

**MUTATION IN CARDIAC VOLTAGE GATED SODIUM CHANNEL $\text{Na}_v1.5$
PROLONGS CARDIOMYOCYTE PROLIFERATION IN LEFT VENTRICULAR
NONCOMPACTION CARDIOMYOPATHY**

Julia Kari-Koskinen
University of Helsinki
Faculty of Pharmacy
Department of Pharmacology

August 2021

Abstract

Faculty: Faculty of Pharmacy

Degree programme: Master's degree in pharmacy

Study track: Pharmacology

Author: Julia Kari-Koskinen

Title: Mutation in cardiac voltage gated sodium channel $Na_v1.5$ prolongs cardiomyocyte proliferation in left ventricular noncompaction cardiomyopathy

Level: Master's thesis

Month and year: August 2021

Number of pages: 55

Keywords: Cardiomyopathy, LVNC, trabeculation, voltage gated sodium channel, *SCN5A* gene, proliferation

Supervisor or supervisors: Vipri Talman Ph.D., Lotta Pohjolainen M.Sc.

Where deposited: ethesis.helsinki.fi

Abstract:

Left ventricular noncompaction cardiomyopathy (LVNC) is a unique form of cardiomyopathy, which is believed to arise from arrest in the compaction process during cardiac development. Dysfunctions in cell cycle regulation and increased or decreased proliferation of cardiomyocytes during cardiac development are likely to contribute to the development of LVNC. *SCN5A* gene encoding the α -subunit of cardiac voltage gated sodium channel $Na_v1.5$ has associated with LVNC-phenotype in a Finnish family. The direct correlation of *SCN5A* gene mutation and LVNC has not been studied before. There is strong evidence that $Na_v1.5$ channel has an essential role in cardiac development and cardiomyocyte proliferation, therefore perturbed function of the channel might also contribute to the development of LVNC.

We used patient-specific human induced pluripotent stem cell -derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs), reprogrammed from fibroblasts obtained from LVNC patient carrying *SCN5A* to study the phenotype of the cells. We utilized immunofluorescent staining in combination with high content analysis (HCA) to investigate the proliferation and $Na_v1.5$ cellular localization. Proliferation potential was assessed at multiple timepoints from three to six weeks. We also investigated the stress response of patient-specific hiPSC-CMs by exposing the cells to mechanical stretch, a hypertrophy inducer, followed by quantitative reverse transcription PCR to study changes in stress biomarker levels.

According to our results, the patient-specific hiPSC-CMs have prolonged proliferation compared to control cells as the proliferation peaks towards the last timepoint, whereas in control cells it decreases. Differences were also observed in the hypertrophic gene expression after 24-hour mechanical stretching. An increase in *NPPB* expression levels caused by stretching was threefold in patient-specific cells to control cells. These results implicate that *SCN5A* gene has an important role on cardiomyocyte proliferation. Mutations in *SCN5A* could correspond to increased proliferation in trabeculations during cardiac development, which might be preventing the compaction process and lead to the development of LVNC. Our results emphasizes that *SCN5A* has an important role in cardiomyocyte physiology unrelated solely to electrical activity.



Tiivistelmä

Tiedekunta: Farmasian tiedekunta

Koulutusohjelma: Proviisorin koulutusohjelma

Opintosuunta: Farmakologia

Tekijä: Julia Kari-Koskinen

Työn nimi: Mutaatio sydämen jänniteherkässä natriumkanava Nav1.5:ssa pidentää kardiomyosyyttien proliferaatiota vasemman kammion nonkompaktio kardiomyopatiassa

Työn laji: Pro gradu-tutkielma

Kuukausi ja vuosi: Elokuu 2021

Sivumäärä: 55

Avainsanat: Kardiomyopatia, LVNC, trabekulaatio, jänniteherkkä natriumkanava, SCN5A-geeni, proliferaatio

Supervisor or supervisors: Vipri Talman FaT, Lotta Pohjolainen Prov.

Where deposited: ethesis.helsinki.fi

Tiivistelmä:

Trabekuloiva kardiomyopatia (left ventricular noncompaction cardiomyopathy) on synnynnäinen sydänlihassairaus, jonka uskotaan johtuvan sikiöaikaisesta kehityshäiriöstä kardiogeneesin viimeisessä vaiheessa sydänlihaksen tiivistymisen yhteydessä, mikä on osa kammioiden kehitystä. On viitteitä siitä, että häiriöt solusyklin säätelyssä ja sydänlihassolujen eli kardiomyosyyttien proliferaation voimistuminen tai heikkeneminen sydämen kehityksen ovat osallisia LVNC:n kehityksessä. Sydämen jänniteherkän natriumkanavan Nav1.5:n α -alaysikköä koodaava SCN5A-geeni on yhdistetty LVNC:n fenotyyppiin suomalaisessa perheessä. LVNC:n geneettinen tausta on moninainen ja yli 40 eri geenin mutaatioita on yhdistetty sairauteen. Toistaiseksi SCN5A -geenimutaation ja LVNC:n välistä yhteyttä ei ole osoitettu. On vahvaa näyttöä siitä, että sähköisen toiminnan säätelyn ohella $Na_v1.5$ -kanavalla on keskeinen rooli sydämen kehityksessä ja kardiomyosyyttien proliferaation säätelyssä.

Tässä työssä käytimme potilasspesifisiä ihmisen indusoituja monikykyisiä kantasoluja ja niistä erilaistettuja kardiomyosyyttejä (human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs). Kantasolut olivat peräisin SCN5A-mutaatiota kantavilta LVNC-potilailta ja kontrollisolulinjana kaikissa kokeissa käytetään iPS(IMR90)-4-solulinjaa. Menetelminä tässä työssä käytimme immunofluoresenssiväryystä yhdessä high content-kuvantamisen kanssa soluproliferaation ja $Na_v1.5$ -kanavan solunsisäisen lokalisaation ja ekspression tutkimiseksi. Proliferaatiota tutkittiin eri aikapisteistä – 21, 28, 35 ja 42 päivää hiPSC-CM:n erilaistuksen aloituksesta. Tutkimme myös potilasspesifisten hiPSC-CM:n stressivastetta altistamalla solut mekaaniselle venytykselle, joka on keskeinen hypertrofiaa aiheuttava ärsyke. Venytyksen jälkeen suoritimme kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio ja määritimme *NPPA* ja *NPPB* geeniekspression.

Tulostemme mukaan potilasspesifisillä hiPSC-CM:illä on pitkittynyt proliferaatiokyky verrattuna kontrollisoluihin. Potilasspesifisissä soluissa proliferaatiokyky nousee kohti kokeen viimeistä aikapistettä, kun taas kontrollisoluissa proliferaatiokyky on ensimmäisestä aikapistestä lähtien laskeva. Eroja havaittiin myös *NPPA* ja *NPPB* geeniekspressiossa 24 tunnin mekaanisen venytyksen jälkeen. *NPPB*-ekspressio oli kolminkertainen potilasspesifisissä soluissa verrattuna kontrollisoluihin. Nämä tulokset viittaavat siihen, että SCN5A-geenillä on tärkeä rooli sydänlihassolujen proliferaatiossa. Lisääntynyt proliferaatio kehityksen aikaisissa trabekulaatioissa voisi johtaa lisääntyneeseen trabekulaatioon ja heikentyneeseen kompaktioprotesseen ja luoda siten pohjan LVNC:n kehitykselle. Tutkimillamme potilasspesifisillä hiPSC-CM:illä oli myös heikentynyt sietokyky mekaaniselle venytykselle, mikä puolestaan korostaa SCN5A-geenin tärkeää roolia kardiomyosyyttien fysiologiassa, joka ei liity pelkästään sähköiseen toimintaan.

Contents

BACKGROUND 1

METHODS..... 3

Materials 3

Human induced pluripotent stem cell culture 4

Cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells..... 5

Immunofluorescence staining 5

Proliferation experiments..... 6

Exposure to mechanical stretching..... 7

RNA Isolation and qRT-PCR..... 7

Data analysis 8

RESULTS 8

Proliferation potential of patient-specific hiPSC-CMs 8

Localization and expression of Na_v1.5 in cardiomyocytes 10

Exposure to mechanical stretching..... 11

DISCUSSION 11

CONCLUSIONS 16

REFERENCES 17

ANNEXES 19

Annex PROV-002A Literature review 19

Background

Left ventricular noncompaction cardiomyopathy (LVNC) is a congenital cause of cardiomyopathy with characteristic feature of meshwork-like myocardial fibers called trabeculations in the left ventricle and deep intertrabecular recesses that predispose patients to cardiac complications such as heart failure, thromboembolic events, conduction defects and sudden cardiac death^{1,2}. In LVNC, the myocardial layers in the left ventricle differ from healthy individuals – the epicardial layer is thin and compacted whereas endocardial layer is thick and sponge-like^{1,3}. There is still controversy about the classification of LVNC and whether it is an individual form of cardiomyopathy, or a morphological trait shared by several cardiomyopathies. American Heart Association classifies LVNC as primary genetic cardiomyopathy, while European Society of Cardiology and World Heart Organization as an unclassified cardiomyopathy^{4,5}. The lack of consensus among classification may be explained by the high variability of the disease phenotype among patients. Clinical manifestation of LVNC differs even among family members ranging from asymptomatic to severe heart failure which requires a heart transplantation^{2,6}. It is also challenging to distinguish physiological hypertrabeculation from LVNC. Hypertrabeculation of the left ventricles may be acquired because of increased cardiac loading conditions. This has been reported among highly trained athletes and pregnant women and this type of trabeculation is usually reversible^{7,8}. LVNC can also occur as isolated or non-isolated where the disease is accompanied with other cardiac disorders, genetic syndromes or neuromuscular diseases which suggests that there may be multiple possible etiologies for LVNC^{1,9}.

Mechanisms behind the development of LVNC are not fully understood. There is high similarity between embryonic hearts and the hearts of LVNC patients⁹. This has led to a hypothesis that LVNC results from a developmental arrest in the final phase of cardiac development in the myocardial compaction process⁹. The process of ventricular trabeculation is a normal part of embryonic development in which cardiomyocytes from endocardial layer form protrusions towards the ventricle lumen^{9,10}. Formation of trabeculation begins after 4th gestational week to increase the cardiac output by increasing myocardial mass and to provide oxygen and nutrients to the myocardium prior to the development of coronary vessels¹⁰. As the cardiac development proceeds, the trabeculations start to remodel in a process also

known as compaction. In compaction, the trabecular cells start to collapse towards the myocardial wall and merge in with the compact layer of myocardium, while intratrabecular recesses transform into capillaries^{9,10}. By the end of the compaction process, a thick and compact myocardium is developed.

The genetic background of LVNC is complex and over 40 gene mutations have been associated with the disease^{1,2}. The causal relationship of the mutations is yet to be established since the same mutation manifests differently among patients and a strong genotype-phenotype correlation has not been proven. Mutations have been reported in genes coding for dystrophin protein complex (*DTNA*), tafazzin encoding gene (*TAZ*), genes coding transcription factors NKX2.5 and TBX5 and sarcomere protein genes, such as β -myosin heavy chain (*MYH7*) just to name few^{1,11}. Additionally, *SCN5A*-gene encoding the α -subunit of cardiac voltage gated sodium channel Na_v1.5 has associated with LVNC-phenotype in a Finnish family (unpublished data). Mechanosensitive Na_v1.5 channel generates rapid influx of sodium ions producing cardiac action potential and therefore plays a crucial role maintaining normal cardiac electrophysiology¹². In cardiomyocyte membrane Na_v1.5 also interacts with several cellular proteins, which contribute to the normal function of the channel¹³. In addition to its crucial role in cardiac electrophysiology, previous studies have reported that *SCN5A* might have pivotal role in cardiac development and cell proliferation¹⁴⁻¹⁶. Mutations in *SCN5A* gene have been associated with various hereditary arrhythmia disorders, such as long QT-syndrome, Brugada syndrome and sick sinus syndrome resulting from gain- or loss-of-function mutations in the channel¹⁷. In a Japanese cohort of LVNC patients it was reported that significantly more *SCN5A* mutations were observed in patients with arrhythmias compared to those without¹⁸. Also, the emergence of hypertrabeculation in other arrhythmias associated with *SCN5A* mutations, such as Brugada syndrome, has been reported¹⁹

Direct link between *SCN5A*-mutations and how the mutations contribute to the development of LVNC is unknown. It has been suggested that chronic arrhythmias induce structural changes in the heart which would eventually leads to LVNC¹⁸. On the other hand, this does not support the hypothesis that LVNC would be caused by developmental arrest. Therefore, defects in cell cycle activity have been proposed to play part in the development of the disease. Abnormal regulation of growth signals such as transforming growth factor beta (TGFB) and NOTCH-

signaling have been proposed to have a part in LVNC development and both increase and decrease in proliferation that have been reported in human and animal studies of LVNC^{20–22}.

In this study, we used human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) from LVNC patient carrying the *SCN5A* P1891A mutation as a model to study possible cell cycling defects to elucidate possible pathological pathways behind LVNC. We used BrdU incorporation and staining with Ki67 and BrdU antibodies to investigate the proliferation capacity of patient-specific hiPSC-CMs. Previous work in the laboratory revealed that *SCN5A* P1891A mutation alters the interaction between Na_v1.5 and several interacting proteins which might affect the localization of channel. To investigate the Na_v1.5 channel we utilized specific antibodies and immunofluorescent staining to visualize protein expression on hiPSC-CMs. Finally, we studied how mechanical stretching affects the stress biomarkers in patient-specific hiPSC-CMs compared to control cells by exposing the cells to 24 hours of mechanical stretch and measured the expression of *NPPA* and *NPPB*, genes coding natriuretic peptide A and B, respectively.

Our results demonstrate that patient-specific hiPSC-CMs have altered proliferation potential compared to control cells and impaired tolerance for mechanical strain, which might contribute to the pathological development of LVNC.

Methods

Materials

All cell culture reagents were purchased from Gibco (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) unless stated otherwise. Matrigel[®] Matrix basement membrane was purchased from Corning (Bedford, MA, USA). Phosphate buffered saline (PBS) and trypsin-EDTA used in cardiomyocyte dissociation was prepared by the Media Kitchen (Institute of Biotechnology, University of Helsinki). p38 mitogen activated protein kinase inhibitor SB203580 used in proliferation experiments was purchased from Cell Signaling Technology. Metoprolol tartrate (3256) and small-molecule inhibitors Y-27632 (cat. no. 1254), CHIR99021 (cat. no. 4423) and Wnt-C59 (cat. no. 5148) were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). 5-

Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Triton X-100 used in cell permeabilization, and dimethyl sulfoxide used for dissolving the compounds was from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

The primary antibodies used in immunofluorescence staining were mouse monoclonal anti- α -actinin (A7811, Sigma Aldrich), rat monoclonal anti-BrdU (ab6326, Abcam), rabbit polyclonal anti-Ki-67 (ab15580, Abcam) and goat polyclonal anti-Nav1.5 (ab39992, Abcam). Alexa Fluor conjugated secondary antibodies Alexa Fluor 488 donkey anti-goat, Alexa Fluor 546 donkey anti-mouse and Alexa Fluor 674 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor goat anti-rat 647 and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse were purchased from Life Technologies (Oregon, USA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Sigma Aldrich.

NucleoSpin RNA kit used in RNA isolation was from Macherney-Nagel (Düren, Germany). Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit and LightCycler 480 Probes Master kit were from Roche Diagnostics. Taqman Gene Expression assays for *NPPA* (Rn00664637_g1), *NPPB* (Rn00580641_m1), *Actb* (Mm_00607939_s1) and *18S* (Hs99999901_s1) were purchased from Thermo Fisher Scientific.

Human induced pluripotent stem cell culture

Only human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) were used in this study. The iPS(IMR90)-4-cell line²³, used as a control line, was purchased from WiCell (Madison, WI, USA). Patient-specific hiPSCs, the UTA.14301.SCN5Ap-cells, were a kind gift from Prof. Katriina Aalto-Setälä from Tampere University. The cells were reprogrammed into hiPS-cells from fibroblasts obtained from LVNC patient carrying *SCN5A* P1891A-mutation. The reprogramming was performed in Tampere University.

The patient-specific hiPSCs and control hiPSCs were cultured in Essential 8 Medium (E8). Both cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % carbon dioxide (CO₂) on Matrigel (1:800)-coated 6-well plates. Fresh medium was replaced daily, and cells were passaged 1:15 or 1:20 approximately every four days. Cells were passaged when

approximately 60% confluency was reached, and cells were dissociated using EDTA and suspended to E8-medium supplemented with 10 μ M Y-27632.

Cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells

HiPSC-derived cardiomyocytes were produced from both hiPSC-lines with small molecule differentiation²⁴. Stem cells were cultured until approximately 95% confluent in E8. Differentiation was initiated by adding 7-8.5 μ M CHIR990210 (Day 0) in RPMI-medium supplemented with B27 without insulin (RB-). Cells were incubated with CHIR990210 for 24 to 48 hours and then fresh RB- was replaced. On third day of the differentiation, 2.5 μ M Wnt-C59 in RB- was added to the cells and incubated for 48 hours. Fresh RB- was added on days 5, 7 and 9 of the differentiation. Metabolic selection of cardiac myocytes was initiated at day 11 by switching the media to RPMI-medium without glucose supplemented with B27-supplement with insulin to purify the culture. Metabolic selection was continued until day 15. From day 15 onwards, the fully differentiated cardiomyocytes were grown in RPMI-medium supplemented with B27 with insulin (RB+). Differentiated hiPSC-CMs were replated using cell dissociation solution containing 40% Cell dissociation buffer, 40% RPMI-medium and 20% Trypsin-EDTA. The cells were diluted into desired density to RB+ medium supplemented with 10 μ M Y-27632. For cell proliferation assays and immunofluorescence staining, the cells were plated at density of 10 000 cells/well on Matrigel coated Cell Carrier Ultra 96-well plates (Perkin Elmer). For stretching experiments 600 000 to 700 000 cells/well were plated on Matrigel coated flexible bottomed 6-well elastomere plates (Bioflex, Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % carbon dioxide (CO₂) and fresh RB+ was changed every two to four days until the experiments were done.

