / C. Chen, Z. Tan, W. Zhu [et al.] // *Clin Genet*. -2020. – Vol. 97(1). – P. 198-208.
54. Chen, Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation / Q. Chen, G.E. Kirsch, D. Zhang [et al.] // *Nature*. -1998. – Vol. 392(6673). – P. 293-296.
55. Chen, R. Voltage-Gated Sodium Channel Pharmacology: Insights From Molecular Dynamics Simulations / R. Chen, A. Buyan, B. Corry // *Adv Pharmacol*. -2017. – Vol. 79. – P. 255-285.
56. Clairfeuille, T. Structural basis of α -scorpion toxin action on Na(v) channels / T. Clairfeuille, A. Cloake, D.T. Infield [et al.] // *Science*. -2019. – Vol. 363(6433). – P. eaav8573.

57. Clancy, C.E. Non-equilibrium gating in cardiac Na⁺ channels: an original mechanism of arrhythmia / C.E. Clancy, M. Tateyama, H. Liu, X.H. Wehrens, R.S. Kass // *Circulation*. -2003. – Vol. 107(17). – P. 2233-2237.
58. Clark, K.A. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function / K.A. Clark, A.S. McElhinny, M.C. Beckerle [et al.] // *Annu Rev Cell Dev Biol*. -2002. – Vol. 18. – P. 637-706.
59. Clatot, J. Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5 α -subunits / J. Clatot, A. Ziyadeh-Isleem, S. Maugenre [et al.] // *Cardiovasc Res*. -2012. – Vol. 96(1). – P. 53-63.
60. Cordeiro, J.M. Compound heterozygous mutations P336L and I1660V in the human cardiac sodium channel associated with the Brugada syndrome / J.M. Cordeiro, H. Barajas-Martinez, K. Hong [et al.] // *Circulation*. -2006. – Vol. 114(19). – P. 2026-2033.
61. Coronel, R. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study / R. Coronel, S. Casini, T.T. Koopmann [et al.] // *Circulation*. -2005. – Vol. 112(18). – P. 2769-2777.
62. Cowgill, J. Mapping Electromechanical Coupling Pathways in Voltage-Gated Ion Channels: Challenges and the Way Forward / J. Cowgill, B. Chanda // *J Mol Biol*. -2021. – Vol. 433(17). – P. 167104.
63. Daimi, H. Genomic and Non-Genomic Regulatory Mechanisms of the Cardiac Sodium Channel in Cardiac Arrhythmias / H. Daimi, E. Lozano-Velasco, A. Aranega [et al.] // *Int J Mol Sci*. -2022. – Vol. 23(3). – P. 1381.
64. de Lera Ruiz M. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications / M. de Lera Ruiz, R.L. Kraus // *J Med Chem*. -2015. – Vol. 58(18). – P. 7093-7118.
65. Dib-Hajj, S. NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties / S. Dib-Hajj, J.A. Black, T.R. Cummins [et al.] // *Trends Neurosci*. -2002. – Vol. 25(5). – P. 253-259.

66. Dolinsky, T.J. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations / T.J. Dolinsky, J.E. Nielsen, J.A. McCammon [et al.] // *Nucleic Acids Res.* -2004. – Vol. 32(Web Server issue). – P. W665-667.
67. Dong, C. Life Cycle of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 / C. Dong, Y. Wang, A. Ma [et al.] // *Frontiers in Physiology.* -2020. – Vol. 11. – P. 609733
68. Doyle, D.A. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity / D.A. Doyle, J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner [et al.] // *Science.* -1998. – Vol. 280(5360). – P. 69-77.
69. Du, Y. Mutational analysis of state-dependent contacts in the pore module of eukaryotic sodium channels / Y. Du, D.B. Tikhonov, Y. Nomura [et al.] // *Arch Biochem Biophys.* -2018. – Vol. 652. – P. 59-70.
70. Dun, W. The Purkinje cell; 2008 style / W. Dun, P.A. Boyden // *J Mol Cell Cardiol.* -2008. – Vol. 45(5). – P. 617-624.
71. Eaholtz, G. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide / G. Eaholtz, T. Scheuer, W.A. Catterall // *Neuron.* -1994. – Vol. 12(5). – P. 1041-1048.
72. Eaholtz, G. Kinetic analysis of block of open sodium channels by a peptide containing the isoleucine, phenylalanine, and methionine (IFM) motif from the inactivation gate / G. Eaholtz, W.N. Zagotta, W.A. Catterall // *J Gen Physiol.* -1998. – Vol. 111(1). – P. 75-82.
73. Eckert, R. Ionic mechanisms of excitation in Paramecium / R. Eckert, P. Brehm // *Annu Rev Biophys Bioeng.* -1979. – Vol. 8. – P. 353-383.
74. Fatima, A. The disease-specific phenotype in cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells of two long QT syndrome type 3 patients / A. Fatima, S. Kaifeng, S. Dittmann [et al.] // *PLoS One.* -2013. – Vol. 8(12). – P. e83005.

75. Fredj, S. Altered Na⁺ channels promote pause-induced spontaneous diastolic activity in long QT syndrome type 3 myocytes / S. Fredj, N. Lindegger, K.J. Sampson [et al.] // *Circ Res.* -2006. – Vol. 99(11). – P. 1225-1232.
76. Frustaci, A. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome / A. Frustaci, S.G. Priori, M. Pieroni [et al.] // *Circulation.* -2005. – Vol. 112(24). – P. 3680-3687.
77. Gade, A.R. An interaction between the III-IV linker and CTD in NaV1.5 confers regulation of inactivation by CaM and FHF / A.R. Gade, S.O. Marx, G.S. Pitt // *J Gen Physiol.* -2020. – Vol. 152(2). – P. e201912434
78. Gamal El-Din, T.M. Fenestropathy of Voltage-Gated Sodium Channels / T.M. Gamal El-Din, M.J. Lenaeus // *Front Pharmacol.* -2022. – Vol. 13. – P. 842645.
79. Garden, D.P. Docking flexible ligands in proteins with a solvent exposure- and distance-dependent dielectric function / D.P. Garden, B.S. Zhorov // *J Comput Aided Mol Des.* -2010. – Vol. 24(2). – P. 91-105.
80. Gardill, B. Nanodisc technology facilitates identification of monoclonal antibodies targeting multi-pass membrane proteins / B. Gardill, J. Huang, L. Tu [et al.] // *Sci Rep.* -2020. – Vol. 10(1). – P. 1130.
81. Gardill, B.R. The voltage-gated sodium channel EF-hands form an interaction with the III-IV linker that is disturbed by disease-causing mutations / B.R. Gardill, R.E. Rivera-Acevedo, C.C. Tung [et al.] // *Sci Rep.* -2018. – Vol. 8(1). – P. 4483.
82. Gavillet B. Cardiac Sodium Channel Na_v1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin / B. Gavillet, J.S. Rougier, A.A. Domenighetti [et al.] // *Circulation Research.* -2006. – Vol. 99(4). – P. 407-414.
83. Gellens, M.E. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel / M.E. Gellens, A.L. Jr. George, L.Q. Chen [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -1992. – Vol. 89(2). – P. 554-558.

