

На правах рукописи

ЗАЙЦЕВА АНАСТАСИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ
КАНАЛОПАТИЯХ**

1.5.5. - Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ- 2024

Работа выполнена в Лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук».

Научный руководитель: Жоров Борис Соломонович,

доктор биологических наук, профессор

ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии

им. И.М. Сеченова РАН»

Официальные оппоненты: Кривой Игорь Ильич,

доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры

общей физиологии Биологического факультета

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный

Университет»

Чубинский-Надеждин Владислав Игоревич,

кандидат биологических наук, руководитель группы ионных

механизмов клеточной сигнализации

ФГБУН «Институт Цитологии РАН»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научный центр неврологии», Москва

Защита состоится « » _____ 2024 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.137.01 при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, тел. (812)328-07-01, электронная почта pavlov.institute@infran.ru, сайт <http://infran.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте Института <http://infran.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Ионные каналы играют ключевую роль в нормальной физиологии и патологии сердца. В миокарде ионные каналы контролируют процессы деполяризации и реполяризации кардиомиоцитов, что определяет их электрическую активность и возможность сокращения. Термин "каналопатии" объединяет заболевания различной этиологии, характеризующиеся нарушениями активности ионных каналов разных типов (Carnevale and Klein, 2017; Huang et al., 2017). Гиперфункция или дисфункция ионных каналов может привести к серьезным нарушениям в работе сердца. Наследственные натриевые каналопатии сердца могут быть ассоциированы с нарушением экспрессии гена *SCN5A*, кодирующего α -субъединицу потенциал-зависимого натриевого канала Nav1.5, изменением интенсивности транспорта Nav1.5 или изменением его электрофизиологических свойств (Kline and Costantini, 2019). Перечисленные изменения могут быть следствиями мутаций в гене *SCN5A*. Синдром удлинённого интервала QT (LQT) ассоциирован с усилением активности Nav1.5, в то время как синдром Бругада (BrS), прогрессирующее нарушение сердечной проводимости и др. ассоциированы с уменьшением активности Nav1.5. Таким образом, понимание роли ионных каналов в физиологии и патологии сердца имеет важное значение для разработки новых методов лечения и диагностики сердечных аритмий.

Исследования функциональной активности мутантных каналов Nav1.5 на модели гетерологической системы экспрессии (линии HEK293, CHO-K1 и др.) существенно расширили понимание молекулярных механизмов дисфункции Nav1.5 в развитии аритмий (Zimmer and Surber, 2008; Kline and Costantini, 2019). Достоинством этих модельных систем является возможность изолированно рассмотреть точечный эффект аминокислотной замены на электрофизиологические характеристики стационарной активации или инактивации, развития медленной инактивации, восстановления из инактивированного состояния (Plumereau et al., 2021). За последние десятилетия накоплено много знаний о молекулярных механизмах развития натриевых каналопатий, однако взаимосвязь между локализацией и типом мутации, спектром изменений функциональных характеристик канала и наблюдаемым у пациента клиническим фенотипом до конца не изучена.

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 аритмии, а также разрабатывать новые подходы, которые позволят предсказывать патогенность конкретных мутаций. Большой прогресс в понимании молекулярных механизмов аритмий может быть достигнут путём интеграции теоретического и экспериментального подходов. Анализ трёхмерных структур ионных каналов позволяет предложить гипотезы о механизмах влияния аминокислотных замен на

стабильность молекулы ионного канала в закрытом, открытом или инактивированных состояниях, которые можно затем проверить экспериментально.

В данной работе исследованы электрофизиологические эффекты мутаций гена *SCN5A*, обнаруженных у пациентов, предложены их структурные интерпретации, а также проанализирован ряд вариантов неизвестной клинической значимости из базы данных ClinVar и предсказана их патогенность. Полученные результаты важны для правильной диагностики и подбора стратегии лечения пациентов с наследственными нарушениями сердечного ритма. В связи с этим диссертационная работа А.К. Зайцевой представляет собой актуальное исследование, которое направлено на решение важной медицинской проблемы.

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 Nav1.5-WT или Nav1.5- $Y^{739}D$.
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 Nav1.5-WT или Nav1.5- $A^{1294}G$.
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 Nav1.5 предложить список потенциально повреждающих мутаций для последующих экспериментальных исследований.

Научная новизна

Научная новизна исследования обусловлена тем, что в настоящей работе впервые показана дисфункция Nav1.5, вызванная мутациями $Y^{739}D$ и $A^{1294}G$ и предложено структурное обоснование наблюдаемых изменений функциональной активности. Высказано предположение о существовании межсегментного контакта $E^{1295}:R^{1739}$, изменение которого может быть причиной наблюдаемых функциональных изменений у Nav1.5- $A^{1294}G$. Получено экспериментальное подтверждение взаимодействия между заместителями E^{1295} и R^{1739} . Впервые получены свидетельства существования пути передачи сигнала от потенциал-чувствительного домена ПЧД-III к петле IVP2-

S6 и роли этого сигнала в инактивации канала. Предложены структурные обоснования возможной патогенности генетических вариантов канала Nav1.5, которые в базе данных ClinVar описаны как варианты неизвестной клинической значимости.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации Y⁷³⁹D и A¹²⁹⁴G в натриевом канале миокарда Nav1.5 приводят к уменьшению его активности, что лежит в основе развития наследственной патологии сердца.
2. Физиологические свойства исследованных мутантных каналов Nav1.5 зависят от ряда конкретных междоменных и межсегментных контактов.
3. Дисфункция ряда мутантных каналов сердца Nav1.5 может быть предсказана путём анализа специфических межсегментных контактов в его трёхмерной структуре.

Теоретическая и практическая значимость

Каналопатии – это редкие наследственные заболевания, ассоциированные с мутациями в генах, кодирующих ионные каналы. В базе данных ClinVar имеются сведения о более 2000 вариантах гена *SCN5A*, ассоциированных с наследственными аритмиями. Более 1500 из этих вариантов являются вариантами неизвестной клинической значимости. Поиск подходов, позволяющих установить патогенность конкретных мутаций, является важной проблемой современной медицины. В работе использованы электрофизиологические и структурно-молекулярные подходы для предсказания патогенности мутаций неизвестной клинической значимости. Полученные данные вносят существенный вклад в фундаментальные представления о роли внеклеточных линкеров IIS1-S2 и IIS3-S4 в гейтинге канала Nav1.5 и динамике межсегментных контактов в структуре Nav1.5.

В ходе дальнейшей теоретической 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 как теоретическую значимость для развития представлений о структурной организации и функционировании канала Nav1.5, так и практическое значение для диагностики аритмий.

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

Личный вклад диссертанта

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, искала и обобщала литературные данные по теме диссертации, статистически обработала и проанализировала полученные результаты и готовила публикации по результатам исследований.

Апробация работы

Основные положения работы были представлены на российских и международных конференциях: Конгресс Европейского общества кардиологии (ESC Congress, Paris, 2019), Международный Съезд Физиологов СНГ (Дагомыс, 2019), IV Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019) и Алмазовский Молодёжный Медицинский Форум (Санкт-Петербург, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых изданиях. Все печатные работы опубликованы в изданиях, входящих в международные научные базы (Scopus, Web of Science). В четырёх публикациях автор диссертационного исследования является первым автором.

Структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, содержащего 292 источника. Работа изложена на 180 страницах, содержит 32 рисунка и 7 таблиц.

Финансовая поддержка работы

Работа была поддержана грантом РФФИ № 20-34-90142 Аспиранты «Связь наследственных нарушений сердечного ритма с процессами инактивации потенциал-зависимого натриевого канала Nav1.5» (рук. Тихонов Д.Б.) и грантами РНФ № 22-15-00186 «Структурно-молекулярные механизмы дисфункции ионных каналов Nav1.5, Cav1.2 и TRPM4 в миокарде» (рук. Жоров Б.С.) и № 17-15-01292 «Структурно-молекулярные механизмы дисфункции канала Nav1.5 в миокарде» (рук. Жоров Б.С.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Методология и методы исследования

Целевое секвенирование пациентов с генетическими вариантами Y⁷³⁹D и A¹²⁹⁴G было выполнено 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). Сайт-направленный мутагенез для создания исследуемых вариантов канала осуществляли методом ПЦР-амплификации. В качестве модельного объекта использовались клеточные линии НЕК293-Т и СНО-К1, трансфицированные плазмидным вектором pcDNA3.1 с последовательностью, кодирующей hNav1.5-WT или мутантные варианты Nav1.5 и GFP. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) использовался для исследования биофизических характеристик мутантов Nav1.5 и каналов дикого типа. Поддерживаемый потенциал для всех используемых протоколов составлял -100 мВ. С помощью различных протоколов исследованы вольтамперная характеристика, зависимость стационарной активации от напряжения, зависимость стационарной инактивации от напряжения, зависимость стационарной быстрой и медленной инактивации от напряжения, развитие медленной инактивации, кинетика восстановления из инактивации и другие характеристики натриевого тока. 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.

Молекулярное моделирование осуществлялось с помощью программы ZMM как описано ранее (Bruhova and Zhorov, 2010; Tikhonov and Zhorov, 2017). Для построения гомологических моделей hNav1.5 и hNav1.5-Y⁷³⁹D использовалась крио-ЭМ структура канала rNav1.5 (ближайший к hNav1.5 канал), опубликованная ко времени наших экспериментов (Jiang et al., 2020). Для построения моделей мутантных каналов hNav1.5 (E¹²⁹⁵R, R¹⁷³⁹E и E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E) мы использовали крио-ЭМ структуру канала hNav1.5 (Li et al., 2021). Крио-ЭМ структуры и модели визуализированы с помощью программы PyMol, версия 0.99rc (Шредингер, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк).

2. Результаты и обсуждение

2.1 Функциональная характеристика и структурная интерпретация генетического варианта Nav1.5-Y⁷³⁹D

В ходе генетических исследований пациентов с наследственными аритмиями с применением целевого секвенирования кандидатных генов был идентифицирован новый генетический вариант Nav1.5-Y⁷³⁹D. Мы создали соответствующую мутантную конструкцию, гетерологически экспрессировали её в системе экспрессии НЕК293-Т и обнаружили, что мутация Nav1.5-Y⁷³⁹D

существенно изменила электрофизиологические характеристики по сравнению с каналом WT. Высоко консервативный тирозин Y^{739} локализован во ПЧД-II (внеклеточная петля IIS1-S2). Мы построили гомологические модели каналов $hNav1.5$ -WT и $hNav1.5$ - $Y^{739}D$, сравнили межсегментные контакты Y^{739} и $Y^{739}D$ и предложили возможные механизмы, посредством которых замена $Y^{739}D$ может влиять на электрофизиологические характеристики $Nav1.5$.

Генетический анализ выявил новый генетический вариант *SCN5A* (chr3: 38639267:A>C NM_001160161.2.; с.2215T>G, р.Y739D), расположенный во внеклеточной петле IIS1-S2 (Рис. 1А, Б). Этот вариант не зарегистрирован в базе данных gnomAD, ClinVar или других публичных базах данных. На основании руководства ACMG этот вариант был классифицирован как вариант неизвестной клинической значимости. Мутант $Y^{739}D$ демонстрировал типичный натриевый ток (Рис. 1В). Пиковая плотность I_{Na} канала $Y^{739}D$, была значительно меньше, чем у WT (Рис. 1Г). Мы также наблюдали, что мутация вызывает небольшой деполярирующий сдвиг и увеличение константы наклона кривой потенциал-зависимости стационарной активации (Рис. 1Д). Таким образом, для активации каналов $Y^{739}D$ требуется более положительные потенциалы чем для каналов WT.

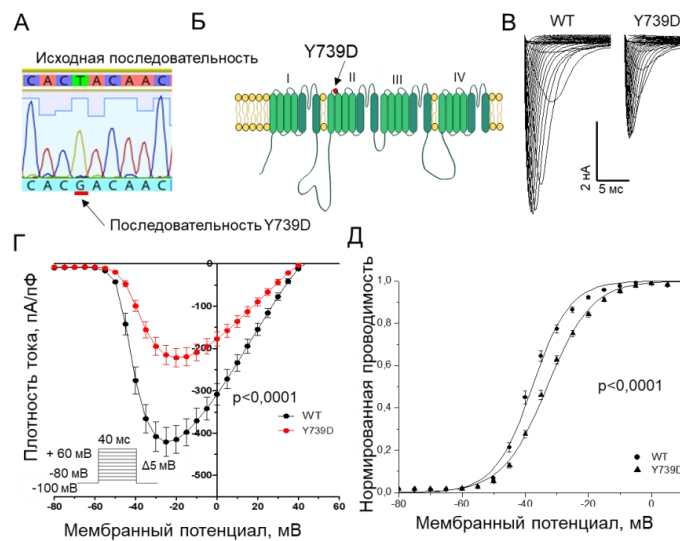


Рисунок 1. Идентификация нового генетического варианта. А. Генетическая характеристика пробанда. Электрофорограмма, полученная в результате анализа последовательности гена *SCN5A*. Стрелкой обозначен нуклеотид, где идентифицирована замена у пробанда. Б. Мембранная топология $Nav1.5$. Вариант $Y^{739}D$ локализован в петле IIS1–S2 (обозначен стрелкой). В. Записи натриевых токов клеток с каналами $Nav1.5$ -WT и $Nav1.5$ - $Y^{739}D$. Г. Вольтамперная характеристика для $Nav1.5$ -WT (чёрные круги, $n=42$) и $Y^{739}D$ (красные круги, $n=33$). Д. Потенциал-зависимость стационарной активации для

Nav1.5-WT (круги, n=42) и Y⁷³⁹D (треугольники, n=33). Сплошные линии соответствуют функции Больцманна для WT и Y⁷³⁹D (Zaytseva et al., 2022).

Также мы зарегистрировали зависимость стационарной инактивации от напряжения. Наблюдался отрицательный сдвиг кривой стационарной инактивации (Рис. 2А). Далее нами был проведён ряд экспериментов, показавших усиление как быстрой, так и медленной инактивации (Рис. 2Б и В). Затем мы проанализировали время восстановления из инактивированного состояния, из состояний быстрой инактивации и медленной инактивации (Рис. 2Г-Е). Мутация Y⁷³⁹D не приводила к изменению характеристик восстановления из состояния инактивации и быстрой инактивации, но нарушала процесс восстановления из состояния медленной инактивации.