Immunofluorescence staining

Patient-specific and control hiPSC-CMs were maintained on a 96-well plate at least until they were at least 30 days old before immunofluorescence staining was performed. The wells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature (rt). After fixation the wells were washed with 3 x 5 minutes with PBS. The wells were then permeabilized with 0,1% Triton X-

100 in PBS for 15 minutes at rt and washed twice with PBS. Unspecific binding of antibodies was blocked with 4% FBS in PBS for 45 minutes in rt. After blocking, the wells were incubated at 4°C overnight with primary antibody solutions for anti- α -actinin (1:1000) and anti-Nav1.5 (1:500) diluted in 4% FBS in PBS. The cells were washed 3 x 5 minutes with PBS and incubated at rt for 45 minutes with Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (1:250) and DAPI (1 μ g/ml) following 3 x 5 washes with PBS. Image acquisition of the immunostainings was carried out using ImageXpress Micro-Confocal Imaging system (Molecular Devices) using a 40x objective with water immersion. Brighter Nav_v1.5 fluorescence was observed in the perinuclear area of the control cells. The intensity of the Nav1.5 staining was analyzed using MetaXpress software. First, the cells were identified based on DAPI staining and only the cells positive for α -actinin staining were included in the analysis. DAPI staining was also utilized to define the nuclear area. Intensity of Nav_v1.5 fluorescence was measured from α -actinin positive cells in nucleus and 30 pixels around nucleus.

Proliferation experiments

To investigate the proliferation of patient-specific hiPSC-CMs, BrdU incorporation and immunostaining with BrdU- and Ki67-antibodies were utilized to determine basal and stimulated proliferation level. To stimulate proliferation, the cells were exposed to 5% FBS, 5 μ M GSK3-inhibitor CHIR990210, 1 μ M p38 MAP-kinase inhibitor SB203580 or combination of 5 μ M CHIR990210 and 1 μ M SB203580 for 24 hours together with 10 μ M BrdU. Timepoints for compound exposures were 21, 28, 35 and 42 days from the initiation of differentiation. After 24-h incubation with the compounds, the cells were stained as described in previous section, with an additional step of DNA was hydrolysis. To hydrolyze the DNA, the wells were incubated with 2 M hydrochloric acid (HCl) at rt for 30 minutes. HCl was neutralized with 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.5) for 30 minutes at rt and washed three times with PBS, followed by blocking of unspecific binding as described in the previous section. After blocking, the wells were incubated with primary antibody solutions for BrdU (1:250), Ki67 (1:500) and α -actinin (1:500) in 4% FBS in PBS for 60 minutes at 300 rpm and rt and the staining was continued as described in previous section. Image acquisition of the 96-well plates was carried out using ImageXpress Micro High-Content Imaging system (Molecular Devices) using a 10x objective. Analysis from the obtained images was performed using MetaXpress software. For

quantification of BrdU- and Ki67-positive CMs, the cell nuclei were identified by DAPI staining. We only wanted to investigate the proliferative capacity of cardiomyocytes. Therefore, we utilized α -actinin staining as a marker for cardiomyocytes. We included only α -actinin positive nuclei to the analysis. The threshold for BrdU- and Ki67-positive CMs were set manually by comparing the intensity to secondary antibody control and the threshold was set individually for each plate to adjust variations in staining intensity between different plates. Images were analyzed by using cell counting feature of the software to first identify the cell count of cardiomyocytes followed by counting the cell count of BrdU- and Ki67-positive cardiomyocytes from each treatment group.

Exposure to mechanical stretching

hiPSC-CMs were cultured until at least 30 days old in flexible bottomed 6-well elastomere plates (Bioflex, Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA) precoated with 1:50 matrigel and exposed to cyclic mechanical stretch (0.5 Hz, 10–20% elongation) mimicking the pumping of human heart with Flexcell® FX-5000 machinery (Flexcell International Corp., Burlington, NC) as described by Välimäki et al. (2017)²⁵. Before initiating the stretching, cells were exposed to 10 μ M metoprolol tartrate or plain medium and incubated for 10-15 minutes at 37 °C. The stretching was continued for 24 hours whereas control plates were incubated in identical conditions without exposure to stretching.

RNA Isolation and qRT-PCR

Total RNA from 24 hours stretched patient-specific hiPSC-CMs and control hiPSC-CMs was isolated using NucleoSpin RNA Isolation Kit protocol, according to the manufacturer's specifications. RNA concentration was measured using NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fischer) and reverse transcribed to cDNA using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was amplified using random hexamer primers from the kit and MJ Mini Personal thermal cycler (Bio-Rad) with 10-minute incubation at 25 °C, 60-minute incubation at 50°C and finally 5 minute-incubation at 85°C to activate the reverse transcriptase.

Quantitative real time PCR (qRT-PCR) was performed in 384-well format using Taqman expression assay, Roche LightCycler 480 Probes Master Mix and Roche LightCycler 480 Real-time PCR Machine. Average values of technical triplicates were used in the analysis. The mRNA expression of *NPPA* and *NPPB* were analyzed by the $\Delta\Delta C_t$ method. In this method, the quantification cycle (C_q) values of the genes of interest were normalized to the average of the C_q values of housekeeping genes *Actb* and *18S* of the same sample. Then, the ΔC_q values of genes of interest were normalized to the ΔC_q values of control sample, that were the unstretched samples. The negative control, a sample without DNA, was used to confirm the absence of contamination with foreign DNA in the PCR experiment.

Data analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics Software 27. Data from proliferation experiments and immunofluorescence staining were used in non-normalized form, data from stretching experiment was normalized to the unstretched samples. For proliferation experiments the statistical significance was analyzed with Randomized Block ANOVA followed by Tukey's post hoc test. The results from immunofluorescent staining of $Na_v1.5$ and α -actinin was analyzed with independent sample T-test. Differences with P values < 0.05 were considered statistically significant. Due to time constraints, only two repetitions of stretching experiments were carried out, and therefore statistical analysis was not applicable.

Results

Proliferation potential of patient-specific hiPSC-CMs

We used patient-specific hiPSC-derived cardiomyocytes to study the pathological background of LVNC by investigating the proliferation of patient-specific hiPSC-CMs. We used BrdU incorporation and immunostaining with BrdU- and Ki67-antibodies to determine basal and stimulated proliferation level. To stimulate proliferation, we exposed the cells to 5% FBS, 5 μ M CHIR99210, 1 μ M SB203580 or the combination of 5 μ M CHIR99210 and 1 μ M SB203580 for 24 hours and stained the cells with cell cycle specific antibodies, α -actinin and DAPI.

According to our observation the patient-specific hiPSC-CMs possess a prolonged proliferation capacity compared to control hiPSC-CMs. The proliferation potential decreases in control cells as the timepoints progressed, while in patient-specific cardiomyocytes it increases again in the last timepoint measured by BrdU-incorporation and staining (figure 1a-b). Similar trend was observed with Ki67 staining of cardiomyocyte but not as drastically as with BrdU-positive cardiomyocytes (figure 1c-d). The same proliferation pattern was seen in both basal and stimulated proliferation. The patient-specific hiPSC-CMs did not respond as readily to the tested compounds as control hiPSC-CMs and only the combination of 5 μ M CHIR990210 and 1 μ M SB203580 was effective to stimulate proliferation over basal level in patient-specific hiPSC-CMs, whereas in control cells also CHIR990210 alone increased the number of BrdU-positive cardiomyocytes above basal level.

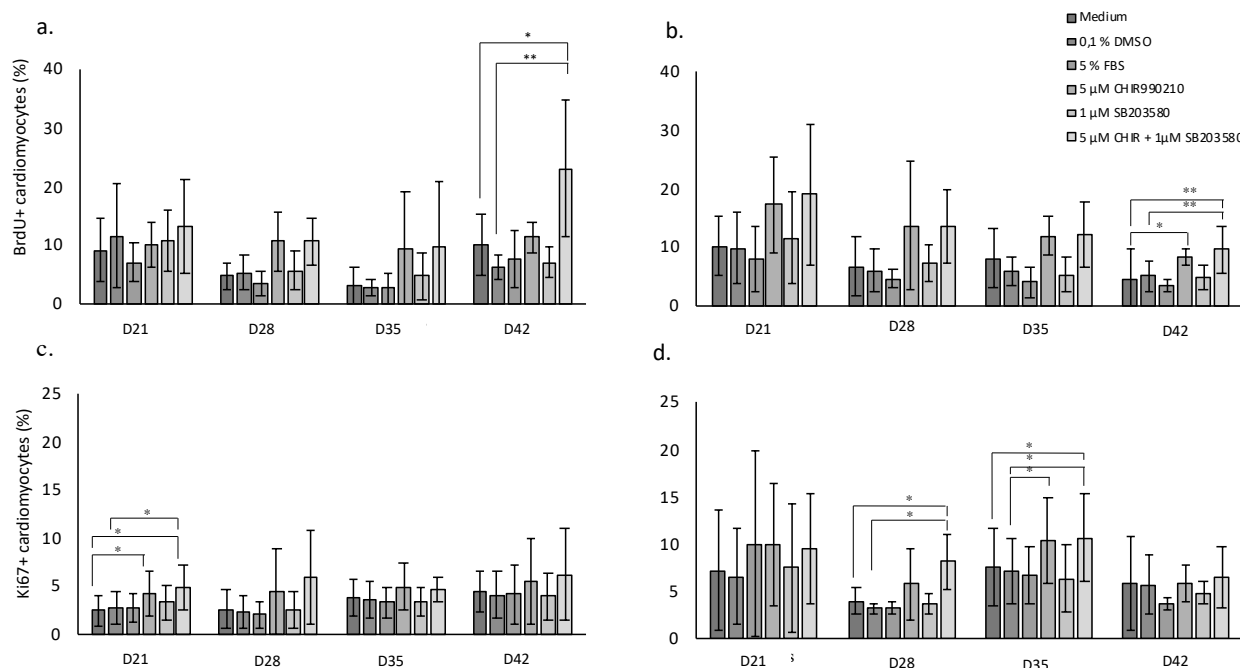


Figure 1. Proliferation potential of patient-specific hiPSC-CMs carrying P1891A mutation

a-d.) Basal and stimulated proliferation of patient-specific hiPSC-CMs and control hiPSC-CMs after 21, 28, 35 and 42 days from the commencement of differentiation. On the previous day of the timepoint, cells were exposed to 5% FBS, 5 μ M CHIR99210, 1 μ M SB203580 and the combination of 5 μ M CHIR990210 and 1 μ M SB203580 together with 1 μ M BrdU for 24 hours following a staining with BrdU-, Ki67- and α -actinin- antibodies and DAPI. Percentage of BrdU-positive patient-specific hiPSC-CMs (**a.**) and control hiPSC-CMs (**b.**). Percentage of Ki67-positive patient-specific hiPSC-CMs (**c.**) and control hiPSC-CMs (**d.**). Results are displayed as average percentages of three independent experiments and error bars display standard deviation (n=3, mean \pm SD, * p < 0.05 ** p < 0.01).

Localization and expression of Nav1.5 in cardiomyocytes

Nav_v1.5 sodium channel expression and cellular localization in hiPSC-CMs was studied using immunofluorescence staining. Nav_v1.5 co-localized with α -actinin in both cell lines and the overall localization pattern of Nav_v1.5 were similar in the two cell lines (figure 2a). In control cells, highly fluorescent spots were observed in nuclear area of Nav_v1.5 staining by visual inspection, which was not seen in patient-specific cells. We imaged the cells with 40x objective and analyzed the intensity of the Nav_v1.5 staining in nucleus and 30 pixels around nucleus. No differences were observed in intensity of Nav_v1.5 staining in nucleus and perinuclear between the patient-specific hiPSC-CMs and control cells, as displayed in figure 2b.

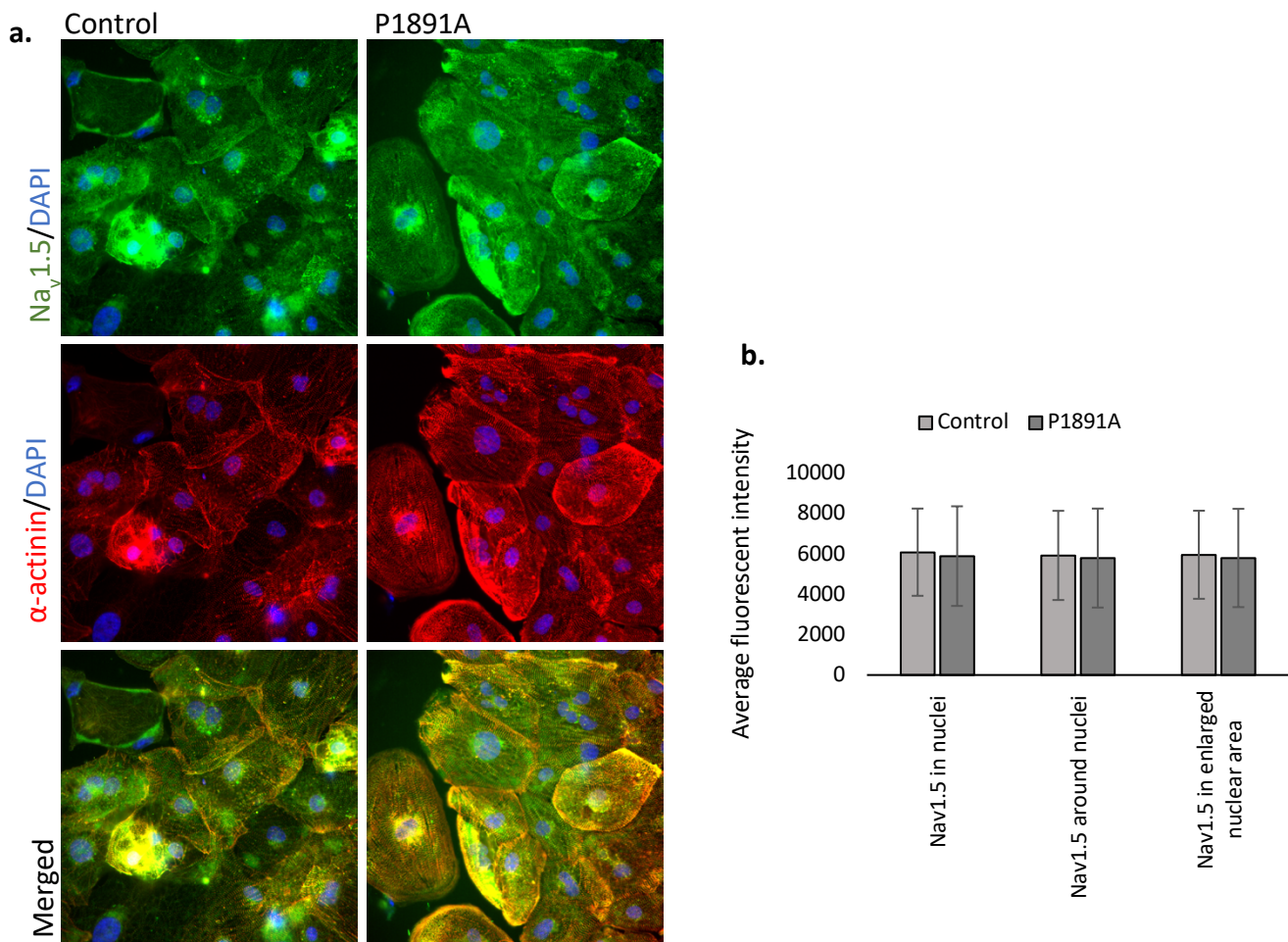


Figure 2. Localization and expression of Nav1.5 in patient was investigated in over 30 days old hiPSC-CMs. **a)** Patient-specific and control hiPSC-CMs stained with anti-Nav_v1.5, anti- α -actinin and DAPI. Image acquisition was performed with 40x objective with water immersion. **b)** Bar graphs representing average intensity of Nav_v1.5 fluorescence in nucleus and 30 pixels around nucleus. Nuclear area was identified based on DAPI fluorescence and α -actinin staining was used as a cardiomyocyte marker. Bar graph is displaying the results from three independent experiments (mean \pm SD, n=3).

Exposure to mechanical stretching

We also studied the effect of mechanical strain on patient-specific hiPSC-CMs. Mechanical stretching activates multiple signaling pathways contributing to hypertrophy, reactive oxygen species, apoptosis and fetal gene expression²⁶. We analyzed the stress response of patient-specific hiPSC-CMs by measuring the *NPPA* and *NPPB* gene expression, markers of cardiac stretch and mechanical overload, after 24 hours of stretching. The effect of beta blocker metoprolol tartrate was also studied at the concentration of 10 μ M. Mechanical stretching upregulated the *NPPB* expression of patient-specific hiPSC-CMs more than threefold compared to healthy control cells after 24 hours of stretching without metoprolol treatment. Metoprolol treatment prior the stretching had no effect on the stress response. No differences were observed in the *NPPA* expression between the cell lines and 24-hour stretch had no effect on the expression in either of the cell lines.