84. George, A.L.Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels / A.L.Jr. George // *J Clin Invest.* -2005. – Vol. 115(8). – P. 1990-1999.
85. Ghovanloo, M.R. Physiology and Pathophysiology of Sodium Channel Inactivation / M.R. Ghovanloo, K. Aimar, R. Ghadir-Tavi [et al.] // *Curr Top Membr.* -2016. – Vol. 78. – P. 479-509.
86. Grant, A.O. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation / A.O. Grant, M.P. Carboni, V. Neplioueva [et al.] // *J Clin Invest.* -2002. – Vol. 110(8). – P. 1201-1209.
87. Guan, Y. Nucleoporin 107 facilitates the nuclear export of Scn5a mRNA to regulate cardiac bioelectricity / Y. Guan, X. Gao, Q. Tang [et al.] // *J Cell Mol Med.* -2019. – Vol. 23(2). – P. 1448-1457.
88. Gusev, K. Impact of the DSP-H1684R Genetic Variant on Ion Channels Activity in iPSC-Derived Cardiomyocytes / K. Gusev, A. Khudiakov, A. Zaytseva [et al.] // *Cell Physiol Biochem.* -2020. – Vol. 54(4). – P. 696-706.
89. Gütter, C. Characterization of N-terminally mutated cardiac Na(+) channels associated with long QT syndrome 3 and Brugada syndrome / C. Gütter, K. Benndorf, T. Zimmer // *Front Physiol.* -2013. – Vol. 4. – P. 153.
90. Hamill, O.P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher [et al.] // *Pflugers Arch.* -1981. – Vol. 391(2). – P. 85-100.
91. Han, D. Dysfunctional Nav1.5 channels due to SCN5A mutations / D. Han, H. Tan, C. Sun [et al.] // *Exp Biol Med (Maywood).* -2018. – Vol. 243(10). – P. 852-863.
92. Hartshorne, R.P. The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition / R.P. Hartshorne, W.A. Catterall // *J Biol Chem.* -1984. – Vol. 259(3). – P. 1667-1675.
93. Hartshorne, R.P, Coppersmith J and Catterall WA. Size characteristics of the solubilized saxitoxin receptor of the voltage-sensitive sodium channel from

- rat brain / Hartshorne RP, J. Coppersmith, W.A. Catterall // J Biol Chem. - 1980. – Vol. 255(22). – P. 10572-10575.
94. Heinemann, S.H. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations / S.H. Heinemann, H. Terlau, W. Stühmer [et al.] // Nature. -1992. – Vol. 356(6368). – P. 441-443.
95. Hirschberg, B. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels / B. Hirschberg, A. Rovner, M. Lieberman [et al.] // J Gen Physiol. -1995. – Vol. 106(6). – P. 1053-1068.
96. Hodgkin, A.L. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve / A.L. Hodgkin, A.F. Huxley // J Physiol. -1952. – Vol. 117(4). – P. 500-544.
97. Hoogendijk, M.G. Mechanism of right precordial ST-segment elevation in structural heart disease: excitation failure by current-to-load mismatch / M.G. Hoogendijk, M. Potse, A.C. Linnenbank [et al.] // Heart Rhythm. -2010. – Vol. 7(2). – P. 238-248.
98. Horn, R. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels / R.Horn // Biochemistry. -2000. – Vol. 39(51). – P. 15653-15658.
99. Hosseini, S.M. Reappraisal of Reported Genes for Sudden Arrhythmic Death: Evidence-Based Evaluation of Gene Validity for Brugada Syndrome / S.M. Hosseini, R. Kim, S. Udupa [et al.] // Circulation. -2018. – Vol. 138(12). – P. 1195-1205.
100. Hsueh, C.H. Distinct functional defect of three novel Brugada syndrome related cardiac sodium channel mutations / C.H. Hsueh, W.P. Chen, J.L. Lin [et al.] // J Biomed Sci. -2009. – Vol. 16(1). – P. 23.
101. Huang, W. Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels / W. Huang, M. Liu, S.F. Yan [et al.] // Protein Cell. -2017. – Vol. 8(6). – P. 401-438.
102. Itoh, H. A paradoxical effect of lidocaine for the N406S mutation of SCN5A associated with Brugada syndrome / H. Itoh, K. Tsuji, T. Sakaguchi [et al.] // Int J Cardiol. -2007. – Vol. 121(3). – P. 239-248.

103. Jensen, M. Mechanism of voltage gating in potassium channels / M. Jensen, V. Jogini, D.W. Borhani [et al.] // *Science*. -2012. – Vol. 336(6078). – P. 229-233.
104. Jiang, D. Open-state structure and pore gating mechanism of the cardiac sodium channel / D. Jiang, R. Banh, T.M. Gamal El-Din [et al.] // *Cell*. -2021a. – Vol. 184(20). – P. 5151-5162.e5111.
105. Jiang, D. Expression and purification of the cardiac sodium channel Na(V)1.5 for cryo-EM structure determination / D. Jiang, T. Gamal El-Din, N. Zheng [et al.] // *Methods Enzymol*. -2021b. – Vol. 653. – P. 89-101.
106. Jiang, D. Structure of the Cardiac Sodium Channel / D. Jiang, H. Shi, L. Tonggu [et al.]. // *Cell*. -2020. – Vol. 180(1). – P. 122-134.e110.
107. Jiang, D. Structural basis for voltage-sensor trapping of the cardiac sodium channel by a deathstalker scorpion toxin / D. Jiang, L. Tonggu, T.M. Gamal El-Din [et al.] // *Nat Commun*. -2021c. – Vol. 12(1). – P. 128.
108. Juang, J.M. Brugada syndrome--an under-recognized electrical disease in patients with sudden cardiac death / J.M. Juang, S.K. Huang // *Cardiology*. -2004. – Vol. 101(4). – P. 157-169.
109. Kass, R.S. Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain / R.S. Kass // *J Cardiovasc Electrophysiol*. -2006. – Vol. 17 Suppl 1. – P. S21-s25.
110. Keller, D.I. A novel SCN5A mutation, F1344S, identified in a patient with Brugada syndrome and fever-induced ventricular fibrillation / D.I. Keller, H. Huang, J. Zhao [et al.] // *Cardiovasc Res*. -2006. – Vol. 70(3). – P. 521-529.
111. Khan, A. Current review of Brugada syndrome: from epidemiology to treatment / A. Khan, S. Mittal, M.V. Sherrid // *Anadolu Kardiyol Derg*. -2009. – Vol. 9 Suppl 2. – P. 12-16.
112. Khudiakov, A. Sodium current abnormalities and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling in iPSC-derived cardiomyocytes generated from patient with arrhythmogenic cardiomyopathy harboring compound genetic