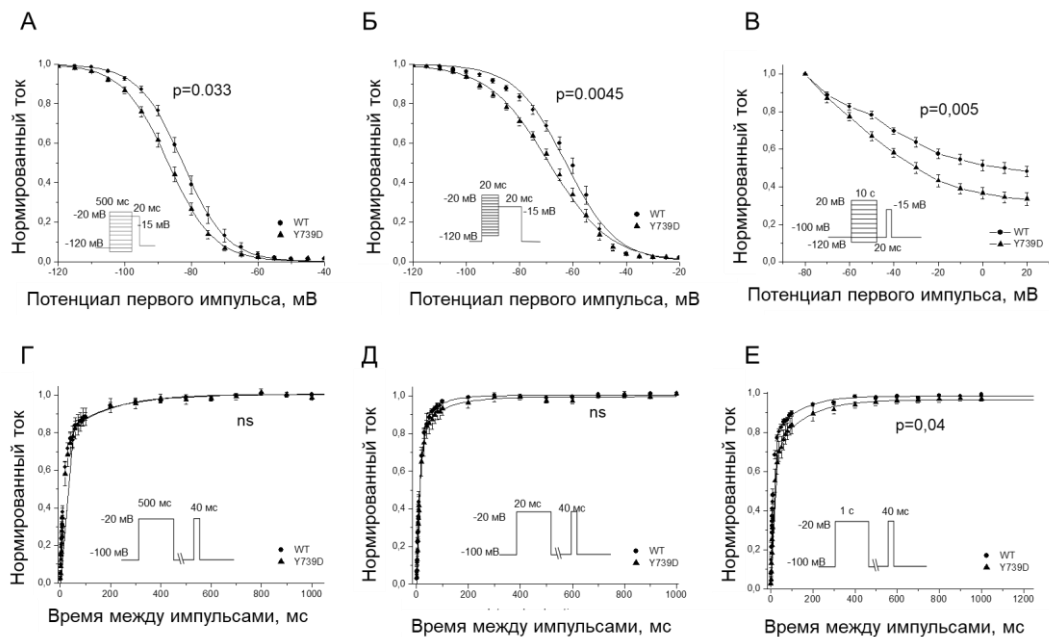


Рисунок 2 – Биофизические характеристики Y⁷³⁹D. А. Стационарная инактивация.

Сплошные линии соответствуют функции Больцманна для WT и Y⁷³⁹D. Б. Стационарная быстрая инактивация. В. Стационарная медленная инактивация ($I_{Na}/I_{Na\max}$ при +20mV WT: $0,48 \pm 0,03$; n=12; Y739D: $0,33 \pm 0,03$, n=15, p=0,005). Г. Восстановление из инактивации: WT (n=24) и Y⁷³⁹D (n=9). Д. Восстановление из быстрой инактивации: WT (n=13) и Y⁷³⁹D (n=10). Е. Восстановление из медленной инактивации WT (n=13) и Y⁷³⁹D (n=10). WT (чёрные круги) и Y⁷³⁹D (чёрные треугольники). Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2022).

В крио-ЭМ структуре канала rNav1.5 (Jiang et al., 2020) Y⁷³⁹ (использована нумерация UNIPROT hNav1.5) образует несколько контактов с большой внеклеточной петлей ПHS5-P1. К ним относятся Н-связи с солевыми мостиками K¹³⁸¹ и E¹⁴³⁵, а также π-катионное взаимодействие Y⁷³⁹ с K¹³⁹⁷ (Рис. 3А). Подобные контакты видны в Монте-Карло минимизированной (МКМ) модели hNav1.5. В МКМ модели hNav1.5-Y⁷³⁹D аспарат D⁷³⁹ образовал Н-связь с Y¹⁴³⁴ и солевой мостик с

K¹³⁹⁷ (Рис. 3Б). Таким образом, замена Y⁷³⁹D значительно изменила контакты между внеклеточными петлями в ПЧД-II (IIS1-S2) и доменом поры (IIS5-P1).

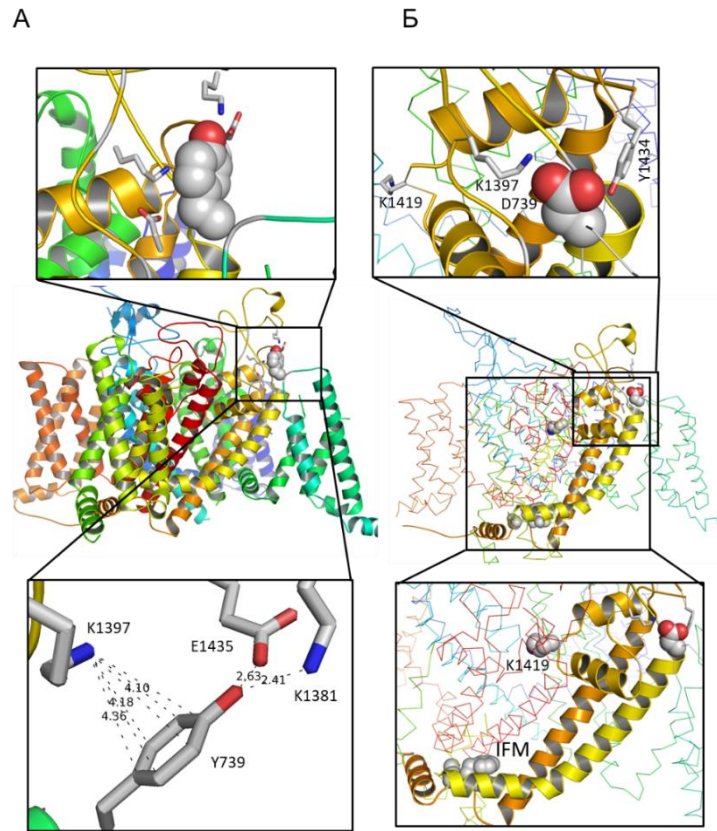


Рисунок 3 – Контакты Y⁷³⁹ и D⁷³⁹. А. В крио-ЭМ структуре канала rNav1.5 заместитель Y⁷³⁹ образует водородные связи с K¹³⁸¹ и E¹⁴³⁵ и π-катионный контакт с K¹³⁹⁷. Последний остаток также образует водородную связь с G¹³⁵⁸ на С-конце IIS5 (не показано для ясности). Б. В модели hNav1.5-Y⁷³⁹D остаток D⁷³⁹ участвует в Н-связях с K¹³⁹⁷ и Y¹⁴³⁴, в то время как Н-связь K¹³⁹⁷ с O=G¹³⁵⁸ отсутствует. Существенно разные контакты Y⁷³⁹ и D⁷³⁹ с петлями IIS5-P1 будут по-разному передавать аллостерические сигналы от потенциал-чувствительного домена II к частице быстрой инактивации IFM и к воротам медленной инактивации (Zaytseva et al., 2022).

