



**HAL**  
open science

# Régulation des canaux NaV1.5 cardiaques par la phosphorylation de leur protéine partenaire FHF2

Adrien Lesage

► **To cite this version:**

Adrien Lesage. Régulation des canaux NaV1.5 cardiaques par la phosphorylation de leur protéine partenaire FHF2. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1026 . tel-03937455

**HAL Id: tel-03937455**

**<https://theses.hal.science/tel-03937455>**

Submitted on 13 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

Par

**Adrien LESAGE**

## **Régulation des canaux $Na_v1.5$ cardiaques par la phosphorylation de leur protéine partenaire FHF2**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 16/12/2022  
Unité de recherche : U1087

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Jean-François Faivre    Professeur des universités, Université de Poitiers  
Laurent Sallé            Professeur des universités, Université de Caen-Normandie

### **Composition du Jury :**

Président :	Isabelle Baró	Directeur de recherche, L'institut du thorax de Nantes
Examineurs :	Isabelle Baró	Directeur de recherche, L'institut du thorax de Nantes
Dir. de thèse :	Céline Marionneau	Chargé de recherche, L'institut du thorax de Nantes



# Remerciements

Ce travail de thèse représente un travail de plus de 3 ans qui a fait intervenir de nombreuses personnes pour permettre sa bonne réalisation. C'est pourquoi je souhaite remercier chaque personne qui m'a aidé de près ou de loin à son élaboration.

Je tiens dans un premier temps à remercier Mr Laurent Sallé et Mr Jean-François Faivre d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et par conséquent d'évaluer ce travail. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez accordé.

Je souhaite également remercier Mr Phillippe Lory et Mr Aurélien Chatelier d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse et de m'avoir fourni de précieux conseils au cours de cette thèse, mais également pendant la période de Master.

Je voudrais adresser des remerciements particuliers à ma directrice de thèse, Mme Céline Marionneau pour avoir accepté de m'encadrer au cours de ces 3 années. Je souhaiterais aussi te remercier pour ton temps et tes conseils tout au long de ce projet ainsi que pour la relecture de ce manuscrit. Je te souhaite de continuer à développer beaucoup de nouveaux projets et te souhaite bon courage pour la suite.

Un merci particulier à Mme Isabelle Baró, Mr Gildas Loussouarn et Mr Jérôme Montnach qui ont toujours été présents pendant ces 3 années afin de répondre à toutes les questions que j'ai pu avoir dans le domaine de l'électrophysiologie. Cela m'a permis de surmonter les difficultés techniques et d'en apprendre beaucoup sur le patch-clamp. Et encore merci à Isabelle d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Merci, Maxime Lorenzini de m'avoir transmis bon nombre de tes connaissances afin que je débute cette thèse dans de bonnes conditions.

Merci, Sophie Burel, ton travail rigoureux et ta motivation m'ont énormément aidé dans l'accomplissement de ma thèse. Je te souhaite une bonne continuation dans tous tes projets.

À Marine Sarlandie, merci beaucoup pour ton aide et ta gentillesse. Bon courage pour la suite de ta thèse au Canada en espérant que tu t'épanouiras là-bas.

À Floriane Bibault, parce que le patch est beaucoup plus agréable à deux lorsque l'on écoute des playlists de country. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils et ta bienveillance qui font de toi une très bonne personne. Je suis très heureux de t'avoir côtoyé pendant près de deux ans pendant lesquels tu m'as rendu de nombreux services et aidé à la réalisation de cette thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite et je ne me fais pas de soucis, car je sais que nous nous reverrons !

À Ludivine Lopez, pour ton soutien et ton amitié. Bien qu'un peu vexé que tu courres plus vite que moi je suis très content d'avoir réalisé ma thèse en ta compagnie. Nos rendez-vous au bar pour parler de l'écriture de thèse vont beaucoup me manquer.



Je te souhaite de bien réussir ta soutenance qui aura lieu une semaine avant moi et te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à tous les doctorants et à ceux avec qui nous avons partagé de bons moments au laboratoire.

À mes amis, je vous remercie tous d'être à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments. J'ai toujours pu compter sur votre soutien et je suis content de vous compter parmi mes proches. Je ne peux malheureusement vous remercier un par un, mais soyez sûr que le cœur y est. J'espère vous voir nombreux lors de ma soutenance et j'espère que nous continuerons notre chemin de vie ensemble.

À ma famille, pour votre soutien indéfectible tout au long de ma vie et de mes études. Je suis heureux de vous avoir à mes côtés, car vous m'avez toujours soutenu dans mes décisions et apporté les moyens de réussir. J'ai conscience que je vous dois tant pour chaque succès dans ma vie. J'aurais pu écrire encore longtemps pour vous exprimer ma gratitude, mais j'ai conscience que je ne pourrais jamais suffisamment vous dire merci.

# Table des matières

Table des matières.....	1
Index des figures.....	4
Index des tableaux.....	10
Liste des abréviations .....	11
Résumé .....	13
Introduction.....	15
I.    Activité électrique cardiaque.....	15
II.   Les courants ioniques.....	17
III.  Les canaux Nav.....	18
IV.  Les canaux Nav1.5 cardiaques.....	20
1.  Structure.....	20
2.  Localisation tissulaire .....	22
3.  Activité canalaire .....	22
4.  Courant sodique persistant .....	25
V.   Régulation du canal Nav1.5 cardiaques par les protéines partenaires .....	27
1.  Complexes protéiques Nav1.5 cardiaques .....	27
2.  Régulation du canal Nav1.5 par les FHFfs .....	34
VI.  Régulation du canal Nav1.5 par la phosphorylation.....	44
1.  Généralités .....	44
2.  Régulation du canal Nav1.5 par la PKA .....	45
3.  Régulation du canal Nav1.5 par la PKC .....	46
4.  Régulation du canal Nav1.5 par la CaMKII .....	47
5.  Régulation du canal Nav1.5 par la kinase dépendante de l'adénosine monophosphate (AMPK) .....	49
6.  Régulation du canal Nav1.5 par les Fyn kinases .....	50
7.  Régulation du canal Nav1.5 par la voie des kinases PI3K/PDK1/Akt/SGK .....	50
8.  Sites de phosphorylation encore non reliés à des kinases .....	52
Objectifs de la thèse .....	55
Matériels et méthodes .....	57
I.    Plasmides et virus .....	57
II.   Culture et transfection des cellules HEK-293.....	57

III.	Isolement et culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de souris nouveaux nés.....	58
IV.	Isolement et culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes.	58
V.	Co-immunoprécipitation.....	60
VI.	Extraction ARN et RT-qPCR .....	60
VII.	Western Blot .....	61
VIII.	Patch-clamp.....	62
IX.	Analyses statistiques .....	66
	Résultats .....	67
I.	Identification des sites de phosphorylation natifs de FHF2 dans le ventricule gauche murin .....	67
II.	Étude des effets de la phosphorylation du FHF2 sur l'activité des canaux $Na_v$ dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales. ....	69
1.	Mise au point d'un modèle de knock-down et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes de souris néonatales.....	69
2.	Étude des propriétés biophysiques des canaux $Na_v$ dans un modèle de knock-down et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales. ....	71
III.	Étude des effets des sites de phosphorylation de FHF2 sur l'activité des canaux $Na_v$ dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes .....	76
1.	Mise au point d'un modèle de knock-down et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes de souris adultes .....	76
2.	Étude des propriétés biophysiques des canaux $Na_v$ dans un modèle de knock-down et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes .....	76
IV.	Expression des variants des protéines FHF2 dans les modèles de cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales et adultes .....	82
V.	Études des effets de la phosphorylation de FHF2 sur les canaux $Na_v1.5$ dans un modèle d'expression hétérologue HEK-293 .....	83
VII.	Étude des effets de la phosphorylation de $Na_v1.5$ sur la régulation médiée par FHF2.....	86
VIII.	Étude des effets de la phosphorylation de FHF2 sur les canaux $Na_v1.5$ mutants pour le motif de liaison de la CaM .....	89
IX.	Étude des effets de la phosphorylation du FHF1-B sur les canaux $Na_v1.5$ .....	91
	Discussion .....	95
I.	Expression des différentes isoformes de FHF dans les cardiomyocytes de souris néonatales et adultes .....	95
II.	Rôles de FHF1 et FHF2 dans la régulation des canaux $Na_v1.5$ cardiaques.....	95

III. Identification des sites de phosphorylation des protéines FHF2 dans le ventricule gauche murin.....	98
IV. Étude des rôles de la phosphorylation des protéines FHF2 et Nav1.5 dans la régulation du courant I <sub>Na</sub> cardiaque .....	99
V. Publications scientifiques.....	100
Conclusion .....	103
Références .....	105
Annexes .....	119
Annexe 1 : En cours de publication .....	119
Annexe 2 : Proteomic and functional mapping of cardiac Nav1.5 channel phosphorylation sites.....	168
Annexe 3 : Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp.....	197

# Index des figures

**Figure 1 : A gauche, une illustration schématique d'un cœur humain et des voies de conduction électrique principales. A droite, schéma d'un tracé électrocardiographique (ECG) dont les différentes ondes sont nommées P, QRS et T (Fédération Française de Cardiologie, 2021).**..... 15

**Figure 2 : Représentation schématique d'un PA ventriculaire humain et des courants ioniques qui lui sont associés.** Les courants entrants dépolarisants (en rouge) et les courants sortants repolarisant (en bleu) (d'après Nerbonne et Kass, 2005). ..... 16

**Figure 3 : Arbre phylogénétique des canaux  $Na_v$  chez l'homme avec leur localisation dans les tissus, sur les chromosomes et leur sensibilité à la TTX.** (CNS) Système nerveux centrale, (SNP) Système nerveux périphérique (Modifié d'après Zimmer et al., 2014). ..... 20

**Figure 4 : Structure du canal  $Na_v1.5$ .** (A) Représentation schématique du canal  $Na_v1.5$  avec les 4 domaines transmembranaires (DI, DII, DIII et DIV). Les + désignent les segments S4 sensibles au voltage. Les segments en vert représentent les segments S5 et S6 qui forment le pore du canal et la boucle P détermine la sélectivité aux ions  $Na^+$ . La boucle reliant les DIII/IV est impliquée dans l'inactivation du canal. (B) Structure cristallographique d'un canal bactérien  $Na_vAb$  avec au centre son pore visible (Catterall, 2012). ..... 21

**Figure 5 : Illustration des mécanismes à l'origine des courants de fenêtre, retardés et persistants.** (A) Le décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels dépolarisés (courbe verte) ainsi que le décalage de la courbe d'activation vers des potentiels hyperpolarisés (courbe orange) induit une augmentation du courant de fenêtre (zones grisées). (B) Ralentissement de la cinétique d'inactivation rapide induit une augmentation du courant sodique retardé (zone grisée). (C) Phénomène d'inactivation incomplète qui peut être la cause d'un courant sodique persistant. (D) Les courants sodiques persistants rallongent la durée d'un PA cardiaque. (d'après Amin et al., 2009) ..... 25

**Figure 6 : Description des différents modèles d'inactivations à l'origine des courants sodiques retardés.** À gauche le « Late scattered openings mode » et à droite le « Burst opening mode ». Les résultats ont été obtenus sur des cellules HEK293 par la technique de patch-clamp en configuration Cell-attached avec un potentiel de maintien à  $-130$  mV et des impositions de potentiel à  $-30$  mV (Undrovinas et al., 2002). ..... 26

**Figure 7 : Représentation schématique du complexe canalaire macromoléculaire de  $Na_v1.5$ .** Les protéines partenaires dont le site d'interaction avec  $Na_v1.5$  est connu sont placées sur le schéma. .... 28

**Figure 8 : Illustration schématique d'un potentiel modèle décrivant l'action du  $Ca^{2+}$  et de la CaM sur le canal  $Na_v1.5$ .** L'ApoCaM se lie au motif IQ, mais la  $Ca^{2+}/CaM$  se délie pour se fixer préférentiellement sur la boucle DIII/IV et permet au  $Ca^{2+}$  de se fixer sur le motif « EF-hand ». (Shah et al., 2006). ..... 31

**Figure 9 : Illustration schématique de l'action de l'ApoCaM sur le canal Nav1.5.** L'ApoCaM stabilise l'interaction entre DIV et le domaine C-terminal. À l'ouverture du canal, la boucle DIII/IV est libérée et intervient dans l'inactivation. En absence de l'ApoCaM l'interaction entre le DIV et le domaine C-terminal est déstabilisée favorisant l'inactivation depuis l'état fermé et en cas d'ouverture du canal favorise le courant sodique persistant. (Kang et al., 2021) ..... 33

**Figure 10 : Arbre phylogénétique des différentes familles de FGF réparties selon leur mode d'action dans l'organisme.** (Bleu) Les FGFs aux fonctions paracrines et autocrines. (Jaune) Les FGFs aux fonctions endocrines. (Rouge) Les FGFs aux fonctions intracellulaires. (Ornitz et Itoh, 2015)..... 34

**Figure 11 : Représentation schématique tridimensionnelle du complexe protéique Nav1.5, FHF2 et C-terminale de la CaM.** (Gabelli et al., 2014)..... 36

**Figure 12 : Illustration schématique des variants d'excisions épissages du FHF2 (FGF13) chez la souris** (Wang et al., 2011). ..... 37

**Figure 13 : Représentation graphique de la répartition d'expression du FHF1 chez l'homme.** Les résultats ont été obtenus par RNA-Seq sur 27 tissus provenant de 95 individus. La quantification est exprimée en « Reads Per Kilobase Million » (RPKM) (Fagerberg et al., 2014). ..... 38

**Figure 14 : Représentation graphique de la répartition d'expression de FHF2 chez l'homme.** Les résultats ont été obtenus par RNA-Seq sur 27 tissus provenant de 95 individus. La quantification est exprimée en « Reads Per Kilobase Million » (RPKM) (Fagerberg et al., 2014). ..... 40

**Figure 15 : Effet du knock-down de FHF2 sur le courant  $I_{Na}$  dans un modèle de cardiomyocytes adultes.** (A) Tracés représentatifs des courants sans shRNA (Control), avec shRNA contrôle (Scrambled) et avec shRNA dirigé contre le FHF2 (shRNA). (B) Quantification de la densité de courant  $I_{Na}$  à -30 mV à partir de deux potentiels de maintien différents (-130 et -90 mV). (C) Dépendance au potentiel de l'inactivation des canaux Nav1.5 (Wang et al., 2011)..... 41

**Figure 16 : Représentation schématique du complexe canalaire macromoléculaire de Nav1.5.** (Violet) Sites de phosphorylations identifiés par spectrométrie de masse chez la souris. (Autres couleurs) Sites de phosphorylations identifiés dans la littérature et reliés à l'activité de kinases, dans des modèles in vitro..... 44

**Figure 17 : Protocoles de voltage-clamp en configuration cellule entière, utilisés pour enregistrer les courants  $I_{Na}$  et  $I_{NaL}$ .** ..... 64

**Figure 18 : Identification des sites de phosphorylation présents sur les protéines FHF2** (A) Alignement des séquences des protéines FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y, FHF2-A, FHF2-B, FHF1-A, FHF1-B et FHF4-B avec (en jaune) les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse et (en rouge) les sites de phosphorylation identifiés. (B) Quantification de l'abondance relative des sites retrouvés phosphorylés (rouge) ou non (blanc) à l'état basal dans des cœurs de souris WT (en UA)..... 68

**Figure 19 : Analyse de l'expression des transcrits et des protéines de FHF2 suite à son KD et sa réexpression par son isoforme majoritaire, FHF2-VY, dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales** (A) Quantification par RT-qPCR de l'expression des transcrits FHF2 après le knockdown FHF2 dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales. Le knockdown de FHF2 a été effectué avec un adénovirus contenant un shRNA dirigé contre le FHF2 (B) Quantification par RT-qPCR de l'expression des transcrits FHF2-VY WT ou phosphomuté en A ou E. La réexpression a été effectuée avec un adénovirus contenant la séquence de FHF2-VY (C) Analyse par western blot de l'expression de la protéine FHF2 dans les différentes conditions (D) Quantification du western blot. (E et F) Analyse par western blot de l'expression des transcrits FHF2 dans des cardiomyocytes de souris néonatales infectées avec des adénovirus exprimant un shRNA contre FHF2 seul ou avec réexpression de FHF2-VY WT ou phosphomuté..... 70

**Figure 20 : Propriétés biophysiques des canaux  $N_{aV}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales KD pour FHF2 et lors de la réexpression du FHF2-VY.** Enregistrement en voltage-clamp configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans des cardiomyocytes de souris néonatales 48 heures après infection par des adénovirus exprimant un shRNA contrôle (Noir), un shRNA ciblant FHF2 (Vert), ou une combinaison de deux adénovirus exprimant pour l'un, le shRNA ciblant FHF2 et pour l'autre, la séquence codante de FHF2-VY-WT (Rouge). (A) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives de chaque condition, en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendances au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives normalisés par leurs pics. (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé..... 73

**Figure 21 : Propriétés biophysiques des canaux  $N_{aV}$  de cardiomyocytes ventriculaires de souris WT néonatales infectées par des adénovirus exprimant un shRNA contrôle, un shRNA dirigé contre FHF2 seul ou avec un autre adénovirus réexprimant la séquence de FHF2-VY-WT ou FHF2-VY phosphomuté (A ou E) aux sites indiqués.** (A) Potentiel de demi-activation  $V_{1/2}$  en mV. (B) Potentiel de demi-inactivation en mV. (C) Densité de courant  $I_{Na}$  pA/pF. (D) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  à 0 mV. (E) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  à 0 mV. (F) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement à 0 mV. Les valeurs  $I_{Na}$ ,  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  et  $A_{fast}/A_{slow}$  présentées ont été déterminées à partir d'enregistrements obtenus sur des dépolarisations à -10 mV (HP=-120 mV). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport au shRNA contrôle ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  par rapport au shRNA FHF2 ; ANOVA à un facteur contrôlé..... 74

**Figure 22 : Analyse par western blot du KD de FHF2 dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes..... 76**

**Figure 23 : Propriétés biophysiques des canaux  $N_{aV}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes KD pour FHF2 et avec réexpression du FHF2-VY.** Enregistrement voltage-clamp cellule entière, des courants  $I_{Na}$  enregistrés 48 heures après l'isolement de

cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes FHF2-lox (Noir) ou FHF2-knockdown (FHF2-KD) (Vert) et infectés avec des adénovirus réexprimant FHF2-VY WT (Rouge). (A) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives de chaque condition en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives normalisés par leurs pics. (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ). ..... 79

**Figure 24 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes FHF2-lox ou FHF2-knockdown (FHF2-KD) et infectés avec des adénovirus réexprimant FHF2-VY WT ou phosphomuté (A ou E) aux sites indiqués.** (A) Potentiel de demi-activation  $V_{1/2}$  en mV. (B) Potentiel de demi-inactivation  $V_{1/2}$  en mV. (C) Densité de courant  $I_{Na}$  pA/pF. (D) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  à -20 mV. (E) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  à -20 mV. (F) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement à 0 mV. Les valeurs  $I_{Na}$ ,  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  et  $A_{fast}/A_{slow}$  présentées ont été déterminées à partir d'enregistrements obtenus sur des dépolarisations à -20 mV (HP=-120 mV). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport au FHF2-Lox ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  par rapport au FHF2-KD ; ANOVA à un facteur contrôlé..... 80

**Figure 25 : Analyse de l'expression des différentes isoformes de FHF2 dans les cardiomyocytes néonataux (CN) et adultes (CA).** (A) RT-qPCR permettant de comparer l'expression relative des transcrits des isoformes FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y et FHF2-A entre les cardiomyocytes néonataux et adultes. (B) Western blot visant à déterminer l'expression protéique de FHF2-A entre les cardiomyocytes néonataux et adultes. .... 83

**Figure 26 : Analyse par western blot de l'expression et de l'interaction des protéines  $Na_v1.5$ , CaM, FHF2-VY WT et 9A dans les cellules HEK-293.** À gauche, analyse de l'expression des différentes protéines dans le lysat total. À droite, analyse des interactions du complexe protéique  $Na_v1.5$ , CaM, FHF2-VY WT et 9A suite à une immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques des canaux  $Na_v$ . .... 84

**Figure 27 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v1.5$  dans les cellules HEK-293 avec expression ou non du FHF2-VY WT ou phosphomuté 9A.** Enregistrement voltage-clamp configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après transfection d'un plasmide contrôle (Noir), ou contenant le FHF2-VY-WT (Vert) ou le FHF2-VY 9A (Rouge). (A) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives de chaque condition, en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendances au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximal (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en



fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé. .... 85

**Figure 28 : Analyse par co-immunoprécipitation et western blot de l'expression et de l'interaction des protéines Nav1.5 WT, Nav1.5 S1884 phosphomuté, CaM, FHF2-VY WT dans les cellules HEK-293.** (A) À gauche, analyse de l'expression des différentes protéines dans le lysat total. À droite, analyse des interactions du complexe protéique Nav1.5 WT, Nav1.5 S1884A, CaM et FHF2-VY WT suite à une immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques des canaux Nav. (B) À gauche, analyse de l'expression des différentes protéines dans le lysat total. À droite, analyse des interactions du complexe protéique Nav1.5 WT, Nav1.5 S1884A, Nav1.5 S1884D, Nav1.5 S1884E et FHF2-VY WT suite à une immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques des canaux Nav. .... 87

**Figure 29 : Propriétés biophysiques des canaux Nav1.5 WT, S1884A ou S1884E dans les cellules HEK-293 avec expression du FHF2-VY WT.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant le Nav1.5 WT et FHF2-VY WT (Noir), ou le Nav1.5 S1884A et FHF2-VY-WT (Vert) ou le Nav1.5 S1884E et FHF2-VY WT (Rouge). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendances au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximal (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ). .... 88

**Figure 30 : Propriétés biophysiques des canaux Nav1.5 IQ/AA dans les cellules HEK-293 avec ou sans expression du FHF2-VY WT ou 9A.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant Nav1.5 IQ/AA et un plasmide contrôle (non enregistrable), ou Nav1.5 IQ/AA et FHF2-VY-WT (Vert) ou Nav1.5 IQ/AA et FHF2-VY 9A (Rouge). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximale (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ). .... 90

**Figure 31 : Propriétés biophysiques des canaux Nav1.5 dans les cellules HEK-293 avec expression ou non du FHF1-B WT.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant Nav1.5, avec un plasmide contrôle (noir), ou avec FHF1-B WT (vert). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au

potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximale (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ). ..... 92

**Figure 32 : Propriétés biophysiques des canaux Nav1.5 dans les cellules HEK-293 avec expression du FHF1-B WT ou des phosphomutants S150A ou S150E.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant le FHF1-B WT (Noir) ou FHF1-B 150A (Vert) ou FHF1-B 150E (Rouge). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximale (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ). ..... 93

# Index des tableaux

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents sites de phosphorylation retrouvés associés à l'activation de kinases, les effets sur le canal  $Na_v1.5$  qui leur sont attribués et la méthode qui a permis l'identification de ces sites. .... 54**

**Tableau 2 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  de cardiomyocytes ventriculaires de souris WT néonatales infectées par des adénovirus exprimant un shRNA contrôle, un shRNA dirigé contre FHF2 seul ou avec un autre adénovirus réexprimant la séquence de FHF2-VY-WT ou FHF2-VY phosphomuté (A ou E) aux sites indiqués.** La densité de courant  $I_{Na}$ , le temps au pic, et les constantes des cinétiques d'inactivation ont été obtenus à la suite de dépolarisation à -10 mV à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre de cellules analysées est entre parenthèses. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparé au témoin shRNA; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  comparé au FHF2 shRNA; Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance Anova à un facteur contrôlé..... 75

**Tableau 3 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes KD FHF2 et lors de la réexpression du FHF2-VY WT et phosphomutants.** La densité de courant  $I_{Na}$ , le temps au pic, et les constantes des cinétiques d'inactivation ont été obtenus à la suite de dépolarisation à -20 mV à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre de cellules analysées est entre parenthèses. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparé au témoin shRNA; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  comparé au FHF2 shRNA; Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance ANOVA à un facteur contrôlé..... 81

**Tableau 4 : Densité de courant  $I_{NaL}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes FHF2-Lox contrôle, KD pour FHF2 et lors de la réexpression du FHF2-VY WT ou du phosphomutant 9A.** \* $p < 0.05$  comparé au témoin FHF2-lox. #### $p < 0.0001$  comparé au FHF2-KD. Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance ANOVA à un facteur contrôlé. .... 82

**Tableau 5 : Densité de courant  $I_{NaL}$  dans les cellules HEK-293 co-transfectées avec le canal  $Na_v1.5$  IQ/AA et le FHF2-VY WT ou 9A.** \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparé à la condition  $Na_v1.5$  IQ/AA avec plasmide contrôle. .... 91

# Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPK : Kinase activée par l'Adénosine MonoPhosphate

ApoCaM : Calmoduline sans liaison de calcium

BM : *Burst Mode*

BrS : Syndrome de Brugada

Ca<sup>2+</sup> : Ion calcium

CaM : Calmoduline

CaMKII : Kinase dépendante de la calcium/Calmoduline de type 2

CK2 : Caséine kinase 2

Ca<sub>v</sub> : Canal calcique dépendant du potentiel

ECG : Électrocardiogramme

FGF : *Fibroblast growth factor*

FHF : Facteur homologue au fibroblast growth factor

GPD1-L : Glycerol-3-phosphate déshydrogénase-*Like*

GSK3 : *Glycogen synthase kinase 3*

HEK-293 : *Human embryonic kidney 293*

I<sub>Ca</sub> : Courant calcique transitoire

I<sub>K</sub> : Courant potassique

I<sub>Na</sub> : Courant sodique transitoire

I<sub>NaL</sub> : Courant sodique persistant

K<sup>+</sup> : Ion potassium

KD : Knock-down

KO : Knock-out

Na<sup>+</sup> : Ion sodium

Na<sub>v</sub> : Canal sodique dépendant du potentiel

LSM : *Late scattered mode*

PA : Potentiel d'action

PBS : *Phosphate buffered saline*

PDK1 : *3-Phosphoinositide-Dependent protein kinase-1*

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine kinase C

PI3K : Kinase phosphatidylinositol de type 3

P<sub>o</sub> : Probabilité d'ouverture

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SGK : Kinases régulée par le sérum et les glucocorticoïdes

TAC : Constriction de l'aorte transverse

TTX : Tétrodotoxine

# Résumé

Les canaux sodiques dépendants du potentiel  $Na_v1.5$  sont responsables de l'initiation et de la propagation rapide des potentiels d'action cardiaques, et tout défaut de fonctionnement ou de régulation de ces canaux est à l'origine de diverses formes d'arythmies cardiaques. Bien que le rôle de la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  du canal  $Na_v1.5$  soit bien connu dans la régulation de l'expression et du fonctionnement du canal, la régulation des canaux  $Na_v1.5$  par la phosphorylation de ses protéines partenaires reste largement inexplorée. Une analyse phosphoprotéomique des complexes canaux  $Na_v1.5$  purifiés à partir de ventricules gauches de souris a été développée au laboratoire afin d'identifier les sites de phosphorylation des protéines partenaires du canal. Parmi elles, la protéine FHF2 (*Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 2*) a montré une forte phosphorylation au niveau de 9 sites spécifiques. Afin de déterminer les rôles fonctionnels de ces sites de phosphorylation dans la régulation des canaux  $Na_v1.5$ , nous avons développé deux modèles de cardiomyocytes en culture dans lesquels l'expression endogène de FHF2 est éteinte et restaurée à l'aide d'adénovirus par l'isoforme FHF2-VY sous sa forme sauvage (WT), phosphosilencieuse (mutations des sérines/thréonines d'intérêt en alanines) ou phosphomimétique (mutations en glutamates) dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés à partir de souris néonatales ou adultes. Le système d'expression hétérologue HEK-293 a également été utilisé en parallèle. Les analyses de voltage-clamp en configuration cellule entière ont démontré que l'extinction de FHF2 accélère l'inactivation des canaux  $Na_v$  à partir des états fermé et ouvert dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales et adultes. De façon intéressante, l'extinction de FHF2 déplace également la dépendance au potentiel de l'activation des canaux  $Na_v$  vers des potentiels hyperpolarisés dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux. Bien que la restauration de l'expression de FHF2-VY restaure les propriétés d'inactivation des canaux  $Na_v$  dans les deux modèles de cardiomyocytes, aucune réversion des propriétés d'activation n'a été obtenue dans les cardiomyocytes néonataux, suggérant l'implication potentielle d'une autre isoforme de FHF2 dans la régulation des propriétés d'activation des canaux  $Na_v$  néonataux. Cependant, malgré les nombreux phosphomutants testés, chacun d'entre eux a rétabli les propriétés d'inactivation des canaux  $Na_v$  de manière similaire au construit FHF2-VY sauvage dans les deux modèles de cardiomyocytes, ne permettant pas d'identifier les rôles des sites de phosphorylation du FHF2 nouvellement identifiés dans la régulation des canaux  $Na_v1.5$ . De manière similaire, aucun rôle des sites de phosphorylation n'a pu être révélé dans la régulation du courant sodique persistant dans les cardiomyocytes ventriculaires adultes. En conclusion, nos résultats démontrent que la protéine FHF2 est fortement phosphorylée dans le ventricule gauche de souris, confirment les rôles régulateurs de FHF2 dans la régulation des propriétés d'inactivation des canaux  $Na_v1.5$ , révèlent le rôle potentiel des isoformes de FHF2 dans la régulation des propriétés d'activation du canal, et suggèrent que la régulation des canaux par la phosphorylation de FHF2 est probablement très complexe.

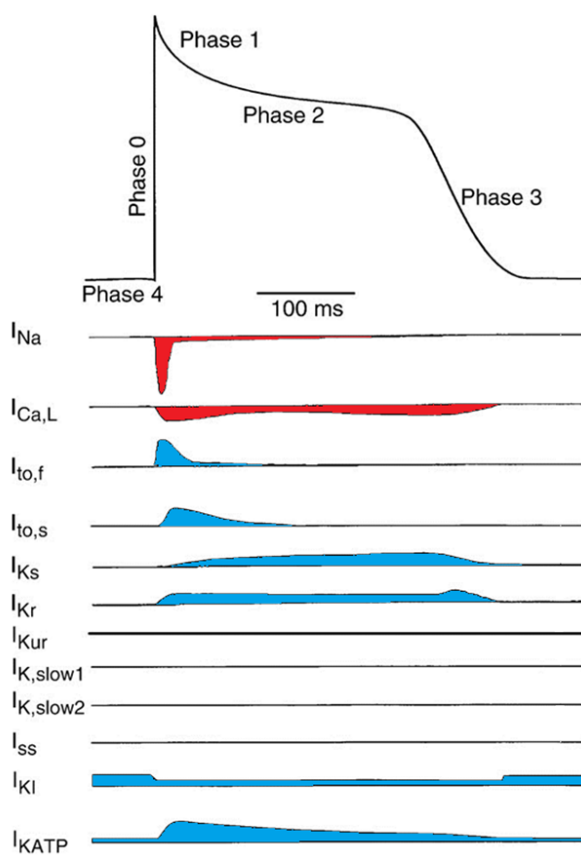






continue de circuler par les faisceaux de His et le réseau de Purkinje pour atteindre les deux ventricules (complexe d'ondes QRS sur l'ECG) et permettre leur contraction. Enfin, suite à l'excitation engendrée par le PA, les ventricules se repolarisent permettant de ce fait leur relaxation (onde T sur l'ECG).

La forme et la durée des PA diffèrent en fonction des régions du cœur, en raison de l'hétérogénéité de l'expression et des propriétés biophysiques, comme l'activation et l'inactivation, des différents types de canaux ioniques (**Figure 2**). Une entrée dans la cellule



**Figure 2 : Représentation schématique d'un PA ventriculaire humain et des courants ioniques qui lui sont associés.** Les courants entrants dépolarisants (en rouge) et les courants sortants repolarisant (en bleu) (d'après Nerbonne et Kass, 2005).

d'ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) va générer un courant entrant qui se caractérise par une dépolarisation membranaire. Au contraire, la sortie d'ions potassium ( $\text{K}^+$ ) va engendrer une repolarisation membranaire. Le potentiel d'action ventriculaire est composé de 5 phases bien distinctes. La phase de dépolarisation rapide (Phase 0) est générée par l'ouverture des canaux sodiques dépendants du potentiel ( $\text{Na}_v$ ), générant un courant sodique transitoire ( $I_{\text{Na}}$ ) qui dépolarise la membrane à un potentiel de l'ordre de +40 mV. Cette dépolarisation est suivie par une phase de dépolarisation rapide transitoire (Phase 1) caractérisée par la fermeture de la majorité des canaux sodiques, et l'ouverture partielle des canaux potassiques ( $I_{\text{to}}$ ). Survient ensuite la phase de plateau (Phase 2) dont l'équilibre entre les

courants sodiques persistants ( $I_{\text{NaL}}$ ), calcique de type L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) entrants et  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{Kr}}$  et  $I_{\text{Ks}}$ ) sortants permettent un équilibre électrique qui maintient le PA sur la durée. La phase plateau se termine par la fermeture de l'ensemble des canaux  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ouverture des canaux potassiques qui assurent une repolarisation membranaire (Phase 3). Pour finir, les myocytes

restent hyperpolarisés à un potentiel de repos proche des -80 mV (Phase 4) du fait d'une perméabilité supérieure de la membrane aux ions  $K^+$  ( $I_{K1}$ ). Dans une moindre mesure, le courant de sortie de la pompe Na/K ATPase participe au maintien du potentiel de membrane lors de la phase 4.

Le moindre changement d'expression et/ou d'activité d'un canal ionique peut modifier la forme et la durée du potentiel d'action cardiaque et avoir pour conséquence le développement de pathologies telles que des arythmies cardiaques ou des syndromes de mort subite (Remme et Bezina, 2010). Le courant  $I_{Na}$  est fréquemment impliqué dans des syndromes de Brugada (BrS) (Priori *et al.*, 2002) il est donc intéressant de comprendre le fonctionnement et les mécanismes de régulation de ces courants.

## II. Les courants ioniques

La valeur du potentiel membranaire dépend à chaque instant du rapport de force qui existe entre la somme des courants dépolarisants et repolarisants. Les courants ioniques cellulaires sont générés par le passage d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique d'une cellule, par l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques, et sont rendus possibles chaque fois que le potentiel de membrane est éloigné du potentiel d'équilibre d'un ion donné. Ce décalage s'appelle le gradient électrochimique.

Le potentiel d'équilibre d'un ion est une valeur de potentiel à laquelle l'ion en question cesse de diffuser à travers une membrane, car le gradient électrique, dû à l'accumulation de charges au niveau de la membrane, devient suffisant pour s'opposer au gradient de concentration. Ce potentiel peut être calculé par l'équation de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} * \ln \frac{[Ion]_{ext}}{[Ion]_{int}}$$
 avec E, le potentiel d'équilibre de l'ion, R, la constante des gaz parfaits ( $8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ), T, la température absolue ( $273^\circ + \text{Température en } ^\circ\text{C}$ ), F, la constante de Faraday (96500 coulombs/mol), z, la valence de l'ion et enfin  $[Ion]_{ext}$  et  $[Ion]_{int}$ , les concentrations extracellulaire et intracellulaire de l'ion étudié. Dans le cas du sodium,  $E_{Na} = +60 \text{ mV}$ , à des concentrations physiologiques (145 mM extra et 12 mM intra), à  $20^\circ\text{C}$ .

Une membrane plasmique permet le passage de plusieurs types d'ions. Il est donc nécessaire d'utiliser l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz qui correspond à la généralisation de l'équation de Nernst pour une membrane sujet à une somme de plusieurs types de conductance afin de calculer le potentiel de membrane :

$$E_m = \frac{RT}{F} * \ln \left( \sum_{cation} \frac{P_{ion}[Ion]_{ext}}{P_{ion}[Ion]_{int}} + \sum_{anion} \frac{P_{ion}[Ion]_{int}}{P_{ion}[Ion]_{ext}} \right) \text{ avec } P_{ion} \text{ la perméabilité de la}$$

membrane pour l'ion donné. Un cardiomyocyte au repos a une membrane plasmique essentiellement perméable au  $K^+$ , c'est pourquoi sa valeur est d'environ - 80 mV (Proche  $E_{K^+} = - 100 \text{ mV}$ ).

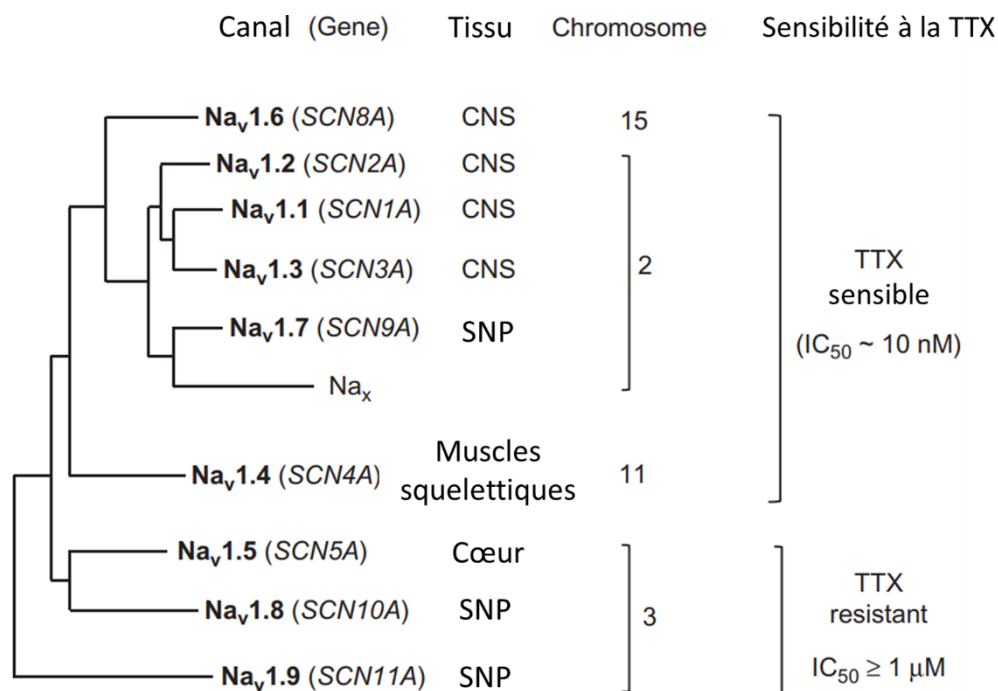
L'expression quantitative d'un courant dépend de la loi d'Ohm :

$I = G * (E_m - E_{ion})$  où I est l'intensité du courant (A), G est la conductance et  $E_m - E_{ion}$  la force électromotrice, soit la différence entre le potentiel de membrane et le potentiel d'équilibre de l'ion.

### III. Les canaux $Na_v$

Le passage des ions de part et d'autre de la membrane se fait par des protéines appelées canaux ioniques. Ces dernières sont des pores hydrophiles qui traversent la membrane lipidique permettant le passage des ions. Dans le cœur, les variations de potentiel de membrane sont à l'origine de l'ouverture des canaux ioniques. C'est pourquoi ils sont désignés comme des canaux ioniques dépendants du potentiel en opposition aux canaux ioniques dépendants, de la tension mécanique, du pH ou d'un ligand. Les canaux  $Na_v$  sont à l'origine de la capacité des cellules excitables à percevoir et à réagir rapidement à une modification de leur environnement électrochimique. La transmission synaptique neuromusculaire, les contractions musculaires squelettiques et cardiaques sont parmi les nombreux mécanismes dépendants du bon fonctionnement de ces canaux. Il existe 10 gènes codants pour les canaux  $Na_v$  (Yu et Catterall, 2003) portés par quatre chromosomes différents (Chr2, 3, 15, 11) (**Figure 3**). Parmi ces canaux, neuf d'entre eux sont exprimés dans le cœur humain (Zimmer *et al.*, 2014). Cependant, dans les cardiomyocytes des mammifères, le canal

Nav1.5 est l'isoforme majoritaire et est responsable de 80 à 90% de la densité de courant  $I_{Na}$  (Haufe *et al.*, 2005). Les canaux Nav1.1, Nav1.2 et Nav1.3 sont davantage exprimés dans le système nerveux central alors que Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9 le sont dans le système nerveux périphérique. Quant à Nav1.6, il est exprimé à la fois dans le système nerveux central et dans le système nerveux périphérique. Concernant Nav1.4, il s'agit de l'isoforme majoritaire présente dans les muscles striés squelettiques. L'expression de ces canaux n'est pas exclusive à un tissu, par exemple Nav1.4 est la troisième isoforme de Nav retrouvée au niveau cardiaque chez l'homme (Zimmer *et al.*, 2014). Actuellement, près de soixante-dix mutations héréditaires différentes de *SCN4A* codant pour Nav1.4 ont été mises en évidence chez l'homme, et bien que le rôle de Nav1.4 dans le cœur ne soit pas encore clairement établi, certains individus, atteints de dystrophie musculaire, présentent des défauts cardiaques tels qu'une repolarisation ventriculaire prolongée (Péréon *et al.*, 2003). Nav $\alpha$  aussi appelé Nav2.1 est à classer à part, car il s'agit d'un canal sodique qui n'est pas dépendant du potentiel et dont la structure est la plus atypique par rapport à l'ensemble des canaux Nav (Zimmer *et al.*, 2014). Une des caractéristiques fonctionnelles qui diverge entre les différentes isoformes de Nav est leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX) (**Figure 3**). Deux groupes se distinguent, les canaux TTX sensibles (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6, Nav1.7 et Nav $\alpha$ ) et les canaux TTX résistants (Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9) (Wang *et al.*, 2017). La différence structurelle du pore des canaux TTX sensibles (possédant un résidu aromatique facilitant la liaison à la TTX) et des canaux TTX résistants (possédant un résidu non aromatique ne pouvant pas lier la TTX) fait que cette toxine est un outil privilégié dans la distinction des isoformes de Nav. Cette toxine a permis d'étudier les éléments structurels critiques dans le pore des Nav et de différencier les courants  $I_{Na}$  des courants  $I_K$  et  $I_{Ca}$  (Zimmer *et al.*, 2014).



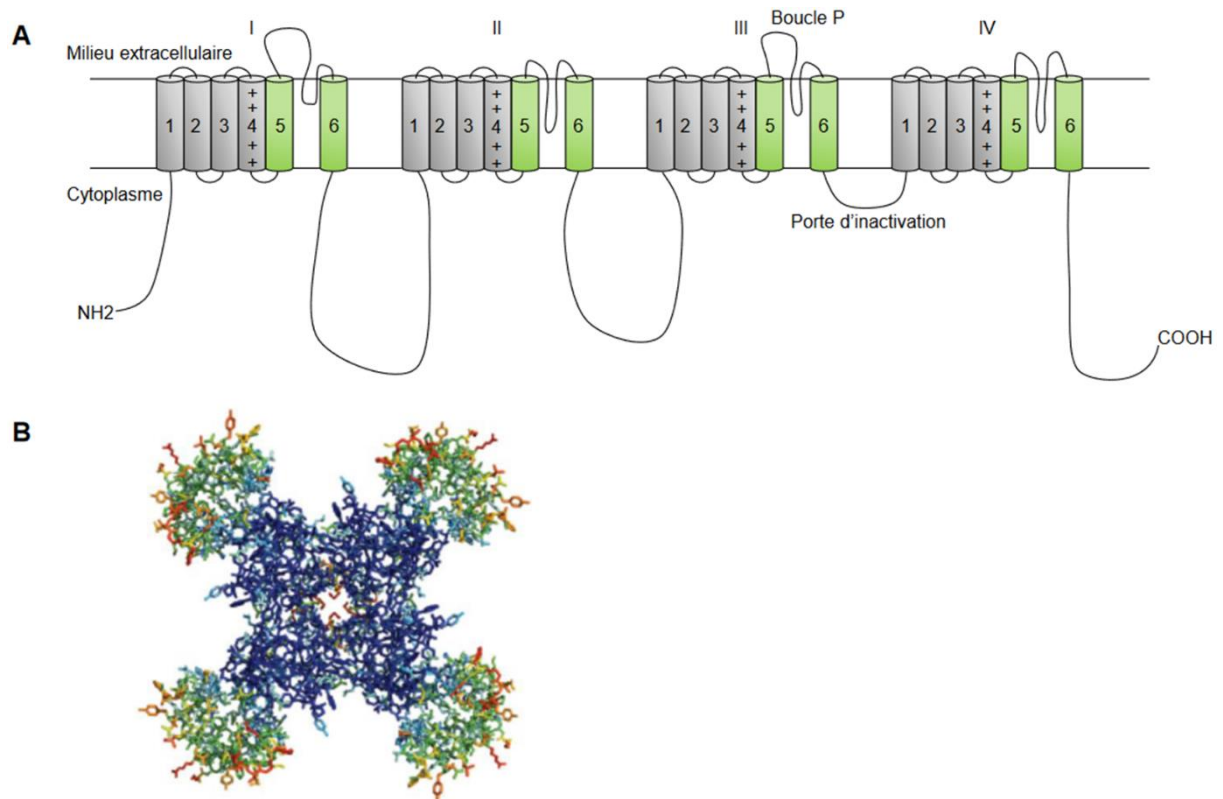
**Figure 3 : Arbre phylogénétique des canaux Na<sub>v</sub> chez l’homme avec leur localisation dans les tissus, sur les chromosomes et leur sensibilité à la TTX. (CNS) Système nerveux centrale, (SNP) Système nerveux périphérique (Modifié d’après Zimmer et al., 2014).**

## IV. Les canaux Na<sub>v</sub>1.5 cardiaques

### 1. Structure

Le canal sodique cardiaque Na<sub>v</sub>1.5, codé par le gène *SCN5A*, est une protéine glycosylée de 220 kDa organisée en quatre domaines transmembranaires chacun constitué de six segments hydrophobes (S1 à S6) qui lorsqu’ils se replient forment un pore perméable aux ions sodium. Les segments S1 à S4 forment les domaines sensibles au potentiel. Les segments S1 à S3 forment le centre de transfert de charges et le segment S4, porteur de nombreux acides aminés chargés positivement (le plus souvent une arginine), confère la sensibilité au potentiel au canal. En fonction des variations de potentiel de membrane, les domaines sensibles au voltage S1-S4 changent de conformation pour permettre l’ouverture ou la fermeture du pore du canal (Catterall, 2012). Les segments S5 et S6 quant à eux forment le pore et les boucles P les reliant déterminent la sélectivité aux ions Na<sup>+</sup> (**Figure 4**). La sous-unité  $\alpha$  forme donc à elle seule un canal fonctionnel et détermine ses propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques (Pincin *et al.*, 2005). Les canaux sodiques Na<sub>v</sub> sont associés à une ou plusieurs sous-unités auxiliaires appelées  $\beta$  qui influencent l’expression

membranaire du canal par le biais d'interactions avec la matrice extracellulaire et le cytosquelette intracellulaire (Calhoun *et al.*, 2014).



**Figure 4 : Structure du canal Nav1.5.** (A) Représentation schématique du canal Nav1.5 avec les 4 domaines transmembranaires (DI, DII, DIII et DIV). Les + désignent les segments S4 sensibles au voltage. Les segments en vert représentent les segments S5 et S6 qui forment le pore du canal et la boucle P détermine la sélectivité aux ions Na<sup>+</sup>. La boucle reliant les DIII/IV est impliquée dans l'inactivation du canal. (B) Structure cristallographique d'un canal bactérien NavAb avec au centre son pore visible (Catterall, 2012).

## 2. Localisation tissulaire

Le canal Nav<sub>v</sub>1.5 est retrouvé dans de nombreux types cellulaires, participant à la régulation et à l'activité de contraction musculaire, tels que les cellules endothéliales vasculaires et musculaires lisses bronchiques (Andrikopoulos *et al.*, 2011; Bradley *et al.*, 2013). Ce canal est toutefois exprimé dans d'autres types cellulaires comme les lymphocytes, les macrophages, les astrocytes et même dans des cellules cancéreuses (Black et Waxman, 2013). L'utilité du canal Nav<sub>v</sub>1.5 ne se restreint pas seulement à réguler le potentiel de membrane des cellules, mais semble plus polyvalente dans les cellules non excitables. C'est le cas par exemple dans les macrophages dont la régulation de l'acidification endosomale implique le canal Nav<sub>v</sub>1.5 (Michael, 2007). Toutefois, le canal Nav<sub>v</sub>1.5 est le plus souvent étudié dans les cellules cardiaques, en particulier dans les cardiomyocytes.

Dans un cardiomyocyte adulte, le canal Nav<sub>v</sub>1.5 est exprimé de manière hétérogène. Des études d'immunohistochimie, de RT-PCR et d'hybridation *in situ* ont montré une répartition inégale du Nav<sub>v</sub>1.5 dans le tissu cardiaque. En effet, l'expression du canal est faible au niveau des nœuds sinusal et atrio-ventriculaire alors que son expression est plus marquée en périphérie des nœuds et au niveau des faisceaux de His et des fibres de Purkinje. Cette expression organisée différemment entre les régions est en partie responsable de la variabilité existante dans la forme des PA, mais cela suggère également l'importance de Nav<sub>v</sub>1.5 dans la conduction atriale et ventriculaire (Remme *et al.*, 2009).

À l'échelle d'un cardiomyocyte adulte, Nav<sub>v</sub>1.5 est majoritairement retrouvé à la membrane, mais la répartition sur cette dernière est elle aussi inégale. En effet, l'expression de Nav<sub>v</sub>1.5 est privilégiée au niveau des disques intercalaires comparés à la membrane latérale (Maier *et al.*, 2004). La régionalisation de Nav<sub>v</sub>1.5 semble donc indiquer le rôle primordial que joue ce canal dans l'initiation et la propagation du PA cardiaque.

## 3. Activité canalaire

À la membrane, le canal Nav<sub>v</sub>1.5 peut changer d'états de conformations et ainsi osciller entre un état fermé (F), un état ouvert (O) et un état inactivé (I). Ce sont des états dynamiques

dont la probabilité de changement est conditionnée aux variations du potentiel de membrane. Lorsque le canal passe de l'état fermé à l'état ouvert, on parle alors d'activation du canal. Lorsqu'il passe de l'état ouvert à inactivé, on parle d'inactivation. Lorsqu'il passe de l'état inactivé à l'état fermé, on parle de levée d'inactivation ou réactivation. Et enfin, lorsqu'il passe de directement de l'état fermé à inactivé, on parle d'inactivation à partir de l'état fermé.

L'activation du canal  $Na_v1.5$  est dépendante du potentiel par la sensibilité électrique du segment S4. Dans des conditions de repos, ce segment est maintenu ancré dans la membrane par son interaction avec les charges négatives présentes dans les segments S1, S2 et S3. Cela permet de maintenir le canal  $Na_v1.5$  dans un état fermé. Lors d'une dépolarisation membranaire, une accumulation de charges positives a lieu sous la membrane, ce qui induit une poussée électrique du segment S4 de l'intérieur vers l'extérieur entraînant dans sa direction les segments S5 et S6. Ce changement de conformation s'accompagne d'une ouverture rapide (<1 ms) du canal par le mouvement des segments S5 et S6, formant ainsi un pore perméable aux ions sodium (Yu et Catterall, 2003). Cette activation se traduit par la génération d'un courant  $I_{Na}$ . Dans un cardiomyocyte, le flux de sodium n'est pas porté exclusivement par les canaux  $Na_v1.5$ , seul 80 à 90% sont attribuables au canal  $Na_v1.5$  en fonction des modèles (Kaufmann *et al.*, 2013). Le seuil de potentiel à partir duquel les canaux  $Na_v1.5$  cardiaques peuvent s'activer est de l'ordre de -50 mV. À partir de ce potentiel, une proportion de canaux  $Na_v1.5$  va s'activer et cette proportion est accrue à des potentiels de plus en plus dépolarisés jusqu'à atteindre une conductance maximum ( $G_{max}$ ) à approximativement 10 mV. Cette relation entre dépendance au potentiel et activation suit une loi de Boltzman simplifiée et peut être enregistrée par la méthode de patch-clamp en configuration cellule entière. Si l'on applique un potentiel de maintien à -120 mV suivi de dépolarisations successives de plus en plus fortes, il est possible d'activer certains canaux  $Na_v1.5$  et ainsi, d'étudier leur probabilité d'ouverture ( $P_o$ ).

En parallèle de cette activation, un phénomène légèrement plus lent (1-2 ms) d'inactivation (Catterall, 2014), dite rapide, survient dont l'initiateur est le segment S4 du domaine IV. Lors du mouvement de ce segment par le processus d'activation, la boucle entre les domaines III et IV va également se déplacer et obstruer physiquement le pore nouvellement formé sur sa face interne. Le domaine IFM (Isoleucine, Phénylalanine et

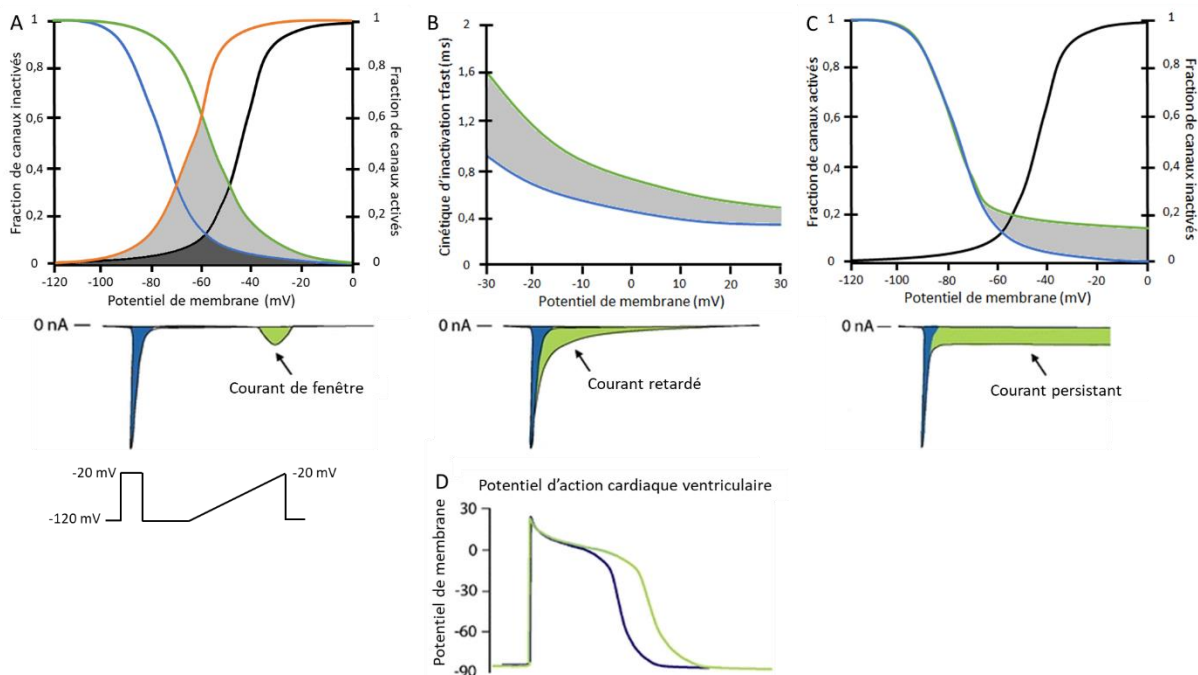


Méthionine en positions 1488-1490) est central dans ce mécanisme de par la capacité qu'il confère à la boucle de se replier dans le pore, permis notamment par l'interaction du domaine IFM avec les boucles intracellulaires des segments S4 et S5 des domaines DIII et DIV (Catterall, 2014). Le rôle dans l'inactivation rapide de l'extrémité C-terminale des canaux a également été démontré. En effet, cette région du canal participe à la stabilisation de l'inactivation par son interaction avec la boucle reliant les domaines III/IV empêchant ainsi la réouverture du canal (Motoike *et al.*, 2004). Ce mécanisme d'inactivation permet de refermer le pore quelques ms après son ouverture afin de permettre la génération d'un courant  $I_{Na}$  transitoire. L'inactivation est elle aussi dépendante du potentiel de membrane, mais à des potentiels bien plus hyperpolarisés que pour l'activation. Il est donc possible pour certains canaux de passer directement de l'état fermé à l'état inactivé. Ainsi, pour un cardiomyocyte dont le potentiel de membrane est de -80 mV environ 20 % des canaux  $Na_v1.5$  sont déjà inactivés (Harris *et al.*, 1991). On parle alors de disponibilité des canaux. Une fois la membrane repolarisée, les canaux  $Na_v1.5$  passent de l'état inactivé à l'état fermé afin d'être de nouveau disponibles pour dépolariser la membrane en générant un nouveau courant  $I_{Na}$ . On parle alors de temps de levée d'inactivation. Avant cela, l'impossibilité des canaux à se rouvrir du fait de leur maintien dans un état inactivé se caractérise au niveau d'un cardiomyocyte par une période réfractaire qui ne permet pas la génération d'un nouveau PA.

L'inactivation rapide est le mécanisme le mieux connu et le mieux décrit, mais il existe trois autres composantes de l'inactivation : l'inactivation intermédiaire, lente et ultra-lente. Cependant encore aujourd'hui, les fonctionnements structurels de ces mécanismes demeurent mal connus et sont souvent retrouvés dans la littérature sous la dénomination générique d'inactivation lente. Quelques pistes existent concernant le fonctionnement de ces mécanismes d'un point de vue structural. L'utilisation de méthodes d'analyses structurales et de mutants au niveau du filtre de sélectivité du canal ont montré l'importance des hélices P1 et P2 dans l'inactivation lente et ultra-lente (Chatterjee *et al.*, 2018 ; Todt *et al.*, 1999). Le muscle cardiaque étant sujet à des dépolarisations régulières et courtes, l'inactivation lente n'est jamais complète contrairement à ce que l'on peut observer dans le muscle strié squelettique (Vilin *et al.*, 1999) et cela peut conduire à la génération de courant sodique persistant ayant une grande importance dans la régulation d'un PA cardiaque.

## 4. Courant sodique persistant

À la fin de la phase 1 du PA cardiaque, la majorité des canaux sodiques ont pu s'ouvrir puis s'inactiver en générant ainsi un courant sodique transitoire. Ces canaux ne pourront se rouvrir qu'à la fin de la période réfractaire du PA lors de la phase 4. Cependant, une faible proportion des canaux sodiques va rester ouverte ou se rouvrir (moins de 1%) lors des phases 2 et 3 du PA et générer un courant sodique persistant  $I_{NaL}$ . Il existe plusieurs types de courants sodiques persistants, qui sont classés en deux catégories en fonction du mécanisme à l'origine de leur génération (**Figure 5**).

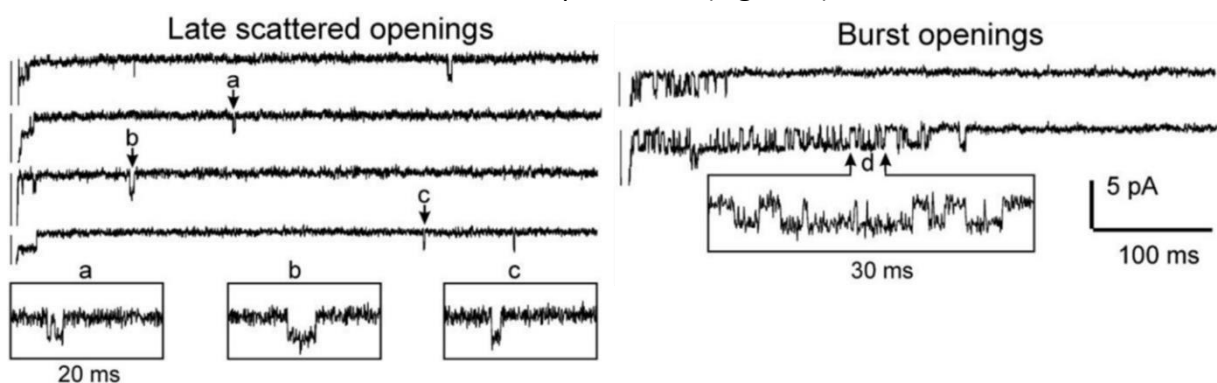


**Figure 5 : Illustration des mécanismes à l'origine des courants de fenêtre, retardés et persistants.** (A) Le décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels dépolarisés (courbe verte) ainsi que le décalage de la courbe d'activation vers des potentiels hyperpolarisés (courbe orange) induit une augmentation du courant de fenêtre (zones grisées). (B) Ralentissement de la cinétique d'inactivation rapide induit une augmentation du courant sodique retardé (zone grisée). (C) Phénomène d'inactivation incomplète qui peut être la cause d'un courant sodique persistant. (D) Les courants sodiques persistants rallongent la durée d'un PA cardiaque. (d'après Amin et al., 2009)

Le premier est le courant de fenêtre « *window current* » qui correspond graphiquement à la gamme de potentiel où se croisent les courbes d'inactivation et d'activation du canal (Zaza et Rocchetti, 2013). Dans cet intervalle, l'activation est possible et l'inactivation incomplète, c'est pourquoi, lorsque le potentiel de membrane atteint cette

gamme de potentiel, une proportion des canaux Nav1.5 peut être réactivé et se rouvrir pour générer, de nouveau, un courant sodique. Trois mécanismes peuvent expliquer une augmentation du courant de fenêtré : un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés. Un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés. Et le mécanisme du « *non equilibrium gating* » (Chadda *et al.*, 2017) qui fait suite à une accélération de la levée d'inactivation des canaux et c'est un phénomène qui n'est pas enregistrable par des protocoles à l'état d'équilibre (Clancy *et al.*, 2003). L'augmentation du courant de fenêtré est souvent décrite comme un acteur pouvant être corrélé à diverses activités arythmogènes. Par exemple, des mutations du canal Nav1.5 ont été décrites comme responsables de syndromes de QT long de type 3 notamment par l'intermédiaire d'une augmentation de l'amplitude et de la gamme de potentiel du courant de fenêtré (Wehrens *et al.*, 2003).

Le second est le courant sodique retardé qui correspond à la fraction de canaux Nav1.5 qui reste ouverte ou se rouvre lors des phases 2 et 3 d'un PA cardiaque. C'est un courant très faible (environ 0.1% du courant au pic) et la dépendance au potentiel de ce courant  $I_{NaL}$  est semblable à celle du courant transitoire, mais son inactivation est bien plus étendue dans le temps (centaines de ms) (Maier et Sossalla, 2013). La génération du courant sodique retardé suit deux mécanismes différents : le « *burst opening mode* » (BM) et le « *late scattered mode* » (LSM) (Maltsev et Undrovinas, 2008). Le BM correspond à des canaux, alternant fréquemment entre les états ouverts et inactivés avant de s'inactiver complètement. Le LSM quant à lui concerne des canaux dont l'inactivation est très lente (1 s) et qui peuvent se rouvrir de manière aléatoire avant de s'inactiver complètement (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Description des différents modèles d'inactivations à l'origine des courants sodiques retardés. À gauche le « *Late scattered openings mode* » et à droite le « *Burst opening mode* ». Les résultats ont été obtenus sur des cellules HEK293 par la technique de patch-clamp en configuration Cell-attached avec un potentiel de maintien à  $-130$  mV et des impositions de potentiel à  $-30$  mV (Undrovinas *et al.*, 2002).