- variants in plakophilin 2 gene / Khudiakov A, Zaytseva A, Perepelina K [et al.] // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* -2020. – Vol. 1866(11). – P. 165915.
113. Kinoshita, K. SCN5A(K817E), a novel Brugada syndrome-associated mutation that alters the activation gating of NaV1.5 channel / Kinoshita K, Takahashi H, Hata Y [et al.] // *Heart Rhythm.* -2016. – Vol. 13(5). – P. 1113-1120.
114. Kleber, A.G. Normal and Abnormal Conduction in the Heart / A.G. Kleber, M.J. Janse, V.G. Fast // *Comprehensive Physiology.* -2011. – Vol. – P. 455-530.
115. Kontis, K.J. Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains / K.J. Kontis, A. Rounaghi, A.L. Goldin // *J Gen Physiol.* -1997. – Vol. 110(4). – P. 391-401.
116. Korkosh, V.S. Atomic Mechanisms of Timothy Syndrome-Associated Mutations in Calcium Channel Cav1.2 / V.S. Korkosh, A.M. Kiselev, E.N. Mikhaylov [et al.] // *Front Physiol.* -2019. – Vol. 10. – P. 335.
117. Korkosh, V.S. Intersegment Contacts of Potentially Damaging Variants of Cardiac Sodium Channel / V.S. Korkosh, A.K. Zaytseva, A.A. Kostareva [et al.] // *Front Pharmacol.* -2021. – Vol. 12. – P. 756415.
118. Kostareva, A. Genetic Spectrum of Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy Uncovered by Next-Generation Sequencing / A. Kostareva, A. Kiselev, A. Gudkova [et al.] // *PLoS One.* -2016. – Vol. 11(9). – P. e0163362.
119. Krahn, A.D. Brugada Syndrome / Krahn AD, Behr ER, Hamilton R, Probst V, Laksman Z and Han HC // *JACC Clin Electrophysiol.* -2022. – Vol. 8(3). – P. 386-405.
120. Kroncke, B.M. *SCN5A* (Na_V1.5) Variant Functional Perturbation and Clinical Presentation/ B.M. Kroncke, A.M.

- Glazer, D.K. Smith [et al.] // *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. -2018. – Vol. 11(5). – P. e002095.
121. Kuzmenkin, A. Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: voltage-dependent charge movement and gating currents / A. Kuzmenkin, F. Bezanilla, A.M. Correa // *J Gen Physiol*. -2004. – Vol. 124(4). – P. 349-356.
122. Kyle, J.W. Diseases caused by mutations in Na(v)1.5 interacting proteins / J.W. Kyle, J.C. Makielski // *Card Electrophysiol Clin*. -2014. – Vol. 6(4). – P. 797-809.
123. Kyndt, F. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family / F. Kyndt, V. Probst, F. Potet [et al.] // *Circulation*. -2001. – Vol. 104(25). – P. 3081-3086.
124. Landrum, M.J. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants / M.J. Landrum, J.M. Lee, M. Benson [et al.] // *Nucleic Acids Res*. -2016. – Vol. 44(D1). – P. D862-868.
125. Lenaeus, M.J. Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel / MJ Lenaeus, TM Gamal El-Din, C Ing [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2017. – Vol. 114(15). – P. E3051-e3060.
126. Leo-Macias, A. Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc / A. Leo-Macias, E. Agullo-Pascual, J.L. Sanchez-Alonso[et al.] // *Nat Commun*. -2016. – Vol. 7. – P. 10342.
127. Li, Q. Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing / Q. Li, H. Huang, G. Liu [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. -2009. – Vol. 380(1). – P. 132-137.
128. Li, Z. Structural Basis for Pore Blockade of the Human Cardiac Sodium Channel Na(v) 1.5 by the Antiarrhythmic Drug Quinidine* / Z. Li, X. Jin, T. Wu [et al.] // *Angew Chem Int Ed Engl*. -2021a. – Vol. 60(20). – P. 11474-11480.

129. Li, Z. Structure of human Na(v)1.5 reveals the fast inactivation-related segments as a mutational hotspot for the long QT syndrome / Z. Li, X. Jin, T. Wu [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. -2021b. – Vol. 118(11). – P.
130. Li, Z. Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding / Z. Li, H.A. Scheraga // Proc Natl Acad Sci U S A. -1987. – Vol. 84(19). – P. 6611-6615.
131. Lin, X. Subcellular heterogeneity of sodium current properties in adult cardiac ventricular myocytes / X. Lin, N. Liu, J. Lu [et al.] // Heart Rhythm. - 2011. – Vol. 8(12). – P. 1923-1930.
132. Lipkind, G.M. KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore / G.M. Lipkind, H.A. Fozzard // Biochemistry. -2000. – Vol. 39(28). – P. 8161-8170
133. Long, S.B. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment / S.B. Long, X. Tao, E.B. Campbell [et al.] // Nature. -2007. – Vol. 450(7168). – P. 376-382.
134. Loussouarn, G. Physiological and Pathophysiological Insights of Nav1.4 and Nav1.5 Comparison / G. Loussouarn, D. Sternberg, S. Nicole [et al.] // Front Pharmacol. -2015. – Vol. 6. – P. 314.
135. Lu, Z. Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels / Z. Lu, A.M. Klem, Y. Ramu // J Gen Physiol. -2002. – Vol. 120(5). – P. 663-676.
136. Lupoglazoff, J.M. Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block / J.M. Lupoglazoff, T. Cheav, G. Baroudi [et al.] // Circ Res. -2001. – Vol. 89(2). – P. E16-21.
137. Makita, N. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome / N. Makita, E. Behr, W. Shimizu [et al.] // J Clin Invest. -2008. – Vol. 118(6). – P. 2219-2229.

138. Makita, N. A de novo missense mutation of human cardiac Na⁺ channel exhibiting novel molecular mechanisms of long QT syndrome / N. Makita, N. Shirai, M. Nagashima [et al.] // FEBS Lett. -1998. – Vol. 423(1). – P. 5-9.
139. Malan, D. Human iPS cell model of type 3 long QT syndrome recapitulates drug-based phenotype correction / Malan D, Zhang M, Stallmeyer B, Müller J, Fleischmann BK, Schulze-Bahr E, Sasse P and Greber B. // Basic Res Cardiol. -2016. – Vol. 111(2). – P. 14.
140. Maltsev, V.A. Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences / V.A. Maltsev, V. Reznikov, N.A. Undrovinas [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. -2008. – Vol. 294(4). – P. H1597-1608.
141. Maltsev, V.A. Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes / V.A. Maltsev, H.N. Sabbah, R.S. Higgins [et al.] // Circulation. -1998. – Vol. 98(23). – P. 2545-2552.
142. Maltsev, V.A. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability / V.A. Maltsev, N. Silverman, H.N. Sabbah [et al.] // Eur J Heart Fail. -2007. – Vol. 9(3). – P. 219-227.
143. Marangoni, S. A Brugada syndrome mutation (p.S216L) and its modulation by p.H558R polymorphism: standard and dynamic characterization / S. Marangoni, C. Di Resta, M. Rocchetti [et al.] // Cardiovasc Res. -2011. – Vol. 91(4). – P. 606-616.
144. Marionneau, C. Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications / C. Marionneau, H. Abriel // J Mol Cell Cardiol. -2015. – Vol. 82. – P. 36-47.
145. Martinac, B. Ion channels in microbes / B. Martinac, Y. Saimi, C. Kung // Physiol Rev. -2008. – Vol. 88(4). – P. 1449-1490.
146. Marzian, S. Side pockets provide the basis for a new mechanism of Kv channel-specific inhibition / S. Marzian, P.J. Stansfeld, M. Rapedius [et al.] // Nat Chem Biol. -2013. – Vol. 9(8). – P. 507-513.