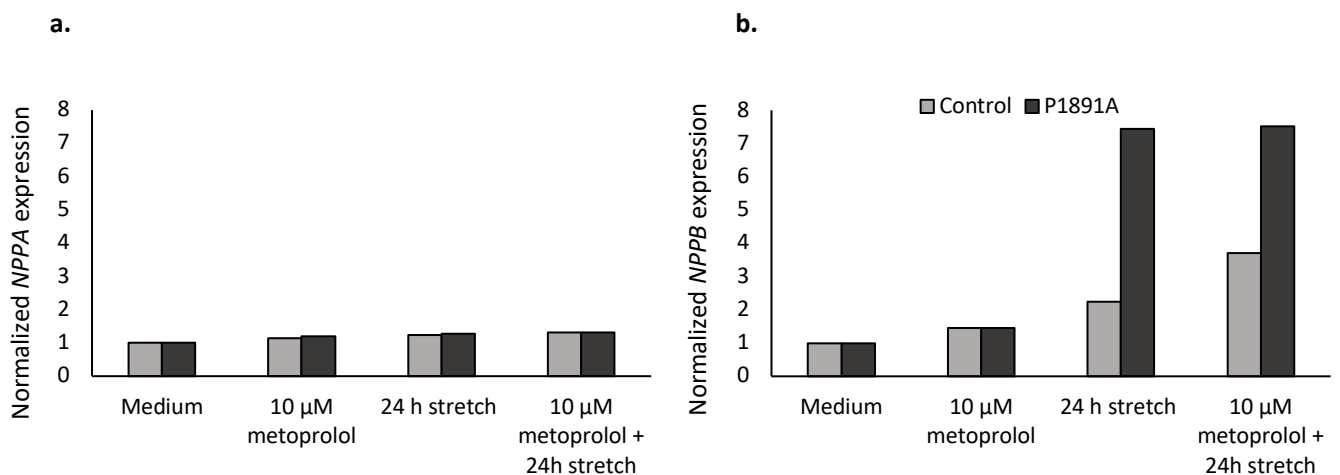


Figure 3. Effect of mechanical stretching to patient-specific hiPSC-CMs. Patient-specific hiPSC-CMs and control cells were exposed to 10 μ M metoprolol or plain medium for 10-15 minutes followed by 24 h stretching. Bar graphs represent the normalized *NPPA* (a) and *NPPB* (b) expression. The displayed results are from two independent experiments (n=2, mean).

Discussion

Dysfunctions in morphogenetic processes in cardiac development are likely to be involved in the pathophysiology of the LVNC as there is marked similarity between embryonic hearts and

hearts of LVNC patients^{9,10}. In addition to hypertrabeculation, it is typical for LVNC phenotype to have thinning of the compact area of myocardium, which might be the result of decreased proliferation of cardiomyocytes during cardiogenesis²⁷. On the other hand, the formation of prominent trabeculations might also be explained by increased proliferation²⁰. Whether LVNC develops because of increase or decrease of cardiomyocyte proliferation during development is not fully established. Most animal models of LVNC arise from decreased proliferation in the compacted myocardium or increased proliferation of trabeculations²⁸. Mutations in *SCN5A* gene coding voltage gated sodium channel $Na_v1.5$ is associated with LVNC phenotype in a Finnish family. The association of *SCN5A* mutation with LVNC has not been thoroughly investigated. $Na_v1.5$ channel plays a crucial role maintaining normal excitability of cardiomyocytes by generating rapid influx of sodium ions leading to cardiac action potential. Thus, even minor changes in *SCN5A* activity may have a significant influence on depolarization and repolarization of cardiomyocytes¹². There is also substantial evidence that *SCN5A* gene contributes to cardiac development and cardiomyocyte proliferation^{16,14,15}.

In this study, we investigated proliferation potential of hiPSC-CMs carrying *SCN5A* P1891A mutation by using patient-specific hiPSC-CMs obtained from Finnish LVNC patient. With the combination of staining with cell cycle specific proteins and high content analysis, we discovered that *SCN5A* mutant hiPSC-CMs have prolonged proliferation capacity compared to control cells as the highest percentages of BrdU- and Ki67-positive cardiomyocytes were observed in the last timepoint, at 42 days from the initiation on differentiation. In healthy control cells, the proliferation capacity decreased as the timepoints progressed. Differences between the two cell lines were also observed in their response to compounds stimulating proliferation. From the tested compounds only the combination of GSK3-inhibitor and p38 MAP-kinase inhibitor was able to increase the percentage of proliferating cells in patient-specific hiPSC-CMs.

The prolonged proliferation of cardiomyocytes during cardiac development could mean that the trabeculations remain proliferative for longer period and start to hypertrabeculate, which causes dysfunctions in the compaction process. Disturbances in cell proliferation and its association with LVNC has also been studied before. In addition to *SCN5A*, the effect of several other genes on cardiomyocyte proliferation has been studied in LVNC models^{21,29,28,30}. One

example is genes associated with NOTCH signaling pathway, which is an important pathway in ventricular development and cardiomyocyte differentiation. Luxán et al. (2013) reported the association of LVNC with inactivating mutations in human *MIB1* gene, which activates NOTCH signaling pathway. *MIB1* is responsible of ubiquitination and activation of NOTCH ligands DELTA and JAGGED²⁰. According to Luxán et al. *MIB1* mutation exhibited in reduced NOTCH activity and lead to 10-15 % increase in cardiomyocyte proliferation. Ventricles of *MIB1* mutants featured hallmarks of LVNC such as enlarged ventricle with noncompacted trabeculations³⁰. Other proteins contributing to cardiomyocyte proliferation and LVNC pathophysiology has been identified as well, such as 14-3-3ε, transforming growth factor β (TGF-β) and steroid receptor cofactors 1 and 3 (SRC1/3)^{21,29,28}. The 14-3-3 proteins are part of polypeptide family that have central role regulating cardiomyocyte proliferation²⁸. In previous studies it was observed that deletion of 14-3-3ε in mice led to decreased number cardiomyocytes²⁸. Mice with 14-3-3ε deletion also displayed characteristic features of LVNC such as hypertrabeculation, ventricular dilatation and thinner compact area of myocardium. Decreased proliferation of cardiomyocytes was also reported by Kodo et al. (2016). In their experiments, Kodo et al. used patient-specific hiPSC-CMs carrying *TBX20* mutation to investigate the proliferation capacity of hiPSC-derived cardiomyocytes. In addition to regulation of TGF-β1, *TBX20* interacts with other transcription factors pivotal in cardiac development, such as *NKX2.5* and *GATA4*²¹.

There is also substantial evidence that *SCN5A* gene contributes to cardiac development, in addition to its functions regulating electrical activity^{16,14,15}. Animal studies have shown that homozygous mutations in the *SCN5A* gene impair cardiac development independent of depolarizing sodium current. Some homozygous *SCN5A* mutations have also been demonstrated to be lethal as mice embryos carrying homozygous *Scn5a-1798insD*^{-/-} mutation die at early developmental stages, around embryonic day (E) 10.5¹⁶. Marchal et al. (2020) demonstrated that sodium channels are closed during the early development and sodium channel blocker tetrodotoxin had no effect on heart rate or ventricular beat activation before E10.5. Yet, according to their studies, embryonic murine hearts carrying homozygous mutations were significantly smaller in size already on E9.5 compared to wildtype. This suggests that normal function of *SCN5A* is essential for cardiac development through mechanisms which do not contribute to electrical activity. Similar results have been reported

with studies made with zebrafish¹⁴. Bennett et al. (2013) demonstrated that knockdown of *SCN5A* isoforms *scn5Laa* and *scn5Lab* in zebrafish decreases proliferation and differentiation of cardiomyocytes and reduces the expression of transcription factors *nkx2.5* and *gata4* crucial for cardiogenesis. These results suggest that voltage gated sodium channel is required for other critical pathways in early cardiac development.

LVNC patients typically show wide spectrum of clinical symptoms ranging from asymptomatic to severe heart failure. Therefore, we wanted to investigate the response to mechanical stretch using the patient-specific hiPSC-CMs. The cells were exposed to cyclic mechanical stretch for 24 hours followed by qPCR and the gene expression of *NPPA* and *NPPB* was quantified. According to our results, hiPSC-CMs carrying *SCN5A* mutation have impaired tolerance to mechanical strain which was observed by over threefold increase in expression of *NPPB* compared to control cells. Mutations in *SCN5A* gene have been associated with various cardiac disorders ranging from arrhythmia to cardiomyopathy. This diverse list of phenotypes caused by *SCN5A* mutations highlights the importance of the channel in normal physiology of heart and raises a question of other roles than regulation of electrical activity. Although majority of the research points to the fact that LVNC results from arrest in the myocardial compaction, it has also been suspected whether it could also be acquired. It has been suggested that chronic arrhythmias caused by loss- or gain-of-function mutations in *SCN5A* would induce structural changes in the heart and thus predispose to the myocardial remodeling and development of LVNC and other cardiomyopathies^{18,31}. In cardiomyocyte membranes $\text{Na}_v1.5$ is part of macromolecular complex where it interacts with multiple protein partners which might serve as enzymes, anchoring proteins and proteins that modulate the biophysical properties of the channel¹³. Proteins such as calmodulin, ankyrin, fibroblast growth factor 13 and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II are known to interact with $\text{Na}_v1.5$ in cardiomyocytes¹³. Changes in the components of the macromolecule complex can adversely affect the normal function of the sodium channel and its interacting proteins causing disturbances in the electrical function of the heart and cytoskeletal structure making the cells more sensitive to hypertrophic stimuli^{13,32,33}. Another interesting feature of $\text{Na}_v1.5$ channel is its mechanosensitivity, which means that mechanical stretch is able to modulate the kinetics of $\text{Na}_v1.5$ channel^{34,35}. In 2012 Beyder et al. studied the mechanosensitivity of $\text{Na}_v1.5$ channel in murine ventricular cardiac myocytes. In their experiments, they were able

show that mechanical stimulation increases the peak I_{Na} current and accelerates the activation and inactivation kinetics, which is regulated by the interacting proteins of $Na_v1.5$ channel. It has been suspected whether dysfunctions in $Na_v1.5$ mechanosensitivity caused by *SCN5A* mutations could contribute to arrhythmia disorders³⁶. Increased mechanosensitivity in the patient-specific hiPSC-CMs in our experiments might offer an explanation to the reduced tolerance to mechanical stretch.

In this study we used patient-specific hiPSC-CMs as a model of LVNC phenotype. Patient-specific hiPSC-CMs have been used to model various cardiomyopathies diseases *in vitro* as they display the molecular features of human heart in combination with the characteristics of the studied disease^{21,37}. As the patient-specific hiPSC-CMs are specific for certain genetic background, they have great potential in the development of personalized therapy. Nevertheless, utilizing hiPSC-CMs has its limitations as well. One of the major disadvantages is the lack of maturity of hiPSC-CMs, as hiPSC-CMs are more reminiscent of fetal myocardial cells in their phenotype. The lack of maturity has an influence to the structural, electrophysical and contractile properties of cultured hiPSC-CMs³⁸. Especially the electrophysical properties should be considered in this study as *SCN5A* has a major role in electrical functioning in cardiomyocytes. In human heart *SCN5A* is expressed in two isoforms – the “adult” form and the “neonatal” form, which differ in their biophysical properties³⁸. The amount of adult isoform increases as culture time of hiPSC-CMs is prolonged³⁸. The expression levels of the two isoforms might have an impact to the phenotypic features of the patient-specific hiPSC-CMs in this study as well. In this study we used reprogrammed hiPSCs obtained from only one individual. This presents another limitation in this study as we cannot be sure that the differences observed between the two cell lines are not the result of unspecific genetic variance. Therefore, it would gain valuable information to also use another disease line as a control. Also, to obtain reliable results from the proliferation and stress response of hiPSC-CMs carrying *SCN5A* mutation at least one more independent experiment should be made, since variations between independent experiments were relatively high.

Conclusions

In this study we investigated the phenotype of hiPSC-CMs obtained from LVNC patients carrying *SCN5A* mutation to elucidate possible pathophysiological pathways behind the disease. To our knowledge, the effect of *SCN5A* mutation to cardiomyocyte proliferation has not been studied with hiPSC-CMs before. Our study demonstrates that the proliferation of patient-specific hiPSC-CMs is prolonged compared to control cells, which might contribute to LVNC development as it has been suggested that increased proliferation would enhance the formation of trabeculations during ventricular development. Furthermore, it was also observed that 24 hours of mechanical stretching increased the hypertrophic gene expression more in the patient-specific hiPSC-CMs. The results give valuable information about the phenotypic changes caused by the *SCN5A* mutation but also raise questions about the other functions of the channel and its wide role in cardiomyocytes.

References

1. Finsterer J, Stöllberger C, Towbin JA. Left ventricular noncompaction cardiomyopathy: cardiac, neuromuscular, and genetic factors. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14:224-237. doi:10.1038/nrcardio.2016.207
2. Oechslin E, Jenni R. Left ventricular non-compaction revisited: a distinct phenotype with genetic heterogeneity? *Eur Heart J.* 2011;32:1446-1456.
3. Towbin JA, Lorts A, Jefferies JL. Left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *The Lancet.* 2015;386:813-825.
4. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J.* 2008;29:270-276.
5. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation.* 2006;113:1807-1816.
6. Ichida F. Left ventricular noncompaction – Risk stratification and genetic consideration –. *J Cardiol.* 2020;75:1-9.
7. Gati S, Chandra N, Bennett RL, et al. Increased left ventricular trabeculation in highly trained athletes: do we need more stringent criteria for the diagnosis of left ventricular non-compaction in athletes? *Heart.* 2013;99:401-408.
8. Gati S, Papadakis M, Papamichael ND, et al. Reversible De Novo Left Ventricular Trabeculations in Pregnant Women. *Circulation.* 2014;130:475-483.
9. Samsa LA, Yang B, Liu J. Embryonic cardiac chamber maturation: Trabeculation, conduction, and cardiomyocyte proliferation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013;163C:157-168.
10. Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec.* 2000;258:319-337.
11. Klaassen S, Probst S, Oechslin E, et al. Mutations in Sarcomere Protein Genes in Left Ventricular Noncompaction. *Circulation.* 2008;117:2893-2901.
12. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85:1205-1253.
13. Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:2-11.
14. Bennett J, Stroud D, Becker J, Roden D. Proliferation of embryonic cardiomyocytes in zebrafish requires the sodium channel scn5Lab. *Genes N Y N 2000.* 2013;51:562-574.

15. Chopra SS, Stroud DM, Watanabe H, et al. Voltage-gated sodium channels are required for heart development in zebrafish. *Circ Res*. 2010;106:1342-1350.
16. Marchal GA, Verkerk AO, Mohan RA, Wolswinkel R, Boukens BJD, Remme CA. The sodium channel NaV1.5 impacts on early murine embryonic cardiac development, structure and function in a non-electrogenic manner. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2020;230.
17. Remme CA. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol*. 2013;591:4099-4116.
18. Shan L, Makita N, Xing Y, et al. SCN5A variants in Japanese patients with left ventricular noncompaction and arrhythmia. *Mol Genet Metab*. 2008;93:468-474.
19. Park BE, Yang DH. A Case of Ventricular Noncompaction with Brugada-Like Electrocardiography Pattern. *Chonnam Med J*. 2020;56:208-209.
20. Luxán G, Casanova JC, Martínez-Poveda B, et al. Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nat Med*. 2013;19:193-201.
21. Kodo K, Ong S-G, Jahanbani F, et al. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF β signaling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *Nat Cell Biol*. 2016;18:1031-1042.
22. Uosaki H, Magadum A, Seo K, et al. Identification of Chemicals Inducing Cardiomyocyte Proliferation in Developmental Stage-Specific Manner With Pluripotent Stem Cells. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:624-633.
23. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 2007;318:1917-1920.
24. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11:855-860.
25. Välimäki MJ, Töllli MA, Kinnunen SM, et al. Discovery of Small Molecules Targeting the Synergy of Cardiac Transcription Factors GATA4 and NKX2-5. *J Med Chem*. 2017;60:7781-7798.
26. Ovchinnikova E, Hoes M, Ustyantsev K, et al. Modeling Human Cardiac Hypertrophy in Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Rep*. 2018;10:794-807.
27. Tian X, Li Y, He L, et al. Identification of a hybrid myocardial zone in the mammalian heart after birth. *Nat Commun*. 2017;8:87.
28. Kosaka Y, Cieslik KA, Li L, et al. 14-3-3 ϵ Plays a Role in Cardiac Ventricular Compaction by Regulating the Cardiomyocyte Cell Cycle. *Mol Cell Biol*. 2012;32:5089-5102.
29. Chen X, Qin L, Liu Z, Liao L, Martin JF, Xu J. Knockout of SRC-1 and SRC-3 in Mice Decreases Cardiomyocyte Proliferation and Causes a Noncompaction Cardiomyopathy Phenotype. *Int J Biol Sci*. 2015;11:1056-1072.