Chacun de ces deux mécanismes participe à la génération et au maintien du  $I_{NaL}$ , mais à des proportions différentes au cours du PA. Le BM est le principal moteur du  $I_{NaL}$  au début du PA, mais décroît au cours du temps contrairement au LSM dont l'implication s'accroît dans le temps. Si le courant transitoire  $I_{Na}$  est en grande partie généré par l'activation des canaux  $Na_V1.5$ , l'origine du  $I_{NaL}$  est plus complexe. En effet, le  $I_{NaL}$  n'est pas porté exclusivement par le canal  $Na_V1.5$ , mais par les canaux  $Na_V$  de manière plus générale. Ainsi, certaines études estiment que la participation des canaux dit neuronaux ( $Na_V1.1$ ,  $Na_V1.2$ ,  $Na_V1.3$  et  $Na_V1.6$ ) est de près de 40 % du courant dans des cardiomyocytes ventriculaires de lapin et de chien (Yang *et al.*, 2012 Mishra *et al.*, 2015). Cependant, des travaux utilisant les différences de sensibilité des canaux  $Na_V$  à la TTX, ont permis de démontrer le rôle central du canal  $Na_V1.5$  dans la génération de  $I_{NaL}$ , dans les cellules tsA201 (Maltsev *et al.*, 2009). De plus, des mutants de  $Na_V1.5$  ont permis d'établir des liens entre divers troubles du rythme et une augmentation du  $I_{NaL}$  (Wei Kang *et al.*, 2021) marquant davantage l'importance de  $Na_V1.5$  dans l'origine du  $I_{NaL}$ .

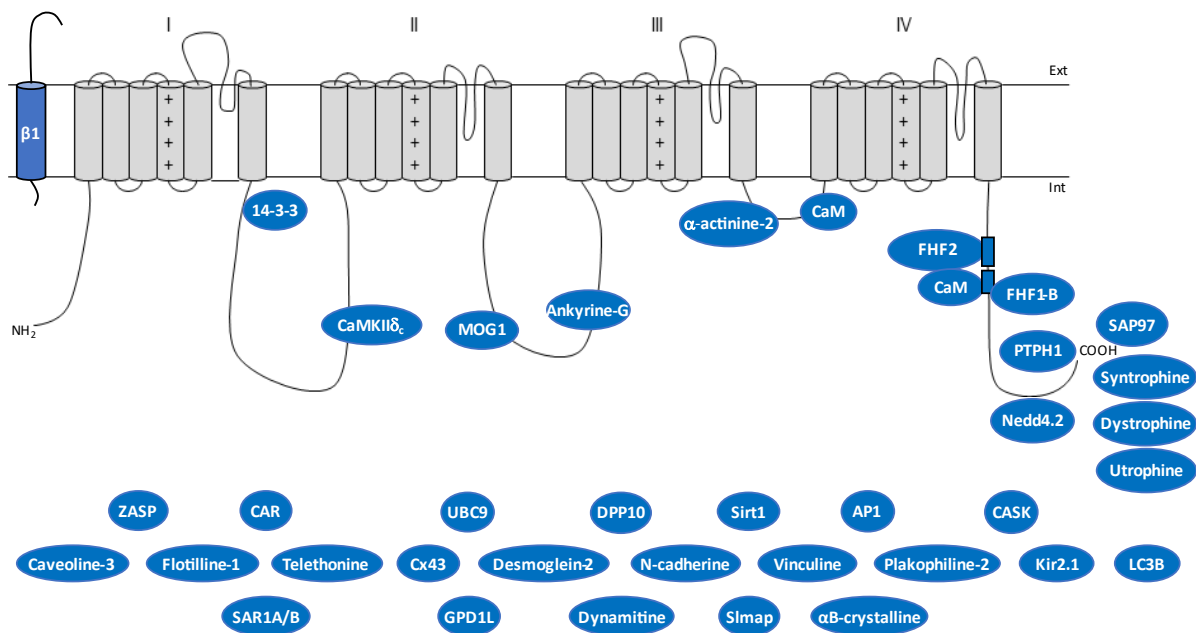
Ces différents types de courants persistants,  $I_{NaL}$  et courants de fenêtre, sont donc très différents dans leur mécanisme de fonctionnement. Ils ont tous deux des caractéristiques communes qui, lorsqu'ils sont modifiés, les impliquent dans des pathologies de types arythmiques qui surviennent lors des phases 2 et 3 d'un PA. Ils vont, à l'opposé de l'action des courants potassiques repolarisant, maintenir une dépolarisation membranaire, prolongeant ainsi le PA, ce qui peut conduire à des posts-dépolarisations précoces et des torsades de pointes (Yan *et al.*, 2001).

## V. Régulation du canal $Na_V1.5$ cardiaques par les protéines partenaires

### 1. Complexes protéiques $Na_V1.5$ cardiaques

Le canal  $Na_V1.5$  à lui seul forme un pore capable de générer un courant  $I_{Na}$  transitoire et dont la moindre variation peut avoir de lourdes conséquences sur l'activité contractile et rythmique cardiaque. De ce fait, le canal  $Na_V1.5$  n'est pas isolé à la membrane, car un

ensemble de protéines partenaires, par liaison directe ou indirecte, forment avec lui un complexe macromoléculaire qui participe à la régulation de son activité intrinsèque, à sa stabilité, à sa localisation membranaire et à la communication intercellulaire (**Figure 7**). De plus, la composition des protéines de ce complexe varie au niveau subcellulaire. Par exemple, Nav<sub>v</sub>1.5 interagit avec le complexe syntrophine/utrophine, ce qui participe à son adressage au niveau de la membrane latérale du cardiomyocyte (Albesa *et al.*, 2011) alors qu'il est ancré au niveau des disques intercalaires par son interaction avec SAP97 (Petitprez *et al.*, 2011). Des régulations post-traductionnelles peuvent affecter la composition des complexes moléculaires comme c'est le cas de la protéine Nav<sub>v</sub>β1, dans un cardiomyocyte. Si elle est phosphorylée au niveau de sa tyrosine T181, elle est retrouvée au niveau des disques intercalaires alors que sa forme non phosphorylée n'est présente qu'au niveau des tubules-T (Malhotra *et al.* 2004).



**Figure 7 : Représentation schématique du complexe canalaire macromoléculaire de Nav<sub>v</sub>1.5.** Les protéines partenaires dont le site d'interaction avec Nav<sub>v</sub>1.5 est connu sont placées sur le schéma.

Les sous-unités régulatrices Nav<sub>v</sub>β1 à Nav<sub>v</sub>β4 codées par les gènes *SCN1B* à *SCN4B* sont mieux décrites aujourd'hui depuis le premier clonage de la séquence de Nav<sub>v</sub>β1 en 1992 (Isom *et al.*, 1992). Elles sont composées d'un domaine transmembranaire avec une courte séquence C-terminale et un long domaine N-terminal de la famille des immunoglobulines qui est notamment impliqué dans les processus d'adhésion (Isom et Catterall, 1996), en facilitant

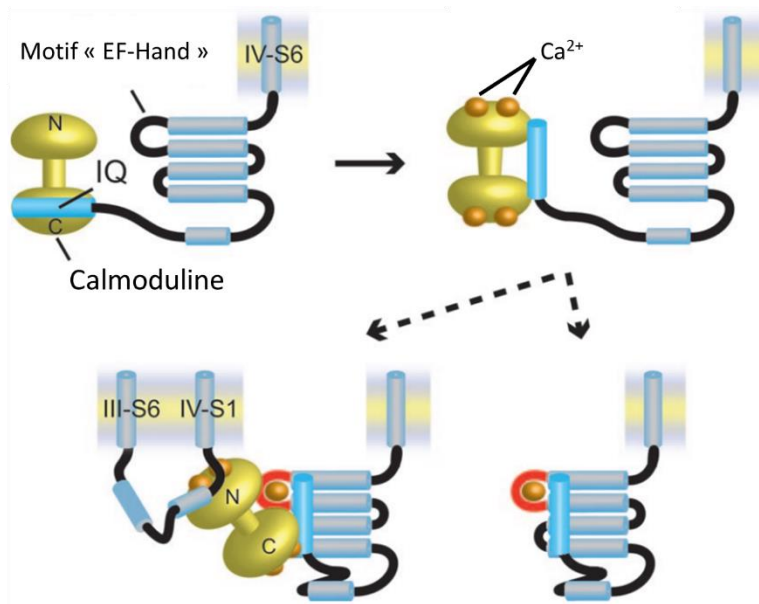
par exemple l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire et avec le cytosquelette ou en régulant les processus de migration (Isom, 2002). Elles sont toutes exprimées dans les cellules cardiaques et sont connues pour leur participation à la modulation des propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  et de la densité des courants  $I_{Na}$  (Dong *et al.*, 2020). La sous-unité  $\beta 1$  est connue pour réguler  $Na_v 1.5$  soit en se liant directement au canal (Malhotra *et al.*, 2001) soit indirectement via l'ankyrine B (Malhotra *et al.*, 2000). Ses effets sur le courant sont encore discutés aujourd'hui, mais il semblerait que dans des modèles d'expression hétérologue, la sous-unité  $\beta 1$  induise une augmentation de la densité de courant  $I_{NaL}$  (Maltsev *et al.*, 2009). Mais encore, certaines études dans des modèles murins ont montré que l'absence de cette sous-unité a aussi pour effet d'augmenter la densité de courant  $I_{Na}$  (Lin *et al.*, 2015) en plus de diminuer la densité de courant  $I_{NaL}$  (Lopez-Santiago *et al.*, 2007) dont les conséquences sont un allongement de l'intervalle QT. Cette sous-unité  $\beta 1$  est aussi directement responsable d'un BrS (Holst *et al.*, 2012), de troubles de la conduction et de fibrillation atriale renforçant de ce fait l'hypothèse selon laquelle  $Na_v \beta 1$  apporte un gain de fonction pour  $Na_v 1.5$  (Watanabe *et al.*, 2008 et 2009).

Les autres sous-unités  $\beta$  sont elles aussi connues pour réguler l'activité du canal  $Na_v 1.5$ .  $Na_v \beta 2$  présente globalement les mêmes effets que  $Na_v \beta 1$  dans le cœur sur la densité de courant, mais il est exprimé essentiellement au niveau des disques intercalaires (Maier *et al.*, 2004). Pour  $Na_v \beta 3$ , son absence dans des modèles murins accroît la densité de courant  $I_{Na}$  (Hakim *et al.*, 2008). De plus, des mutations du gène *SCN3B* sont impliquées dans le BrS et des cas de fibrillation atriale et ventriculaire (Adsit *et al.*, 2013). Enfin, la co-expression de  $Na_v 1.5$  et de  $Na_v \beta 4$  induit un décalage de la courbe d'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés dans les cellules HEK-293. De plus, une mutation de cette sous-unité a pu être désignée comme responsable de syndrome du QT long du fait d'une augmentation du courant sodique retardé (Medeiros-Domingo *et al.*, 2007).

Les sous-unités  $\beta$  ne sont pas les seules protéines interagissant avec le canal  $Na_v 1.5$ . En effet, des approches de protéomique et les études d'interaction ont permis à ce jour d'identifier près de quarante protéines susceptibles d'être des protéines partenaires directes ou indirectes de  $Na_v 1.5$ . Par exemple, l'ankyrine G, MOG1 et l' $\alpha$ -actinine-2 interagissent avec le canal au niveau des boucles reliant les domaines DII, DIII et DIV et ont pour effet de réguler

l'adressage du canal à la membrane (Mohler *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2008 ; Ziane *et al.*, 2012). À l'inverse, la protéine Nedd4.2, qui interagit avec l'extrémité C-terminale du canal, ubiquitinye Nav1.5 et permet son internalisation (Van Bemmelen *et al.*, 2004). D'autres protéines ont des rôles plus complexes telle que la protéine 14-3-3 qui, dans un premier temps, était connue pour son effet régulateur de l'inactivation (Allouis *et al.*, 2006 ; Jespersen *et al.*, 2006), mais qui récemment aurait été identifiée comme un médiateur essentiel de la dimérisation des sous-unités Nav1.5 (Clatot *et al.*, 2017). D'autres types de canaux Kir2.1 et Kir2.2 avaient déjà été décrits comme interagissant avec Nav1.5. La co-expression du canal Kir2.1 a pour conséquence d'augmenter la densité de courant  $I_{Na}$  par un renforcement de l'adressage de Nav1.5 à la membrane, mais sans affecter les propriétés biophysiques du canal sodique (Ponce-Balbuena *et al.*, 2018). Le domaine de liaison PDZ au niveau de l'extrémité N-terminale semble à l'origine de ce mécanisme par sa liaison avec l' $\alpha$ 1-syntrophine et agirait comme une protéine chaperonne pour augmenter l'adressage des Nav1.5, Kir2.1 et Kir2.2 (Matamoros *et al.*, 2016). La connexine 43 est aussi un partenaire privilégié de Nav1.5, car celle-ci permet de renforcer la propagation de l'influx électrique et a été décrite comme établissant des interactions covalentes avec Nav1.5 (Agullo Pascual *et al.*, 2014).

En plus des autres canaux, l'activité du canal Nav1.5 est susceptible d'être régulée par les ions eux-mêmes. Le calcium  $Ca^{2+}$  a un rôle central dans cette régulation puisqu'il a été montré que l'extrémité C-terminale des canaux Nav1.5 dispose d'un site de liaison du  $Ca^{2+}$  de type « *EF-hand* » (Wingo *et al.*, 2004). Plusieurs études ont mis en évidence que l'augmentation de concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire induit un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés (Wingo *et al.*, 2004 ; Biswas *et al.*, 2009 ; Potet *et al.*, 2009). De plus, cet effet persiste malgré l'utilisation d'un antagoniste de la calmoduline, et au contraire la mutation du site « *EF-hand* » de Nav1.5 induit la perte de cet effet (Wingo *et al.*, 2004). Cependant, ce rôle direct du  $Ca^{2+}$  sur la régulation du canal Nav1.5 fait encore débat. Des études plus récentes n'ont pas permis d'observer de modification d'activité de Nav1.5 lors de variations de concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Kim *et al.*, 2004 ; Ben-johny *et al.* 2014 ; Kang *et al.*, 2021). Les effets observés seraient selon eux dus à la fixation du  $Ca^{2+}$  sur une autre protéine partenaire de Nav1.5, la calmoduline. Cette dernière est bien connue pour interagir avec le motif IQ localisé sur l'extrémité C-terminale et la boucle reliant le domaine DIII/IV dont le rôle dans l'inactivation rapide a déjà été décrit



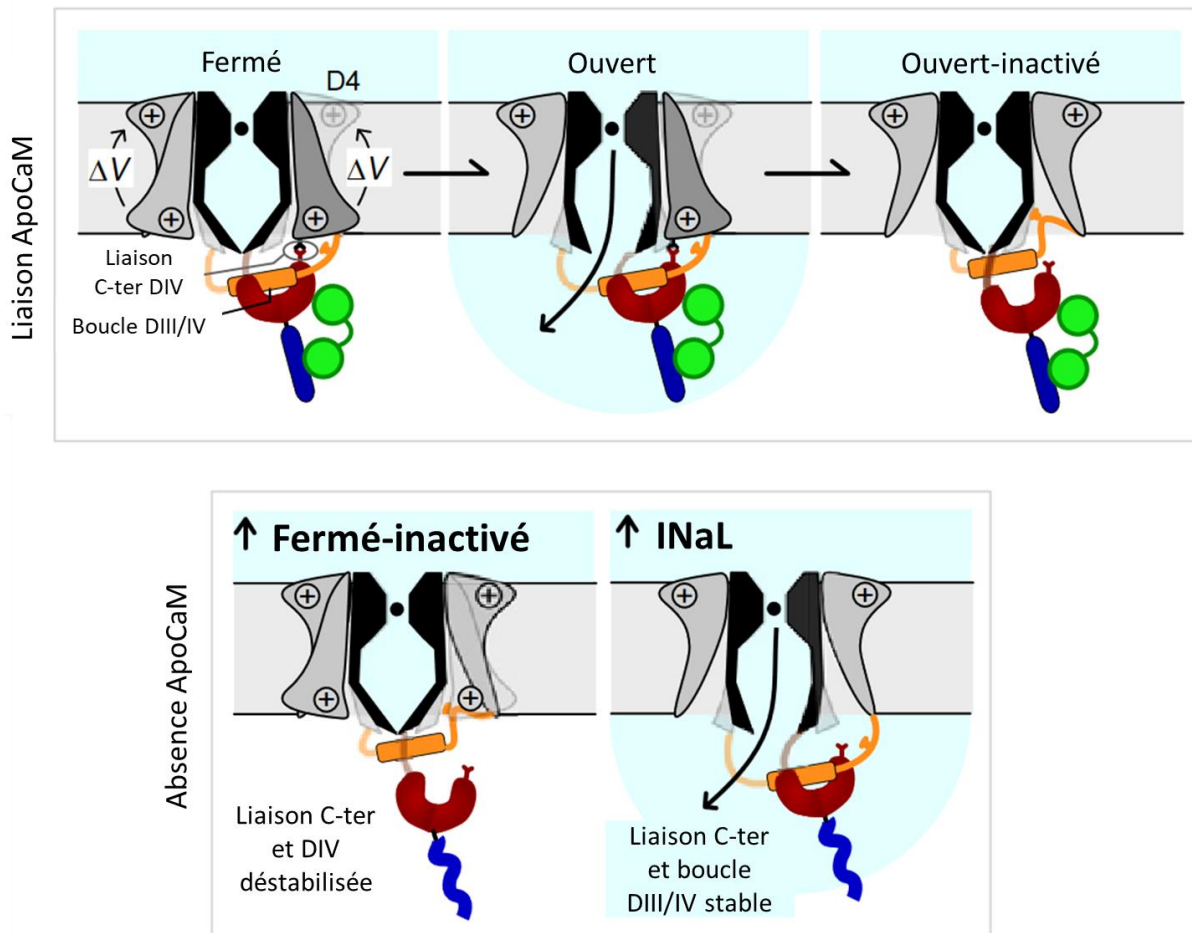
**Figure 8 : Illustration schématique d'un potentiel modèle décrivant l'action du  $Ca^{2+}$  et de la CaM sur le canal  $Nav_{1.5}$ . L'ApoCaM se lie au motif IQ, mais la  $Ca^{2+}/CaM$  se délie pour se fixer préférentiellement sur la boucle DIII/IV et permet au  $Ca^{2+}$  de se fixer sur le motif « EF-hand ». (Shah et al., 2006)**

(Page 22-23). De plus, cette protéine dispose dans sa séquence de quatre sites « EF-hand ». Elle existe donc principalement sous deux formes, celle liant le  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}/CaM$  ou holo- $CaM$ ) et celle ne le liant pas (ApoCaM). Cela lui permet de se comporter comme un véritable senseur des variations de concentrations de  $Ca^{2+}$  en lui conférant une certaine plasticité dans ses interactions avec de nombreuses protéines

partenaires (Hoeflitch et Ikura, 2002). Son rôle sur l'effet observé entre  $Nav_{1.5}$  et le  $Ca^{2+}$  serait donc celui d'un intermédiaire. D'une part, à faible concentration de  $Ca^{2+}$ , la calmoduline est liée au motif IQ, mais peut changer de conformation si la concentration en  $Ca^{2+}$  augmente afin de partiellement se décrocher et interagir avec la boucle DIII/IV, ce qui expliquerait les changements apportés par le  $Ca^{2+}$  sur les propriétés d'inactivation de  $Nav_{1.5}$  (Shah et al., 2006). D'autre part, le motif IQ délié de la CaM pourrait se lier au motif « EF-hand » pour augmenter son affinité au  $Ca^{2+}$  expliquant ainsi le mécanisme de sensibilité au  $Ca^{2+}$  des canaux  $Nav_{1.5}$  (Figure 8). Ces divergences d'opinions dans la littérature concernant les incohérences de résultats obtenus entre les différents travaux illustrent bien la complexité dans la régulation des  $Nav_{1.5}$  par ses partenaires.



De plus, l'ApoCaM disposerait de deux effets bien distincts sur le canal. Le premier, est considéré comme un gain de fonction avec une augmentation de la  $P_o$  du canal sodique qui a pour conséquence une augmentation de la densité de courant  $I_{Na}$  (Kang *et al.*, 2021). Et le second, est considéré comme une perte de fonction, dont l'effet est une diminution du courant sodique persistant (Kang *et al.*, 2021 ; Yan *et al.*, 2017). La description de ce mécanisme a été permise par l'utilisation d'une forme mutée sur le motif IQ de Nav1.5 (IQ/AA) rompant ainsi la liaison du canal avec la CaM. Concernant l'effet gain de fonction sur la  $P_o$  du canal, au potentiel de membrane, la CaM stabilise l'interaction entre le DIV et le domaine C-terminal qui par positionnement allostérique favorise l'interaction de l'extrémité C-terminale avec la boucle DIII/IV. Une inhibition de liaison entre l'ApoCaM et le Nav1.5 (IQ/AA) a pour conséquence une perte de cette interaction. De cette perte résulte une translocation prématurée du motif IFM, ce qui augmente l'inactivation depuis l'état fermé. Lorsque la CaM est présente, une dépolarisation membranaire provoque le déplacement du DIV vers l'extérieur et affaiblit sa liaison avec l'extrémité C-terminale, ce qui à son tour perturbe son interaction avec la boucle DIII/IV. Le motif IFM est par conséquent libéré et peut inactiver le canal. Dans une moindre mesure, le motif IFM peut ne pas atteindre sa cible en absence de CaM car le mécanisme de libération de la boucle DIII/IV de l'extrémité C-terminale ne se fait pas (**Figure 9**). C'est cela qui pourrait induire cette augmentation d' $I_{NaL}$  sur le mutant Nav1.5 IQ/AA.



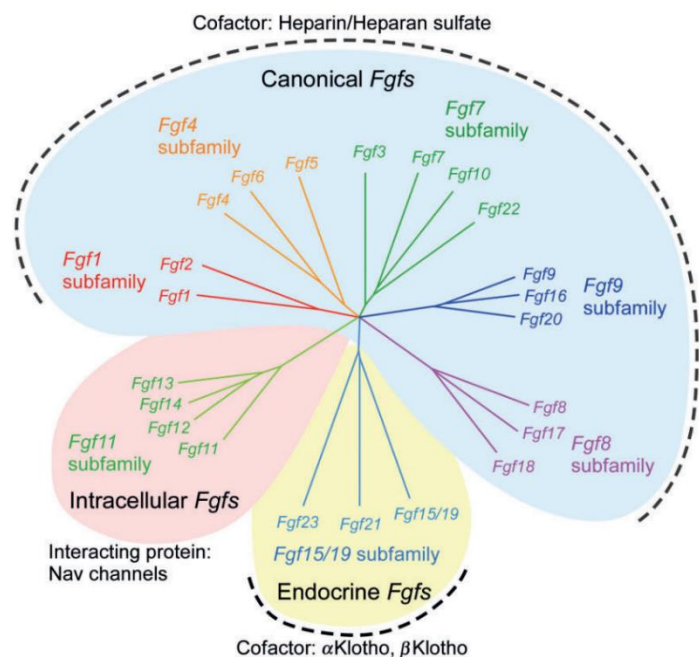
**Figure 9 : Illustration schématique de l'action de l'ApoCaM sur le canal  $Nav1.5$ .** L'ApoCaM stabilise l'interaction entre DIV et le domaine C-terminal. À l'ouverture du canal, la boucle DIII/IV est libérée et intervient dans l'inactivation. En absence de l'ApoCaM l'interaction entre le DIV et le domaine C-terminal est déstabilisée favorisant l'inactivation depuis l'état fermé et en cas d'ouverture du canal favorise le courant sodique persistant. (Kang et al., 2021)

De façon intéressante, une autre protéine, FHF2, est impliquée dans cette régulation de  $Nav1.5$  avec la calmoduline. La co-expression de cette protéine avec la forme IQ/AA du canal  $Nav1.5$  a permis de rétablir l'effet de la perte d'interaction de l'ApoCaM sur la densité courant  $I_{NaL}$  (Chakouri et al., 2022). D'autant plus, qu'une autre étude avait déjà prédit les effets de l'ApoCaM et du FHF2 avec  $Nav1.5$  en s'intéressant aux structures obtenues par Cryo-EM et par utilisation de mutants du domaine C-terminal et de la boucle DIII/IV (Gade, et al., 2020). L'étude du FHF2 fera l'objet d'une description détaillée par son rôle central dans les travaux qui sont présentés dans ce travail de thèse.

## 2. Régulation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 par les FGFs

### a. Généralités sur la famille des « Fibroblast Growth Factor » (FGFs)

La famille des *Fibroblast Growth Factor* (FGF) est composée de 22 peptides différents chez les mammifères (**Figure 10**) qui sont, eux-mêmes, divisés en deux sous-familles, les peptides sécrétés (FGFs) et les peptides non sécrétés aussi connus sous le nom de *Fibroblast Growth Factor Homologous Factors* (FHF). Ces deux sous-familles ont en commun une séquence nucléotidique appelée FGF core, qui présente une forte homologie entre les 22 peptides et est aussi bien retrouvée chez les vertébrés que chez les invertébrés (Ornitz et Itoh, 2015).



**Figure 10 :** Arbre phylogénétique des différentes familles de FGF réparties selon leur mode d'action dans l'organisme. (Bleu) Les FGFs aux fonctions paracrines et autocrines. (Jaune) Les FGFs aux fonctions endocrines. (Rouge) Les FGFs aux fonctions intracellulaires. (Ornitz et Itoh, 2015)

Les FGFs sont des peptides de signalisation qui interagissent avec des récepteurs de type tyrosine kinase. Ils sont sécrétés dans tous les tissus tout au long de la vie de l'individu, et ce très tôt lors du développement. Le FGF4 est, par exemple, impliqué dans la croissance de l'endoderme primitif (Krawchuk *et al.*, 2013). La majorité de ces FGFs ont des fonctions paracrines et autocrines (FGFs paracrine), mais trois d'entre eux, les plus récents à apparaître au cours de l'évolution, ont des fonctions endocrines (FGFs endocrines) et sont majoritairement exprimés chez l'individu adulte.

Les FGFs paracrines jouent un rôle primordial dans le développement embryonnaire et l'organogénèse en particulier dans la régulation du développement de la partie secondaire et la partie antérieure du cœur (Kelly, 2005). De plus, ils possèdent des rôles dans l'homéostasie tissulaire afin de favoriser la régénération, et le renouvellement tissulaire, par exemple, en

cas de lésion ischémique du cœur, les FGFs paracrines ont un rôle cardioprotecteur (Kardami *et al.*, 2007). Et enfin, les FGFs paracrines vont assurer certaines fonctions métaboliques comme la régulation du cholestérol et de la synthèse biliaire, pour FGF4 (Yu *et al.*, 2000). Les FGFs endocrines, ont quant à eux, des fonctions essentiellement chez l'adulte, notamment dans la régulation métabolique lipidique, glucidique, des phosphates et de l'acide biliaire (Long et Kharitonov, 2011). Les rôles des FGFs à l'échelle cellulaire sont divers, mais fondamentaux, comme la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire (Ornitz et Itoh, 2015).

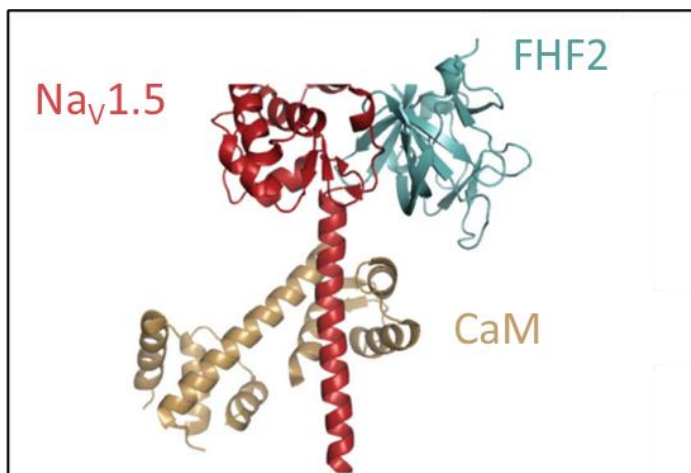
Par leur présence ubiquitaire dans l'organisme et de leurs nombreux rôles pendant et après le développement des mammifères, les FGFs sont retrouvés dans diverses pathologies comme des cancers ou des malformations, touchant différents organes comme le cerveau, les reins et aussi les vaisseaux sanguins. L'utilisation de modèles murins mutants pour FGF16 a montré que cette protéine préviendrait le risque d'hypertrophie cardiaque et de fibrose et aurait par conséquent un rôle cardioprotecteur (Matsumoto *et al.*, 2013). Pour FGF23, une étude clinique sur une cohorte de patients atteints de syndrome de Kawasaki a permis d'établir un lien entre la concentration de FGF23 dans le sérum et une augmentation des risques d'anomalies cardiaques (Falcini *et al.*, 2013). Ces deux exemples illustrent parfaitement la diversité des fonctions de la famille des FGFs au sein du cœur et des risques pathologiques qui peuvent y être associés. Une famille de FGFs bien décrite dans la littérature, dispose aussi d'un rôle majeur dans le cœur à savoir la régulation de l'activité électrique cardiaque : la famille des FHF.

#### *b. La famille des FHF*

Les FHF présentent une homologie de séquence avec les autres FGFs, mais sont exclusivement intracellulaires. Il en existe 4 : FHF1 = FGF12 ; FHF2 = FGF13 ; FHF3 = FGF11 ; FHF4 = FGF14. Ils interagissent avec diverses protéines partenaires comme les canaux dépendant du potentiel c'est pourquoi ils sont connus pour être des régulateurs essentiels de l'excitabilité neuronale et cardiaque. Ils sont donc majoritairement exprimés dans les cellules excitables comme les neurones au niveau des segments initiaux des axones et au niveau des nœuds de Ranvier (Lou *et al.*, 2005 ; Wittmack *et al.*, 2004). Au début des années 2000, des travaux de recherche ont permis de déterminer que les FHF interagissaient avec les canaux

sodiques dépendant du potentiel ( $Na_v$ ) au niveau des extrémités C-terminale de ces derniers régulant de ce fait, leurs propriétés d'adressage et de dépendance au potentiel de l'inactivation (Liu *et al.*, 2001). En 2008, une étude a montré que la sous-famille des FHF pourrait être la première à avoir évolué parmi les FGFs en modifiant ainsi le peptide signal extracellulaire et son affinité pour l'héparine/HS, obtenant, par conséquent, une localisation exclusivement intracellulaire et donc un rôle majeur dans la régulation des canaux dépendant du potentiel (Itoh et Ornitz, 2008).

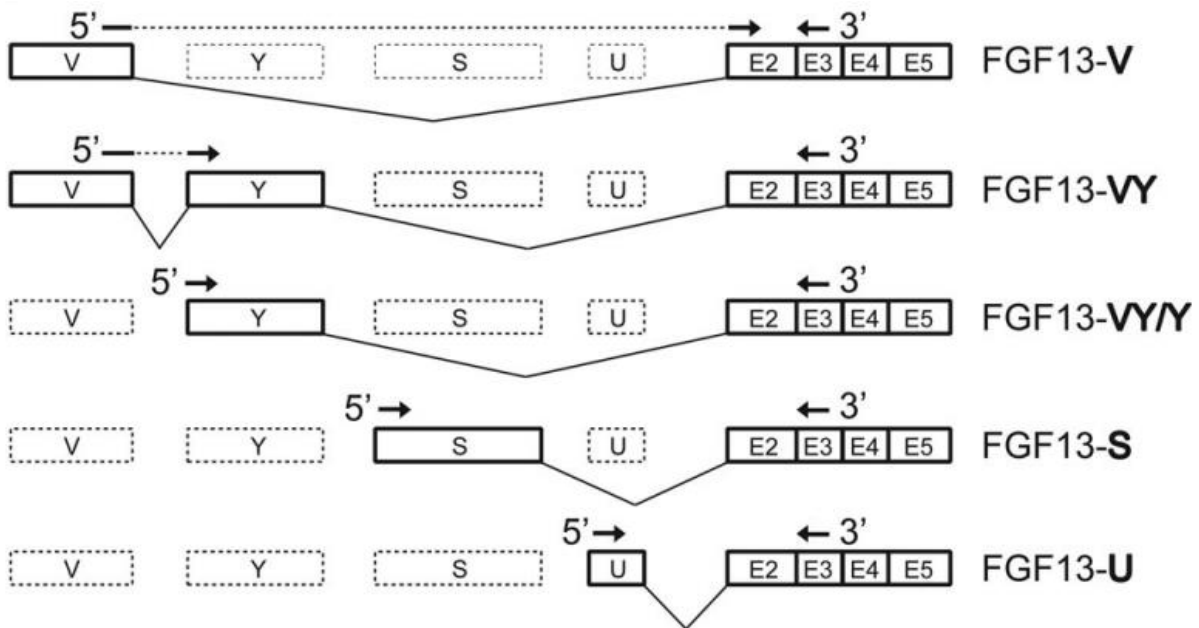
Cependant, leurs interactions ne se limitent pas aux canaux ioniques, ils interagissent également avec d'autres protéines comme la « *Islet Brain-2 Scaffold Protein* » (IB2)



**Figure 11 :** Représentation schématique tridimensionnelle du complexe protéique  $Na_v1.5$ , FHF2 et C-terminale de la CaM. (Gabelli *et al.*, 2014)

(Schoorlemme et Goldfarb, 2002), la  $\beta$ -tubuline (Wu *et al.*, 2012) ou encore NEMO (König *et al.*, 2012). De plus, il semblerait que la liaison de certaines protéines FHF à des canaux  $Na_v$  puisse faciliter la liaison d'autres protéines, comme c'est le cas du FHF2 qui en se liant au canal  $Na_v1.5$  semble faciliter la liaison de la calmoduline avec le canal (Burel *et al.*, 2017) (Figure 11).

L'extrémité N-terminale des FHF fait l'objet d'un épissage alternatif du premier exon générant diverses isoformes (Figure 12). En 1999, des travaux de recherche ont permis d'identifier dans différents modèles animaux différents variants d'excision et d'épissage pour chaque protéine des FHF (4 isoformes pour FHF1, 9 pour FHF2 et 2 pour FHF3 et FHF4).



**Figure 12 : Illustration schématique des variants d'excisions épissages du FHF2 (FGF13) chez la souris (Wang et al., 2011).**

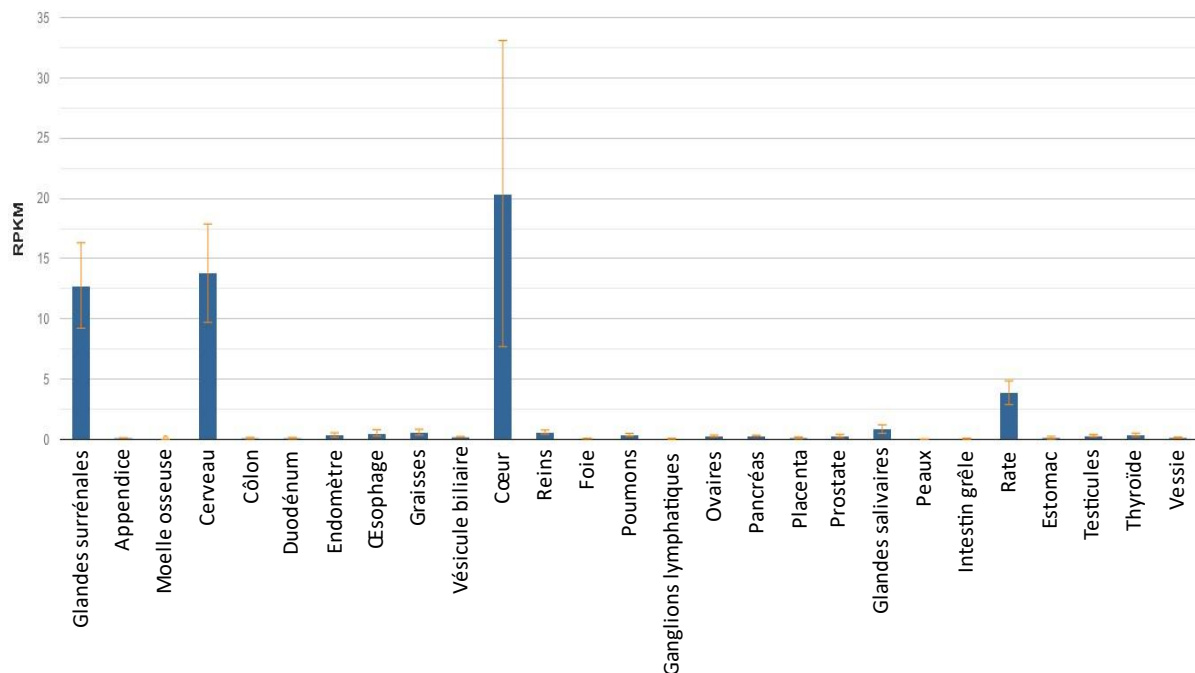
Ils ne sont pas tous exprimés de la même façon en fonction des espèces étudiées, par exemple, seul le FHF3-A est exprimé chez l'homme alors que FHF3-A et FHF3-B sont tous deux exprimés chez la souris. Cette étude a également montré que l'expression et la distribution de ces différentes isoformes étaient variables dans les tissus (Munoz-Sanjuan *et al.*, 1999). La combinaison de tous ces phénomènes amène à penser que l'émergence de ces variants d'excision et d'épissage confère aux FHF3 une grande flexibilité dans la régulation des propriétés biophysiques des canaux ioniques et dans les autres rôles fonctionnels qui peuvent leur être attribués (Chakouri *et al.*, 2022).

De plus, par leur importance dans le système de régulation du complexe protéique des  $Na_v$ , les FHF3 sont liés à des pathologies. Dans les neurones, le rôle du FHF4 a pu être découvert par l'existence d'une mutation perte de fonction qui induit, une pathologie de type ataxie-spinocérébelleuse (Van Swieten *et al.*, 2003). Une autre étude s'intéressant au FHF4 a mis en lumière son rôle dans l'augmentation de la disponibilité des canaux  $Na_v$ , dans l'accélération de la cinétique d'inactivation, mais aussi dans l'augmentation de courant  $I_{NaL}$  de  $Na_v1.6$  (Yan *et al.*, 2014). Concernant FHF3, celui-ci semble ne pas présenter d'effets similaires aux autres FHF3 d'autant plus que les fonctions du FHF3 sont moins connues à ce jour, car des mutations de type perte de fonction du FHF3 dans des modèles murins n'ont pas permis

d'identifier de phénotype particulier (Ornitz et Itoh, 2015). Cependant, certains travaux plus récents semblent pointer le rôle de FHF3 comme étant un régulateur de l'angiogenèse (Yang *et al.*, 2015).

### c. *FHF1*

La protéine FHF1 est l'isoforme majoritaire cardiaque des FHF chez l'homme, mais elle est également fortement exprimée dans le cerveau, les glandes surrénales et la rate (**Figure 13**) (Fagerberg *et al.*, 2014).



**Figure 13 : Représentation graphique de la répartition d'expression du FHF1 chez l'homme.** Les résultats ont été obtenus par RNA-Seq sur 27 tissus provenant de 95 individus. La quantification est exprimée en « Reads Per Kilobase Million » (RPKM) (Fagerberg *et al.*, 2014).

C'est une protéine qui présente deux isoformes chez l'homme (FHF1-A et FHF1-B) et trois chez la souris (FHF1-A, FHF1-B et FHF1-C). Il existe une 4<sup>ème</sup> isoforme, mais qui est retrouvée exclusivement chez le poulet (FHF1-D) (Munoz-Sanjuan *et al.*, 1999). Les différences d'expression ne sont pas exclusivement entre espèce ou entre les tissus d'un même organisme, mais aussi au sein des compartiments cellulaires. En effet, l'utilisation de modèle d'expression hétérologue a montré que l'isoforme FHF1-A semble être majoritairement exprimée au niveau nucléaire au contraire de l'isoforme FHF1-B qui semble davantage cytoplasmique suggérant de ce fait une différence de fonction (Smallwood *et al.*, 1996).



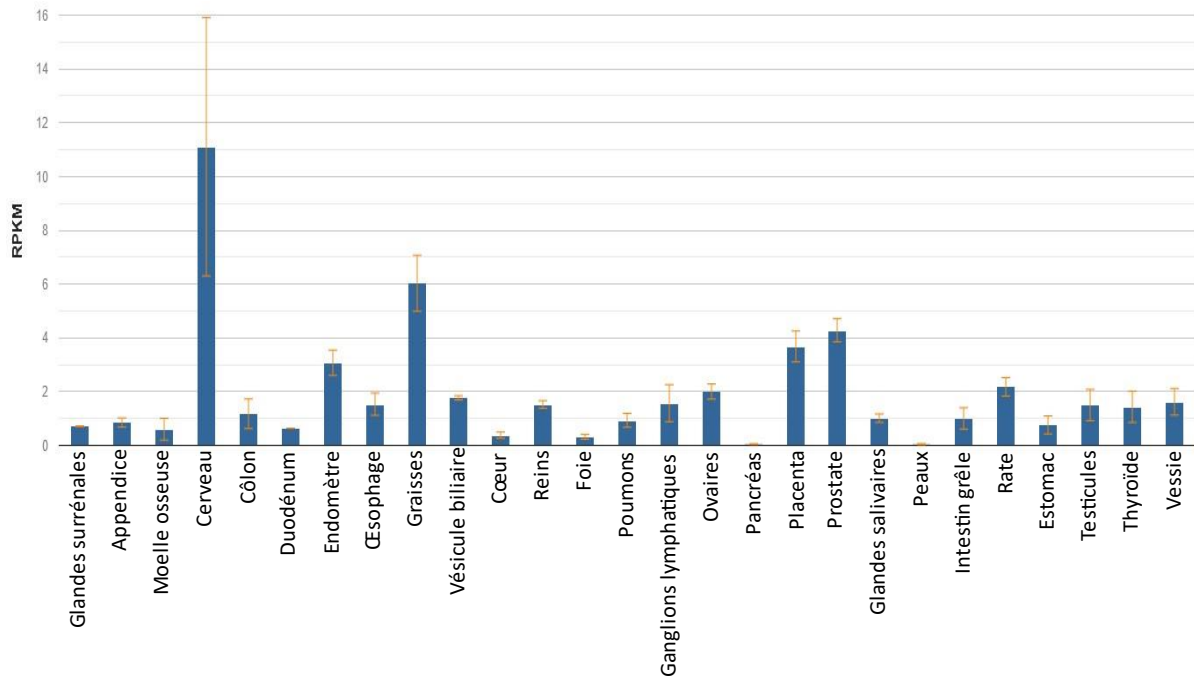
Comme de nombreuses autres FHF1, FHF1 est connu pour son rôle de régulateur de l'activité des canaux  $Na_v$ . Il a été démontré que l'isoforme FHF1-B se lie à la queue C-terminale de  $Na_v1.5$  dans une zone d'une quarantaine d'acides aminés (1773–1832) et était responsable d'un décalage vers des potentiels hyperpolarisés de la dépendance au potentiel de l'inactivation (Liu *et al.*, 2003). Quant au mécanisme d'interaction entre FHF1-A et les canaux sodiques, celui-ci reste encore à ce jour mal connu. Si le rôle du FHF1-B dans un modèle d'expression hétérologue a pu être démontré (Liu *et al.*, 2003) le rôle du FHF1 dans l'organisme humain se heurte à une difficulté de transposition des modèles animaux en raison des variabilités dans l'expression des isoformes des FHF1. D'autant plus que l'utilisation de modèles murins mutants pour FHF1 n'induit pas de phénotypes sévères hormis quelques faiblesses musculaires (Goldfarb, 2005) et des troubles auditifs (Hanada *et al.*, 2018). Or, les rapports de cas clinique concernant des mutations du FHF1 sont en constantes augmentations avec des atteintes aussi bien cérébrales (épilepsie, atrophie cérébelleuse) que cardiaques (Bradycardie) (Siekierska *et al.*, 2016 ; Veliskova *et al.*, 2021). Cependant des solutions existent pour étudier FHF1, car en 2013 une équipe a montré que FHF1-B est responsable d'une augmentation de la densité de courant  $I_{Na}$  dans des cardiomyocytes adultes de souris (Hennessey *et al.*, 2013a). Ils ont, pour cela, induit un « *Knock-Down* » (KD) du FHF2 pour le substituer avec l'isoforme majoritaire cardiaque de l'homme. Ces résultats ont été renforcés par l'effet décrit de FHF1-B sur le canal  $Na_v1.2$  dans un modèle d'expression hétérologue (Wildburger *et al.*, 2015). Le rôle de FHF1-A dans le cœur reste à ce jour mal connu, mais des collaborateurs ont pu nous informer que cette isoforme serait retrouvée davantage exprimée dans des cardiomyocytes humains de patients ayant été victimes d'arrêt cardiaque et au contraire l'expression de FHF1-B serait diminuée. Dans ces cellules, l'augmentation du FHF1-A semble moduler la cinétique d'inactivation et s'opposerait à l'effet de la ranolazine un inhibiteur du courant  $I_{NaL}$  (Données en cours de publication, Jeanne Nerbonne et Jonathan Silva, *Washington University School of Medicine*, St. Louis). Ces résultats, pris dans leur ensemble, semblent faire apparaître une relation de codépendance entre les isoformes afin d'établir une régulation bien ajustée du canal  $Na_v1.5$ .

#### d. FHF2

FHF2 est une protéine retrouvée dans de nombreux organes. Chez l'homme, elle est majoritairement exprimée dans le cerveau et est 5 fois plus exprimée dans ce dernier que



FHF1, FHF3 et FHF4 (**Figure 14**). Dans le cœur, c'est FHF1 qui est majoritairement exprimé, mais chez la souris, il s'agit de FHF2. En outre, l'affinité du FHF1 pour le canal Nav1.5 est moindre que celle de FHF2 (Wang *et al.*, 2012 ; Abrams *et al.*, 2020).

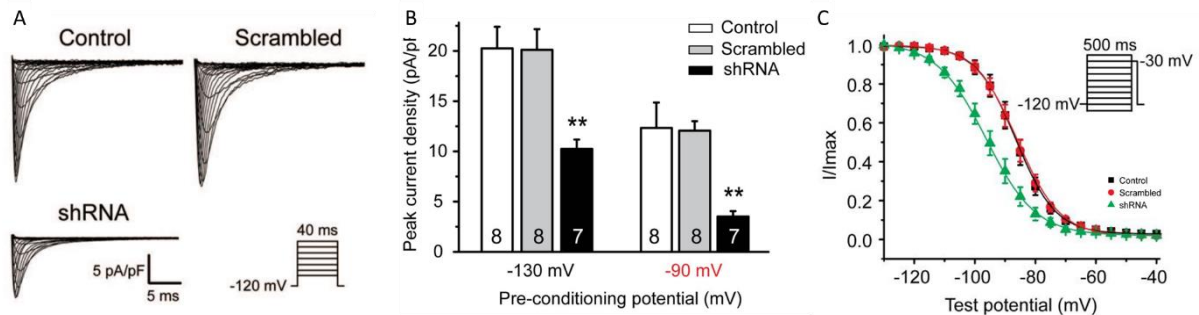


**Figure 14 : Représentation graphique de la répartition d'expression de FHF2 chez l'homme.** Les résultats ont été obtenus par RNA-Seq sur 27 tissus provenant de 95 individus. La quantification est exprimée en « Reads Per Kilobase Million » (RPKM) (Fagerberg *et al.*, 2014).

Le FHF2 a divers rôles comme la polymérisation des microtubules (Wu *et al.*, 2012), mais il est aussi impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire pouvant être reliées à des cancers (Lu *et al.*, 2015). Cependant ses effets les plus connus concernent la régulation des canaux dépendants du potentiel. Le FHF2 régule aussi les canaux calciques Cav1.2, via une possible interaction avec la junctophiline-2. Cela aurait pour effet d'augmenter leur expression à la membrane et par conséquent la densité du courant  $I_{Ca}$ , dans les cardiomyocytes de souris adultes (Amenta *et al.*, 2013). Mais FHF2 est surtout connu pour ses effets dans le cœur par son rôle de partenaire avec le canal Nav1.5.

FHF2 est la forme majoritaire des FHF<sub>s</sub> retrouvée dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris et il joue un rôle essentiel dans la modulation de la fonction du canal Nav1.5 et de son expression à la surface cellulaire (Wang *et al.*, 2011). Ces travaux ont montré que l'extinction de l'expression de FHF2 (*knock-down*) induit une diminution de l'expression des canaux Nav1.5 au niveau du sarcolemme ainsi qu'une diminution de la densité de courant

$I_{Na}$  et enfin une diminution de la disponibilité de ces canaux par un effet de décalage vers des potentiels hyperpolarisés de la dépendance au potentiel de l'inactivation de près de 10 mV (**Figure 15**). Cela a pour effet d'altérer la vitesse de conduction électrique cardiaque, pouvant conduire à des arythmies. L'étude s'intéresse aussi à l'expression de différentes isoformes de FHF2 (**Figure 12**). Il a ainsi été observé que parmi les cinq isoformes de FHF2, obtenus par épissage alternatif et présent dans les cardiomyocytes de souris adultes, l'isoforme FHF2-2, aussi appelé FHF2-VY, est majoritaire.



**Figure 15 : Effet du knock-down de FHF2 sur le courant  $I_{Na}$  dans un modèle de cardiomyocytes adultes.** (A) Tracés représentatifs des courants sans shRNA (Control), avec shRNA contrôle (Scrambled) et avec shRNA dirigé contre le FHF2 (shRNA). (B) Quantification de la densité de courant  $I_{Na}$  à -30 mV à partir de deux potentiels de maintien différents (-130 et -90 mV). (C) Dépendance au potentiel de l'inactivation des canaux  $Na_v1.5$  (Wang *et al.*, 2011).

Un autre effet concernant le courant sodique persistant ( $I_{NaL}$ ) a été découvert par notre groupe. En effet, nos données fournissent un nouveau rôle pour le FHF2 dans la diminution du courant sodique tardif dans les cellules HEK-293 (Burel *et al.*, 2017). Le rôle du FHF2, et en particulier du FHF2-VY, dans la régulation d' $I_{NaL}$  n'avait été étudié qu'une seule fois dans des cellules tsA201, et il s'était avéré sans effet (Yang *et al.*, 2016). Or nos résultats montrent que la phosphorylation des sérines 1933 et 1984 diminue l'interaction du FHF2 et de la calmoduline avec le canal  $Na_v1.5$  ce qui a pour conséquence d'augmenter  $I_{NaL}$  et de diminuer la disponibilité des canaux. Aujourd'hui, de nouvelles études semblent renforcer cette hypothèse et soulignent le rôle central de FHF2 dans la régulation d' $I_{NaL}$  (Gade *et al.*, 2020).

Au vu de ces résultats, le prolongement des PA cardiaques plus lents observés dans le contexte du « knock-out » conditionnel de FHF2 dans des cœurs de modèles murins (Wang *et al.*, 2017), pourrait donc bien être causé par une augmentation du courant  $I_{NaL}$ . De plus, une récente étude a permis d'approfondir cette hypothèse en montrant les différences pouvant

exister dans la régulation d' $I_{NaL}$  par les différentes isoformes de FHF. Cette étude a permis d'identifier que la co-expression du mutant  $Nav_{1.5}$  IQ/AA, avec les isoformes FHF1-A, FHF2-A (S), FHF2-VY, FHF2-Y et FHF3-A a pour résultat une diminution du courant  $I_{NaL}$ . Au contraire, aucun changement sur  $I_{NaL}$  n'a été démontré par la co-expression de  $Nav_{1.5}$  IQ/AA et des isoformes FHF2-B (U) et FHF2-V. Ces isoformes semblent, en revanche, avoir un effet antagoniste des autres variants. Cela suggère que la balance d'expression entre les différentes isoformes de FHF, permet un équilibre bien ajusté de la régulation d' $I_{NaL}$  (Chakouri, *et al.*, 2022).

*e. Pathologies liées au FHF2*

Le dysfonctionnement du canal  $Nav_{1.5}$  est au cœur de diverses arythmies héréditaires telles que le syndrome du QT long et le BrS, mais il est à noter que seulement 30% des cas atteints d'un BrS ont un lien direct avec une mutation dans le gène *SCN5A* codant pour la protéine  $Nav_{1.5}$ .

Concernant FHF2, du fait de son expression majoritaire dans le cerveau chez l'homme, un certain nombre de pathologies neuronales lui sont directement attribuées. Le syndrome de Börjeson-Forssman-Lehmann, par exemple, s'exprime par un retard mental lié à une mutation par addition de 2 nouveaux exons, ayant pour conséquence une plus forte expression du FHF2 dans le tissu cérébral (Gezc, *et al.*, 1999). D'autres pathologies comme des désordres épileptiques ont pour origine une régulation altérée de  $Nav_{1.6}$  par le FHF2-A ayant pour conséquence un gain de fonction (Fry *et al.*, 2020).

Il existe peu de maladies génétiques cardiaques rapportées dans la littérature portant sur les gènes de FHF2 et FHF1. Mais, une étude a décrit qu'une mutation présente sur le gène FHF1 pouvait conduire à un syndrome de Brugada (Hennessey *et al.*, 2013a) ou encore qu'une mutation présente sur le gène *SCN5A* au niveau du site d'interaction entre la queue C-terminale et le FHF2, provoque une altération de liaison de ce dernier au canal dont le résultat est un allongement du potentiel d'action cardiaque et une augmentation de la disponibilité des canaux (Musa *et al.*, 2015). Le peu de pathologies associées à cette catégorie de protéines pourrait être expliqué par la redondance des effets des deux FHF présents chez l'homme, car la perte de fonction de l'un pourrait être compensée par la surexpression de l'autre

(Hennessey *et al.*, 2013a). Malgré tout, de plus en plus de cas cliniques sont recensés comme étant relatifs à des mutations de type perte de fonction des FHF<sub>s</sub> et sont maintenant clairement identifiés comme responsables de pathologies cérébrales ou cardiaques arborant ainsi l'importance d'étudier plus en détail les mécanismes de régulation de Nav<sub>v</sub>1.5 par les FHF<sub>s</sub>.

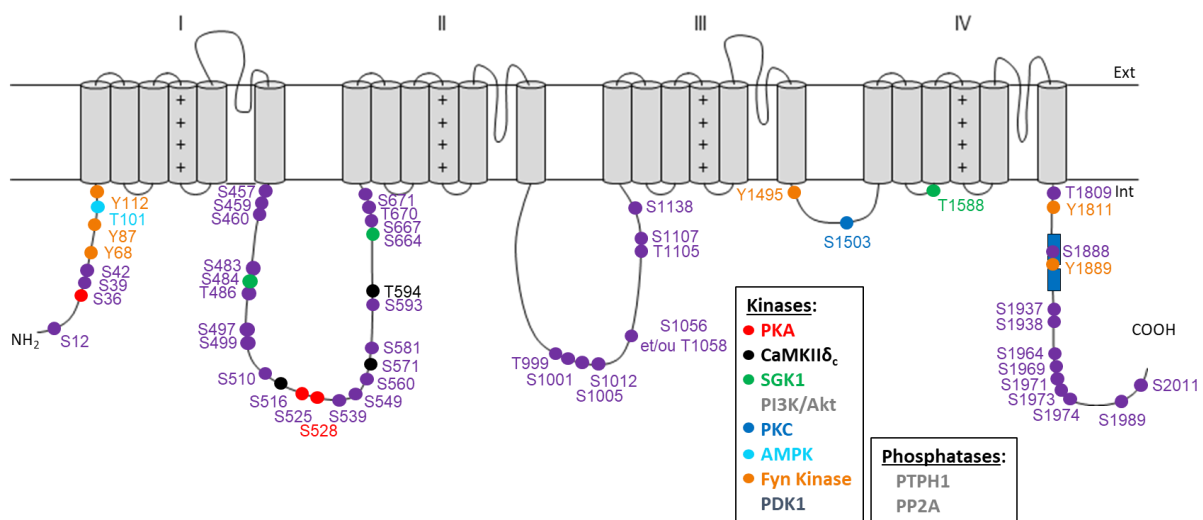
*f. Régulation de l'activité des FHF<sub>s</sub>*

La phosphorylation pourrait-être l'un des mécanismes de régulation impliqués dans le contrôle des Nav par les FHF<sub>s</sub>. Une étude a déjà souligné l'implication de la protéine Caséine Kinase 2 (CK2) dans la régulation des canaux sodiques dans les neurones. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la CK2, le TBB, a montré la diminution d'interaction entre le FHF4 et le canal Nav<sub>v</sub>1.6 ou Nav<sub>v</sub>1.2 au niveau de leurs extrémités C-terminales. Cela a pour effet d'induire un décalage hyperpolarisé de la courbe d'inactivation et une diminution de la densité de courant I<sub>Na</sub>, qui ont pour conséquence de réduire l'excitabilité neuronale (Hsu *et al.*, 2016). Cette même étude met en évidence dans un système d'expression hétérologue, deux sites de phosphorylation sur FHF4 (S228 et S230) dont l'effet est une diminution de la densité de courant I<sub>Na</sub> de Nav<sub>v</sub>1.6 renforçant l'idée que FHF4 serait directement phosphorylée par la CK2 afin de favoriser la liaison au canal. D'autres sites de phosphorylation ont pu être identifiés, dans les neurones, comme régissant l'interaction du FHF4 avec Nav<sub>v</sub>1.6. Il s'agit, de la tyrosine Y158 et de la sérine S226, qui ont été identifiées par spectrométrie de masse et seraient phosphorylées respectivement par la « *Janus kinase 2* » (JAK2) ou la « *Glycogen synthase kinase-3 β* » (GSK3β) (Hsu *et al.*, 2017 ; Wadsworth *et al.*, 2020). La CaMKII serait également impliquée dans l'interaction des canaux Nav avec les FHF<sub>s</sub>. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la CaMKII, le KN-93, a permis de relier le rôle régulateur de la kinase dans le contrôle de la dépendance au potentiel de l'activation de Nav<sub>v</sub>1.2 par FHF1 (Wildburger *et al.*, 2015). Notre groupe a par ailleurs montré que la phosphorylation de deux sérines en position S1933 et S1984 diminue l'interaction de FHF2 avec le canal sodique Nav<sub>v</sub>1.5 au niveau de l'extrémité C-terminale, ce qui abolit les effets de cette protéine sur le courant I<sub>NaL</sub> et sur la disponibilité des canaux (Burel *et al.*, 2017).

## VI. Régulation du canal $\text{Na}_v1.5$ par la phosphorylation

### 1. Généralités

La phosphorylation est une modification chimique post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un groupement phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) sur une molécule organique. C'est un mécanisme fondamental de régulation protéique, car il est ubiquitaire et est retrouvé impliqué dans de nombreux processus cellulaires dont la modulation de l'activité des protéines. L'ajout de ce groupement phosphate chargé négativement sur des acides aminés neutres (Sérine, Thréonine et Tyrosine) modifie l'environnement électrostatique immédiat de ces acides aminés pouvant, par contrainte de charges, aboutir à des changements conformationnels. La cascade d'événements qui s'en suit est dépendante de l'acide aminé ciblé et de sa localisation sur la protéine. Certaines vont directement provoquer des modifications de l'activité protéique, quand d'autres régulent les interactions entre les protéines, comme c'est le cas pour le FHF2, la CaM et  $\text{Na}_v1.5$  décrit précédemment (**Page 42**). Le canal  $\text{Na}_v1.5$  fait partie des protéines retrouvées phosphorylées et la combinaison de différentes approches, *in silico*, *in vitro* et de protéomique a permis de lui attribuer 42 sites de phosphorylation (Lorenzini *et al.*, 2021). Dès lors, la présence de ces nombreux sites suggère l'importance de la phosphorylation dans le contrôle de la régulation de l'activité de  $\text{Na}_v1.5$ .



**Figure 16 :** Représentation schématique du complexe canalaire macromoléculaire de  $\text{Na}_v1.5$ . (Violet) Sites de phosphorylations identifiés par spectrométrie de masse chez la souris. (Autres couleurs) Sites de phosphorylations identifiés dans la littérature et reliés à l'activité de kinases, dans des modèles *in vitro*.

De nombreux laboratoires se sont donc intéressés aux rôles physiologiques et/ou physiopathologiques de ces sites et aux acteurs responsables de leur phosphorylation. Des kinases ont par conséquent été reliées à certains sites précis et ce sont ces informations qui sont traitées dans les paragraphes suivants.

## 2. Régulation du canal Nav1.5 par la PKA

La Protéine Kinase dépendante de l'AMPc (PKA) est une holoenzyme qui est organisée en tétramère avec 2 sous-unités catalytiques et 2 sous-unités régulatrices. C'est une protéine kinase sollicitée dans la voie  $\beta$ -adrénergique lorsque l'adénylate cyclase catalyse la réaction d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc agit comme un second messenger en se fixant aux sous-unités régulatrices, s'en suit un changement de conformation qui active les sous unités catalytiques ce qui permet la phosphorylation des acides aminés sérine et thréonine (Turnham et Scott, 2016). Le début des années 90 a permis de faire émerger des preuves concernant le rôle de la PKA dans la régulation de l'activité du canal Nav1.5 par la phosphorylation. En effet, dans des myocytes néonataux de rat, la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par de l'isoprénaline, un activateur des récepteurs  $\beta$ -1 adrénergiques, a montré une diminution de la densité de courant  $I_{Na}$  et un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiel hyperpolarisés. Ces effets seraient également associés à une augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc (Schubert *et al.*, 1990). Certains résultats ont pu confirmer ces effets de la PKA sur Nav1.5, mais au contraire, d'autres ont montré une augmentation du courant  $I_{Na}$  (Herren *et al.*, 2013). Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par les différences de protocole en voltage imposé utilisés car ceux pour lesquels le potentiel de maintien est hyperpolarisé (-130 mV) induisent une augmentation de courant au contraire de ceux qui le sont moins (-90 mV) induisent une diminution de courant  $I_{Na}$ . Toutefois, les informations les plus consistantes pointent en direction d'un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Kirstein *et al.*, 1991 ; Gintant et Liu, 1992 ; Baba *et al.*, 2004) et une augmentation de canaux Nav1.5 à la surface cellulaire qui se traduit par une augmentation de courant  $I_{Na}$  (Kirstein *et al.*, 1991 ; Baba, Dun et Boyden., 2004 ; Hallaq *et al.*, 2006).

Des sites de phosphorylation dépendant de la PKA ont pu être identifiés chez le rat, à savoir, les sérines S526 et S529 (S525 et S528 chez l'homme) de la boucle reliant les domaines DI-II (Murphy *et al.*, 1996). Les auteurs n'ont, dans un premier temps, pas identifié le rôle de ces 2 sites, mais celui-ci a pu être confirmé par l'utilisation de techniques de mutagenèse dirigée contre la séquence codante humaine de Nav<sub>v</sub>1.5. La substitution des 2 sérines (S) par des alanines (A) dont la charge est neutre, afin d'abolir la phosphorylation, a permis de les relier aux effets sur la densité de courant I<sub>Na</sub>, conséquence de leur effet sur l'adressage des canaux à la membrane. De plus, il existe, dans la boucle DI-II de Nav<sub>v</sub>1.5 à proximité des S525-528, des sites de signal de rétention du réticulum endoplasmique (motif RXR). Ces derniers sont impliqués dans l'adressage de canaux à la surface cellulaire, l'hypothèse étant que les charges négatives portées par les groupements phosphates des S525-528 masquent les motifs RXR ce qui favorise l'adressage des canaux à la membrane (Zhou *et al.*, 2002). Ces deux sites de phosphorylation ont été reliés à des pathologies d'origine génétique. La première, affecte le résidu D1790G de Nav<sub>v</sub>1.5 et est associée à une augmentation du courant I<sub>NaL</sub> dépendante de la phosphorylation des S36 et S525 et dont le résultat phénotypique est un syndrome du QT long (Tateyama *et al.*, 2003). La seconde, affecte le résidu R526H qui est localisé dans le site consensus de phosphorylation de la PKA de la S528. Cette mutation affecte la capacité de la PKA à phosphoryler S528 avec pour conséquence clinique, un BrS (Aiba *et al.*, 2014). Les analyses de phosphoprotéomique ont permis de confirmer la phosphorylation des résidus S36 et S525 sur des cœurs de souris en condition physiologique, cependant la phosphorylation du S528 n'a pas pu être confirmée (Lorenzini *et al.*, 2021).