147. McCusker, E.C. Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing / E.C. McCusker, C.Bagn ris, C.E.Naylor [et al.] // Nat Commun. -2012. – Vol. 3. – P. 1102.
148. McNair, W.P. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia / W.P. McNair, L. Ku, M.R. Taylor [et al.] // Circulation. -2004. – Vol. 110(15). – P. 2163-2167.
149. McPhee, J.C. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation / J.C. McPhee, D.S. Ragsdale, T. Scheuer [et al.] // J Biol Chem. -1998. – Vol. 273(2). – P. 1121-1129.
150. Medeiros-Domingo, A. Unique mixed phenotype and unexpected functional effect revealed by novel compound heterozygosity mutations involving SCN5A / A. Medeiros-Domingo, B.H. Tan, P. Iturralde-Torres [et al.] // Heart Rhythm. -2009. – Vol. 6(8). – P. 1170-1175.
151. Mohler, P.J. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes / P.J. Mohler, I. Rivolta, C. Napolitano [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. -2004. – Vol. 101(50). – P. 17533-17538.
152. Moreau, A. A leaky voltage sensor domain of cardiac sodium channels causes arrhythmias associated with dilated cardiomyopathy / A. Moreau, P. Gosselin-Badaroudine, A. Mercier [et al.] // Sci Rep. -2018. – Vol. 8(1). – P. 13804.
153. Muroi, Y. Molecular determinants of coupling between the domain III voltage sensor and pore of a sodium channel / Y. Muroi, M. Arcisio-Miranda, S. Chowdhury [et al.]. // Nat Struct Mol Biol. -2010. – Vol. 17(2). – P. 230-237.
154. Nagatomo, T. Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ Na⁺ channels / T. Nagatomo, Z. Fan, B. Ye [et al.] // Am J Physiol. -1998. – Vol. 275(6). – P. H2016-2024.

155. Noda, M. Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain / M. Noda, T. Ikeda, T. Kayano [et al.] // *Nature*. -1986. – Vol. 320(6058). – P. 188-192.
156. Noda, M. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence / M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe [et al.] // *Nature*. -1984. – Vol. 312(5990). – P. 121-127.
157. Noda, M. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II / M. Noda, H. Suzuki, S. Numa [et al.] // *FEBS Lett*. -1989. – Vol. 259(1). – P. 213-216.
158. Noreng, S. Structural Pharmacology of Voltage-Gated Sodium Channels / S. Noreng, T. Li, J. Payandeh // *J Mol Biol*. -2021. – Vol. 433(17). – P. 166967.
159. O'Malley, H.A. Sodium channel β subunits: emerging targets in channelopathies / H.A. O'Malley, L.L. Isom // *Annu Rev Physiol*. -2015. – Vol. 77. – P. 481-504.
160. Olesen, M.S. High prevalence of long QT syndrome-associated SCN5A variants in patients with early-onset lone atrial fibrillation / Olesen MS, Yuan L, Liang B [et al.]. // *Circ Cardiovasc Genet*. -2012. – Vol. 5(4). – P. 450-459.
161. Olson, T.M. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation / T.M. Olson, V.V. Michels, J.D. Ballew [et al.] // *Jama*. -2005. – Vol. 293(4). – P. 447-454.
162. Ortiz-Bonnin, B. Electrophysiological characterization of a large set of novel variants in the SCN5A-gene: identification of novel LQTS3 and BrS mutations / B. Ortiz-Bonnin, S. Rinné, R. Moss [et al.] // *Pflugers Arch*. -2016. – Vol. 468(8). – P. 1375-1387.
163. Pan, X. Molecular basis for pore blockade of human Na(+) channel Na(v)1.2 by the μ -conotoxin KIIIA / X. Pan, Z. Li, X. Huang [et al.] // *Science*. -2019. – Vol. 363(6433). – P. 1309-1313.
164. Pan, X. Comparative structural analysis of human Na(v)1.1 and Na(v)1.5 reveals mutational hotspots for sodium channelopathies / X. Pan, Z.

- Li, X. Jin [et al.]. // Proc Natl Acad Sci U S A. -2021. – Vol. 118(11). – P. e2100066118.
165. Pan, X. Structure of the human voltage-gated sodium channel Na(v)1.4 in complex with $\beta 1$ / X. Pan, Z. Li, Q. Zhou [et al.] // Science. -2018. – Vol. 362(6412). – P. eaau2486.
166. Papazian, D.M. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence / D.M. Papazian, L.C. Timpe, Y.N. Jan [et al.] // Nature. -1991. – Vol. 349(6307). – P. 305-310.
167. Payandeh, J. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states / J. Payandeh, T.M. Gamal El-Din, T. Scheuer[et al.] // Nature. -2012. – Vol. 486(7401). – P. 135-139.
168. Payandeh, J. Bacterial voltage-gated sodium channels (BacNa(V)s) from the soil, sea, and salt lakes enlighten molecular mechanisms of electrical signaling and pharmacology in the brain and heart / J. Payandeh, D.L.Jr. Minor // J Mol Biol. -2015. – Vol. 427(1). – P. 3-30.
169. Payandeh, J. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel / J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng [et al.] // Nature. -2011. – Vol. 475(7356). – P. 353-358.
170. Pérez-Hernández, M. Brugada syndrome trafficking-defective Nav1.5 channels can trap cardiac Kir2.1/2.2 channels / M. Pérez-Hernández, M. Matamoros, S. Alfayate [et al.] // JCI Insight. -2018. – Vol. 3(18). – P.
171. Peters, C.H. E1784K, the most common Brugada syndrome and long-QT syndrome type 3 mutant, disrupts sodium channel inactivation through two separate mechanisms / C.H. Peters, A.R. Watkins, O.L. Poirier [et al.] // J Gen Physiol. -2020. – Vol. 152(9). – P. e96291.
172. Pfahnl, A.E. A sodium channel pore mutation causing Brugada syndrome / A.E. Pfahnl, P.C. Viswanathan, R. Weiss [et al.] // Heart Rhythm. -2007. – Vol. 4(1). – P. 46-53.
173. Plumereau, Q. Novel G1481V and Q1491H SCN5A Mutations Linked to Long QT Syndrome Destabilize the Nav1.5 Inactivation State / Q.