30. Lux G. Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nat Med.* 2013;19:13.
31. McNair William P., Ku Lisa, Taylor Matthew R.G., et al. SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder, and Arrhythmia. *Circulation.* 2004;110(15):2163-2167. doi:10.1161/01.CIR.0000144458.58660.BB
32. Abriel H. Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res.* 2007;76:381-389.
33. Abriel H, Kass RS. Regulation of the Voltage-Gated Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by Interacting Proteins. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:35-40.
34. Beyder A, Rae JL, Bernard C, Strege PR, Sachs F, Farrugia G. Mechanosensitivity of Nav1.5, a voltage-sensitive sodium channel. *J Physiol.* 2010;588(24):4969-4985.
35. Beyder A, Strege PR, Reyes S, et al. Ranolazine Decreases Mechanosensitivity of the Voltage-Gated Sodium Ion Channel NaV1.5. *Circulation.* 2012;125:2698-2706.
36. Strege PR, Mercado-Perez A, Mazzone A, et al. SCN5A mutation G615E results in NaV1.5 voltage-gated sodium channels with normal voltage-dependent function yet loss of mechanosensitivity. *Channels.* 2019;13:287-298.
37. Sun N, Yazawa M, Liu J, et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 2012;4
38. Veerman CC, Mengarelli I, Lodder EM, et al. Switch From Fetal to Adult SCN5A Isoform in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Unmasks the Cellular Phenotype of a Conduction Disease-Causing Mutation. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis.* 2017;6

Annexes

Annex PROV-002A Literature review

SCN5A-geenimutaatioiden vaikutus sydämen toiminnan taustalla

Julia Easton
Helsingin Yliopisto
Farmasian tiedekunta
Farmakologian ja lääkehoidon osasto

Helmikuu 2021

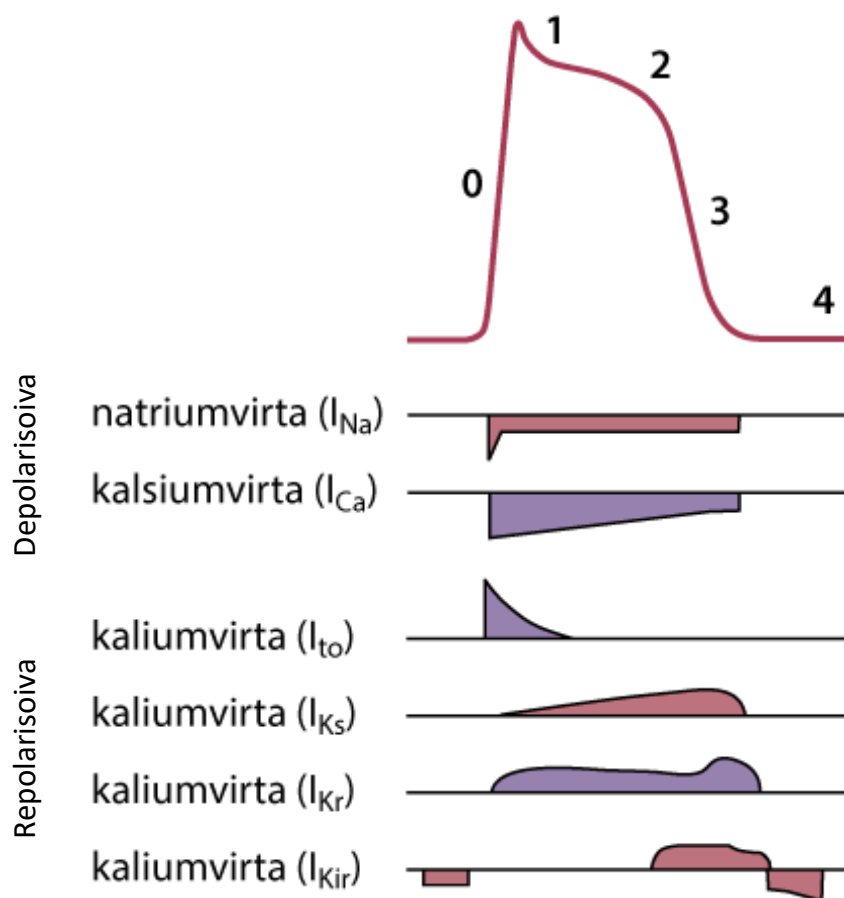
Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
2. Sydämen jänniteherkät natriumkanavat	3
2.1. SCN5A-geeni ja Na _v 1.5-kanavat.....	3
2.1.1. Nav1.5-kanavien rakenne	4
2.1.2. Na _v 1.5-kanavien toiminta	5
2.1.3. Na _v 1.5-ekspressio sydämessä.....	6
3. Na _v 1.5 toiminnan säätely	8
3.1. Na _v 1.5 toimintaa säätelevät proteiinit	8
3.1.1. β-alayksiköt.....	9
3.1.2. Ankyrin.....	9
3.1.3. Dystrofiini ja syntrofiini	10
3.1.4. Fibroblastikasvutekijät.....	10
3.1.5. Kalmoduliini	11
3.1.6. Ca ²⁺ /kalmoduliini-riippuvainen proteiinikinaasi II	12
3.1.7. 14-3-3η.....	12
3.2. Natriumkanavan merkitys sydämen kehityksessä	12
4. SCN5A-geenin mutaatiot.....	13
4.1. Pitkä QT-oireyhtymä.....	15
4.2. Brugada oireyhtymä	16
4.3. Laajentuva kardiomyopatia	17
4.4. Oireyhtymien päällekkäisyys	18
5. Trabekuloiva kardiomyopatia.....	19
5.1. LVNC:n non-kompaktiohypoteesi.....	20
5.2. LVNC:n geneettinen tausta.....	22
6. Na _v 1.5 lääkevaikutuskohteena.....	23
6.1. Natriumkanavan salpaajat SCN5A-mutaatioiden hoidossa	24
7. Kirjallisuusluettelo.....	27

1. Johdanto

Keskiverto ihmisen sydän sykkii yli 2 miljardia kertaa elämän aikana (Hund & Mohler, 2018). Sydämen syke on seurausta sähkökemiallisista muutoksista, joiden taustalla ovat jänniteherkkien ionikanavien välittämät natrium-, kalium- ja kalsiumvirrat sydänlihassolujen sisälle tai ulos soluista. Depolarisoivat natrium- ja kalsiumvirrat sekä repolarisoiva kaliumvirta aikaansaavat aktiopotentiaalien muodostuksen yksittäisissä soluissa, joista se leviää sydänlihassolujen välisten aukkoliitosten avulla läpi koko sydänlihaksen. Ionikanavien esiintymisessä on eroja sydämen eri osissa, mikä luo eroja aktiopotentiaalin voimakkuudessa sekä mahdollistaa aktiopotentiaalien yksisuuntaisen etenemisen läpi sydänlihaksen ja ylläpitää sydämen normaalia rytmiä (Nerbonne & Kass, 2005).

Ionikanavien luoma sydämen aktiopotentiaali voidaan jakaa neljään vaiheeseen (0-4) (kuva 1). Sydänlihassolut depolarisoituvat (vaihe 0), kun jänniteherkät natriumkanavat aukeavat ja aiheuttavat voimakkaan, lyhytaikaisen natriumvirran (I_{Na}) solun sisään. Depolarisaation seurauksena jänniteherkät kaliumkanavat aukeavat ja käynnistävät kaliumionien ulosvirtauksen (I_{To}) (vaihe 1), joka aikaansaa hetkellisen repolarisaation. Myös jännitteen säätelemät L-tyyppin kalsiumkanavat aukeavat ja sallivat kalsiumionien sisäänvirtauksen (I_{CaL}), joka käynnistää sydänlihaksen supistumisen. Samanaikainen repolarisoiva kaliumin ulosvirtaus ja depolarisoiva kalsiumin sisäänvirtaus johtavat aktiopotentiaalin tasannevaiheeseen (vaihe 2). Kaliumin ulosvirtaus voimistuu ja käynnistää repolarisaation (vaihe 3). Kolme eri kaliumvirtaa (I_{Ks} , I_{Kr} , I_{Kur}) palauttavat solun kalvojännitteen aktiopotentiaalia edeltävälle tasolle (Ruskoaho & Huikuri, 2018). Vasta kun solukalvo on palautunut takaisin lepopotentiaaliin (vaihe 4), on uuden aktiopotentiaalin mahdollista syntyä (Nerbonne & Kass, 2005).



Kuva 1. Eri ionivirtojen vaikutus sydämen aktiopotentiaalin depolarisaatioon ja repolarisaatioon. Muokattu Ruskoaho & Huikuri, 2018.

Sydämen jänniteherkillä ionikanavilla on ensiarvoinen rooli sydämen elektrofysiologiassa. Mutaatiot jänniteherkkää natriumkanavaa koodaavassa *SCN5A*-geeneissä on yhdistetty lukuisiin rytmihäiriöoireyhtymiin, kuten pitkään QT-oireyhtymään ja Brugada-oireyhtymään (Remme, 2013). Rytmihäiriöiden ohella on viitteitä siitä, että *SCN5A*-geenin mutaatiot ovat osallisia sydämen rakenteellisia muutoksia aiheuttavien sydänsairauksien taustalla. Jänniteherkkä natriumkanava on osa suurempaa makromolekyylikompleksia ja sen toimintaan vaikuttavat lukuisat solunsisäiset proteiinit, minkä vuoksi on mahdollista, että kanavalla kanava osallistuu myös muiden fysiologisten prosessien kuin sähköisen toiminnan säätelyyn.

Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastelen sydämen jänniteherkkää natriumkanavaa koodaavan *SCN5A*-geenin mutaatioiden vaikutusta sydämen toimintaan sekä mutaatioiden vaikutusta kanavan kanssa vuorovaikuttaviin proteiineihin.

2. Sydämen jänniteherkät natriumkanavat

Sydänlihassolujen solukalvo toimii luonnollisena esteenä varautuneiden ionien läpäisylle, jonka vuoksi ionikanavilla on keskeinen tehtävä eri ionivirtojen säätelyssä solun ulko- ja sisäpuolen välillä. Jänniteherkkien natriumkanavien välittämä nopean natriumin sisään virtauksen aikaansaama depolarisaatio etenee sydänlihassolusta toiseen ja saa aikaan sydämen sähkömekaanisen aktivaation synkronoidusti yhdessä muiden ionivirtojen avulla, joka johtaa sydämen rytmiseen pumppaustoimintaan. Keskeisen roolinsa vuoksi häiriöt natriumkanavan toiminnassa altistavat häiriöille sydämen sähköisessä toiminnassa (Nerbonne & Kass, 2005).

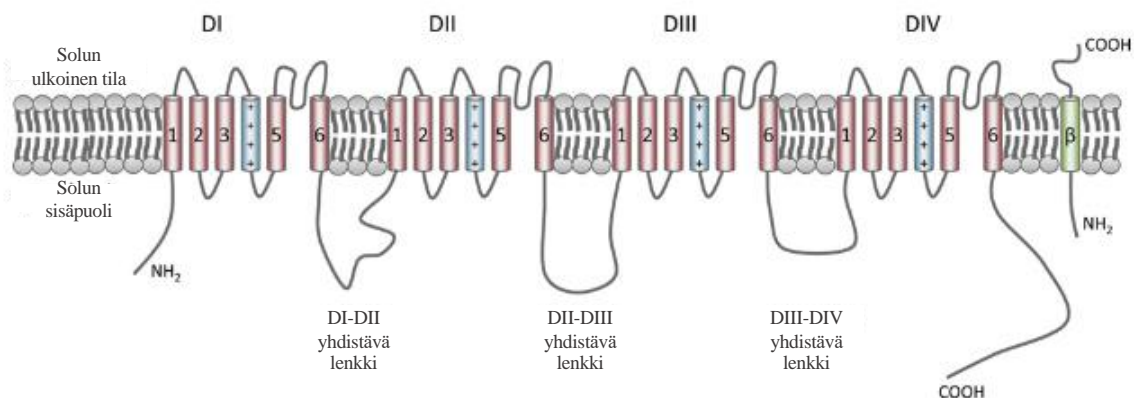
2.1. *SCN5A*-geeni ja $Na_v1.5$ -kanavat

Kromosomissa 3p21 sijaitseva *SCN5A*-geeni koodaa jänniteherkän natriumkanavan eli tyypin 5 jänniteherkän natriumkanavan ($Na_v1.5$) α -alayksikköä, joka on tärkein natriumkanava sydämessä. Nisäkkäillä tunnetaan yhteensä kymmenen (*SCN1A-SCN10A*) Na_v -kanavan α -alayksikköä koodaavaa geeniä, joiden koodaamat proteiini eroavat sekä rakenteeltaan että toiminnaltaan (DeMarco & Clancy, 2016). $Na_v1.5$:n ohella sydämessä esiintyy pienempinä pitoisuuksina muitakin jänniteherkkiä natriumkanavia, mutta niiden rooli sydämen toiminnan taustalla on tuntematon. *SCN5A*-geenistä tunnetaan kaksi eri isoformia: aikuisilla esiintyvä isoformi ja vastasyntyneillä ilmentyvä isoformi. Aikuisten isoformi esiintyy aikuisen ihmisen sydämessä, kun taas vastasynteen ekspressoivat omaa isoformiaan. Isoformien välillä on yhden eksonin ero jännitettä analysoivassa kanavan osassa. Ero vaikuttaa merkittävästi geenin tuottaman proteiinin toimintaan – neonataali isoformilla on hitaampi aktivoitumis- ja inaktivoitumisnopeus aikuisen isoformiin verrattuna (Onkal ym., 2008).

2.1.1. Nav1.5-kanavien rakenne

Jänniteherkät natriumkanavat koostuvat suuremmasta α -alaysiköstä sekä tyypillisesti kahdesta β -alaysiköstä. α -alaysiköt muodostavat kanavan natriumioneja kuljettavan osan sekä jänniteherkän osan, kun taas β -alaysiköt ovat kanavan toimintaa tukevia rakenteita.

SCN5A-geenin koodaama $\text{Na}_v1.5$ α -alaysikkö on suurikokoinen transmembraaninen proteiini (noin 230 kDa), joka koostuu neljästä homologisesta domeenista (DI-DIV) (Kuva 2). Jokainen domeeni sisältää kuusi solukalvon läpäisevää segmenttiä (S1-S6). Segmentit voidaan jakaa niiden toiminnan perusteella kahteen ryhmään: kanavan muodostavat segmentit ja jänniteherkät segmentit. Kaikkien neljän domeenin S4-segmentit ovat positiivisesti varautuneita ja toimivat kanavan jänniteherkkinä sensoreina, jotka aistivat kalvojännitteen muutoksia solukalvon depolarisoituessa. Segmentit S5 ja S6 sekä niitä yhdistävä P-silmukat muodostavat natriumioneja läpäisevän huokosen (Catterall, 2014). Solunsisäiset lenkit yhdistävät neljä domeenia yhtenäiseksi kokonaisuudeksi solukalvolla. Solukalvolla esiintyvässä kolmiulotteisessa rakenteessa kanavan jokaisen domeenin jänniteherkät segmentit sijoittuvat kanavan muodostavan osan ympärille symmetrisesti (Jiang ym., 2020).



Kuva 2. $\text{Na}_v1.5$ -kanavanproteiinin rakenne laskostumattomassa muodossaan. Muokattu Veerman ym. 2015.

2.1.2. Na_v1.5-kanavien toiminta

Na_v-kanavat reagoivat dynaamisesti solukalvolla tapahtuviin jännitemuutoksiin ja esiintyvät kolmessa eri konformaatioissa: auki, suljettu ja inaktivoitunut. Ainoastaan avoin konformaatio on kanavan sähköä johtava muoto (DeMarco & Clancy 2016). Na_v-kanavien välittämä nopea natriumvirta on vain hetkellinen ja aktivoitumisen jälkeen kanavat inaktivoituvat nopeasti (Hodgkin & Huxley, 1952).

Solukalvon depolarisoituessa kanavan jännitesensorina toimivassa S4-segmentissä tapahtuu konformaatiomuutos. S4-segmentti on keskeinen rakenne kanavan nopean aktivaation taustalla ja muutokset segmentin aminohapposekvenssiin heikentävät merkittävästi kanavan aktivaatiota (Stühmer ym. 1986). S4-segmentit ovat positiivisesti varautuneita ja solukalvon ollessa lepopotentiaalissa solunsisäinen negatiivinen varaus vetää S4-segmentin kanavan läpi kulkevaa positiivista varausta puoleensa (Catterall, 2014). Solun depolarisoituessa S4 segmenttiä vetävä elektrostaattinen voima heikkenee ja aiheuttaa konformaatiomuutokset segmentissä. Konformaatiomuutos S4-segmentissä saa aikaan liikkeen S5-S6-segmenteissä, joka johtaa transmembraanisen ioneja läpäisevän kanavan aukeamiseen (Catterall, 2014; Payandeh ym., 2011).

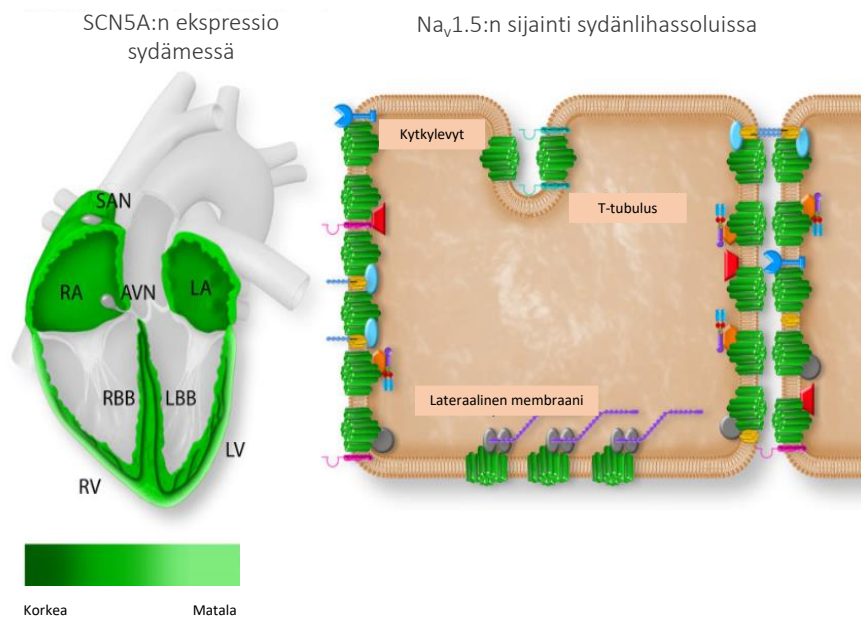
Jänniteherkät natriumkanavat inaktivoituvat nopeasti kanavan aukeamisen jälkeen – noin 1-2 millisekunnissa. Nopean inaktivaation avulla kanavan on mahdollista säädellä tehokkaasti depolarisaation kestoa ja ylläpitää tasaista sydämen pumppaustoimintaa. Inaktivaation kannalta keskeinen rakenne kanavaproteiinissa on domeenien III ja IV välinen solunsisäinen lenkki, joka muodostaa esteen ionivirralle depolarisaation pitkittyessä (Stühmer ym., 1989). Stühmer ym. (1989) havaitsivat, että domeenien välisen lenkin poistaminen kanavaproteiinista pidentää merkittävästi kanavan inaktivaatioon kuluvaan aikaan. Sittemmin on tarkentunut, että lenkin kolme hydrofobista aminohappoa (isoleusiini, fenyyialaniini ja metioniini) ovat välttämättömiä nopealle inaktivaatiolle (West ym., 1992). Tätä rakennetta kutsutaan myös IFM-alueeksi. Aktivaation tavoin myös inaktivaatioaika on vain muutamien millisekuntien pituinen, jonka jälkeen kanavan konformaatio palautuu alkuperäiseen tilaan, jossa kanava on

valmiina uuteen aktivoitumissykliin. Kanavan selektiivisyydestä natriumioneille vastaa segmenttien 5 ja 6 välisen neljän aminohapon (asparataatin, glutamaatin, lysiinin ja alaniinin) muodostama DEKA-motiivi (Lipkind & Fozzard, 2008).