### 3. Régulation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 par la PKC

La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase possédant une extrémité N-terminale régulatrice et une extrémité C-terminale catalytique et de la même façon que pour la PKA, la fixation d'un activateur de la PKC sur le domaine régulateur provoque un changement de conformation ce qui active le domaine catalytique. Il en existe 11 isoformes regroupées en 3 classes. La première, dite « conventionnelle » activée par le diacylglycérol et le Ca<sup>2+</sup>, la seconde, activée seulement par le diacylglycérol, dite « nouvelle » et la troisième, dite « atypiques » qui répond à d'autres types de lipides (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ou le céramide) (Steinberg *et al.*, 2008). Les effets de la PKC sur le canal Nav<sub>v</sub>1.5

ont été décrits dans des cardiomyocytes de rats et dans des lignées stables. Ils ont pour résultats de diminuer la densité de courant  $I_{Na}$ , du fait d'une diminution de l'expression de  $Nav1.5$  à la surface (Hallaq *et al.*, 2012), et de décaler vers des potentiels hyperpolarisés la dépendance au potentiel de l'inactivation. Ces effets ont pu être relié à la phosphorylation de la S1505 localisée dans la boucle DIII-IV (S1503 chez l'homme) car la substitution S1505A abolit partiellement les effets observés lors de la stimulation de la PKC par un activateur (Qu *et al.*, 1996). Cependant, l'action partielle des effets de la phosphorylation de la sérine S1503 suggère que d'autres cibles pourraient être impliquées dans la régulation de  $Nav1.5$  par la PKC. Récemment, la description d'une voie de signalisation, impliquant l'activité de la PKC, l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une augmentation des concentrations cellulaires de NADH, serait impliquée dans une diminution de courant  $I_{Na}$  (Liu *et al.*, 2017). De façon intéressante, cette diminution de courant ne serait pas due à une diminution de l'expression de  $Nav1.5$  à la surface, mais à la  $P_o$  des canaux. L'augmentation des concentrations de NADH est possible en condition pathologique (hypertrophie cardiaque ou ischémie) (Varadarajan *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2013) et est suivie d'une stimulation de l'activité de la PKC par l'intermédiaire de la phospholipase D. La PKC semble avoir un double effet, direct, avec la phosphorylation du canal sur la S1503, et indirect avec l'augmentation des ROS au niveau mitochondrial. Ces deux actions aboutissent à la diminution de la conductance des canaux  $Nav1.5$ . D'autant que les liens entre le stress oxydatif, la PKC et le canal  $Nav1.5$  était déjà suspecté lorsque deux mutations d'une enzyme impliquée dans l'équilibre redox, la Glycerol-3-phosphate Déshydrogénase (GPD1-L) ont été découvertes sur des patients atteints de BrS et de mort subite du nourrisson (Liu *et al.*, 2009 ; Valdivia *et al.*, 2009). La perte de fonction de cette enzyme est associée à une diminution de courant  $I_{Na}$  qui peut être partiellement inversée par l'utilisation de la S1503A, dans un modèle d'expression hétérologue, soulignant l'implication de la PKC dans ce mécanisme. Toutefois, les analyses de phosphoprotéomique, développées au laboratoire, n'ont pas permis de confirmer la phosphorylation de la S1503 dans le tissu cardiaque endogène (Lorenzini *et al.*, 2021).

#### 4. Régulation du canal $Nav1.5$ par la CaMKII

Chez l'homme, il existe 4 isoformes codées par 4 gènes différents de la protéine kinase II dépendante de la  $Ca^{2+}/CaM$  (CaMKII) et chacune présente une distribution et de propriétés



d'activation qui lui sont propres. Dans le cœur humain, c'est l'isoforme  $\delta$  qui est majoritaire et est retrouvée sous deux formes de variants d'excision et d'épissage, CaMKII $\delta_B$  et CaMKII $\delta_C$ . Les CaMKII sont des sérines/thréonines kinases, et composées de 12 monomères qui s'assemblent et dont chacun dispose d'une extrémité N-terminale catalytique et une extrémité C-terminale qui porte le domaine d'association protéique et un domaine régulateur entre les deux (Rellos *et al.*, 2010). Ce dernier, peut lier la  $Ca^{2+}/CaM$  ce qui libère la sous unité catalytique et permet la phosphorylation de la sérine S287 sur le monomère voisin. Ce mécanisme d'autophosphorylation s'inscrit en tant que première étape de l'activation de la CaMKII et permet de maintenir l'activité enzymatique lorsque la  $Ca^{2+}/CaM$  se dissocie en cas de diminution des concentrations intracellulaires de  $Ca^{2+}$  (Hudmon et Schulman, 2002). Un des effets indirects du  $Ca^{2+}$  sur la CaMKII est que cette dernière peut être activée par l'oxydation des méthionines M281 et M282 lorsque la  $Ca^{2+}/CaM$  se fixe. Le changement de conformation associé à cette fixation, expose les résidus méthionines aux ROS dans la cellule.

L'implication directe de la CaMKII dans la régulation de l'activité du canal  $Na_v1.5$  a été obtenue par l'étude de deux modèles animaux. L'un, des souris transgéniques développant une insuffisance cardiaque par surexpression de la CaMKII $\delta_C$ , de manière spécifique du cœur, et l'autre, un modèle de cardiomyocytes ventriculaires de lapin surexprimant la CaMKII $\delta_C$  par application d'adénovirus. Dans les deux cas, les résultats se traduisent par un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus polarisés, un ralentissement des cinétiques d'inactivation, une augmentation de la proportion des canaux à entrer en inactivation intermédiaire, une augmentation du courant sodique persistant  $I_{NaL}$  ainsi qu'un ralentissement de la levée d'inactivation. Ces résultats semblent spécifiques de la CaMKII $\delta$  puisque l'utilisation de deux inhibiteurs, le KN-93 et l'AIP (« *Autocamtide-2 related Inhibitory Peptide* ») inversent les effets observés de la surexpression de CaMKII $\delta_C$  (Wagner *et al.*, 2006). Il est à noter que le rôle de la CaMKII dans la régulation du courant  $I_{NaL}$  a été confirmé à plusieurs reprises et était associé à un prolongement du PA cardiaque (Toischer *et al.*, 2013), mais que son rôle sur les propriétés d'inactivation est encore controversé (Iqbal *et al.*, 2018). En effet, des résultats contraires ont été mis en évidence sur un modèle de cardiomyocyte de rat (Yoon *et al.*, 2009) ou de cochon d'Inde (Aiba *et al.*, 2010), mais le fait que la première ne s'intéresse qu'à l'inhibition totale de la CaMKII et que la deuxième utilise l'isoforme CaMKII $\alpha$ , pourraient expliquer ces incohérences.

Rapidement, certaines équipes ont cherché à identifier les sites de phosphorylation dépendants de la CaMKII. Une première approche consistant à muter les sérines de Nav<sub>v</sub>1.5, au niveau des sites consensus de phosphorylation par la CaMKII (RXX[S/T]), a permis d'identifier la S571, sur la boucle reliant les domaines DI-II, comme potentiel responsable des effets de la CaMKII (Hund *et al.*, 2010). Son implication a, par la suite, été confirmée dans un contexte d'insuffisance cardiaque où la S571 était retrouvée davantage phosphorylée (Koval *et al.*, 2012). D'autres potentiels candidats ont pu être identifiés par une seconde approche combinant analyse prédictive *in silico* et d'essais kinases *in vitro*, la S516 et la T594 (Ashpole *et al.*, 2012). La phosphorylation des sérines S516 et S571 par la CaMKII a pu être confirmée par des analyses de spectrométries de masses (Herren *et al.*, 2015). Par une approche similaire, notre groupe a cherché à étudier la phosphorylation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 et confirmer ou non la phosphorylation de ces sites en condition basale ou pathologique (souris surexprimant CaMKII $\delta_c$  dans le cœur). Les sites S516 et S571 ont bien été retrouvés en condition basale, mais seuls trois autres sites S1937, S1938 et S1989 sur l'extrémité C-terminale, sont retrouvés d'avantages phosphorylés en condition pathologique (Burel *et al.*, 2017).

## 5. Régulation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 par la kinase dépendante de l'adénosine monophosphate (AMPK)

Lors d'un infarctus du myocarde, la voie de l'adénosine monophosphate (AMPK) est stimulée par la diminution des concentrations en ATP dans les cardiomyocytes. Cette cascade d'activation AMPK dépendante a été reliée à la phosphorylation des canaux Nav<sub>v</sub>1.5 via le résidu thréonine 101. Ce dernier permettrait, lorsqu'il est phosphorylé, le démasquage du site d'interaction de la protéine « *microtubule-associated protein 1 light chain 3* » LC3 avec Nav<sub>v</sub>1.5, ce qui favoriserait sa dégradation par la voie autophagique (Liu *et al.*, 2019). L'influence de la voie AMPK dans la régulation du courant I<sub>Na</sub> avait déjà été suggérée dans un modèle de cardiomyocytes de rat exprimant une forme active de l'AMPK par infection avec un adénovirus. Ces travaux avaient montré que la stimulation de l'activité de l'AMPK allongeait la durée des PA des cardiomyocytes probablement par une augmentation du courant I<sub>NaL</sub> et un ralentissement des cinétiques d'inactivation. L'AMPK semble également induire un

décalage de la dépendance au potentiel de l'activation et de l'inactivation vers des potentiels hyperpolarisés (Light *et al.*, 2003).

## 6. Régulation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 par les Fyn kinases

La tyrosine kinase Fyn de la famille des Src est l'une des kinases impliquées dans la phosphorylation du canal Nav<sub>v</sub>1.5. C'est une protéine composée de 4 domaines : SH1 l'unité catalytique en C-terminal, SH2 l'unité permettant la reconnaissance des tyrosines phosphorylées, SH3 l'unité de liaison aux prolines et SH4 l'unité d'ancrage à la membrane en N-terminale (Resh, 1998). L'origine des études suggérant que les tyrosines kinases impactent la régulation du courant  $I_{Na}$  remonte au début des années 2000 lorsque l'utilisation d'inhibiteur des tyrosines kinases, sur des cardiomyocytes de lapin, a montré une diminution de la densité de courant, un ralentissement de la levée d'inactivation ainsi qu'un décalage des courbes d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Wang *et al.*, 2003). Cette découverte a rapidement été suivie par l'identification de la Fyn kinase comme responsable des effets sur le courant  $I_{Na}$  (Ahern *et al.*, 2005). Ces effets seraient médiés par la phosphorylation de la tyrosine Y1494 de la boucle DIII-DIV située non loin du motif IFM impliqué dans le mécanisme d'inactivation du canal. Plus récemment, des travaux ont révélé la présence, dans un modèle de HEK-293, de sites de phosphorylation Y68, Y87, Y112 sur l'extrémité N-terminale et de Y1811 et Y1889 sur la queue C-terminale. Ces tyrosines semblent impliquées dans la régulation de la dépendance au potentiel de l'inactivation des canaux Nav<sub>v</sub>1.5 (Iqbal *et al.*, 2018). Cependant, la phosphorylation de ces sites, sur des modèles plus complexes comme les cardiomyocytes, n'a pas été confirmée par les études de phosphoprotéomique (Lorenzini *et al.*, 2021).

## 7. Régulation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 par la voie des kinases PI3K/PDK1/Akt/SGK

Les Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K) sont un groupe de kinases qui phosphorylent le groupe 3-hydroxyle du phosphatidylinositol dont les rôles dans la signalisation cellulaire est bien décrit aujourd'hui. Les PI3K sont classées en trois classes (classe-1, classe-2 et classe-3)

en fonction de leur structure et de la spécificité de substrat (Ballou *et al.*, 2015). Dans le cœur des mammifères, les 3 classes de PI3K sont exprimées, mais la majorité des études se concentre sur la classe-1 (Iqbal et Lemmens-Gruber, 2018). Ces kinases sont organisées en dimères avec une unité catalytique et une unité régulatrice. L'activation de la voie des PI3K va induire l'activation de nombreuses kinases dont la « *Glucocorticoid-regulated Kinase* » (SGK) et l'Akt, aussi appelée protéine kinase B (PKB), par l'intermédiaire de la « *Phosphoinositide-dependent kinase-1* » (PDK1). Cette dernière est un acteur clé de l'activation des kinases de la famille AGC dont font partie la PKC, la PKA, la SGK et l'Akt. Des études de KO de la PDK1, de manière spécifique dans le cœur, ont montré que l'absence de cette protéine induit une diminution de la densité de courant  $I_{Na}$  de par une expression de  $Na_v1.5$ , réduite à la membrane. Au niveau phénotypique cela se traduit par une diminution de la fréquence cardiaque et de la durée des PA. La PDK1 semble donc avoir un effet indirect sur le canal  $Na_v1.5$  probablement par la voie d'activation de Foxo1 et de l'Akt (Han *et al.*, 2015). L'Akt a aussi été décrite comme un intermédiaire entre l'inhibition de l'activité de la PI3K et l'augmentation de la densité de courant  $I_{NaL}$ , dans des contextes pathologiques tels que le syndrome du QT long et le diabète de type II (Lu *et al.*, 2012 ; Lu *et al.*, 2013). Une autre protéine activée par la PDK1 est la protéine SGK, une sérine thréonine kinase ubiquitaire, mais fortement exprimée dans le cœur. Il en existe 3 isoformes, à savoir, la SGK1, la SGK2 et la SGK3 et sont toutes régulées par « *insulin-like Growth Factor-1* » (IGF-1). La SGK1 possède la particularité d'être aussi régulée par les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes (Lang *et al.*, 2014). Le rôle direct de la phosphorylation du canal  $Na_v1.5$ , par la SGK1 et la SGK3, a été démontré dans les ovocytes de xénope au début des années 2000. La co-expression de  $Na_v1.5$  et de la SGK1 augmente la densité de courant  $I_{Na}$ . Tandis qu'avec SGK3, la dépendance au potentiel de l'activation est décalée vers des potentiels hyperpolarisés et la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels dépolarisés augmentant, de ce fait, le courant de fenêtre. De plus, ces effets sont abolis lorsque les sérines S483 et S664 sont mutés en alanine et semblent donc être la cible des SGK1 et SGK3 sur le canal (Boehmer *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'activité de la SGK1 est retrouvée augmentée dans un contexte d'insuffisance cardiaque qu'il soit chez l'homme ou chez la souris (Das *et al.*, 2012). Cette même étude a montré que l'expression d'une forme de SGK1 constitutivement active dans un modèle de souris transgénique provoque des troubles du rythme cardiaque et des arythmies ventriculaires. Au contraire, l'expression d'une forme de SGK1 dominant négatif semble

prévenir la survenue des problèmes cardiovasculaires associés à un modèle de souris insuffisante cardiaque induit par une constriction de l'aorte transverse (modèle TAC). L'expression à la surface de Nav1.5 semble aussi liée à l'activité de la SGK1, car celle-ci inhibe l'activité de l'ubiquitine ligase Nedd4.2 et prévient ainsi l'internalisation du canal. Un site de phosphorylation de la T1590 semble être associé à l'augmentation de la densité de courant  $I_{Na}$  médiée par la SGK1, car la mutation T1590A semble abolir cet effet (Bezzarides *et al.*, 2016).

## 8. Sites de phosphorylation encore non reliés à des kinases

Notre groupe a entrepris l'étude des sites de phosphorylation nouvellement identifiés par spectrométrie de masse. Trois phosphomutants des sites de phosphorylation localisés à proximité les uns des autres sur la boucle reliant les domaines DI/II ont montré des différences avec le canal WT (Lorenzini *et al.*, 2021). Il s'agit des sérines S664, S667 et S671 bien que la S664 soit déjà suspectée comme phosphorylée par la SGK, les effets des deux autres sont inédits. Les deux premières, S664 et S667 présentent des effets sur la dépendance au potentiel de l'activation avec un décalage vers des potentiels hyperpolarisés lorsqu'ils sont mutés en alanine pour abolir la phosphorylation. Le fait que ces résultats aient été obtenus en inhibant la phosphorylation suggère que ces deux sérines sont retrouvées hautement phosphorylées à l'état basal, ce qui est par ailleurs, en accord avec les résultats obtenus en spectrométrie de masse. En plus de cela, ces effets seraient synergiques, car le double phosphomutants amplifie ce décalage. Quant à la troisième, la S671, lorsqu'elle est phosphorylée, semble diminuer la densité de courant  $I_{Na}$  dont l'origine serait une diminution d'expression de Nav1.5 à la surface cellulaire. En opposition avec les deux précédentes sérines, ces résultats semblent mettre en évidence la faible phosphorylation de la S671 à l'état basal. Mes premiers travaux de thèse ont porté sur la caractérisation de l'effet de la S671 sur la densité de courant. (Lorenzini *et al.*, 2021).

Kinase	Résidu phosphorylé	Effet sur $I_{NaV1.5}$	Méthode d'identification
PKA	Homme : S36, S525, S528 Rat : S526, S529	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de la densité de courant <math>I_{Na}</math></li> <li>- Décalage négatif de l'inactivation</li> </ul>	Spectrométrie de masse Phosphomutants Essais Kinases Analyse structurale et site consensus de phosphorylation
PKC	Homme : S1503 Rat : S1505	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la densité de courant <math>I_{Na}</math></li> <li>- Diminution de la <math>P_o</math></li> <li>- Décalage négatif de l'inactivation</li> <li>- Augmentation de l'internalisation</li> </ul>	Phosphomutants Essais Kinases
CaMKII	Homme : S516, S571, T594 Souris : S571, S1937, S1938, S1989	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de la densité courant <math>I_{NaL}</math></li> <li>- Ralentissement des cinétiques d'inactivation</li> <li>- Ralentissement de la levée d'inactivation</li> <li>- Augmente l'inactivation intermédiaire</li> <li>- Décalage positif de l'inactivation</li> </ul>	Spectrométrie de masse Phosphomutants Essais Kinases
AMPK	Homme : T101	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorise la dégradation autophagique</li> <li>- Augmentation de la densité courant <math>I_{NaL}</math></li> <li>- Ralentissement des cinétiques d'inactivation</li> <li>- Décalage négatif de l'inactivation</li> <li>- Décalage négatif de l'activation</li> </ul>	Essais kinases Phosphomutants
Fyn	Homme : Y68, Y87, Y112, Y1494, Y1495, Y1811, Y1889	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la densité de courant <math>I_{Na}</math></li> <li>- Ralentissement de la levée d'inactivation</li> <li>- Décalage négatif de l'inactivation</li> </ul>	Essais kinases Phosphomutants
PI3K $\alpha$ , PDK1 et PKB/Akt	N/A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de la densité de courant <math>I_{Na}</math></li> <li>- Augmentation de la densité courant <math>I_{NaL}</math></li> </ul>	Inhibiteurs kinases

SGK	Homme : S483, S664, T1590	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation de la densité courant <math>I_{Na}</math></li> <li>- Décalage négatif de l'activation</li> <li>- Décalage positif l'inactivation</li> </ul>	Spectrométrie de masse Phosphomutants
Kinases indéterminées	Homme : S667, S671	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminution de la densité de courant <math>I_{Na}</math></li> <li>- Décalage positif de l'activation</li> </ul>	Spectrométrie de masse Phosphomutants

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents sites de phosphorylation retrouvés associés à l'activation de kinases, les effets sur le canal  $Na_v1.5$  qui leur sont attribués et la méthode qui a permis l'identification de ces sites.**

# Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la phosphorylation est l'un des mécanismes majeurs de régulation des canaux Nav1.5. Bien que le rôle de la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  du canal Nav1.5 soit bien connu dans la régulation de l'expression et du fonctionnement du canal, la régulation des canaux Nav1.5 par la phosphorylation de ses protéines partenaires reste largement inexplorée.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'identifier les sites de phosphorylation de la protéine FHF2 à partir de ventricules gauches de souris et de caractériser les rôles de ces sites dans la régulation du canal Nav1.5 cardiaque. De plus, en comparant l'expression des différentes isoformes de FHF2 ainsi que les effets distincts du « *knock-down* » et de la réexpression de FHF2 dans les cardiomyocytes ventriculaires isolés de souris néonatales et adultes, nous avons cherché à déterminer les fonctions différentielles des isoformes de FHF2 dans la régulation des canaux Nav1.5.





# Matériels et méthodes

## I. Plasmides et virus

La séquence codante du canal  $Na_v1.5$  humain hH1c (Séquence de référence NCBI NM\_001099404.2), isoforme majoritaire cardiaque, a été sous-clonée dans le vecteur pCI-CMV et dans le vecteur Dual Basic, la séquence pour le FHF2-VY souris (NM\_001139500.2) dans le vecteur DUAL2-CCM(-) ou pIRES2-ZsGreen et la séquence du FHF1-B humain (NM\_004113.6) dans le vecteur pIRES2-ZsGreen.

Les phosphomutants des canaux  $Na_v1.5$ , FHF2-VY et FHF1-B ont été générés par mutagenèse dirigée, à l'aide du kit Quick Change II XL Site-directed Mutagenesis (Agilent Technologies®). Chacune des sérines a été remplacée, de façon individuelle ou simultanée, soit par des alanines (A), afin d'éliminer les sites de phosphorylation, soit par des acides glutamiques (E), afin de mimer la phosphorylation. Les différents fragments mutés ont été sous-clonés dans le plasmide d'origine et tous les plasmides ainsi obtenus ont été séquencés afin de vérifier la séquence du plasmide généré.

Les adénovirus utilisés pour l'infection des cardiomyocytes ont été générés par la société Vector Biolabs® à partir des plasmides DUAL2-CCM(-) pour la réexpression de la séquence FHF2-VY et des plasmides DUAL-U6 pour l'expression des shRNA (*short hairpin RNA*) contrôle et ciblant FHF2.

## II. Culture et transfection des cellules HEK-293

La lignée cellulaire Human Embryonic Kidney 293 (HEK-293) a été utilisée afin d'exprimer de façon transitoire le canal  $Na_v1.5$  et sa protéine partenaire FHF2-VY ou la protéine FHF1-B. Les cellules HEK-293 sont cultivées dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen®) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio®), de la L-glutamine (Invitrogen®), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules sont maintenues dans un incubateur ventilé à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les cellules sont décollées des flasques de culture 24 heures avant transfection par l'utilisation de trypsine-EDTA puis ensemencées dans des puits de 35 mm de diamètre. Les cellules sont transfectées avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen®) à environ 60-70 % de confluence avec 0.6 µg du plasmide contenant le cDNA de Nav1.5, et 1.4 µg du plasmide contenant les séquences du FHF2-VY et de la GFP.

### III. Isolement et culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de souris nouveaux nés

Les cardiomyocytes ventriculaires de souris C57BL/6J sauvages néonatales sont isolés à partir de cœurs 24h après la naissance en utilisant la méthode du kit Miltenyi Biotec® (#130-098-373). Les cardiomyocytes sont séparés des fibroblastes par un préensemencement de 1h30 à 37°C dans du DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de cheval, 5 % de sérum de veau fœtal (Eurobio®), 1% de L-glutamine (Invitrogen®), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cardiomyocytes sont ensuite ensemencés dans des puits de 35 mm de diamètre recouverts de laminine à 10 µg/mL (Sigma-Aldrich®). Les cardiomyocytes néonataux sont infectés avec 1 mL de milieu contenant l'adénovirus pendant 6h à 37 °C en respectant la « *Multiplicity Of Infection* » MOI de 50 pour les adénovirus exprimant les shARN et de 1 pour les adénovirus réexprimant les protéines FHF2-VY. Le milieu est ensuite changé toutes les 24h après l'isolement à partir d'un milieu DMEM supplémenté de 1 % de sérum de veau fœtal.

### IV. Isolement et culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes

Deux lignées transgéniques différentes de souris C57BL/6J mâles adultes ont été utilisées comme modèle d'étude pour le FHF2 dans les cardiomyocytes adultes. Dans la première, le gène codant pour FHF2 est flanqué de séquences LoxP (FHF2-Lox). La seconde exprime la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de la myosine  $\alpha$  ( $\alpha$ MHC-Cre) spécifique du cœur. Le croisement de ces deux lignées ( $\alpha$ MHC-Cre  $\times$  FHF2-Lox) abouties à l'obtention d'une descendance de souris KD pour le gène FHF2 spécifiquement dans le cœur (FHF2-KD).

Les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes sont isolés à partir des souris C57BL/6J FHF2-Lox ou FHF2-KD âgées de 8 à 12 semaines. Les souris sont, dans un premier temps, mises à mort par dislocation cervicale, et immédiatement utilisées afin d'en extraire le cœur. Ce dernier est ensuite perfusé de manière rétrograde par un système Langendorff, afin de le nettoyer et de retirer le sang des coronaires, pendant approximativement 5 min avec une solution de tyrode contenant : NaCl 113 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 mM, HEPES 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1.6 mM, Taurine 30 mM, Glucose 20 mM et ajustée au pH 7.4 avec NaOH (Sigma-Aldrich®).

Le milieu de perfusion est ensuite substitué à un milieu de digestion pendant 11 min avec la solution de tyrode supplémentée avec 250 µL de libérase à 5mg/mL (TM Research Grade, Sigma-Aldrich® Ref 05401127001). Le cœur est ensuite retiré du système de perfusion pour être découpé mécaniquement sous PSM, dans une solution de tyrode contenant 0.2 mM de Ca<sup>2+</sup> et 10% de sérum de veau fœtal. Lors de cette opération, le ventricule droit et les oreillettes sont séparés du ventricule gauche. Les cellules isolées sont récupérées par filtration (filtre stérile en nylon de 200 µm), puis décantées à 37 °C pendant 10 min. Les cellules sont ensuite réintroduites progressivement dans des milieux de plus en plus riches en calcium (0.5 mM, 1 mM). Les cellules sont ensuite resuspendues dans un milieu M199 (Sigma-Aldrich®) supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal, 10 mM de ButaneDione Monoxime (BDM), 1 % de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, puisensemencées pendant 1h dans des puits de 35 mm de diamètre recouverts de laminine. Après cette incubation, le milieu est substitué par un milieu de culture composé de M199 (Sigma-Aldrich®) supplémenté avec 0.1 % de sérum de veau fœtal, 10 mM de BDM, 0.5 mM d'ITX (Insuline, Transferrine, Sélénium) (Sigma-Aldrich®), 0.5 mM de CD Lipid (Invitrogen®), 0.5 µM de Cytocalasine D (Sigma-Aldrich®), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. L'adénovirus est ajouté lors de ce changement de milieu en respectant les mêmes conditions de MOI que pour les cardiomyocytes néonataux.

## V. Co-immunoprécipitation

L'immunoprécipitation des canaux  $\text{Na}_v$  a été effectuée sur des ventricules gauches de souris C57/BL6J wild-type (WT) de 13 semaines. Les ventricules ont été lysés avec un tampon composé de : HEPES 20 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, 0.5% d'amidosulfobetaine, cocktail d'inhibiteur de protéase 1X, fluorure de phénylméthylsulfonyl 1 mM (PMSF), pepstatine A 0.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) et un cocktail d'inhibiteur de protéases Halt™ 1X (Thermo Fisher Scientific®). Tous les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO). Après 15 min d'agitation à 4°C, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, puis les surnageants ont été récupérés et dosés à l'aide du kit *BCA Protein Assay Kit* (Pierce®). Puis, 8 mg de ces lysats cellulaires ont été incubés pendant 1h avec 12.5  $\mu\text{L}$  de billes magnétiques (*Dynabeads Protein G*, Invitrogen®) préalablement « *crosslinkées* » à 48  $\mu\text{g}$  d'anticorps monoclonaux de souris anti- $\text{Na}_v\text{Pan}$  (M $\alpha$  $\text{Na}_v\text{Pan}$ , Sigma-Aldrich®, #S8809) avec 20 mM de diméthyl pimélimidate (Thermo Fisher Scientific®). Les anticorps M $\alpha$  $\text{Na}_v\text{Pan}$  sont dirigés contre l'épitope de la protéine SP19 (Vassilev et Catterall., 1988) situé sur la troisième boucle de liaison intracellulaire et commun à toutes les sous-unités formant le pore des canaux  $\text{Na}_v$ . Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec du tampon de lyse froid, et les complexes protéiques ont été élués avec du *SDS Sample Buffer* 1X (Bio-Rad®, Hercules, CA) à 60°C pendant 10 min. Quarante-neuf pour cent des complexes protéiques des canaux  $\text{Na}_v$  ventriculaires gauches de souris immunoprécipités ont été analysés par spectrométrie de masse, et le 1% restant a été utilisé pour vérifier les rendements de l'immunoprécipitation  $\text{Na}_v1.5$  par Western blot.

## VI. Extraction ARN et RT-qPCR

Les extractions des ARN totaux de cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales ont été réalisées avec le kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel®) puis leurs qualités ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (BET). L'absence de présence d'éventuel ADN génomique contaminant a été vérifiée par *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR). Les *Reverse Transcriptions* (RT) ont été réalisées à partir de 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total, à l'aide du kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®). La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée à partir de 10 ng d'ADNc et de 0.3  $\mu\text{M}$

d'amorces, à l'aide du kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). La qPCR a consisté en une répétition de 40 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation (95°C, 15 sec) et une étape d'hybridation/élongation (60°C, 1 min). L'analyse des résultats a été réalisée selon la méthode de quantification relative du 2- $\Delta$ Ct où le Ct (*threshold cycle*) représente le nombre de cycles de PCR nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence prédéfinie, situé dans la phase linéaire de la courbe d'amplification. Le Ct du gène d'intérêt est comparé à celui d'un gène de référence, selon la formule  $\Delta$ Ct = Ct<sub>gène</sub> - Ct<sub>référence</sub>. Le calcul du 2- $\Delta$ Ct permet ainsi de comparer l'expression d'un gène entre deux échantillons.

## VII. Western Blot

Les cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales ont été rincés avec du PBS 1X pH 7,4 puis lysées dans un tampon de lyse contenant 20 mM d'HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,5% d'amidosulfobeatine-14 (Sigma-Aldrich®), un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche®), 1mM de Fluorure de Phenylmethylsulfonyl (Interchim®), 0,7 µg/mL de pepstatine A (ThermoScientific®), et des inhibiteurs de phosphatases 1X (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, ThermoScientific®), 48 heures après infection. Après 15 minutes d'agitation à 4°C, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, puis les surnageants ont été récupérés et dosés à l'aide du kit BCA Protein Assay Kit (Pierce®). Les échantillons protéiques ont été repris dans du XT Sample Buffer (Biorad®) contenant 100 µM de DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich®), dénaturés pendant 5 min à 60°C, puis les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose à l'aide du TransBlot® Turbo™ (Biorad®) et la membrane saturée pendant 1h avec 5% de lait dans du PBS-Tween 0,1%. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires monoclonaux de souris m $\alpha$ FGF13-2 (N91/27, NeuroMab®) et M $\alpha$ TrR (Invitrogen®) ont été utilisés respectivement au 1:500ème, et 1:100000ème. Après trois rinçages de 10 min avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane a été incubée 1 h avec un anticorps secondaire, dirigé contre les anticorps primaires de souris et couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP). Après trois nouveaux rinçages avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane a été incubée avec du réactif ElectroChemiluminescence (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate, Pierce®) pendant 5 min, puis les signaux de chemiluminescence ont été révélés à l'aide de l'appareil ImageQuant RT ECL (GE Healthcare®).

## VIII. Patch-clamp

Les enregistrements de courant  $I_{Na}$  ont été effectués avec la méthode de patch-clamp en voltage-clamp en configuration cellule entière sur les cellules HEK-293 transfectées de façon transitoire et les cardiomyocytes néonataux ou adultes infectés. Les expériences de patch-clamp ont été réalisées à température ambiante, 48 h après transfection ou infection et l'acquisition des données s'est faite par l'utilisation du logiciel pClamp (Version 10.4, Molecular Devices®). L'électrode d'enregistrement et de stimulation est relié à un système d'amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments®) lui-même relié à un convertisseur Digidata 1440A (Molecular Devices®) permettant la conversion du signal électrique en signal numérique lisible par le logiciel d'analyse Clampfit (Version 11.2, Molecular Devices®). Les pipettes ont été étirées à l'aide d'une étireuse horizontale Modèle P-97 (Sutter Instrument®), à partir de capillaires de verre en borosilicate (BF150-86-10, Sutter Instrument®), afin d'obtenir des pipettes d'une résistance comprise entre 0.8 et 1.5 M $\Omega$ .

Pour les cardiomyocytes néonataux, la solution intrapipette contient du NaCl 5 mM, CsF 115 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, CsCl 20 mM et ajustée à pH = 7,35 avec du CsOH dont l'osmolarité doit être d'environ 300 mOsms. La solution extracellulaire contient du NaCl 20 mM, CsCl 103 mM, TEA-Cl 25 mM, HEPES 10 mM, glucose 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CoCl<sub>2</sub> 2.5 mM et ajustée à pH = 7,4 avec du CsOH et dont l'osmolarité doit être comprise entre 300 et 310 mOsms (Tous Sigma-Aldrich®).

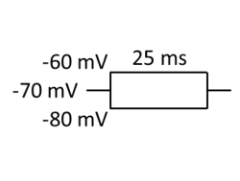
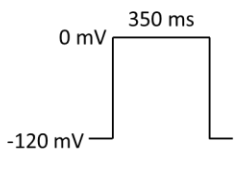
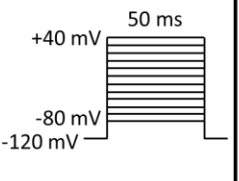
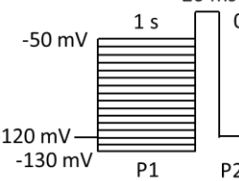
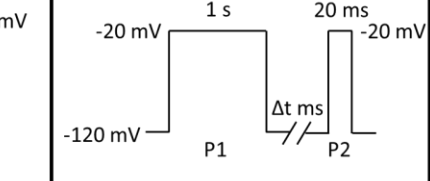
Pour les cardiomyocytes adultes, la solution intrapipette contient du NaCl 5 mM, CsF 115 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, CsCl 20 mM et ajustée à pH = 7,35 avec du CsOH dont l'osmolarité doit être d'environ 300 mOsms. La solution extracellulaire contient du NaCl 10 mM, CsCl 5 mM, N-Methyl-D-glucamine (NDMG) 104 mM, TEA-Cl 25 mM, HEPES 10 mM, glucose 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CoCl<sub>2</sub> 2.5 mM et ajustée à pH = 7,4 avec du CsOH et dont l'osmolarité doit être comprise entre 300 et 310 mOsms. Une solution extracellulaire différente est utilisée pour enregistrer le  $I_{NaL}$  qui contient du NaCl 120 mM, TEA-Cl 25 mM, HEPES 10 mM, glucose 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CoCl<sub>2</sub> 2.5 mM et ajustée à pH = 7,4 avec du CsOH et dont l'osmolarité doit être comprise entre 300 et 310 mOsms. Cette solution

a été utilisée pour diluer la TTX (Tocris®) à 60  $\mu\text{M}$  a été projeté sur les cellules à l'aide d'un éjecteur non électronique.

Pour les HEK-293, la solution intrapipette contient du NaCl 5 mM, CsF 115 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, CsCl 20 mM et ajustée à pH = 7,35 avec du CsOH dont l'osmolarité doit être d'environ 300 mOsm. Une solution intracellulaire différente est utilisée pour enregistrer le  $I_{\text{NaL}}$  qui contient NaCl 1 mM, CsF 119 mM, HEPES 10 mM, EGTA 10 mM, CsCl 20 mM et ajustée à pH = 7,35 avec du CsOH. La solution extracellulaire contient du NaCl 10 mM, CsCl 113 mM, TEA-Cl 25 mM, HEPES 10 mM, glucose 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM et ajustée à pH = 7,4 avec du CsOH et dont l'osmolarité doit être comprise entre 300 et 310 mOsm. Une solution extracellulaire différente est utilisée pour enregistrer le  $I_{\text{NaL}}$  qui contient NaCl 140 mM, CsCl 5 mM, HEPES 10 mM, glucose 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, et ajustée à pH = 7,4 avec du CsOH et dont l'osmolarité doit être comprise entre 300 et 310 mOsm. Cette solution a été utilisée pour diluer la TTX (Tocris®) à 60  $\mu\text{M}$  a été utilisé de la même façon que pour les cardiomyocytes adultes.

L'analyse des données s'effectue sur le logiciel ClampFit (Molecular Devices®), Excel (Microsoft®) et GraphPad Prism (GraphPad Software®). Elle s'effectue sur les cellules en suivant certains critères de qualités comme : la fuite inférieure à 10 % du courant au pic, la résistance membranaire supérieure à 500 M $\Omega$  et la résistance série inférieure à 7 M $\Omega$  sans compensation électrique de l'amplificateur. D'autre part, seuls des courants compris dans un intervalle de -500 pA à -5000 pA ont été analysés excepter pour les mesures nécessaires au calcul de la densité de courant. Ce paramètre s'explique par les limites techniques de l'amplificateur qui ne parvient pas à maintenir le potentiel de membrane lors de l'enregistrement à de trop grandes amplitudes de courant et qui est sujet à un bruit de fond altérant la qualité de l'enregistrement à de trop faibles amplitudes de courant (Montnach *et al.*, 2021).



				
Mesure de la capacitance cellulaire	Mesure du courant au pic et du courant $I_{NaL}$	Mesure de la dépendance au potentiel de l'activation	Mesure de la dépendance au potentiel de l'inactivation	Mesure du temps de levée d'inactivation

**Figure 17 : Protocoles de voltage-clamp en configuration cellule entière, utilisés pour enregistrer les courants  $I_{Na}$  et  $I_{NaL}$ .**

Divers protocoles de patch-clamp ont été effectués sur les cellules après avoir établi la configuration cellule entière. Le premier avec un potentiel de maintien à -70 mV a consisté en 2 sauts de potentiel de  $\pm 10$  mV pendant 25 ms afin de mesurer la capacitance cellulaire (en pF), la résistance membranaire (en  $M\Omega$ ) et la résistance d'accès (en  $M\Omega$ ). La résistance de série ( $R_s$ ) a ensuite été compensée de 60% à 80 % de façon électronique en fonction de l'ouverture et de la taille des cellules. Puis cette dernière a été maintenue à un potentiel de membrane de -120 mV.

Le second a permis d'observer la dialyse qui s'effectue entre la pipette et la cellule afin de commencer l'enregistrement des courants  $I_{Na}$  dans un état stable (environ 5 min). Ce même protocole a également permis l'enregistrement du courant au pic en divisant son amplitude par la capacitance cellulaire (pA/pF). Il consiste en un saut répété de potentiel toutes les 5 s afin de s'assurer du retour à l'état fermé des canaux entre chaque saut de potentiel, qui passe du potentiel de maintien -120 mV à un potentiel de -20 mV pendant 350 ms ou la conductance ( $G$ ) est proche de la conductance maximum ( $G_{max}$ ). Lors de l'enregistrement du  $I_{NaL}$ , ce protocole est utilisé en absence puis en présence de TTX. La différence de courant à 300 ms post-stimulation avant et après TTX permet de calculer  $I_{NaL}$ .

Un troisième protocole d'activation a été réalisé en effectuant, à partir du potentiel de maintien de -120 mV, des dépolarisations successives toutes les 5 s, de -80 mV à +40 mV pendant 50 ms, avec un incrément de 5 mV. Ce protocole permet d'étudier la densité de courant à différents potentiels et ainsi d'établir une représentation graphique des courbes courant-voltage (I-V). Cette courbe I-V permet le calcul du potentiel d'inversion du courant  $I_{Na}$

par simple calcul de la pente dans la phase croissante de la courbe due à la diminution de la force électromotrice. Le potentiel de demi-activation ( $V_{1/2 \text{ act}}$ ) et le facteur de pente ( $k$ ) de la courbe d'activation peuvent également être obtenus par ce protocole. Ces deux paramètres ont été déterminés grâce à une régression non linéaire de la conductance ( $G$ ) normalisée par la conductance maximale ( $G_{\text{max}}$ ), à l'aide d'une équation de type Boltzmann :

$$G = \frac{G_{\text{max}}}{1 + e^{-\frac{(V_m - V_{1/2})}{k}}}$$

Les constantes d'inactivation à partir de l'état ouvert,  $\tau_{\text{slow}}$  et  $\tau_{\text{fast}}$ , ainsi que le rapport  $A_{\text{fast}}/A_{\text{slow}}$ , représentant la fraction de canaux s'inactivant rapidement par rapport à la fraction de canaux s'inactivant plus lentement, ont été déterminés à l'aide de ce 3<sup>ème</sup> protocole. Ces valeurs ont été calculées à partir de la phase d'inactivation 10 ms après le pic selon une régression non linéaire biexponentielle standard de Levenberg-Marquardt :

$$I(t) = A_{\text{fast}} * e^{\frac{-t}{\tau_{\text{fast}}}} + A_{\text{slow}} * e^{\frac{-t}{\tau_{\text{slow}}}} + C$$

Où  $C$  représente les courants résiduels en fin de stimulation (pA).

Un 4<sup>ème</sup> protocole d'inactivation a été réalisé afin de déterminer la dépendance au potentiel de l'inactivation à l'état stable. Pour cela, une première dépolarisation de la membrane est effectuée à partir du potentiel de maintien de -120 mV, toutes les 5 s, de -130 mV à -50 mV pendant 1 s, avec un incrément de 5 mV. Celles-ci sont systématiquement suivies d'une seconde dépolarisation à -20 mV pendant 20 ms dont le courant est le reflet des canaux restants, ne s'étant pas ouverts et inactivés lors du premier pulse et a permis de déterminer la disponibilité des canaux pour un potentiel donné. Ce protocole permet de calculer le potentiel de demi-inactivation ( $V_{1/2 \text{ inact}}$ ) et le facteur de pente ( $k$ ) de la courbe d'inactivation. Ces courbes ont été tracées à l'aide d'une régression non linéaire de type Boltzmann :

$$I = \frac{I_{\text{max}}}{1 + e^{-\frac{(V_m - V_{1/2})}{k}}}$$

Afin d'étudier la levée d'inactivation des canaux Nav1.5, un 5<sup>ème</sup> protocole a été effectué avec une première dépolarisation qui passe du potentiel de maintien de -120 mV à -20 mV pendant 1 s (stimulation P1), suivie d'une re-polarisation à -120 mV maintenue pendant un temps variable de 1 à 200 ms, avant d'imposer une nouvelle dépolarisation à -20 mV pendant 20 ms (stimulation P2), toutes les 5 s.

Les constantes de temps ( $\tau_{fast}$  et  $\tau_{slow}$ ) et l'amplitude (A) de levée d'inactivation ont été déterminées à l'aide d'une régression non linéaire du pic de courant  $I_{Na}$  mesuré en P2 normalisé par rapport au pic de courant mesuré en P1, à l'aide d'une équation de type biexponentielle :

$$I = A * \left( 1 - e^{\frac{-t}{\tau_{fast}}} + 1 - e^{\frac{-t}{\tau_{slow}}} \right) + C$$

Où C représente les courants résiduels en fin de stimulation (pA).

## IX. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance ANOVA à un facteur contrôlé. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme significative.

# Résultats

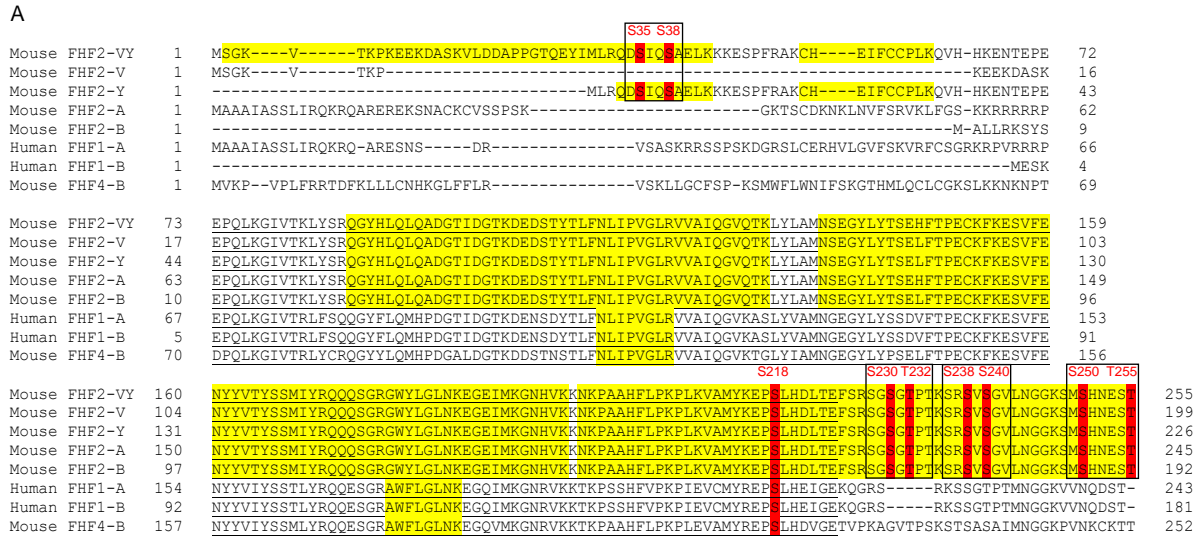
## I. Identification des sites de phosphorylation natifs de FHF2 dans le ventricule gauche murin

L'identification des sites de phosphorylation des FHF2 s'est faite par spectrométrie de masse à partir des complexes protéiques de  $\text{Na}_v$  purifiés par immunoprécipitation en utilisant des anticorps monoclonaux de souris ( $\alpha\text{Na}_v\text{PAN}$ ). Plusieurs protéines de FHF2 ont été identifiées par cette méthode. FHF2 est majoritaire, mais des peptides de FHF1 ou FHF4 sont également présents.

Afin d'entreprendre une analyse approfondie du rôle de FHF2 et de FHF1 dans la régulation de l'activité du canal  $\text{Na}_v1.5$ , nous avons débuté par l'analyse des séquences protéiques entre leurs différents variants d'excision et d'épissage (FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y, FHF2-A, FHF2-B, FHF1-A, FHF1-B et FHF4-B). Chaque variant de FHF2 présente sur sa séquence protéique les sérines S218, S230, S238, S240 et S250 ainsi que les thréonines T232 et T255 (**Figure 18A**). Seules les sérines S35 et S38 semblent spécifiques de l'exon Y et ne sont retrouvées que sur le variant FHF2-VY et FHF2-Y. Ces acides aminés sont dans l'ensemble organisés en paire et ont été étudiés au cours de ce projet en tenant compte de cette organisation (encadré en noir, **Figure 18A**) excepté pour la sérine S218. Cette dernière a été étudiée de manière indépendante en raison de sa présence sur le site d'interaction du FHF2 et du FHF1 avec le canal  $\text{Na}_v1.5$ .

Dans l'ensemble, la majorité des peptides sont retrouvés phosphorylés (Abondance relative =  $1.6\text{E}+09$  UA peptides phosphorylés contre  $1.5\text{E}+08$  UA pour les peptides non phosphorylés). Les sérines et thréonines précédemment citées ont toutes été retrouvées phosphorylées dans cette étude de manière plus ou moins importante sur les peptides correspondant au FHF2 (**Figure 18B**). De façon intéressante, la sérine S218 est retrouvée davantage phosphorylée que les autres (AR =  $1.4\text{E}+09$  UA) et c'est une sérine qui est conservée

entre tous les variants de FHF2 (S150 pour FHF1). Les sérines S35-S38 sont également retrouvées abondamment phosphorylées (AR = 2.0E+08 UA) en opposition au S230-T232 (AR = 5.9E+06), S238-S240 (AR = 1.6E+06) et S250-T255 (AR = 1.6E+07). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la protéine FHF2 est une protéine hautement phosphorylée en condition physiologique plus particulièrement sur certains sites.



**Figure 18 : Identification des sites de phosphorylation présents sur les protéines FHF2 (A) Alignement des séquences des protéines FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y, FHF2-A, FHF2-B, FHF1-A, FHF1-B et FHF4-B avec (en jaune) les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse et (en rouge) les sites de phosphorylation identifiés. (B) Quantification de l'abondance relative des sites retrouvés phosphorylés (rouge) ou non (blanc) à l'état basal dans des cœurs de souris WT (en UA).**

## II. Étude des effets de la phosphorylation du FHF2 sur l'activité des canaux $\text{Na}_v$ dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales.

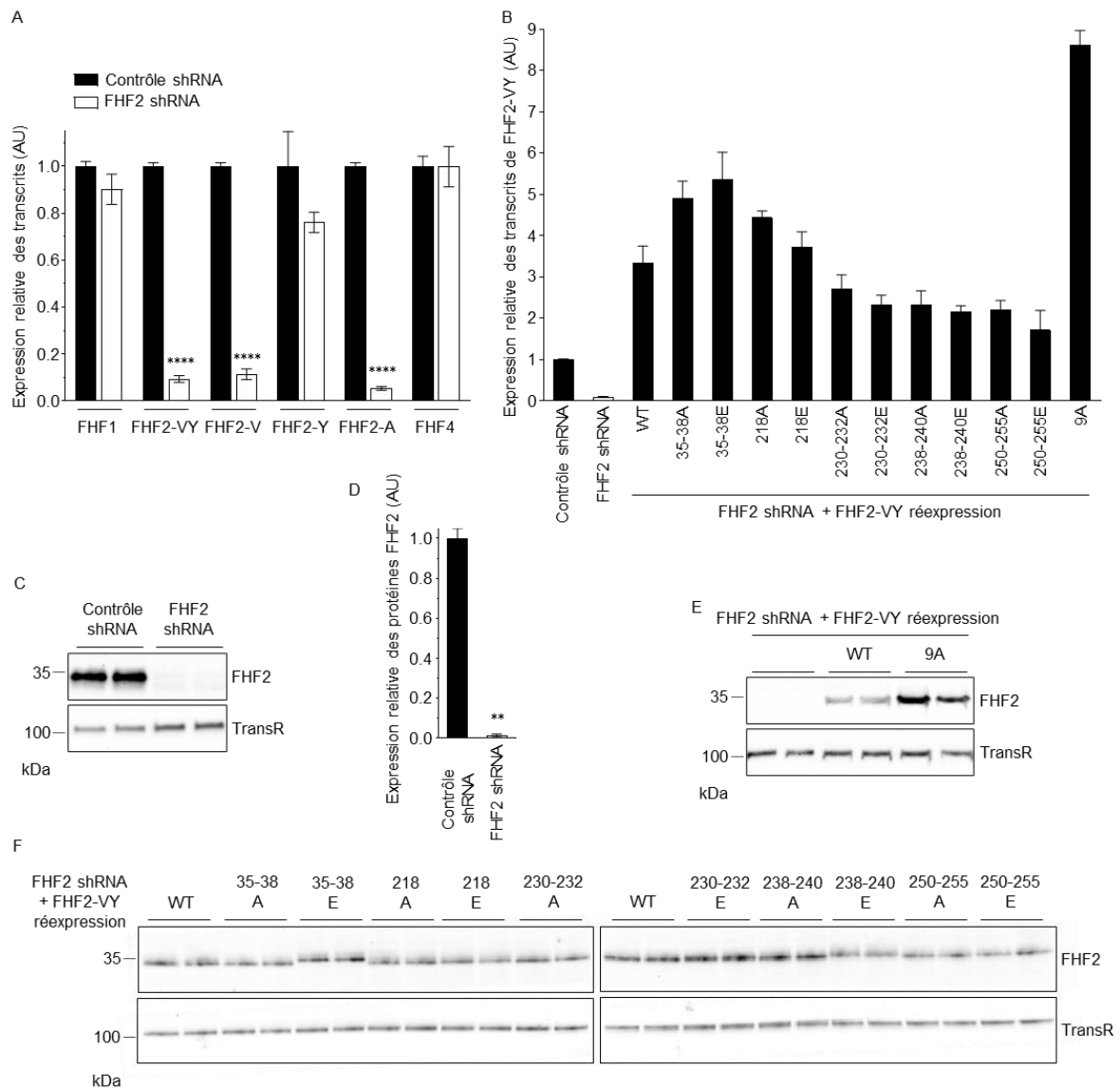
### 1. Mise au point d'un modèle de knock-down et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes de souris néonatales.

Pour étudier l'influence de la phosphorylation du FHF2, nous avons développé un modèle de cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales reposant sur l'extinction de l'expression du FHF2 par interférence ARN (shRNA) et la réexpression de l'isoforme majoritaire FHF2-VY par adénovirus.

Les résultats obtenus par RT-qPCR sur ces cardiomyocytes montrent que pour les variants FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-A, le shRNA présente une efficacité de près de 90%, 48 heures après infection ( $p < 0.01$ ), mais pas pour le FHF2-Y (**Figure 19A**). Par ailleurs, la qPCR ne nous permet pas de détecter la présence de FHF2-B suggérant l'absence d'expression de ce dernier dans les cardiomyocytes néonataux. Au niveau protéique, par la méthode de western blot, le shRNA induit bien une diminution de l'expression de FHF2 dans les cellules (**Figure 19C et 19D**).

La réexpression du variant majoritaire du FHF2 (FHF2-VY) WT ou pour chaque forme mutée, en alanine (A) ou en glutamate (E) est confirmée en RT-qPCR (**Figure 19B**) et en western blot (**Figure 19E et 19F**). Un dernier phosphomutant présentant les 9 sites de phosphorylation, mutés en alanine, a été généré, afin d'étudier l'impact de l'absence de phosphorylation sur les sites pris dans leur ensemble. Le niveau de réexpression des différents construits est du même ordre de grandeur pour chacun des construits, mais est toutefois supérieur à l'expression de FHF2 endogène (de 1.7 fois supérieure pour le FHF2-VY 250-255E jusqu'à 5.4 fois pour FHF2-VY 35-38E). Le phosphomutant 9A se démarque davantage, car il présente la plus forte expression parmi tous les transcrits (**Figure 19B**) et les protéines (**Figure 19E**) FHF2 (8.6 fois supérieur au FHF2 endogène).

Ces résultats nous permettent de valider notre modèle de cardiomyocytes néonataux et semblent en adéquation avec l'objectif d'étudier les effets de la phosphorylation du FHF2 sur la modulation du courant  $I_{Na}$ .



**Figure 19 : Analyse de l'expression des transcrits et des protéines de FHF2 suite à son KD et sa réexpression par son isoforme majoritaire, FHF2-VY, dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales** (A) Quantification par RT-qPCR de l'expression des transcrits FHF2 après le knockdown FHF2 dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales. Le knockdown de FHF2 a été effectué avec un adénovirus contenant un shRNA dirigé contre le FHF2 (B) Quantification par RT-qPCR de l'expression des transcrits FHF2-VY WT ou phosphomuté en A ou E. La réexpression a été effectuée avec un adénovirus contenant la séquence de FHF2-VY (C) Analyse par western blot de l'expression de la protéine FHF2 dans les différentes conditions (D) Quantification du western blot. (E et F) Analyse par western blot de l'expression des transcrits FHF2 dans des cardiomyocytes de souris néonatales infectées avec des adénovirus exprimant un shRNA contre FHF2 seul ou avec réexpression de FHF2-VY WT ou phosphomuté.

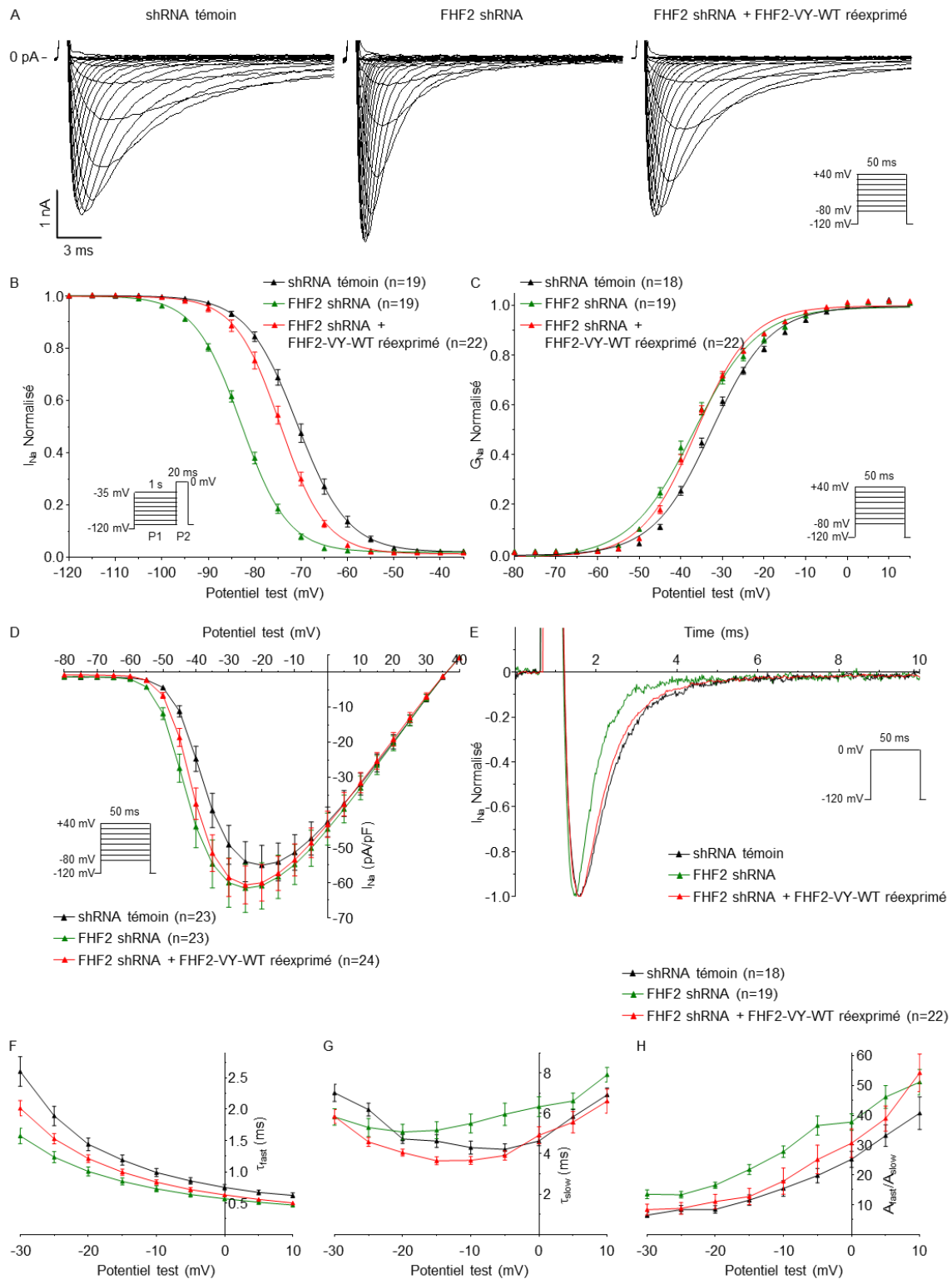
## 2. Étude des propriétés biophysiques des canaux $\text{Na}_V$ dans un modèle de *knock-down* et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales.

Les analyses de patch-clamp en configuration cellule entière sur les cardiomyocytes néonataux ont été effectués 48h après infection avec les adénovirus. Les données obtenues ne montrent aucun effet significatif sur les paramètres de densité de courant  $I_{\text{Na}}$  et de temps de levée d'inactivation (**Figure 20D, Tableau 2**). Un effet encore jamais observé dans la littérature a été mis en évidence sur la dépendance au potentiel de l'activation. En effet, le KD de FHF2 provoque un décalage de la courbe d'activation de près de 4 mV ( $p < 0.001$ ) vers des potentiels plus négatifs. Cependant, cet effet n'est pas inversé par la réexpression du FHF2-VY (**Figure 20C**). Un autre effet est observé avec le KD de FHF2 qui induit un décalage significatif de près de 12 mV sur l'inactivation ( $p < 0.0001$ ) et qui est partiellement restauré par la réexpression de l'isoforme FHF2-VY (**Figure 20B, Tableau 2**). Ces résultats confirment les données de la littérature décrivant le FHF2 comme augmentant la disponibilité dans les cardiomyocytes (Wang *et al.*, 2011 ; Hennessey *et al.*, 2013). Des effets sur les cinétiques d'inactivation sont aussi visibles à 0 mV, potentiel à partir duquel il n'y a pas de différence de dépendance au potentiel de l'activation entre les conditions étudiées. En effet, le KD de FHF2 présente une accélération de l'inactivation rapide ( $\tau_{\text{Fast}}$  diminue de 0.3 ms ;  $p < 0.001$ ), et là encore, il est partiellement restauré par une réexpression de FHF2-VY (**Figure 20A, 20E et 20F, Tableau 2**). Nous observons aussi que la proportion des canaux s'inactivant rapidement par rapport aux canaux s'inactivant plus lentement est augmentée (Rapport  $A_{\text{fast}}/A_{\text{slow}}$  augmenté  $p < 0.01$ ) (**Figure 20H, Tableau 2**). Dans l'ensemble ces résultats ont permis de valider notre modèle expérimental et témoignent de l'effet du FHF2 dans la régulation de l'inactivation des canaux  $\text{Na}_V$  et dans une moindre mesure de l'activation.

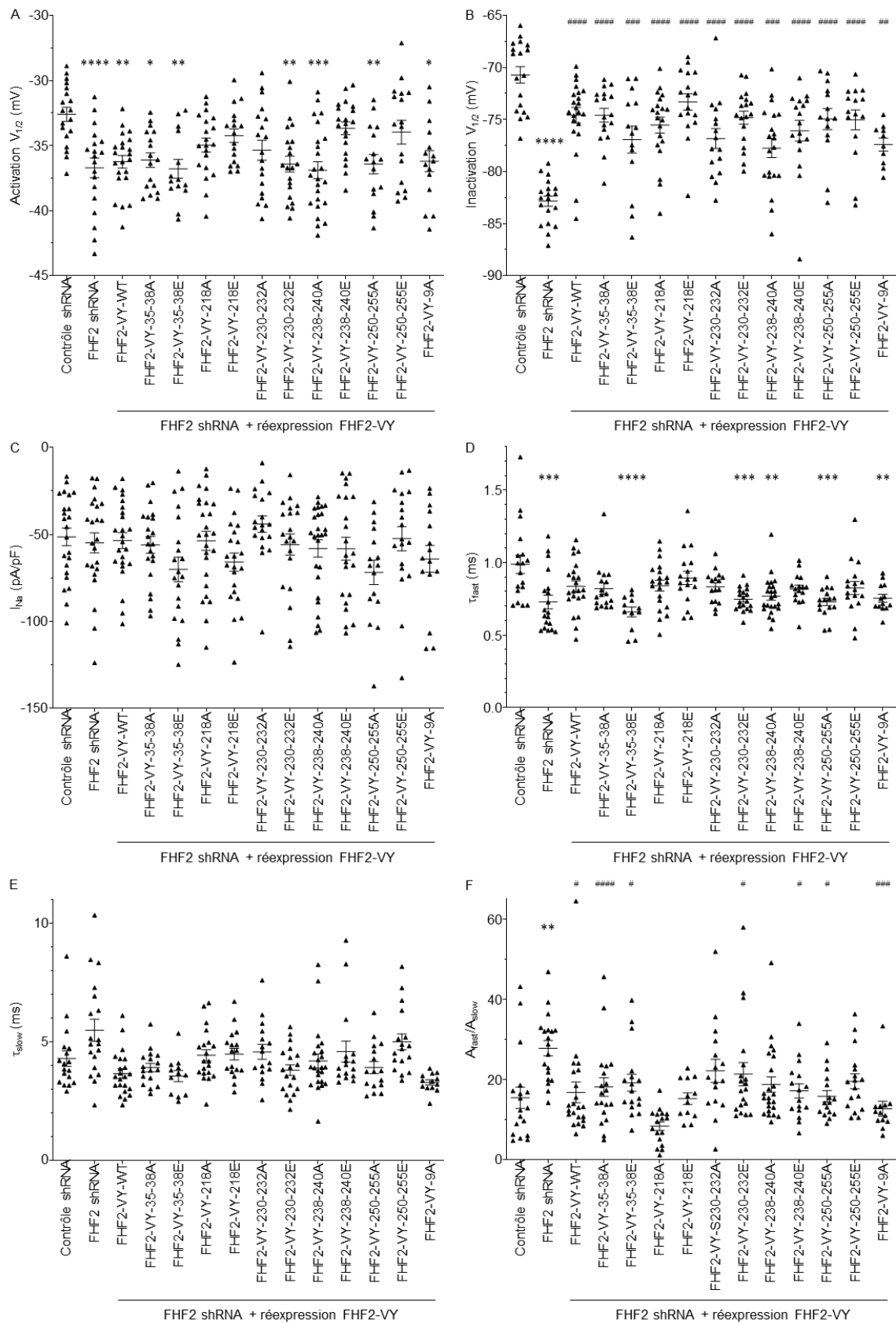
Nous avons ensuite étudié les propriétés biophysiques des canaux  $\text{Na}_V$  suite à la réexpression des phosphomutants alanine ou glutamate, simple ou doubles du FHF2-VY. Un dernier phosphomutant avec les 9 sites de phosphorylation mutés en alanine a été généré pour vérifier le possible impact de l'ensemble des sites présents sur FHF2. Aucune différence n'est observée entre la réexpression du FHF2-VY WT et avec les phosphomutants sur les propriétés d'inactivation, et la densité de courant  $I_{\text{Na}}$  et d'inactivation lente (**Figure 21B, 21C**



**et 21E, Tableau 2).** Concernant la dépendance au potentiel de l'activation, le fait que la réexpression de FHF2-VY WT ne restaure pas le phénotype sauvage nous empêche de conclure quant à l'effet de la phosphorylation de FHF2 sur l'activation des Nav (**Figure 21A**). La phosphorylation de la protéine FHF2-VY ne semble donc pas avoir d'effet sur la régulation des propriétés biophysiques des canaux Nav dans ce modèle expérimental, mais le fait que la réexpression de FHF2-VY ne restaure pas certains paramètres nous amène à penser qu'il pourrait s'agir d'une régulation sous dépendance d'une autre isoforme de FHF. C'est pourquoi, afin d'approfondir cette étude, un modèle de cardiomyocytes plus matures a été développé.