- Plumereau, O. Theriault, V. Pouliot [et al.] // *CJC Open*. -2021. – Vol. 3(3). – P. 256-266.
174. Portero, V. K(V)4.3 Expression Modulates Na(V)1.5 Sodium Current / V. Portero, R. Wilders, S. Casini [et al.] // *Front Physiol*. -2018. – Vol. 9. – P. 178.
175. Potet, F. Functional Interactions between Distinct Sodium Channel Cytoplasmic Domains through the Action of Calmodulin / F. Potet, B. Chagot, M. Anghelescu [et al.] // *J Biol Chem*. -2009. – Vol. 284(13). – P. 8846-8854.
176. Remme, C.A. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects / C.A. Remme // *J Physiol*. -2013. – Vol. 591(17). – P. 4099-4116.
177. Remme, C.A. Sodium channel (dys)function and cardiac arrhythmias / C.A. Remme, C.R. Bezzina // *Cardiovasc Ther*. -2010. – Vol. 28(5). – P. 287-294.
178. Remme, C.A. The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium / C.A. Remme, A.O. Verkerk, W.M. Hoogaars, [et al.] // *Basic Res Cardiol*. -2009. – Vol. 104(5). – P. 511-522.
179. Remme, C.A. Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD / C.A. Remme, A.O. Verkerk, D. Nuyens [et al.] // *Circulation*. -2006. – Vol. 114(24). – P. 2584-2594.
180. Remme, C.A. SCN5A overlap syndromes: no end to disease complexity? / C.A. Remme, A.A. Wilde // *Europace*. -2008. – Vol. 10(11). – P. 1253-1255.
181. Ren, D. A prokaryotic voltage-gated sodium channel / D. Ren, B. Navarro, H. Xu [et al.] // *Science*. -2001. – Vol. 294(5550). – P. 2372-2375.
182. Richards, S. 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

- / S. Richards, N. Aziz, S. Bale [et al.]. // *Genet Med.* -2015. – Vol. 17(5). – P. 405-424.
183. Rivaud, M.R. Sodium Channel Remodeling in Subcellular Microdomains of Murine Failing Cardiomyocytes / Rivaud MR, Agullo-Pascual E, Lin X [et al.] *J Am Heart Assoc.* -2017. – Vol. 6(12). – P. e007622
184. Rivaud, M.R. Enhanced late sodium current underlies pro-arrhythmic intracellular sodium and calcium dysregulation in murine sodium channelopathy / M.R. Rivaud, A. Baartscheer, A.O. Verkerk [et al.] // *Int J Cardiol.* -2018. – Vol. 263. – P. 54-62.
185. Rivaud, M.R. Heritable arrhythmia syndromes associated with abnormal cardiac sodium channel function: ionic and non-ionic mechanisms / M.R. Rivaud, M. Delmar, C.A. Remme // *Cardiovasc Res.* -2020. – Vol. 116(9). – P. 1557-1570.
186. Rivolta, I. Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes / I. Rivolta, H. Abriel, M. Tateyama [et al.] // *J Biol Chem.* -2001. – Vol. 276(33). – P. 30623-30630.
187. Rivolta, I. A novel SCN5A mutation associated with long QT-3: altered inactivation kinetics and channel dysfunction / I. Rivolta, C.E. Clancy, M. Tateyama [et al.] // *Physiol Genomics.* -2002. – Vol. 10(3). – P. 191-197.
188. Rohl CA. Solution structure of the sodium channel inactivation gate / C.A. Rohl, F.A. Boeckman, C. Baker [et al.] // *Biochemistry.* -1999. – Vol. 38(3). – P. 855-861.
189. Rossenbacker, T. Novel pore mutation in SCN5A manifests as a spectrum of phenotypes ranging from atrial flutter, conduction disease, and Brugada syndrome to sudden cardiac death/ T. Rossenbacker, S.J. Carroll, H. Liu, [et al.] // *Heart Rhythm.* -2004. – Vol. 1(5). – P. 610-615.
190. Rougier, JS. A Distinct Pool of Na(v)1.5 Channels at the Lateral Membrane of Murine Ventricular Cardiomyocytes / J.S. Rougier, M.C. Essers, L. Gillet [et al.] // *Front Physiol.* -2019. – Vol. 10. – P. 834.

191. Ruan, Y. Trafficking defects and gating abnormalities of a novel SCN5A mutation question gene-specific therapy in long QT syndrome type 3 / Y. Ruan, M. Denegri, N. Liu [et al.] // *Circ Res.* -2010. – Vol. 106(8). – P. 1374-1383.
192. Ruan, Y. Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients / Y. Ruan, N. Liu, R. Bloise [et al.] // *Circulation.* -2007. – Vol. 116(10). – P. 1137-1144.
193. Rudy, B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance / Rudy B. // *J Physiol.* -1978. – Vol. 283. – P. 1-21.
194. Saint, D.A. The role of the persistent Na(+) current during cardiac ischemia and hypoxia / D.A. Saint // *J Cardiovasc Electrophysiol.* -2006. – Vol. 17 Suppl 1. – P. S96-S103.
195. Sakmann, B. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes / B. Sakmann, E. Neher // *Annu Rev Physiol.* -1984. – Vol. 46. – P. 455-472.
196. Sato, P.Y. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc / P.Y. Sato, W. Coombs, X. Lin [et al.] // *Circ Res.* -2011. – Vol. 109(2). – P. 193-201.
197. Savio-Galimberti, E. Cardiac Arrhythmias Related to Sodium Channel Dysfunction / E. Savio-Galimberti, M. Argenziano, C. Antzelevitch // *Handb Exp Pharmacol.* -2018. – Vol. 246. – P. 331-354.
198. Schlieff, T. Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain / T. Schlieff, R. Schönherr, K. Imoto [et al.] // *Eur Biophys J.* -1996. – Vol. 25(2). – P. 75-91.
199. Schott, J.J. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A / J.J. Schott, C. Alshinawi, F. Kyndt [et al.] *Nat Genet.* -1999. – Vol. 23(1). – P. 20-21.
200. Schwartz, P.J. Long-QT syndrome: from genetics to management / P.J. Schwartz, L. Crotti, R. Insolia // *Circ Arrhythm Electrophysiol.* -2012. – Vol. 5(4). – P. 868-877.