Kiinnostavaa on, että 1% sydämen natriumkanavista jää auki tai aktivoituu ennenaikaisesti repolarisaation aikana. Näiden kanavien välittämää natriumvirtaa kutsutaan myöhäiseksi natriumvirraksi (*late current*, I_{NaL}). Sillä ei ole suurta merkitystä terveen sydämen kannalta, mutta sillä voi olla merkittävä rooli *SCN5A*-mutaatioiden yhteydessä (Wilde & Amin, 2018).

2.1.3. $Na_v1.5$ -ekspressio sydämessä

$Na_v1.5$:a ilmentyy lähes kauttaaltaan sydämessä, mutta ekspression tasossa on eroja eri rakenteiden välillä. Sinussolmukkeessa $Na_v1.5$:n esiintyminen painottuu solmukkeen reunaosiin (Rivaud ym., 2020). Eteiskammiosolmukkeessa $Na_v1.5$ -kanavia ei esiinny lainkaan, mikä mahdollistaa eteisten ja kammioden välille syntyvän viiveen impulssin etenemisessä. Sen sijaan AV-solmukkeessa, Purkinjen säikeissä ja Hisin kimpussa, joissa sähköimpulssin johtuminen on nopeinta, $Na_v1.5$:a esiintyy korkein pitoisuuksin (Kuva 3). Näiden rakenteiden ohella $Na_v1.5$ ekspressoituu kauttaaltaan eteisten ja kammioden supistuvissa sydänlihassoluissa.



Kuva 3. Na_v1.5:n alueellinen ja solunsisäinen jakautuminen sydämessä ja sydänlihassoluissa. Vasemmalla kuvattu Na_v1.5:n ilmentyminen sydämen eri osissa. Oikealla kuvattu Na_v1.5:n ilmentymistä solutasolla, jossa esiintyminen jakautuu alaryhmiin kytkeylevyillä, T-tubuluksissa ja lateraalisella membraanilla. Sinussolmuke (SAN), oikea eteinen (RA), eteiskammiosolmuke (AVN), vasen eteinen (LA), eteiskammioikimpun oikea haara (RBB), eteiskammioikimpun vasen haara (LBB), oikea eteinen (RV), vasen eteinen (LV), kytkeylevyt (ID), lateraalinen membraani (LM). Muokattu Rivaud ym., 2020.

Na_v1.5:n esiintymistä sydänlihassoluissa on selvitetty myös solutasolla. Na_v1.5 esiintyy sydänlihassoluissa kolmena alaryhmänä: kytkeylevyillä, lateraalisella membraanilla sekä T-tubuluksissa (kuva 2.). Na_v1.5:n toiminnassa alaryhmien välillä on eroja biofysikaalisissa ominaisuuksissa ja kanavan kanssa vuorovaikuttavien proteiinien kirjossa. Kytkeylevyt, jotka ovat sydänlihassolujen välisten solukalvojen muodostamia levymäisiä rakenteita, sisältävät runsaasti aukkoliitoksia, joiden ansiosta sähköiset impulssit kulkevat tehokkaasti solusta toiseen (Mohler ym., 2004). Kytkeylevyillä sijaitsevat natriumkanavat aikaansaavat suurempia natriumvirtoja muihin alaryhmiin verrattuna ja niillä on lyhyempi inaktivaatioaika lateraalisen membraanin alaryhmään verrattuna (Rivaud ym., 2020). Yksi Na_v1.5-populaatio sijaitsee puolestaan

sydänlihassolujen T-tubuluksissa, jotka ovat soluväliaineen ja sydänlihassolujen välisten vuorovaikutusten kannalta tärkeitä solujen kiinnittymiskohtia (Mohler ym., 2004).

3. Na_v1.5 toiminnan säätely

Sydämen natriumkanavat eivät toimi itsenäisinä rakenteina. Sen sijaan kanavaproteiini toimii elinkaarensa aikana vuorovaikutuksessa lukuisten solunsisäisten molekyylien kanssa. Solukalvolla ekspressoituessaan kanava muodostaa makromolekyylikomplekseja yhdessä solunsisäisten proteiinien, nukleiinihappojen, hiilihydraattien ja lipidien kanssa, jotka osallistuvat kanavan toiminnan säätelyyn eri tavoin (Abriel, 2010; Maltsev ym., 2008). Kanavan toiminnan kannalta keskeisimpiä vuorovaikutuskohteita ovat erilaiset proteiinit (Iqbal & Lemmens-Gruber, 2019). Tässä kappaleessa esittelen keskeisiä Na_v1.5:n kanssa vuorovaikuttavia proteiineja sekä niiden merkitystä kanavan toiminnassa. Tämän ohella sivuan lyhyesti, mitä muita rooleja *SCN5A*-geenin toiminnalla voi olla sydämessä sähköisen toiminnan säätelyn ohella.

3.1. Na_v1.5 toimintaa säätelevät proteiinit

Kanavan kanssa vuorovaikuttavat proteiinit säätelevät kanavaproteiinien kuljetusta solumembraaneille, solun sisäistä lokalisaatiota, ionikanavan aukeamista, sen natriumionien läpäisyä sekä kanavan hajoamista. Vuorovaikuttavien proteiinien joukkoon kuuluu soluntukirangan proteiineja, jotka ankkuroivat kanavan osaksi plasmamembraania sekä entsyymejä, jotka aikaansaavat post-translacionaalisia modifikaatioita kanavaan (Abriel, 2010). Na_v1.5 lokalisoituu sydänlihassoluissa kytkylevyillä, lateraalisella membraanilla ja T-tubuluksissa.

Na_v1.5 toimintaan vuorovaikuttavissa proteiineissa on eroja sijainnin mukaan (Shy ym., 2013). Muutokset vuorovaikuttavissa proteiineissa selittävät osittain eroja Na_v1.5-populaatioiden välisissä eroissa natriumvirran voimakkuudessa. Tarkkaa syytä sijaintien välisille eroille proteiinivuorovaikutuksessa ei tiedetä, mutta viittaisi se kuitenkin siihen,

että natriumkanavat ovat eri tavoin säädeltyjä eri alueilla. Kytkylevyillä $\text{Na}_v1.5$:n läheisyydessä toimii muun muassa ankyrin-G, kalsium/kalmoduliini riippuvainen proteiinikinaasi II (CaMKII), kun taas lateraalaisella membraanilla keskeinen vuorovaikuttava proteiini kanavan kanssa on syntrofiini (Rivaud ym., 2020). Proteiinien vuorovaikutuksen toiminnallista merkitystä korostaa se, että vuorovaikutusta estävät mutaatiot eri proteiineja koodaavissa geneissä tai *SCN5A*-geenissä on liitetty natriumkanavan toimintahäiriöihin (Remme, 2013).

3.1.1. β -alayksiköt

Primäärisen α -alayksikön ohella $\text{Na}_v1.5$ -kanava sisältää yleensä kaksi β -alayksikköä, jotka tukevat kanavan toimintaa. Kaikkiaan β -alayksiköitä tunnetaan neljä, $\beta1$ - $\beta4$ (*SCN1B-SCN4B*), ja ne koostuvat yhdestä solukalvon läpäisevästä osasta ja sisältävät solunulkoisen immunoglobuliinidomeenin (IgG) (Isom, 2002). Kaikkia β -alayksiköitä esiintyy sydämessä ja β -alayksiköt jakautuvat alaryhmiin niiden solunsisäisen lokalisaation perusteella α -alayksikköjen tapaan. Alayksiköistä $\beta1$ ja $\beta2$ lokalisoituvat sydänlihaskalvon T-putkissa ja kytkylevyillä, $\beta3$ t-putkissa ja $\beta4$ kytkylevyillä (Meadows & Isom, 2005; Rook ym., 2012). β -alayksiköillä on useita kanavan toimintaan vaikuttavia tehtäviä. Ne säätelevät kanavan natriumvirran kinetiikkaa, kanavan ekspressiota plasmamembraanilla sekä vuorovaikuttavat kanavan toimintaan osallistuvien solunsisäisten proteiinien kanssa (Isom, 2002). β -alayksiköt osallistuvat myös sähköisen aktivaation säätelyyn moduloimalla natriumvirran voimakkuutta, kanavan jänniteherkkyyttä sekä aktivaatio- ja inaktivaatioaika (O'Malley & Isom, 2015).

3.1.2. Ankyrin

ANK3-geenin koodaama ankyrin-G on solunsisäinen säätelyproteiini, joka sitoutuu solukalvon proteiineihin ja yhdistää niitä osaksi solun tukirankaa (Abriel & Kass, 2005). Se vuorovaikuttaa myös $\text{Na}_v1.5$:n kanssa sitoutumalla kanavan domeeneja II ja III yhdistäviin solunsisäisiin lenkkeihin (Lemaillet ym., 2003). Mohler ym. (2004) kuvasivat Brugadan oireyhtymää aiheuttavan *SCN5A*-mutaatio E1053K:n muuttavan

kanavaproteiinin aminohappojärjestystä siten, että ankyrin-G:n sitoutuminen kanavaan estyy. Sitoutumisen esto heikensi tutkimuksen mukaan kanavan toimintaa vähentämällä kanavaproteiinin kuljetusta kytkylevyille. Samaan proteiiniperheeseen kuuluva Ankyrin-B (*ANK2*) vaikuttaa todennäköisesti myös Nav1.5:n toimintaan. Mutaatiot *ANK2*-geenissä on yhdistetty erilaisiin rytmihäiriöoireyhtymiin, mutta toistaiseksi suoraa yhteyttä natriumkanavan kanssa sydämessä ei olla pystytty osoittamaan (Abriel & Kass, 2005).

3.1.3. Dystrofiini ja syntrofiini

Dystrofiini on solunsisäinen proteiini, joka muodostaa komplekseja erilaisten solunsisäisten proteiinien kanssa ja yhdistää niitä osaksi solun tukirankaa. Dystrofiini vuorovaikuttaa Nav1.5:n kanssa lateraalilla membraanilla, jossa se säätelee kanavan ekspressiota ja toimintaa (Gavillet ym., 2006). Dystrofiini-proteiini-komplekseja tavataan sydänlihassolujen ohella myös luustolihaksissa (Abriel & Kass, 2005). Dystrofiinin ja Nav1.5:n muodostaman vuorovaikutuksen välittää α - ja β -syntrofiinit, jotka sisältävät rakenteessaan niin kutsutun PDZ-domeenin. PDZ-domeenit ovat konservoituneita alueita, jotka vuorovaikuttavat kohdeproteiinien C-terminaalien kanssa. C-terminaalien sisältävän PDZ-sitoutumiskohdan lisäksi myös Nav1.5:n N-terminaali sisältää todennäköisesti toisen sitoutumiskohdan syntrofiineille (Gavillet Bruno ym., 2006; Matamoros ym., 2016). Nav1.5-kanavien ekspressio lateraalilla membraanilla on osittain dystrofiinista riippuvaista. Dystrofiini-puutteellisilla hiirillä Nav1.5 proteiinin taso oli alhaisempi, mikä johti heikentyneeseen natriumvirtaan lateraalilla membraanilla (Gavillet Bruno ym., 2006).

3.1.4. Fibroblastikasvutekijät

Fibroblastikasvutekijät (fibroblast growth factors, FGF) ovat solunsisäisten signaalintiproteiinien perhe, jotka osallistuvat Nav-kanavien toiminnan säätelyyn sekä kehittyvässä sydämessä että hermosoluissa (Musa ym., 2015). FGF-perheen proteiineista FGF13 (FHF2) on voimakkaimmin ilmenetty hiirten sydänlihassoluissa,

joissa se säätelee Nav1.5:n sähköistä toimintaa kanavan C-terminaalien kautta. FGF13:n vaikutuksen esto täyskasvuisten hiirten primäärisydänlihassoluissa johti heikentyneeseen natriumvirtaan, muutti lepopotentiaalia hyperpolarisoituneemmaksi ja pidensi kanavan inaktivaatioaikaa (Wang ym., 2011, Yang ym., 2016). FGF13:n vaikutuksia on tutkittu myös transgeenisellä *Fhf2*-knock out hiirimallilla, jossa proteiinin esto johti pidentyneeseen QRS-kompleksin keston sekä lisäsi koe-eläinten alttiutta kammioperäisiin rytmihäiriöihin (Wang ym., 2017). FGF13:a tunnetaan useita isoformeja, joista FGF13S:lla on voimakkain vaikutus Nav1.5:n toimintaan (Yang ym., 2016). Ihmisen sydämessä FGF12 on voimakkaimmin ekspressoitu FGF-isoformeista ja sen affiniteetti Nav1.5:n on FGF13:a heikompi. Voi kuitenkin olla mahdollista, että vähäinenkin FGF13S:n lisääntynyt ekspressio ihmisellä aikaansaisi muutoksia kanavan toiminnassa (Yang ym., 2016). Kehittyvän sydämen ohella FGF:lla voi olla keskeinen rooli Nav1.5:n toiminnan säätelyssä täysikasvuisessa sydämessä.

3.1.5. Kalmoduliini

Nav1.5:n toiminnan säätelyyn osallistuu myös solunsisäinen kalsiumia sitova proteiini kalmoduliini (calmodulin, CaM). CaM toimii osana useita solunsisäisiä signaalinvälitysketjuja ja monet ionikanavat hyödyntävät CaM:a aistimaan solunsisäisen kalsiumin muutoksia. Nav-kanavaperheen kanavat sisältävät C-terminuksessaan spesifin sitoutumiskohdan CaM:lle, jota kutsutaan IQ-domeeniksi (Abrams ym., 2020). CaM:n sitoutumisen IQ-domeeniin on ehdotettu hillitsevän myöhäistä natriumvirtaa ja tehostavan kanavan inaktivaatiota (Yan ym., 2017). Joidenkin tutkimusten mukaan mutaatiot, jotka estävät CaM:n sitoutumisen domeeniinsa, voimistavat myöhäistä depolarisoivaa natriumvirtaa tai hidastavat kanavan inaktivaatiota altistaen erilaisille rytmihäiriöille, kuten pitkä QT-oireyhtymälle (Yan ym., 2017). On myös ehdotettu, että IQ-domeenin ohella CaM sitoutuisi domeeneja III-IV yhdistävään solunsisäiseen lenkkiin, joka vaikuttaisi myös kanavan inaktivaatioon (Johnson ym., 2019). CaM:n estoa on tutkittu transgeenisessä hiirimallissa (Abrams ym., 2020). Tutkimuksessa havaittiin, että koe-eläimillä ei ilmennyt muutoksia natriumkanavien toiminnassa ja tutkija epäilivät, että FGF13:n oli mahdollista kompensoida CaM:n estosta seuranneet muutokset

sydämen toiminnassa. CaM:n ja Na_v1.5:n vuorovaikutuksen fysiologinen merkitys on kuitenkin yhä huonosti ymmärretty.

3.1.6. Ca²⁺/kalmoduliini-riippuvainen proteiinikinaasi II

Ca²⁺/kalmoduliini-riippuvainen proteiinikinaasi (CaMKII) on seriini-/treoniinikinaasi, joka aktivoituu solun sisäisen kalsiumpitoisuuden muutoksista. CaMKII:a esiintyy neljä eri isoformia α , β , δ , ja γ , joista CaMKII δ on vallitseva isoformi sydämessä. CaMKII δ säätelee Na_v1.5:n toimintaa todennäköisesti kanavan fosforylaation kautta (Wagner ym., 2006). CaMKII δ -yliekspressio vaikuttaa Na_v1.5:n toimintaan monin eri tavoin. Yliekspressio muun muassa hidastaa kanavan nopeaa inaktivaatiota, voimistaa depolarisoivaa natriumvirtaa ja hidastaa kanavan uudelleen aktivoitumista, joka altistaa jälkidepolarisaatiolle (Abriel 2010; Wagner ym., 2006). CaMKII δ :n yliekspressio altistaakin erilaisille rytmihäiriöille ja sen pitoisuuden kasvua on raportoitu sydämen vajaatoiminnan yhteydessä. Osa vaikutuksista on käännettävissä CaMKII δ :n estolla ja tulevaisuudessa CaMKII δ voisikin olla kiinnostava lääkevaikutuksen kohde rytmihäiriöiden hoitoon (Abriel, 2010).

3.1.7. 14-3-3 η

14-3-3-proteiiniperheeseen kuuluvat proteiinit, kuten 14-3-3 η , ovat pieniä, 30 kDa:n kokoisia solunsisäisiä proteiineja. Ne osallistuvat useisiin solunsisäisiin signaalintiketjuihin, jotka säätelevät esimerkiksi solun kasvua, jakautumista, soluadheesiota, solujen erilaistumista, apoptoosia ja ionikanavien toimintaa. Proteiiniperheen isoformi 14-3-3 η vuorovaikuttaa kytkelyvyillä sijaitsevien Na_v1.5-kanavien kanssa (Allouis Marie ym., 2006).