Таким образом, натриевый ток в клетках HEK293-T, экспрессировавших Nav1.5-Y⁷³⁹D, характеризовался рядом изменений биофизических свойств: снижение пиковой плотности тока, нарушение активации и усиление инактивации. В частности, вариант Y⁷³⁹D 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 у мутантного канала медленная инактивация развивается 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 Y⁷³⁹D. Наконец, мы обнаружили замедление восстановления

Nav1.5-Y⁷³⁹D из состояния медленной инактивации. Резюмируя, Nav1.5-Y⁷³⁹D продемонстрировал фенотип снижения активности, что согласуется с нашим пониманием молекулярных механизмов BrS1.

Y⁷³⁹ консервативен среди паралогов и ортологов Nav1.5. 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). Анализ контактов Y⁷³⁹ и D⁷³⁹ с петлей IIS5-P1 показал, что они существенно различаются. Это обуславливает разницу в передаче аллостерических сигналов от ПЧД-II в двух направлениях: 1) через IIS5 к трипептиду быстрой инактивации IFM (Рис. 3Б), фенилаланин в составе которого образует тесные контакты с V¹³²³ и A¹³²⁶ на N-конце IIS5 и 2) по спирали IIP1 к K¹⁴¹⁹ в области селективного фильтра (СФ), где расположены ворота медленной инактивации (Рис. 3Б).

2.2. Функциональная характеристика мутантного канала Nav1.5-A¹²⁹⁴G и структурная интерпретация результатов

Вариант гена *SCN5A* (NM_198056.2:c.3881C<G, p.A¹²⁹⁴G) (Рис. 4 А), расположенный во внеклеточной петле IIS3-S4 (Рис. 4Б) обнаружен у молодого пациента мужского пола со смешанным аритмогенным фенотипом: атриовентрикулярная блокада II типа, ЭКГ-феномен Бругада, фиброз межжелудочковой перегородки и дилатация правого желудочка.

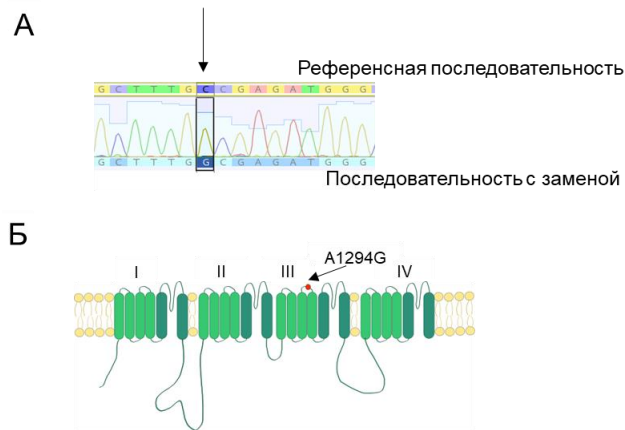


Рисунок 4 – Идентификация генетического варианта A1294G. А. Генетическая характеристика пробанда. Участок электрофореграммы, полученной после анализа последовательности *SCN5A*. Стрелкой указано положение нуклеотида 3881 в гене *SCN5A*, где в ДНК пробанда была обнаружена замена (гетерозиготная замена С на G, с.3881 C<G). Б. Мембранная топология канала Nav1.5. Относительное положение мутации A¹²⁹⁴G в петле S3–S4 повтора III обозначено стрелкой. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2019).

Вариант был зарегистрирован в базе данных gnomAD с заявленной частотой $2,859 \cdot 10^5$ (rs754933998). Согласно классификации Американского колледжа медицинской генетики этот

генетический вариант относится к вариантам неизвестной клинической значимости (VUS – variant of unknown significance). Далее мы функционально охарактеризовали Nav1.5-A¹²⁹⁴G и выявили изменения функциональных свойств мутантных каналов, которые могут приводить к развитию клинического фенотипа.

Пиковая плотность I_{Na} , Nav1.5-A¹²⁹⁴G снижена относительно каналов WT. (Рис. 5А). Мы также наблюдали у A¹²⁹⁴G небольшое усиление активации (Рис. 5Б). Таким образом, степень деполяризации, необходимая для активации, была несколько снижена для каналов Nav1.5-A¹²⁹⁴G.

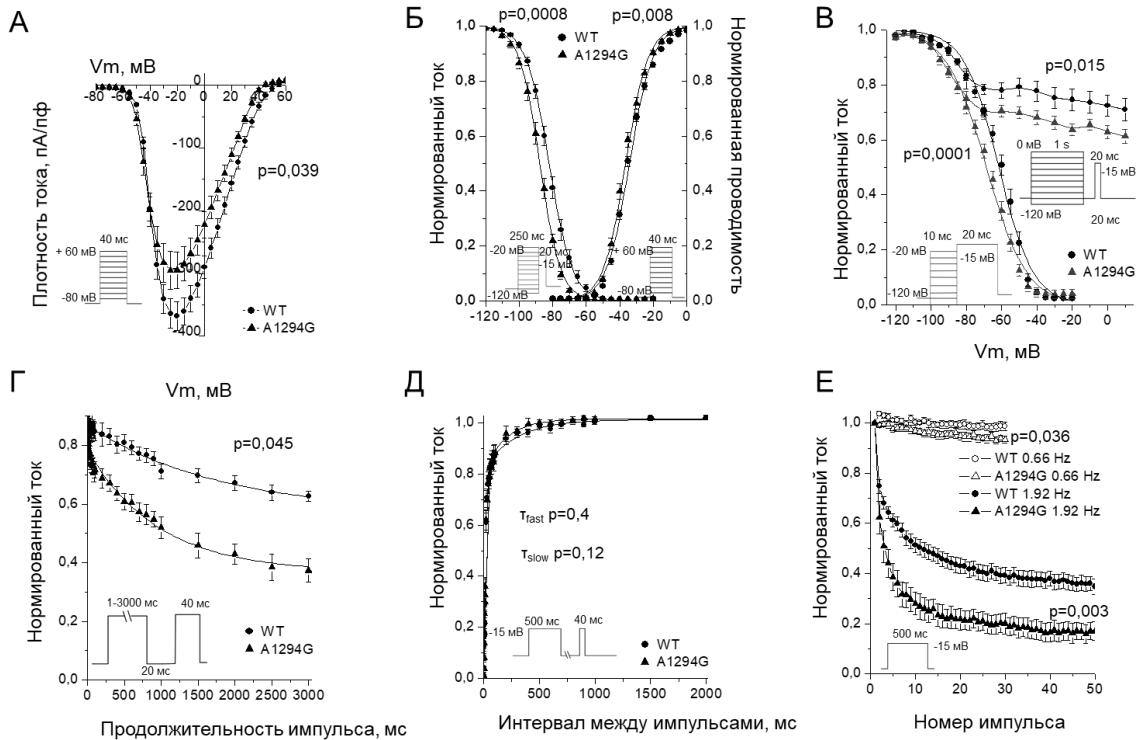


Рисунок 5 – Биофизические свойства натриевых каналов, экспрессированных в клетках НЕК293-Т для WT (круги) и A¹²⁹⁴G (треугольники). А. Вольтамперная характеристика. Б.