201. Schwartz, P.J. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias / P.J. Schwartz, S.G. Priori, C. Spazzolini [et al.] // *Circulation*. -2001. – Vol. 103(1). – P. 89-95.
202. Sendfeld, F. Experimental Models of Brugada syndrome / F. Sendfeld, E. Selga, F.S. Scornik [et al.] // *Int J Mol Sci*. -2019. – Vol. 20(9). – P. 2123
203. Shang, L.L. Human heart failure is associated with abnormal C-terminal splicing variants in the cardiac sodium channel / LL Shang, AE Pfahnl, S Sanyal [et al.] // *Circ Res*. -2007. – Vol. 101(11). – P. 1146-1154.
204. Shaw, R.M. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions / R.M. Shaw, A.J. Fay, M.A. Puthenveedu [et al.] // *Cell*. -2007. – Vol. 128(3). – P. 547-560.
205. Shaya, D. Structure of a prokaryotic sodium channel pore reveals essential gating elements and an outer ion binding site common to eukaryotic channels / D. Shaya, F. Findeisen, F. Abderemane-Ali [et al.] // *J Mol Biol*. -2014. – Vol. 426(2). – P. 467-483.
206. Shen, H. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins / H. Shen, Z. Li, Y. Jiang [et al.] // *Science*. -2018. – Vol. 362(6412). – P. eaau2596.
207. Shen, H. Structures of human Na(v)1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins / H. Shen, D. Liu, K. Wu [et al.] // *Science*. -2019. – Vol. 363(6433). – P. 1303-1308.
208. Shen, H. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution / H. Shen, Q. Zhou, X. Pan [et al.] // *Science*. -2017. – Vol. 355(6328). – P. eaal4326.
209. Shirai, N. A mutant cardiac sodium channel with multiple biophysical defects associated with overlapping clinical features of Brugada syndrome and cardiac conduction disease / N. Shirai, N. Makita, K. Sasaki [et al.] // *Cardiovasc Res*. -2002. – Vol. 53(2). – P. 348-354.

210. Shy, D. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model / D. Shy, L. Gillet, H. Abriel // *Biochim Biophys Acta*. -2013. – Vol. 1833(4). – P. 886-894.
211. Sieira, J. The definition of the Brugada syndrome / J. Sieira, P. Brugada // *Eur Heart J*. -2017. – Vol. 38(40). – P. 3029-3034.
212. Six, I. The occurrence of Brugada syndrome and isolated cardiac conductive disease in the same family could be due to a single SCN5A mutation or to the accidental association of both diseases / I. Six, J.S. Hermida, H. Huang [et al.] // *Europace*. -2008. – Vol. 10(1). – P. 79-85.
213. Smits, J.P. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families/ J.P. Smits, T.T. Koopmann, R. Wilders [et al.] // *J Mol Cell Cardiol*. -2005a. – Vol. 38(6). – P. 969-981.
214. Smits, J.P.P. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families / J.P.P. Smits, T.T. Koopmann, R. Wilders [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. -2005b. – Vol. 38(6). – P. 969-981.
215. Song, Y. Basal late sodium current is a significant contributor to the duration of action potential of guinea pig ventricular myocytes / Y. Song, L. Belardinelli // *Physiol Rep*. -2017. – Vol. 5(10). – P. e13295.
216. Sottas, V. Characterization of 2 genetic variants of Na(v) 1.5-arginine 689 found in patients with cardiac arrhythmias / V. Sottas, J.S. Rougier, F. Jousset [et al.]. // *J Cardiovasc Electrophysiol*. -2013. – Vol. 24(9). – P. 1037-1046.
217. Stühmer, W. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel / W. Stühmer, F. Conti, H. Suzuki [et al.] // *Nature*. -1989. – Vol. 339(6226). – P. 597-603.

218. Sula, A. The complete structure of an activated open sodium channel / A. Sula, J. Booker, L.C. Ng [et al.] // *Nat Commun.* -2017. – Vol. 8. – P. 14205.
219. Surber, R. Combination of cardiac conduction disease and long QT syndrome caused by mutation T1620K in the cardiac sodium channel / R. Surber, S. Hensellek, D. Prochnau [et al.] // *Cardiovasc Res.* -2008. – Vol. 77(4). – P. 740-748.
220. Takehara, N. A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill / N. Takehara, N. Makita, J. Kawabe, [et al.] // *J Intern Med.* -2004. – Vol. 255(1). – P. 137-142.
221. Tamkun, M.M. Reconstitution of the voltage-sensitive sodium channel of rat brain from solubilized components / M.M. Tamkun, W.A. Catterall// *J Biol Chem.* -1981. – Vol. 256(22). – P. 11457-11463.
222. Tan, B.H. Partial expression defect for the SCN5A missense mutation G1406R depends on splice variant background Q1077 and rescue by mexiletine / B.H. Tan, C.R. Valdivia, C. Song [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* -2006. – Vol. 291(4). – P. H1822-1828.
223. Tan, B.Y. A Brugada syndrome proband with compound heterozygote SCN5A mutations identified from a Chinese family in Singapore / B.Y. Tan, R.Y. Yong, H. Barajas-Martinez [et al.]// *Europace.* -2016. – Vol. 18(6). – P. 897-904.
224. Tan H.L. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease / H.L. Tan, M.T. Bink-Boelkens, C.R. Bezzina [et al.] // *Nature.* -2001. – Vol. 409(6823). – P. 1043-1047.
225. Tarnovskaya, S.I. Predicting novel disease mutations in the cardiac sodium channel / S.I. Tarnovskaya, V.S. Korkosh, B.S. Zhorov [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* -2020. – Vol. 521(3). – P. 603-611.
226. Tateyama, M. Stimulation of protein kinase C inhibits bursting in disease-linked mutant human cardiac sodium channels / M. Tateyama, J.

- Kurokawa, C. Terrenoire [et al.] // *Circulation*. -2003a. – Vol. 107(25). – P. 3216-3222.
227. Tateyama, M. Modulation of cardiac sodium channel gating by protein kinase A can be altered by disease-linked mutation / M. Tateyama, I. Rivolta, C.E. Clancy [et al.]. // *J Biol Chem*. -2003b. – Vol. 278(47). – P. 46718-46726.
228. Te Riele, A.S. Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis / A.S. Te Riele, E. Agullo-Pascual, C.A. James [et al.] // *Cardiovasc Res*. -2017. – Vol. 113(1). – P. 102-111.
229. Ter Bekke, R.M.A. Heritability in a SCN5A-mutation founder population with increased female susceptibility to non-nocturnal ventricular tachyarrhythmia and sudden cardiac death / R.M.A. Ter Bekke, A. Isaacs, A. Barysenka [et al.] // *Heart Rhythm*. -2017. – Vol. 14(12). – P. 1873-1881.
230. Tester, D.J. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing / D.J. Tester, M.L. Will, C.M. Haglund [et al.] // *Heart Rhythm*. -2005. – Vol. 2(5). – P. 507-517.
231. Tikhonov, D.B. Sodium channels: ionic model of slow inactivation and state-dependent drug binding / D.B Tikhonov, B.S. Zhorov // *Biophys J*. -2007. – Vol. 93(5). – P. 1557-1570.
232. Tikhonov, D.B. Architecture and pore block of eukaryotic voltage-gated sodium channels in view of NavAb bacterial sodium channel structure / D.B Tikhonov, B.S. Zhorov // *Mol Pharmacol*. -2012. – Vol. 82(1). – P. 97-104.
233. Tikhonov, D.B. Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants / D.B Tikhonov, B.S. Zhorov // *J Gen Physiol*. -2017. – Vol. 149(4). – P. 465-481
234. Toischer, K. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease / K. Toischer,