**Figure 20 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales KD pour FHF2 et lors de la réexpression du FHF2-VY.** Enregistrement en voltage-clamp configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans des cardiomyocytes de souris néonatales 48 heures après infection par des adénovirus exprimant un shRNA contrôle (Noir), un shRNA ciblant FHF2 (Vert), ou une combinaison de deux adénovirus exprimant pour l'un, le shRNA ciblant FHF2 et pour l'autre, la séquence codante de FHF2-VY-WT (Rouge). (A) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives de chaque condition, en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendances au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives normalisés par leurs pics. (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé.



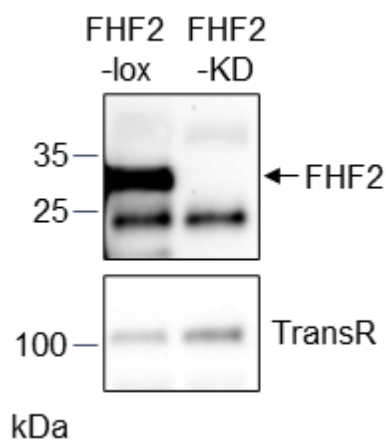
**Figure 21 : Propriétés biophysiques des canaux  $N_{av}$  de cardiomyocytes ventriculaires de souris WT néonatales infectées par des adénovirus exprimant un shRNA contrôle, un shRNA dirigé contre FHF2 seul ou avec un autre adénovirus réexprimant la séquence de FHF2-VY-WT ou FHF2-VY phosphomuté (A ou E) aux sites indiqués. (A) Potentiel de demi-activation  $V_{1/2}$  en mV. (B) Potentiel de demi-inactivation en mV. (C) Densité de courant  $I_{Na}$  pA/pF. (D) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  à 0 mV. (E) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  à 0 mV. (F) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement à 0 mV. Les valeurs  $I_{Na}$ ,  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  et  $A_{fast}/A_{slow}$  présentées ont été déterminées à partir d'enregistrements obtenus sur des dépolarisations à -10 mV (HP=-120 mV). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport au shRNA contrôle ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  par rapport au shRNA FHF2 ; ANOVA à un facteur contrôlé.**

	$I_{Na}$ (pA/pF)	Temps au pic (ms)	Constantes des cinétiques d'inactivation			Dépendance au potentiel de l'activation		Dépendance au potentiel de l'inactivation		Temps de levée d'inactivation	
			$\tau_{fast}$ (ms)	$\tau_{slow}$ (ms)	$A_{fast}/A_{slow}$	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$\tau_{fast}$ (ms)	$\tau_{slow}$ (ms)
Contrôle shRNA	-51.4 ± 5.1 (23)	1.03 ± 0.05 (19)	0.99 ± 0.06 (18)	4.3 ± 0.3 (18)	15.5 ± 2.6 (18)	-32.6 ± 0.5 (19)	7.0 ± 0.2 (19)	-70.7 ± 0.8 (18)	5.1 ± 0.2 (18)	3.1 ± 0.3 (16)	51.1 ± 8.7 (16)
FHF2 shRNA	-54.9 ± 5.7 (23)	0.92 ± 0.04 (19)	0.73 ± 0.05 (19) ***	5.5 ± 0.5 (19)	27.8 ± 1.9 (19) **	-36.7 ± 0.8 (19) ***	7.5 ± 0.3 (19)	-82.8 ± 0.5 (19) ****	4.9 ± 0.1 (19)	4.0 ± 0.3 (19)	45.4 ± 7.5 (19)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-WT	-53.5 ± 4.6 (24)	0.97 ± 0.03 (23)	0.84 ± 0.04 (22)	3.7 ± 0.2 (22)	16.8 ± 2.6 (22) #	-36.2 ± 0.5 (22) **	6.5 ± 0.2 (22)	-74.6 ± 0.8 (22) #####	4.5 ± 0.1 (22)	2.7 ± 0.1 (19)	56.8 ± 8.5 (19)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-35-38A	-56.0 ± 4.8 (21)	0.90 ± 0.02 (17)	0.82 ± 0.04 (17)	3.9 ± 0.2 (17)	8.4 ± 1.1 (17) #####	-36.1 ± 0.6 (17) *	6.8 ± 0.2 (17)	-74.6 ± 0.7 (17) #####	4.9 ± 0.2 (17)	2.9 ± 0.2 (16)	44.8 ± 10.0 (16)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-35-38E	-70.1 ± 7.1 (20)	0.75 ± 0.02 (14)	0.66 ± 0.03 (12) ****	3.6 ± 0.2 (12)	15.2 ± 1.4 (12) #	-36.8 ± 0.7 (14) **	7.1 ± 0.2 (14)	-76.9 ± 1.3 (14) ###	4.8 ± 0.2 (14)	2.8 ± 0.2 (14)	61.1 ± 7.1 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-218A	-53.7 ± 5.5 (25)	0.91 ± 0.03 (20)	0.86 ± 0.03 (19)	4.3 ± 0.2 (19)	18.2 ± 2.3 (19)	-35.0 ± 0.5 (20)	7.1 ± 0.1 (20)	-75.5 ± 0.8 (20) #####	4.5 ± 0.1 (20)	3.4 ± 0.2 (14)	46.6 ± 3.9 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-218E	-65.9 ± 5.2 (22)	1.00 ± 0.04 (17)	0.89 ± 0.05 (17)	4.5 ± 0.2 (17)	19.2 ± 2.1 (17)	-34.2 ± 0.5 (17)	6.6 ± 0.2 (17)	-73.3 ± 0.8 (17) #####	4.6 ± 0.1 (17)	3.2 ± 0.2 (15)	52.7 ± 8.6 (15)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-230-232A	-44.1 ± 4.8 (19)	0.78 ± 0.04 (19)	0.83 ± 0.03 (16)	4.6 ± 0.3 (16)	22.2 ± 2.9 (16)	-35.4 ± 0.8 (19)	7.7 ± 0.2 (19)	-76.8 ± 1.0 (16) #####	4.8 ± 0.2 (16)	3.1 ± 0.2 (14)	59.3 ± 10.5 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-230-232E	-55.9 ± 6.1 (20)	0.74 ± 0.03 (20)	0.75 ± 0.02 (19) ***	3.8 ± 0.2 (19)	21.4 ± 2.9 (19) #	-36.4 ± 0.6 (20) **	6.7 ± 0.2 (20)	-74.8 ± 0.6 (18) #####	4.4 ± 0.1 (18)	2.4 ± 0.2 (19)	55.1 ± 4.8 (19)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-238-240A	-58.1 ± 4.9 (26)	0.73 ± 0.02 (24)	0.77 ± 0.03 (23) **	4.2 ± 0.3 (23)	18.8 ± 1.9 (23)	-36.9 ± 0.7 (24) ***	7.2 ± 0.2 (24)	-77.8 ± 0.9 (20) ###	4.5 ± 0.1 (20)	2.8 ± 0.1 (18)	64.6 ± 5.0 (18)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-238-240E	-58.3 ± 6.6 (22)	0.77 ± 0.02 (20)	0.82 ± 0.03 (16)	4.6 ± 0.4 (16)	17.2 ± 1.8 (16) #	-33.7 ± 0.5 (20)	7.3 ± 0.1 (20)	-76.1 ± 1.0 (17) #####	4.4 ± 0.1 (17)	2.5 ± 0.2 (12)	64.1 ± 13.2 (12)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-250-255A	-71.8 ± 7.0 (16)	0.75 ± 0.03 (16)	0.73 ± 0.02 (16) ***	3.9 ± 0.3 (16)	15.8 ± 1.4 (16) #	-36.4 ± 0.7 (16) **	6.9 ± 0.2 (16)	-75.0 ± 1.0 (14) #####	4.9 ± 0.2 (14)	2.4 ± 0.1 (14)	65.3 ± 7.1 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-250-255E	-52.4 ± 7.0 (19)	0.79 ± 0.02 (17)	0.82 ± 0.04 (17)	5.0 ± 0.3 (17)	19.6 ± 1.8 (17)	-34.0 ± 0.9 (17)	7.4 ± 0.2 (17)	-75.0 ± 1.0 (15) #####	4.6 ± 0.2 (15)	2.6 ± 0.1 (15)	49.4 ± 5.5 (15)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-9A	-64.1 ± 7.7 (15)	0.75 ± 0.02 (15)	0.75 ± 0.03 (13) **	3.3 ± 0.1 (13)	12.7 ± 1.8 (13) ###	-36.2 ± 0.8 (15) *	7.2 ± 0.3 (15)	-77.4 ± 0.6 (10) ##	4.2 ± 0.1 (10)	4.4 ± 0.4 (8)	78.5 ± 7.6 (8)

**Tableau 2 : Propriétés biophysiques des canaux  $I_{Na}$  de cardiomyocytes ventriculaires de souris WT néonatales infectées par des adénovirus exprimant un shRNA contrôle, un shRNA dirigé contre FHF2 seul ou avec un autre adénovirus réexprimant la séquence de FHF2-VY-WT ou FHF2-VY phosphomuté (A ou E) aux sites indiqués. La densité de courant  $I_{Na}$ , le temps au pic, et les constantes des cinétiques d'inactivation ont été obtenus à la suite de dépolarisation à -10 mV à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre de cellules analysées est entre parenthèses. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparé au témoin shRNA; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  comparé au FHF2 shRNA; Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance Anova à un facteur contrôlé.**

### III. Étude des effets des sites de phosphorylation de FHF2 sur l'activité des canaux $\text{Na}_v$ dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes

#### 1. Mise au point d'un modèle de *knock-down* et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes de souris adultes



**Figure 22 : Analyse par western blot du KD de FHF2 dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes.**

Afin d'étudier l'influence de la phosphorylation de FHF2 dans des cardiomyocytes matures, nous avons utilisé un modèle de cardiomyocyte ventriculaire de souris adultes reposant sur l'utilisation de souris Cre-lox pour le FHF2 de manière spécifique au cœur, puis par la réexpression en culture de l'isoforme majoritaire FHF2-VY par adénovirus.

Le western blot montre que l'expression de FHF2 semble bien diminuée dans les cardiomyocytes de souris adultes cre-lox-FHF2 par rapport aux cardiomyocytes lox-FHF2 (**Figure 22**). La réexpression du FHF2-VY a été évaluée directement en patch-clamp.

#### 2. Étude des propriétés biophysiques des canaux $\text{Na}_v$ dans un modèle de *knock-down* et de réexpression de FHF2 dans des cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes

Les analyses de patch-clamp en configuration cellule entière sur les cardiomyocytes adultes ne montrent aucun effet significatif sur les paramètres de dépendance au potentiel de l'activation et de temps de levée d'inactivation (**Figure 23C, tableau 3**). Le KD de FHF2 présent dans ce modèle ne semble pas affecter la densité de courant  $I_{\text{Na}}$  mais la réexpression de l'isoforme majoritaire FHF2-VY a pour conséquence une augmentation de la densité de courant  $I_{\text{Na}}$  de manière significative ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 23A, 23D, Tableau 3**). Dans ce modèle, le décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation est aussi présent avec un décalage de près de 9 mV ( $p < 0.0001$ ) qui cette fois est entièrement inversé par la réexpression du FHF2-

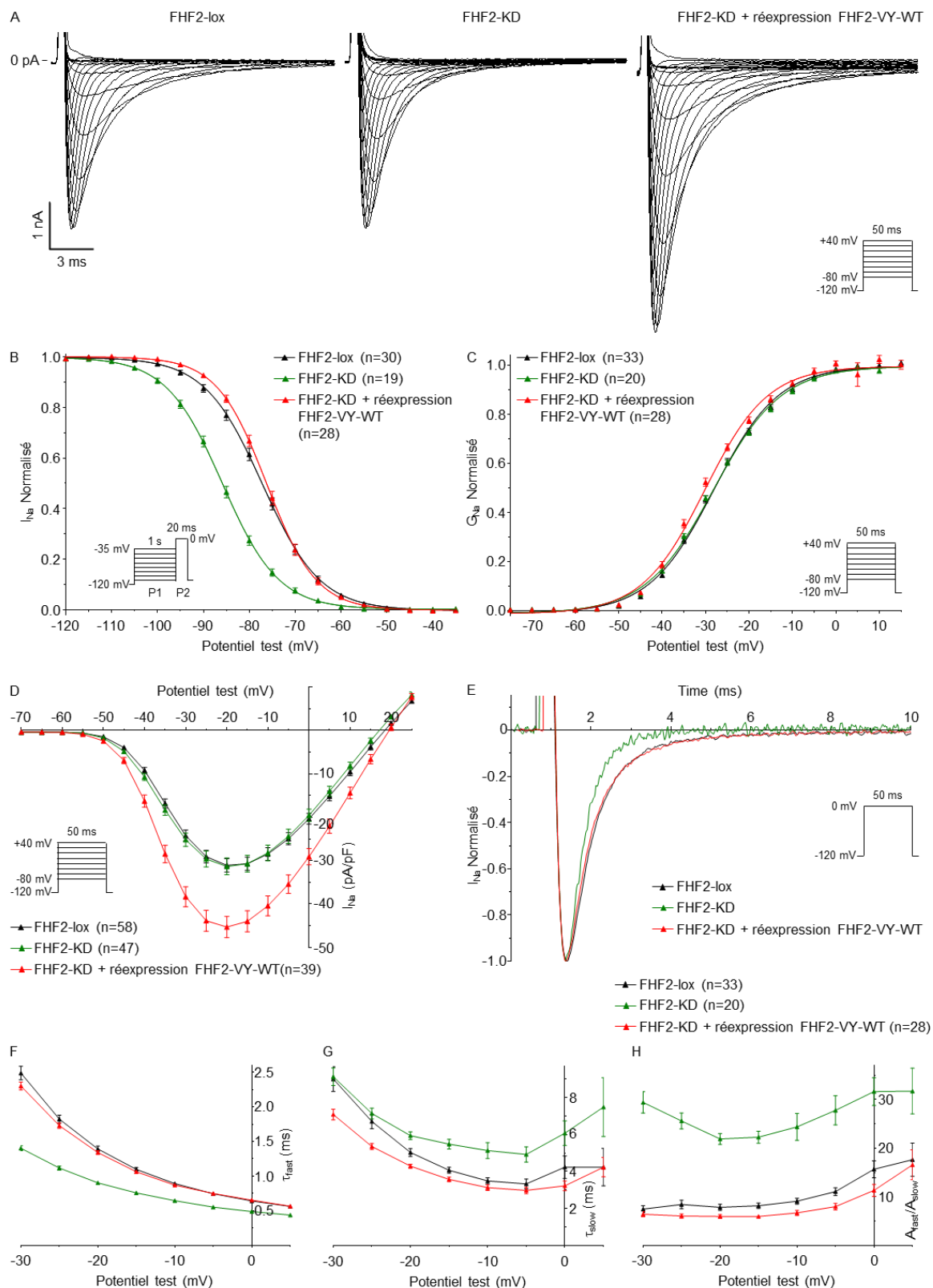
VY (**Figure 23B, Tableau 3**). De la même façon, les cinétiques d'inactivation rapide sont accélérées dans la condition KD FHF2 et entièrement restaurées lors de la réexpression de FHF2-VY (**Figure 23A, 22E, Tableau 3**). Cet effet est visible sur les paramètres du  $\tau_{Fast}$  qui diminue de 0.5 ms par rapport au contrôle FHF2-Lox ( $p < 0.0001$ ) et du rapport  $A_{fast}/A_{slow}$  qui est augmenté ( $p < 0.0001$ ). Comme pour les cardiomyocytes néonataux, le KD FHF2 et la réexpression de FHF2-VY ne semble pas affecter l'inactivation lente (**Figure 23G, Tableau 3**). Dans l'ensemble, ces résultats ont permis de montrer que la réexpression du FHF2-VY par les adénovirus est valide, car il restaure les effets de régulation du FHF2 avec les canaux  $Nav$  sur les propriétés d'inactivation. Cependant, certains effets tels que la densité de courant et la dépendance au potentiel de l'activation divergent des résultats obtenus dans les cardiomyocytes néonataux, ce qui suggère que des différences de régulation existent en fonction de l'âge des souris.

Nous avons ensuite étudié les propriétés biophysiques des canaux  $Nav$  suite à la réexpression des phosphomutants alanine ou glutamate, simple ou doubles du FHF2-VY. La réexpression de FHF2-VY WT ou phosphomutant restaure les effets de FHF2 sur les cinétiques et la dépendance au potentiel de l'inactivation (**Figure 24B, 24D, 24F, Tableau 3**). Les effets sur la densité de courant montrent, dans l'ensemble, une augmentation de la densité de courant  $I_{Na}$  avec chaque FHF2-VY ré-exprimé. Cette augmentation d'amplitude de courant pourrait être due au fait que l'expression du FHF2-VY est augmentée par rapport au FHF2 endogène favorisant ainsi l'interaction de FHF2-VY avec  $Nav1.5$ . Cette même raison pourrait aussi prévenir tout effet des phosphomutants de FHF2 sur la modulation des propriétés du courant  $I_{Na}$ .

Du fait d'un lien déjà établi dans la régulation du courant sodique  $I_{NaL}$  par les protéines FHF2 (Chakouri *et al.*, 2021), nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de la phosphorylation dans la régulation de  $I_{NaL}$ . Le KD de FHF2 augmente  $I_{NaL}$  de 0.1 pA/pF soit une densité de courant supérieur de près de 20% par rapport au contrôle FHF2-Lox ( $p < 0.05$ ) (**Tableau 4**) et cet effet est inversé par la réexpression du FHF2-VY WT ( $p < 0.0001$ ), mais aussi par le FHF2-VY 9A ( $p < 0.0001$ ).

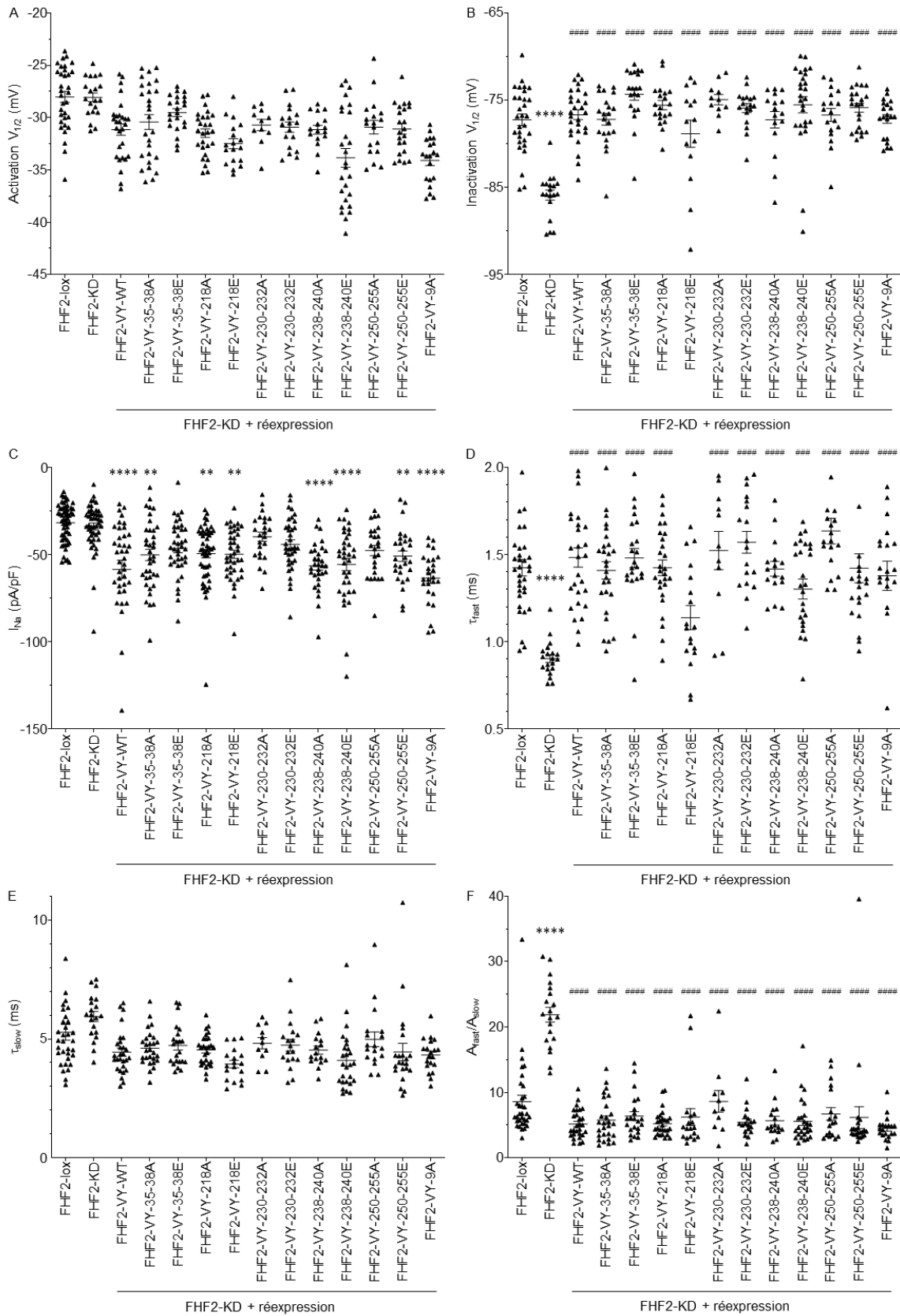
Ainsi, les résultats des deux modèles de cardiomyocytes ne nous a pas permis d'identifier les effets de la phosphorylation sur la régulation des propriétés biophysiques des

canaux Nav. Cependant, les différences entre les deux modèles suggèrent qu'une autre isoforme que FHF2-VY pourrait être impliquée dans les effets observés dans les cardiomyocytes néonataux.



**Figure 23 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_V$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes KD pour FHF2 et avec réexpression du FHF2-VY.** Enregistrement voltage-clamp cellule entière, des courants  $I_{Na}$  enregistrés 48 heures après l'isolement de cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes FHF2-lox (Noir) ou FHF2-knockdown (FHF2-KD) (Vert) et infectés avec des adénovirus réexprimant FHF2-VY WT (Rouge). (A) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives de chaque condition en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Tracés de courants  $I_{Na}$  de cellules représentatives normalisés par leurs pics. (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ).





**Figure 24 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_V$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes FHF2-lox ou FHF2-knockdown (FHF2-KD) et infectés avec des adénovirus réexprimant FHF2-VY WT ou phosphomuté (A ou E) aux sites indiqués. (A) Potentiel de demi-activation  $V_{1/2}$  en mV. (B) Potentiel de demi-inactivation  $V_{1/2}$  en mV. (C) Densité de courant  $I_{Na}$  pA/pF. (D) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  à -20 mV. (E) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  à -20 mV. (F) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement à 0 mV. Les valeurs  $I_{Na}$ ,  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  et  $A_{fast}/A_{slow}$  présentées ont été déterminées à partir d'enregistrements obtenus sur des dépolarisations à -20 mV (HP=-120 mV). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  par rapport au FHF2-Lox ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  par rapport au FHF2-KD ; ANOVA à un facteur contrôlé.**

	$I_{Na}$ (pA/pF)	Temps au pic (ms)	Constantes des cinétiques d'inactivation			Dépendance au potentiel de l'activation		Dépendance au potentiel de l'inactivation		Temps de levée d'inactivation	
			$\tau_{fast}$ (ms)	$\tau_{slow}$ (ms)	$A_{fast}/A_{slow}$	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$\tau_{fast}$ (ms)	$\tau_{slow}$ (ms)
FHF2-lox	-31.8 ± 1.4 (58)	1.09 ± 0.03 (33)	1.42 ± 0.05 (33)	5.3 ± 0.3 (33)	8.6 ± 1.0 (33)	-28.0 ± 0.5 (33)	7.5 ± 0.1 (33)	-77.3 ± 0.7 (30)	6.3 ± 0.2 (30)	2.9 ± 0.1 (27)	37.3 ± 1.2 (27)
FHF2-KD	-33.9 ± 2.0 (47)	0.97 ± 0.03 (20)	0.90 ± 0.02 (20) ****	5.9 ± 0.2 (20)	21.9 ± 1.1 (20) ****	-28.1 ± 0.4 (20)	7.8 ± 0.1 (20)	-85.9 ± 0.6 (19) ****	6.1 ± 0.2 (19)	3.0 ± 0.1 (18)	41.9 ± 2.6 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-WT	-58.5 ± 5.3 (39) ****	1.02 ± 0.03 (28)	1.48 ± 0.06 (28) #####	4.4 ± 0.2 (28)	5.2 ± 0.4 (28) #####	-31.2 ± 0.5 (28)	7.1 ± 0.2 (28)	-76.7 ± 0.6 (28) #####	5.2 ± 0.1 (28)	3.2 ± 0.2 (27)	45.1 ± 2.5 (27)
FHF2-KD + FHF2-VY-35-38A	-50.2 ± 3.3 (37) **	1.01 ± 0.02 (27)	1.41 ± 0.05 (27) #####	4.6 ± 0.1 (27)	5.8 ± 0.6 (27) #####	-30.4 ± 0.7 (27)	7.2 ± 0.2 (27)	-77.2 ± 0.7 (21) #####	6.0 ± 0.2 (21)	3.4 ± 0.2 (15)	40.2 ± 1.8 (15)
FHF2-KD + FHF2-VY-35-38E	-46.5 ± 2.5 (38)	1.09 ± 0.04 (22)	1.48 ± 0.05 (22) #####	4.7 ± 0.2 (22)	6.4 ± 0.7 (22) #####	-29.5 ± 0.4 (22)	6.8 ± 0.1 (22)	-74.3 ± 0.7 (20) #####	5.6 ± 0.2 (20)	2.7 ± 0.1 (18)	39.9 ± 2.8 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-218A	-49.5 ± 2.4 (49) **	1.04 ± 0.02 (27)	1.42 ± 0.04 (27) #####	4.5 ± 0.1 (27)	5.2 ± 0.4 (27) #####	-31.5 ± 0.4 (27)	7.1 ± 0.1 (27)	-75.6 ± 0.5 (20) #####	5.7 ± 0.1 (20)	3.0 ± 0.2 (20)	38.1 ± 2.1 (20)
FHF2-KD + FHF2-VY-218E	-49.9 ± 2.3 (39) **	0.93 ± 0.04 (18)	1.14 ± 0.07 (18)	3.9 ± 0.2 (18)	6.2 ± 1.3 (18) #####	-32.5 ± 0.5 (18)	7.0 ± 0.16 (18)	-78.9 ± 1.6 (14) #####	6.6 ± 0.4 (14)	3.0 ± 0.2 (11)	39.4 ± 2.5 (11)
FHF2-KD + FHF2-VY-230-232A	-39.8 ± 2.7 (24)	1.25 ± 0.05 (11)	1.52 ± 0.11 (11) #####	4.8 ± 0.2 (11)	8.6 ± 1.6 (11) #####	-30.7 ± 0.5 (11)	6.8 ± 0.2 (11)	-74.9 ± 0.6 (11) #####	5.0 ± 0.1 (11)	2.8 ± 0.1 (11)	38.2 ± 3.3 (11)
FHF2-KD + FHF2-VY-230-232E	-44.2 ± 2.6 (35)	1.17 ± 0.03 (18)	1.57 ± 0.06 (18) #####	4.7 ± 0.2 (18)	5.4 ± 0.5 (18) #####	-30.9 ± 0.5 (18)	7.0 ± 0.2 (18)	-75.9 ± 0.5 (18) #####	5.1 ± 0.1 (18)	3.1 ± 0.1 (18)	40.9 ± 2.3 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-238-240A	-56.5 ± 2.4 (31) ****	1.01 ± 0.03 (16)	1.42 ± 0.04 (16) #####	4.5 ± 0.2 (16)	5.7 ± 0.7 (16) #####	-31.2 ± 0.4 (16)	7.4 ± 0.2 (16)	-77.3 ± 0.9 (16) #####	5.5 ± 0.2 (16)	3.3 ± 0.3 (16)	39.6 ± 2.6 (16)
FHF2-KD + FHF2-VY-238-240E	-55.8 ± 3.5 (35) ****	0.94 ± 0.03 (26)	1.30 ± 0.06 (26) ###	4.1 ± 0.2 (26)	5.6 ± 0.6 (26) #####	-33.8 ± 0.9 (26)	7.2 ± 0.2 (26)	-75.5 ± 0.9 (26) #####	5.4 ± 0.2 (26)	2.6 ± 0.2 (26)	35.3 ± 1.8 (26)
FHF2-KD + FHF2-VY-250-255A	-47.7 ± 3.0 (25)	1.08 ± 0.04 (18)	1.63 ± 0.07 (18) #####	5.0 ± 0.3 (18)	6.7 ± 0.9 (18) #####	-30.9 ± 0.7 (18)	7.1 ± 0.2 (18)	-76.7 ± 0.7 (18) #####	5.3 ± 0.2 (18)	3.3 ± 0.3 (16)	51.1 ± 4.0 (16)
FHF2-KD + FHF2-VY-250-255E	-50.9 ± 3.0 (27) **	1.01 ± 0.02 (22)	1.42 ± 0.08 (22) #####	4.4 ± 0.4 (22)	6.2 ± 1.7 (22) #####	-31.1 ± 0.5 (22)	6.9 ± 0.2 (22)	-75.9 ± 0.5 (22) #####	5.0 ± 0.1 (22)	2.8 ± 0.1 (20)	38.7 ± 2.0 (20)
FHF2-KD + FHF2-VY-9A	-63.6 ± 2.9 (26) ****	0.98 ± 0.03 (20)	1.38 ± 0.08 (20) #####	4.3 ± 0.2 (20)	4.5 ± 0.4 (20) #####	-34.1 ± 0.5 (20)	6.6 ± 0.2 (20)	-77.2 ± 0.5 (20) #####	5.1 ± 0.1 (20)	3.1 ± 0.2 (20)	37.2 ± 1.5 (20)

**Tableau 3 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes KD FHF2 et lors de la réexpression du FHF2-VY WT et phosphomutants.** La densité de courant  $I_{Na}$ , le temps au pic, et les constantes des cinétiques d'inactivation ont été obtenus à la suite de dépolarisation à -20 mV à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. Toutes les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). Le nombre de cellules analysées est entre parenthèses. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  comparé au témoin shRNA; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , #### $p < 0.0001$  comparé au FHF2 shRNA; Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance ANOVA à un facteur contrôlé.

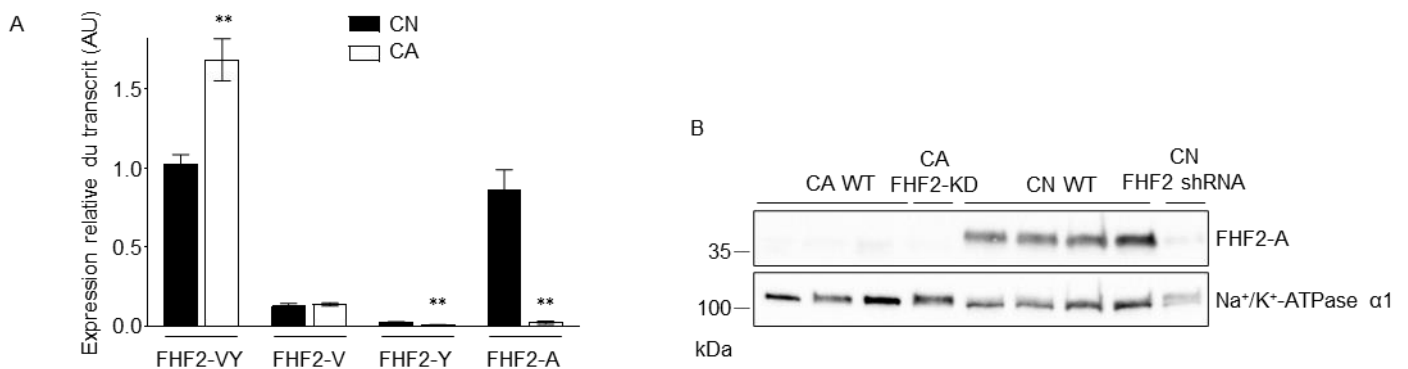
	FHF2-lox	FHF2-KD	FHF2-KD + FHF2-VY-WT	FHF2-KD + FHF2-VY-9A
$I_{NaL}$ (pA/pF)	-0.41 ± 0.04 (25)	-0.53 ± 0.02 (60)*	-0.33 ± 0.02 (38)#####	-0.30 ± 0.02 (27)#####

**Tableau 4 : Densité de courant  $I_{NaL}$  dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes FHF2-Lox contrôle, KD pour FHF2 et lors de la réexpression du FHF2-VY WT ou du phosphomutant 9A.** \* $p < 0.05$  comparé au témoin FHF2-lox. ##### $p < 0.0001$  comparé au FHF2-KD. Les différences sont testées statistiquement en utilisant dans un premier temps des tests de normalité suivis d'une analyse de la variance ANOVA à un facteur contrôlé.

#### IV. Expression des variants des protéines FHF2 dans les modèles de cardiomyocytes ventriculaires de souris néonatales et adultes

Les résultats du KD et de la réexpression de FHF2 obtenus dans nos deux modèles de souris néonatales et adultes présentent des effets communs attribuables à l'isoforme majoritaire cardiaque FHF2-VY. Cependant, d'autres effets distincts observés entre ces modèles nous questionnent quant à l'origine de ces différences. Une approche de RT-qPCR et de western blot a permis de quantifier l'expression des transcrits des différentes isoformes de FHF2. FHF2-VY est l'isoforme cardiaque majoritaire puisqu'elle est bien plus exprimée (près de 10 fois) que les isoformes FHF2-V, FHF2-Y et FHF2-A ( $p < 0.01$ ) (**Figure 25A**). Seul FHF2-B ne semble pas exprimé dans les cœurs murins. De plus, FHF2-VY est, aussi, très largement exprimé dans les cardiomyocytes néonataux, mais son expression reste moindre que dans les cardiomyocytes adultes ( $p < 0.01$ ). De façon intéressante, les isoformes FHF2-Y et surtout FHF2-A sont significativement plus exprimées dans les cardiomyocytes néonataux que dans les cardiomyocytes adultes ( $p < 0.01$ ). Cette expression différentielle de l'isoforme FHF2-A entre les deux modèles a pu être vérifiée par western blot (**Figure 25B**). De plus, l'expression de FHF2-A est similaire à celle du FHF2-VY dans les cardiomyocytes néonataux et ils sont tous deux retrouvés plus exprimés que les isoformes FHF2-V et FHF2-Y (respectivement 6 et 30 fois) (**Figure 25A**). Les résultats suggèrent donc qu'il existe une régulation de FHF2-A sur le canal  $Nav_{1.5}$  dans les cardiomyocytes néonataux, mais pas dans les cardiomyocytes adultes. Rien ne peut être conclu quant à la régulation de  $Nav_{1.5}$  par l'isoforme FHF2-Y puisqu'il s'agit de la seule isoforme qui n'est pas inhibée par l'utilisation de notre shRNA spécifique de FHF2 (**Figure 19A**). Ces résultats suggèrent donc qu'il existe une régulation de l'activité de  $Nav_{1.5}$

par les isoformes FHF2-A et FHF2-VY dans les premiers jours après la naissance, puis que cette régulation devient exclusivement sous contrôle du FHF2-VY chez l'individu adulte.

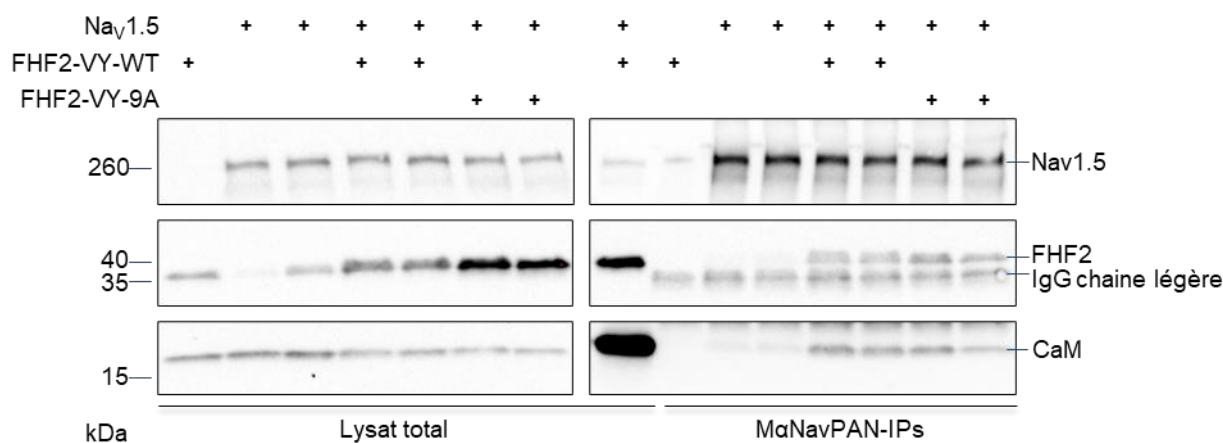


**Figure 25 : Analyse de l'expression des différentes isoformes de FHF2 dans les cardiomyocytes néonataux (CN) et adultes (CA).** (A) RT-qPCR permettant de comparer l'expression relative des transcrits des isoformes FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y et FHF2-A entre les cardiomyocytes néonataux et adultes. (B) Western blot visant à déterminer l'expression protéique de FHF2-A entre les cardiomyocytes néonataux et adultes.

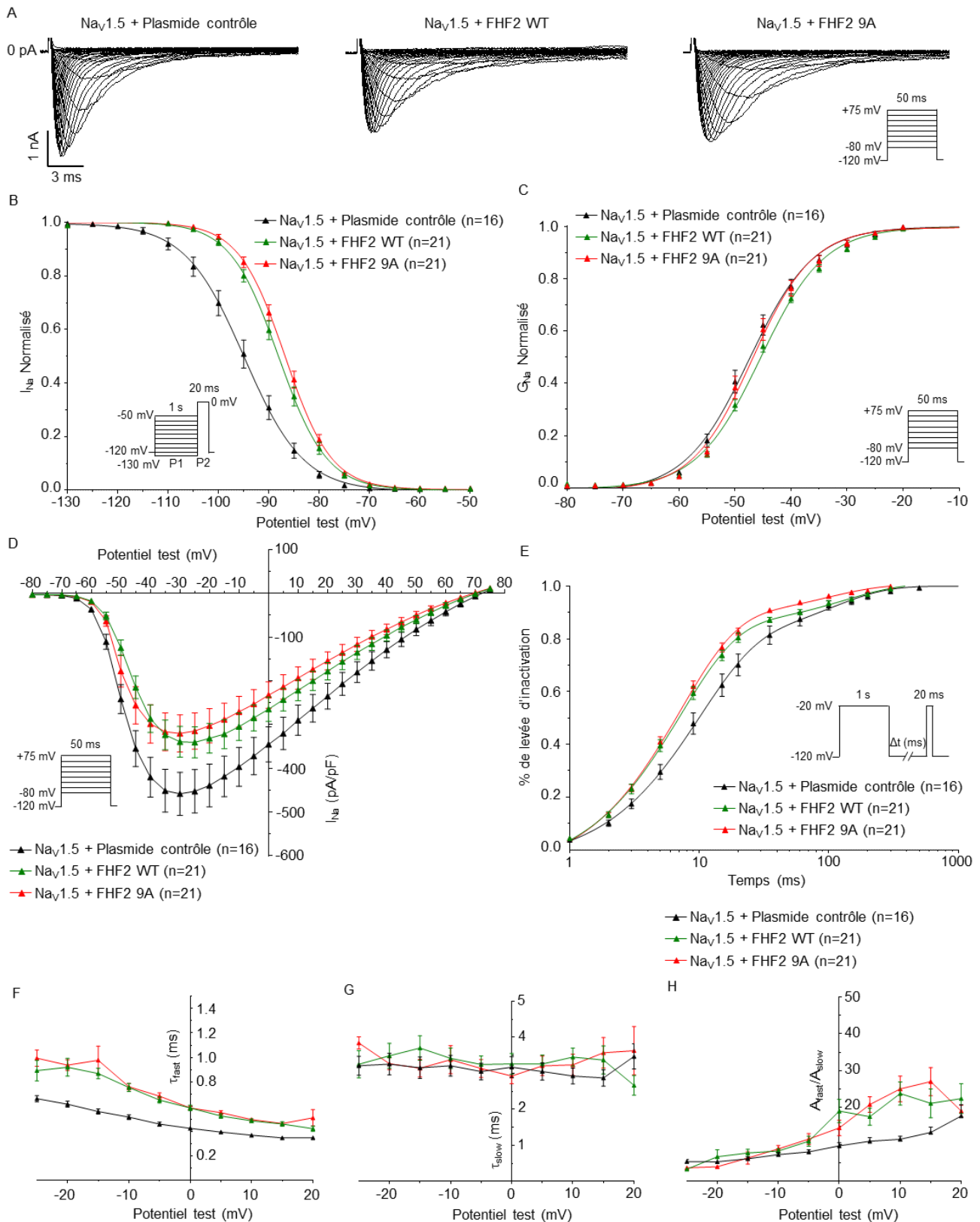
## V. Études des effets de la phosphorylation de FHF2 sur les canaux Na<sub>v</sub>1.5 dans un modèle d'expression hétérologue HEK-293

L'utilisation d'un modèle de cellules HEK-293 nous permet d'étudier de manière spécifique le canal Na<sub>v</sub>1.5 ainsi que les effets de la phosphorylation de ce dernier sur son interaction avec la protéine FHF2. Dans le modèle de cellules HEK-293, nous nous sommes intéressés aux propriétés biophysiques des canaux Na<sub>v</sub>1.5 en présence ou en absence du FHF2-VY WT ou phosphomutant 9A. Aucun effet n'est observé sur la dépendance au potentiel de l'activation, sur le temps de levée d'inactivation, sur la cinétique d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  et sur le rapport  $A_{fast}/A_{slow}$  (**Figure 27A, 27C, 27E, 27G, 27H**). La cinétique d'inactivation rapide semble légèrement ralentie avec la réexpression des isoformes FHF2-VY WT et 9A ( $p < 0.0001$ ), mais ne semble pas être liée à la phosphorylation de FHF2 (**Figure 27F**). De façon intéressante, les résultats obtenus sur la densité de courant sont contraires à ceux observés dans les deux précédents modèles. En effet, la littérature a décrit le FHF2 comme participant à l'expression des canaux Na<sub>v</sub>1.5 à la surface, ce qui se traduit par une augmentation de la densité de courant  $I_{Na}$  (Wang *et al.*, 2011). Or l'expression du FHF2-VY WT ou 9A dans notre modèle HEK-293 provoquent une diminution de la densité du courant  $I_{Na}$  ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 27D**). Ces résultats semblent spécifiques au modèle HEK-293 (Lou *et al.*, 2005), ce qui pourrait être dû à l'absence

de suffisamment d'acteurs protéiques pour moduler l'activité de Nav<sub>v</sub>1.5. L'effet majeur observé porte sur la dépendance au potentiel de l'inactivation avec un décalage de 7 mV lorsque les isoformes FHF2-VY WT et FHF2-VY 9A sont exprimées (p<0.0001). Encore une fois, l'effet sur la dépendance au potentiel de l'inactivation du FHF2-VY WT est proche de celui obtenu par le FHF2-VY 9A (**Figure 27B**). Les résultats de western blot sont en adéquation avec les données obtenues en patch-clamp car ils montrent que l'expression du FHF2-VY 9A ne diminue pas l'interaction du FHF2 avec le canal Nav<sub>v</sub>1.5 (**Figure 26**). Le rôle régulateur du FHF2 dans l'augmentation de liaison de la CaM au canal Nav<sub>v</sub>1.5 est aussi visible dans ce blot, mais le même effet est visible avec l'expression du phosphomutant 9A (**Figure 26**).



**Figure 26 : Analyse par western blot de l'expression et de l'interaction des protéines Nav<sub>v</sub>1.5, CaM, FHF2-VY WT et 9A dans les cellules HEK-293.** À gauche, analyse de l'expression des différentes protéines dans le lysat total. À droite, analyse des interactions du complexe protéique Nav<sub>v</sub>1.5, CaM, FHF2-VY WT et 9A suite à une immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques des canaux Nav<sub>v</sub>.



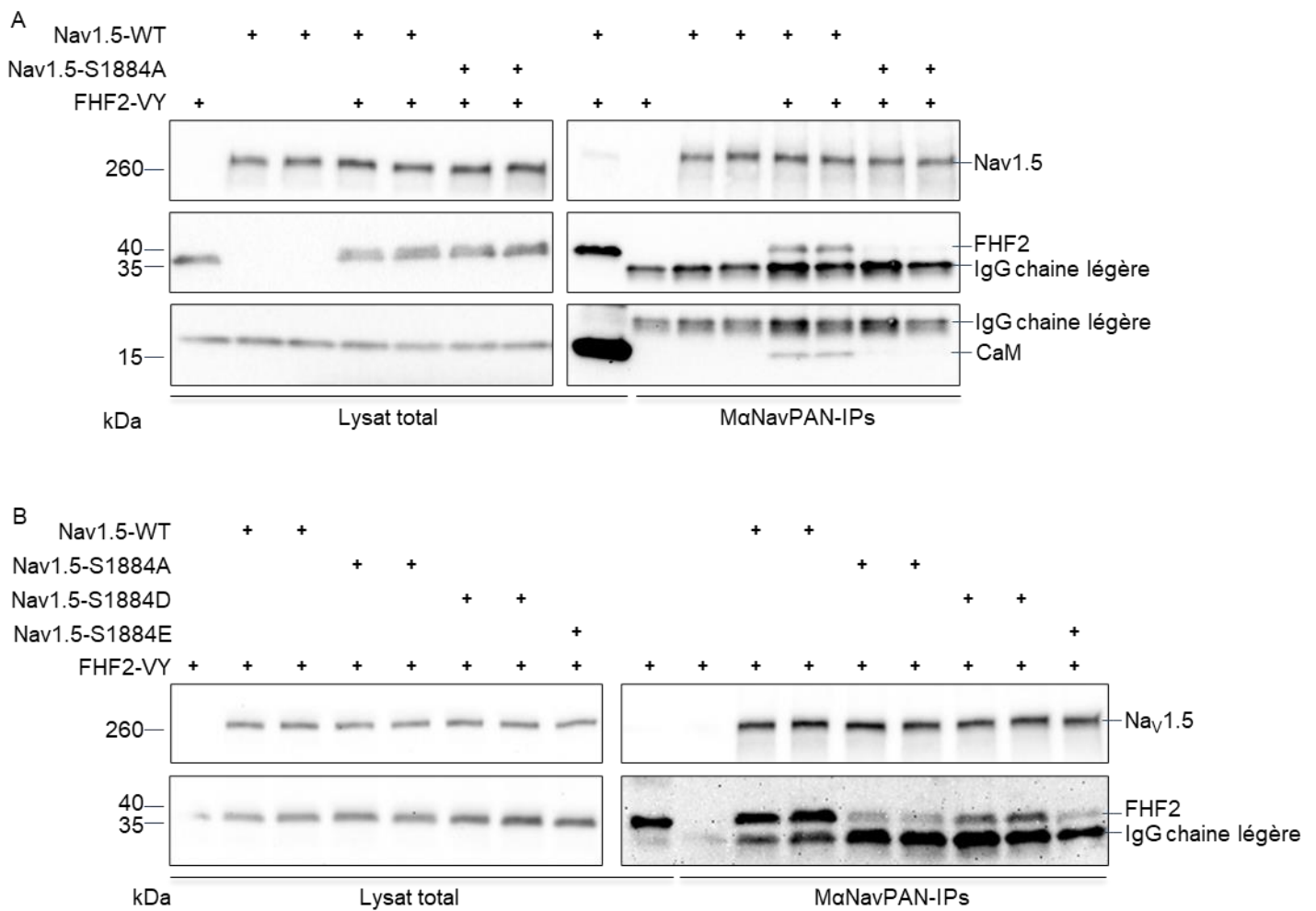
**Figure 27 : Propriétés biophysiques des canaux  $\text{Na}_v1.5$  dans les cellules HEK-293 avec expression ou non du FHF2-VY WT ou phosphomutant 9A.** Enregistrement voltage-clamp configuration cellule entière, des courants  $I_{\text{Na}}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après transfection d'un plasmide contrôle (Noir), ou contenant le FHF2-VY-WT (Vert) ou le FHF2-VY 9A (Rouge). (A) Tracés de courants  $I_{\text{Na}}$  de cellules représentatives de chaque condition, en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendances au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{\text{Na}}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximal (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{\text{fast}}$  du courant  $I_{\text{Na}}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{\text{slow}}$  du courant  $I_{\text{Na}}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé.



## VII. Étude des effets de la phosphorylation de Nav<sub>v</sub>1.5 sur la régulation médiée par FHF2

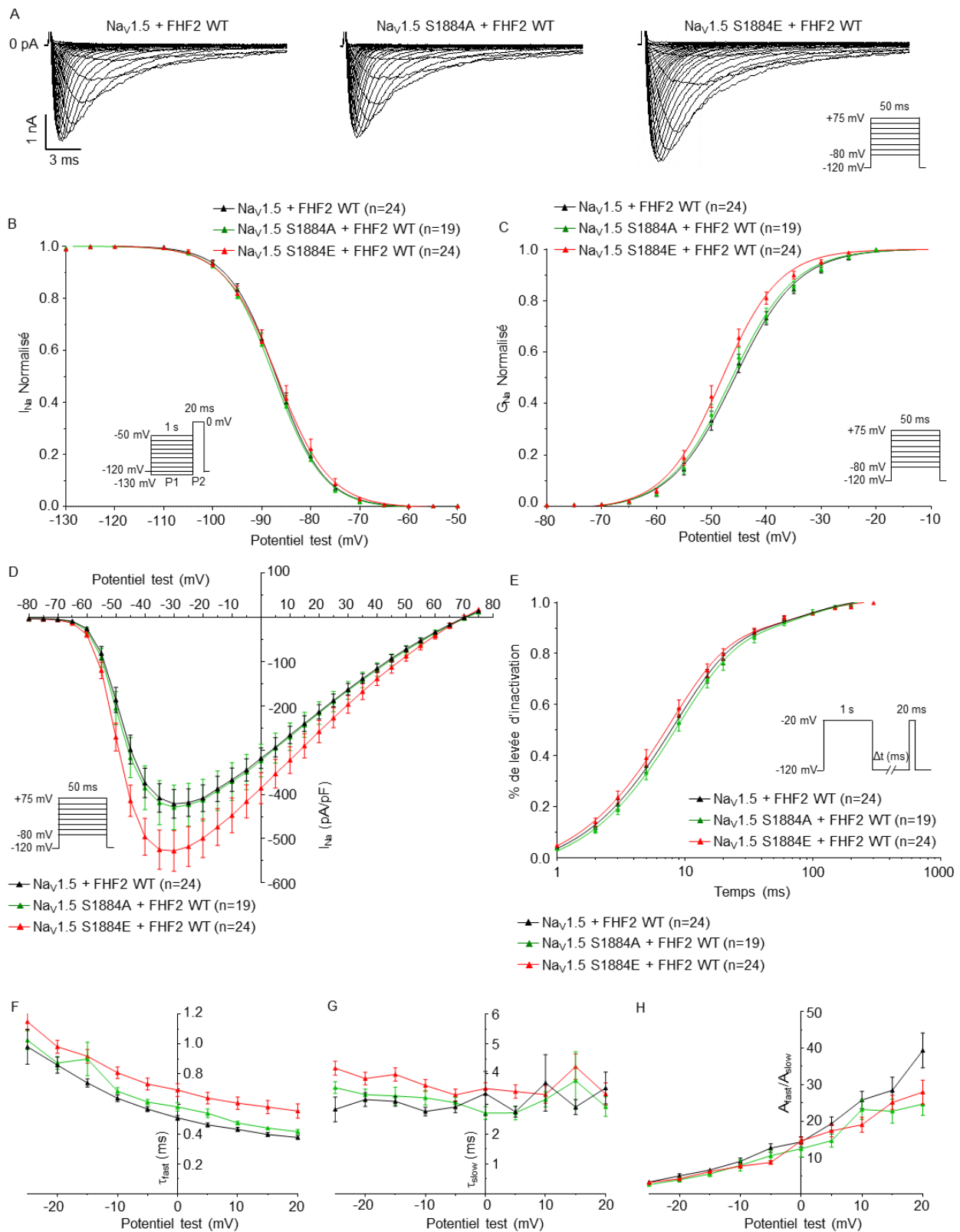
Nous nous sommes intéressés à un site de phosphorylation particulier, la sérine S1884, localisée au niveau de l'extrémité C-terminale de Nav<sub>v</sub>1.5 dans la zone d'interaction avec FHF2. Certains sites de phosphorylation avaient déjà été reliés comme participant à la régulation de cette interaction dans les cellules HEK-293 (Burel *et al.*, 2017). Les résultats de co-immunoprécipitation, effectués dans nos cellules HEK-293, semblent confirmer notre hypothèse selon laquelle ce site de phosphorylation serait impliqué dans la régulation de cette interaction. En effet, l'abolition de la phosphorylation sur la sérine S1884 a pour conséquence une perte d'interaction de FHF2-VY WT avec le canal Nav<sub>v</sub>1.5 mais aussi une perte d'interaction avec la CaM (**Figure 28A**). Le phosphomutant S1884E présente aussi une perte d'interaction de FHF2-VY WT avec le canal Nav<sub>v</sub>1.5 mais l'utilisation d'un deuxième mutant mimant la phosphorylation, la sérine S1884D, semble partiellement rétablir cette interaction (**Figure 28B**).

Nous avons, de la même façon, exprimé les mutants Nav<sub>v</sub>1.5 S1884A et S1884E avec le FHF2-VY WT. Cependant, l'expression de ces deux mutants ne nous montre aucun changement de la densité et des propriétés biophysiques comparées au canal Nav<sub>v</sub>1.5 WT (**Figure 29B, 29C, 29D, 29E**) excepté pour la cinétique d'inactivation rapide ( $\tau_{fast}$ ) qui semble être ralentie avec le mutant S1884E ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 29A, 29F**). Ces résultats montrent donc que ce site de phosphorylation module l'interaction entre les protéines du complexe Nav<sub>v</sub>1.5, FHF2 et CaM ce qui se traduit par une modification de la cinétique d'inactivation rapide du canal Nav<sub>v</sub>1.5 en présence du FHF2-VY.



**Figure 28 : Analyse par co-immunoprécipitation et western blot de l'expression et de l'interaction des protéines  $Na_v1.5$  WT,  $Na_v1.5$  S1884 phosphomuté, CaM, FHF2-VY WT dans les cellules HEK-293. (A) À gauche, analyse de l'expression des différentes protéines dans le lysat total. À droite, analyse des interactions du complexe protéique  $Na_v1.5$  WT,  $Na_v1.5$  S1884A, CaM et FHF2-VY WT suite à une immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques des canaux  $Na_v$ . (B) À gauche, analyse de l'expression des différentes protéines dans le lysat total. À droite, analyse des interactions du complexe protéique  $Na_v1.5$  WT,  $Na_v1.5$  S1884A,  $Na_v1.5$  S1884D,  $Na_v1.5$  S1884E et FHF2-VY WT suite à une immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques des canaux  $Na_v$ .**



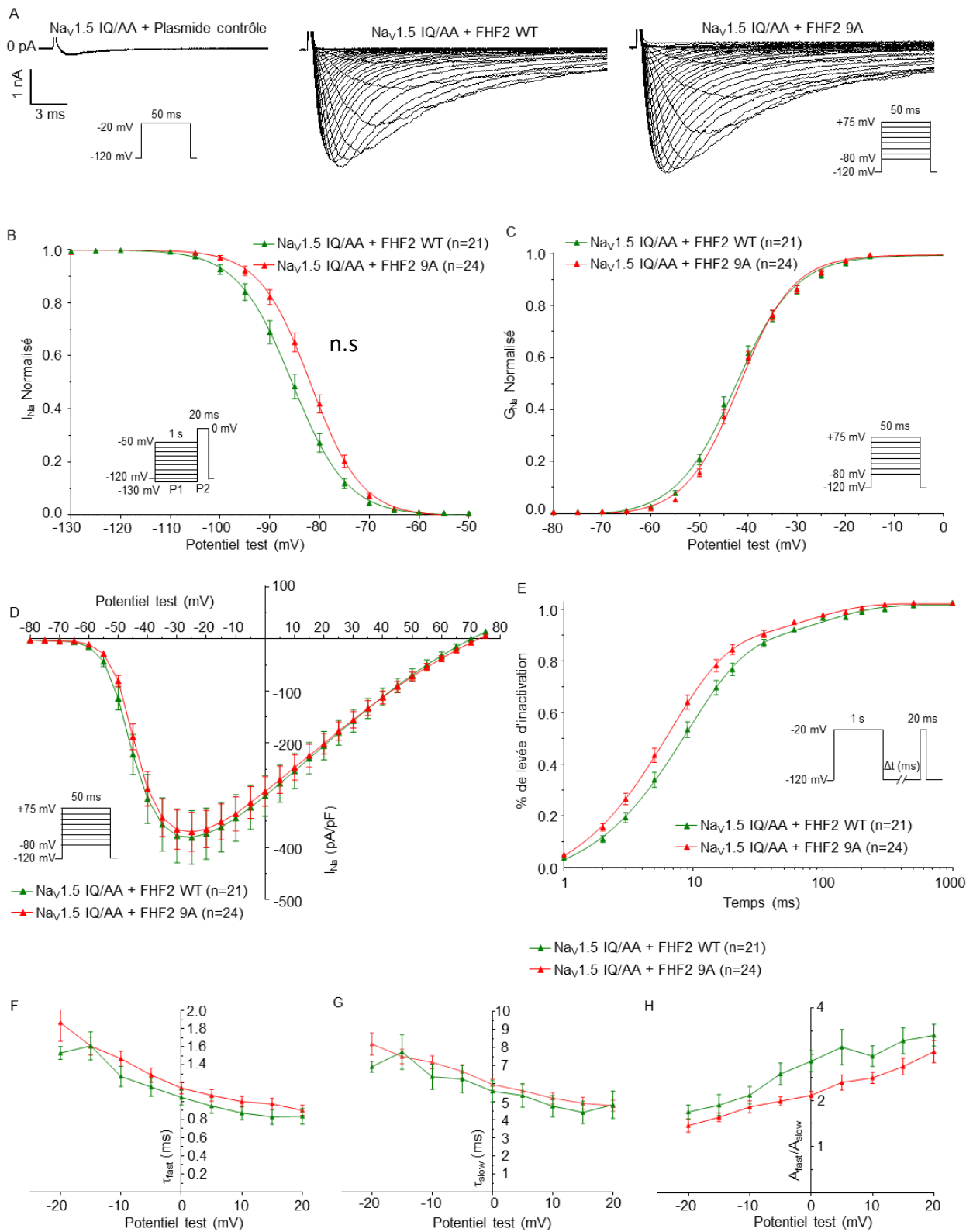


**Figure 29 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v1.5$  WT, S1884A ou S1884E dans les cellules HEK-293 avec expression du FHF2-VY WT.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection les plasmides contenant le  $Na_v1.5$  WT et FHF2-VY WT (Noir), ou le  $Na_v1.5$  S1884A et FHF2-VY-WT (Vert) ou le  $Na_v1.5$  S1884E et FHF2-VY WT (Rouge). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendances au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximal (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ).

## VIII. Étude des effets de la phosphorylation de FHF2 sur les canaux $\text{Na}_v1.5$ mutants pour le motif de liaison de la CaM

La liaison entre le canal  $\text{Na}_v1.5$  et la CaM est étroitement liée à la liaison de  $\text{Na}_v1.5$  avec FHF2 (Burel *et al.*, 2017). En effet, le mutant double alanine  $\text{Na}_v1.5$  pour le motif IQ (IQ/AA), qui participe à la liaison de la CaM au canal, induit deux effets. L'un est une diminution de la  $P_o$  du canal, alors que l'autre est une augmentation d' $I_{\text{NaL}}$  (Kang *et al.*, 2021). De plus, une étude récente a souligné l'implication du FHF2 dans cette augmentation d' $I_{\text{NaL}}$  (Abrams *et al.*, 2020). Ne parvenant pas à moduler l'interaction entre  $\text{Na}_v1.5$  et FHF2 dans des conditions basales, nous avons donc cherché à déstabiliser cette interaction en utilisant le mutant  $\text{Na}_v1.5$  IQ/AA dont la liaison à la CaM est altérée. De façon intéressante, l'expression de la forme de  $\text{Na}_v1.5$  IQ/AA seule ne permet d'obtenir que de très faibles amplitudes de courant alors que l'expression du FHF2-VY WT ou 9A restaure entièrement l'activité canalaire de  $\text{Na}_v1.5$  ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 28A**). Cet effet était encore inconnu dans la littérature et semble en accord avec la diminution de  $P_o$  décrite jusqu'à présent avec le canal  $\text{Na}_v1.5$  IQ/AA (Kang *et al.*, 2021). Le FHF2 semble donc être un élément central de la régulation de  $P_o$  et viendrait, de plus, compenser la perte d'interaction de la CaM avec le canal. Cependant, le fait que le  $\text{Na}_v1.5$  IQ/AA, en présence de FHF2-VY 9A, présente les mêmes résultats que ceux décrits pour le FHF2-VY WT sur les propriétés biophysiques du courant  $I_{\text{Na}}$  (**Figure 30B, 30C, 30D, 30E, 30F, 30G et 30H**) nous amène à penser que ce nouvel effet n'est pas régi par la phosphorylation de la protéine FHF2.