Стационарная активация и инактивация. В. Стационарная быстрая и промежуточная инактивация. Г. Развитие промежуточной инактивации. Д. Восстановление 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 A¹²⁹⁴G (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 A¹²⁹⁴G (закрашенные треугольники, $n = 10$) 17 ± 4 % ($p = 0,003$) на частоте 1,92 Гц. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2019).

Инактивация A¹²⁹⁴G была существенно усилена (Рис. 5Б). Мутант также приводил к сдвигу зависимости быстрой инактивации от напряжения на ~ -10 мВ (Рис. 5В). Также у канала A¹²⁹⁴G наблюдалось усиление процесса промежуточной инактивации относительно каналов дикого типа

для широкого диапазона деполяризованных потенциалов (от -95 до +10 мВ) (Рис. 5В). Развитие промежуточной инактивации для мутантных каналов происходило значительно быстрее, чем для каналов дикого типа (Рис. 5Г). А¹²⁹⁴G не влиял на параметры восстановления из инактивированного состояния (Рис. 5Д). Это позволяет предположить, что данный вариант нарушает процесс релаксации из активированного состояния, а не повышает стабильность инактивированного состояния. Кроме того, вариант А¹²⁹⁴G продемонстрировал уменьшение амплитуды тока в ответ на стимуляцию (Рис. 5Е). Таким образом, мутация Nav1.5-А¹²⁹⁴G стабилизирует промежуточное инактивированное состояние канала.

Дисфункция натриевых каналов сердца связана с различными аритмогенными синдромами, включая LQT, BrS, ПНСП, атриовентрикулярную блокаду и др. Эти синдромы могут быть связаны с различными дисфункциями канала Nav1.5. Например, две мутации *SCN5A* (IS5-S6_G²⁹⁸S и IVS3_D¹⁵⁹⁵N), ассоциированные с атриовентрикулярной блокадой, 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, позднее были описаны различные смешанные фенотипы, обусловленные одиночными вариантами *SCN5A* (Bezzina et al., 1999).

В настоящее время отсутствует четкая корреляция локализации и типа замен с их клиническим и/или электрофизиологическим фенотипом. 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, 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 и T¹⁶²⁰K) (Baroudi et al., 2000; Abriel et al., 2001; Wang et al., 2007; Surber et al., 2008; Ortiz-Bonnin et al., 2016). Схожим образом, А¹²⁹⁴G влияет на процессы инактивации и восстановления из инактивированного состояния, что указывает на возможную роль линкеров S3-S4 в конформационных переходах между различными состояниями Nav1.5.

Таким образом, наши данные свидетельствуют, что замена А¹²⁹⁴G делает линкер S3-S4 более гибким и изменяет движение потенциал-чувствительной спирали III-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 изменения могут лежать в основе комбинированного фенотипа.

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

Как описано выше, вариант A¹²⁹⁴G 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 III3-S4, увеличивает гибкость линкера и, таким образом, может оказывать влияние на межсегментные контакты с участием этого линкера и фланкирующих внеклеточных остатков в спиральях S3 и S4.

В крио-ЭМ структуре канала hNav1.5 (PDB: 6lqa) остатки E¹²³⁰ и E¹²⁹⁵ в составе ПЧД-III сближены, соответственно, с остатками N¹⁷³⁶ и R¹⁷³⁹ в петле IVP2-S6. 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 HEK293-T. 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 медленной инактивации у селективного фильтра на N-конце спирали IVP2 и к воротам быстрой инактивации на C-конце спирали IVS6.

В двух крио-ЭМ структурах канала hNav1.5 конформации петли IVP2-S6 несколько отличаются (Рис. 6 А, Б), а конформации кольца внешних карбоксилатов (EEDD) существенно различаются. 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 домен поры (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. Это свидетельствует, что оба канала находятся в состоянии инактивации. Однако неясно, находятся ли апо- и лиганд-связанные каналы в функционально различных состояниях инактивации.

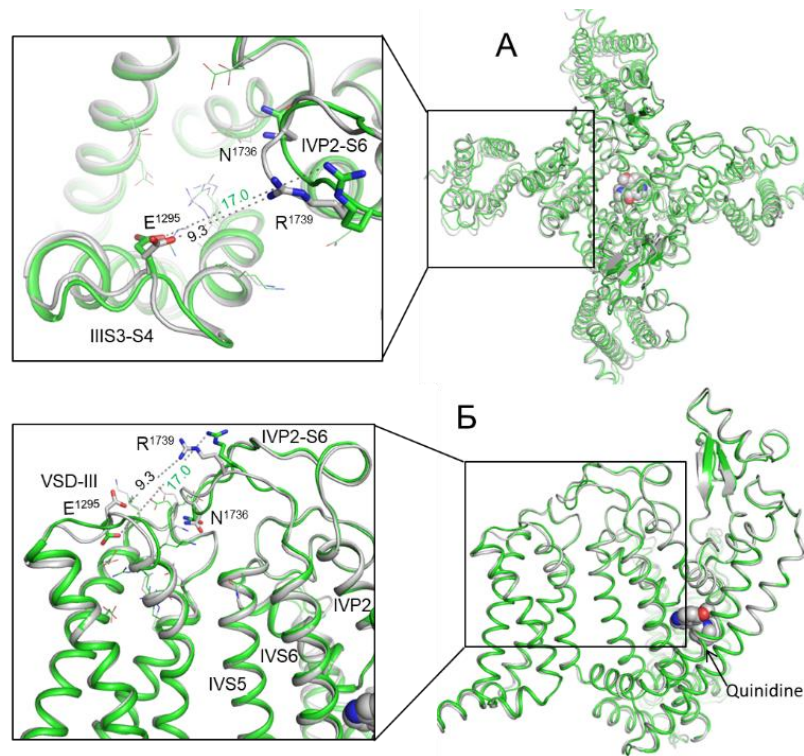


Рисунок 6 – Внеклеточные петли в двух крио-ЭМ структурах канала hNav1.5. А, Б. Внеклеточный (А) и боковой (Б) виды hNav1.5 в апо-форме (зеленый; PDB ID: 7dtc) и в комплексе с хинидином (серый, PDB ID: 6lqa). Следует отметить разную конформацию петель III S3-S4 и IVP2-D6 и разницу в расстоянии между остатками E^{1295} и R^{1739} . Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

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., 2021) показывают, что индуцированная токсином деактивация ПЧД-IV резко сдвигает в сторону цитоплазмы IVS4 и вызывает большие конформационные изменения в петле IVS3-S4. Важно отметить, что петля IVS3-S4 переместилась намного ближе к петле IS5-P1. Приведенные выше данные свидетельствуют, что потенциал-зависимая деактивация ПЧД-III также может уменьшить расстояние между петлями III S3-S4 и IVP2-S6.