- N. Hartmann, S. Wagner [et al.]. // *J Mol Cell Cardiol.* -2013. – Vol. 61. – P. 111-122.
235. Tsushima, R.G. Altered ionic selectivity of the sodium channel revealed by cysteine mutations within the pore / R.G. Tsushima, R.A. Li, P.H. Backx. // *J Gen Physiol.* -1997a. – Vol. 109(4). – P. 463-475.
236. Tsushima, R.G. P-loop flexibility in Na⁺ channel pores revealed by single- and double-cysteine replacements / R.G. Tsushima, R.A. Li, P.H. Backx. // *J Gen Physiol.* -1997b. – Vol. 110(1). – P. 59-72.
237. Valdivia, C.R. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs / C.R. Valdivia, D.J. Tester, B.A. Rok [et al.] . // *Cardiovasc Res.* -2004. – Vol. 62(1). – P. 53-62.
238. van den Berg, MP. Possible bradycardic mode of death and successful pacemaker treatment in a large family with features of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome / M.P. van den Berg, A.A. Wilde, T.J.W. Viersma [et al.] // *J Cardiovasc Electrophysiol.* -2001. – Vol. 12(6). – P. 630-636.
239. van den Boogaard, M. Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer / M. van den Boogaard, L.Y. Wong, F. Tessadori [et al.] // *J Clin Invest.* -2012. – Vol. 122(7). – P. 2519-2530.
240. Vassilev, P. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody / P. Vassilev, T. Scheuer, W.A. Catterall // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -1989. – Vol. 86(20). – P. 8147-8151.
241. Vatta, M. Novel mutations in domain I of SCN5A cause Brugada syndrome / M. Vatta, R. Dumaine, C. Antzelevitch [et al.] // *Mol Genet Metab.* -2002. – Vol. 75(4). – P. 317-324.
242. Veldkamp, M.W. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel / M.W. Veldkamp, P.C. Viswanathan, C. Bezzina [et al.] *Circ Res.* -2000. – Vol. 86(9). – P. E91-97.

243. Vetter, I. Na(V)1.7 as a pain target - From gene to pharmacology / I. Vetter, J.R. Deuis, A. Mueller [et al.] // *Pharmacol Ther.* -2017. – Vol. 172. – P. 73-100.
244. Vilin, Y.Y. Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies / Y.Y. Vilin, P.C. Ruben // *Cell Biochem Biophys.* -2001. – Vol. 35(2). – P. 171-190.
245. Wang, D.W. Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome/ D.W. Wang, R.R. Desai, L. Crotti [et al.] // *Circulation.* - 2007. – Vol. 115(3). – P. 368-376.
246. Wang, D.W. Enhanced Na(+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome / D.W. Wang, N. Makita, A. Kitabatake [et al.] // *Circ Res.* -2000. – Vol. 87(8). – P. E37-43.
247. Wang, D.W. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block / D.W. Wang, P.C. Viswanathan, J.R. Balsler [et al.] // *Circulation.* -2002. – Vol. 105(3). – P. 341-346.
248. Wang, L. De Novo Mutation in the SCN5A Gene Associated with Brugada Syndrome / L. Wang, X. Meng, Z. Yuchi [et al.] // *Cell Physiol Biochem.* -2015. – Vol. 36(6). – P. 2250-2262.
249. Wang, Q. The common SCN5A mutation R1193Q causes LQTS-type electrophysiological alterations of the cardiac sodium channel / Q. Wang, S. Chen, Q. Chen [et al.] // *J Med Genet.* -2004. – Vol. 41(5). – P. e66.
250. Wedekind, H. De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death / H. Wedekind, J.P. Smits, E. Schulze-Bahr [et al.] // *Circulation.* -2001. – Vol. 104(10). – P. 1158-1164.
251. Wehrens, X.H. A novel mutation L619F in the cardiac Na⁺ channel SCN5A associated with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating / X.H. Wehrens, T. Rossenbacker, R.J. Jongbloed [et al.] // *Hum Mutat.* -2003. – Vol. 21(5). – P. 552.

252. Weigele, J.B. Functional reconstitution of the purified sodium channel protein from rat sarcolemma / J.B. Weigele, R.L. Barchi // Proc Natl Acad Sci U S A. -1982. – Vol. 79(11). – P. 3651-3655.
253. Weiner, S.J. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids / S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen [et al.] // J Comput Chem. -1986. – Vol. 7(2). – P. 230-252.
254. West, J.W. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation / J.W. West, D.E. Patton, T. Scheuer [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. -1992. – Vol. 89(22). – P. 10910-10914.
255. Whalley, D.W. Voltage-independent effects of extracellular K⁺ on the Na⁺ current and phase 0 of the action potential in isolated cardiac myocytes / D.W. Whalley, D.J. Wendt, C.F. Starmer [et al.] // Circ Res. -1994. – Vol. 75(3). – P. 491-502.
256. Wilde, A.A.M. Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy / A.A.M. Wilde, A.S.Amin // JACC Clin Electrophysiol. -2018. – Vol. 4(5). – P. 569-579. doi: 10.1016/j.jacep.2018.03.006
257. Wisedchaisri, G. Structural Basis for High-Affinity Trapping of the Na(V)1.7 Channel in Its Resting State by Tarantula Toxin / G. Wisedchaisri, L. Tonggu, T.M. Gamal El-Din [et al.] // Mol Cell. -2021. – Vol. 81(1). – P. 38-48.e34.
258. Wisedchaisri, G. Resting-State Structure and Gating Mechanism of a Voltage-Gated Sodium Channel / G. Wisedchaisri, L. Tonggu, E. McCord [et al.] Cell. -2019. – Vol. 178(4). – P. 993-1003.e1012.
259. Wu, L. Induction of high STAT1 expression in transgenic mice with LQTS and heart failure / L. Wu, S.R. Archacki, T. Zhang [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. -2007. – Vol. 358(2). – P. 449-454.
260. Xiong, Q. A rare loss-of-function SCN5A variant is associated with lidocaine-induced ventricular fibrillation / Q. Xiong, L. Cao, J. Hu [et al.] // Pharmacogenomics J. -2014. – Vol. 14(4). – P. 372-375.