D'autre part, l'effet du IQ/AA sur le  $I_{\text{NaL}}$  a pu être décrit dans ce modèle de cellules HEK-293. En effet, l'expression du FHF2-VY WT ou 9A, provoque une diminution de la densité de courant  $I_{\text{NaL}}$  comparée au courant  $I_{\text{NaL}}$  généré par une expression de  $\text{Na}_v1.5$  IQ/AA seul ( $p < 0.0001$ ) (**Tableau 5**). Mais encore une fois, l'expression de FHF2-VY 9A présente les mêmes valeurs de densité de courant  $I_{\text{NaL}}$  qu'avec l'expression du FHF2-VY WT, ce qui ne permet pas de relier cet effet à la phosphorylation du FHF2.



**Figure 30 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v1.5$  IQ/AA dans les cellules HEK-293 avec ou sans expression du FHF2-VY WT ou 9A.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant  $Na_v1.5$  IQ/AA et un plasmide contrôle (non enregistrable), ou  $Na_v1.5$  IQ/AA et FHF2-VY-WT (Vert) ou  $Na_v1.5$  IQ/AA et FHF2-VY 9A (Rouge). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximale (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ).

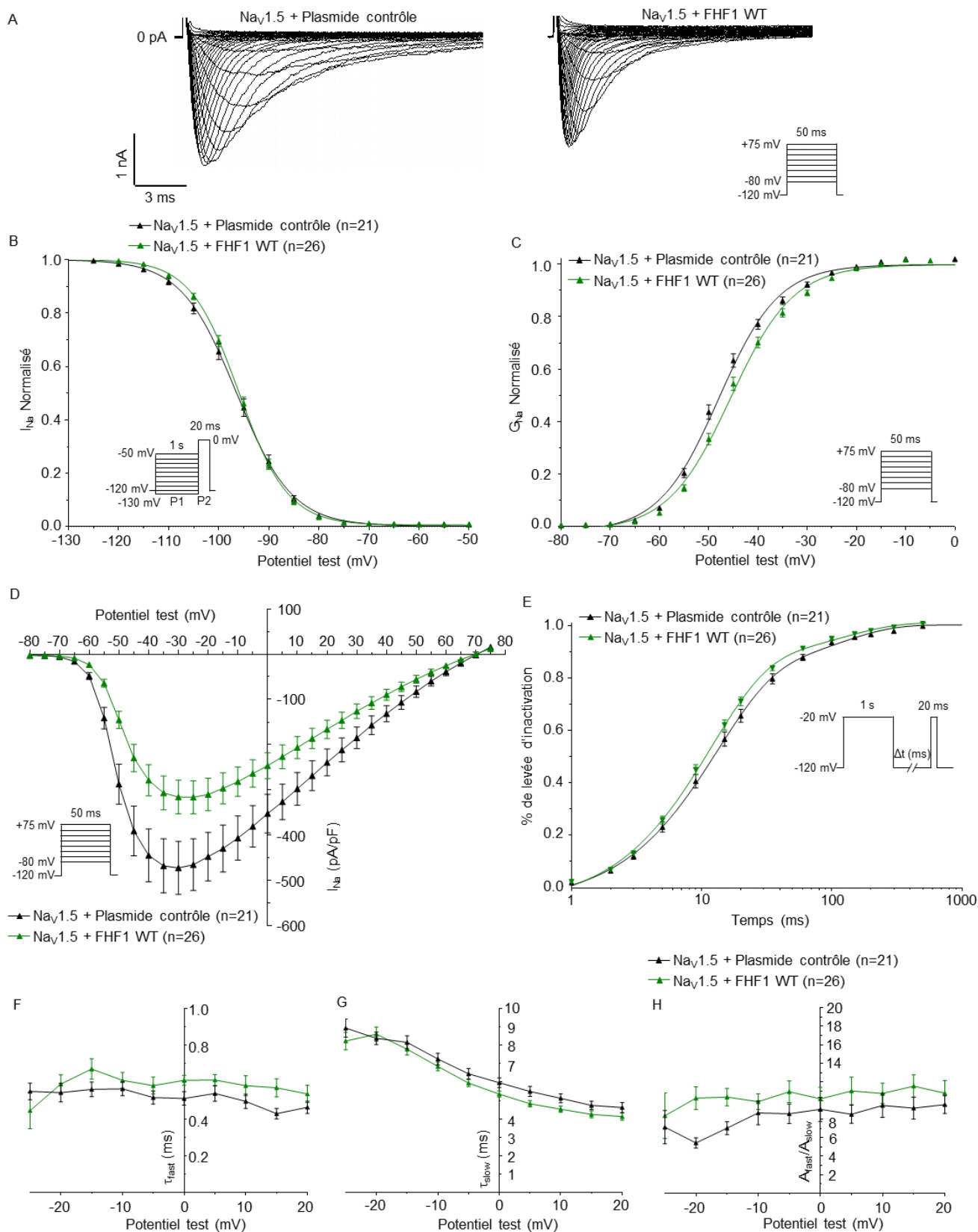
	Na <sub>v</sub> 1.5 IQ/AA + Plasmide contrôle	Na <sub>v</sub> 1.5 IQ/AA + FHF2 WT	Na <sub>v</sub> 1.5 IQ/AA + FHF2 9A
I <sub>NaL</sub> (pA/pF)	-2.34 ± 0.27 (29)	-0.95 ± 0.11 (30)****	-0.90 ± 0.11 (29)****

**Tableau 5 : Densité de courant I<sub>NaL</sub> dans les cellules HEK-293 co-transfectées avec le canal Na<sub>v</sub>1.5 IQ/AA et le FHF2-VY WT ou 9A. \*\*\*\*p<0.0001 comparé à la condition Na<sub>v</sub>1.5 IQ/AA avec plasmide contrôle.**

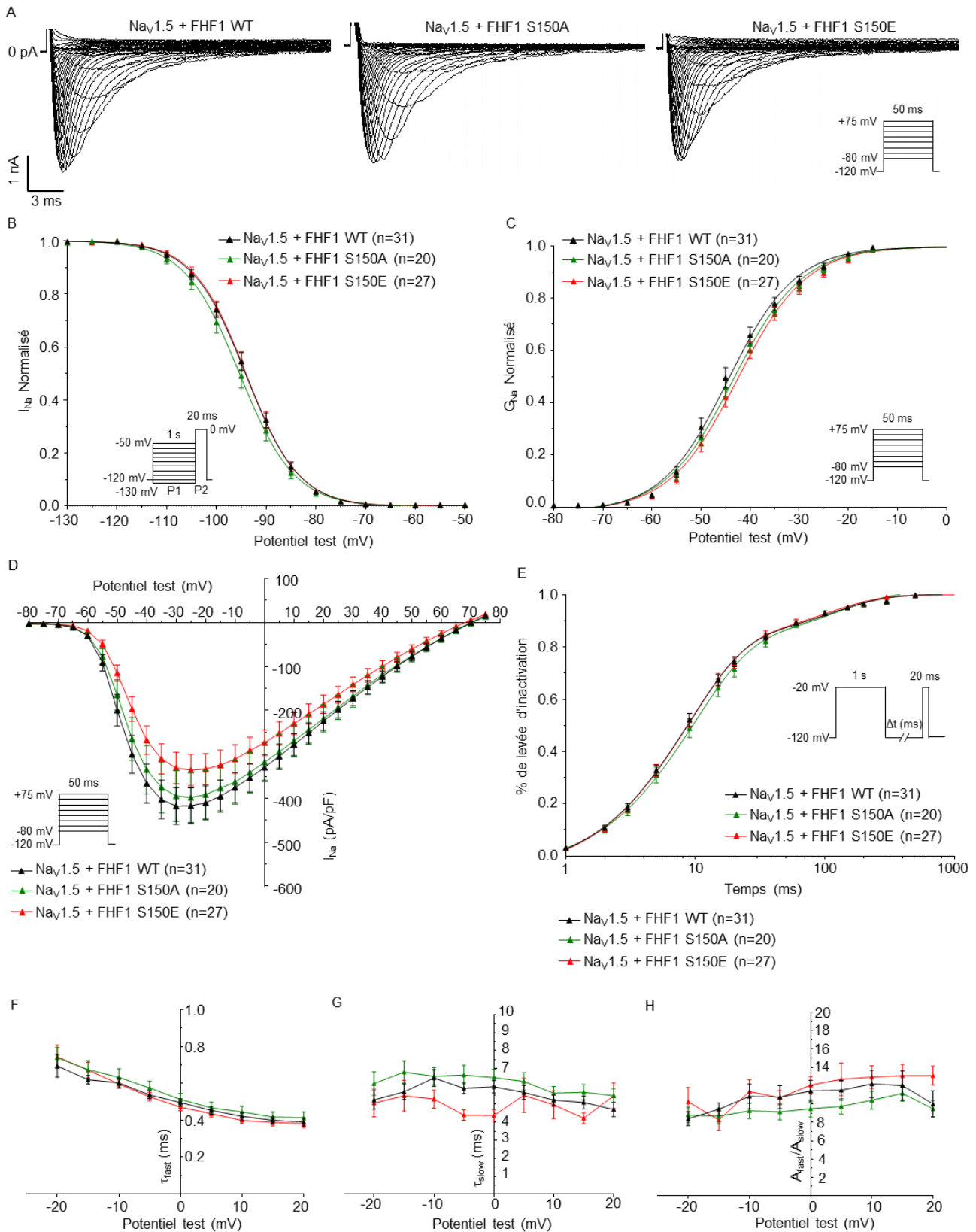
## IX. Étude des effets de la phosphorylation du FHF1-B sur les canaux Na<sub>v</sub>1.5

La protéine FHF1 est la principale forme de FHF retrouvée dans le cœur humain. De plus, il a été montré que son affinité pour le Na<sub>v</sub>1.5 est bien moindre que celle du FHF2 (Wang *et al.*, 2012 ; Abrams *et al.*, 2020). Toujours dans l'objectif de déstabiliser l'interaction de Na<sub>v</sub>1.5 avec les FHF nous avons ici testé l'effet de la phosphorylation des FHF en utilisant la protéine FHF1 plutôt que FHF2 du fait de son affinité plus faible avec le canal. Nous avons donc entrepris d'étudier les effets qui pourraient exister en présence de FHF1-B dans le contrôle de l'activité du canal Na<sub>v</sub>1.5 et si le site de phosphorylation S150 qui est homologue au site S218 du FHF2 est impliqué dans cette régulation.

Contrairement au FHF2, le FHF1-B ne semble pas impliqué dans la régulation de la dépendance au potentiel de l'inactivation (**Figure 31A, 31B**). Il ne semble pas non plus impliqué dans la dépendance au potentiel de l'activation (**Figure 31C**), ni dans le temps de levée d'inactivation (**Figure 31E**), ni dans les cinétiques d'inactivation rapide et lente ou le rapport A<sub>fast</sub>/A<sub>slow</sub> (**Figure 31F, 31G, 31H**). De façon intéressante, le FHF1-B semble diminuer la densité de courant I<sub>Na</sub> dans les cellules HEK-293 (p<0.0001) (**Figure 31D**) de la même façon que d'autres FHF (Lou *et al.*, 2005). Nous avons donc cherché à savoir si le site S150 pouvait être impliqué dans cette diminution de courant. Cependant, la co-expression de Na<sub>v</sub>1.5 avec le FHF1-B ou FHF1-B S150A ou FHF1-B S150E ne montre aucune différence de propriétés biophysiques et les variations de densité de courant sont non significatives (**Figure 32**). L'effet de FHF1-B sur la densité de courant ne semble pas médié par la phosphorylation du site S150.



**Figure 31 : Propriétés biophysiques des canaux  $Na_v1.5$  dans les cellules HEK-293 avec expression ou non du FHF1-B WT.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{Na}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant  $Na_v1.5$ , avec un plasmide contrôle (noir), ou avec FHF1-B WT (vert). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{Na}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{Na}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à  $-120$  mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximale (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{fast}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{slow}$  du courant  $I_{Na}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{fast}/A_{slow}$ ).



**Figure 32 : Propriétés biophysiques des canaux  $\text{Na}_v1.5$  dans les cellules HEK-293 avec expression du FHF1-B WT ou des phosphomutants S150A ou S150E.** Enregistrement de voltage-clamp en configuration cellule entière, des courants  $I_{\text{Na}}$  dans les cellules HEK-293 48 heures après co-transfection des plasmides contenant le FHF1-B WT (Noir) ou FHF1-B 150A (Vert) ou FHF1-B 150E (Rouge). (A) Tracés représentatifs de courants  $I_{\text{Na}}$ , en fonction du potentiel. (B) Courbes de dépendance au potentiel de l'inactivation. (C) Courbes de dépendance au potentiel de l'activation. (D) Courbes des moyennes  $\pm$  SEM des courants  $I_{\text{Na}}$  au pic en fonction du potentiel imposé à partir d'un potentiel de maintien à -120 mV. (E) Courbes de temps de levée d'inactivation à un potentiel imposé proche de la conductance maximale (F) Valeurs des constantes d'inactivation rapide  $\tau_{\text{fast}}$  du courant  $I_{\text{Na}}$  en fonction du potentiel imposé. (G) Valeurs des constantes d'inactivation lente  $\tau_{\text{slow}}$  du courant  $I_{\text{Na}}$  en fonction du potentiel imposé. (H) Rapport des fractions des canaux s'inactivant rapidement par rapport à ceux s'inactivant plus lentement en fonction du potentiel imposé ( $A_{\text{fast}}/A_{\text{slow}}$ ).





# Discussion

## I. Expression des différentes isoformes de FHF dans les cardiomyocytes de souris néonatales et adultes

Nos résultats combinés d'analyses de phosphoprotéomique, de biologie moléculaire et de biochimie nous ont permis d'identifier les protéines FHF partenaires de Nav<sub>v</sub>1.5 dans les cardiomyocytes de souris néonatales et adultes. Conformément aux données issues de la littérature (Munoz-Sanjuan *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2011), nos analyses ont montré la présence de plusieurs variants d'excision et d'épissage du domaine N-terminal de FHF2 (FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y et FHF2-A) et la présence des protéines FHF1 et FHF4 dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris adultes. Nos données ont aussi souligné l'existence de différences dans l'expression des différentes isoformes de FHF2 avec, notamment, une expression quasiment exclusive de FHF2-VY dans les cardiomyocytes de souris adultes. En revanche, l'expression de FHF2-A est similaire à celle du FHF2-VY dans les cardiomyocytes de souris néonatales. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent qu'il existe une évolution dans la composition protéique du complexe macromoléculaire de Nav<sub>v</sub>1.5 au cours du développement. Précocement après la naissance, la régulation du canal Nav<sub>v</sub>1.5 pourrait être affectée par son interaction avec les variants majoritaires FHF2-VY et FHF2-A, tandis qu'au cours du développement cette régulation serait de plus en plus sous la dépendance de l'isoforme FHF2-VY jusqu'à en être exclusive dans les cœurs des souris adultes.

## II. Rôles de FHF1 et FHF2 dans la régulation des canaux Nav<sub>v</sub>1.5 cardiaques

Les résultats mis en évidence par les enregistrements électrophysiologiques témoignent du rôle régulateur sur l'inactivation du FHF2-VY qui se répercute à la fois sur les cinétiques d'inactivation et les propriétés de dépendance au potentiel de l'inactivation à l'état stable. FHF2 provoque une augmentation de la disponibilité des canaux dans les



cardiomyocytes néonataux et adultes. Cet effet s'observe également dans un modèle d'expression hétérologue (cellules HEK-293), confirmant de ce fait les données de la littérature (Wang *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2016). Aussi, la diminution de densité de courant  $I_{NaL}$  observée dans les cardiomyocytes adultes a permis de confirmer le rôle de FHF2-VY dans la modulation de ce courant.

Un autre mécanisme semble impliquer dans la régulation de la dépendance au potentiel de l'activation, celle-ci existe uniquement dans les cardiomyocytes de souris néonatales. Dans notre étude, nous avons démontré que l'expression des isoformes du FHF2 variait entre les modèles utilisés. Ces données pourraient corroborer l'hypothèse selon laquelle l'isoforme FHF2-A et l'isoforme FHF2-VY agiraient sur le canal  $Nav1.5$  juste après la naissance, puisque l'expression du FHF2-A disparaîtrait chez l'individu adulte, pour ne laisser place qu'au contrôle exclusif de FHF2-VY sur le canal. Néanmoins, le FHF2-A n'a jamais été décrit comme un acteur de la régulation des propriétés d'activation des canaux  $Nav$  mais davantage comme influant sur le temps de levée d'inactivation dans les neurones de la moelle épinière ou dans des modèles d'expression hétérologue. Cela a pour conséquence une diminution de densité de courant et un ralentissement des trains de potentiels d'action (Rush *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2016 ; Effraim *et al.*, 2019). Une autre hypothèse serait que l'extinction de FHF2-VY pourrait avoir des conséquences différentes sur l'activité des canaux  $Nav$  dans les cardiomyocytes de souris néonatales par rapport aux cardiomyocytes adultes (Onkal *et al.*, 2008). Le KD du FHF2 pourrait, en effet, modifier l'expression ou l'organisation du complexe protéique de  $Nav1.5$ , de manière distincte dans le cœur d'un individu juvénile et celui d'un adulte et conduire à un effet différentiel sur l'activation.

Le FHF2 avait déjà été plusieurs fois décrit comme un acteur majeur de la régulation qui lie les protéines FHF2, CaM et  $Nav1.5$  (Burel *et al.*, 2017 ; Abrams *et al.*, 2020). Plus particulièrement, les données de la littérature indiquent que FHF2 restaure l'augmentation du courant  $I_{NaL}$  dans le modèle de souris « *Knock-in* »  $Nav1.5$  IQ/AA ne pouvant lier la CaM, ce que nous avons confirmé avec nos enregistrements dans les cellules HEK-293. Cependant, l'origine de la diminution de  $P_o$  associée à la mutation IQ/AA n'avait encore aucune origine clairement établie (Kang *et al.*, 2021). Nos analyses de patch-clamp ont permis de relier, au moins en partie, ce phénomène à l'isoforme FHF2-VY dans les cellules HEK-293. En effet,

l'expression de Nav<sub>v</sub>1.5 IQ/AA seul, ne permettait aucun enregistrement électrophysiologique en raison de trop faibles amplitudes de courant. Au contraire, la co-expression du mutant Nav<sub>v</sub>1.5 IQ/AA en présence de FHF2-VY permet d'obtenir des densités de courant I<sub>Na</sub> similaires à celles obtenues avec Nav<sub>v</sub>1.5 WT. L'une des conclusions les plus évidentes de ce résultat est que la fixation de FHF2 se substitue à celle de la CaM et restaure de ce fait les effets de la CaM sur le canal Nav<sub>v</sub>1.5 à savoir une augmentation de la P<sub>o</sub> et une diminution du courant I<sub>NaL</sub>.

Un dernier effet a été mis en évidence dans notre étude qui est uniquement visible lors de la réexpression d'un des phosphomutants du FHF2-VY dans les cardiomyocytes adultes. Celui-ci se caractérise par une augmentation de la densité de courant I<sub>Na</sub>, mais qui, de façon surprenante, n'est pas associée à une diminution du courant avec le KD de FHF2. De manière intéressante, le seul effet obtenu de l'isoforme FHF1-B dans la régulation de Nav<sub>v</sub>1.5 concerne la régulation de la densité de courant. Par ailleurs, FHF1-B et FHF2-VY induisent tous deux une diminution de la densité de courant I<sub>Na</sub> dans les cellules HEK-293. Cependant, FHF2-VY augmente le courant I<sub>Na</sub> dans des modèles plus intégrés tels que les cardiomyocytes, ce qui est en accord avec les effets décrits dans la littérature, sur le courant I<sub>Na</sub> et l'expression du canal Nav<sub>v</sub>1.5 à la surface cellulaire (Wang *et al.*, 2011 ; Hennessey *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2016). Ce phénomène avait déjà été montré pour plusieurs FHF2 dont le FHF4-B qui, dans des cellules HEK-293, induit une diminution de courant I<sub>Na</sub> de Nav<sub>v</sub>1.1, Nav<sub>v</sub>1.2, Nav<sub>v</sub>1.5 et Nav<sub>v</sub>1.6 alors qu'il augmente le courant I<sub>Na</sub> dans les neurones (Lou *et al.* 2005). Il est possible que le KO de l'une des protéines FHF2 soit compensé par la surexpression d'une autre et que la restauration de FHF2-VY augmente par la suite l'expression de Nav<sub>v</sub>1.5. Enfin, il est à noter que la réexpression de FHF2-VY est deux à trois fois supérieure à l'expression de la protéine FHF2 endogène, ce qui pourrait favoriser l'adressage à la membrane des canaux Nav<sub>v</sub>1.5 ayant pour conséquence une augmentation de courant I<sub>Na</sub>.

En résumé, les effets obtenus sur la régulation des canaux Nav<sub>v</sub>1.5 par le FHF2 et FHF1 montrent que FHF2 module les propriétés d'inactivation et l'adressage des canaux à la membrane ainsi que l'activation chez les souris nouveau nées, alors que FHF1 ne semble impliqué que dans l'adressage.

### III. Identification des sites de phosphorylation des protéines FHF2 dans le ventricule gauche murin

Les analyses de phosphoprotéomique effectuées à partir des ventricules gauches de souris adultes nous ont permis d'identifier neuf sérines et thréonines phosphorylées sur la protéine FHF2 (S35, S38, S218, S230, T232, S240, S250 et T255). De façon intéressante, l'une des sérines, la S218 est conservée sur l'isoforme FHF1-B (S150). Au contraire, les sérines S35 et S38 sont spécifiques de l'exon Y du FHF2 et, par conséquent, présentes uniquement sur les isoformes FHF2-Y et VY. De plus, les trois sérines précédemment décrites S218, S35 et S38 sont celles qui sont retrouvées le plus fréquemment phosphorylées dans les analyses de phosphoprotéomique. Cette forte phosphorylation de ces trois résidus suggère qu'ils pourraient disposer d'un rôle central dans la régulation de l'activité du canal Nav<sub>v</sub>1.5, d'autant plus que la S218 est localisée à proximité de la séquence d'interaction du FHF2 avec le canal (Wang *et al.*, 2012). Au contraire, les autres sites de phosphorylation identifiés en positions S230, T232, S238, S240, S250 et T255 sont retrouvés moins phosphorylés en condition basale. Cela pourrait être expliqué par leurs rôles dans des activités plus temporaires et/ou locale comme la stimulation d'une voie de signalisation particulière aboutissant à l'activation de kinases.

Nos études de phosphoprotéomique n'ont pas mis en exergue le site de phosphorylation Y158 précédemment décrit sur FHF4 (Wadsworth *et al.*, 2020) et conservé sur les séquences de chaque variant de FHF2 (Y161). Le fait que ce site ait été identifié par spectrométrie de masse, mais dans des expériences de phosphorylation *in vitro* et le fait que les tyrosines soient moins sensibles à la phosphorylation que les sérines et thréonines pourraient expliquer l'absence de ce site dans nos analyses. De la même façon, les sites S226, S228 et S230 précédemment identifiés sur FHF4 (Hsu *et al.*, 2016 ; Hsu *et al.*, 2017) ne sont pas conservés sur FHF2.

## IV. Étude des rôles de la phosphorylation des protéines FHF2 et Na<sub>v</sub>1.5 dans la régulation du courant I<sub>Na</sub> cardiaque

Chacun de ces sites de phosphorylation a été muté en alanine ou glutamate et analysé en paire avec le site voisin le plus proche (S35-S38 ; S230-T232 ; S238-S240 ; S250-T255), excepté pour la sérine S218 qui est davantage isolée. Les résultats obtenus par la méthode de patch-clamp n'ont pas révélé d'effet particulier associé aux différents phosphomutants. En effet, les courants sodiques enregistrés avec l'expression des phosphomutants de FHF2-VY dans les cardiomyocytes néonataux et adultes, ainsi que dans les cellules HEK-293, présentent les mêmes caractéristiques qu'avec l'expression du FHF2-VY WT. Le phosphomutant 9A ne fait pas exception, ce qui nous empêche de déterminer le rôle de ces sites de phosphorylation dans un contexte physiologique. L'une des raisons pouvant expliquer cette absence d'effet est l'utilisation d'un résidu glutamate pour mimer la phosphorylation. En effet, le glutamate ne mime que partiellement la fonction chimique du phosphate par l'ajout d'une seule charge négative contrairement à deux pour le groupement phosphate et par un encombrement allostérique plus petit. D'autre part, la phosphorylation d'un ou deux phosphomutants n'est peut-être pas suffisante pour observer une régulation probablement très fine du courant I<sub>Na</sub>. La fonction de FHF2 sur le canal Na<sub>v</sub>1.5 pourrait très bien être portée par des combinaisons particulières de phosphorylation. Une autre raison pourrait être que les modèles d'études *in vitro* utilisés ne récapitulent pas suffisamment l'environnement canalaire présent dans le cœur. En effet, les cardiomyocytes sont des modèles matures, contrairement aux cellules HEK-293, mais le fait qu'ils soient utilisés en dehors de tout contexte physiologique dans des milieux très contrôlés nous fait perdre toutes les régulations externes qui pourraient y être associées. En effet, les kinases impliquées pourraient faire intervenir un certain nombre de stimulations extérieures à la cellule, absentes de nos modèles. Ce type de régulation n'est pas présente dans nos expériences, ce qui pourrait nous empêcher de déterminer les effets de la phosphorylation de FHF2. Une dernière explication serait liée au fait que l'expression du FHF2-VY dans nos modèles est plus forte que le FHF2 endogène. Cette surexpression du FHF2-VY, couplée à la forte affinité du FHF2 pour le canal Na<sub>v</sub>1.5 (Abrams *et al.*, 2020), pourrait favoriser l'interaction de la protéine avec le canal et nous empêcher de voir une perte d'interaction associée à la phosphorylation.

La phosphorylation du canal Nav1.5 avait déjà été décrite comme participant à l'interaction du FHF2 et de la CaM avec le canal (Burel *et al.*, 2017). C'est pourquoi nous avons approfondi cette étude en nous intéressant à la phosphorylation de la sérine S1884 sur le canal Nav1.5. Des résultats encourageants de biochimie ont montré une perte d'interaction du FHF2-VY avec le canal Nav1.5 phosphomuté en S1884A qui s'accompagne d'une perte d'interaction avec la CaM, mais ces effets sont également retrouvés avec le mutant Nav1.5 S1884E. Cependant, l'expression d'un autre mutant phosphomimétique, le Nav1.5 S1884D, restaure la liaison du FHF2 avec Nav1.5. De façon intéressante, la co-expression de Nav1.5 S1884E avec le FHF2-VY montre un ralentissement de la cinétique d'inactivation rapide qui est rétablie par l'expression du mutant Nav1.5 S1884A. Ces différents résultats suggèrent qu'il existe une régulation impliquant la phosphorylation de la sérine S1884 sur la liaison de FHF2 au canal Nav1.5 avec un effet régulateur de l'inactivation rapide. Une investigation plus poussée devrait, par la suite, être effectuée avec le mutant Nav1.5 S1884D afin de confirmer cette régulation.

La protéine FHF1-B est l'isoforme cardiaque majoritaire chez l'homme et dispose d'une affinité moindre pour le canal Nav1.5 que celle des protéines FHF2 (Wang *et al.*, 2012 ; Abrams *et al.*, 2020). De la même façon que pour FHF2, nous avons cherché à identifier les rôles éventuels de la réexpression de FHF1-B sur le courant  $I_{Na}$  et si la phosphorylation pouvait être impliquées dans cette régulation. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la sérine S150, homologue de la sérine S218 de FHF2, qui est la seule sérine phosphorylée conservée entre les séquences FHF1 et FHF2. Cependant, aucun effet n'a pu être attribué aux phosphomutants (S150A et S150E) étudiés, car leurs co-expressions avec Nav1.5 ne montrent pas de différence comparée à la forme sauvage du FHF1-B.

## V. Publications scientifiques

Au cours de ce projet de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à la caractérisation de deux sites de phosphorylation T670 et S671 retrouvé dans les analyses de phosphoprotéomique. La caractérisation de ces deux sites s'inscrit dans une démarche plus large ayant pour but d'identifier et de déterminer les rôles potentiels des sites de phosphorylation présents sur le canal Nav1.5. Cette étude a mis en évidence 42 sites de

phosphorylation sur des complexes protéiques Nav1.5 purifiés à partir de ventricule gauche de souris. Bien qu'aucun effet n'ait été déterminé par les phosphomutants sur de nombreux sites, un cluster de sites de phosphorylation (S664, S667, T670 et S671) a été mis en évidence comme régulateur des propriétés biophysiques des canaux Nav1.5. La sérine S671 a montré, lorsqu'elle est phosphorylée, une diminution la densité de courant  $I_{Na}$  dont l'origine serait une diminution d'expression de Nav1.5 à la surface cellulaire. Quant aux sérines S664 et S667, celles-ci sont impliquées dans la régulation de la dépendance au potentiel de l'activation qui est décalé vers des potentiels hyperpolarisés lorsqu'ils sont mutés en alanine pour abolir la phosphorylation. Seule la thréonine T670 n'a pas été reliée à un effet sur le courant  $I_{Na}$  parmi les sites de ce cluster. L'ensemble des résultats de ce projet sont présentés dans l'article « *Proteomic and functional mapping of cardiac Nav1.5 channel phosphorylation sites* » (Lorenzini *et al.*, 2021).

Mes travaux de thèse ont également été utilisés dans le cadre d'une étude visant à étudier et définir certaines limites de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière. Les limites étudiées dans ce projet concernent les trop grandes amplitudes de courant et les défauts dans la compensation de la résistance série. Ces paramètres peuvent induire des variabilités de potentiel membranaire lors des enregistrements électrophysiologiques qui affectent la caractérisation des processus d'activation et d'inactivation dépendants du potentiel. À partir de prédictions obtenues sur différents modèles cellulaires, nous avons mis en place des méthodes simples afin de mettre en application de bonnes pratiques lors d'enregistrements de voltage-clamp en configuration cellule entière. Les résultats de cette étude ont été publiés dans l'article « *Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp* » (Montnach *et al.*, 2021).



# Conclusion

Les analyses de phosphoprotéomique effectuées sur des ventricules gauches de souris ont permis d'identifier un nombre important de sites de phosphorylation sur le canal Nav1.5 et sa protéine partenaire FHF2-VY. Cette thèse s'est intéressée aux rôles de ces sites de phosphorylation dans la régulation de l'expression et de l'activité du canal Nav1.5 dans deux modèles de cardiomyocytes ventriculaires, néonataux et adultes de souris, ainsi que dans un modèle de cellules HEK-293. Nos données montrent que la protéine FHF2 ventriculaire est fortement phosphorylée. Bien qu'aucun rôle particulier n'ait été attribué aux sites de phosphorylation des FHF, notre étude a permis de mettre en évidence une régulation différentielle par les isoformes de FHF2 dans les cœurs murins néonataux et adultes. L'isoforme FHF2-VY affecte uniquement les propriétés d'inactivation chez l'individu jeune et adulte tandis que l'isoforme FHF2-A n'est présente que chez l'individu juvénile et conduit également à la régulation des propriétés d'activation. La protéine FHF1-B, quant à elle, ne semble moduler que la densité de courant  $I_{Na}$  de la même façon que FHF2. De futures investigations pourraient être entreprises pour confirmer le rôle de l'isoforme FHF2-A dans la régulation de Nav1.5 dans les cardiomyocytes néonataux et pour pallier le phénomène de surexpression des isoformes dans nos deux modèles. Cela pourrait révéler davantage d'informations concernant l'impact de la phosphorylation dans la régulation des canaux Nav par ses protéines partenaires FHF.





# Références

- Abrams, J., Roybal, D., Chakouri, N., Katchman, A. N., Weinberg, R., Yang, L., Chen, B. X., 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. (2020). Fibroblast growth factor homologous factors tune arrhythmogenic late NaV1.5 current in calmodulin binding-deficient channels. *JCI Insight*, 5(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141736>
- Adsit, G. S., Vaidyanathan, R., Galler, C. M., Kyle, J. W., & Makielski, J. C. (2013). Channelopathies from mutations in the cardiac sodium channel protein complex. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 61, pp. 34–43). <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.017>
- Agullo-Pascual, E., Lin, X., Leo-Macias, A., Zhang, M., Liang, F. X., Li, Z., Pfenniger, A., Lübke, I., Keegan, S., Fenyo, D., Willecke, K., Rothenberg, E., & Delmar, M. (2014). Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and NaV1.5 localization at the intercalated disc. *Cardiovascular Research*, 104(2), 371–381. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu195>
- Ahern, C. A., Zhang, J. F., Wookalis, M. J., & Horn, R. (2005). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circulation Research*, 96(9), 991–998. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000166324.00524.dd>
- Aiba, T., Farinelli, F., Kostecky, G., Hesketh, G. G., Edwards, D., Biswas, S., Tung, L., & Tomaselli, G. F. (2014). A mutation causing brugada syndrome identifies a mechanism for altered autonomic and oxidant regulation of cardiac sodium currents. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(3), 249–256. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000480>
- Aiba, T., Hesketh, G. G., Liu, T., Carlisle, R., Villa-Abrille, M. C., O'Rourke, B., Akar, F. G., & Tomaselli, G. F. (2010). Na<sup>+</sup> channel regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 85(3), 454–463. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp324>
- Albesa, M., Ogronik, J., Rougier, J. S., & Abriel, H. (2011). Regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by utrophin in dystrophin-deficient mice. *Cardiovascular Research*, 89(2), 320–328. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq326>
- Allouis, M., le Bouffant, F., Wilders, R., Péroz, D., Schott, J. J., Noireaud, J., le Marec, H., Mérot, J., Escande, D., & Baró, I. (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circulation Research*, 98(12), 1538–1546. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000229244.97497.2c>
- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., & Tan, H. L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 460, Issue 2, pp. 223–237). <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0>
- Andrikopoulos, P., Fraser, S. P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., Diss, J. K. J., Box, C., Eccles, S. A., & Djamgoz, M. B. A. (2011). Angiogenic functions of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in human endothelial cells: Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16846–16860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187559>
- Ashpole, N. M., Herren, A. W., Ginsburg, K. S., Brogan, J. D., Johnson, D. E., Cummins, T. R., Bers, D. M., & Hudmon, A. (2012). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium

- channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 19856–19869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322537>
- Baba, S., Dun, W., & Boyden, P. A. (2004). Can PKA activators rescue Na<sup>+</sup> channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart? *Cardiovascular Research*, 64(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.06.021>
- Ballou, L. M., Lin, R. Z., & Cohen, I. S. (2015). Control of cardiac repolarization by phosphoinositide 3-kinase signaling to ion channels. In *Circulation Research* (Vol. 116, Issue 1, pp. 127–137). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303975>
- Ben-Johny, M., Yang, P. S., Niu, J., Yang, W., Joshi-Mukherjee, R., & Yue, D. T. (2014). Conservation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulation across Na and Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*, 157(7), 1657–1670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.035>
- Bezzerrides, V. J., Zhang, A., Xiao, L., Simonson, B., Khedkar, S. A., Baba, S., Ottaviano, F., Lynch, S., Hessler, K., Rigby, A. C., Milan, D., Das, S., & Rosenzweig, A. (2017). Inhibition of serum and glucocorticoid regulated kinase-1 as novel therapy for cardiac arrhythmia disorders. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00413-3>
- Biswas, S., Disilvestre, D., Tian, Y., Halperin, V. L., & Tomaselli, G. F. (2009). Calcium-mediated dual-mode regulation of cardiac sodium channel gating. *Circulation Research*, 104(7), 870–878. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193565>
- Black, J. A., & Waxman, S. G. (2013). Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. In *Neuron* (Vol. 80, Issue 2, pp. 280–291). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.012>
- Boehmer, C., Wilhelm, V., Palmada, M., Wallisch, S., Henke, G., Brinkmeier, H., Cohen, P., Pieske, B., & Lang, F. (2003). Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel SCN5A. *Cardiovascular Research*, 57(4), 1079–1084. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00837-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00837-4)
- Bradley, E., Webb, T. I., Hollywood, M. A., Sergeant, G. P., Mchale, N. G., & Thornbury, K. D. (2013). The cardiac sodium current Na<sup>v</sup> 1.5 is functionally expressed in rabbit bronchial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305, 427–435. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00034.2013.-A>
- Burel, S., Coyan, F. C., Lorenzini, M., Meyer, M. R., Lichti, C. F., Brown, J. H., Loussouarn, G., Charpentier, F., Nerbonne, J. M., Townsend, R. R., Maier, L. S., & Marionneau, C. (2017). C-terminal phosphorylation of NaV1.5 impairs FGF13-dependent regulation of channel inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(42), 17431–17448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787788>
- Carrithers, M. D., Dib-Hajj, S., Carrithers, L. M., Tokmoulina, G., Pypaert, M., Jonas, E. A., & Waxman, S. G. (2007). Expression of the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.5 in the Macrophage Late Endosome Regulates Endosomal Acidification. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7822–7832. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7822>
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: Structure, function and pathophysiology. In *Journal of Physiology* (Vol. 590, Issue 11, pp. 2577–2589). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), 35–51. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071969>

- Chadda, K. R., Jeevaratnam, K., Lei, M., & Huang, C. L. H. (2017). Sodium channel biophysics, late sodium current and genetic arrhythmic syndromes. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 469, Issues 5–6, pp. 629–641). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1959-1>
- Chakouri, N., Rivas, S., Roybal, D., Yang, L., Diaz, J., Hsu, A. L., Mahling, R., Chen, B.-X., Owoyemi, J. O., DiSilvestre, D., Sirabella, D., Corneo, B., Tomaselli, G. F., Dick, I. E., Marx, S. O., & Ben-Johny, M. (2022). Fibroblast growth factor homologous factors serve as a molecular rheostat in tuning arrhythmogenic cardiac late sodium current. *Nature Cardiovascular Research*, 1(5), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00060-6>
- Chatterjee, S., Vyas, R., Chalamalasetti, S. v., Sahu, I. D., Clatot, J., Wan, X., Lorigan, G. A., Deschênes, I., & Chakrapani, S. (2018). The voltage-gated sodium channel pore exhibits conformational flexibility during slow inactivation. *Journal of General Physiology*, 150(9), 1333–1347. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812118>
- Clancy, C. E., Tateyama, M., Liu, H., Wehrens, X. H. T., & Kass, R. S. (2003). Non-equilibrium gating in cardiac Na<sup>+</sup> channels: An original mechanism of arrhythmia. *Circulation*, 107(17), 2233–2237. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000069273.51375.BD>
- Clatot, J., Hoshi, M., Wan, X., Liu, H., Jain, A., Shinlapawittayatorn, K., Marionneau, C., Ficker, E., Ha, T., & Deschênes, I. (2017). Voltage-gated sodium channels assemble and gate as dimers. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02262-0>
- Cohen S. A. (1996). Immunocytochemical Localization of rH1 Sodium Channel in Adult Rat Heart Atria and Ventricle. *Circulation*. 94, 12, 3083 – 3086. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.12.3083>
- Das, S., Aiba, T., Rosenberg, M., Hessler, K., Xiao, C., Quintero, P. A., Ottaviano, F. G., Knight, A. C., Graham, E. L., Boström, P., Morissette, M. R., del Monte, F., Begley, M. J., Cantley, L. C., Ellinor, P. T., Tomaselli, G. F., & Rosenzweig, A. (2012a). Pathological role of serum-and glucocorticoid-regulated kinase 1 in adverse ventricular remodeling. *Circulation*, 126(18), 2208–2219. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115592>
- Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2010). Isoform-specific and pan-channel partners regulate trafficking and plasma membrane stability; and alter sodium channel gating properties. In *Neuroscience Letters* (Vol. 486, Issue 2, pp. 84–91). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.077>
- Dong, C., Wang, Y., Ma, A., & Wang, T. (2020). Life Cycle of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.609733>
- Effraim, P. R., Huang, J., Lampert, A., Stamboulion, S., Zhao, P., Black, J. A., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2019). Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FGF-13) associates with Nav1.7 in DRG neurons and alters its current properties in an isoform-dependent manner. *Neurobiology of Pain*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2019.100029>
- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjostedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C. A. K., Skogs, M., Ottosson Takanen, J., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., ... Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(2), 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>

- Fry, A. E., Marra, C., Derrick, A. v., Pickrell, W. O., Higgins, A. T., te Water Naude, J., McClatchey, M. A., Davies, S. J., Metcalfe, K. A., Tan, H. J., Mohanraj, R., Avula, S., Williams, D., Brady, L. I., Mesterman, R., Tarnopolsky, M. A., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, X., ... Chung, S. K. (2021). Missense variants in the N-terminal domain of the A isoform of FHF2/FGF13 cause an X-linked developmental and epileptic encephalopathy. *American Journal of Human Genetics*, *108*(1), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.10.017>
- Gade, A. R., Marx, S. O., & Pitt, G. S. (2020). An interaction between the III-IV linker and CTD in NaV1.5 confers regulation of inactivation by CaM and FHF. *Journal of General Physiology*, *152*(2). <https://doi.org/10.1085/JGP.201912434>
- J Gecz, E Baker, A Donnelly, J E Ming, D M McDonald-McGinn, N B Spinner, E H Zackai, G R Sutherland, J C Mulley. (1999). Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2): gene structure, expression and mapping to the Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome region in Xq26 delineated by a duplication breakpoint in a BFLS-like patient. *Human Genetics*. *104*(1):56-63. <https://10.1007/s004390050910>
- Gintant, G. A., & Liu, D.-W. (1992). 3-Adrenergic Modulation of Fast Inward Sodium Current in Canine Myocardium Syncytial Preparations Versus Isolated Myocytes. *Circulation research*. *70*:844–850. <https://doi.org/10.1161/01>.
- Goldfarb, M. (2005). Fibroblast growth factor homologous factors: Evolution, structure, and function. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *16*(2 SPEC. ISS.), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.02.002>
- Goldfarb, M., Schoorlemmer, J., Williams, A., Diwakar, S., Wang, Q., Huang, X., Giza, J., Tchetchik, D., Kelley, K., Vega, A., Matthews, G., Rossi, P., Ornitz, D. M., & D'Angelo, E. (2007). Fibroblast Growth Factor Homologous Factors Control Neuronal Excitability through Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, *55*(3), 449–463. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.006>
- Hakim, P., Gurung, I. S., Pedersen, T. H., Thresher, R., Brice, N., Lawrence, J., Grace, A. A., & Huang, C. L. H. (2008). Scn3b knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *98*(2–3), 251–266. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.01.005>
- Hallaq, H., Wang, D. W., Kunic, J. D., George, A. L., Sam Wells, K., & Murray, K. T. (2012). Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *302*, 782–789. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00817.2010>.
- Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P. C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D. W., Wells, K. S., Zhou, J., Yi, J., & Murray, K. T. (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovascular Research*, *72*(2), 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.007>
- Han, Z., Jiang, Y., Yang, Y., Li, X., Yang, Z., Cao, K., & Wang, D. W. (2015). Deletion of PDK1 causes cardiac sodium current reduction in mice. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122436>
- Hanada, Y., Nakamura, Y., Ozono, Y., Ishida, Y., Takimoto, Y., Taniguchi, M., Ohata, K., Koyama, Y., Imai, T., Morihana, T., Kondo, M., Sato, T., Inohara, H., & Shimada, S. (2018). Fibroblast growth factor 12 is expressed in spiral and vestibular ganglia and necessary for auditory and equilibrium function. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28618-0>

- Harris D., Green W., Craelius W., (1991). Acute thyroid hormone promotes slow inactivation of sodium current in neonatal cardiac myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1045 175-18. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(91\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0167-4889(91)90081-8)
- Haufe, V., Camacho, J. A., Dumaine, R., Günther, B., Bollensdorff, C., von Banchet, G. S., Benndorf, K., & Zimmer, T. (2005). Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in the developing mouse heart. *Journal of Physiology*, 564(3), 683–696. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079681>
- Hennessey, J. A., Marcou, C. A., Wang, C., Wei, E. Q., Wang, C., Tester, D. J., Torchio, M., Dagradi, F., Crotti, L., Schwartz, P. J., Ackerman, M. J., & Pitt, G. S. (2013a). FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm*, 10(12), 1886–1894. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.09.064>
- Hennessey, J. A., Wei, E. Q., & Pitt, G. S. (2013b). Fibroblast growth factor homologous factors modulate cardiac calcium channels. *Circulation Research*, 113(4), 381–388. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301215>
- Herren, A. W., Bers, D. M., & Grandi, E. (2013). Post-translational modifications of the cardiac Na channel: contribution of CaMKII-dependent phosphorylation to acquired arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305, 431–445. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00306.2013>-The
- Herren, A. W., Weber, D. M., Rigor, R. R., Margulies, K. B., Phinney, B. S., & Bers, D. M. (2015). CaMKII phosphorylation of Na V 1.5: Novel in vitro sites identified by mass spectrometry and reduced s516 phosphorylation in human heart failure. *Journal of Proteome Research*, 14(5), 2298–2311. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00107>
- Hoeflich, K. P., Ikura M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*. 108(6):739-42. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00682-7)
- Hsu, W. C. J., Scala, F., Nenov, M. N., Wildburger, N. C., Elferink, H., Singh, A. K., Chesson, C. B., Buzhdygan, T., Sohail, M., Shavkunov, A. S., Panova, N. I., Nilsson, C. L., Rudra, J. S., Lichti, C. F., & Laezza, F. (2016). CK2 activity is required for the interaction of FGF14 with voltage-gated sodium channels and neuronal excitability. *FASEB Journal*, 30(6), 2171–2186. <https://doi.org/10.1096/fj.201500161>
- Hsu, W. C. J., Wildburger, N. C., Haidacher, S. J., Nenov, M. N., Folorunso, O., Singh, A. K., Chesson, B. C., Franklin, W. F., Cortez, I., Sadygov, R. G., Dineley, K. T., Rudra, J. S., Tagliatela, G., Lichti, C. F., Denner, L., & Laezza, F. (2017). PPARγ agonists rescue increased phosphorylation of FGF14 at S226 in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 295, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.005>
- Hudmon, A., & Schulman, H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. In *Biochem. J* (Vol. 364). <https://doi.org/10.1042/BJ20020228>
- Hund, T. J., Koval, O. M., Li, J., Wright, P. J., Qian, L., Snyder, J. S., Gudmundsson, H., Kline, C. F., Davidson, N. P., Cardona, N., Rasband, M. N., Anderson, M. E., & Mohler, P. J. (2010). A βIV-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(10), 3508–3519. <https://doi.org/10.1172/JCI43621>
- Imbrici, P., Liantonio, A., Camerino, G. M., de Bellis, M., Camerino, C., Mele, A., Giustino, A., Pierno, S., de Luca, A., Tricarico, D., Desaphy, J. F., & Conte, D. (2016). Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 7, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00121>

- Iqbal, S. M., Aufy, M., Shabbir, W., & Lemmens-Gruber, R. (2018). Identification of phosphorylation sites and binding pockets for modulation of Na V 1.5 channel by Fyn tyrosine kinase. *FEBS Journal*, 285(13), 2520–2530. <https://doi.org/10.1111/febs.14496>
- Iqbal, S. M. & Lemmens-Gruber, R. (2018). Phosphorylation of cardiac voltage-gated sodium channel: Potential players with multiple dimensions. *Acta Physiologica*. 2019;225:e13210. <https://doi.org/10.1111/apha.13210>
- Isom, L. L. (2002). The role of sodium channels in cell adhesion. *Frontiers in Bioscience*. 7(4), 12–23. <https://doi.org/10.2741/isom>
- Isom, L. L., de Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F. X., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). Primary Structure and Functional Expression of the  $\beta_1$  Subunit of the Rat Brain Sodium Channel. *New Series*. 256(5058):839-42. <https://doi.org/10.1126/science.1375395>
- Isom, L. L., Catterall W. A. (1996). Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. (1996). *Nature*. 383(6598):307-8. <https://doi.org/10.1038/383307b0>
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. In *Developmental Dynamics* (Vol. 237, Issue 1, pp. 18–27). <https://doi.org/10.1002/dvdy.21388>
- Jespersen, T., Gavillet, B., van Bemmelen, M. X., Cordonier, S., Thomas, M. A., Staub, O., & Abriel, H. (2006). Cardiac sodium channel Nav1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(4), 1455–1462. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.014>
- Kang, P. W., Chakouri, N., Diaz, J., Tomaselli, G. F., Yue, D. T., Ben-Johny, M., Designed, -J, Performed, -J, & Contrib-Uted, J. (2021). *Na V 1.2 (19, 20), and Na V 1.6 (21)*. 18, 2025085118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025085118/-/DCSupplemental>
- Kardami, E., Detillieux, K., Ma, X., Jiang, Z., Santiago, J. J., Jimenez, S. K., & Cattini, P. A. (2007). Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection. *Heart Failure Reviews*, 12(3–4), 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9027-0>
- Kaufmann, S. G., Westenbroek, R. E., Maass, A. H., Lange, V., Renner, A., Wischmeyer, E., Bonz, A., Muck, J., Ertl, G., Catterall, W. A., Scheuer, T., & Maier, S. K. G. (2013). Distribution and function of sodium channel subtypes in human atrial myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 61: 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc>
- Kelly G. R., (2005). Molecular Inroads into the Anterior Heart Field. *Trends Cardiovasc Med*. 15:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.02.001>
- Kim, J., Ghosh, S., Liu, H., Tateyama, M., Kass, R. S., & Pitt, G. S. (2004). Calmodulin mediates Ca<sup>2+</sup> sensitivity of sodium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 45004–45012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407286200>
- Kirstein, M., Eickhorn, R., Langenfeld, H., Kochsiek, K., & Antoni, H. (1991). Influence of  $\beta$ -adrenergic stimulation on the fast sodium current in the intact rat papillary muscle. *Basic Research in Cardiology*. 86, 441–448. <https://doi.org/10.26481/dis.20120427jh>
- König, H. G., Fenner, B. J., Byrne, J. C., Schwamborn, R. F., Bernas, T., Jefferies, C. A., & Prehn, J. H. M. (2012). Fibroblast growth factor homologous factor 1 interacts with NEMO to regulate NF- $\kappa$ B signaling in neurons. *Journal of Cell Science*, 125(24), 6058–6070. <https://doi.org/10.1242/jcs.111880>

- Koval, O. M., Snyder, J. S., Wolf, R. M., Pavlovicz, R. E., Glynn, P., Curran, J., Leymaster, N. D., Dun, W., Wright, P. J., Cardona, N., Qian, L., Mitchell, C. C., Boyden, P. A., Binkley, P. F., Li, C., Anderson, M. E., Mohler, P. J., & Hund, T. J. (2012). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase ii-based regulation of voltage-gated na<sup>+</sup> channel in cardiac disease. *Circulation*, *126*(17), 2084–2094. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.105320>
- Krawchuk, D., Honma-Yamanaka, N., Anani, S., & Yamanaka, Y. (2013). FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Developmental Biology*, *384*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.09.023>
- Kumar, V., Goutam, R. S., Park, S., Lee, U., & Kim, J. (2021). Functional roles of fgf signaling in early development of vertebrate embryos. *Cells* (Vol. 10, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10082148>
- Lang, F., Stourmaras, C., & Alesutan, I. (2014). Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Molecular Membrane Biology* (Vol. 31, Issue 1, pp. 29–36). <https://doi.org/10.3109/09687688.2013.874598>
- Lee, K. W., Yim, H. S., Shin, J., Lee, C., Lee, J. H., & Jeong, J. Y. (2017). FGF11 induced by hypoxia interacts with HIF-1 $\alpha$  and enhances its stability. *FEBS Letters*, *591*(2), 348–357. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12547>
- Li, Z., Jin, X., Wu, T., Zhao, X., Wang, W., Lei, J., Pan, X., & Yan, N. (2021). Structure of human Na<sup>v</sup> 1.5 reveals the fast inactivation-related segments as a mutational hotspot for the long QT syndrome. *PNAS*. Vol. 118, No. 11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100069118/-/DCSupplemental>
- Light, P. E., Wallace, C. H. R., & Dyck, J. R. B. (2003). Constitutively active adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Circulation*, *107*(15), 1962–1965. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000069269.60167.02>
- Lin, X., O'Malley, H., Chen, C., Auerbach, D., Foster, M., Shekhar, A., Zhang, M., Coetzee, W., Jalife, J., Fishman, G. I., Isom, L., & Delmar, M. (2015). Scn1b deletion leads to increased tetrodotoxin-sensitive sodium current, altered intracellular calcium homeostasis and arrhythmias in murine hearts. *Journal of Physiology*, *593*(6), 1389–1407. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.277699>
- Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2001). Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 1B Binds to the C Terminus of the Tetrodotoxin-resistant Sodium Channel rNav1.9a (NaN). *Journal of Biological Chemistry*, *276*(22), 18925–18933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101606200>
- Liu, C. ju, Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 1029–1036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207074200>
- Liu, M., Gu, L., Sulkin, M. S., Liu, H., Jeong, E. M., Greener, I., Xie, A., Efimov, I. R., & Dudley, S. C. (2013). Mitochondrial dysfunction causing cardiac sodium channel downregulation in cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *54*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.10.011>
- Liu, M., Sanyal, S., Gao, G., Gurung, I. S., Zhu, X., Gaconnet, G., Kerchner, L. J., Shang, L. L., Huang, C. L. H., Grace, A., London, B., & Dudley, S. C. (2009). Cardiac Na<sup>+</sup> Current regulation by pyridine nucleotides. *Circulation Research*, *105*(8), 737–745. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197277>



- Liu, M., Shi, G., Yang, K. C., Gu, L., Kanthasamy, A. G., Anantharam, V., & Dudley, S. C. (2017). Role of protein kinase C in metabolic regulation of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Heart Rhythm*, 14(3), 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.12.026>
- Liu, X., Chen, Z., Han, Z., Liu, Y., Wu, X., Peng, Y., Di, W., Lan, R., Sun, B., Xu, B., & Xu, W. (2019). AMPK-mediated degradation of Nav1.5 through autophagy. *FASEB Journal*, 33(4), 5366–5376. <https://doi.org/10.1096/fj.201801583RR>
- Long, Y. C., & Kharitononkov, A. (2011). Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1812, Issue 7, pp. 791–795). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.04.002>
- Lopez-Santiago, L. F., Meadows, L. S., Ernst, S. J., Chen, C., Malhotra, J. D., Mcewen, D. P., Speelman, A., Noebels, J. L., Maier, S. K. G., Lopatin, A. N., & Isom, L. L. (2007). Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol.* 43(5):636-47 <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.07.062>
- Lorenzini, M., Burel, S., Lesage, A., Wagner, E., Charriere, C., Chevillard, P. M., Evrard, B., Maloney, D., Ruff, K. M., Pappu, R. v., Wagner, S., Nerbonne, J. M., Silva, J. R., Townsend, R. R., Maier, L. S., & Marionneau, C. (2021). Proteomic and functional mapping of cardiac Nav1.5 channel phosphorylation sites. *Journal of General Physiology*, 153(2). <https://doi.org/10.1085/JGP.202012646>
- Lou, J. Y., Laezza, F., Gerber, B. R., Xiao, M., Yamada, K. A., Hartmann, H., Craig, A. M., Nerbonne, J. M., & Ornitz, D. M. (2005). Fibroblast growth factor 14 is an intracellular modulator of voltage-gated sodium channels. *Journal of Physiology*, 569(1), 179–193. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097220>
- Lu, Z., Jiang, Y. P., Wu, C. Y. C., Ballou, L. M., Liu, S., Carpenter, E. S., Rosen, M. R., Cohen, I. S., & Lin, R. Z. (2013). Increased persistent sodium current due to decreased pi3k signaling contributes to qt prolongation in the diabetic heart. *Diabetes*, 62(12), 4257–4265. <https://doi.org/10.2337/db13-0420>
- Lu, Z., Wu, C. Y. C., Jiang, Y. P., Ballou, L. M., Clausen, C., Cohen, I. S., & Lin, R. Z. (2012). Suppression of phosphoinositide 3-kinase signaling and alteration of multiple ion currents in drug-induced long QT syndrome. *Science Translational Medicine*, 4(131). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003623>
- Maier, L. S., & Sossalla, S. (2013). The late Na current as a therapeutic target: Where are we? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 61, pp. 44–50). <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.001>
- Maier, S. K. G., Westenbroek, R. E., McCormick, K. A., Curtis, R., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2004). Distinct Subcellular Localization of Different Sodium Channel  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits in Single Ventricular Myocytes from Mouse Heart. *Circulation*, 109(11), 1421–1427. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121421.61896.24>
- Malhotra, J. D., Chen, C., Rivolta, I., Abriel, H., Malhotra, R., Mattei, L. N., Brosius, F. C., Kass, R. S., & Isom, L. L. (2001). Characterization of Sodium Channel-and-Subunits in Rat and Mouse Cardiac Myocytes. *Circulation*, 103:1303–1310. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.9.1303>
- Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., & Isom, L. L. (2000). Sodium Channel Subunits Mediate Homophilic Cell Adhesion and Recruit Ankyrin to Points of Cell-Cell Contact\*. *Journal of biological chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11383>
- Malhotra, J. D., Thyagarajan, V., Chen, C., & Isom, L. L. (2004). Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel  $\beta$ 1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40748–40754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407243200>

- Maltsev, V. A., Kyle, J. W., & Undrovinas, A. (2009). Late Na<sup>+</sup> current produced by human cardiac Na<sup>+</sup> channel isoform Nav1.5 is modulated by its  $\beta$ 1 subunit. *Journal of Physiological Sciences*, 59(3), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s12576-009-0029-7>
- Maltsev, V. A., & Undrovinas, A. (2008). Late sodium current in failing heart: Friend or foe? *Prog Biophys Mol Biol*, 96(1-3): 421–451. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.010>
- Matamoros, M., Perez-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  $\alpha$ 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovascular Research*, 110(2), 279–290. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw009>
- Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M. T., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2007). SCN4B-encoded sodium channel  $\beta$ 4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, 116(2), 134–142. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.659086>
- Mishra, S., Reznikov, V., Maltsev, V. A., Undrovinas, N. A., Sabbah, H. N., & Undrovinas, A. (2015). Contribution of sodium channel neuronal isoform Nav1.1 to late sodium current in ventricular myocytes from failing hearts. *Journal of Physiology*, 593(6), 1409–1427. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.278259>
- Mohler, P. J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S. G., & Bennett, V. (2004). Na v 1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Na v 1.5 on the surface of cardiomyocytes. *PNAS*. Vol. 101 No. 50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403711101>
- Montnach, J., M. Lorenzini, A. Lesage, I. Simon, S. Nicolas, E. Moreau, C. Marionneau, I. Baro, M. De Waard, and G. Lousouarn. 2021. Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp. *Sci Rep*. 11:3282. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82077-8>
- Motoike, H. K., Liu, H., Glaaser, I. W., Yang, A. S., Tateyama, M., & Kass, R. S. (2004). The Na<sup>+</sup> Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex: A Novel Role of the COOH-terminal Domain. *Journal of General Physiology*, 123(2), 155–165. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308929>
- Munoz-Sanjuan, I., Smallwood, P. M., & Nathans, J. (2000). Isoform Diversity among Fibroblast Growth Factor Homologous Factors Is Generated by Alternative Promoter Usage and Differential Splicing\*. *Journal of biological chemistry*. Volume 275, ISSUE 4 <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2589>
- Murphy, B. J., Rogers, J., Perdichizzi, A. P., Colvin, A. A., & Catterall, W. A. (1996). cAMP-dependent Phosphorylation of Two Sites in the Subunit of the Cardiac Sodium Channel\*. *Journal of biological chemistry*, 271(46):28837-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28837>
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev*, 85(4):1205-53. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>.
- Onkal, R., J.H. Mattis, S.P. Fraser, J.K. Diss, D. Shao, K. Okuse, and M.B. Djamgoz. 2008. Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J Cell Physiol*. 216:716-726. <https://doi.org/10.1002/jcp.21451>
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 215–266. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>

- Pablo, J. L., & Pitt, G. S. (2016). Fibroblast Growth Factor Homologous Factors: New Roles in Neuronal Health and Disease. *Neuroscientist* (Vol. 22, Issue 1, pp. 19–25). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858414562217>
- Péréon, Y., Lande, G., Demolombe, S., Nguyen the Tich, S., Sternberg, D., Marec, H., David, A. (2003). Paramyotonia congenita with an SCN4A mutation affecting cardiac repolarization. *Neurology*. 340, 2, 60. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000042093.96309.5A>
- Petitprez, S., Zmoos, A. F., Ogrodnik, J., Balse, E., Raad, N., El-Haou, S., Albesa, M., Bittihn, P., Luther, S., Lehnart, S. E., Hatem, S. N., Coulombe, A., & Abriel, H. (2011). SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circulation Research*, 108(3), 294–304. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228312>
- Ponce-Balbuena D, Guerrero-Serna G, Valdivia C. R, Caballero R, Diez-Guerra F. J, Jiménez-Vázquez E. N, Ramírez R. J, da Rocha A. M, Herron T. J, Campbell K. F, Willis B. C, Alvarado F. J, Zarzoso M, Kaur K, Pérez-Hernández M, Matamoros M, Valdivia H. H, Delpón E, Jalife J. (2018). Cardiac Kir2.1 and Nav1.5 Channels Traffic Together to the Sarcolemma to Control Excitability. *Circulation research*. 122:1501-1516. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311872>
- Potet, F., Chagot, B., Anghelescu, M., Viswanathan, P. C., Stepanovic, S. Z., Kupersmidt, S., Chazin, W. J., & Balsler, J. R. (2009). Functional interactions between distinct sodium channel cytoplasmic domains through the action of calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8846–8854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806871200>
- Priori, S. G., Napolitano, C., Gasparini, M., Pappone, C., della Bella, P., Giordano, U., Bloise, R., Giustetto, C., de Nardis, R., Grillo, M., Ronchetti, E., Faggiano, G., & Nastoli, J. (2002). Natural history of Brugada syndrome: Insights for risk stratification and management. *Circulation*, 105(11), 1342–1347. <https://doi.org/10.1161/hc1102.105288>
- Qu, Y., Rogers, J. C., Tanada, T. N., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (n.d.). Phosphorylation of S1505 in the Cardiac Na<sup>+</sup> Channel Inactivation Gate Is Required for Modulation by Protein Kinase C. *Journal of General Physiology*, 108(5):375-9. <https://doi.org/10.1085/jgp.108.5.375>
- Rellos, P., Pike, A. C. W., Niesen, F. H., Salah, E., Lee, W. H., von Delft, F., & Knapp, S. (2010). Structure of the CaMKII $\delta$ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CamKII kinase activation. *PLoS Biology*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000426>
- Remme, C. A., & Bezzina, C. R. (2010). Sodium channel (Dys)function and cardiac arrhythmias. *Cardiovascular Therapeutics* (Vol. 28, Issue 5, pp. 287–294). <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00210.x>
- Remme, C. A., Verkerk, A. O., Hoogaars, W. M. H., Aanhaanen, W. T. J., Scicluna, B. P., Annink, C., van den Hoff, M. J. B., Wilde, A. A. M., van Veen, T. A. B., Veldkamp, M. W., de Bakker, J. M. T., Christoffels, V. M., & Bezzina, C. R. (2009). The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Research in Cardiology*, 104(5), 511–522. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0012-8>
- Resh, M. D. (1998). Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Tk International Journal of Biuckmistry & The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30(11):1159-62. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(98\)00089-2](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00089-2)
- Rush, A. M., Wittmack, E. K., Tyrrell, L., Black, J. A., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2006). Differential modulation of sodium channel Nav1.6 by two members of the fibroblast growth factor homologous

factor 2 subfamily. *European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2551–2562. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04789.x>