Приведенные выше данные побудили нас сгенерировать модельные мутации $E^{1295}R$, $R^{1739}E$, $N^{1736}R$ и $E^{1295}R/R^{1739}E$ для проверки взаимодействий между остатками линкеров III S3-S4 и IVP2-S6 и изучить их электрофизиологические характеристики. Мутантный канал $E^{1295}R$ продемонстрировал положительный сдвиг кривой стационарной активации на 4 мВ (Рис. 7А). Для каналов $R^{1739}E$ (Рис. 7Б), $E^{1295}R/R^{1739}E$ (Рис. 7В) или $N^{1736}R$ (Рис. 7Г) не наблюдалось значимых изменений стационарной активации. Это свидетельствует, что ослабление активации у мутанта $E^{1295}R$, компенсируется у двойного мутанта $E^{1295}R/R^{1739}E$. $E^{1295}R$ приводил к сдвигу стационарной инактивации в сторону деполяризации на 7,6 мВ (Рис. 7Д). $R^{1739}E$ продемонстрировал небольшой

сдвиг стационарной инактивации в сторону гиперполяризации (Рис. 7Е). Стационарная инактивация не изменялась у мутантных каналов $E^{1295}R/R^{1739}E$ (Рис. 7Ж) и $N^{1736}R$ (Рис. 7З).

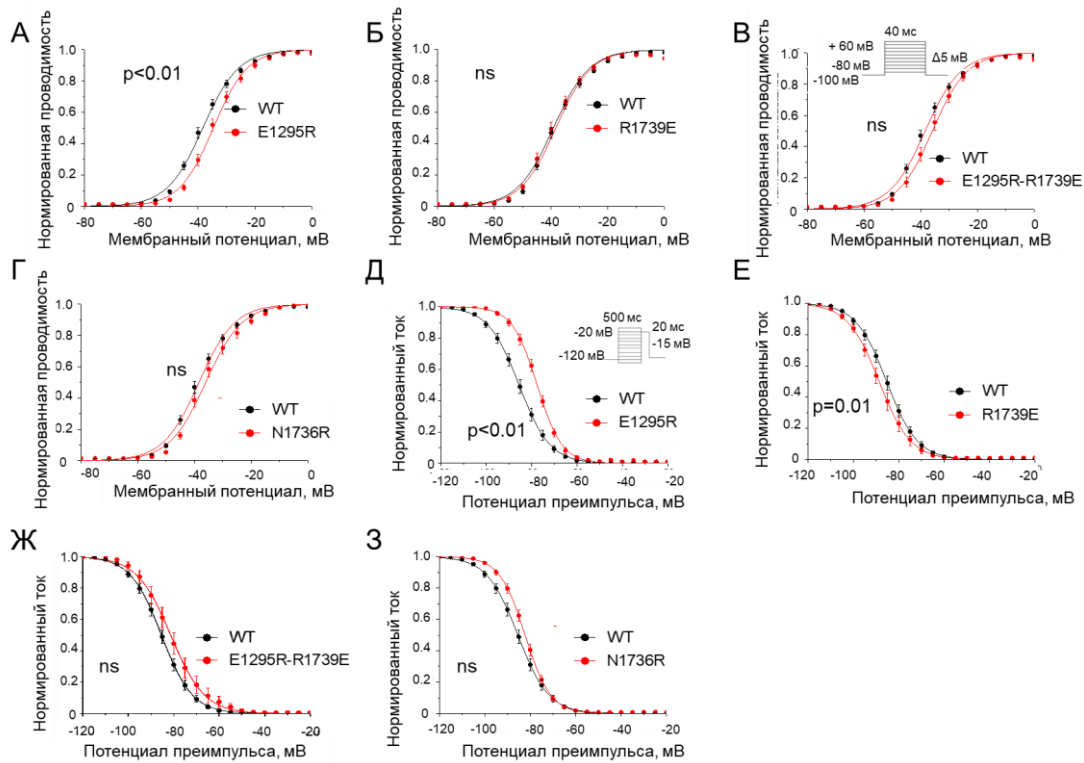


Рисунок 7 – Зависимость стационарной активации и стационарной инактивации от напряжения. Сплошными линиями обозначены аппроксимации функции Больцмана для канала WT (черный) и мутантных каналов (красный). А-Г. Стационарная активация. А. Замена $E^{1295}R$ вызывает нарушение активации. Б. $R^{1739}E$ не оказывает влияния на активацию. В, Г. $E^{1295}R/R^{1739}E$ (В) и $N^{1736}R$ (Г) незначительно изменили активацию. Д-З. Стационарная инактивация. Д. Мутация $E^{1295}R$ нарушает процесс инактивации. Е. Мутация $R^{1739}E$ несколько облегчила инактивацию. Ж, З. $E^{1295}R/R^{1739}E$ (Ж) и $N^{1736}R$ (З) незначительно нарушали инактивацию. Рисунок взят из статьи (Zaytseva et al., 2021).

Мутация $E^{1295}R$ вызвала деполяризующий сдвиг стационарной быстрой инактивации примерно на 10 мВ (Рис. 8А). Мутация $R^{1739}E$ ускоряла стационарную быструю инактивацию и характеризовалась отрицательным сдвигом примерно на 5 мВ (Рис. 8Б). Стационарная быстрая инактивация двойного мутанта $E^{1295}R/R^{1739}E$ была аналогична таковой для канала WT (Рис. 8В). Мутация $N^{1736}R$ препятствовала стационарной быстрой инактивации, демонстрируя положительный сдвиг примерно на 4 мВ (Рис. 8Г). Мутация $E^{1295}R$ значительно усиливала стационарную медленную инактивацию (Рис. 8Д), тогда как замена $R^{1739}E$ приводила к её нарушению (Рис. 8Е). У двойных мутантов $E^{1295}R/R^{1739}E$ зависимость стационарной медленной инактивации от напряжения была аналогична таковой для канала дикого типа (Рис. 8Ж). Замена

$N^{1736}R$, по-видимому, приводила к нарушению медленной инактивации (рис. 83), однако эффект был статистически незначимым.