261. Xiong, W. A conserved ring of charge in mammalian Na⁺ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation / W. Xiong, Y.Z. Farukhi, Y. Tian [et al.] // *J Physiol.* -2006. – Vol. 576(Pt 3). – P. 739-754.
262. Xu, H. Structural Basis of Nav1.7 Inhibition by a Gating-Modifier Spider Toxin / H. Xu, T. Li, A. Rohou [et al.] // *Cell.* -2019. – Vol. 176(4). – P. 702-715.e714.
263. Yan, G.X. Phase 2 early afterdepolarization as a trigger of polymorphic ventricular tachycardia in acquired long-QT syndrome : direct evidence from intracellular recordings in the intact left ventricular wall / G.X. Yan, Y. Wu, T. Liu [et al.] // *Circulation.* -2001. – Vol. 103(23). – P. 2851-2856.
264. Yan, Z. Structure of the Na(v)1.4-β1 Complex from Electric Eel / Z. Yan, Q. Zhou, L. Wang [et al.] *Cell.* -2017. – Vol. 170(3). – P. 470-482.e411.
265. Yang, N. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels / N. Yang, A.L. Jr. George, R. Horn // *Neuron.* -1996. – Vol. 16(1). – P. 113-122.
266. Yang, Y. Molecular architecture of a sodium channel S6 helix: radial tuning of the voltage-gated sodium channel 1.7 activation gate / Y. Yang, M. Estacion, S.D. Dib-Hajj [et al.]// *J Biol Chem.* -2013. – Vol. 288(19). – P. 13741-13747.
267. Ye, B. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation / B. Ye, C.R. Valdivia, M.J. Ackerman [et al.] // *Physiol Genomics.* -2003. – Vol. 12(3). – P. 187-193.
268. Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels / G. Yellen // *Q Rev Biophys.* -1998. – Vol. 31(3). – P. 239-295.
269. Yokoi, H. Double SCN5A mutation underlying asymptomatic Brugada syndrome / H. Yokoi, N. Makita, K. Sasaki [et al.] // *Heart Rhythm.* -2005. – Vol. 2(3). – P. 285-292.
270. Yong, S.L. Characterization of the cardiac sodium channel SCN5A mutation, N1325S, in single murine ventricular myocytes / S.L. Yong, Y. Ni,

- T. Zhang [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* -2007. – Vol. 352(2). – P. 378-383.
271. Yu, F.H. Overview of the voltage-gated sodium channel family / F.H. Yu, W.A. Catterall. // *Genome Biol.* -2003. – Vol. 4(3). – P. 207.
272. Zaytseva, A.K. Possible Interactions of Extracellular Loop IVP2-S6 With Voltage-Sensing Domain III in Cardiac Sodium Channel / A.K. Zaytseva, A.S. Boitsov, A.A. Kostareva [et al.]. // *Front Pharmacol.* -2021. – Vol. 12. – P. 742508.
273. Zaytseva, A.K. Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype / Zaytseva AK, Karpushev AV, Kiselev AM [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* -2019. – Vol. 516(3). – P. 777-783.
274. Zaytseva, A.K. Characterization of the novel heterozygous SCN5A genetic variant Y739D associated with Brugada syndrome / Zaytseva AK, Kiselev AM, Boitsov AS [et al.] // *Biochem Biophys Rep.* -2022. – Vol. 30. – P. 101249.
275. Zaytseva, A.K. Biophysical mechanisms of myocardium sodium channelopathies / A.K. Zaytseva, O.E. Kulichik, A.A. Kostareva [et al.] \ // *Pflugers Arch.* -2024. – Vol. – P. Online ahead of print.
276. Zeng, Z. p.D1690N sodium voltage-gated channel α subunit 5 mutation reduced sodium current density and is associated with Brugada syndrome / Z. Zeng, Q. Xie, Y. Huang [et al.] // *Mol Med Rep.* -2016. – Vol. 13(6). – P. 5216-5222.
277. Zeng, Z. Electrophysiological characteristics of a SCN5A voltage sensors mutation R1629Q associated with Brugada syndrome / Z. Zeng, J. Zhou, Y. Hou [et al.] // *PLoS One.* -2013. – Vol. 8(10). – P. e78382.
278. Zhang, A.H. A complicated complex: Ion channels, voltage sensing, cell membranes and peptide inhibitors / A.H. Zhang, G. Sharma, E.A.B. Undheim [et al.] // *Neurosci Lett.* -2018. – Vol. 679. – P. 35-47.

279. Zhang, JZ. Mapping the interaction site for a β -scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na(+) channels / J.Z. Zhang, V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer [et al.] // *J Biol Chem.* -2012a. – Vol. 287(36). – P. 30719-30728.
280. Zhang, X. Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel / X. Zhang, W. Ren, P. DeCaen [et al.] // *Nature.* - 2012b. – Vol. 486(7401). – P. 130-134.
281. Zhang, Y. Correlations between clinical and physiological consequences of the novel mutation R878C in a highly conserved pore residue in the cardiac Na⁺ channel / Y. Zhang, T. Wang, A. Ma [et al.] // *Acta Physiol (Oxf).* -2008. – Vol. 194(4). – P. 311-323.
282. Zhang, ZS. Sodium channel kinetic changes that produce Brugada syndrome or progressive cardiac conduction system disease / Z.S. Zhang, J. Tranquillo, V. Neplioueva [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* -2007. – Vol. 292(1). – P. H399-407.
283. Zhao, Y. Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment / Y. Zhao, T. Scheuer, W.A. Catterall // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2004. – Vol. 101(51). – P. 17873-17878.
284. Zheng, J. The biophysical characterization of the first SCN5A mutation R1512W identified in Chinese sudden unexplained nocturnal death syndrome / J. Zheng, F. Zhou, T. Su [et al.] // *Medicine (Baltimore).* -2016. – Vol. 95(23). – P. e3836.
285. Zhorov, B.S. A vector method for calculating the derivatives of the energy of the atom-atom interactions of complex molecules with respect to generalized coordinates / B.S.Zhorov // *Journal of Structural Chemistry.* - 1981. – Vol. 22(1). – P. 4-8.
286. Zhorov, B.S. Structural Models of Ligand-Bound Sodium Channels / B.S. Zhorov // *Handb Exp Pharmacol.* -2018. – Vol. 246. – P. 251-269.

287. Zhorov, B.S. Possible Mechanism of Ion Selectivity in Eukaryotic Voltage-Gated Sodium Channels / B.S. Zhorov // *J Phys Chem B*. -2021. – Vol. 125(8). – P. 2074-2088.
288. Zhorov, B.S. Mapping the interaction surface of scorpion β -toxins with an insect sodium channel / B.S. Zhorov, Y. Du, W. Song [et al.] // *Biochem J*. -2021. – Vol. 478(14). – P. 2843-2869.
289. Zhorov, B.S. Computational Structural Pharmacology and Toxicology of Voltage-Gated Sodium Channels / B.S. Zhorov, D.B. Tikhonov // *Curr Top Membr*. -2016. – Vol. 78. – P. 117-144.
290. Zhou, X. Electrophysiological and Pharmacological Analyses of Na(v)1.9 Voltage-Gated Sodium Channel by Establishing a Heterologous Expression System / X. Zhou, Z. Xiao, Y. Xu [et al.] // *Front Pharmacol*. -2017. – Vol. 8. – P. 852.
291. Zhu, J.F. Novel heterozygous mutation c.4282G>T in the SCN5A gene in a family with Brugada syndrome / J.F. Zhu, L.L. Du, Y. Tian [et al.] // *Exp Ther Med*. -2015. – Vol. 9(5). – P. 1639-1645.
292. Zimmer, T. SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms / T. Zimmer, R. Surber // *Prog Biophys Mol Biol*. -2008. – Vol. 98(2-3). – P. 120-136.