- Schoorlemmer, J., & Goldfarb, M. (2002). Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49111–49119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205520200>
- Schubert B, Vandongen AM, Kirsch GE, Brown AM. Inhibition of cardiac Na<sup>+</sup> currents by isoproterenol. (1990). *Am J Physiol*. 258:H977-H982. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.258.4.H977>
- Shah, V. N., Wingo, T. L., Weiss, K. L., Williams, C. K., Balsler, J. R., & Chazin, W. J. (2006). Calcium-dependent regulation of the voltage-gated sodium channel hH1: Intrinsic and extrinsic sensors use a common molecular switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(10):3592-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507397103>
- Siekierska A, Isrie M, Liu Y, Scheldeman C, Vanthillo N, Lagae L, de Witte P. A. M, Van Esch H, Goldfarb M, Buyse G. M. (2016). Gain-of-function FHF1 mutation causes early-onset epileptic encephalopathy with cerebellar atrophy. *Neurology*. 86 (23) <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002752>
- Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological Reviews* (Vol. 88, Issue 4, pp. 1341–1378). <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>
- Tateyama, M., Rivolta, I., Clancy, C. E., & Kass, R. S. (2003). Modulation of Cardiac Sodium Channel Gating by Protein Kinase A Can Be Altered by Disease-linked Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46718–46726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308977200>
- Todt, H., Dudley, S. C., Kyle, J. W., French, R. J., & Fozzard, H. A. (1999). Ultra-Slow Inactivation in 1 Na Channels Is Produced by a Structural Rearrangement of the Outer Vestibule. *Biophys J*, 76(3):1335-45. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77296-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77296-6)
- Toischer, K., Hartmann, N., Wagner, S., Fischer, T. H., Herting, J., Danner, B. C., Sag, C. M., Hund, T. J., Mohler, P. J., Belardinelli, L., Hasenfuss, G., Maier, L. S., & Sossalla, S. (2013). Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.021>
- Turnham, R. E., & Scott, J. D. (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene* (Vol. 577, Issue 2, pp. 101–108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.052>
- Valdivia, C. R., Ueda, K., Ackerman, M. J., & Makielski, J. C. (2009). GPD1L links redox state to cardiac excitability by PKC-dependent phosphorylation of the sodium channel SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(4):H1446-52. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00513.2009>.
- van Bemmelen, M. X., Rougier, J. S., Gavillet, B., Apothéoz, F., Daidié, D., Tateyama, M., Rivolta, I., Thomas, M. A., Kass, R. S., Staub, O., & Abriel, H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation Research*, 95(3), 284–291. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000136816.05109.89>
- van Swieten, J. C., Brusse, E., de Graaf, B. M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B. A., & Heutink, P. (2003). A Mutation in the Fibroblast Growth Factor 14 Gene Is Associated with Autosomal Dominant Cerebral Ataxia. *Am. J. Hum. Genet* 72:191–199. [hdl.handle.net/1765/8498](https://hdl.handle.net/1765/8498)

- Varadarajan, S. G., An, J., Novalija, E., Smart, S. C., Stowe, D. F., & Stowe, D. F. (2001). Changes in  $[Na^{+}]_i$ , compartmental  $[Ca^{2+}]_i$ , and NADH with dysfunction after global ischemia in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(1):H280-93. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.1.H280>
- Vassilev P. M. Scheuerand T. Catterall W. A. (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*. Vol 241, Issue 4873 pp. 1658-1661. <https://doi.org/10.1126/science.241.4873.1658>
- Velíšková, J., Marra, C., Liu, Y., Shekhar, A., Park, D. S., Iatckova, V., Xie, Y., Fishman, G. I., Velíšek, L., & Goldfarb, M. (2021). Early onset epilepsy and sudden unexpected death in epilepsy with cardiac arrhythmia in mice carrying the early infantile epileptic encephalopathy 47 gain-of-function FHF1(FGF12) missense mutation. *Epilepsia*, 62(7), 1546–1558. <https://doi.org/10.1111/epi.16916>
- Vilin, Y. Y., Makita, N., George, A. L., & Ruben, P. C. (1999). Structural Determinants of Slow Inactivation in Human Cardiac and Skeletal Muscle Sodium Channels. *Biophys J*. 77(3): 1384–1393. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76987-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76987-0)
- Wadsworth, P. A., Singh, A. K., Nguyen, N., Dvorak, N. M., Tapia, C. M., Russell, W. K., Stephan, C., & Laezza, F. (2020). JAK2 regulates Nav1.6 channel function via FGF14Y158 phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118786>
- 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. (2006a).  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac  $Na^{+}$  channels. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127–3138. <https://doi.org/10.1172/JCI26620>
- 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. (2006b).  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac  $Na^{+}$  channels. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3127–3138. <https://doi.org/10.1172/JCI26620>
- Wang, C., Chung, B. C., Yan, H., Lee, S. Y., & Pitt, G. S. (2012a). Crystal structure of the ternary complex of a Nav C-terminal domain, a fibroblast growth factor homologous factor, and calmodulin. *Structure*, 20(7), 1167–1176. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.001>
- Wang, C., Chung, B. C., Yan, H., Lee, S. Y., & Pitt, G. S. (2012b). Crystal structure of the ternary complex of a Nav C-terminal domain, a fibroblast growth factor homologous factor, and calmodulin. *Structure*, 20(7), 1167–1176. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.001>
- 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 hearts. *Circulation Research*, 109(7), 775–782. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247957>
- Wang, J., Ou, S. W., & Wang, Y. J. (2017). Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. In *Channels* (Vol. 11, Issue 6, pp. 534–554). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1380758>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.009>

- Wang, Y., Wagner, M. B., Kumar, R., Cheng, J., & Joyner, R. W. (2003). Inhibition of fast sodium current in rabbit ventricular myocytes by protein tyrosine kinase inhibitors. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 446(4), 485–491. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1061-8>
- Watanabe, H., Darbar, D., Kaiser, D. W., Jiramongkolchai, K., Chopra, S., Donahue, B. S., Kannankeril, P. J., & Roden, D. M. (2009). Mutations in Sodium Channel  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-Subunits Associated With Atrial Fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(3), 268–275. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.779181>
- Watanabe, H., Koopmann, T. T., le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C. R., Schott, J. J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., Wiesfeld, A. C. P., Pfeufer, A., Kääb, S., Wichmann, H. E., Hasdemir, C., Aizawa, Y., Wilde, A. A. M., Roden, D. M., & Bezzina, C. R. (2008). Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2260–2268. <https://doi.org/10.1172/JCI33891>
- Wedekind, H., Smits, J. P., Schulze-Bahr, E., Arnold, R., Veldkamp, M. W., Bajanowski, T., Borggrefe, M., Brinkmann, B., Warnecke, I., Funke, H., Bhuiyan, Z. A., Wilde, A. A., Breithardt, G., & Haverkamp, W. (2001). De Novo Mutation in the SCN5A Gene Associated With Early Onset of Sudden Infant Death. *Circulation*, 104: 1158-1164. <https://doi.org/10.1161/hc3501.095361>
- Wehrens, X. H. T., Rossenbacker, T., Jongbloed, R. J., Gewillig, M., Heidbüchel, H., Doevendans, P. A., Vos, M. A., Wellens, H. J. J., & Kass, R. S. (2003). A novel mutation L619F in the cardiac Na<sup>+</sup> channel SCN5A associated with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating. *Human Mutation*, 21(5), 552. <https://doi.org/10.1002/humu.9136>
- Wildburger, N. C., Ali, S. R., Hsu, W. C. J., Shavkunov, A. S., Nenov, M. N., Lichti, C. F., LeDuc, R. D., Mostovenko, E., Panova-Elektronova, N. I., Emmett, M. R., Nilsson, C. L., & Laezza, F. (2015). Quantitative proteomics reveals protein-protein interactions with fibroblast growth factor 12 as a component of the voltage-gated sodium channel 1.2 (Nav1.2) macromolecular complex in mammalian brain. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(5), 1288–1300. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040055>
- Wingo, T. L., Shah, V. N., Anderson, M. E., Lybrand, T. P., Chazin, W. J., & Balsler, J. R. (2004). An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(3), 219–225. <https://doi.org/10.1038/nsmb737>
- Wittmack, E. K., Rush, A. M., Craner, M. J., Goldfarb, M., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2004). Fibroblast growth factor homologous factor 2B: Association with Na v1.6 and selective colocalization at nodes of Ranvier of dorsal root axons. *Journal of Neuroscience*, 24(30), 6765–6775. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1628-04.2004>
- Wu, Q. F., Yang, L., Li, S., Wang, Q., Yuan, X. bin, Gao, X., Bao, L., & Zhang, X. (2012). Fibroblast growth factor 13 is a microtubule-stabilizing protein regulating neuronal polarization and migration. *Cell*, 149(7), 1549–1564. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.046>
- Wu, L., Yong, S. L., Fan, C., Ni, Y., Yoo, S., Zhang, T., Zhang, X., Obejero-Paz, C. A., Rho, H. J., Ke, T., Szafranski, P., Jones, S. W., Chen, Q., & Wang, Q. K. (2008). Identification of a new co-factor, MOG1, required for the full function of cardiac sodium channel Nav1.5. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6968–6978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709721200>
- Yan, H., Pablo, J. L., Wang, C., & Pitt, G. S. (2014). FGF14 modulates resurgent sodium current in mouse cerebellar Purkinje neurons. *eLife*, 3, e04193. <https://doi.org/10.7554/eLife.04193>

- Yan, H., Wang, C., Marx, S. O., & Pitt, G. S. (2017). Calmodulin limits pathogenic Na<sup>+</sup> channel persistent current. *Journal of General Physiology*, *149*(2), 277–293. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611721>
- Yang, J., Kim, W. J., Jun, H. O., Lee, E. J., Lee, K. W., Jeong, J. Y., & Lee, S. W. (2015). Hypoxia-induced fibroblast growth factor 11 stimulates capillary-like endothelial tube formation. *Oncology Reports*, *34*(5), 2745–2751. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4223>
- 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. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1190055>
- Yang, T., Atack, T. C., Stroud, D. M., Zhang, W., Hall, L., & Roden, D. M. (2012). Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circulation Research*, *111*(3), 322–332. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265173>
- Yoon, J. Y., Ho, W. K., Kim, S. T., & Cho, H. (2009). Constitutive CaMKII activity regulates Na<sup>+</sup> channel in rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *47*(4), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.06.020>
- Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R. B., Weinstein, M., Deng, C.-X., & McKeehan, W. L. (2000). Elevated Cholesterol Metabolism and Bile Acid Synthesis in Mice Lacking Membrane Tyrosine Kinase Receptor FGFR4\*. *Journal of biological chemistry*. Volume 275, Issue 20, Pages 15482-15489. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15482>
- Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. In *Genome Biology* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>
- Zaza, A., & Rocchetti, M. (2013). The late Na<sup>+</sup> current - Origin and pathophysiological relevance. In *Cardiovascular Drugs and Therapy* (Vol. 27, Issue 1, pp. 61–68). <https://doi.org/10.1007/s10557-012-6430-0>
- Zhou, J., Shin, H. G., Yi, J., Shen, W., Williams, C. P., & Murray, K. T. (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circulation Research*, *91*(6), 540–546. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000033598.00903.27>
- Ziane, R., Huang, H., Moghadaszadeh, B., Beggs, A. H., Levesque, G., & Chahine, M. (2010). Cell membrane expression of cardiac sodium channel Nav1.5 is modulated by  $\alpha$ -actinin-2 interaction. *Biochemistry*, *49*(1), 166–178. <https://doi.org/10.1021/bi901086v>
- Zimmer, T., Haufe, V., & Blechschmidt, S. (2014). Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. In *Global Cardiology Science and Practice* (Vol. 2014, Issue 4). HBKU Press. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.58>

# Annexes

## Annexe 1 : En cours de publication

### **FHF2 phosphorylation and regulation of native myocardial Nav1.5 channels**

**Adrien Lesage<sup>a</sup>, Maxime Lorenzini<sup>a1</sup>, Sophie Burel<sup>a2</sup>, Marine Sarlandie<sup>a</sup>, Floriane Bibault<sup>a</sup>, Dan Maloney<sup>b</sup>, R. Reid Townsend<sup>c,d</sup>, Jeanne M. Nerbonne<sup>d,e</sup> and Céline Marionneau<sup>a†</sup>**

<sup>a</sup>Nantes Université, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France; <sup>b</sup>Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada; Departments of <sup>c</sup>Cell Biology and Physiology, <sup>d</sup>Medicine and <sup>e</sup>Developmental Biology, Washington University Medical School, Saint Louis, MO, USA.

**†Correspondence to:** Céline Marionneau, ORCID ID: 0000-0003-0962-9756, Email: [celine.marionneau@univ-nantes.fr](mailto:celine.marionneau@univ-nantes.fr), Tel: +33 2 28 08 01 78, l'institut du thorax, INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291, IRS-Nantes Université, 8 Quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France

<sup>1</sup>**Current address:** B'SYS, Witterswil, Switzerland

<sup>2</sup>**Current address:** UMR 703 INRAe/ONIRIS PAnTher, Nantes, France

**Running Title:** Regulation of Nav1.5 by FHF2 phosphorylation

#### **eTOC Summary:**

Lesage *et al.* identify the phosphorylation sites of FHF2 from mouse left ventricular Nav1.5 channel complexes. While no roles for FHF2 phosphosites could be recognized yet, the findings demonstrate differential FHF2-dependent regulation of neonatal and adult mouse ventricular Nav1.5 channels.



## Abstract

Phosphorylation of the cardiac Nav1.5 channel pore-forming subunit is extensive and critical in modulating channel expression and function, yet the regulation of Nav1.5 by phosphorylation of its accessory proteins remains elusive. Using a phosphoproteomic analysis of Nav channel complexes purified from mouse left ventricles, we identified nine phosphorylation sites on Fibroblast growth factor Homologous Factor 2 (FHF2). To determine the roles of phosphosites in regulating Nav1.5, we developed two models from neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes in which FHF2 expression is knockdown and rescued by WT, phosphosilent or phosphomimetic FHF2-VY. While the increased rates of closed-state and open-state inactivation of Nav channels induced by the FHF2 knockdown are completely restored by the FHF2-VY isoform in adult cardiomyocytes, sole a partial rescue is obtained in neonatal cardiomyocytes. The FHF2 knockdown also shifts the voltage-dependence of activation towards hyperpolarized potentials in neonatal cardiomyocytes, which is not rescued by FHF2-VY. Parallel investigations showed that the FHF2-VY isoform is predominant in adult cardiomyocytes, while expression of FHF2-VY and FHF2-A is comparable in neonatal cardiomyocytes. Similar to WT FHF2-VY, however, each FHF2-VY phosphomutant restores the Nav channel inactivation properties in both models, preventing identification of FHF2 phosphosite roles. FHF2 knockdown also increases the late Na<sup>+</sup> current in adult cardiomyocytes, which is restored similarly by WT and phosphosilent FHF2-VY. Together, our results demonstrate that ventricular FHF2 is highly phosphorylated, implicate differential roles for FHF2 in regulating neonatal and adult mouse ventricular Nav1.5, and suggest that the regulation of Nav1.5 by FHF2 phosphorylation is highly complex.

**Keywords:** Cardiac Nav1.5 channels; phosphoproteomics; native FHF2 phosphorylation sites; FHF2 isoforms; neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes

**Abbreviations:** A, alanine; E, glutamate; FHF2, Fibroblast growth factor Homologous Factor 2; FHF2-VY, isoform VY of Fibroblast growth factor Homologous Factor 2; I<sub>Na</sub>, peak Na<sup>+</sup> current; I<sub>NaL</sub>, late Na<sup>+</sup> current; IP, immunoprecipitation; m $\alpha$ Nav<sub>v</sub>PAN, anti-Nav channel subunit mouse monoclonal antibody;

MS, Mass Spectrometry; MS1, mass spectrum of peptide precursors; MS2 or MS/MS, fragmentation mass spectrum of peptides selected in narrow mass range (2 Da) from MS1 scan; Na<sub>v</sub>, voltage-gated Na<sup>+</sup> channel; pS, phosphoserine; pT, phosphothreonine; S, serine; T, threonine; WT, Wild-Type.

## Introduction

Voltage-gated Na<sup>+</sup> (Nav) channels are critical determinants of myocardial excitability, driving the fast upstroke of the action potential and conduction of electrical impulse through the myocardium (Chen-Izu et al., 2015). While most Nav channels undergo rapid activation and inactivation to generate the peak Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>), a tiny fraction (~0.5%) of channels remains open, leaving a small persistent Na<sup>+</sup> influx, known as the late Na<sup>+</sup> current (I<sub>NaL</sub>), which critically contributes to determining action potential duration. In ventricular cardiomyocytes, Nav channels are composed primarily of the Nav1.5 channel pore-forming subunit, which critically functions in macromolecular protein complexes. As such, these channels are tightly embedded within local signaling domains, in which they are dynamically regulated by a rich repertoire of accessory proteins and post-translational modifications (PTMs) (Marionneau and Abriel, 2015). Defects in Nav1.5 channel functioning and/or regulation by these components underlie diverse forms of inherited or acquired cardiac arrhythmias. Impaired inactivation of Nav1.5 channels, notably, leads to alterations in channel availability and/or enhances I<sub>NaL</sub>, that can cause severe arrhythmias, including long QT syndrome 3, Brugada syndrome or conduction slowing. Leveraging the endogenous regulatory mechanisms of Nav1.5 channels is therefore essential to decipher arrhythmogenic Nav current defects. Several recent studies in the laboratory demonstrated that the cardiac Nav1.5 protein is highly phosphorylated, and that phosphorylation-dependent regulation of Nav1.5 channels is critical in regulating the expression or functioning of the channel, as well as interactions with accessory proteins (Marionneau et al., 2012; Lorenzini et al., 2021). This is the case for example of serines 1933 and 1984 in the C-terminal domain of Nav1.5, which regulate the interaction with the Fibroblast growth factor Homologous Factor 2 (FHF2) and calmodulin, and associated channel inactivation properties (Burel et al., 2017). While numerous phosphorylation sites have been identified on the Nav1.5 protein, phosphorylation of the other channel complex components and the impact of these modifications on Nav1.5 channel expression or properties remains unappreciated.

A promising pool from which such regulation by phosphorylation may be found is the FHF accessory proteins. FHF proteins have emerged as pivotal players in controlling the inactivation properties of cardiac Nav1.5 channels, tuning both channel availability (Wang et al., 2011a; Park et al., 2016; Wang et al., 2017; Santucci et al., 2022) and I<sub>NaL</sub> (Abrams et al., 2020; Gade et al., 2020; Chakouri et al., 2022).

The FHF family comprises four members (FHF1=FGF12, FHF2=FGF13, FHF3=FGF11, and FHF4=FGF14), and further family diversity is achieved through the generation of several alternatively spliced isoforms highly diverging from their N-amino termini (Munoz-Sanjuan et al., 2000). FHF s are small intracellular proteins interacting directly with the membrane proximal portion of the C-terminal domain of Nav channels through their common FGF homology core domain in a 1:1 stoichiometry (Goetz et al., 2009; Wang et al., 2011b). The structural basis by which FHF s regulate Nav channels emerged in 2012 with the crystal structure of the ternary complex formed by a Nav C-terminal domain, a FHF and Ca<sup>2+</sup>-free calmodulin (Wang et al., 2012), and was more recently determined by solving the cryo-electron microscopy structure of human Nav1.5 (Gade et al., 2020). The different FHF isoforms demonstrate species-, age-, tissue- and subcellular-specific expression patterns, and affect Nav channel properties distinctively (Yang et al., 2016). In addition to their broad distribution in the nervous system, the FHF isoforms are prominently expressed in the mammalian heart. While FHF2-VY is the predominant FHF isoform in mouse ventricles, with FHF2 knockout or knockdown mice displaying severe conduction slowing (Wang et al., 2011a; Park et al., 2016; Wang et al., 2017), FHF1-B is preponderant in human hearts (Santucci et al., 2022), and has been linked to inherited arrhythmias including Brugada syndrome (Hennessey et al., 2013), long QT syndrome 3 (Liu et al., 2003), idiopathic ventricular tachycardia (Li et al., 2017), and atrial and ventricular arrhythmias with sudden cardiac death (Musa et al., 2015). In addition to its ascribed function in regulating Nav channel inactivation properties, some studies have demonstrated that FHF2 also participates in regulating the surface expression of Nav1.5 channels in cardiomyocytes (Wang et al., 2011a; Hennessey et al., 2013; Wang et al., 2017), in a way that may be reminiscent of the well-recognized role of FHF4 in concentrating neuronal Nav channels to axon initial segments and nodes of Ranvier (Goetz et al., 2009; Wang et al., 2011b).

Evidence for the role of phosphorylation in regulating FHF-dependent regulation of Nav channels has mostly been provided in neuroscience studies, driven in large part by the identification of kinases that regulate the FHF-Nav channel interface. Specifically, phosphorylation of neuronal Nav channels by Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Shavkunov et al., 2013; James et al., 2015; Hsu et al., 2017), protein kinase CK2 (Hsu et al., 2016), Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein Kinase II (CaMKII) (Wildburger et al., 2015), as well as the tyrosine kinase Janus Kinase 2 (JAK2) (Wadsworth

et al., 2020) has been demonstrated to promote binding of FHF proteins to Nav channels and associated FHF-mediated channel regulation.

In this study, we investigated the pattern of phosphorylation of native mouse left ventricular FHF2 and the roles of identified FHF2 phosphorylation sites in regulating the cardiac  $I_{Na}$  current. Furthermore, by comparing the distinct consequences of FHF2 knockdown and rescue in ventricular cardiomyocytes isolated from neonatal and adult mice, as well as the FHF2 isoform expression profile, we sought to determine the differential representation and functions of FHF2 isoforms in regulating neonatal and adult mouse ventricular Nav1.5 channels.

## Results

### Identification and stoichiometry of nine native FHF2 phosphorylation sites from mouse left ventricular Nav channel complexes

The identification of the FHF2 protein from mouse left ventricles was obtained from the mass spectrometric analysis of mouse left ventricular Nav channel complexes purified by immunoprecipitation (IP) using an anti-NavPAN mouse monoclonal ( $\alpha$ NavPAN) antibody as previously described (Lorenzini et al., 2021). Among the 52 unique (169 total) FHF peptides detected in the  $\alpha$ NavPAN-IPs, 38 (117 total) peptides were specific for FHF2 and conserved across the five FHF2 isoforms (**Figure 1A & Table Supplement 1**). While 8 additional unique (25 total) peptides located in the alternatively spliced N-terminus of the FHF2-VY isoform and 4 unique (24 total) peptides common to the FHF2-VY and FHF2-Y N-termini could be discriminated, no peptides specific for the three other FHF2 isoforms (FHF2-V, FHF2-A and FHF2-B) were detected. Hence, as highlighted in yellow in **Figure 1A**, 84 % of the FHF2-VY amino acid sequence was covered by mass spectrometry, representing most of the protein sequence. In addition to FHF2 peptides, sole one peptide specific for, and common to FHF1 and FHF4 sequences was identified. Altogether, these observations confirm that FHF2-VY is the predominant FHF isoform in mouse left ventricular Nav1.5 channel complexes, and suggest minor representations of FHF2-Y, FHF1 and/or FHF4 isoforms.

Among these 166 total FHF2 peptides, 62 peptides were phosphorylated at single or double positions, which represents more than a third of detected FHF2 peptides (**Table 1 & Table Supplement**

1). The annotation of MS/MS spectra obtained for each phosphopeptide allowed the unambiguous identification of nine phosphorylation sites on the FHF2 protein at positions S35, S38, S218, S230, T232, S238, S240, S250 and T255 (**Figure 1A**). **Table 1** lists the phosphopeptides enabling the best phosphorylation site assignment(s) for each phosphorylation site. The identification of the two N-terminal phosphorylation sites at positions S35 and S38 arises from 2 (6 total) phosphopeptides specific for FHF2-VY and 3 (16 total) phosphopeptides common to FHF2-VY and FHF2-Y, suggesting that these N-terminal phosphosites are localized on the most represented ventricular FHF2-VY isoform. Interestingly, the phosphorylation site at position S218 is conserved across all mouse FHF (1-4) isoforms, as well as the human FHF1-A and FHF1-B isoforms, while the six C-terminal FHF2 phosphorylation sites are specific for the mouse FHF2 isoforms. It is also interesting to note that, excluding S218, these phosphosites are clustered by two, which may indicate concomitant phosphorylation and involvement in a shared regulation.

Concordantly to the large number of detected phosphorylated, compared to non-phosphorylated, FHF2 peptides, further label-free quantitative analysis of the areas of extracted MS1 peptide ion chromatograms demonstrated a greater relative abundance of phosphorylated FHF2 peptides (summed area=1.6E+09 AU), compared to non-phosphorylated FHF2 peptides (summed area=1.5E+08 AU, **Figure 1B**). This analysis also revealed large differences in the relative abundance of individual FHF2 phosphopeptides. While phosphorylation at position S218 is the most abundant (area=1.4E+09 AU), followed by phosphorylation at S35-38 (area=2.0E+08 AU), phosphorylation at the six C-terminal sites at positions S250-255 (area=1.6E+07 AU), S230-232 (area=5.9E+06 AU) and S238-240 (area=1.6E+06 AU) is less represented. Noteworthy, the phosphorylated peptides assigning S35-38, S218 and S230-232 are more abundant than their non-phosphorylated counterparts, suggesting that these sites are mostly phosphorylated in mouse left ventricular Nav1.5 channel complexes. Taken together, these quantitative phosphoproteomic analyses identified nine phosphorylation sites on FHF2-VY from mouse left ventricular Nav1.5 channel complexes, among which one site at position S218 is conserved across FHF isoforms and species, and three sites at positions S35, S38 and S218 are heavily phosphorylated in mouse left ventricles.

## **FHF2 knockdown and rescue in neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes**

In order to investigate the roles of newly-identified FHF2 phosphorylation sites in regulating the expression and/or function of the cardiac Nav1.5 channels, two models were developed in freshly isolated neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes, and the voltage-gated Na<sup>+</sup> currents were analyzed by whole-cell voltage-clamp recordings. Neonatal ventricular cardiomyocytes were isolated from wild-type (WT) mouse pups, and adult ventricular cardiomyocytes were isolated from cardiac specific FHF2-knockdown (FHF2-KD) or control FHF2-lox adult mice (Angsutararux et al., Under revision for resubmission). The knockdown of FHF2 expression in neonatal WT cardiomyocytes was obtained in culture using FHF2 shRNA-expressing adenoviruses, and was compared directly to cardiomyocytes exposed to adenoviruses expressing control shRNA. The expression of FHF2 in both neonatal and adult cardiomyocytes was then rescued using adenoviruses expressing the FHF2-VY isoform, which is the predominant FHF isoform expressed in adult mouse left ventricles (Wang et al., 2011a), in its WT, phosphosilent or phosphomimetic forms at specific site(s). Note that the human FHF2-VY cDNA sequence was used in these rescue experiments as it only differs from one amino acid (leucine 146) compared to the mouse sequence (histidine 146). With the exception of the S218 phosphosite which was mutated individually, all the other FHF2 phosphosites were mutated and analyzed by clusters of two (35-38, 230-232, 238-240 and 250-255) as indicated by the black boxes in **Figure 1A**. In the phosphosilent constructs, mutations were introduced to replace serine(s)/threonine(s) (S/T) with alanines (A), whereas in the phosphomimetic constructs, mutations were introduced to substitute glutamate(s) (E) for serine(s)/threonine(s), to mimic phosphorylation. An additional adenovirus expressing FHF2-VY phosphosilent at the nine identified sites (FHF2-VY-9A) was also generated and used as a rescue.

Quantitative RT-PCR analyses of the four FHF genes and the five FHF2 isoforms (FHF2-VY, -V, -Y, -A and -B) as well as FHF2 western blot analyses were performed to verify the specific knockdown and rescue of FHF2 in the two cardiomyocyte models. As illustrated in **Figure 2A**, the application of FHF2 shRNA-expressing adenoviruses on neonatal mouse ventricular cardiomyocytes allowed ~90% knockdown of the transcripts encoding the FHF2-VY, FHF2-V and FHF2-A isoforms ( $p < 0.0001$ ), whereas no significant changes in the expression of FHF1, FHF2-Y and FHF4 transcripts

were obtained. Consistent with previous reports (Wang et al., 2011a), the transcript expression of the FHF2-B and FHF3 isoforms were not detected in neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes (data not shown). Accordingly, western blot analyses showed 99% knockdown in FHF2 protein expression ( $p < 0.01$ ) in FHF2, compared to control, shRNA-treated cardiomyocytes (**Figures 2C & 2D**). A similar knockdown in FHF2 protein expression was reached in ventricular cardiomyocytes isolated from FHF2-KD, compared to FHF2-lox, adult mice (**Figure 2F**). The expression of FHF2 was then rescued simultaneously using adenoviruses expressing the human FHF2-VY isoform in its WT, phosphosilent or phosphomimetic forms. The results from quantitative RT-PCR analyses showed that the transcript expression of the rescued human FHF2-VY constructs is in average 2- to 3-fold greater than the endogenous mouse FHF2 transcript expression (**Figure 2B**). No direct comparison of the endogenous mouse and rescued human FHF2 protein expression could be performed because the anti-FHF2 antibodies used only allowed the specific and exclusive detection of the mouse or the human FHF2 proteins (data not shown). Additionally, although the averaged rescued FHF2-VY transcript expression varied between the different adenovirus constructs, from 1.7- (for FHF2-VY-250-255E) to 5.4- (for FHF2-VY-35-38E) fold the level of endogenous FHF2-VY expression (**Figure 2B**), no significant differences in expression were observed between the WT and the different phosphosilent or phosphomimetic FHF2-VY rescued proteins (**Figure 2G**), suggesting that the observed differences in rescued transcript expression are inherent to experimental variability. Unexpectedly, however, the FHF2-VY-9A rescue demonstrated a substantial increase in transcript (8.6-fold, **Figure 2B**) and protein (3-fold, **Figure 2E**) expression, compared with the other WT or phosphomutant FHF2 adenoviral constructs, an observation that was also apparent when transfected using a plasmid vector in heterologous expression system (data not shown). Altogether, therefore, these molecular analyses validated our ability to manipulate the expression of endogenous and rescued FHF2 proteins, and thus, the possibility to examine the effects of FHF2 phosphorylation using phosphosilent or phosphomimetic FHF2-VY constructs in both neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes.

### **Regulation of Nav<sub>v</sub>1.5 channels by FHF2 knockdown and rescue in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes**



The density, voltage-dependence and kinetic properties of voltage-gated Na<sup>+</sup> (Nav) currents (I<sub>Na</sub>) following the knockdown and rescue of FHF2 were evaluated in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes 48 hours after adenoviral infection using whole-cell voltage-clamp analyses. As illustrated in **Figure 3B**, and consistent with previous studies in other cardiomyocyte models (Wang et al., 2011a; Hennessey et al., 2013; Park et al., 2016; Wang et al., 2017; Santucci et al., 2022), these analyses showed that the knockdown of FHF2 significantly ( $p < 0.0001$ ) shifts the voltage-dependence of steady-state I<sub>Na</sub> inactivation towards hyperpolarized potentials, compared to cardiomyocytes exposed to control shRNA-expressing adenoviruses (see distributions at -10 mV, detailed properties and statistics in **Figure 4B & Table 2**). Consistent with this effect on channel inactivation from closed state, an acceleration of the kinetics of inactivation from open state was also observed upon FHF2 knockdown (**Figures 3A & 3E**), with a significant ( $p < 0.001$ ) decrease in the time constant of fast inactivation ( $\tau_{fast}$ , **Figures 3F & 4D**) and an increase ( $p < 0.01$ ) in the proportion of fast to slow inactivation components ( $A_{fast}/A_{slow}$ , **Figures 3H & 4F**). No significant differences in the time constant of slow inactivation ( $\tau_{slow}$ , **Figures 3G & 4E**), peak I<sub>Na</sub> density (**Figures 3A, 3D & 4C**), time to peak I<sub>Na</sub>, or time for recovery from inactivation were observed upon FHF2 knockdown (**Table 2**). Interestingly, these analyses also revealed for the first time that the knockdown of FHF2 induces a significant ( $p < 0.001$ ) shift in the voltage-dependence of channel activation towards hyperpolarized potentials (**Figures 3C, 4A & Table 2**). Noteworthy, while the rescue of FHF2 expression with the WT FHF2-VY isoform partially, but significantly restored the Nav channel inactivation properties from both closed (**Figures 3B, 4B & Table 2**) and open (**Figures 3A, 3E, 3F, 3H, 4D, 4F & Table 2**) states, no rescue of the activation properties was obtained (**Figures 3C, 4A & Table 2**). Together, therefore, these electrophysiological analyses suggest that an additional FHF2 isoform contributes, with FHF2-VY, to the regulation of both the activation and inactivation properties of neonatal mouse ventricular Nav1.5 channels.

To decipher the roles of the newly-identified FHF2 phosphorylation sites in regulating the cardiac Nav1.5 channels, the expression of FHF2 was then rescued in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes with the different FHF2-VY phosphomutant adenoviruses, and I<sub>Na</sub> properties and densities were compared to those obtained with the WT FHF2-VY rescue. Importantly, the phosphosilent and phosphomimetic constructs for each phosphosite subgroup were compared directly

to the WT FHF2-VY rescue obtained on the same days of patch-clamp analyses, and for the sake of clarity, a single representative subset of this later condition was chosen and presented in **Figure 4** and **Table 2**. To our surprise, however, no significant differences in the voltage-dependence, kinetic properties or peak  $I_{Na}$  densities were obtained for any of the ten phosphosilent or phosphomimetic FHF2-VY constructs, compared to the WT FHF2-VY rescue. A FHF2-VY construct phosphosilent at the nine identified phosphorylation sites was thus generated, but did not allow either detecting any significant changes in  $I_{Na}$  properties or density, compared to the WT FHF2-VY rescue. Together, therefore, no roles for the newly-identified FHF2 phosphorylation sites in regulating neonatal mouse ventricular  $Na_v1.5$  channels could be revealed, notwithstanding the multiple subgroup mutations tested. Interestingly, however, these electrophysiological analyses demonstrate for the first time that, in addition to their recognized function in regulating  $Na_v1.5$  channel inactivation properties, the FHF2 isoforms also regulate the voltage-dependence of  $Na_v1.5$  channel activation in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes.

### **Regulation of $Na_v1.5$ channels by FHF2 knockdown and rescue in adult mouse ventricular cardiomyocytes**

One possibility accounting for the absence of differences in the rescues of  $I_{Na}$  properties with the different phosphomutant, compared to WT, FHF2-VY constructs in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes could arise from the fact that the FHF2 phosphorylation sites were identified from adult mouse left ventricles, which may differ from the FHF2 phosphorylation sites and/or the overall  $Na_v1.5$  channel complex and regulation involved in neonatal cardiomyocytes. In this respect, therefore, the same electrophysiological analyses were designed in ventricular cardiomyocytes isolated from FHF2-KD (and control FHF2-lox) adult mice (Angsutararux et al., Under revision for resubmission), 48 hours following culture and infection with the different phosphomutant (or WT) FHF2-VY adenoviruses. Similar to findings obtained in neonatal cardiomyocytes, as well as in adult cardiomyocytes isolated from the same mouse lines in the Silva laboratory (Angsutararux et al., Under revision for resubmission), the knockdown of FHF2 in adult mouse ventricular cardiomyocytes significantly increases the rate of  $Na_v$  channel inactivation from both closed (**Figure 5B**) and open (**Figures 5A & 5E**) states. Hence, the

membrane potential of half-inactivation ( $V_{1/2}$ , **Figures 5B & 6B**), the time constant of fast inactivation ( $\tau_{fast}$ , **Figures 5F & 6D**), and the proportion of fast to slow inactivation components ( $A_{fast}/A_{slow}$ , **Figures 5H & 6F**) were significantly ( $p < 0.0001$ ) changed between FHF2-KD and FHF2-lox cardiomyocytes (see distributions at -20 mV, detailed properties and statistics in **Figure 6 & Table 3**). However, contrary to findings obtained in neonatal cardiomyocytes, these analyses demonstrated the exclusive role of the FHF2-VY isoform in these effects in adult cardiomyocytes as all the  $Na_v$  channel inactivation properties changed with the FHF2 knockdown were completely restored by the WT FHF2-VY isoform. Additionally, the voltage-dependence of  $Na_v$  channel activation was not regulated by the knockdown or rescue of FHF2 expression (**Figures 5C & 6A**), which is consistent with the sole involvement of the FHF2-VY isoform in regulating  $Na_v1.5$  channels in these cells. Interestingly, however, the rescue of FHF2 expression with the WT FHF2-VY isoform significantly ( $p < 0.0001$ ) increases the density of the peak  $Na^+$  current, while no changes were observed in FHF2-KD, compared to FHF2-lox, cardiomyocytes (**Figures 5A, 5D, 6C & Table 3**).

The roles of FHF2 phosphorylation sites were then explored in this adult mouse ventricular cardiomyocyte model using the different phosphosilent or phosphomimetic FHF2-VY adenoviruses. Similar to results obtained in neonatal cardiomyocytes, however, we were unable to detect any significant differences in  $I_{Na}$  densities or properties between the different phosphomutant and the WT adenoviral rescues, including with the FHF2-VY-9A rescue (**Figure 6 & Table 3**), preventing to identify any roles for FHF2 phosphorylation sites in regulating  $Na_v1.5$  channels.

Because it was previously shown that FHF2 also plays a crucial role in regulating the late  $Na^+$  current ( $I_{NaL}$ ) (Abrams et al., 2020; Gade et al., 2020; Chakouri et al., 2022), additional voltage-clamp experiments were designed to investigate whether the simultaneous mutation of the nine identified FHF2 phosphorylation sites to alanine, using the FHF2-VY-9A phosphomutant rescue, affects the density of TTX-sensitive  $I_{NaL}$  in adult mouse ventricular cardiomyocytes. In accordance with previous studies, these analyses demonstrated that the averaged  $I_{NaL}$  density is significantly ( $p < 0.05$ ) increased in FHF2-KD, compared to FHF2-lox, cardiomyocytes (**Table 4**). Similar to the other  $Na_v$  current inactivation properties, however, comparable rescues in  $I_{NaL}$  density were obtained with the FHF2-VY-WT and FHF2-VY-9A adenoviruses.

Together with the electrophysiological findings in neonatal cardiomyocytes, therefore, these analyses demonstrate the exclusive role of the FHF2-VY isoform in regulating the Nav1.5 channel inactivation properties from closed and open states in adult mouse ventricular cardiomyocytes, and suggest the involvement of an additional FHF2 isoform in regulating both the activation and inactivation properties of Nav1.5 channels in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. Unexpectedly, however, no roles for the newly-identified FHF2 phosphorylation sites could be identified in the regulation of either neonatal or adult cardiac Nav1.5 channels.

### **Differential transcript and protein expression of FHF2 isoforms in neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes**

In order to investigate the possible differences that could impart the observed distinctive effects of FHF2 knockdown and rescue on neonatal and adult ventricular Nav1.5 channels, further experiments were undertaken to examine the expression of the various FHF2 isoforms in freshly isolated neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes. Quantitative RT-PCR analyses using isoform-specific primers demonstrated a greater ( $p < 0.01$ ) expression of the FHF2-VY isoform in adult, compared to neonatal, cardiomyocytes (**Figure 2H**). Conversely, and of potential interest in the differential regulation of neonatal Nav1.5 channels, a significant ( $p < 0.01$ ) higher expression of the FHF2-Y and FHF2-A isoforms was measured in neonatal, compared to adult, cardiomyocytes. Although direct comparison of relative expression of different transcripts could not reliably be achieved using the employed relative quantitative RT-PCR method, it is interesting to underscore that the FHF2-VY isoform is ~10-fold more abundant than the three other FHF2 isoforms combined in adult cardiomyocytes, a result consistent with the exclusive mass spectrometric identification of peptides specific for the FHF2-VY (or FHF2-Y) N-terminus (**Figure 1A and Table Supplement 1**). In neonatal cardiomyocytes, however, the expression levels of the FHF2-VY and FHF2-A isoforms are similar and ~6- to ~30-fold greater than FHF2-V and FHF2-Y, respectively (**Figure 2H**). Remember here, nonetheless, that the FHF2-Y isoform is not of interest in the context of the mechanisms explored in the present electrophysiological analyses from neonatal cardiomyocytes as the expression of this particular isoform is not modulated by the FHF2 knockdown in these cells (**Figure 2A**). These findings thus leave

the FHF2-A isoform as the sole potential FHF2 candidate responsible for the differential FHF2-dependent regulation of neonatal, compared to adult, Nav1.5 channels. Consistent with these findings in transcript expression, the use of an antibody specific for the FHF2-A isoform in western blot analyses demonstrated that FHF2-A is expressed in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes, whereas no expression could be detected in adult mouse ventricular cardiomyocytes (**Figure 2I**). Together with the electrophysiological and mass spectrometric findings, therefore, these molecular analyses suggest that the FHF2-dependent regulation of Nav1.5 channels in adult mouse ventricular cardiomyocytes is exclusively mediated by the FHF2-VY isoform, while the FHF2-VY and FHF2-A isoforms share the regulation of neonatal Nav1.5 channels.

## **Discussion**

The results presented here provide the first phosphorylation map of the FHF2 protein isolated from native mouse left ventricular Nav1.5 channel complexes. Although no functional roles for the nine newly-identified FHF2 phosphorylation sites in the regulation of the expression or gating properties of Nav1.5-encoded channels could be recognized in the present study, the use of two distinct ventricular cardiomyocyte models from neonatal and adult mice revealed a differential FHF2-dependent regulation of Nav1.5 channels through the developing and adult mouse hearts. While the FHF2-VY isoform appears to be the sole FHF2 isoform involved in regulating the inactivation properties of Nav1.5 channels in adult mouse ventricular cardiomyocytes, our findings concur to the suggestion that both the FHF2-VY and FHF2-A isoforms share the regulation of Nav1.5 channel inactivation and activation properties in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes.

### **Expression and representation of FHF2 isoforms in Nav1.5 channel complexes in neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes**

Consistent with previous studies (Wang et al., 2011a), our mass spectrometric and transcript expression analyses confirmed that, out of the 4 FHF genes and the five distinct FHF2 isoforms generated by N-amino terminus alternative splicing (FHF2-VY, -V, -Y, -A and -B) reported before (Munoz-Sanjuan et al., 2000), the expression of the FHF2-VY isoform is preponderant in adult mouse ventricular cardiomyocytes, while the FHF2-B and FHF3 isoforms are not detected in either neonatal or

adult mouse ventricular cardiomyocytes. Additionally, the present transcript expression findings are consistent with a differential expression of the FHF2 isoforms through the developing and adult mouse hearts, with adult mouse ventricular cardiomyocytes expressing mainly the FHF2-VY isoform, and neonatal cardiomyocytes bearing both FHF2-VY and FHF2-A. Importantly, the differential transcript expression profile of the FHF2-A isoform observed in neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes was confirmed at the protein level by western blot showing specific or no FHF2-A bands in neonatal and adult samples, respectively. Altogether, therefore, these expression analyses using different technical approaches suggest that FHF2-VY is the unique FHF isoform represented in adult mouse ventricular Nav1.5 channel complexes, while the neonatal Nav1.5 channel complexes comprise both the FHF2-VY and FHF2-A isoforms.

#### **Proteomic and functional mapping of mouse left ventricular FHF2-VY phosphorylation sites**

The present phosphoproteomic analysis confidently identified a total of nine novel native phosphorylation sites in the FHF2 protein purified from adult mouse left ventricular Nav1.5 channel complexes. Three of these sites, at positions S35, S38 and S218 are heavily phosphorylated in mouse left ventricles. Interestingly, the S218 phosphosite is conserved across all FHF isoforms and species, while the two N-terminal phosphosites at positions S35 and S38 are specific for FHF2-VY and FHF2-Y. Having established that the transcript expression level of the FHF2-VY isoform is predominant in adult mouse ventricular cardiomyocytes, especially compared to the much lower expression of FHF2-Y, these two N-terminal phosphosites have most likely been detected from the FHF2-VY isoform. In contrast, the six other, C-terminal FHF2 sites, at positions S230, T232, S238, S240, S250 and T255 are common to the five FHF2 isoforms, are less abundantly phosphorylated, and show a much lower stoichiometry compared to the N-terminal and S218 phosphosites. The simplest interpretation of these differences in phosphosite abundance and stoichiometry is that the first group may contribute to the basal FHF2-dependent regulatory mechanisms of cardiac Nav1.5 channels, while the later may participate in more local or temporary roles. While the Laezza group identified three phosphoserines on FHF4, at positions S226, S228 and S230 (Hsu et al., 2016; Hsu et al., 2017), no alignment of these three

phosphoserines with the newly-identified FHF2 phosphoserines here could be obtained as the surrounding amino acid sequences are not conserved (**Figure 1A**). Additionally, while phosphorylation at Y158 was previously identified in FHF4 using *in silico* and *in vitro* analyses (Wadsworth et al., 2020), no phosphorylation was detected at the corresponding conserved FHF2 tyrosine in the present mass spectrometric analysis, likely reflecting the distinctly low level of tyrosine phosphorylation compared with phosphoserines and phosphothreonines, and/or differences in the *in situ* and *in silico/in vitro* approaches used.

With the exception of the S218 phosphosite which is more isolated in the FHF2 amino acid primary sequence, the distribution of phosphosites by clusters of two led us to investigate the functional roles of these sites by four clusters of two phosphosilent or phosphomimetic mutations (35-38, 230-232, 238-240 and 250-255). To our surprise, however, no differential effects in the regulation of Nav<sub>v</sub>1.5 channel expression or biophysical properties could be revealed with the different phosphomutant, compared to WT, FHF2-VY rescues in both neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocyte models. A complete phosphosilent FHF2-VY construct in which the nine phosphosites were mutated to alanine (FHF2-VY-9A) was therefore generated, but did not allow either revealing any roles for FHF2 phosphorylation in regulating cardiac Nav<sub>v</sub>1.5 channels. Although the reasons for this absence of positive findings are uncertain, especially for the FHF2-VY-9A phosphosilent mutant, three possible and non-exclusive scenarios could be incriminated. The regulation of Nav<sub>v</sub>1.5 by phosphorylation of FHF2 could depend, as for the regulation of many protein interactions, on two distinct, direct or allosteric mechanisms. The most plausible reason, involving the more direct mechanism, may be linked to the supra-physiological levels of rescued FHF2 proteins (in average 2- to 3-fold, and 9-fold greater for FHF2-VY-9A, compared to endogenous FHF2), which may compensate for a potential loss in FHF2 interaction with the channel. Another, likely reason may be associated with the combinations of phosphosite mutations tested, which may not reflect the exact combinations of sites involved in specific channel regulations. Last, but not least, these two cardiomyocyte models, although native, may be missing some *sine qua none* molecular details involved in specific FHF2-dependent regulations, such as the activation of particular signaling pathways or kinases, therefore preventing engagement of analyzed phosphosites in specific regulatory mechanisms. Similarly, additional FHF2 phosphosites may

have been lost during sample preparation and therefore not detected by mass spectrometry, which may have cancelled the occurrence of regulatory mechanisms. Although unfortunate, it is likely, however, based on the great number, abundance and/or stoichiometry of identified native FHF2 phosphosites, as well as on the previously recognized roles of phosphorylation in regulating FHF4-Nav interaction and neuronal Nav channel function (Shavkunov et al., 2013; James et al., 2015; Wildburger et al., 2015; Hsu et al., 2016; Hsu et al., 2017; Wadsworth et al., 2020), that the phosphorylation of FHF2 does play specific roles in regulating cardiac Nav1.5 channel physiology. Altogether, these notwithstanding results demonstrate that native mouse left ventricular FHF2-VY is highly phosphorylated at nine specific sites, and that the regulation of Nav1.5-encoded channels by FHF2 phosphorylation most certainly contributes to variable Nav1.5 expressivity in a highly complex manner. Further different approaches, therefore, taking the present study limitations into account, must warrant future investigations.

#### **FHF2 affects cardiac Nav current properties and density in an age-specific manner**

The study took advantage of the use of two distinct ventricular cardiomyocyte models, respectively from neonatal and adult mice, to explore the extent to which the diversity and differential expression of FHF2 isoforms may distinctly participate in the regulation of Nav1.5 channels through the developing and adult mouse hearts. In agreement with previous studies (Wang et al., 2011a; Park et al., 2016; Wang et al., 2017; Santucci et al., 2022), the effects of FHF2 knockdown and rescue on Nav current properties herein observed demonstrate that the FHF2-VY isoform is preponderant, not to say the sole FHF2 isoform involved in regulating the Nav1.5 channel inactivation properties, facilitating inactivation from both closed and open states, in adult mouse ventricular cardiomyocytes. The present study also confirms the role of FHF2-VY in decreasing the late Na<sup>+</sup> current in adult mouse ventricular cardiomyocytes. A differential regulation schema, however, implying not only the inactivation, but also the activation properties was observed in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. Based on differences in FHF2 isoform expression patterns in neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes, it is tempting to speculate that both FHF2-VY and FHF2-A isoforms participate in the regulation of neonatal Nav1.5 channels. This conclusion, nonetheless, cannot be definitive as other differences may also exist and explain this differential regulation. It is possible, for example, that FHF2-



VY does not exert the same effects on neonatal and adult Nav1.5 channel isoforms (Onkal et al., 2008). Alternatively, the FHF2 knockdown in neonatal cardiomyocytes may change some other channel regulatory components that are differential and therefore affect channel functioning differently compared to adult cells. Whichever schema involved, these studies lead to the conclusion that the FHF2 isoforms are robust cellular factors in controlling the inactivation properties of Nav1.5 channels in both neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes, whereas their role in regulating channel activation in neonatal cardiomyocytes, whether in a direct or indirect manner, would rather be secondary compared to more prevalent cellular factors. Although the diversity of the roles of the FHF2 isoforms, including FHF2-A, in regulating Nav channels has previously been queried in several heterologous expression systems, as well as in dorsal root ganglion neurons or derived cells, no specific roles for FHF2-A have been attributed in the regulation of Nav channel activation (Rush et al., 2006; Yang et al., 2016; Efferaim et al., 2019). The most consistent finding from these studies demonstrated that FHF2-A hastens the rate of Nav channel entry into the slow inactivation state and induces a dramatic slowing of recovery from inactivation, resulting in a large current decrease upon repetitive stimulations at both low and high frequencies. Together with these previous studies, therefore, the present findings suggest that this newly-identified function for FHF2-A in regulating the voltage-dependence of Nav channel activation is most likely specific to the regulation of neonatal mouse ventricular Nav1.5 channels.

Another difference between neonatal and adult cardiomyocytes in the FHF2-dependent regulation of Nav1.5 channels concerns the increase in peak Na<sup>+</sup> current density observed upon the FHF2 rescue in adult mouse ventricular cardiomyocytes. This finding is in a way surprising because no concordant decreased current was observed upon the FHF2 knockdown, in neither cardiomyocyte models, but is nonetheless consistent with previous studies reporting a role for FHF2 in regulating the cell surface expression of Nav1.5 channels (Wang et al., 2011a; Hennessey et al., 2013; Yang et al., 2016; Wang et al., 2017). In the context of the present interpretation, it is important to stress here that the expression of the rescued FHF2-VY isoforms is 2- to 3-fold greater, compared to endogenous FHF2 expression level, which may bring, by mass action, more channels to the cell surface, and therefore increase the peak Na<sup>+</sup> current. Therefore, although not congruent in the literature, this novel

demonstration does infer a role for FHF2-VY in the regulation of cardiac Nav1.5 channel cell surface expression.

In summary, our data demonstrate that ventricular FHF2 is highly phosphorylated at specific sites, and that the two main mouse ventricular FHF2 isoforms are key Nav1.5 channel regulatory proteins that influence membrane excitability through age- and cell environment-specific mechanisms. These novel demonstrations add to the overall suggestion that a complex and specific orchestration of regulation contributes to variable Nav1.5 expression and function in distinct channel complexes and contexts, and give rise to the unappreciated roles of post-translational modifications and isoform diversity in providing bases for physiological or pathological differences in Na<sup>+</sup> current.

## **Materials and methods**

### **Statement on the use of murine tissue**

All investigations conformed to directive 2010/63/EU of the European Parliament, to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1985) and to local institutional guidelines.

### **Immunoprecipitation of Nav channel complexes**

Immunoprecipitation (IP) of Nav channel complexes from mouse left ventricles was performed as described previously (Lorenzini et al., 2021). Briefly, flash-frozen left ventricles from 13-weeks-old male C57/BL6J wild-type (WT) mice were homogenized individually in ice-cold lysis buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% amidosulfobetaine, 1X complete protease inhibitor cocktail tablet, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.7 µg/ml pepstatin A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and 1X Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). All reagents were from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) unless otherwise noted. After 15-minutes rotation at 4°C, 8 mg of the soluble protein fractions were pre-cleared with 200 µL of protein G-magnetic Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) for 1 hour, and subsequently used for IP with 48 µg of an anti-NavPAN mouse monoclonal antibody (mαNavPAN, Sigma-Aldrich, #S8809), raised against the SP19 epitope (Vassilev et al., 1988) located in the third intracellular linker loop and common to all Nav channel pore-forming subunits. Prior to the IP, antibodies were cross-linked to 200 µl of protein G-magnetic Dynabeads using 20 mM dimethyl pimelimidate (Thermo Fisher Scientific) (Schneider et al., 1982). Protein samples and antibody-coupled beads were mixed for 2 hours at 4°C. Magnetic beads were then collected, washed rapidly four times with ice-cold lysis buffer, and isolated protein complexes were eluted from the beads in 1X SDS sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at 60°C for 10 minutes. Ninety-nine percent of the immunoprecipitated mouse left ventricular Nav channel protein complexes were analyzed by MS, and the remaining one percent was used to verify Nav1.5 IP yields by western blotting.

## Peptide preparation and isobaric labeling for LC-MS

The tryptic peptides from mouse left ventricular Na<sub>v</sub> channel complexes were generated and labeled as described previously (Lorenzini et al., 2021). Briefly, the IP eluates were thawed on ice, reduced, and denatured by heating for 10 min at 95°C. The Cys residues were alkylated with iodoacetamide (10 mM) for 45 min at room temperature in the dark. The peptides were prepared using a modification (Erde et al., 2014) of the filter-aided sample preparation method (Wisniewski et al., 2009). After the addition of 300 µL of 100 mM Tris buffer (pH 8.5) containing 8 M urea (UT) and vortexing, the samples were transferred to YM-30 filter units (Millipore, MRCF0R030) and spun for 14 min at 10,000 rcf (Eppendorf, Model No. 5424). The filters were washed with 200 µl of UT buffer, and the spin-wash cycle was repeated twice. The samples were then exchanged into digest buffer with the addition of 200 µL of 50 mM Tris buffer, pH 8.0, followed by centrifugation (10,000 rcf for 10 min). After transferring the upper filter units to new collection tubes, 80 µL of digest buffer was added, and the samples were digested with trypsin (1 µg) for 4 h at 37°C. The digestion was continued overnight after adding another aliquot of trypsin. The filter units were then spun for 10 min (10,000 rcf) in an Eppendorf microcentrifuge. The filter was washed with 50 µL of Tris buffer (100 mM, pH 8.0), followed by centrifugation. The digests were extracted three times with 1 ml of ethyl acetate, and acidified to 1% trifluoroacetic acid (TFA) using a 50% aqueous solution. The pH was < 2.0 by checking with pH paper. The solid phase extraction of the peptides was performed using porous graphite carbon micro-tips (Chen et al., 2012). The peptides were eluted with 60% acetonitrile in 0.1% TFA, and pooled for drying in a Speed-Vac (Thermo Fisher Scientific, Model No. Savant DNA 120 concentrator) after adding TFA to 5%. The peptides were dissolved in 20 µL of 1% acetonitrile in water. An aliquot (10%) was removed for quantification using the Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 23290). The remainder of the peptides from each IP samples (~0.5-3.5 µg) and 1.16 µg of reference pool peptide were transferred into a new 0.5 mL Eppendorf tube, dried in the Speed-Vac, and dissolved in 12 µL of HEPES buffer (100 mM, pH 8.0, Sigma-Aldrich, H3537).

The samples were labeled with tandem mass tag reagents (TMT11, Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol. The labeled samples were pooled, dried, and resuspended in 120 µL of 1% formic acid (FA). The TMT11 labeled sample was desalted as described above for the

unlabeled peptides. The eluates were transferred to autosampler vials (Sun-Sri, Cat. No. 200046), dried, and stored at -80°C for capillary liquid chromatography interfaced to a mass spectrometer (nano-LC-MS).

### **Nano-LC-MS**

The mass spectrometric analysis of mouse left ventricular Nav channel complexes was performed as described previously (Lorenzini et al., 2021). Briefly, the samples in formic acid (1%) were loaded (2.5 µL) onto a 75 µm i.d. × 50 cm Acclaim® PepMap 100 C18 RSLC column (Thermo Fisher Scientific) on an EASY nano-LC (Thermo Fisher Scientific). The column was equilibrated using constant pressure (700 bar) with 20 µL of solvent A (0.1% FA). The peptides were eluted using the following gradient program with a flow rate of 300 nL/min and using solvents A and B (acetonitrile with 0.1% FA): solvent A containing 5% B for 1 min, increased to 25% B over 87 min, to 35% B over 40 min, to 70% B in 6 min and constant 70% B for 6 min, to 95% B over 2 min and constant 95% B for 18 min. The data were acquired in data-dependent acquisition (DDA) mode. The MS1 scans were acquired with the Orbitrap™ mass analyzer over  $m/z = 375$  to 1500 and resolution set to 70,000. Twelve data-dependent high-energy collisional dissociation spectra (MS2) were acquired from each MS1 scan with a mass resolving power set to 35,000, a range of  $m/z = 100 - 1500$ , an isolation width of 2 Th, and a normalized collision energy setting of 32%. The maximum injection time was 60 ms for parent-ion analysis and 120 ms for product-ion analysis. The ions that were selected for MS2 were dynamically excluded for 20 sec. The automatic gain control (AGC) was set at a target value of 3e6 ions for MS1 scans and 1e5 ions for MS2. Peptide ions with charge states of one or  $\geq 7$  were excluded for higher-energy collision-induced dissociation (HCD) acquisition.

### **MS data analysis**

Peptide identification from raw MS data was performed using PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) (Zhang et al., 2012). The Uni-mouse-Reference-20131008 protein database was used for spectral matching. The precursor and product ion mass tolerances were set to 20 ppm and 0.05 Da, respectively, and the enzyme cleavage specificity was set to

trypsin, with a maximum of three missed cleavages allowed. Carbamidomethylation (Cys) and TMT tags (Lys and/or peptide N-terminus) were treated as fixed modifications, while oxidation (Met), pyroglutamination (Gln), deamidation (Asn and/or Gln), methylation (Lys and/or Arg), dimethylation (Lys and/or Arg), acetylation (Lys) and phosphorylation (Ser, Thr and/or Tyr) were considered variable modifications. The definitive annotation of each FHF2 phosphopeptide-spectrum match was obtained by manual verification and interpretation. The phosphorylation site assignments were based on the presence or absence of the unphosphorylated and phosphorylated b- and y-ions flanking the site(s) of phosphorylation, ions referred to as site-discriminating ions throughout this study. Peptide sequences, m/z, charge states, mass errors of parent ions (in ppm), PEAKS -10lgP and A scores, and charge state confirmations of site-discriminating b- and y-ions are presented in **Table Supplement 1 & Table 1**.

Label-free quantitative analysis of the areas of extracted MS1 chromatograms of phosphorylated and non-phosphorylated peptide ions covering the phosphorylation site(s) of interest was used to evaluate the proportion of phosphorylated to non-phosphorylated peptides at each position, as well as the relative abundance of phosphopeptides.

### **Plasmids and adenoviruses**

The FHF2 and control shRNA sequences were subcloned behind an U6 promoter into the pDUAL-U6 plasmid (Vector Biolabs, Malvern, PA). The sequence for FHF2 shRNA was 5'-CAGCACTTACACTCTGTTTAA-CTCGAG-TTAAACAGAGTGTAAGTGCTG-3', which targets nucleotides corresponding to mouse FHF2-VY amino acids 106-113. The sequence for control shRNA was 5'-GCGCGATAGCGCTAATAATTT-CTCGAG-AAATTATTAGCGCTATCGCGC-3', which does not correspond to any known sequence in the mouse genome. The FHF2-VY phosphomutant rescue constructs were generated by mutating the serine(s)/threonine(s) to alanine(s) (A) or glutamate(s) (E) by site-directed mutagenesis using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent, Santa Clara, CA) of a pDUAL2-CCM(-) plasmid (Vector Biolabs, Malvern, PA) containing the CMV promoter in front of the human FHF2-VY cDNA (NCBI Reference Sequence NM\_001139500, full-length cDNA clone purchased from Origene, Rockville, MD) silently mutated in the sequence targeted by the FHF2 shRNA. The mutated FHF2-VY constructs were then digested with restriction

endonucleases to excise the mutated fragments, which were then subcloned into the original pDUAL2-CCM(-) plasmid. The pDUAL plasmids containing the shRNA or FHF2-VY constructs were then provided to Vector Biolabs (Malvern, PA) for the generation, purification and titration of recombinant (human type 5, dE1/E3) adenoviruses which also contain the Red (RFP) or Green (GFP) Fluorescent Proteins, respectively, as markers of infection, under the control of a CMV promoter. All plasmid and adenoviral constructs were sequenced to ensure that no unintentional mutations were introduced.

### **Isolation, culture and adenoviral infection of neonatal mouse ventricular cardiomyocytes**

Single cardiomyocytes were isolated from the ventricles of C57BL/6J WT mouse neonates aged from postnatal day 0 to 3 by enzymatic and mechanical dissociation in a semi-automated procedure by using the Neonatal Heart Dissociation kit and the GentleMACS™ dissociator (Miltenyi Biotec, Gaithersburg, MD). Briefly, hearts were harvested, and the ventricles were separated from the atria and digested in the GentleMACS™ dissociator. After termination of the program, the digestion was stopped by adding medium containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The cell suspension was filtered to remove undissociated tissue fragments, and centrifuged. The cell pellet was resuspended in culture medium, and the cells were plated in 60 mm-diameter Petri dishes at 37°C for 1.5 hour. The non-plated cardiomyocytes were then resuspended, plated on laminin-coated dishes at a density of 5 000 or 500 000 cells per 35 mm-diameter plate for patch-clamp and molecular biology/biochemical analyses, respectively, and incubated in 37°C, 5% CO<sub>2</sub>: 95% air incubator. After 24 hours-plating, medium was replaced by DMEM supplemented with 1% fetal bovine serum and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, in the presence or absence of the shRNA- and FHF2-VY-expressing adenoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 50 and 1, respectively. Culture medium was then changed 24 and 48 hours after adenoviral infection with DMEM supplemented with 1% fetal bovine serum and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin without adenoviruses.

### **FHF2-lox, $\alpha$ MHC-Cre and FHF2-KD mice**

Cardiac specific FHF2-knockdown (FHF2-KD) and control FHF2-lox adult (8-16-weeks-old) male C57BL/6J mice (Angsutararux et al., Under revision for resubmission) were used. The FHF2-lox C57BL/6J mouse line, in which the FHF2 locus is floxed, was obtained from Dr. Jeanne Nerbonne, and the  $\alpha$ MHC-Cre C57BL/6J mouse line, expressing the Cre-recombinase driven by the cardiac specific alpha Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ MHC) promoter, was purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, Tg(Myh6-cre)2182Mds/J mouse line). To obtain cardiac specific FHF2 targeted knockdown (FHF2-KD) mice, FHF2-lox female mice were crossed with  $\alpha$ MHC-Cre male mice. The FHF2-lox male littermates were used as controls.