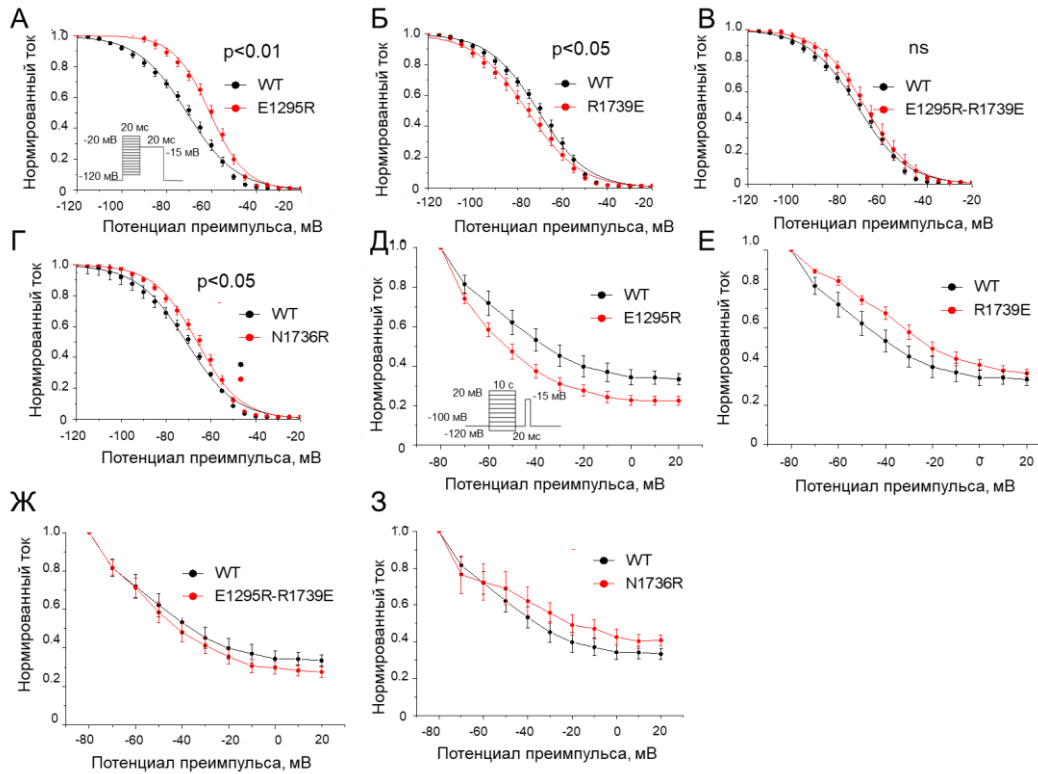


Рисунок 8 – Зависимость стационарной быстрой и медленной инактивации от напряжения. А-Г. Стационарная быстрая инактивация. Сплошными линиями обозначены аппроксимации функции Больцмана. А. Мутация $E^{1295}R$ нарушает процесс быстрой инактивации. Б. Мутация $R^{1739}E$ слегка усиливает быструю инактивацию. В. Быстрая инактивация двойного мутанта $E^{1295}R/R^{1739}E$ аналогична таковой у канала WT. Г. Мутация $N^{1736}R$ ослабляет быструю инактивацию. Д-З. Стационарная медленная инактивация. Сравнение проводили с использованием I_{Na} при напряжении 20 мВ. Характеристики канала WT: $I_{Na}/I_{max} = 0,32 \pm 0,02$, $n=11$. Д. $E^{1295}R$ незначительно усиливал медленную инактивацию ($I_{Na}/I_{max} = 0,23 \pm 0,02$; $p=0,0074$, $n=12$). Е, Ж. Мутации $R^{1739}E$ (Е) ($I_{Na}/I_{max} = 0,37 \pm 0,02$; $p=0,15$, $n=8$) и $E^{1295}R/R^{1739}E$ (Ж) ($I_{Na}/I_{max} = 0,28 \pm 0,03$; $p = 0,36$, $n = 11$) не влияли на медленную инактивацию. З. Мутация $N^{1736}R$ существенно усиливала медленную инактивацию ($I_{Na}/I_{max} = 0,18 \pm 0,05$; $p = 0,037$, $n = 7$) (Zaytseva et al., 2021).

Приведенные выше данные указывают на важную роль остатков R^{1739} , E^{1295} и N^{1736} в нормальном функционировании $Nav1.5$. 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 активированном состоянии.

Дальнейшие эксперименты необходимы для демонстрации прямого взаимодействия остатков E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹. Между тем, возможность существования солевого мостика E¹²⁹⁵:R¹⁷³⁹ подтверждается следующими косвенными данными. 1) Аминокислотные замены с потерей заряда в BrS1-ассоциированных вариантах R¹⁷³⁹Q/W или обратная мутация патогенного варианта E¹²⁹⁵K предполагают участие этих остатков в важных электростатических взаимодействиях. В крио-ЭМ структуре Nav_v1.5 E¹²⁹⁵ является ближайшим кислотным остатком, способным притягиваться к R¹⁷³⁹. 2) Согласно нашим расчетам, IVP2-S6 скорее способствует, чем сопротивляется смещению спирали III4. 3) В состоянии покоя ПЧД-III E¹²⁹⁵ создает потенциал, притягивающий R¹⁷³⁹. 4) Некоторую аналогию зависимых от состояния контактов между ПЧД-III и петлей IVP2-S6 можно найти в крио-ЭМ структурах rNav_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. Предлагаемый механизм объясняет, почему мутации в предполагаемом пути передачи движения от ПЧД-III к селективному фильтру связаны со снижением активности Nav_v1.5 и BrS.

Таким образом, мы создали четыре мутанта, локализованные в интерфейсе между ПЧД-III и внеклеточной петлей IVP2-S6 и исследовали их электрофизиологические свойства. Мутация E¹²⁹⁵R в петле III3-S4 продемонстрировала наиболее сильное влияние на активацию и инактивацию каналов. Основываясь на молекулярном моделировании, мы предполагаем, что E¹²⁹⁵ образует зависимый от состояния канала солевой мостик с R¹⁷³⁹ в спирали IVP2-S6. Мы 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 Nav_v1.5.

2.4. Потенциально повреждающие варианты канала hNav_v1.5

Более 1500 миссенс-вариантов hNav_v1.5, 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 пациентов с наследственными аритмиями. С помощью биоинформатических подходов было предсказано, что 74 варианта VUS/NP/CIP 54-х 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 hNav_v1.5 (Li et al., 2021) и построенные нами модели для поиска контактов заместителей, для которых известны потенциально повреждающие варианты.

Используя PyMol, мы отобрали аминокислоты, которые в аминокислотной последовательности 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 списка w54 связываются с 84 остатками, для которых в ClinVar описано 118 миссенс-вариантов, из них 104 варианта VUS/NP/CIP ассоциированы с аритмиями (Korkosh et al., 2021).

Матричное представление контактов (Рис.9) позволило распознать мутации, ассоциированные 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, стабилизирующие открытое состояние домена поры 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 описаны как варианты VUS/NP/CIP.

На рисунке 9 показаны Р-петли с некоторыми контактами, которые, по-видимому, стабилизируют фолдинг, и матрица соответствующих контактов. Пять гидрофобных остатков (IS6_M³⁹⁰, IS6_M³⁹⁷, IVS5_M¹⁶⁶⁸, IVP1_M¹⁷⁰¹ и L¹⁷⁰⁴) образуют плотный кластер (Рис. 9А, Б). В вариантах M³⁹⁰I/V, M³⁹⁴I, M¹⁶⁶⁸T и M¹⁷⁰¹I замены метионина остатками меньшего размера (Рис. 9В) приведут к дестабилизации кластера и повышению гибкости спирали IVP1. Несколько мутаций, локализованных в Р-петлях, также могут изменять их гибкость. Например, в крио-ЭМ структуре заместители PP1_F⁸⁹² и PP1_F⁸⁸⁸ образуют стэкинг-пару (Рис. 9Г), которая может стабилизировать α -спираль (Butterfield et al., 2002). Мутация PP1_F⁸⁹²L влияет на межсегментный контакт с PS6_V¹⁴⁵¹ и разрушает стэкинг-пару с вероятной дестабилизацией спирали PP1. Соседняя к F⁸⁹² аминокислота, PP1_R⁸⁹³, образует несколько сильных контактов, в том числе солевой мостик с PP2_E⁹⁰¹, который стабилизирует взаимное расположение спиралей PP1 и PP2 (Рис. 9Г). Другой контакт, PP1_R⁸⁹³, включает глутамат селективного фильтра PP1-P2_E⁸⁹⁸, который может изменять конформацию при прохождении иона натрия (Zhorov, 2021). Сильное электростатическое притяжение к PP1_R⁸⁹³ может стабилизировать конформацию E⁸⁹⁸. Контакты в моделях в других состояниях рассмотрены в нашей публикации (Korkosh et al., 2021).