3.2. Natriumkanavan merkitys sydämen kehityksessä

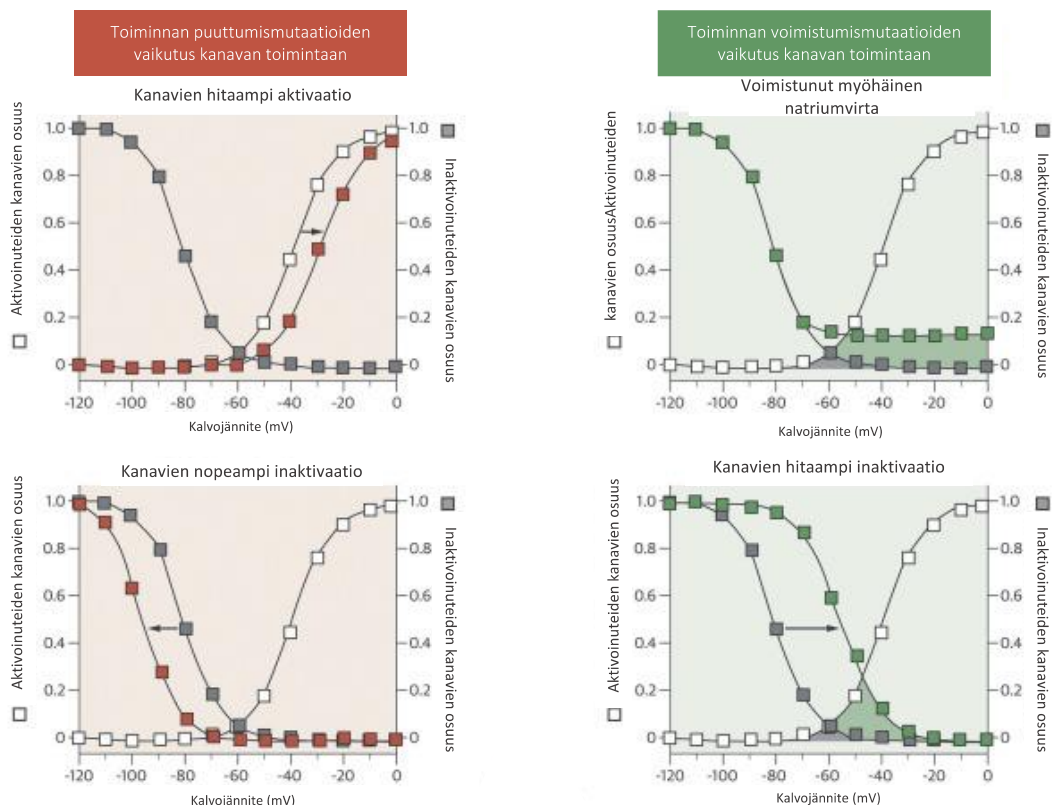
Monimutkaisen makromolekyylikompleksinsa kautta Na_v1.5:n toimintaa säätelee heterogeeninen joukko eri tavoin vaikuttavia proteiineja. Muutokset näissä

komponenteissa voivat vaikuttaa haitallisesti $Na_v1.5$ -kanavan toimintaan ja aiheuttaa sydämen sähköisen toiminnan häiriöitä, jotka ilmenevät esimerkiksi rytmihäiriöinä (Abriel, 2010). Toistaiseksi ei ole kuitenkaan varmaa, heikentävätkö *SCN5A*-geenin mutaatiot vastavuoroisesti solun tukirangan komponenttien toimintaa aiheuttaen muutoksia tukirangan eheydessä, jotka altistavat sydämen rakenteellisille muutoksille (Abriel, 2010). Tutkimusten mukaan homotsygootit mutaatiot *SCN5A*-geenissä aikaansaavat hiirten sikiöaikaisen kuoleman, mikä viittaisi geenin toiminnan olevan välttämätön sydämen kehityksen yhteydessä toistaiseksi tuntemattomien mekanismien välityksellä (Marchal ym., 2020; Papadatos ym., 2002). Hiiren sydän kehittyy alkeellisesta sydänputkesta sydämeksi alkionkehityksen toisella viikolla kahdeksannen ja kymmenennen päivän välissä (E8.5-E10.5). $Na_v1.5$:n välittämä natriumvirta käynnistyy kehityspäivästä 10.5 eteenpäin (Marchal ym., 2020). Marchal ym. (2020) havaitsivat homotsygootteja *SCN5A*-mutaatioita kantavilla hiirillä sydämen rakenteellisia häiriöitä jo kehityspäivänä 9.5. Tämä viittaisi *SCN5A*-geenin toiminnan vaikuttavan sydämen kehitykseen taustalla mekanismilla, joka ei liity sähköisen toiminnan säätelyyn (Marchal ym., 2020). Häiriöitä sydämen kehityksessä havaittiin *SCN5A*-geeniä vastaavan *Scn5aLab*:n osalta poistogeenisillä seeprakaloilla, johtuen heikentyneestä sydänlihassolujen erilaistumisesta ja proliferaatiosta (Bennett ym., 2013). Potilailla, jotka kantavat heterotsygootteja *SCN5A*-mutaatioita, on tavattu sähköisen toiminnan häiriöiden ohella sydämen rakenteellisia poikkeamia, kuten dilatoivaa kardiomyopatiaa, non-kompaktiokardiomyopatiaa, sydänlihassolujen hypertofiaa ja fibroosia. Sydämen sähköisen toiminnan säätelyn ohella $Na_v1.5$:lla on todennäköisesti toimintoja, joita ei vielä olla tunnistettu.

4. *SCN5A*-geenin mutaatiot

Mutaatiot *SCN5A*-geenissä on yhdistetty useisiin rytmihäiriöoireyhtymiin, kuten pitkään QT-oireyhtymään, Brugadaan oireyhtymään sekä sairaaseen sinus-oireyhtymään. Rytmihäiriöiden ohella mutaatiot on liitetty rakenteellisiin muutoksiin, kuten laajentuneeseen kardiomyopatiaan (Remme, 2013). *SCN5A*-geenivirheet saavat aikaan

biofysikaalisia muutoksia solukalvolla ja häiritsevät natriumvirran tasapainoa toiminnan voimistumis- tai toiminnan puuttumismutaatioiden kautta (kuva 4). Toiminnan voimistumismutaatiot lisäävät geenin koodaavan proteiinin toimintaa, mikä *SCN5A*:n kohdalla voimistaa depolarisoivaa natriumionivirtaa soluun. Toiminnan puuttumismutaatioissa $Na_v1.5$:n toiminnan vaikutus on heikentynyt johtuen kanavan virheellisestä toiminnasta tai proteiinin normaalia alhaisemmasta pitoisuudesta solumembraanilla (Wilde & Amin, 2018). *SCN5A*-geenimutaatioilla on myös tavattu oireyhtymien päällekkäisyyttä, joissa sama mutaatio ilmentää useita fenotyyppiä samanaikaisesti. *SCN5A*-geenin spesifisyyttä sydänlihassolujen toiminnassa korostaa se, että heterotsygootit mutaatiot geenissä voivat olla jopa kuolemaan johtavia eikä muiden rakenteiden kompensoitavissa (Jiang ym., 2020).



Kuva 4. Toiminnan puuttumismutaatioissa kanava vaatii aktivoituakseen tavallista voimakkaamman depolarisaation ja kanava voi inaktivoitua normaalia helpommin. Toiminnan voimistumismutaatioissa (oikealla) kanavien inaktivaatio on heikompaa, jolloin solukalvo depolarisoituu voimakkaammin (muokattu Wilde & Amin, 2018).

4.1. Pitkä QT-oireyhtymä

Yleisin rytmihäiriösairaus, jota mutaatiot *SCN5A*:ssa aiheuttavat on pitkä QT-oireyhtymä (LQTS) (Remme, 2013). LQTS on perinnöllinen rytmihäiriösairaus, jossa sydänlihassolujen ionikanavien toiminta on häiriintynyt lisäten potilaiden riskiä hengenvaarallisille rytmihäiriöille sydämen ollessa rakenteellisesti normaali. LQTS:n tyypillinen piirre on EKG:ssa nähtävä pitkä QT-väli. QT-ajan määrittää sydänlihassolujen aktiopotentiaali, jota säätelee solukalvon natrium-, kalium- ja kalsiumionivirtojen tarkoin säädelty tasapaino. QT-välin pidentyminen voi johtua joko voimistuneesta depolarisaatiosta tai heikentyneestä repolarisaatiosta. *SCN5A*-mutaatioiden kohdalla on kyse voimistuneesta depolarisoivasta natriumvirrasta soluun (Tan ym., 2003).

LQTS:ta esiintyy yhteensä 17 eri alatyyppeä, jotka edustavat fenotyypiltään sekä geneettiseltä taustaltaan erilaisia taudinkuvia (Wilde ym., 2018). *SCN5A*-geenivirheet aiheuttavat näistä pitkä QT-oireyhtymä tyyppi 3:a (LQT3), jonka osuus tautitapauksista on noin 5%-10% (Wilde ym., 2018). Mutaatiot LQT3:n taustalla ovat *SCN5A*-geenin toiminnan voimistumismutaatioita eli ne lisäävät geenin koodaaman proteiinin toimintaa. Valtaosa *SCN5A*-mutaatioista, jotka on yhdistetty LQT3:een häiritsevät natriumvirran nopeaa inaktivaatiota, joka mahdollistaa natriumkanavien uudelleen aukeamisen. Tämä voimistaa myöhäistä natriumvirtaa, viivyttää repolarisaation muodostusta ja pidentää aktiopotentiaalin kestoa (Remme, 2013)

LQT3:n ja muiden LQTS-alatyyppien välillä on eroja kliinisessä kuvassa. LQT3:n voi esiintyä potilailla piilevänä, sillä erityisesti *SCN5A*-mutaation aiheuttamassa alatyypissä rytmihäiriöitä esiintyy sydämen sykkeen ollessa alhainen, kuten levossa ja nukkuessa, kun taas LQT1 ja LQT2 ilmenevät herkemmin urheilun tai muun fyysisen aktiivisuuden parissa (Schwartz ym., 2001). LQTS:a sairastavat potilaat ovat myös suuremmassa riskissä synkopeekohtauksiin sekä kammioperäisille rytmihäiriöille, kuten kääntyvien kärkien takykardialle ja sydänperäiselle äkkikuolemalle (Remme & Bezzina, 2010). Kääntyvien kärkien takykardiassa repolarisoivien mekanismien heikentyessä tai viivästyessä natriumin depolarisoiva virtaus voi käynnistää sydänlihassoluissa

jälkidepolarisaation. LQT3:a on mahdollista hoitaa natriumkanavan salpaajilla, jotka lyhentävät QT-aikaa ja ehkäisevät rytmihäiriöiden mahdollisuutta (Wilde & Amin, 2018).

4.2. Brugada oireyhtymä

Mutaatiot *SCN5A*-geenissä on yhdistetty Brugada oireyhtymään, joka on harvinainen perinnöllinen sairaus, joka altistaa hengenvaaralliselle kammiovärinälle. Brugada oireyhtymän tyyppilöydös on ST-välin nousu heikentyneestä depolarisaatiosta johtuen.

Päinvastoin kuin LQT3:n, Brugada oireyhtymän taustalla olevat *SCN5A*-geenimutaatiot ovat tyyppillisesti toiminnan puutosmutaatioita, jotka voivat heikentää kanavaproteiinin kuljetusta solukalvolle tai muuttaa kanavan toimintaa. Brugada oireyhtymässä natriumionivirta on heikentynyt, joka johtaa lyhentyneeseen aktiopotentiaalin kestoon ja heikentyneeseen aktiopotentiaalin johtumiseen eteisissä ja kammioissa (Tan ym., 2003).

Tarkkaa mekanismia Brugada oireyhtymän ja sen aiheuttamaan kammiovärinään taustalla ei toistaiseksi olla pystytty selvittämään. Toiminnan menetysmutaatiot *SCN5A*:ssa oireyhtymän taustalla voivat johtaa siihen, että kanavan ekspressio sarkolemassa on heikentynyt, kanavaa ekspressoidaan toimimattomassa muodossa tai kanava ekspressoituu muodossa, jossa natriumivirta on heikentynyt (Wilde ym., 2018). Ehdotettu mekanismi Brugada oireyhtymän rytmihäiriöiden taustalla perustuu sydänlihaksen natriumvirran heikkenemiseen, joka lisää eroja aktiopotentiaalin kestossa kammioiden sydämen sisä- ja ulkokerroksen välillä (Antzelevitch ym., 2005). Epikardiumin ja endokardiumin välinen ero repolarisoivassa kaliumvirtauksessa tekee voimakkaammin repolarisoituneen epikardiumin herkemäksi mutaation vuoksi heikentyneelle natriumvirtaukselle. Heikentynyt depolarisoiva natriumvirtaus lyhentää aktiopotentiaalia epikardiumin soluissa, mikä aiheuttaa alueellisia eroja kalvopotentiaalissa altistaen rytmihäiriöille, kammiotakykardialle ja kammiovärinälle. Ennenaikainen repolarisaatio ilmenee erityisesti sydämen oikeassa kammiossa, jonka vuoksi ST-segmentin kupera nousu havaitaan V1-V3 rintakytkennoissä EKG:ssä.

Oireyhtymä on pitkään luokiteltu sähköisen toiminnan häiriöksi, mutta todellisuudessa Brugadan oireyhtymä voi olla osa kardiomyopatioiden kirjoa, sillä useilta oireyhtymää sairastavilta on raportoitu sydämen rakenteellisia poikkeavuuksia ja kammion tilavuuden muutoksia (Wilde & Amin, 2018).

Oireyhtymällä on vahva geneettinen tausta ja sairautta aiheuttavat geenimutaatiot ovat autosomaalisesti dominantisti periytyviä (Brugada ym., 2002). *SCN5A* oli ensimmäinen geeni, jonka osallisuus Brugadan oireyhtymään selvitettiin ja mutaatiot kyseisessä geenissä kattavat jopa 30% tapauksista. Tämän jälkeen oireyhtymään on yhdistetty yli 20 erilaista geeniä, joista osa koodaa $Na_v1.5$:n kanssa vuorovaikuttavia proteiineja (Wilde & Amin, 2018).

4.3. Laajentuva kardiomyopatia

Laajentuva kardiomyopatia (dilated cardiomyopathy, DCM) on sydänsairaus, jonka tyyppipiirteenä on sydämen vasemman kammion laajeneminen, joka johtaa seinämien ohenemiseen sekä supistuvuuden heikkenemiseen. DCM lisää merkittävästi riskiä sydänperäisiin äkkikuolemiin työikäisessä väestössä (Heliö & Kuusisto, 2016). DCM:aa kutsutaan idiopaattiseksi (idiopathic dilated cardiomyopathy, IDCM) tapauksissa, joissa syyt, kuten sepelvatimotauti, läppäviat, aineenvaihduntasairaudet ja toksiniit, ovat poissuljettuja taudin aiheuttajia. Yli 60 erilaista geeniä on yhdistetty IDCM:aan mukaan lukien mutaatiot *SCN5A*:ssa, mutta mekanismi mutaatioiden ja IDCM:n välillä on yhä tuntematon. Useat IDCM:aan yhdistetyistä geeneistä koodaavat sydänlihassolujen tukirangan proteiineja sekä proteiineja, jotka säätelevät sydänlihassolujen supistuvuutta (Amin ym., 2010). Mutaatiot geeneissä häiritsevät eri osien vuorovaikutusta solukalvolla, solun tukirangassa ja sarkomeereissa johtaen solunkalvon epästabiliuteen. Tästä seuraa sydänlihassolujen supistuvuuden heikkenemistä, solukuolemaa ja fibroosia (Amin ym., 2010). Vuonna 2004 McNair teki ryhmiseen löydöksen, joka haastaa osittain näitä patologisia mekanismeja raportoidessaan perheestä, jossa mutaatio *SCN5A*-geenissä aiheutti IDCM:n. Tämän jälkeen on raportoitu yli 20 erilaista *SCN5A*-mutaatiota, jotka liittyvät DCM:n.

Kolmenlaisia mutaatioita *SCN5A*:ssa on raportoitu DCM:n taustalla: toiminnan voimistumismutaatioita, toiminnan puutosmutaatioita ja näiden yhdistelmiä (Wilde & Amin, 2018). *SCN5A*-mutaatioiden IDCM:n johtavista mekanismeista on esitetty useita hypoteeseja. Useita DCM:a aiheuttavia *SCN5A*-mutaatioita ilmenee S3- ja S4-transmembraanisten segmenttien eri osissa (McNair ym., 2004). S4-segmentti on keskeinen rakenne kalvopotentialin muutosten havaitsemisessa ja on mahdollista, että tällä mekanismilla on yhteys DCM:n kehittymiseen (McNair ym., 2004). Enemmistö IDCM-potilaista ovat taipuvaisia erilaisille rytmihäiriöoireyhtymille ja on ehdotettu, että IDCM:n kehittyisikin kroonisten rytmihäiriöoireyhtymien, kuten LQT3:n ja Brugada oireyhtymän seurauksena (Amin ym., 2010). Toisaalta *SCN5A*-geenimutaatiosta johtuvan IDCM:n mekanismiksi on myös ehdotettu, että mutaatio lisäisi solunsisäisen natriumin pitoisuutta, joka aktivoisi kompensatorisesti Na^+/H^+ -tai $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -vaihtajaa. Tämä voisi laskea solunsisäistä pH:ta tai lisätä solunsisäisen kalsiuminpitoisuuden liian suureksi ja aiheuttaa häiriöitä sydänlihaksen supistuvuudessa, joka johtaisi sydämen patologiaan muutoksiin. $\text{Na}_v1.5$ vuorovaikuttaa useiden solun tukirangan proteiinien kanssa ja vaihtoehtoisen hypoteesin mukaan *SCN5A*-mutaatio estää vuorovaikutuksia proteiinein välillä, mikä häiritsisi solun tukirangan eheyttä ja aiheuttaisi rakenteellisia muutoksia sydänlihassoluissa. Nämä muutokset heikentäisivät sydänlihassolujen supistuvuutta ja loisivat pohjan DCM:n kehitykselle (Wilde & Amin, 2018).