### **Isolation, culture and adenoviral infection of adult mouse ventricular cardiomyocytes**

Single cardiomyocytes were isolated from the ventricles of FHF2-KD and FHF2-lox adult (8-16 weeks-old) male C57BL/6J mice (Angsutararux et al., Under revision for resubmission) by enzymatic dissociation and mechanical dispersion according to a modified procedure of established methods. All reagents were from Sigma-Aldrich unless otherwise noted. Briefly, mice were injected with heparin (5000 units/kg body weight) 30 minutes before sacrifice by cervical dislocation. Hearts were quickly excised, and perfused retrogradely through the aorta with a solution at 37°C containing (in mM): NaCl, 113; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6; HEPES, 10; NaHCO<sub>3</sub>, 1.6; taurine, 30; glucose, 20 (pH 7.4 with NaOH). Hearts were subsequently digested for 11 minutes with the same solution supplemented with 0.08 mg/mL Liberase TM Research Grade. Following digestion, the perfusion was stopped, the atria were removed, and the ventricles were dispersed by gentle trituration. The resulting cell suspension was filtered to remove large undissociated tissue fragments, and resuspended in solutions containing 10 mg/mL bovine serum albumin and Ca<sup>2+</sup> concentrations successively increasing from nominally 0 to 0.2, 0.5 and 1 mM. Isolated cardiomyocytes were then resuspended in medium-199 supplemented with 5% fetal bovine serum, 10 mM 2,3-Butanedione monoxime, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, plated on laminin-coated dishes, and incubated in 37°C, 5% CO<sub>2</sub>: 95% air incubator. After 1-hour plating, culture medium was replaced by medium-199 supplemented with 0.1%



bovine serum albumin, 10 mM 2,3-Butanedione monoxime, 1X Insulin/Transferrin/Sodium Selenite, 1X Chemically Defined Lipid Concentrate (Thermo Fisher Scientific), 0.5  $\mu$ M cytochalasine D, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, in the presence or absence of the different FHF2-VY-expressing adenoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 1.

### **RNA preparation and SYBR Green quantitative RT-PCR**

Total RNA was isolated from cultured cardiomyocytes and analyzed using standard methods previously described in detail (Marionneau et al., 2008). Briefly, cells were washed twice in ice-cold PBS (pH 7.4) and lysed in buffer provided in the Nucleospin RNA kit (Machery-Nagel, Düren, Germany). Total RNA was isolated and DNase treated following the kit instructions. The quality of total RNA in each sample was examined by gel electrophoresis. Genomic DNA contamination was assessed by PCR amplification of each total RNA sample without prior cDNA synthesis; no genomic DNA was detected.

First strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA from each sample using the High-Capacity cDNA Archive kit (Thermo Fisher Scientific). The relative expression levels of transcripts encoding the different FHF isoforms, including FHF1, FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y, FHF2-A, FHF2-B, FHF3 and FHF4, as well as the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase I (HPRT) used as an endogenous control, were determined by quantitative RT-PCR using 1X SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). PCR reactions were performed on 10 ng of cDNA in the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific) using isoform specific primer pairs giving 90-100% efficacy and a single amplicon at the appropriate melting temperature and size (**Table Supplement 2**). The cycling conditions included a hot start at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Results for each sample were normalized to HPRT, and expressed according to the  $2^{-\Delta C_t}$  method, as relative transcript expression compared with HPRT.

## **Preparation of cardiomyocyte lysates and western blot analyses**

Cultured cardiomyocytes were lysed and western blot analyses of cardiomyocyte lysates were completed as described previously (Lorenzini et al., 2021). Briefly, cells were washed twice in ice-cold PBS (pH 7.4) and lysed in ice-cold lysis buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% amidosulfobetaine, 1X complete protease inhibitor cocktail tablet, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.7 µg/ml pepstatin A (Thermo Fisher Scientific) and 1X Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). All reagents were from Sigma-Aldrich unless otherwise noted. After 15-minutes rotation at 4°C, protein concentrations in detergent-soluble cell lysates were determined using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific), and proteins were subsequently analyzed by western blot. The mouse FHF2 isoforms (all included), the human FHF2-VY isoform and the mouse FHF2-A isoform were specifically detected using an anti-FHF2 rabbit polyclonal antibody (1:1000) given by Dr. Cecilia Lindskog Bergström (Human Protein Atlas project, Uppsala University, Sweden), the anti-FGF13 mouse monoclonal antibody (Antibodies Incorporated, Davis, CA, NeuroMab clone N91/27, 1:300), and the anti-Pan-FHF-A mouse monoclonal antibody (Antibodies Incorporated, NeuroMab clone N235/22, 1:300), respectively. The anti-transferrin receptor mouse monoclonal antibody (TransR, clone H68.4, Thermo Fisher Scientific, 1:1000) and the anti-alpha 1 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mouse monoclonal antibody (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1, #ab7671, Abcam, Cambridge, United Kingdom, 1:1000) were used to verify equal protein loading. Bound primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or -rabbit secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA), and protein signals were visualized using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific). Bands corresponding to FHF2 were normalized to bands corresponding to TransR from the same sample, and relative FHF2 protein expression is expressed relative to TransR protein expression.

## **Electrophysiological recordings**

Whole-cell Na<sub>v</sub> currents were recorded at room temperature from neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices,

San Jose, CA) 48 hours following adenoviral infection. Voltage-clamp protocols were applied using the pClamp 10.4 software package (Axon Instruments) interfaced to the electrophysiological equipment using a Digidata 1440A digitizer (Axon Instruments). Current signals were filtered at 10 kHz prior to digitization at 50 kHz and storage. Patch-clamp pipettes were fabricated from borosilicate glass (OD: 1.5 mm, ID: 0.86 mm, Sutter Instrument, Novato, CA) using a P-97 micropipette puller (Sutter Instrument) to obtain a resistance between 0.8 and 1.5 M $\Omega$  when filled with internal solution. For both neonatal and adult cardiomyocytes, the internal solution contained (in mM): NaCl 5, CsF 115, CsCl 20, HEPES 10, EGTA 10 (pH 7.35 with CsOH, ~300 mosM). The external solution used to patch neonatal cardiomyocytes contained (in mM): NaCl 20, CsCl 103, TEA-Cl (tetraethylammonium chloride) 25, HEPES 10, Glucose 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, CoCl<sub>2</sub> 2.5 (pH 7.4 with CsOH, ~300 mosM); and the external solution used to patch adult cardiomyocytes contained (in mM): NaCl 10, CsCl 5, N-Methyl-D-Glucamine (NMDG) 104, TEA-Cl 25, HEPES 10, Glucose 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, CoCl<sub>2</sub> 2.5 (pH 7.4 with CsOH, ~300 mosM). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. After establishing the whole-cell configuration, five minutes were allowed to ensure stabilization of voltage-dependence of activation and inactivation properties, at which time 25 ms voltage steps to  $\pm$  10 mV from a holding potential (HP) of -70 mV were applied to allow measurement of whole-cell membrane capacitances, input and series resistances. Only cells with access resistance < 7 M $\Omega$  were used, and input resistances were typically > 1 G $\Omega$ . After compensation of series resistance (80%), the membrane was held at a HP of -120 mV, and the voltage-clamp protocols were carried out as indicated below. Leak currents were always < 300 pA at HP (-120 mV), and were corrected offline. Cells exhibiting peak current amplitudes < 500 or > 5000 pA were excluded from analyses of biophysical properties because of errors associated with leak or voltage-clamp (Montnach et al., 2021), respectively, but were conserved in analyses of peak current density to avoid bias in evaluation of current densities.

Data were compiled and analyzed using ClampFit 11.2 (Axon Instruments), Microsoft Excel, and Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Whole-cell membrane capacitances (C<sub>m</sub>) were determined by analyzing the decays of capacitive transients elicited by brief (25 ms) voltage steps to  $\pm$  10 mV from the HP (-70 mV). Input resistances were calculated from the steady-state currents elicited by the same  $\pm$ 10 mV steps (from the HP). Series resistances were calculated by dividing the decay time

constants of the capacitive transients (fitted with single exponentials) by the  $C_m$ . To determine peak  $\text{Na}^+$  current-voltage relationships, currents were elicited by 50-ms depolarizing pulses to potentials ranging from -80 to +40 mV (presented at 5-s intervals in 5-mV increments) from a HP of -120 mV. Peak current amplitudes were defined as the maximal currents evoked at each voltage. Current amplitudes were leak-corrected, normalized to the  $C_m$ , and current densities are presented.

To analyze voltage-dependence of current activation properties, conductances ( $G$ ) were calculated, and conductance-voltage relationships were fitted with the Boltzmann equation  $G = G_{\text{max}} / (1 + \exp(-(V_m - V_{1/2}) / k))$ , in which  $V_{1/2}$  is the membrane potential of half-activation and  $k$  is the slope factor. The time courses of inactivation of macroscopic currents were determined by fitting the current decay with the bi-exponential function  $I(t) = A_{\text{fast}} \times \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_{\text{slow}} \times \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + A_0$ , in which  $A_{\text{fast}}$  and  $A_{\text{slow}}$  are the amplitudes of the fast and slow inactivating current components, respectively, and  $\tau_{\text{fast}}$  and  $\tau_{\text{slow}}$  are the decay time constants of  $A_{\text{fast}}$  and  $A_{\text{slow}}$ , respectively. In order to visually inspect changes in current decay kinetics, overlays of  $I_{\text{Na}}$  recordings were obtained after normalization by the peak current amplitude; and representative current traces are presented. A standard two-pulse protocol was used to examine the voltage-dependences of steady-state inactivation. From a HP of -120 mV, 1-s conditioning pulses to potentials ranging from -120 to -35 mV (in 5-mV increments) were followed by 20-ms test depolarizations to -20 mV (interpulse intervals were 5-s). Current amplitudes evoked from each conditioning voltage were measured and normalized to the maximal current ( $I_{\text{max}}$ ) evoked from -120 mV, and normalized currents were plotted as a function of the conditioning voltage. The resulting steady-state inactivation curves were fitted with the Boltzmann equation  $I = I_{\text{max}} / (1 + \exp((V_m - V_{1/2}) / k))$ , in which  $V_{1/2}$  is the membrane potential of half-inactivation and  $k$  is the slope factor. To examine the rates of recovery from inactivation, a three-pulse protocol was used. Cells were first depolarized to -20 mV (from a HP of -120 mV) to inactivate the channels, and subsequently repolarized to -120 mV for varying times (ranging from 1 to 200 ms), followed by test depolarizations to -20 mV to assess the extent of recovery (interpulse intervals were 5-s). The current amplitudes at -20 mV, measured following each recovery period, were normalized to the maximal current amplitude and plotted as function of the recovery time. The resulting plot was fitted with a double exponential function  $I(t) = A \times (1 - \exp(-t / \tau_{\text{fast}}) + 1 - \exp(-t / \tau_{\text{slow}})) + C$  to determine the time constants for fast ( $\tau_{\text{fast}}$ ) and slow ( $\tau_{\text{slow}}$ ) recovery

from inactivation. For each of these biophysical properties, data from individual cells were first fitted and then averaged.

In experiments aimed at recording the tetrodotoxin (TTX)-sensitive late Na<sup>+</sup> current (I<sub>NaL</sub>), cardiomyocytes were bathed in external solution containing (in mM): NaCl 120, TEA-Cl 25, HEPES 10, Glucose 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, CoCl<sub>2</sub> 2.5 (pH 7.4 with CsOH, ~300 mosM). Repetitive 350-ms test pulses to -20 mV from a HP of -120 mV (at 5-s intervals) were applied to cells to record Na<sup>+</sup> currents in the absence of TTX. Cells were then superfused locally with the external solution supplemented with 60 μM TTX (Bio-Techne SAS, Rennes, France). Cells exhibiting differences in leak current amplitudes before and after TTX application > 5 pA at -20 mV (calculated from leak currents at -120 mV) were excluded from analyses. TTX-sensitive currents from individual cells were determined by offline digital subtraction of average leak-subtracted currents obtained from 5 recordings in the absence and in the presence of TTX after achieving steady state. The amplitude of TTX-sensitive I<sub>NaL</sub> was defined as the mean steady-state current amplitude of macroscopic TTX-sensitive current measured from 150 to 350 ms. For each cell, the TTX-sensitive I<sub>NaL</sub> amplitude was normalized to the C<sub>m</sub>, and I<sub>NaL</sub> current densities are presented.

### Statistical analyses

Results are expressed as means ± SEM. Data were first tested for normality using the D'Agostino and Pearson normality test. Depending on the results of normality tests, statistical analyses were then performed using the Mann-Whitney nonparametric test or the ordinary one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparisons post-hoc test, as indicated in Figures and Tables. All these analyses, as well as plots and graphs were performed using Prism (GraphPad Software).

**Acknowledgements:** This work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* [ANR-15-CE14-0006-01 and ANR-16-CE92-0013-01 to CM] and the National Institutes of Health [R01-HL148803 to CM; R01-HL034161 and R01-HL142520 to JMN]. The proteomic experiments were performed at the Washington University Proteomics Shared Resource (WU-PSR), R. Reid Townsend MD, PhD., Director, Robert W. Sprung and Qiang Zhang, PhD., Co-Directors. The WU-PSR is

supported in part by the WU Institute of Clinical and Translational Sciences (NCATS UL1 TR000448), the Mass Spectrometry Research Resource (NIGMS P41 GM103422) and the Siteman Comprehensive Cancer Center Support Grant (NCI P30 CA091842). ML was supported by a *Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire-Société Française de Cardiologie* predoctoral fellowship [SFC/GRRC2018]. SB was supported by a Lefoulon-Delalande postdoctoral fellowship. The expert technical assistance of Agnès Tessier, Bérangère Evrard, Petra Erdmann-Gilmore, Dr. Yiling Mi, Alan Davis and Rose Connors is gratefully acknowledged. The content of the research reported is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official view of the funding agencies.

**Competing Interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Author Contributions:** CM designed the study and wrote the paper. DM, RRT, JMN and CM designed, performed and/or analyzed the mass spectrometry experiments. AL, ML, SB, MS, FB, JMN and CM designed, performed and/or analyzed the functional analyses. JMN provided the FHF2-lox C57BL/6J mouse line. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## References

- Abrams, J., D. Roybal, N. Chakouri, A.N. Katchman, R. Weinberg, L. Yang, B.X. Chen, S.I. Zakharov, J.A. Hennessey, U.M.R. Avula, J. Diaz, C. Wang, E.Y. Wan, G.S. Pitt, M. Ben-Johny, and S.O. Marx. 2020. Fibroblast growth factor homologous factors tune arrhythmogenic late NaV1.5 current in calmodulin binding-deficient channels. *JCI Insight*. 5.
- Angsutararux, P., A. Dutta, M. Marras, C. Abella, R.L. Mellor, J. Shi, J.M. Nerbonne, and J.R. Silva. Under revision for resubmission. Mechanisms of intracellular fibroblast growth factor (iFGF) regulation of human cardiac sodium channel gating. *J Gen Physiol*.
- Burel, S., F.C. Coyan, M. Lorenzini, M.R. Meyer, C.F. Lichti, J.H. Brown, G. Loussouarn, F. Charpentier, J.M. Nerbonne, R.R. Townsend, L.S. Maier, and C. Marionneau. 2017. C-terminal

- phosphorylation of NaV1.5 impairs FGF13-dependent regulation of channel inactivation. *J Biol Chem.* 292:17431-17448.
- Chakouri, N., S. Rivas, D. Roybal, L. Yang, J. Diaz, A. Hsu, R. Mahling, B.X. Chen, J.O. Owoyemi, D. DiSilvestre, D. Sirabella, B. Corneo, G.F. Tomaselli, I.E. Dick, S.O. Marx, and M. Ben-Johny. 2022. Fibroblast growth factor homologous factors serve as a molecular rheostat in tuning arrhythmogenic cardiac late sodium current. *Nat Cardiovasc Res.* 1:1-13.
- Chen-Izu, Y., R.M. Shaw, G.S. Pitt, V. Yarov-Yarovoy, J.T. Sack, H. Abriel, R.W. Aldrich, L. Belardinelli, M.B. Cannell, W.A. Catterall, W.J. Chazin, N. Chiamvimonvat, I. Deschenes, E. Grandi, T.J. Hund, L.T. Izu, L.S. Maier, V.A. Maltsev, C. Marionneau, P.J. Mohler, S. Rajamani, R.L. Rasmusson, E.A. Sobie, C.E. Clancy, and D.M. Bers. 2015. Na<sup>+</sup> channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J Physiol.* 593:1347-1360.
- Chen, Z.W., K. Fuchs, W. Sieghart, R.R. Townsend, and A.S. Evers. 2012. Deep amino acid sequencing of native brain GABAA receptors using high-resolution mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 11:M111 011445.
- Effraim, P.R., J. Huang, A. Lampert, S. Stamboulian, P. Zhao, J.A. Black, S.D. Dib-Hajj, and S.G. Waxman. 2019. Fibroblast growth factor homologous factor 2 (FGF-13) associates with Nav1.7 in DRG neurons and alters its current properties in an isoform-dependent manner. *Neurobiol Pain.* 6:100029.
- Erde, J., R.R. Loo, and J.A. Loo. 2014. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J Proteome Res.* 13:1885-1895.
- Gade, A.R., S.O. Marx, and G.S. Pitt. 2020. An interaction between the III-IV linker and CTD in NaV1.5 confers regulation of inactivation by CaM and FHF. *J Gen Physiol.* 152.
- Goetz, R., K. Dover, F. Laezza, N. Shtraizent, X. Huang, D. Tchetchik, A.V. Eliseenkova, C.F. Xu, T.A. Neubert, D.M. Ornitz, M. Goldfarb, and M. Mohammadi. 2009. Crystal structure of a fibroblast growth factor homologous factor (FHF) defines a conserved surface on FHF for binding and modulation of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 284:17883-17896.

- Hennessey, J.A., C.A. Marcou, C. Wang, E.Q. Wei, D.J. Tester, M. Torchio, F. Dagradi, L. Crotti, P.J. Schwartz, M.J. Ackerman, and G.S. Pitt. 2013. FGF12 is a candidate Brugada syndrome locus. *Heart Rhythm*. 10:1886-1894.
- Hsu, W.C., F. Scala, M.N. Nenov, N.C. Wildburger, H. Elferink, A.K. Singh, C.B. Chesson, T. Buzhdygan, M. Sohail, A.S. Shavkunov, N.I. Panova, C.L. Nilsson, J.S. Rudra, C.F. Lichti, and F. Laezza. 2016. CK2 activity is required for the interaction of FGF14 with voltage-gated sodium channels and neuronal excitability. *FASEB J*. 30:2171-2186.
- Hsu, W.J., N.C. Wildburger, S.J. Haidacher, M.N. Nenov, O. Folorunso, A.K. Singh, B.C. Chesson, W.F. Franklin, I. Cortez, R.G. Sadygov, K.T. Dineley, J.S. Rudra, G. Tagliatalata, C.F. Lichti, L. Denner, and F. Laezza. 2017. PPARgamma agonists rescue increased phosphorylation of FGF14 at S226 in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 295:1-17.
- James, T.F., M.N. Nenov, N.C. Wildburger, C.F. Lichti, J. Luisi, F. Vergara, N.I. Panova-Electronova, C.L. Nilsson, J.S. Rudra, T.A. Green, D. Labate, and F. Laezza. 2015. The Nav1.2 channel is regulated by GSK3. *Biochim Biophys Acta*. 1850:832-844.
- Li, Q., Y. Zhao, G. Wu, S. Chen, Y. Zhou, S. Li, M. Zhou, Q. Fan, J. Pu, K. Hong, X. Cheng, Q. Kenneth Wang, and X. Tu. 2017. De Novo FGF12 (Fibroblast Growth Factor 12) Functional Variation Is Potentially Associated With Idiopathic Ventricular Tachycardia. *J Am Heart Assoc*. 6.
- Liu, C.J., S.D. Dib-Hajj, M. Renganathan, T.R. Cummins, and S.G. Waxman. 2003. Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem*. 278:1029-1036.
- Lorenzini, M., S. Burel, A. Lesage, E. Wagner, C. Charriere, P.M. Chevillard, B. Evrard, D. Maloney, K.M. Ruff, R.V. Pappu, S. Wagner, J.M. Nerbonne, J.R. Silva, R.R. Townsend, L.S. Maier, and C. Marionneau. 2021. Proteomic and functional mapping of cardiac Nav1.5 channel phosphorylation sites. *J Gen Physiol*. 153.
- Marionneau, C., and H. Abriel. 2015. Regulation of the cardiac Na channel Na1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol*. 82:36-47.



- Marionneau, C., S. Brunet, T.P. Flagg, T.K. Pilgram, S. Demolombe, and J.M. Nerbonne. 2008. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K<sup>+</sup> currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res.* 102:1406-1415.
- Marionneau, C., C.F. Lichti, P. Lindenbaum, F. Charpentier, J.M. Nerbonne, R.R. Townsend, and J. Merot. 2012. Mass Spectrometry-Based Identification of Native Cardiac Nav1.5 Channel alpha Subunit Phosphorylation Sites. *J Proteome Res.* 11:5994-6007.
- Montnach, J., M. Lorenzini, A. Lesage, I. Simon, S. Nicolas, E. Moreau, C. Marionneau, I. Baro, M. De Waard, and G. Loussouarn. 2021. Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp. *Sci Rep.* 11:3282.
- Munoz-Sanjuan, I., P.M. Smallwood, and J. Nathans. 2000. Isoform diversity among fibroblast growth factor homologous factors is generated by alternative promoter usage and differential splicing. *J Biol Chem.* 275:2589-2597.
- Musa, H., C.F. Kline, A.C. Sturm, N. Murphy, S. Adelman, C. Wang, H. Yan, B.L. Johnson, T.A. Csepe, A. Kilic, R.S. Higgins, P.M. Janssen, V.V. Fedorov, R. Weiss, C. Salazar, T.J. Hund, G.S. Pitt, and P.J. Mohler. 2015. SCN5A variant that blocks fibroblast growth factor homologous factor regulation causes human arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:12528-12533.
- Onkal, R., J.H. Mattis, S.P. Fraser, J.K. Diss, D. Shao, K. Okuse, and M.B. Djamgoz. 2008. Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J Cell Physiol.* 216:716-726.
- Park, D.S., A. Shekhar, C. Marra, X. Lin, C. Vasquez, S. Solinas, K. Kelley, G. Morley, M. Goldfarb, and G.I. Fishman. 2016. Fhf2 gene deletion causes temperature-sensitive cardiac conduction failure. *Nat Commun.* 7:12966.
- Rush, A.M., E.K. Wittmack, L. Tyrrell, J.A. Black, S.D. Dib-Hajj, and S.G. Waxman. 2006. Differential modulation of sodium channel Na(v)1.6 by two members of the fibroblast growth factor homologous factor 2 subfamily. *Eur J Neurosci.* 23:2551-2562.
- Santucci, J., 3rd, D.S. Park, A. Shekhar, X. Lin, L. Bu, N. Yamaguchi, S. Mintz, E.W. Chang, A. Khodadadi-Jamayran, G. Redel-Traub, M. Goldfarb, and G.I. Fishman. 2022. Contrasting Ionic

- Mechanisms of Impaired Conduction in FHF1- and FHF2-Deficient Hearts. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 15:e011296.
- Schneider, C., R.A. Newman, D.R. Sutherland, U. Asser, and M.F. Greaves. 1982. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem.* 257:10766-10769.
- Shavkunov, A.S., N.C. Wildburger, M.N. Nenov, T.F. James, T.P. Buzhdygan, N.I. Panova-Elektronova, T.A. Green, R.L. Veselenak, N. Bourne, and F. Laezza. 2013. The fibroblast growth factor 14.voltage-gated sodium channel complex is a new target of glycogen synthase kinase 3 (GSK3). *J Biol Chem.* 288:19370-19385.
- Vassilev, P.M., T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science.* 241:1658-1661.
- Wadsworth, P.A., A.K. Singh, N. Nguyen, N.M. Dvorak, C.M. Tapia, W.K. Russell, C. Stephan, and F. Laezza. 2020. JAK2 regulates Nav1.6 channel function via FGF14(Y158) phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1867:118786.
- Wang, C., B.C. Chung, H. Yan, S.Y. Lee, and G.S. Pitt. 2012. Crystal structure of the ternary complex of a NaV C-terminal domain, a fibroblast growth factor homologous factor, and calmodulin. *Structure.* 20:1167-1176.
- Wang, C., J.A. Hennessey, R.D. Kirkton, V. Graham, R.S. Puranam, P.B. Rosenberg, N. Bursac, and G.S. Pitt. 2011a. Fibroblast growth factor homologous factor 13 regulates Na<sup>+</sup> channels and conduction velocity in murine hearts. *Circ Res.* 109:775-782.
- Wang, C., E.G. Hoch, and G.S. Pitt. 2011b. Identification of novel interaction sites that determine specificity between fibroblast growth factor homologous factors and voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem.* 286:24253-24263.
- Wang, X., H. Tang, E.Q. Wei, Z. Wang, J. Yang, R. Yang, S. Wang, Y. Zhang, G.S. Pitt, H. Zhang, and C. Wang. 2017. Conditional knockout of Fgf13 in murine hearts increases arrhythmia susceptibility and reveals novel ion channel modulatory roles. *J Mol Cell Cardiol.* 104:63-74.
- Wildburger, N.C., S.R. Ali, W.C. Hsu, A.S. Shavkunov, M.N. Nenov, C.F. Lichti, R.D. LeDuc, E. Mostovenko, N.I. Panova-Elektronova, M.R. Emmett, C.L. Nilsson, and F. Laezza. 2015.

Quantitative proteomics reveals protein-protein interactions with fibroblast growth factor 12 as a component of the voltage-gated sodium channel 1.2 (nav1.2) macromolecular complex in Mammalian brain. *Mol Cell Proteomics*. 14:1288-1300.

Wisniewski, J.R., A. Zougman, N. Nagaraj, and M. Mann. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 6:359-362.

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

Zhang, J., L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G.A. Lajoie, and B. Ma. 2012. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics*. 11:M111 010587.

## Figure Legends

**Figure 1.** Mass spectrometric identification and stoichiometry of nine FHF2 phosphorylation sites from mouse left ventricular Nav channel complexes. **(A)** The mouse FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y, FHF2-A, FHF2-B and FHF4-B, and human FHF1-A and FHF1-B sequences are aligned, and the phosphorylation sites identified by MS on mouse FHF2-VY and conserved in the other FHF isoforms are highlighted in red. MS-covered sequence is highlighted in yellow; and FGF homology core domain is underlined in black. Amino acid sequences, masses and MS quality indicators of detected FHF peptides are provided in **Table 1 and Table Supplement 1**. The four phosphorylation clusters analyzed electrophysiologically are boxed in black. **(B)** The areas of extracted MS1 ion chromatograms, corresponding to MS2 spectra assigning phosphorylated (in red) and non-phosphorylated (in white) FHF2 peptides at indicated site(s), in  $\alpha$ Nav<sub>v</sub>PAN-IPs from adult mouse left ventricles are indicated. Phosphosite stoichiometry is analyzed individually (S218) or by clusters of two (S35-38, S230-232, S238-240 and S250-255) as corresponding phosphosites are identified from the same phosphopeptides.

**Figure 2.** FHF2 expression in WT, knockdown and rescued neonatal and adult mouse ventricular cardiomyocytes. Neonatal ventricular cardiomyocytes were freshly isolated from WT mouse pups. Adult ventricular cardiomyocytes were freshly isolated from FHF2-lox or cardiac specific FHF2-knockdown (FHF2-KD) mice. The knockdown of FHF2 in neonatal cardiomyocytes was obtained using FHF2 shRNA-expressing adenoviruses, and the expression of FHF2 in both neonatal and adult cardiomyocytes was rescued using adenoviruses expressing WT (FHF2-VY-WT), phosphosilent (mutation to alanine) or phosphomimetic (mutation to glutamate) FHF2-VY at indicated sites. **(A)** Mean  $\pm$  SEM relative transcript expression of FHF1 (n=12 in each group), FHF2-VY (n=28 in control and 24 in FHF2 shRNA samples), FHF2-V (n=12 in each group), FHF2-Y (n=4 in each group), FHF2-A (n=12 in each group) and FHF4 (n=12 in each group) isoforms in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected with control or FHF2 shRNA-expressing adenoviruses. **(B)** Mean  $\pm$  SEM relative transcript expression of FHF2-VY in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected with adenoviruses expressing control shRNA (n=28), FHF2 shRNA alone (n=24) or with FHF2-VY-WT (n=16), FHF2-VY-35-38A (n=6), FHF2-VY-35-38E (n=4), FHF2-VY-218A (n=4), FHF2-VY-218E (n=4), FHF2-VY-230-232A (n=4), FHF2-VY-230-232E (n=4), FHF2-VY-238-240A (n=4), FHF2-VY-238-240E (n=4), FHF2-VY-250-255A (n=4), FHF2-VY-250-255E (n=4) or FHF2-VY-9A (n=2). Representative western blot **(C)** and mean  $\pm$  SEM relative protein expression **(D)** of FHF2 (all isoforms) in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected with adenoviruses expressing control (n=6) or FHF2 (n=6) shRNA. **(E)** Representative western blot of the rescued human FHF2-VY isoform in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected with adenoviruses expressing FHF2 shRNA alone (n=4) or with FHF2-VY-WT (n=4) or FHF2-VY-9A (n=4). **(F)** Representative western blot of FHF2 (all isoforms) in ventricular cardiomyocytes isolated from FHF2-lox (n=3) and FHF2-KD (n=3) adult mice. **(G)** Representative western blots of the rescued human FHF2-VY isoform in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected with adenoviruses expressing FHF2 shRNA and FHF2-VY-WT (n=14), FHF2-VY-35-38A (n=10), FHF2-VY-35-38E (n=8), FHF2-VY-218A (n=6), FHF2-VY-218E (n=4), FHF2-VY-230-232A (n=2), FHF2-VY-230-232E (n=4), FHF2-VY-238-240A (n=4), FHF2-VY-238-240E (n=4), FHF2-VY-250-255A (n=4) or FHF2-VY-250-255E (n=4). **(H)**

Mean  $\pm$  SEM relative transcript expression of FHF2-VY, FHF2-V, FHF2-Y and FHF2-A isoforms in neonatal and adult ventricular cardiomyocytes isolated from WT mice (n=6 in each group). **(I)** Representative western blot of FHF2-A in ventricular cardiomyocytes isolated from WT (n=6) and FHF2-KD (n=2) adult mice, and WT neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected (n=2) or not (n=8) with FHF2 shRNA-expressing adenoviruses. Note that the FHF2-A band is absent in neonatal cardiomyocytes knockdown for FHF2, validating the specificity of the detection. All western blots were probed in parallel with the anti-transferrin receptor (TransR) or the anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 antibodies to verify equal protein loading. \*\* $p$ <0.01, \*\*\*\* $p$ <0.0001 *versus* control shRNA (**A** and **D**) or neonatal WT mouse ventricular cardiomyocytes (**H**), Mann Whitney test.

**Figure 3.** The increased closed-state and open-state inactivation rates of Nav channels induced by FHF2 knockdown are partially rescued by the FHF2-VY isoform while no rescue of the shift in voltage-dependence of activation towards hyperpolarized potentials is obtained in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes. **(A)** Representative whole-cell voltage-gated Na<sup>+</sup> currents recorded 48 hours following infection of neonatal WT mouse ventricular cardiomyocytes with adenoviruses expressing control shRNA, FHF2 shRNA alone or with WT FHF2-VY (FHF2-VY-WT) using the protocols illustrated in each panel. Scale bars are 1 nA and 3 ms. Voltage-dependences of steady-state current inactivation **(B)** and activation **(C)**. **(D)** Mean  $\pm$  SEM peak Na<sup>+</sup> current ( $I_{Na}$ ) densities plotted as a function of test potential. **(E)** Superimposed representative current traces recorded at 0 mV (HP=-120 mV) from cardiomyocytes infected with adenoviruses expressing control shRNA (black), FHF2 shRNA alone (green) or with FHF2-VY-WT (red). Mean  $\pm$  SEM time constants of fast ( $\tau_{fast}$ , **F**) and slow ( $\tau_{slow}$ , **G**) inactivation, and proportions of fast to slow inactivation components ( $A_{fast}/A_{slow}$ , **H**) plotted as a function of test potential. Current densities, time- and voltage-dependent properties, as well as statistical comparisons across groups are provided in **Figure 4 & Table 2**.

**Figure 4.** Distributions and mean  $\pm$  SEM membrane potentials for half-activation **(A)** and half-inactivation **(B)**, peak Na<sup>+</sup> current ( $I_{Na}$ ) densities **(C)**, time constants of fast ( $\tau_{fast}$ , **D**) and slow ( $\tau_{slow}$ , **E**)

inactivation, and proportions of fast to slow inactivation components ( $A_{fast}/A_{slow}$ , **F**) from neonatal WT mouse ventricular cardiomyocytes infected with adenoviruses expressing control shRNA, FHF2 shRNA alone or with WT (FHF2-VY-WT), phosphosilent (mutation to alanine) or phosphomimetic (mutation to glutamate) FHF2-VY at indicated sites. Currents were recorded as described in the legend to **Figure 3**. The  $I_{Na}$ ,  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  and  $A_{fast}/A_{slow}$  values presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -10 mV (HP=-120 mV). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 *versus* control shRNA; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01, ### $p$ <0.001, #### $p$ <0.0001 *versus* FHF2 shRNA; one-way ANOVA. Current densities, time- and voltage-dependent properties, as well as statistical comparisons across groups are provided in **Table 2**.

**Figure 5.** The increased closed-state and open-state inactivation rates of  $Na_V$  channels induced by FHF2 knockdown is completely rescued by the FHF2-VY isoform in adult mouse ventricular cardiomyocytes. **(A)** Representative whole-cell voltage-gated  $Na^+$  currents recorded 48 hours following isolation of FHF2-lox or cardiac specific FHF2-knockdown (FHF2-KD) adult mouse ventricular cardiomyocytes and/or infection with WT FHF2-VY (FHF2-VY-WT)-expressing adenoviruses using the protocols illustrated in each panel. Scale bars are 1 nA and 3 ms. Voltage-dependences of steady-state current inactivation **(B)** and activation **(C)**. **(D)** Mean  $\pm$  SEM peak  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ) densities plotted as a function of test potential. **(E)** Superimposed representative current traces recorded at 0 mV (HP=-120 mV) from FHF2-lox (black) or FHF2-KD adult mouse ventricular cardiomyocytes infected (red) or not (green) with FHF2-VY-WT-expressing adenoviruses. Mean  $\pm$  SEM time constants of fast ( $\tau_{fast}$ , **F**) and slow ( $\tau_{slow}$ , **G**) inactivation, and proportions of fast to slow inactivation components ( $A_{fast}/A_{slow}$ , **H**) plotted as a function of test potential. Current densities, time- and voltage-dependent properties, as well as statistical comparisons across groups are provided in **Figure 6 & Table 3**.

**Figure 6.** Distributions and mean  $\pm$  SEM membrane potentials for half-activation **(A)** and half-inactivation **(B)**, peak  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ) densities **(C)**, time constants of fast ( $\tau_{fast}$ , **D**) and slow ( $\tau_{slow}$ , **E**)

inactivation, and proportions of fast to slow inactivation components ( $A_{fast}/A_{slow}$ , **F**) from FHF2-lox or cardiac specific FHF2-knockdown (FHF2-KD) adult mouse ventricular cardiomyocytes infected or not with WT (FHF2-VY-WT), phosphosilent (mutation to alanine) or phosphomimetic (mutation to glutamate) FHF2-VY-expressing adenoviruses at indicated sites. Currents were recorded as described in the legend to **Figure 5**. The  $I_{Na}$ ,  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  and  $A_{fast}/A_{slow}$  values presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -20 mV (HP=-120 mV). \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.0001 *versus* FHF2-lox; ### $p$ <0.001, #### $p$ <0.0001 *versus* FHF2-KD; one-way ANOVA. Current densities, time- and voltage-dependent properties, as well as statistical comparisons across groups are provided in **Table 3**.

A

Mouse FHF2-VY	1	MSGK---V-----TKPKEEKDASKVLDDAPPQTQEYIMLRCD	S35 S38	ELKPKKESPFRAKCH---EIFCCPLKQVH-HKENTEPE	72			
Mouse FHF2-V	1	MSGK---V-----TKP-----		-----KEEKDASK	16			
Mouse FHF2-Y	1	-----MLRCD		ELKPKKESPFRAKCH---EIFCCPLKQVH-HKENTEPE	43			
Mouse FHF2-A	1	MAAAIASSLIRKQKQAREREKSNACKCVSSPSK-----		-----GKTSCKDNKLNVSFVKLFGS-KKRRRRRP	62			
Mouse FHF2-B	1	-----		-----M-ALLRKSYS	9			
Human FHF1-A	1	MAAAIASSLIRKQKQ-ARESNS----DR-----		-----VSASKRRSSPSKDGRLCERHVLGVFSKVRFCSGRKRPRVRRRP	66			
Human FHF1-B	1	-----		-----MESK	4			
Mouse FHF4-B	1	MVKP--VPLFRRTDFKLLLCNKHGLFFLR-----		-----VSKLLGCFSP-KSMWFLWNIFSKGTHMLQCICGKSLKKNKNT	69			
Mouse FHF2-VY	73	EPQLKGIVTKLYSRQGYHLQLQADGTIDGTDKDEDSTYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVQTKLYLAMNSEGYLYTSEHFTPECKFKESVFE	159			
Mouse FHF2-V	17	EPQLKGIVTKLYSRQGYHLQLQADGTIDGTDKDEDSTYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVQTKLYLAMNSEGYLYTSELFTPECKFKESVFE	103			
Mouse FHF2-Y	44	EPQLKGIVTKLYSRQGYHLQLQADGTIDGTDKDEDSTYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVQTKLYLAMNSEGYLYTSELFTPECKFKESVFE	130			
Mouse FHF2-A	63	EPQLKGIVTKLYSRQGYHLQLQADGTIDGTDKDEDSTYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVQTKLYLAMNSEGYLYTSEHFTPECKFKESVFE	149			
Mouse FHF2-B	10	EPQLKGIVTKLYSRQGYHLQLQADGTIDGTDKDEDSTYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVQTKLYLAMNSEGYLYTSELFTPECKFKESVFE	96			
Human FHF1-A	67	EPQLKGIVTRLFSQQGYFLQMHDPDGTIDGTDKDESDYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVKASLYVAMNGEGYLYSSDVFTPECKFKESVFE	153			
Human FHF1-B	5	EPQLKGIVTRLFSQQGYFLQMHDPDGTIDGTDKDESDYTLFNLI		PVGLRVVAIQGVKASLYVAMNGEGYLYSSDVFTPECKFKESVFE	91			
Mouse FHF4-B	70	DPQLKGIVTRLYCRQGYFLQMHDPDGDALDGTDKDDSTNSTL		FNLI PVGLRVVAIQGVKTGLYIAMNGEGYLYPSELFTPECKFKESVFE	156			
Mouse FHF2-VY	160	NYVYTYSSMIYRQQSGRGWYLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK	S218	VAMYKEPSLHDLTEFSRS	S230 T232	S238 S240	S250 T255	255
Mouse FHF2-V	104	NYVYTYSSMIYRQQSGRGWYLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				199
Mouse FHF2-Y	131	NYVYTYSSMIYRQQSGRGWYLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				226
Mouse FHF2-A	150	NYVYTYSSMIYRQQSGRGWYLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				245
Mouse FHF2-B	97	NYVYTYSSMIYRQQSGRGWYLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				192
Human FHF1-A	154	NYVYIYSSLYRQQESGRAWFLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				243
Human FHF1-B	92	NYVYIYSSLYRQQESGRAWFLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				181
Mouse FHF4-B	157	NYVYIYSSMLYRQQESGRAWFLGLNKEGEMKGNHVKKPKAAHFLPKPLK		VAMYKEPSLHDLTEFSRS				252

B

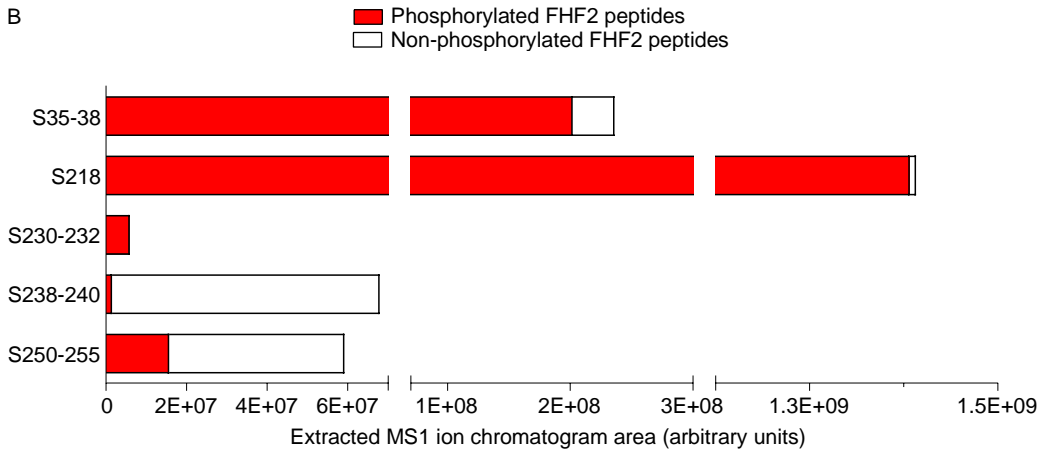


Figure 1.



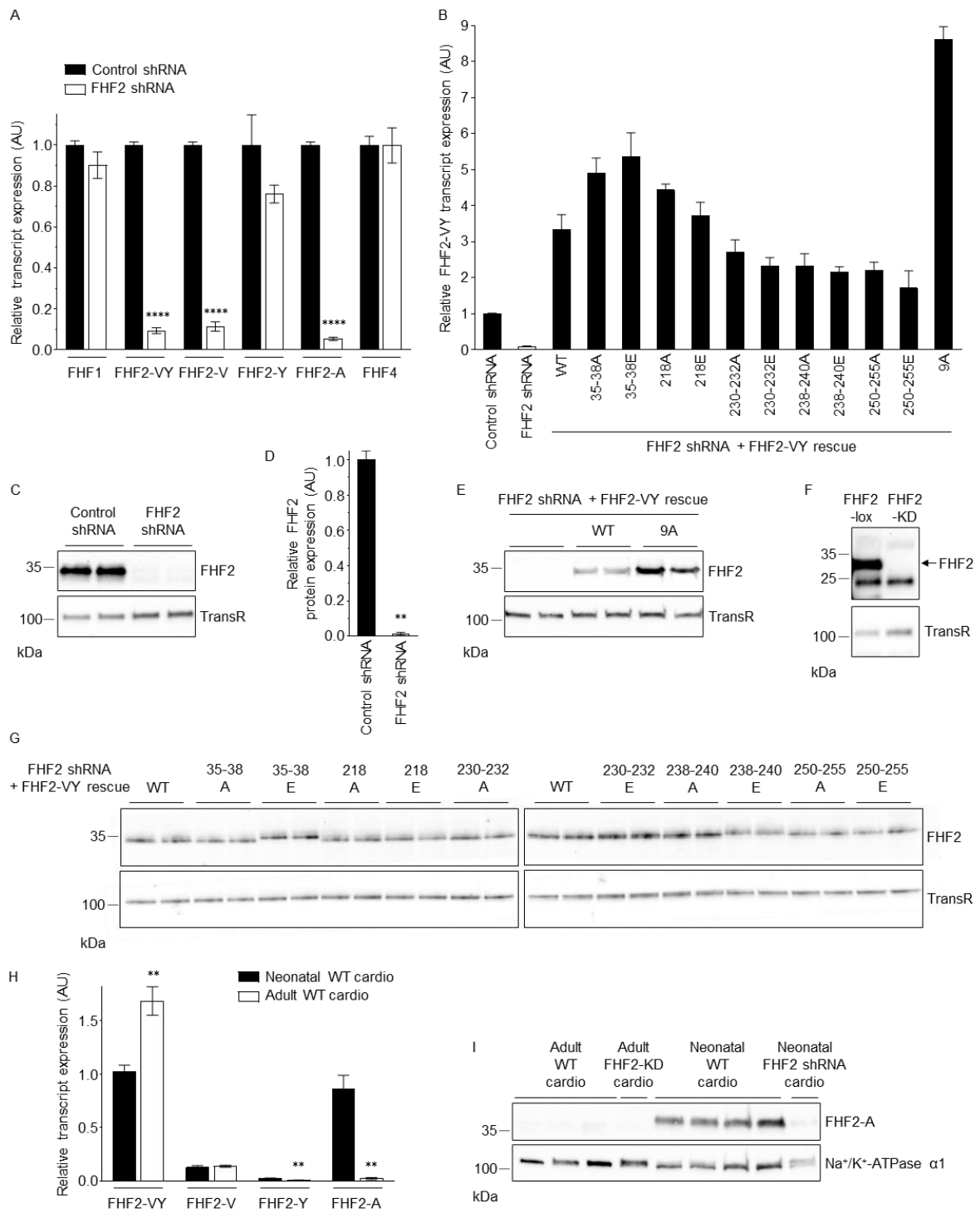


Figure 2.

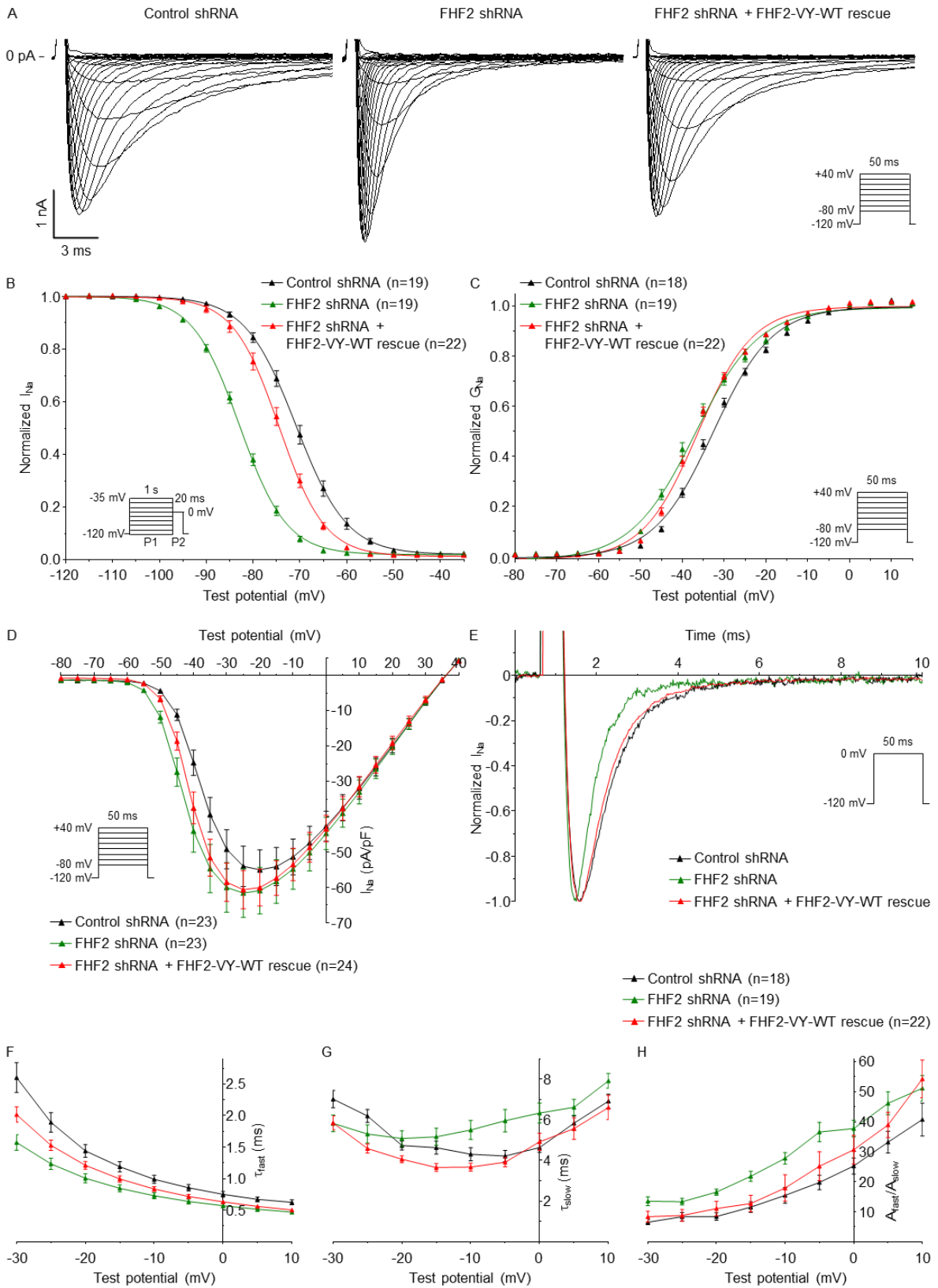


Figure 3.

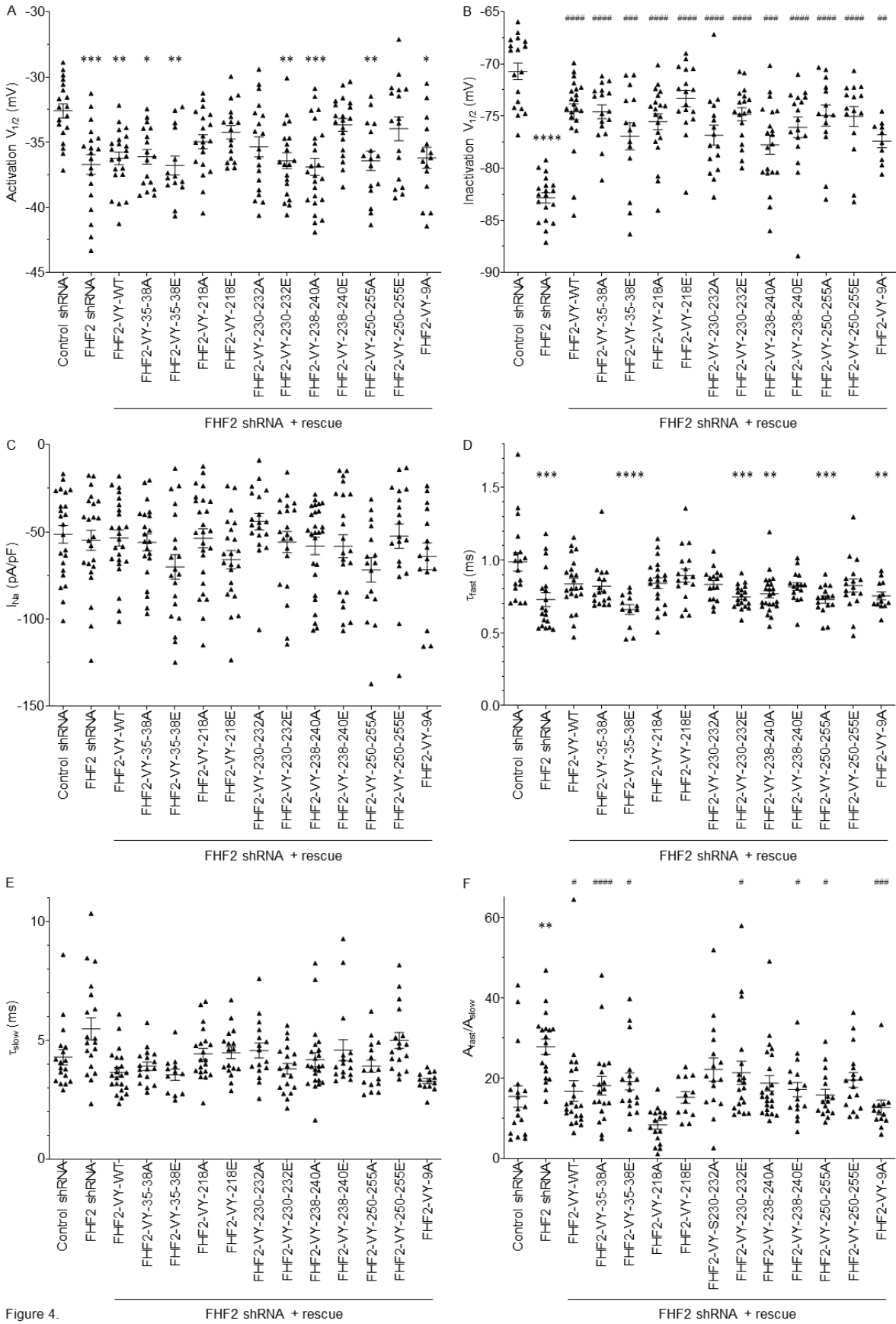


Figure 4.

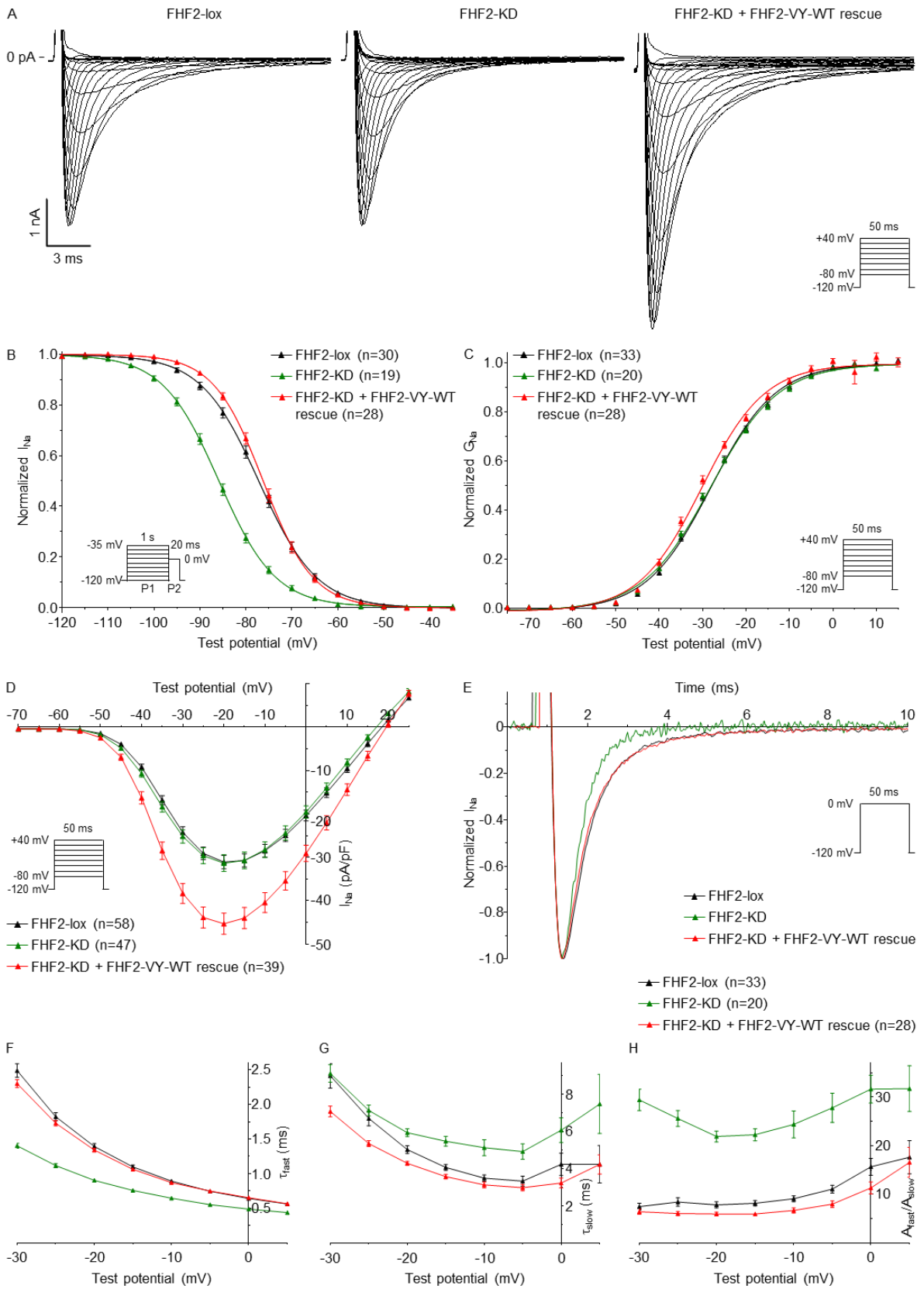


Figure 5.

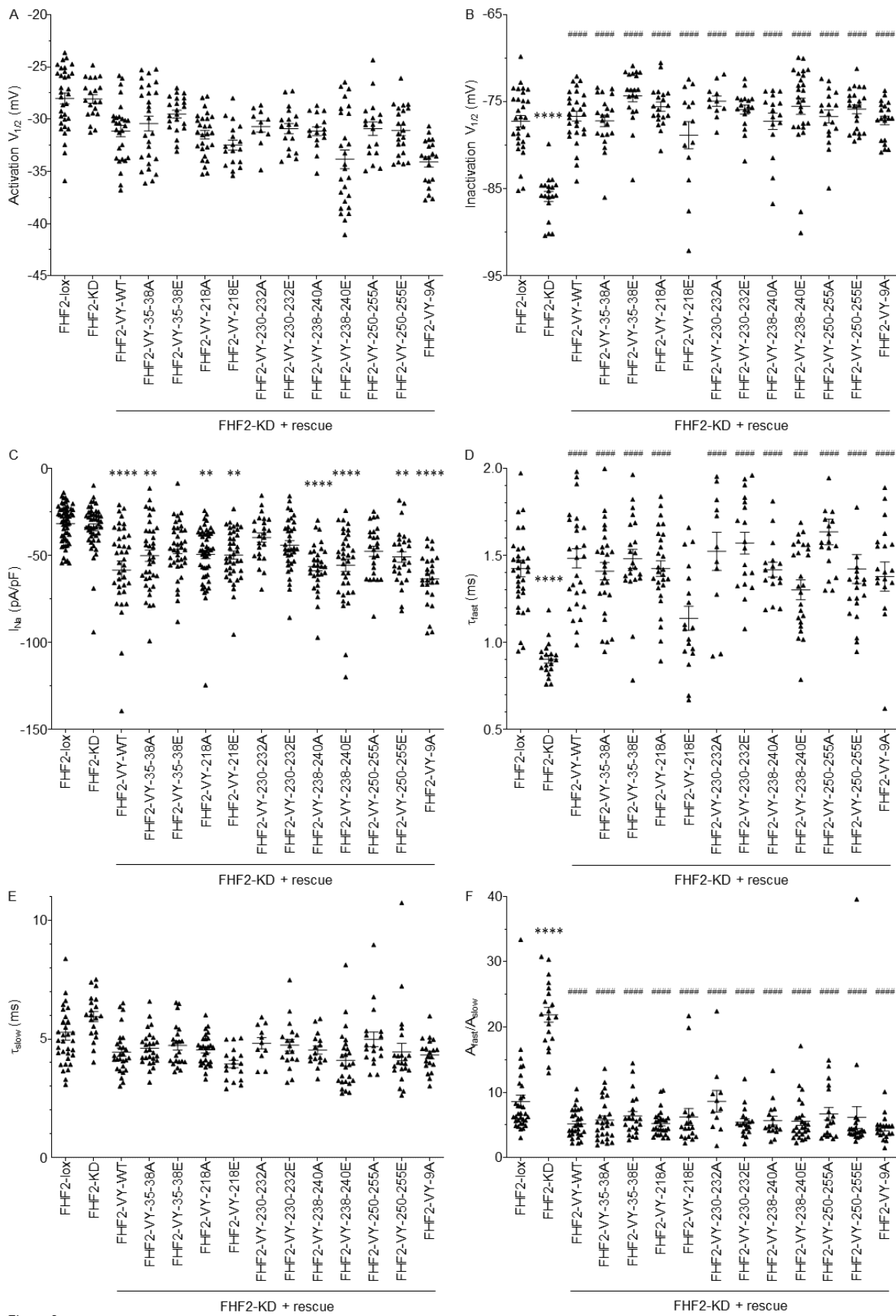


Figure 6.

**Table 1.** Phosphorylation sites, phosphopeptides and site-discriminating ions identified in FHF2 proteins from Na<sub>v</sub> channel complexes purified from adult mouse left ventricles using MS

Phosphorylation site(s)	Phosphopeptide sequence	m/z (charge)	AScore	b ion	Phospho b ion	y ion	Phospho y ion
S35	33-QD(pS)IQSAELK	828.936 (+2)	10	b2 (+1)	b5	y7 (+1)	y8 (+1)
S38	33-QDSIQ(pS)AELK	828.933 (+2)	38	b5 (+1)	(-)	y4 (+1)	(-)
S35 + S38	33-QD(pS)IQ(pS)AELK	868.917 (+2)	1000; 1000	b2 (+1)	b5	y4 (+1)	y5; y8
S218	216-EP(pS)LHDLTEFSR	870.414 (+2)	54	b1 (+1)	b7	y9 (+1)	(-)
S230 + T232	228-SG(pS)G(pT)PTKSR	532.593 (+3)	11; 14	b2	(-)	y5 (+2)	(-)
T232	228-SGSG(pT)PTKSR	505.936 (+3)	8	b4	(-)	y5 (+2)	(-)
S238	236-SR(pS)VSGVLNGGK	566.982 (+3)	9	b2	b3 (+2)	y9	(-)
S240	238-SV(pS)GVLNGGK	728.401 (+2)	1000	b2	(-)	y7	(-)
S250	248-SM(pS)HNEST	609.238 (+2)	2	b2	b5 (+2)	(-)	(-)
T255	248-SMSHNES(pT)	601.240 (+2)	12	b7 (+2)	(-)	(-)	(-)
S250 + S255	248-SM(pS)HNES(pT)	641.226 (+2)	0; 0	b2	(-)	(-)	(-)

The site-discriminating ions observed in MS/MS spectra of each annotated FHF2 phosphopeptide support the assignment of the indicated phosphorylation site(s). The PEAKS AScore is a quality indicator of site localization. The manually verified charge state of unphosphorylated and phosphorylated site-discriminating b and y ions is reported in parentheses. The (-) symbol indicates that the ion was not detected.