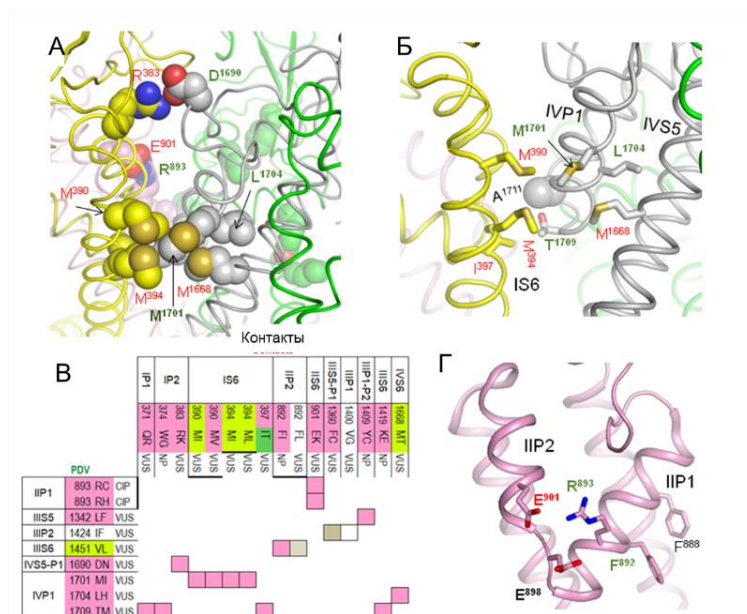


Рисунок 9 – Контакты остатков, стабилизирующие Р-петли в крио-ЭМ структуре hNav1.5. Повторы I, II, III и IV окрашены желтым, розовым, зеленым и серым цветами, соответственно. (А, Б) Виды со стороны мембраны. Остатки M³⁹⁰, M³⁹⁴, M¹⁶⁶⁸, M¹⁷⁰¹ и L¹⁷⁰⁴ образуют плотный гидрофобный кластер, который, по-видимому, стабилизирует взаимное расположение спиралей IS6, IVS5 и IVP1. (В) Матрица вариантов контактов в Р-петлях. Поля сверху и слева обозначают локализацию вариантов и клиническую значимость (VUS, NP, CIP). Варианты, ассоциированные с более чем одним заболеванием, окрашены двумя цветами. Ячейки в теле матрицы обозначают наличие контакта между дикими заместителями. Ячейки в полях и теле матрицы 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. Большинство вариантов, для которых имеется ячейка в теле матрицы, ассоциированы с уменьшением активности Nav1.5. (Г) Внутримембранный вид спиралей IIP1 и IIP2, взаимное расположение которых стабилизировано солевым мостиком R⁸⁹³:E⁹⁰¹. Конформация боковой цепи глутамата E⁹⁰¹ стабилизируется его солевым мостиком с R⁸⁹⁸. Спиральная структура IIP1 стабилизирована π-стекингом F⁸⁸⁸ и F⁸⁹².

Ряд факторов ограничивает интерпретацию данных электрофизиологических экспериментов на модели гетерологической системе экспрессии. Во-первых, для вариантов неизвестной клинической значимости нельзя исключить влияние возраста, пола и гормонального статуса пациента (Zimmer and Surber, 2008). Во-вторых, в гетерологической системе экспрессии отсутствует ряд кардио-специфичных белков, которые могут влиять на экспрессию гена, транспорт и регуляцию Nav1.5 (Mohler et al., 2004; Balse and Eichel, 2018). В-третьих, системы экзогенной экспрессии не

позволяют проанализировать долговременный эффект экспрессии генетического варианта *SCN5A* в миокарде (Wu et al., 2007). В-четвертых, исследуемый вариант, как правило, рассматривается в отрыве от полиморфизмов *SCN5A*, носителем которых является пациент. Известно, что полиморфизмы *SCN5A* могут влиять на гейтинг или транспорт Nav1.5 (Ackerman et al., 2004). Также следует отметить, что, изменение электрофизиологических характеристик Nav1.5 может быть следствием альтернативного сплайсинга (Tan et al., 2006; Wang et al., 2007). В-пятых, часто дизайн исследований предполагает измерения при комнатной температуре, что осложняет выявление изменений характеристик и транспорта канала (Berecki et al., 2006).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Функциональные исследования, выполненные на модели гетерологической системы экспрессии являются высокоинформативным методом выявления корреляции между генотипом и фенотипом пациента. Метод локальной фиксации потенциала позволяет обнаружить функциональные изменения в работе ионных каналов. Выявление механизмов аритмии может находить применение в подборе индивидуальной терапии для пациентов с конкретной мутацией *SCN5A*, что определяет ценность данного направления для развития персонализированной медицины. Исследование физиологических механизмов *SCN5A*-ассоциированных каналопатий позволяет установить роль конкретных аминокислот в конформационных переходах Nav1.5 и вносит 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, расширяет понимание структурных основ работы Nav1.5 в норме и патологии, и позволяет реклассифицировать ряд вариантов гена *SCN5A* неизвестной клинической значимости как потенциально повреждающие варианты. Полученные данные потенциально практически значимы, так как они улучшают диагностику и стратификацию риска для пациентов с наследственными аритмиями.

ВЫВОДЫ

1. Мутация Y⁷³⁹D в натриевом канале Nav1.5, который играет ключевую роль в передаче возбуждения в миокарде, вызывает ослабление активации и усиление инактивации, что приводит к дисфункции Nav1.5 и может лежать в основе развития синдрома Бругада.
2. Мутация A¹²⁹⁴G приводит к усилению быстрой и медленной инактивации канала Nav1.5. Это свидетельствует об уменьшении активности канала, которая нарушает нормальную физиологическую функцию сердца и может лежать в основе развития смешанной клинической картины у пациента.
3. Физиологическая дисфункция канала Nav1.5 при мутациях E¹²⁹⁵R в потенциал-чувствительном домене III (ПЧД-III) и R¹⁷³⁹E в петле IVP2-S6 порогового домена

компенсируются у двойного мутанта E¹²⁹⁵R/R¹⁷³⁹E. Это свидетельствует о взаимодействии между заместителями E¹²⁹⁵ и R¹⁷³⁹ и его участии в передаче сигнала от ПЧД-III к инактивационным воротам порового домена.

4. На основе анализа структуры Nav1.5 и матричного представления контактных вариантов предложен список потенциально повреждающих вариантов гена *SCN5A* для последующих экспериментальных исследований.

Список публикаций в журналах, рекомендованных ВАК

1. Зайцева, А.К. Биофизические механизмы натриевых каналопатий в миокарде: синдром удлинённого интервала QT / А.К. Зайцева, А.В. Карпушев, Б.С. Жоров, А.А. Костарева // 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, A. Kostareva// Front. Cardiovasc. – 2022. –Vol.9. –P. 932956.