4.4. Oireyhtymien päällekkäisyys

$\text{Na}_v1.5$ -kanavalla on keskeinen rooli sydämen sähköisessä toiminnassa ja muutokset kanavan toiminnassa saavat aikaan erilaisia muutoksia sydämen toiminnalle. Alun perin *SCN5A*-geenimutaatioiden aiheuttamien rytmihäiriöoireyhtymien uskottiin olevan erillisiä kliinisiä kokonaisuuksia, joilla on erilliset fenotyypilliset piirteet. Myöhemmin kuitenkin havaittiin, että saman *SCN5A*-mutaation oli mahdollista aikaansaada fenotyyppi, joka yhdisti piirteitä LQT3:sta, Brugada oireyhtymästä sekä johtumishäiriöistä. Eräs tällainen mutaatio on paljon tutkittu 1795insD-mutaatio (Tan ym., 2003). Yksityiskohtaisempi tutkimus molempia oireyhtymiä ilmentävistä

mutanteista paljasti, että ne aiheuttivat häiriöitä aktiopotenitaalin eri vaiheissa – aktiopotentiaalin 0-vaiheessa toiminnan puutosmutaatio on vallitsevassa roolissa, kun taas vaiheen 2-3 aikana ilmenee toiminnan voimistumismutaatiolle tyypillinen vahvistava toiminta (Wilde & Amin, 2018). Fenotyyppien päällekkäisyys tulee ottaa huomioon erityisesti lääkehoitoa suunniteltaessa, sillä lääkeaineet, joilla LQ3:a voidaan hoitaa, voivat pahentaa oireita Brugada-oireyhtymässä.

5. Trabekuloiva kardiomyopatia

Trabekuloiva kardiomyopatia (left ventricular non-compaction, LVNC) on sydänlihassairaus, jonka tyypillisenä piirteenä on vasemman kammion runsas kudosjuosteisuus eli trabekulaatio, joka muodostaa sormimaisia ulokkeita kammion luumenia kohti (Finsterer ym., 2017; Jenni ym., 2007). LVNC:ssa sydämen vasemmasta kammioista voidaan erottaa kaksi kerrosta: ohut ja tiivistynyt epikardiumi sekä paksu, sienimäinen endokardiumi. LVNC:n etiologiasta, patogeneesistä tai hoidosta ei ole yksimielisiä kriteereitä. AHA (American Heart Association) luokittelee LVNC:n perinnölliseksi kardiomyopatiaksi, kun taas ESC:n (European Society of Cardiology) mukaan kyseessä on luokittelematon kardiomyopatia.

LVNC voidaan luokitella usealla eri tavalla. Taudin alkamisajankohdan perusteella LVNC määritellään joko synnynnäiseksi tai hankituksi. Synnynnäinen LVNC ilmenee jo kohdussa, kun taas hankitun LVNC:n alkamisajankohta voi olla missä vaiheessa elämää tahansa. LVNC voidaan luokitella myös eristyneeksi ja eristymättömäksi sen perusteella. Eristymätön LVNC ilmenee muiden sydämen rakenteellisten poikkeavuuksien yhteydessä. LVNC:n kaltaista poikkeavaa trabekulaatiota on kuvattu myös laajentavan ja restriktiiviseen kardiomyopatiaan sekä neuromuskulaarisairauksiin liittyvänä (Finsterer ym., 2017).

LVNC:n luokittelussa voidaan myös hyödyntää oirekuvaa. LVNC:n taudinkuva on moninainen ja vaihtelee aikuisen oireettomuudesta hengenvaarallisiin prenataalisiin

ilmentymiin (Vanninen & Holmström, 2019). Oireilevassa LVNC:ssa ilmenee sydämen vajaatoiminnalle tyypillisiä oireita, kuten kammioperäisiä rytmihäiriöitä sekä tromboembolisia tapahtumia. Trabekkelien väliin jäävät poukamat altistavat trombinmuodostuksille erityisesti, jos vasemman kammion supistuminen on heikkoa. Vasen kammiot voi olla myös laajentunut ja supistuvuus heikentynyt. LVNC potilaiden sydämen hemodynamiikka voi olla myös restriktiivinen. Tämä tarkoittaa sitä, että sydämen supistumiskyky on säilynyt, mutta myötäävyys ja täytyminen on vajavaista, joka johtaa kammioiden paineen nousuun. Lapsipotilailla tavataan myös LVNC:n aaltoilevaa tyyppiä, jossa sydämessä voidaan havaita eri myopatioihin viittaavia rakenteellisia muutoksia (Finsterer ym., 2017). Näiden eri luokitteluiden taustalla on epävarmuus LVNC:n etiologiasta.

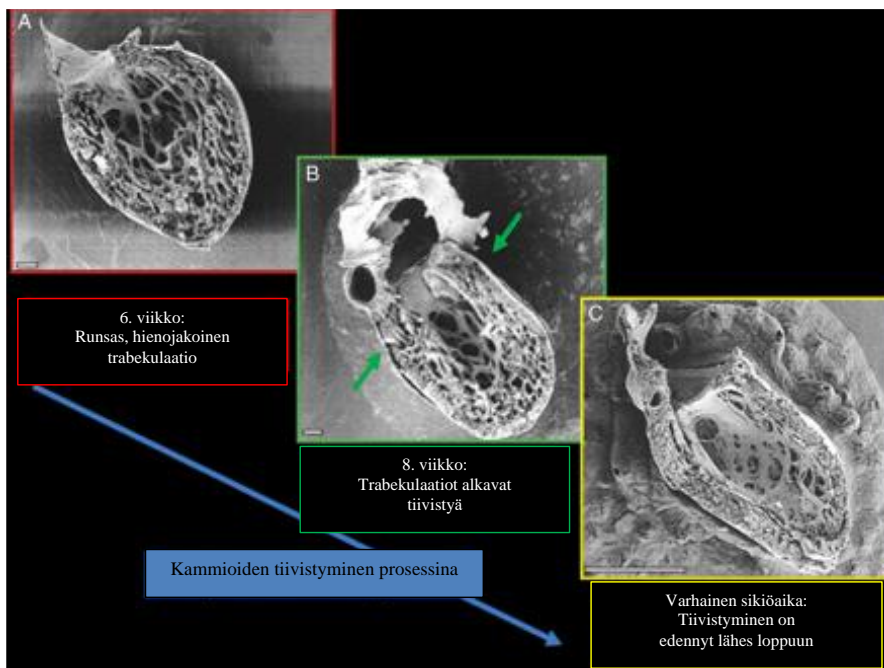
Taudin heterogeenisyyden vuoksi yksimielisyyttä LVNC:n diagnostisista kriteeteistä ei ole. Diagnostointi perustuu sydämen ultraäänitutkimukseen, kontrastialtraääneen sekä magneettikuvantamiseen. Sairauden diagnosoinnissa hyödynnetään paksun, trabekuloituneen osan sekä tiiviin epikardiumin massojen tai tilavuuksien suhdetta (Vanninen & Holmström, 2019). Vaikka kuvantamistekniikat, kuten sydämen kaikukuvaus ja magneettikuvantaminen, ovat helpottaneet sairauden diagnosointia, on sen esiintyvyys silti vähäistä (Wengrofsky ym., 2019)

5.1. LVNC:n non-kompaktiohypoteesi

LVNC:n etiologia on huonosti ymmärretty, mutta on ehdotettu, että kyseessä olisi sikiöaikainen kehityshäiriö. Niin kutsutun nonkompaktiohypoteesin mukaan LVNC:n taustalla oleva kehityshäiriö ilmeni kardiogeneesin viimeisessä vaiheessa, sydänlihaksen tiivistymisen yhteydessä, joka on osa kammioiden kehitystä (Finsterer ym., 2017). Alkionkehityksen aikana sydän on muodostunut löyhistä lihassäikeistä sekä solujen välisistä syvennyksistä, jotka yhdistävät sydänlihaksen kammion onteloon. Viidennen ja kahdeksannen raskausviikon välillä verkkomaisen rakenne alkaa hiljalleen tiivistyä epikardiumista endokardiumiin ja tyvestä kärkeen edeten. Jos tiivistyminen on

puutteellista, voi kammion seinämä jäädä poikkeavan trabekuloituneeksi, joka luo pohjan sydänsairauden kehittymiselle (Hussein ym., 2015).

Sydämen kehitys alkaa kolmannella sikiöviikolla, kun mesodermin kardiogeenisistä soluista kehittyvät sydänlihassolujen esisolut. Esisolut muodostavat sydänputken, jonka solujen erilaistumista sydänlihassoluiksi säätelee useat geneettiset ja humoraaliset tekijät (Finsterer ym., 2017). Sydänputki koostuu endoteelisolujen verhoamasta endokardiumista, sydänlihassolujen muodostamasta myokardiumista sekä kerrosten välisestä ekstrasellulaarisesta matriksista. Ennen kammioden kehitystä sydänputki alkaa kiertyä tarkoituksenaan luoda pohja sydämen tulevalle lohkojärjestelmälle.



Kuva 4. Kammioden tiivistymisprosessi käynnistyy raskausviikolla kahdeksan ja tiivistyminen on lähes täydellistä varhaiseen sikiöaikaan mennessä. Muokattu lähteestä Jenni ym., 2007.

Kiertymisen jälkeen sydänlihas alkaa paksuuntua ja endokardiaaliset sydänlihassolut muodostavat kohti luumenia työntyviä ulokkeita, eli trabekulaatioita, joiden ensisijainen tarkoitus on lisätä sydämen pinta-alaa sekä sydänlihassolujen massaa ennen sepelvaltimoiden kehitystä (Sedmera ym., 2000). Myokardiumin ulkokerros pysyy

kompaktina pohjana tulevalle tiivistymisprosessille. Trabekkelit laajenevat muodostaen verkkomaisen rakenteen kammion luumeniin. Kehityksen edetessä trabekulaatiot alkavat tiivistyä kompaktioksi kutsutussa prosessissa, jonka etenemistä on kuvattu kuvassa 4. Tarkkaa mekanismia kompaktion taustalla ei tunneta ja tapahtumaa on selitetty kahdella eri mekanismilla: tiiviin sydänlihaksen leviäminen trabekulaariseen kerrokseen tai trabekulaaristen solujen sulautuminen osaksi tiivistä kerrosta (Tian ym., 2017). Molemmissa malleissa tiivis subepikardiaalinen sydänlihas laajenee itsestään muodostaen yhä paksumman kammion seinämän sydämen kehityksen aikana. Ero mallien välillä on mekanismi, jolla trabekulaarinen osa muuttuu osaksi tiivistä sydänlihaksen seinämää. Joidenkin tutkimusten mukaan vaskulaarinen endoteliaalinen kasvutekijä A (VEGFA) tai angiopoietiini 1 laukaisivat tiivistymisprosessin (Finsterer ym., 2017). Kompaktion lopputuloksena on tiivis sydänlihas, joka on muodostunut kahdesta verrattain heterogeenisestä soluryhmästä – trabekuloituneista ja myöhemmin tiivistyneistä subendokardiaalisista soluista sekä subepikardiaalisesta sydänlihassoluista – jotka toimivat pohjana tiivistymisprosessissa. Häiriöt missä tahansa vaiheessa sydämen kammioiden kypsymistä, trabekulaatioissa ja kompaktiossa, voivat johtaa trabekulaatioiden jäämiseen osaksi sydämen pysyvää rakennetta ja estää oikeanlaisen tiiviin sydänlihaksen muodostumisen.

5.2. LVNC:n geneettinen tausta

LVNC:n geneettinen tausta on heterogeeninen ja yli 40 eri geenin mutaatioita on yhdistetty sairauteen (Finsterer ym., 2017). Siitä huolimatta sairauden ja geenimutaatioiden syy-yhteyttä ei ole täysin pystytty osoittamaan, sillä sama geenimutaatio aiheuttaa hyvin erilaisia fenotyyppisiä potilaiden välillä. Mutaatioita on löydetty esimerkiksi dystrofiini-perheen proteiineja koodavassa dystrobrevin-geenissä (*DTNA*) ja tafatsiinia koodaavassa *TAZ*-geenissä (*TAZ*) sekä NKX2.5 ja TBX5 transkriptiotekijöitä koodaavissa geneeissa (Finsterer ym., 2017). Valtaosalla LVNC-potilaista ilmenee sydämen rytmihäiriöitä, jotka eivät täysin selity näiden geenien mutaatioilla. Vahva korrelaatio potilaiden genotyypissä ja fenotyypissä on raportoitu ainoastaan *HCN4*-geenimutaatioissa. *HCN4*-geeni on tärkeässä roolissa

sinussolmukkeen spontaanien depolarisaatioiden säätelyssä. *SCN5A*-mutaatiot on myös yhdistetty alttiuteen sairastua LVNC:n. Vuonna 2008, Shan ym., havaitsivat LVNC-potilaskohortista useita *SCN5A*-geenivariantteja. *SCN5A*-geenivariantteja havaittiin merkittävästi enemmän niillä potilailla, joilla oli rytmihäiriöitä verrattuna niihin, joilla ei ollut. Suoraa yhteyttä *SCN5A*-geenivarianttien kausaalisuudesta LVNC:n syntyyn ei kuitenkaan pystytty osoittamaan. LVNC:n esiintymistä muiden *SCN5A*-mutaatioihin liittyvien rytmihäiriöiden, kuten Brugada-oireyhtymän yhteydessä on raportoitu (Park & Yang, 2020). Toistaiseksi ei ole tiedossa mekanisme, jolla mutaatiot *SCN5A*:ssa myötävaikuttavat LVNC:n syntyyn. On esitetty, että krooniset rytmihäiriöt saivat aikaan sydämen rakenteellisia muutoksia ja altistaisivat siten LVNC:n kehittymiselle (Shan ym., 2008). Toisaalta tämä ei tue hypoteesia, jonka perusteella LVNC olisi ensisijaisesti kehityksellinen häiriö. Mekanismin taustalla voi olla muutokset kanavan kanssa vuorovaikuttavissa proteiineissa. *SCN5A*:lla on sydänlihassolujen sähköisen toiminnan ohella muitakin tehtäviä, sillä se vuorovaikuttaa useiden solunsisäisten proteiinien toimintaan.

6. $\text{Na}_v1.5$ lääkevaikutuskohteena

Rytmihäiriöissä sydämen depolarisaatiota ja repolarisaatiota säätelevien ionivirtojen toiminta on poikkeavaa johtuen sydämen rakenteellisista tai toiminnallisista häiriöistä. Useat rytmihäiriölääkkeet perustuvatkin solukalvon natrium-, kalium- ja kalsiumkanavien toiminnan säätelyyn. Rytmihäiriölääkkeet luokitellaan neljään luokkaan niiden vaikutusmekanismin mukaan. Natriumkanavaa salpaavat lääkkeet kuuluvat luokkaan I ja ne jaetaan edelleen alaluokkiin (IA-IC) sen perusteella, kuinka tehokkaasti ne salpaavat natriumkanavaa (Al-Khatib ym., 2018). Kaikki ryhmän lääkeaineet estävät natriumin sisäänvirtausta solukalvon depolarisaation aikana sekä hidastavat aktiopotentiaalin johtumista Purkinjen säikeissä. Lääkeaineet voivat aikaansaada kohtalaisen (IA), heikon (IB) tai merkittävän (IC) natriumkanavan salpauksen sitoutumalla eri tavoin $\text{Na}_v1.5$ -kanavaan. Luokan IA ja IB lääkeaineet sitoutuvat kanavan aktiiviseen konformaatioon, kun taas IC-luokan lääkeaineet

sitoutuvat inaktiiviseen muotoon (Lei ym., 2018). Ryhmän IA lääkeaineet kinidiini ja disopyramini salpaavat natriumkanavien ohella myös kaliumkanavia ja L-tyyppin kalsiumkanavia, jonka seurauksena sekä aktiopotentiaalin että refraktaariajan kesto pitenee. Luokan IB rytmihäiriölääkkeet, kuten lidokaiini ja meksiletiini, vaikuttavat heikommin Purkinjen säikeiden nopean depolarisaatioon ja johtumisnopeuteen. Toisin kuin IA-luokan lääkeaineet, lidokaiini ja meksiletiini tyypillisesti lyhentävät repolarisaation kestoja. Luokan IC lääkeaineet, kuten flekainidi, sitoutuvat voimakkaimmin natriumkanaviin. Ne takaavat tehokkaan eston natriumvirtaukseen ja aktiopotentiaalin johtumiseen. Flekainidin käyttöä rajoittaa kuitenkin sen rytmihäiriötä aiheuttava haittavaikutus (Ruskoaho & Huikuri, 2018). Sen ohella, että natriumkanavan salpaajat estävät nopeaa natriumvirtaa, luokan IC ja IB natriumkanavan salpaajat estävät myös hidasta natriumvirtaa, jonka vaikutus aktiopotentiaaleihin on pienempi. Flekainidi ja meksiletiini ovat jopa selektiivisempiä myöhäisen natriumvirran estäjiä (Remme & Wilde, 2014).

6.1. Natriumkanavan salpaajat SCN5A-mutaatioiden hoidossa

Koska natriumkanavan salpaajilla on mahdollista muuntaa sydänlihassolujen epänormaalia sähköistä aktivaatiota, niiden käyttöä on tutkittu SCN5A-geenimutaatioiden yhteydessä ilmenevien rytmihäiriöiden hoidossa.

LQT3:n yhdistetyt SCN5A-mutaatiot tyypillisesti voimistavat depolarisoivaa natriumvirtaa, joka pidentää aktiopotentiaalin kestoja sydämessä. Natriumkanavan salpaajia on tutkittu LQT3-potilaiden hoidossa niiden depolarisaatiota hillitsevän vaikutuksensa vuoksi. Luokan IA natriumkanavan salpaajiin kuuluva Meksiletiini osoitti lupaavia tuloksia *in vitro*, kun lääkeaineen havaittiin lyhentävän aktiopotentiaalin kestoja sydänlihassoluissa, jotka mimikoivat LQT3:n fenotyyppiä. Tämän jälkeen lääkeaineiden tutkimista jatkettiin kliinisillä kokeilla, joissa meksiletiinin ohella flekainidilla havaittiin lyhentävän QT-ajan pituutta LQT3-mutaatioita kantavilla potilailla (Windle ym., 2001). Myöhemmin kuitenkin kävi ilmi, että LQT3:n hoito natriumkanavan salpaajilla ei aina johda QT-ajan lyhenemiseen. Eräässä tutkimuksessa flekainidi aiheutti LQT3-potilailla

Brugadan oireyhtymälle tyypillistä ST-segmentin nousua sen sijaan, että lääkeaine olisi hillinnyt rytmihäiriöitä (Priori ym., 2000). Flekainidia käytetäänkin Brugadan oireyhtymää tutkittaessa diagnostisena apuvälineenä, sillä lääkeaine aikaansaa oireyhtymälle tyypillistä ST-segmenttien nousua oireyhtymälle alttiilla henkilöillä (Priori ym., 2000). Tämänhetkiset natriumkanavan salpaajat estävät sekä nopeaa että myöhäistä natriumvirtaa ja lääkeaineiden vaikutuksissa LQT3-potilailla on suurta vaihtelua. LQT3:ssa on usein muutoksia aktiopotentiaalin myöhäisessä natriumvirrassa, joten tietyllä lääkeaineella, jolla olisi mahdollista vaikuttaa ainoastaan siihen, voisi olla edullisia vaikutuksia QT-ajan pituuteen. Eräs tällainen lääkeaine on ranolatsiini, jonka ensisijainen käyttöaihe on krooninen vakaa angina pectoris sen anti-iskeemisen vaikutusmekanisminsa vuoksi. Pienellä potilasjoukolla tehdyssä tutkimuksessa ranolatsiinilla oli mahdollista lyhentää QT-aikaa eikä potilailla havaittu tutkimuksen aikana Brugadan oireyhtymälle tyypillisiä EKG-muutoksia (Chorin ym., 2016). Ranolatsiini ehkäisee myös kalsiumin kertymistä sydänlihassoluihin, jolla todennäköisesti myös vaikutusta depolarisaation hillitsemiseen (Lindegger ym., 2009).

Sen ohella, että natriumkanavan salpaajat muuttavat kanavan läpäisevyyttä natriumioneille, ne voivat vaikuttaa kanavaproteiinin kuljetukseen solukalvolle (Valdivia ym., 2004). Heikentynyt kanavaproteiinin kuljetus ja solukalvon ekspressio voivat olla seurausta toiminnan puutosmutaatioista, joita Brugadan oireyhtymän taustalla olevat *SCN5A*-mutaatiot tyypillisesti ovat. Valdivia ym. (2004) tekivät mielenkiintoisen havainnon inkuboidessaan Brugadan oireyhtymää aiheuttavaa mutaatiota kantavia sydänlihassoluja meksiletiinillä tai kinidiinillä. Inkubointi natriumkanavan salpaajan kanssa aikaansai merkittävän natriumvirran voimistumisen sydänlihassoluissa. Spesifisti kanavaproteiinin kuljetukseen vaikuttaminen voisikin tarjota uudenlaisen geenispesifisen lääkevaikutuskohteen toiminnan puutosmutaatioiden hoidossa.

SCN5A-geenimutaatioiden aiheuttamat rytmihäiriöoireyhtymät ovat mekanismeiltaan komplekseja. Tämä näkyy myös lääkeaineissa, joiden vaikutukset sydämen jänniteherkkiin natriumkanaviin ovat ristiriitaiset saman oireyhtymän sisällä. Lääkeaine,

joka toisella potilaalla estää rytmihäiriöiden syntyä, voi indusoida niitä toisella potilaalla. *SCN5A*-mutaatioiden keskuudessa tavataan myös paljon eri fenotyyppien yhdistelmiä, joissa sama potilas voi ilmentää sekä toiminnan voimistumis- että toiminnan puuttumismutaatioille tyypillisiä löydöksiä, mikä tekee oireyhtymän hoidon natriumkanavan salpaajilla erityisen haastavaksi. Sydämen sähköisen toiminnan ja mutaatioiden patofysiologisten mekanismien monimutkaisuuden vuoksi *SCN5A*-mutaatioiden hoito on edelleen haastavaa. Parempi ymmärrys geenimutaatioiden aiheuttamien rytmihäiriöiden mekanismeista voisi johtaa räätälöityyn yksilölliseen lääkehoitoon.

7. Kirjallisuusluettelo

- Abrams, J., Roybal, D., Chakouri, N., Katchman, A. N., Weinberg, R., Yang, L., Chen, B., Zakharov, S. I., Hennessey, J. A., Avula, U. M. R., Diaz, J., Wang, C., Wan, E. Y., Pitt, G. S., Ben-Johny, M., & Marx, S. O. (ei pvm.). Fibroblast growth factor homologous factors tune arrhythmogenic late Nav1.5 current in calmodulin binding-deficient channels. *JCI Insight*, 5(19).
- Abriel, H. (2010). Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 2–11.
- Abriel, H., & Kass, R. S. (2005). Regulation of the Voltage-Gated Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by Interacting Proteins. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(1), 35–40.
- Al-Khatib, S. M., Stevenson, W. G., Ackerman, M. J., Bryant, W. J., Callans, D. J., Curtis A. B., Deal, B. J., Dickfeld, T., Field, M. E., Fonarow, G. C., Gillis, A. M., Granger, C. B., Hammill, S. C., Hlatky, M. A., Joglar, J. A., Kay, G.N, Matlock, D. D., Myerburg, R. J., & Page, R. L. (2018). 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. *Circulation*, 138(13), e272–e391.
- Allouis Marie, Le Bouffant Françoise, Wilders Ronald, Péroz David, Schott Jean-Jacques, Noireaud Jacques, Le Marec Hervé, Mérot Jean, Escande Denis, & Baró Isabelle. (2006). 14-3-3 Is a Regulator of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5. *Circulation Research*, 98(12), 1538–1546.

- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., & Tan, H. L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Archiv*, *460*(2), 223–237.
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., LeMarec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A. R., Shimizu, W., Schulze-Bahr, E., Tan, H. & Wilde, A. (2005). Brugada Syndrome: Report of the Second Consensus Conference. *Circulation*, *111*(5), 659–670.
- Bennett, J., Stroud, D., Becker, J., & Roden, D. (2013). Proliferation of embryonic cardiomyocytes in zebrafish requires the sodium channel scn5Lab. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *51*(8), 562–574.
- Brugada, P., Brugada, J., & Brugada, R. (2002). The Brugada Syndrome. *Cardiac Electrophysiology Review*, *6*(1), 45–48.
- Catterall, W. A. (2014). 1—Voltage-Gated Sodium Channels and Electrical Excitability of the Heart. Teoksessa D. P. Zipes & J. Jalife (Toim.), *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Sixth Edition)* (ss. 1–11). W.B. Saunders.
- Chorin, E., Hu, D., Antzelevitch, C., Hochstadt, A., Belardinelli, L., Zeltser, D., Barajas-Martinez, H., Rozovski, U., Rosso, R., Adler, A., Benhorin, J., & Viskin, S. (2016). Ranolazine for Congenital Long-QT Syndrome Type III: Experimental and Long-Term Clinical Data. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *9*(10).
- DeMarco, K. R., & Clancy, C. E. (2016). Cardiac Na Channels: Structure to Function. *Current topics in membranes*, *78*, 287–311.
- Finsterer, J., Stöllberger, C., & Towbin, J. A. (2017). Left ventricular noncompaction cardiomyopathy: Cardiac, neuromuscular, and genetic factors. *Nature Reviews Cardiology*, *14*(4), 224–237.

- Gavillet, B. Rougier, J-S., Domenighetti, A. A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H-A., Pedrazzini, T., & Abriel, H. (2006). Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin. *Circulation Research*, 99(4), 407–414.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4), 500–544.
- Hund, T. J., & Mohler, P. J. (2018). 23—Function and Dysfunction of Ion Channel Membrane Trafficking and Posttranslational Modification. Teoksessa D. P. Zipes, J. Jalife, & W. G. Stevenson (Toim.), *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside (Seventh Edition)* (ss. 212–218). Elsevier.
- Hussein, A., Karimianpour, A., Collier, P., & Krasuski, R. A. (2015). Isolated Noncompaction of the Left Ventricle in Adults. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(5), 578–585.
- Iqbal, S. M., & Lemmens-Gruber, R. (2019). Phosphorylation of cardiac voltage-gated sodium channel: Potential players with multiple dimensions. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 225(3).
- Isom, L. L. (2002). The role of sodium channels in cell adhesion. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, 12–23.
- Jenni, R., Oechslin, E. N., & van der Loo, B. (2007). Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults. *Heart*, 93(1), 11–15.

- Jiang, D., Shi, H., Tonggu, L., Gamal El-Din, T. M., Lenaeus, M. J., Zhao, Y., Yoshioka, C., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2020). Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell*, *180*(1), 122-134.e10.
- Lei, M., Wu, L., Terrar, D. A., & Huang, C. L.-H. (2018). Modernized Classification of Cardiac Antiarrhythmic Drugs. *Circulation*, *138*(17), 1879–1896.
- Lemaillet, G., Walker, B., & Lambert, S. (2003). Identification of a Conserved Ankyrin-binding Motif in the Family of Sodium Channel α Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(30), 27333–27339
- Lindegger, N., Hagen, B., Marks, A. R., Lederer, W. J., & Kass, R. S. (2009). Diastolic transient inward current in Long QT Syndrome type 3 is caused by Ca²⁺ overload and inhibited by Ranolazine. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *47*(2), 326–334.
- Lipkind, G. M., & Fozzard, H. A. (2008). Voltage-gated Na Channel Selectivity: The Role of the Conserved Domain III Lysine Residue. *The Journal of General Physiology*, *131*(6), 523–529.
- Maltsev, V. A., Kyle, J. W., Mishra, S., & Undrovinas, A. (2008). Molecular identity of the late sodium current in adult dog cardiomyocytes identified by Nav1.5 antisense inhibition. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *295*(2), H667–H676.
- Marchal, G. A., Verkerk, A. O., Mohan, R. A., Wolswinkel, R., Boukens, B. J. D., & Remme, C. A. (2020). The sodium channel Nav1.5 impacts on early murine embryonic cardiac development, structure and function in a non-electrogenic manner. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *230*(2).

- Matamoros, M., Pérez-Hernández, M., Guerrero-Serna, G., Amorós, I., Barana, A., Núñez, M., Ponce-Balbuena, D., Sacristán, S., Gómez, R., Tamargo, J., Caballero, R., Jalife, J., & Delpón, E. (2016). Nav1.5 N-terminal domain binding to α 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovascular Research*, *110*(2), 279–290.
- McNair, W. P., Ku L., Taylor M: R.G., Fain, P. R., Dao, D., Wolfel, E., Mestroni, L.(2004). SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder, and Arrhythmia. *Circulation*, *110*(15), 2163–2167.
- Meadows, L. S., & Isom, L. L. (2005). Sodium channels as macromolecular complexes: Implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovascular Research*, *67*(3), 448–458.
- Mohler, P. J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S. G., & Bennett, V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(50), 17533–17538.
- Musa, H., Kline, C. F., Sturm, A. C., Murphy, N., Adelman, S., Wang, C., Yan, H., Johnson, B. L., Csepe, T. A., Kilic, A., Higgins, R. S. D., Janssen, P. M. L., Fedorov, V. V., Weiss, R., Salazar, C., Hund, T. J., Pitt, G. S., & Mohler, P. J. (2015). SCN5A variant that blocks fibroblast growth factor homologous factor regulation causes human arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(40), 12528–12533.

- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological Reviews*, 85(4), 1205–1253.
- O'Malley, H. A., & Isom, L. L. (2015). Sodium channel β subunits: Emerging targets in channelopathies. *Annual Review of Physiology*, 77, 481–504.
- Onkal, R., Mattis, J. H., Fraser, S. P., Diss, J. K. J., Shao, D., Okuse, K., & Djamgoz, M. B. A. (2008). Alternative splicing of Nav1.5: An electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 716–726.
- Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M. R., Head, C. E. G., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., Saumarez, R. C., Trezise, A. E. O., Huang, C. L.-H., Vandenberg, J. I., Colledge, W. H., & Grace, A. A. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6210–6215.
- Park, B. E., & Yang, D. H. (2020). A Case of Ventricular Noncompaction with Brugada-Like Electrocardiography Pattern. *Chonnam Medical Journal*, 56(3), 208–209.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475(7356), 353–358.
- Priori, S. G., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Bloise, R., Crotti, L., & Ronchetti, E. (2000). The Elusive Link Between LQT3 and Brugada Syndrome. *Circulation*, 102(9), 945–947.

- Remme, C. A. (2013). Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: Electrophysiological, molecular and genetic aspects. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 17), 4099–4116.
- Remme, C. A., & Bezzina, C. R. (2010). REVIEW: Sodium Channel (Dys)Function and Cardiac Arrhythmias. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(5), 287–294.
- Remme, C. A., & Wilde, A. A. M. (2014). Targeting sodium channels in cardiac arrhythmia. *Current Opinion in Pharmacology*, 15, 53–60.
- Rivaud, M. R., Delmar, M., & Remme, C. A. (2020). Heritable arrhythmia syndromes associated with abnormal cardiac sodium channel function: Ionic and non-ionic mechanisms. *Cardiovascular Research*, 116(9), 1557–1570.
- Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. A., & Bierhuizen, M. F. A. (2012). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular Research*, 93(1), 12–23.
- Ruskoaho, H., & Huikuri, H. (2018). Natriumkanavien salpaajien vaikutukset ja luokittelu. Teoksessa *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia* (Vsk. 2018). Kustannus Oy Duodecim. www.oppiportti.fi
- Schwartz, P. J., Priori S. G., Spazzolini, C., Moss, A. J., Vincent, G. M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M. T., Towbin, J.A., Beggs, A. H., Brink, P., Wilde, A. A. M., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson J. L., Timothy, K. W., Corfield, V., Bloise, R. (2001). Genotype-Phenotype Correlation in the Long-QT Syndrome. *Circulation*, 103(1), 89–95.
- Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R. P., & Anderson, R. H. (2000). Developmental patterning of the myocardium. *The Anatomical Record*, 258(4), 319–337.

- Shy, D., Gillet, L., & Abriel, H. (2013). Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(4), 886–894.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., & Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339(6226), 597–603.
- Tan, H. L., Bezzina, C. R., Smits, J. P. P., Verkerk, A. O., & Wilde, A. A. M. (2003). Genetic control of sodium channel function. *Cardiovascular Research*, 57(4), 961–973.
- Tian, X., Li, Y., He, L., Zhang, H., Huang, X., Liu, Q., Pu, W., Zhang, L., Li, Y., Zhao, H., Wang, Z., Zhu, J., Nie, Y., Hu, S., Sedmera, D., Zhong, T. P., Yu, Y., Zhang, L., Yan, Y., ... Zhou, B. (2017). Identification of a hybrid myocardial zone in the mammalian heart after birth. *Nature Communications*, 8(1), 87.
- Valdivia, C. R., Tester, D. J., Rok, B. A., Porter, C. J., Munger, T. M., Jahangir, A., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2004). A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovascular Research*, 62(1), 53–62.
- Vanninen, S., & Holmström, M. (2019). Vasemman kammion nonkompaktaatiokardiomyopatia. *Sydänääni*, 30:1A.
- Wagner, S., Dybkova, N., Rasenack, E. C. L., Jacobshagen, C., Fabritz, L., Kirchhof, P., Maier, S. K. G., Zhang, T., Hasenfuss, G., Brown, J. H., Bers, D. M., & Maier, L. S. (2006). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127–3138.

- Wang, C., Hennessey, J. A., Kirkton, R. D., Wang, C., Graham, V., Puranam, R. S., Rosenberg, P. B., Bursac, N., & Pitt, G. S. (2011). Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na⁺ channels and conduction velocity in murine heart. *Circulation Research*, *109*(7), 775–782.
- Wang, X., Tang, H., Wei, E. Q., Wang, Z., Yang, J., Yang, R., Wang, S., Zhang, Y., Pitt, G. S., Zhang, H., & Wang, C. (2017). Conditional knockout of Fgf13 in murine hearts increases arrhythmia susceptibility and reveals novel ion channel modulatory roles. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *104*, 63–74.
- Wengrofsky, P., Armenia, C., Oleszak, F., Kupferstein, E., Rednam, C., Mitre, C. A., & McFarlane, S. I. (2019). Left Ventricular Trabeculation and Noncompaction Cardiomyopathy: A Review. *EC clinical and experimental anatomy*, *2*(6), 267–283.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(22), 10910–10914.
- Wilde, A. A. M., & Amin, A. S. (2018). Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy. *JACC: Clinical Electrophysiology*, *4*(5), 569–579.
- Windle, J. R., Geletka, R. C., Moss, A. J., Zareba, W., & Atkins, D. L. (2001). Normalization of Ventricular Repolarization with Flecainide in Long QT Syndrome Patients with SCN5A:ΔKPK Mutation. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, *6*(2), 153–158.

Yan, H., Wang, C., Marx, S. O., & Pitt, G. S. (2017). Calmodulin limits pathogenic Na⁺ channel persistent current. *The Journal of General Physiology*, *149*(2), 277–293.

Yang, J., Wang, Z., Sinden, D. S., Wang, X., Shan, B., Yu, X., Zhang, H., Pitt, G. S., & Wang, C. (2016). FGF13 modulates the gating properties of the cardiac sodium channel Nav1.5 in an isoform-specific manner. *Channels*, *10*(5), 410–420.