**Table 2.** Voltage-gated Na<sup>+</sup> current densities and properties in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes infected with control shRNA, FHF2 shRNA alone or with WT or phosphomutant FHF2-VY-expressing adenoviruses

	I <sub>Na</sub> (pA/pF)	Time to peak (ms)	Time course of inactivation			Voltage-dependence of activation		Voltage-dependence of inactivation		Recovery from inactivation	
			t <sub>fast</sub> (ms)	t <sub>slow</sub> (ms)	A <sub>fast</sub> /A <sub>slow</sub>	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	t <sub>fast</sub> (ms)	t <sub>slow</sub> (ms)
Control shRNA	-51.4 ± 5.1 (23)	1.03 ± 0.05 (19)	0.99 ± 0.06 (18)	4.3 ± 0.3 (18)	15.5 ± 2.6 (18)	-32.6 ± 0.5 (19)	7.0 ± 0.2 (19)	-70.7 ± 0.8 (18)	5.1 ± 0.2 (18)	3.1 ± 0.3 (16)	51.1 ± 8.7 (18)
FHF2 shRNA	-54.9 ± 5.7 (23)	0.92 ± 0.04 (19)	0.73 ± 0.05 (19) ***	5.5 ± 0.5 (19)	27.8 ± 1.9 (19) **	-36.7 ± 0.8 (19) ***	7.5 ± 0.3 (19)	-82.8 ± 0.5 (19) ****	4.9 ± 0.1 (19)	4.0 ± 0.3 (19)	45.4 ± 7.5 (19)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-WT	-53.5 ± 4.6 (24)	0.97 ± 0.03 (23)	0.84 ± 0.04 (22)	3.7 ± 0.2 (22)	16.8 ± 2.6 (22) #	-36.2 ± 0.5 (22) **	6.5 ± 0.2 (22)	-74.6 ± 0.8 (22) #####	4.5 ± 0.1 (22)	2.7 ± 0.1 (19)	56.8 ± 8.5 (19)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-35-38A	-56.0 ± 4.8 (21)	0.90 ± 0.02 (17)	0.82 ± 0.04 (17)	3.9 ± 0.2 (17)	8.4 ± 1.1 (17) #####	-36.1 ± 0.6 (17) *	6.8 ± 0.2 (17)	-74.6 ± 0.7 (17) #####	4.9 ± 0.2 (17)	2.9 ± 0.2 (16)	44.8 ± 10.0 (16)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-35-38E	-70.1 ± 7.1 (20)	0.75 ± 0.02 (14)	0.66 ± 0.03 (12) ****	3.6 ± 0.2 (12)	15.2 ± 1.4 (12) #	-36.8 ± 0.7 (14) **	7.1 ± 0.2 (14)	-76.9 ± 1.3 (14) ###	4.8 ± 0.2 (14)	2.8 ± 0.2 (14)	61.1 ± 7.1 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-218A	-53.7 ± 5.5 (25)	0.91 ± 0.03 (20)	0.86 ± 0.03 (19)	4.3 ± 0.2 (19)	18.2 ± 2.3 (19)	-35.0 ± 0.5 (20)	7.1 ± 0.1 (20)	-75.5 ± 0.8 (20) #####	4.5 ± 0.1 (20)	3.4 ± 0.2 (14)	46.6 ± 3.9 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-218E	-65.9 ± 5.2 (22)	1.00 ± 0.04 (17)	0.89 ± 0.05 (17)	4.5 ± 0.2 (17)	19.2 ± 2.1 (17)	-34.2 ± 0.5 (17)	6.6 ± 0.2 (17)	-73.3 ± 0.8 (17) #####	4.6 ± 0.1 (17)	3.2 ± 0.2 (15)	52.7 ± 8.6 (15)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-230-232A	-44.1 ± 4.8 (19)	0.78 ± 0.04 (19)	0.83 ± 0.03 (16)	4.6 ± 0.3 (16)	22.2 ± 2.9 (16)	-35.4 ± 0.8 (19)	7.7 ± 0.2 (19)	-76.8 ± 1.0 (16) #####	4.8 ± 0.2 (16)	3.1 ± 0.2 (14)	59.3 ± 10.5 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-230-232E	-55.9 ± 6.1 (20)	0.74 ± 0.03 (20)	0.75 ± 0.02 (19) ***	3.8 ± 0.2 (19)	21.4 ± 2.9 (19) #	-36.4 ± 0.6 (20) **	6.7 ± 0.2 (20)	-74.8 ± 0.6 (18) #####	4.4 ± 0.1 (18)	2.4 ± 0.2 (19)	55.1 ± 4.8 (19)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-238-240A	-58.1 ± 4.9 (26)	0.73 ± 0.02 (24)	0.77 ± 0.03 (23) **	4.2 ± 0.3 (23)	18.8 ± 1.9 (23)	-36.9 ± 0.7 (24) ***	7.2 ± 0.2 (24)	-77.8 ± 0.9 (20) #####	4.5 ± 0.1 (20)	2.8 ± 0.1 (18)	64.6 ± 5.0 (18)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-238-240E	-58.3 ± 6.6 (22)	0.77 ± 0.02 (20)	0.82 ± 0.03 (16)	4.6 ± 0.4 (16)	17.2 ± 1.8 (16) #	-33.7 ± 0.5 (20)	7.3 ± 0.1 (20)	-76.1 ± 1.0 (17) #####	4.4 ± 0.1 (17)	2.6 ± 0.2 (12)	64.1 ± 13.2 (12)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-250-255A	-71.8 ± 7.0 (16)	0.75 ± 0.03 (16)	0.73 ± 0.02 (16) ***	3.9 ± 0.3 (16)	15.8 ± 1.4 (16) #	-36.4 ± 0.7 (16) **	6.9 ± 0.2 (16)	-75.0 ± 1.0 (14) #####	4.9 ± 0.2 (14)	2.4 ± 0.1 (14)	65.3 ± 7.1 (14)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-250-255E	-52.4 ± 7.0 (19)	0.79 ± 0.02 (17)	0.82 ± 0.04 (17)	5.0 ± 0.3 (17)	19.6 ± 1.8 (17)	-34.0 ± 0.9 (17)	7.4 ± 0.2 (17)	-75.0 ± 1.0 (15) #####	4.6 ± 0.2 (15)	2.6 ± 0.1 (15)	49.4 ± 5.5 (15)
FHF2 shRNA + FHF2-VY-9A	-64.1 ± 7.7 (15)	0.75 ± 0.02 (15)	0.75 ± 0.03 (13) **	3.3 ± 0.1 (13)	12.7 ± 1.8 (13) ###	-36.2 ± 0.8 (15) *	7.2 ± 0.3 (15)	-77.4 ± 0.6 (10) ##	4.2 ± 0.1 (10)	4.4 ± 0.4 (8)	78.5 ± 7.6 (8)

Whole-cell voltage-gated Na<sup>+</sup> currents were recorded 48 hours following infection of neonatal WT mouse ventricular cardiomyocytes with adenoviruses expressing control shRNA, FHF2 shRNA alone or with wild-type (FHF2-VY-WT), phosphoserine (mutation to alanine) or phosphothreonine (mutation to glutamate) FHF2-VY cDNA constructs using the protocols described in the materials and methods section. The peak Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>) density, time to peak I<sub>Na</sub>, and time course of inactivation properties presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -10 mV (HP=-120 mV). All values are means ± SEM. The number of cells analyzed is provided in parentheses. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 versus control shRNA; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 versus FHF2 shRNA; one-way ANOVA.

**Table 3.** Voltage-gated Na<sup>+</sup> current densities and properties in FHF2-lox and FHF2-KD adult mouse ventricular cardiomyocytes infected or not with WT or phosphomutant FHF2-VY-expressing adenoviruses

	I <sub>Na</sub> (pA/pF)	Time to peak (ms)	Time course of inactivation			Voltage-dependence of activation		Voltage-dependence of inactivation		Recovery from inactivation	
			τ <sub>fast</sub> (ms)	τ <sub>slow</sub> (ms)	A <sub>fast</sub> /A <sub>slow</sub>	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	τ <sub>fast</sub> (ms)	τ <sub>slow</sub> (ms)
FHF2-lox	-31.8 ± 1.4 (58)	1.09 ± 0.03 (33)	1.42 ± 0.05 (33)	5.3 ± 0.3 (33)	8.6 ± 1.0 (33)	-28.0 ± 0.5 (33)	7.5 ± 0.1 (33)	-77.3 ± 0.7 (30)	6.3 ± 0.2 (30)	2.9 ± 0.1 (27)	37.3 ± 1.2 (27)
FHF2-KD	-33.9 ± 2.0 (47)	0.97 ± 0.03 (20)	0.90 ± 0.02 (20)****	5.9 ± 0.2 (20)	21.9 ± 1.1 (20)****	-28.1 ± 0.4 (20)	7.8 ± 0.1 (20)	-85.9 ± 0.6 (19)****	6.1 ± 0.2 (19)	3.0 ± 0.1 (18)	41.9 ± 2.6 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-WT	-58.5 ± 5.3 (39)****	1.02 ± 0.03 (28)	1.48 ± 0.06 (28)####	4.4 ± 0.2 (28)	5.2 ± 0.4 (28)####	-31.2 ± 0.5 (28)	7.1 ± 0.2 (28)	-76.7 ± 0.6 (28)####	5.2 ± 0.1 (28)	3.2 ± 0.2 (27)	45.1 ± 2.5 (27)
FHF2-KD + FHF2-VY-35-38A	-50.2 ± 3.3 (37)**	1.01 ± 0.02 (27)	1.41 ± 0.05 (27)####	4.6 ± 0.1 (27)	5.8 ± 0.6 (27)####	-30.4 ± 0.7 (27)	7.2 ± 0.2 (27)	-77.2 ± 0.7 (21)####	6.0 ± 0.2 (21)	3.4 ± 0.2 (15)	40.2 ± 1.8 (15)
FHF2-KD + FHF2-VY-35-38E	-46.5 ± 2.5 (38)	1.09 ± 0.04 (22)	1.48 ± 0.05 (22)####	4.7 ± 0.2 (22)	6.4 ± 0.7 (22)####	-29.5 ± 0.4 (22)	6.8 ± 0.1 (22)	-74.3 ± 0.7 (20)####	5.6 ± 0.2 (20)	2.7 ± 0.1 (18)	39.9 ± 2.8 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-218A	-49.5 ± 2.4 (49)**	1.04 ± 0.02 (27)	1.42 ± 0.04 (27)####	4.5 ± 0.1 (27)	5.2 ± 0.4 (27)####	-31.5 ± 0.4 (27)	7.1 ± 0.1 (27)	-75.6 ± 0.5 (20)####	5.7 ± 0.1 (20)	3.0 ± 0.2 (20)	38.1 ± 2.1 (20)
FHF2-KD + FHF2-VY-218E	-49.9 ± 2.3 (39)**	0.93 ± 0.04 (18)	1.14 ± 0.07 (18)	3.9 ± 0.2 (18)	6.2 ± 1.3 (18)####	-32.5 ± 0.5 (18)	7.0 ± 0.16 (18)	-78.9 ± 1.6 (14)####	6.6 ± 0.4 (14)	3.0 ± 0.2 (11)	39.4 ± 2.5 (11)
FHF2-KD + FHF2-VY-230-232A	-39.8 ± 2.7 (24)	1.25 ± 0.05 (11)	1.52 ± 0.11 (11)####	4.8 ± 0.2 (11)	8.6 ± 1.6 (11)####	-30.7 ± 0.5 (11)	6.8 ± 0.2 (11)	-74.9 ± 0.6 (11)####	5.0 ± 0.1 (11)	2.8 ± 0.1 (11)	38.2 ± 3.3 (11)
FHF2-KD + FHF2-VY-230-232E	-44.2 ± 2.6 (35)	1.17 ± 0.03 (18)	1.57 ± 0.06 (18)####	4.7 ± 0.2 (18)	5.4 ± 0.5 (18)####	-30.9 ± 0.5 (18)	7.0 ± 0.2 (18)	-75.9 ± 0.5 (18)####	5.1 ± 0.1 (18)	3.1 ± 0.1 (18)	40.9 ± 2.3 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-238-240A	-56.5 ± 2.4 (31)****	1.01 ± 0.03 (16)	1.42 ± 0.04 (16)####	4.5 ± 0.2 (16)	5.7 ± 0.7 (16)####	-31.2 ± 0.4 (16)	7.4 ± 0.2 (16)	-77.3 ± 0.9 (16)####	5.5 ± 0.2 (16)	3.3 ± 0.3 (16)	39.6 ± 2.6 (16)
FHF2-KD + FHF2-VY-238-240E	-55.8 ± 3.5 (35)****	0.94 ± 0.03 (26)	1.30 ± 0.06 (26)###	4.1 ± 0.2 (26)	5.6 ± 0.6 (26)####	-33.8 ± 0.9 (26)	7.2 ± 0.2 (26)	-75.5 ± 0.9 (26)####	5.4 ± 0.2 (26)	2.6 ± 0.2 (26)	35.3 ± 1.8 (26)
FHF2-KD + FHF2-VY-250-255A	-47.7 ± 3.0 (25)	1.08 ± 0.04 (18)	1.63 ± 0.07 (18)####	5.0 ± 0.3 (18)	6.7 ± 0.9 (18)####	-30.9 ± 0.7 (18)	7.1 ± 0.2 (18)	-76.7 ± 0.7 (18)####	5.3 ± 0.2 (18)	3.3 ± 0.3 (18)	51.1 ± 4.0 (18)
FHF2-KD + FHF2-VY-250-255E	-50.9 ± 3.0 (27)**	1.01 ± 0.02 (22)	1.42 ± 0.08 (22)####	4.4 ± 0.4 (22)	6.2 ± 1.7 (22)####	-31.1 ± 0.5 (22)	6.9 ± 0.2 (22)	-75.9 ± 0.5 (22)####	5.0 ± 0.1 (22)	2.8 ± 0.1 (20)	38.7 ± 2.0 (20)
FHF2-KD + FHF2-VY-9A	-63.6 ± 2.9 (26)****	0.98 ± 0.03 (20)	1.38 ± 0.08 (20)####	4.3 ± 0.2 (20)	4.5 ± 0.4 (20)####	-34.1 ± 0.5 (20)	6.6 ± 0.2 (20)	-77.2 ± 0.5 (20)####	5.1 ± 0.1 (20)	3.1 ± 0.2 (20)	37.2 ± 1.5 (20)

Whole-cell voltage-gated Na<sup>+</sup> currents were recorded 48 hours following isolation of FHF2-lox or FHF2-knockdown (FHF2-KD) adult mouse ventricular cardiomyocytes infected or not with wild-type (WT), phosphosilent (mutation to alanine) or phosphomimetic (mutation to glutamate) FHF2-VY-expressing adenoviruses using the protocols described in the materials and methods section. The peak Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>) density, time to peak I<sub>Na</sub>, and time course of inactivation properties presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -20 mV (HP=-120 mV). All values are means ± SEM. The number of cells analyzed is provided in parentheses. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 versus FHF2-lox; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 versus FHF2-KD; one-way ANOVA.

**Table 4.** Late Na<sup>+</sup> current densities in FHF2-lox and FHF2-KD adult mouse ventricular cardiomyocytes infected or not with WT or phosphosilent FHF2-VY-expressing adenoviruses

	FHF2-lox	FHF2-KD	FHF2-KD + FHF2-VY-WT	FHF2-KD + FHF2-VY-9A
I <sub>NaL</sub> (pA/pF)	-0.41 ± 0.04 (25)	-0.53 ± 0.02 (60)*	-0.33 ± 0.02 (38)####	-0.30 ± 0.02 (27)####

The TTX-sensitive late Na<sup>+</sup> current (I<sub>NaL</sub>) densities were measured at -20 mV (HP=-120 mV). All values are means ± SEM. The number of cells analyzed is provided in parentheses. \*p<0.05 versus FHF2-lox; ####p<0.0001 versus FHF2-KD; one-way ANOVA.

**Table Supplement 1.** FHF peptides identified in Na<sub>v</sub> channel complexes purified from adult mouse left ventricles using MS

FHF isoform	Peptide sequence	m/z	Mass error (ppm)	-10lgP score
FHF2	D(+229.16)EDSTYTLF	660.314	0.2	37.7
FHF2	D(+229.16)EDSTYTLFNLIPVGLR	1091.5841	0.7	68.6
FHF2	E(+229.16)GEIM(+15.99)K(+229.16)GNHVK(+229.16)	487.0334	-1.2	38.6
FHF2	E(+229.16)GEIMK(+229.16)	582.8382	-0.7	31.4
FHF2	E(+229.16)PS(+79.97)LHDLTEFSR	870.4138	0	56.5
FHF2	E(+229.16)PSLHDLTEFSR	553.9565	0.7	54.3
FHF2	E(+229.16)SVFENYVYTY	821.8948	-0.9	39.3
FHF2	E(+229.16)SVFENYVYTYSSM	974.4464	-1.5	36.4
FHF2	E(+229.16)SVFENYVYTYSSMIYR	1190.5706	-1.3	67.4
FHF2	F(+229.16)K(+229.16)ESVFENYVYTY	1074.0575	-1.1	48.8
FHF2	F(+229.16)K(+229.16)ESVFENYVYTYSSMIYR	962.1516	-8	66.2
FHF2	F(+229.16)LPK(+229.16)PLK(+229.16)	510.6848	0.8	21.7
FHF2	G(+229.16)TIDGK(+229.16)DEDSTYTLFNLIPVGLR	1028.5565	-3.7	52.7
FHF2	G(+229.16)WYLGKLNK(+229.16)	704.9221	1.1	43.4
FHF2	G(+229.16)WYLGKLNK(+229.16)EGEIMK(+229.16)	775.7797	0	53.1
FHF2	N(+229.16)K(+229.16)PAAHFLPK(+229.16)PLK(+229.16)	476.3113	0.8	57.1
FHF2	N(+229.16)SEGELYTSEHFTPEC(+57.02)K(+229.16)	840.7415	-0.6	59.4
FHF2	Q(+229.16)GYHLQLQADGTIDGK(+229.16)	768.4186	0.8	63.0
FHF2	Q(+229.16)GYHLQLQADGTIDGK(+229.16)DEDSTYTLFNLIPVGLR	1060.0593	-0.6	79.0
FHF2	Q(+229.16)QQSGR	466.7595	0.6	32.7
FHF2	S(+229.16)EGELYTSEHFTPEC(+57.02)K(+229.16)	802.7274	-0.5	57.0
FHF2	S(+229.16)GS(+79.97)GT(+79.97)PTK(+229.16)SR	532.5926	2.3	24.0
FHF2	S(+229.16)GSGT(+79.97)PTK(+229.16)SR	505.9351	-1.7	27.8
FHF2	S(+229.16)M(+15.99)S(+79.97)HNEST	609.2379	-1.8	30.4
FHF2	S(+229.16)MIYR	449.7551	1.2	22.4
FHF2	S(+229.16)MS(+79.97)HNEST	601.2413	-0.3	34.7
FHF2	S(+229.16)MS(+79.97)HNEST(+79.97)	641.2258	1.8	23.5
FHF2	S(+229.16)MSHNEST	561.257	-2.4	44.4
FHF2	S(+229.16)MSHNEST(+79.97)	601.2401	-2.4	38.7
FHF2	S(+229.16)RS(+79.97)VSGVLNGGK(+229.16)	566.9828	2.1	36.9
FHF2	S(+229.16)SMIYR	493.2705	0	31.0
FHF2	S(+229.16)VS(+79.97)GVLNGGK(+229.16)	728.4011	-1.6	47.8
FHF2	S(+229.16)VSGVLNGGK(+229.16)	688.4185	-0.8	55.9
FHF2	V(+229.16)AMYK(+229.16)	535.3282	1	30.0
FHF2	V(+229.16)AMYK(+229.16)EPS(+79.97)LHDLTEF	773.386	-4.6	30.8
FHF2	V(+229.16)AMYK(+229.16)EPS(+79.97)LHDLTEFSR	854.4339	-0.2	61.0
FHF2	V(+229.16)VAIQGVQTK(+229.16)	750.978	-1.7	56.1
FHF2	Y(+229.16)K(+229.16)EPS(+79.97)LHDLTEFSR	754.0508	-1.6	51.8
FHF2-VY	C(+57.02)(+229.16)HEIFC(+57.02)C(+57.02)PLK(+229.16)	607.9788	0.1	52.5
FHF2-VY	E(+229.16)EK(+229.16)DASK(+229.16)	498.6313	1	27.9
FHF2-VY	S(+229.16)GK(+42.01)VTK(+229.16)PK(+229.16)EEK(+229.16)	548.0983	1.9	25.1
FHF2-VY	V(+229.16)LDDAPPQTQEVIMLR	1024.0393	-0.8	66.3
FHF2-VY	V(+229.16)LDDAPPQTQEVIMLRQDS(+79.97)IQS(+79.97)AELK(+229.16)	884.685	-0.4	53.3
FHF2-VY	V(+229.16)LDDAPPQTQEVIMLRQDS(+79.97)IQSAELK(+229.16)	864.6933	-0.6	60.2
FHF2-VY	V(+229.16)TK(+229.16)PK(+229.16)EEK(+229.16)	469.5589	2.9	29.6
FHF2-VY	V(+229.16)TK(+229.16)PK(+229.16)EEK(+229.16)DASK(+229.16)	501.9194	2.1	40.8
FHF2-VY/FHF2-Y	Q(+229.16)DS(+79.97)IQS(+79.97)AELK(+229.16)	868.9174	0.1	43.5
FHF2-VY/FHF2-Y	Q(+229.16)DS(+79.97)IQSAELK(+229.16)	828.936	2.3	43.7
FHF2-VY/FHF2-Y	Q(+229.16)DSIQS(+79.97)AELK(+229.16)	828.9333	-0.9	45.9
FHF2-VY/FHF2-Y	Q(+229.16)DSIQSAELK(+229.16)	788.951	0.1	55.4
FHF1/FHF4	A(+229.16)WFLGLNK(+229.16)	703.9318	0.2	42.2
FHF	N(+229.16)LIPVGLR	555.8643	1.4	24.8

The peptide sequences, m/z, mass errors (in ppm) as well as the -10lgP PEAKS quality scores of unique peptides for each FHF isoform are presented. FHF2 peptides are conserved across the five FHF2 isoforms; FHF2-VY peptides are specific for FHF2-VY; FHF2-VY/FHF2-Y peptides are common to FHF2-VY and FHF2-Y; one FHF1/FHF4 peptide (second last lane) is specific for FHF1 and FHF4; and one FHF peptide (last lane) is conserved across the four FHF (1-4) proteins. Delta masses of amino acid modifications, including phosphorylation (+79.97 Da), are indicated in parentheses at specific sites in peptide sequences.

**Table Supplement 2.** Primer pairs used for SYBR Green quantitative RT-PCR

FHF isoform	Nucleotide sequence
FHF1	5'-AGGCCGCGCATGGTT 5'-TCTGTCCCCTTCATGATTGTA
FHF2-VY	5'-TTCTGCTGCCCGCTGAA 5'-GTATCCCTCGCTGTTCAATTGC
FHF2-V	5'-GCTTCTAAGGAGCCTCAGC 5'-CACCACCCGAAGACCCACAG
FHF2-Y	5'-CGGCTCTGCGGTGTAACAG 5'-CCGAAAGGAAATGTTTGAACA
FHF2-A	5'-CGAGAAATCCAATGCCTGC 5'-CACCACCCGAAGACCCACAG
FHF2-B	5'-GTTAAGGAAGTCATATTCAGAGC 5'-GTATCCCTCGCTGTTCAATTGC
FHF3	5'-CCC GCGGTACCAAGTCACT 5'-CACCTTGGACAGCAGGATGA
FHF4	5'-CAGATGCACCCGGATGGA 5'-CAGAGTGAATTGGTGCTGTCA
HPRT	5'-TGAATCACGTTTGTGTCATTAGTGA 5'-TTCAACTTGCCTCATCTTAGG















## Annexe 2 : Proteomic and functional mapping of cardiac Na<sub>v</sub>1.5 channel phosphorylation sites

**ARTICLE**

# Proteomic and functional mapping of cardiac Na<sub>v</sub>1.5 channel phosphorylation sites

Maxime Lorenzini<sup>1</sup>, Sophie Burel<sup>1</sup> , Adrien Lesage<sup>1</sup> , Emily Wagner<sup>2</sup> , Camille Charrière<sup>1</sup> , Pierre-Marie Chevillard<sup>1</sup>, Bérangère Evrard<sup>1</sup>, Dan Maloney<sup>3</sup>, Kiersten M. Ruff<sup>2</sup>, Rohit V. Pappu<sup>2</sup> , Stefan Wagner<sup>4</sup> , Jeanne M. Nerbonne<sup>5,6</sup> , Jonathan R. Silva<sup>2</sup> , R. Reid Townsend<sup>6,7</sup>, Lars S. Maier<sup>4</sup> , and Céline Marionneau<sup>1</sup> 

**Phosphorylation of the voltage-gated Na<sup>+</sup> (Na<sub>v</sub>) channel Na<sub>v</sub>1.5 regulates cardiac excitability, yet the phosphorylation sites regulating its function and the underlying mechanisms remain largely unknown. Using a systematic, quantitative phosphoproteomic approach, we analyzed Na<sub>v</sub>1.5 channel complexes purified from nonfailing and failing mouse left ventricles, and we identified 42 phosphorylation sites on Na<sub>v</sub>1.5. Most sites are clustered, and three of these clusters are highly phosphorylated. Analyses of phosphosilent and phosphomimetic Na<sub>v</sub>1.5 mutants revealed the roles of three phosphosites in regulating Na<sub>v</sub>1.5 channel expression and gating. The phosphorylated serines S664 and S667 regulate the voltage dependence of channel activation in a cumulative manner, whereas the nearby S671, the phosphorylation of which is increased in failing hearts, regulates cell surface Na<sub>v</sub>1.5 expression and peak Na<sup>+</sup> current. No additional roles could be assigned to the other clusters of phosphosites. Taken together, our results demonstrate that ventricular Na<sub>v</sub>1.5 is highly phosphorylated and that the phosphorylation-dependent regulation of Na<sub>v</sub>1.5 channels is highly complex, site specific, and dynamic.**

## Introduction

Voltage-gated Na<sup>+</sup> (Na<sub>v</sub>) channels are key determinants of myocardial excitability, and defects in Na<sub>v</sub> channel expression or functioning in the context of inherited or acquired cardiac disease increase the propensity to develop lethal arrhythmias (Remme and Bezzina, 2010). Ventricular Na<sub>v</sub> channels, composed primarily of the Na<sub>v</sub>1.5 channel pore-forming subunit, in association with several accessory/regulatory proteins, generate the transient peak Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>) responsible for the action potential upstroke and rapid intercellular conduction. While cardiac myocyte Na<sub>v</sub> channels inactivate quickly, there is a finite probability (~0.5%) of channels remaining open, resulting in the late component of the Na<sup>+</sup> current (I<sub>NaL</sub>), which contributes to determining action potential duration. In the ventricular myocardium, the Na<sub>v</sub>1.5 protein is subject to many post-translational modifications, each of which fine-tunes channel expression and functioning in various physiological and disease contexts. Among the 11 different post-translational modifications previously shown to regulate cardiac Na<sub>v</sub>1.5 channels, phosphorylation at serine,

threonine, and tyrosine residues is certainly the best characterized (reviewed in Marionneau and Abriel, 2015; Pei et al., 2016; Yu et al., 2018; Plant et al., 2020).

A role for phosphorylation in regulating cardiac Na<sub>v</sub>1.5 channels was first suggested in a pioneering study demonstrating that β-adrenergic receptors couple to Na<sub>v</sub> channels not only through a direct G protein pathway but also through an indirect PKA-dependent pathway (Schubert et al., 1989). The involvement of several additional kinases and phosphatases in regulating I<sub>Na</sub> and/or I<sub>NaL</sub> later spotlighted the functional relevance of cardiac Na<sub>v</sub>1.5 channel phosphorylation. Perhaps most strikingly, progress in mass spectrometry (MS)-based phosphoproteomic analyses recently buttressed the field by revealing the existence of multiple phosphorylation sites on native ventricular (Marionneau et al., 2012b; Burel et al., 2017) and heterologously expressed (Herren et al., 2015) Na<sub>v</sub>1.5 channels. Yet, little is known about the roles and detailed molecular mechanisms that underlie phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na<sub>v</sub>1.5 channels.

<sup>1</sup>Université de Nantes, Centre national de la recherche scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, l'Institut du thorax, Nantes, France;

<sup>2</sup>Department of Biomedical Engineering, Washington University in Saint Louis, St. Louis, MO; <sup>3</sup>Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canada; <sup>4</sup>Department of Internal Medicine II, University Heart Center, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany; <sup>5</sup>Department of Developmental Biology, Washington University Medical School, St. Louis, MO; <sup>6</sup>Department of Medicine, Washington University Medical School, St. Louis, MO; <sup>7</sup>Department of Cell Biology and Physiology, Washington University Medical School, St. Louis, MO.

Correspondence to Céline Marionneau: [celine.marionneau@univ-nantes.fr](mailto:celine.marionneau@univ-nantes.fr).

© 2021 Lorenzini et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

Phosphorylation of Na<sub>v</sub>1.5 channels has also recently been suggested as an arrhythmogenic mechanism in heart failure (Wagner et al., 2006; Maltsev et al., 2008; Koval et al., 2012; Aiba et al., 2013; Toischer et al., 2013; Glynn et al., 2015). The Na<sub>v</sub> channel defects associated with heart failure are most often characterized by increased I<sub>NaL</sub> and/or decreased I<sub>Na</sub>, contributing to action potential prolongation and conduction slowing, respectively (Zicha et al., 2004; Valdivia et al., 2005; Maltsev et al., 2007; Xi et al., 2009; Aiba et al., 2013; Toischer et al., 2013). The increase in I<sub>NaL</sub> has reportedly been linked to the activation of kinases, mainly the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII; Wagner et al., 2006; Maltsev et al., 2008; Aiba et al., 2013; Toischer et al., 2013), and several studies have focused on identifying the CaMKII-dependent Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation sites (Hund et al., 2010; Ashpole et al., 2012; Herren et al., 2015; Burel et al., 2017). Notably, increased CaMKII-dependent Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation at serine 571 has been reported and suggested to increase I<sub>NaL</sub> in nonischemic human heart failure (Koval et al., 2012) and in animal models of heart disease (Koval et al., 2012; Toischer et al., 2013; Glynn et al., 2015). Nevertheless, Na<sub>v</sub>1.5 channel phosphorylation may not be the sole mechanism involved in the observed pathophysiological defects, as other evidence suggests roles for up-regulation of the neuronal Na<sub>v</sub>1.1 (Xi et al., 2009; Mishra et al., 2015), Na<sub>v</sub>1.6 (Xi et al., 2009), or Na<sub>v</sub>1.8 (Dybkovala et al., 2018) channels. Intensive investigations were also undertaken to understand the causes of the reduced I<sub>Na</sub>; yet, the detailed underlying molecular mechanisms remain unclear. While most studies failed to detect any changes in Na<sub>v</sub>1.5 transcript or total protein expression in failing human hearts (Kääb et al., 1998) or in animal models of heart failure (Zicha et al., 2004; Valdivia et al., 2005), several mechanisms have been suggested to contribute to reduced I<sub>Na</sub>, including the generation of a C-terminal truncation splicing variant switch in Na<sub>v</sub>1.5 transcripts (Shang et al., 2007; Noyes et al., 2017), elevated NADH and reactive oxygen species production (Liu et al., 2013), or increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and subsequent increased expression of the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2 (Luo et al., 2017). In line with reduced I<sub>Na</sub>, a recent study using high-resolution imaging and functional techniques showed a reduction in Na<sub>v</sub>1.5 cluster size and a corresponding decreased number of open channels at the lateral membranes of ventricular myocytes from mice subjected to transverse aortic constriction (TAC), without any changes in Na<sub>v</sub>1.5 transcript or total protein expression (Rivaud et al., 2017).

In this study, we investigated the patterns of phosphorylation of native mouse left ventricular Na<sub>v</sub>1.5 channels and the roles of identified phosphorylation sites in regulating Na<sub>v</sub>1.5 channel expression and functioning. Using quantitative MS-based phosphoproteomic analyses, we identified and quantified in situ the native phosphorylation sites of the Na<sub>v</sub>1.5 in a mouse model of pressure overload-induced heart failure produced by TAC. By analyzing the expression and the functional properties of phosphosilent and phosphomimetic Na<sub>v</sub>1.5 mutant channels in human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells, as well as simulating the consequences of phosphorylation on Na<sub>v</sub>1.5 peptide segment expansion, we identified phosphorylation

hot spots for regulation of both channel cell surface expression and gating.

## Materials and methods

### Statement on the use of murine tissue

All investigations conformed to Directive 2010/63/EU of the European Parliament, to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (Publication No. 85-23, revised 1985), and to local institutional guidelines.

### Animal model of heart failure

Heart failure was induced by TAC as described previously (Toischer et al., 2013). 8-wk-old male C57BL/6J mice were anesthetized using intraperitoneal injections of medetomidine (0.5 mg/kg), midazolam (5 mg/kg), and fentanyl (0.05 mg/kg body weight). A horizontal incision (1–1.5 cm) at the jugulum was used to display the transverse aorta, and a 27-gauge needle was tied against the aorta using a 6-0 nonabsorbable suture. After removal of the 27-gauge needle, the skin was closed, and the mice were kept on a heating plate until they recovered from the anesthesia. Sham animals underwent the same procedure except for the banding of the transverse aorta. At the end of the surgery, anesthesia was antagonized using intraperitoneal injections of atipamezole (2.5 mg/kg), flumazenil (0.5 mg/kg), and buprenorphine (0.1 mg/kg body weight). For analgesia, metamizole (1.33 mg/ml) was added to the drinking water 2 d before surgery and was supplied for 7 d after operation. In addition, buprenorphine (60 μg/kg body weight) was administered subcutaneously 1 h before surgery. A TAC with a mean gradient of <5 mm Hg was deemed insufficient to induce heart failure, and if observed, the animal was excluded from later analysis. Mice were sacrificed 5 wk after TAC by cervical dislocation, and left ventricles were harvested, flash frozen, and stored for further analyses.

### Mouse echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed blinded before and 5 wk after TAC using a Vevo 3100 system (VisualSonics) equipped with a 30-MHz center frequency transducer, as described previously (Toischer et al., 2013). The animals were initially anesthetized with 3% isoflurane, while temperature-, respiration-, and electrocardiogram-controlled anesthesia was maintained with 1.5% isoflurane. 2-D cine loops with frame rates of >200 frames/s of a long-axis view and a short-axis view at the midlevel of the papillary muscles, as well as M-mode loops of the short-axis view, were recorded. Thicknesses of the anterior and posterior walls of the left ventricle, the inner diameter of the left ventricle (LVID), and the area of the left ventricular cavity were measured in systole and diastole from the short-axis view according to standard procedures (Gao et al., 2011). Maximal left ventricular length was measured from the long-axis view. Systolic and diastolic left ventricular volumes were calculated using the area-length method, and the ejection fraction was derived. Left ventricular mass (LVM) was calculated from anterior and posterior wall thicknesses using Vevo LAB Software (VisualSonics).

Pulsed-wave Doppler ultrasound was used to assess mean gradients 3 d after the TAC procedure.

### Immunoprecipitation (IP) of Na<sub>v</sub> channel complexes

Flash-frozen left ventricles from four sham and five TAC mice were homogenized individually in ice-cold lysis buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% amidolysobetaine, 1× complete protease inhibitor cocktail tablet, 1 mM PMSF, 0.7 μg/ml pepstatin A (Thermo Fisher Scientific), and 1× Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) as described previously (Marionneau et al., 2012b). All reagents were from Sigma-Aldrich unless otherwise noted. After 15-min rotation at 4°C, 8 mg of the soluble protein fractions were precleared with 200 μl of protein G-magnetic Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) for 1 h and subsequently used for IPs with 48 μg of an anti-Na<sub>v</sub>PAN mouse mAb (mαNa<sub>v</sub>PAN, S8809; Sigma-Aldrich) raised against the SP19 epitope (Vassilev et al., 1988) located in the third intracellular linker loop and common to all Na<sub>v</sub> channel pore-forming subunits. Prior to the IP, antibodies were cross-linked to 200 μl of protein G-magnetic Dynabeads using 20 mM dimethyl pimelimidate (Thermo Fisher Scientific; Schneider et al., 1982). Protein samples and antibody-coupled beads were mixed for 2 h at 4°C. Magnetic beads were then collected and washed rapidly four times with ice-cold lysis buffer, and isolated protein complexes were eluted from the beads in 1× SDS sample buffer (Bio-Rad Laboratories) at 60°C for 10 min. 99% of the immunoprecipitated mouse left ventricular Na<sub>v</sub> channel protein complexes were analyzed by MS, and the remaining 1% were used to verify IP yields by Western blotting using a rabbit polyclonal anti-Na<sub>v</sub>1.5 antibody (RbαNa<sub>v</sub>1.5, 1:1,000, ASC-005; Alomone Laboratories).

### Peptide preparation and isobaric labeling for liquid chromatography (LC)-MS

The IP eluates were thawed on ice, reduced, and denatured by heating for 10 min at 95°C. The Cys residues were alkylated with iodoacetamide (10 mM) for 45 min at room temperature in the dark. The peptides were prepared using a modification (Erde et al., 2014) of the filter-aided sample preparation method (Wiśniewski et al., 2009). After the addition of 300 μl of 100 mM Tris buffer (pH 8.5) containing 8 M urea (UT buffer) and vortexing, the samples were transferred to YM-30 filter units (MRCFOR030; EMD Millipore) and spun for 14 min at 10,000 rcf (model 5424; Eppendorf). The filters were washed with 200 μl of UT buffer, and the spin-wash cycle was repeated twice. The samples were then exchanged into digest buffer with the addition of 200 μl of 50 mM Tris buffer, pH 8.0, followed by centrifugation (10,000 rcf for 10 min). After transferring the upper filter units to new collection tubes, 80 μl of digest buffer were added, and the samples were digested with trypsin (1 μg) for 4 h at 37°C. The digestion was continued overnight after adding another aliquot of trypsin. The filter units were then spun for 10 min (10,000 rcf) in an Eppendorf microcentrifuge. The filter was washed with 50 μl of Tris buffer (100 mM, pH 8.0), followed by centrifugation. The digests were extracted three times with 1 ml ethyl acetate and acidified to 1% trifluoroacetic acid (TFA) using a 50% aqueous solution. The pH was <2.0 by checking

with pH paper. The solid-phase extraction of the peptides was performed using porous graphite carbon microtips (Chen et al., 2012). The peptides were eluted with 60% acetonitrile in 0.1% TFA and pooled for drying in a Speed-Vac (model Savant DNA 120 concentrator; Thermo Fisher Scientific) after adding TFA to 5%. The peptides were dissolved in 20 μl of 1% acetonitrile in water. An aliquot (10%) was removed for quantification using the Pierce Quantitative Fluorometric Peptide Assay Kit (23290; Thermo Fisher Scientific). The remainder of the peptides from each IP sample (~0.5–3.5 μg) and 1.16 μg of reference pool peptide were transferred into a new 0.5-ml Eppendorf tube, dried in the Speed-Vac, and dissolved in 12 μl HEPES buffer (100 mM, pH 8.0, H3537; Sigma-Aldrich).

The samples were labeled with tandem mass tag (TMT) reagents (TMT11; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The labeled samples were pooled, dried, and resuspended in 120 μl of 1% formic acid (FA). The TMT11-labeled sample was desalted as described above for the unlabeled peptides. The eluates were transferred to autosampler vials (200046; SUN-SRi), dried, and stored at –80°C for capillary LC interfaced to a mass spectrometer (nanoscale LC-MS).

### Nanoscale LC-MS

The samples in FA (1%) were loaded (2.5 μl) onto a 75-μm ID × 50-cm Acclaim PepMap 100 C18 RSLC column (Thermo Fisher Scientific) on an EASY nano-LC (Thermo Fisher Scientific). The column was equilibrated using constant pressure (700 bar) with 20 μl of solvent A (0.1% FA). The peptides were eluted using the following gradient program with a flow rate of 300 nl/min and using solvents A and B (acetonitrile with 0.1% FA): solvent A containing 5% B for 1 min, increased to 25% B over 87 min, to 35% B over 40 min, to 70% B in 6 min and constant 70% B for 6 min, to 95% B over 2 min and constant 95% B for 18 min. The data were acquired in data-dependent acquisition mode. The mass spectrum of peptide precursors (MS1) scans were acquired with the Orbitrap mass analyzer over mass-to-charge ratio = 375–1,500 and with resolution set to 70,000. 12 data-dependent high-energy collisional dissociation spectra (MS2) were acquired from each MS1 scan with a mass resolving power set to 35,000, a range of mass-to-charge ratio = 100–1,500, an isolation width of 2 Th, and a normalized collision energy setting of 32%. The maximum injection time was 60 ms for parent ion analysis and 120 ms for product ion analysis. The ions that were selected for MS2 were dynamically excluded for 20 s. The automatic gain control was set at a target value of 3e6 ions for MS1 scans and 1e5 ions for MS2. Peptide ions with charge states of 1 or ≥7 were excluded for higher-energy collision-induced dissociation acquisition.

### MS data analysis

Peptide identification from raw MS data was performed using PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc.; Zhang et al., 2012). The Uni-mouse-Reference-20131008 protein database was used for spectral matching. The precursor and product ion mass tolerances were set to 20 ppm and 0.05 D, respectively, and the enzyme cleavage specificity was set to trypsin, with a maximum of three missed cleavages allowed. Carbamidomethylation



(Cys) and TMTs (Lys and/or peptide N terminus) were treated as fixed modifications, while oxidation (Met), pyroglutamination (Gln), deamidation (Asn and/or Gln), methylation (Lys and/or Arg), dimethylation (Lys and/or Arg), acetylation (Lys), and phosphorylation (Ser, Thr, and/or Tyr) were considered variable modifications. The definitive annotation of each Na<sub>v</sub>1.5 phosphopeptide–spectrum match was obtained by manual verification and interpretation. The phosphorylation site assignments were based on the presence or absence of the unphosphorylated and phosphorylated b and y ions flanking the site(s) of phosphorylation, ions referred to as “site-discriminating ions” throughout this study. When site-discriminating ions were not all detected, the assignment of phosphorylation sites was narrowed down to several possibilities by elimination (for example, pS1056 and/or pT1058). Representative MS/MS spectra, PEAKS –10lgP scores, mass errors of parent ions (in ppm), and charge state confirmations of site-discriminating b and y ions are presented in Table 2, Table S3, and Data S1.

The protein and peptide relative abundances in TAC versus sham mαNa<sub>v</sub>PAN-IPs were calculated using quantification of TMT reporter ions. Reporter ion intensities in each TMT channel were normalized to the mean reporter ion intensities of Na<sub>v</sub>1.5-derived peptides (normalization to spike) to correct for differences in IP yields and technical variabilities. Normalization factors are presented in Fig. S1 B. Quantification values of each peptide–spectrum match were exported into Excel, and the mean peptide abundance ratios were calculated from the abundance ratios of all manually verified peptide–spectrum matches assigning to the phosphorylation site(s) of interest. Label-free quantitative analysis of the areas of extracted MS1 chromatograms of phosphorylated and nonphosphorylated peptide ions covering the phosphorylation site(s) of interest was used to evaluate the proportion of phosphorylated to nonphosphorylated peptides at each position, as well as the relative abundances of phosphopeptides.

### Plasmids

The Na<sub>v</sub>1.5 phosphomutant constructs were generated by mutating the serine(s)/threonine(s) to alanine(s) (A) or glutamate (E), as well as aspartate(s) (D) in the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D quadruple phosphomimetic channel, by site-directed mutagenesis of a pCI-Na<sub>v</sub>1.5 plasmid containing the human Na<sub>v</sub>1.5 hHIC cDNA (Makielski et al., 2003; National Center for Biotechnology Information reference sequence NM\_000335) using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) or the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs). The mutated constructs were then digested with restriction endonucleases to excise the mutated fragments, which were then subcloned into the original pCI-Na<sub>v</sub>1.5 plasmid. The human Na<sub>v</sub>β1 (NM\_001037; a gift from A.L. George, Department of Pharmacology, Northwestern University, Evanston, IL) cDNAs were subcloned into pRc/cytomegalovirus. All constructs were sequenced to ensure that no unintentional mutations were introduced.

### Culture and transient transfections

HEK-293 cells were maintained in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (Thermo Fisher Scientific), supplemented with 10%

FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air incubator. Cells were transiently transfected at 70–80% confluence in 35-mm dishes with 0.6 μg of the WT or phosphomutant Na<sub>v</sub>1.5 plasmid and 1.2 μg of the Na<sub>v</sub>β1 plasmid using 2 μl Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer’s instructions. For whole-cell recordings, transfections also contained 0.2 μg of the pEGFP plasmid (enhanced GFP plasmid; Clontech), and EGFP expression served as a marker of transfection. The absolute amounts of the various constructs were calculated, and the empty pcDNA3.1 plasmid was used as a filler plasmid to keep the total DNA constant at 2 μg in each transfection.

### Electrophysiological recordings

Whole-cell Na<sub>v</sub> currents were recorded at room temperature from transiently transfected HEK-293 cells using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments/Molecular Devices) 48 h after transfection. Voltage-clamp protocols were applied using the pClamp 10.2 software package (Axon Instruments) interfaced to the electrophysiological equipment using a Digidata 1440A digitizer (Axon Instruments). Current signals were filtered at 10 kHz before digitization at 50 kHz and storage. Patch-clamp pipettes were fabricated from borosilicate glass (OD, 1.5 mm; ID, 0.86 mm; Sutter Instrument) using a P-97 micropipette puller (Sutter Instrument), coated with wax, and fire polished to a resistance between 1.5 and 2.5 MΩ when filled with internal solution. The internal solution contained (in mM) 5 NaCl, 115 CsF, 20 CsCl, 10 HEPES, and 10 EGTA (pH 7.35 with CsOH, ~300 mosM). The external solution contained (in mM) 10 NaCl (20 NaCl for analysis of single phosphomutants), 103 CsCl, 25 TEA-Cl, 10 HEPES, 5 glucose, 1 CaCl<sub>2</sub>, and 2 MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4 with CsOH, ~300 mosM). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. After establishing the whole-cell configuration, 3 min were allowed to ensure stabilization of voltage-dependence of activation and inactivation properties, at which time 25-ms voltage steps to ±10 mV from a holding potential (HP) of –70 mV were applied to allow measurement of whole-cell C<sub>m</sub>, input, and series resistances. Only cells with access resistance <7 MΩ were used, and input resistances were typically >5 GΩ. After compensation of series resistance (80%), the membrane was held at an HP of –120 mV, and the voltage-clamp protocols were performed as indicated below. Leak currents were always <200 pA at HP (–120 mV) and were corrected offline. Cells exhibiting peak current amplitudes <500 or >5,000 pA were excluded from analyses of biophysical properties because of leak or voltage-clamp issues, respectively, but were conserved in analyses of peak current density to avoid bias in evaluation of current densities.

Data were compiled and analyzed using ClampFit 10.2 (Axon Instruments), Microsoft Excel, and Prism (GraphPad Software). Whole-cell C<sub>m</sub> values were determined by analyzing the decays of capacitive transients elicited by brief (25-ms) voltage steps to ±10 mV from the HP (–70 mV). Input resistances were calculated from the steady-state currents elicited by the same ±10-mV steps (from the HP). Series resistances were calculated by dividing the decay time constants of the capacitive transients (fitted with single exponentials) by the C<sub>m</sub>. To determine peak Na<sup>+</sup> I-V

relationships, currents were elicited by 50-ms depolarizing pulses to potentials ranging from  $-80$  to  $+40$  mV (presented at 5-s intervals in 5-mV increments) from an HP of  $-120$  mV. Peak current amplitudes were defined as the maximal currents evoked at each voltage. Current amplitudes were leak corrected and normalized to the  $C_m$ , and current densities are presented.

To analyze voltage dependence of current activation properties,  $G$  values were calculated, and  $G$ - $V$  relationships were fitted with the Boltzmann equation  $G = G_{\max}/\{1 + \exp[-(V_m - V_{1/2}) / k]\}$ , in which  $V_{1/2}$  is the membrane potential of half-activation and  $k$  is the slope factor. The time courses of inactivation of macroscopic currents were fitted with biexponential functions,  $I(t) = A_{\text{fast}} \times \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_{\text{slow}} \times \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + A_0$ , in which  $A_{\text{fast}}$  and  $A_{\text{slow}}$  are the amplitudes of the fast and slow inactivating current components, respectively, and  $\tau_{\text{fast}}$  and  $\tau_{\text{slow}}$  are the decay time constants of  $A_{\text{fast}}$  and  $A_{\text{slow}}$ , respectively. A standard two-pulse protocol was used to examine the voltage dependences of steady-state inactivation. From an HP of  $-120$  mV, 1-s conditioning pulses to potentials ranging from  $-120$  to  $-45$  mV (in 5-mV increments) were followed by 20-ms test depolarizations to  $-20$  mV (interpulse intervals were 5 s). Current amplitudes evoked from each conditioning voltage were measured and normalized to the maximal current ( $I_{\max}$ ) evoked from  $-120$  mV, and normalized currents were plotted as a function of the conditioning voltage. The resulting steady-state inactivation curves were fitted with the Boltzmann equation  $I = I_{\max}/\{1 + \exp[(V_m - V_{1/2}) / k]\}$ , in which  $V_{1/2}$  is the membrane potential of half-inactivation and  $k$  is the slope factor. To examine the rates of recovery from inactivation, a three-pulse protocol was used. Cells were first depolarized to  $-20$  mV (from an HP of  $-120$  mV) to inactivate the channels and subsequently repolarized to  $-120$  mV for varying times (ranging from 1 to 200 ms), followed by test depolarizations to  $-20$  mV to assess the extent of recovery (interpulse intervals were 5-s). The current amplitudes at  $-20$  mV, measured following each recovery period, were normalized to the maximal current amplitude and plotted as a function of the recovery time. The resulting plot was fitted with a single exponential function  $I(t) = A \times [1 - \exp(-t/\tau_{\text{rec}})]$  to determine the recovery time constant. For each of these biophysical properties, data from individual cells were first fitted and then averaged.

The currents generated on expression of each phosphosilent and phosphomimetic  $\text{Na}_v1.5$  mutant were recorded and compared with currents generated by the  $\text{Na}_v1.5$ -WT construct obtained on the same days of patch-clamp analyses. The densities and properties of  $\text{Na}_v1.5$ -WT currents in each dataset were similar, and, for the sake of clarity, a single representative  $\text{Na}_v1.5$ -WT channel dataset was chosen and presented in Fig. S3 and Tables 3 and 4.

In experiments aimed at recording the tetrodotoxin (TTX)-sensitive  $I_{\text{NaL}}$ , cells were bathed in external solution containing (in mM) 120 NaCl, 25 TEA-Cl, 10 HEPES, 5 glucose, 1  $\text{CaCl}_2$ , and 2  $\text{MgCl}_2$  (pH 7.4 with CsOH,  $\sim 300$  mosM). Repetitive 350-ms test pulses to  $-20$  mV from an HP of  $-120$  mV (at 5-s intervals) were applied to cells to record  $I_{\text{Na}}$  in the absence of TTX. Cells were then superfused locally with the external solution supplemented with 30  $\mu\text{M}$  TTX (Bio-Techne SAS). Only cells

exhibiting peak current amplitudes  $>4,000$  pA were used (those with peak currents  $<4,000$  pA did not show measurable  $I_{\text{NaL}}$ ), and cells with difference in leak current amplitudes before and after TTX application  $>5$  pA at  $-20$  mV (calculated from leak currents at  $-120$  mV) were excluded from analyses. TTX-sensitive currents from individual cells were determined by offline digital subtraction of average leak-subtracted currents obtained from five recordings in the absence and in the presence of TTX after achieving steady state. The amplitude of TTX-sensitive  $I_{\text{NaL}}$  was defined as the steady-state current amplitude ( $A_0$ ) obtained by fitting the inactivation decay of macroscopic TTX-sensitive current with the double-exponential function  $I(t) = A_{\text{fast}} \times \exp(-t/\tau_{\text{fast}}) + A_{\text{slow}} \times \exp(-t/\tau_{\text{slow}}) + A_0$ . For each cell, the TTX-sensitive  $I_{\text{NaL}}$  amplitude was normalized to the peak  $I_{\text{Na}}$  amplitude and expressed as a percentage of the peak  $I_{\text{Na}}$ .

### Cell surface biotinylation and Western blot analyses

Surface biotinylation of HEK-293 cells was completed as described previously (Marionneau et al., 2012a). Briefly, cells were incubated with the cleavable EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.5 mg/ml; Thermo Fisher Scientific) in ice-cold PBS (pH 7.4) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . Free biotin was quenched with Tris-saline (10 mM Tris [pH 7.4], 120 mM NaCl), and detergent-soluble cell lysates were prepared. Biotinylated cell surface proteins were affinity purified using NeutrAvidin-conjugated agarose beads (Thermo Fisher Scientific), and purified cell surface proteins were analyzed by Western blot using the  $\text{mNa}_v\text{PAN}$  antibody (1:2,000, S8809; Sigma-Aldrich), the anti-transferrin receptor mouse mAb (TransR, 1:1000, Thermo Fisher Scientific), and the anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mouse mAb (anti-GAPDH, 1:100,000; Santa Cruz Biotechnology). Bound primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies (Cell Signaling Technology), and protein signals were visualized using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific). Bands corresponding to  $\text{Na}_v1.5$  were normalized to bands corresponding to TransR from the same sample.  $\text{Na}_v1.5$  phosphomutant protein expression (total or cell surface) is expressed relative to  $\text{Na}_v1.5$ -WT protein expression (total or cell surface).

### Molecular simulations

Molecular simulations were performed with the CAMPARI software package (Vitalis and Pappu, 2009b) using the ABSINTH implicit solvation model (Vitalis and Pappu, 2009a) and parameters from the all-atom optimized potentials for liquid simulations force field. Markov chain Metropolis Monte Carlo moves sampled the conformational space of each protein segment. To mimic a 5 mM NaCl concentration, neutralizing and excess  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions were modeled explicitly with the protein segments in spherical droplets of ( $5 \times$  number of residues)  $\text{\AA}$  radius. 10 simulation runs were performed for each sequence construct, and the average of these 10 runs was then plotted. The simulations denoted as EV (excluded volume) and FRC (Flory random coil) are reference models. In the EV limit, the only interactions considered are the pairwise repulsions. In the FRC

limit, conformations are constructed by randomly sampling residue-specific backbone dihedral angles. Three EV and three FRC simulation runs were performed for each protein segment, and the averages were plotted.

### Statistical analyses

Results are expressed as means  $\pm$  SEMs. Data were first tested for normality using the D'Agostino and Pearson normality test. Depending on the results of normality tests, statistical analyses were then performed using the Mann-Whitney nonparametric test, Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Dunn's post-hoc test, or one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test, as indicated in figures and tables. All these analyses, as well as plots and graphs, were performed using Prism software (GraphPad Software).

### Online supplemental material

The supplemental figures and tables show multiple pieces of raw or analyzed data to complement the main figures as explicated in the text. Fig. S1 shows IP yields and relative quantification of Na<sub>v</sub>1.5 peptide abundances from sham and TAC mouse left ventricles. Fig. S2 shows conservation of phosphorylation sites in mouse and human Na<sub>v</sub>1.5. Fig. S3 shows distributions and mean  $\pm$  SEM membrane potentials for half-activation and half-inactivation, peak I<sub>Na</sub> densities, and time constants of recovery from inactivation of WT and mutant Na<sub>v</sub>1.5 channels. Fig. S4 shows distributions and mean  $\pm$  SEM of TTX-sensitive I<sub>NaL</sub> densities of quadruple S664-671 and simple S671 Na<sub>v</sub>1.5 phosphomutants. Data S1 shows representative MS/MS spectra corresponding to the phosphopeptides enabling the best phosphorylation site assignment(s) for each phosphorylation site. Table S1 lists echocardiographic parameters of sham and TAC mice before and 5 wk after surgery. Table S2 summarizes Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation sites identified in the present and previous studies. Table S3 lists phosphorylation sites, phosphopeptides, and site-discriminating ions identified in coimmunoprecipitated Na<sub>v</sub>  $\alpha$  subunits from sham and TAC mouse left ventricles using MS.

## Results

### Purification and characterization of Na<sub>v</sub> channel complexes from sham and TAC mouse left ventricles

Na<sub>v</sub> channel complexes from four sham-operated and five TAC mouse left ventricles were purified by IP using an mNa<sub>v</sub>PAN and characterized using quantitative isobaric TMT-based analysis. As illustrated in Table S1, and consistent with previous findings (Toischer et al., 2013), the echocardiographic analysis confirmed increased LVMs (LVM/body weight ratios), reduced ejection fractions, but unaltered left ventricular end-diastolic diameters (LVID;d) 5 wk after the TAC surgery, demonstrating left ventricular concentric hypertrophy and systolic contractile dysfunction or heart failure in the TAC animals. Western blot analyses of total lysates showed similar total Na<sub>v</sub>1.5 protein expression in sham and TAC left ventricles, which resulted in similar Na<sub>v</sub>1.5 IP yields in the nine samples (Fig. S1 A). Isolated Na<sub>v</sub> channel complexes were then digested with trypsin,

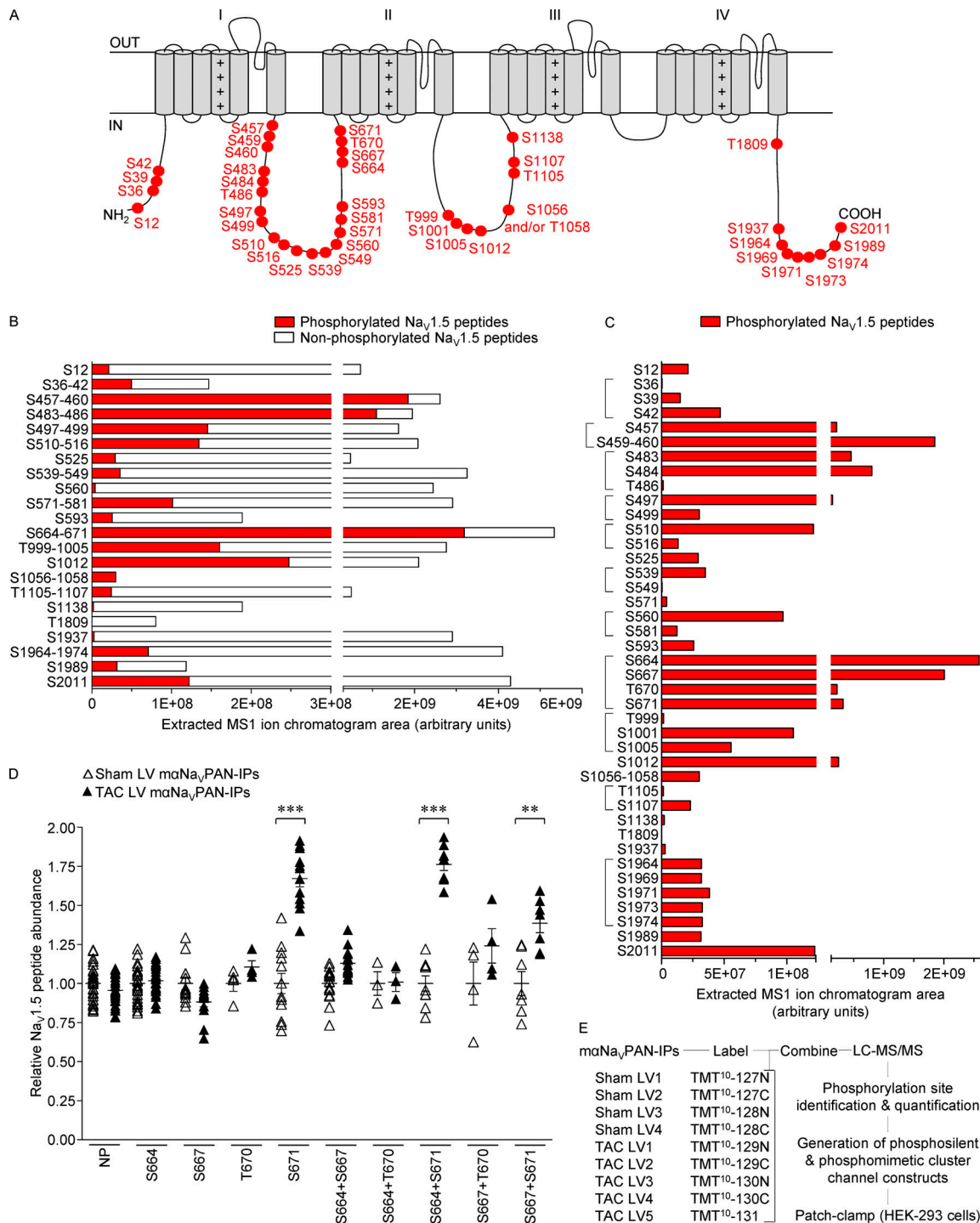
and peptide mixtures were labeled with different TMTs and combined in the same TMT set for multiplexed MS/MS analysis (Fig. 1 E). As illustrated in Table 1, the Na<sub>v</sub>1.5 protein was the most represented protein in the mNa<sub>v</sub>PAN-IPs, with 310 unique and Na<sub>v</sub>1.5-specific peptides identified and 56% amino acid sequence coverage (70% with the transmembrane domains removed; Fig. 2).

Consistent with the homogeneous yields in the Na<sub>v</sub>1.5 IP, the relative abundance of the Na<sub>v</sub>1.5 peptides detected by MS in the nine samples was similar and used for normalization of each single protein and peptide abundance (Fig. S1 B). Accordingly, the distribution of normalized abundance ratios of Na<sub>v</sub>1.5 peptides (in log<sub>2</sub>) in TAC versus sham mNa<sub>v</sub>PAN-IPs was centered on zero (Fig. S1 C). Altogether, therefore, these observations attest to a high reproducibility across biological replicates and a low technical variability inherent to experimental procedures. Of note, and as described previously (Makielski et al., 2003), several Na<sub>v</sub>1.5 peptides differing by the presence (1079-QQESQVVS GGHEPPQEPR, Q1080 variant) or absence (1077-SKQESQVVS GGHEPPQEPR and 1078-KQESQVVS GGHEPPQEPR, Q1080del variant) of a glutamine (Q) at position 1080 were detected (Table 1 and Fig. 2), reflecting the expression of two distinct Na<sub>v</sub>1.5 variants in adult mouse left ventricles; Q1080del corresponds to the commonly reported hHIC variant. The identification of additional, nondiscriminating peptides (1079-QESQVVS GGHEPPQEPR and 1079-QESQVVS GGH), which could arise from either variant, however, prevented us from quantifying the relative abundance of the two Na<sub>v</sub>1.5 variants. These analyses also allowed the identification of eight additional Na<sub>v</sub> channel pore-forming subunits, among which Na<sub>v</sub>1.4 is the most abundant, with 86 unique Na<sub>v</sub>1.4-specific peptides detected (Table 1). In addition, several previously identified Na<sub>v</sub>1.5 channel associated/regulatory proteins, including calmodulin, the VY variant of fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF2-VY) and ankyrin-G, were detected, with no significant differences in abundance between sham and TAC mNa<sub>v</sub>PAN-IPs (Table 1).

### Identification and quantification of 42 Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation sites in sham and TAC mouse left ventricles

The phosphoproteomic analysis of the mNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC mouse left ventricles allowed the unambiguous identification of 42 native phosphorylation sites in the Na<sub>v</sub>1.5 protein, 19 of which have never, to our knowledge, been previously described (Figs. 1 A and 2). Table 2 lists the phosphopeptides enabling the best phosphorylation site assignment(s) for each phosphorylation site, and corresponding MS/MS spectra are presented in Data S1. Table S2 lists these 42 phosphorylation sites with all the other phosphorylation sites identified so far on the mouse and/or human Na<sub>v</sub>1.5 protein, whether by using MS, in silico, and/or in vitro analyses. Interestingly, the vast majority of these 42 phosphorylation sites are clustered, with the first intracellular linker loop of Na<sub>v</sub>1.5 revealed as a hot spot for phosphorylation, with a total of 21 sites identified. Further label-free quantitative analysis of the areas of extracted MS1 peptide ion chromatograms revealed large differences in the relative abundance of the individual





**Figure 1. Localization and quantification of 42 MS-identified Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation sites in maNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC mouse left ventricles (LVs).** (A) Schematic representation of phosphorylation sites on the Na<sub>v</sub>1.5 protein (UniProt reference sequence K3W4N7). Two phosphorylation site locations are possible at amino acids S1056-T1058. (B) The areas of extracted MS1 ion chromatograms, corresponding to MS2 spectra assigning phosphorylated (in red) and nonphosphorylated (in white) Na<sub>v</sub>1.5 peptides at indicated phosphorylation site(s), in maNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC LVs are indicated. No red color is visible for the phosphorylated peptide at position T1809, because this phosphopeptide area is very small (area = 80,291 arbitrary unit) relative to the areas of the nonphosphorylated peptides (areas = 80,060,220 arbitrary unit). (C) The areas of extracted MS1 ion chromatograms, corresponding to MS2 spectra assigning phosphorylated peptides at indicated phosphorylation site(s), in maNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC LVs are indicated. The brackets indicate the subgroups of phosphorylation sites analyzed in B. Independent quantification of S459 and S460 phosphorylated peptides was not possible, because localization of the phosphorylation site in most of the phosphorylated peptides could not be discriminated. Similar to B, no red bar is visible for the phosphorylated peptide at position T1809, because this phosphopeptide area is very small (area = 80,291 arbitrary unit), relative to the areas of the other phosphorylated peptides. (D) Distributions and mean ± SEM relative abundances of individual Na<sub>v</sub>1.5 phosphopeptides allowing assignments of indicated phosphorylation site(s), as well as of corresponding nonphosphorylated (NP) peptides, in TAC LV (n = 5, in black) versus sham LV (n = 4, in white)

maNav<sub>v</sub>PAN-IPs were obtained using TMT reporter ion intensities. The relative abundances of Na<sub>v</sub>1.5 phosphopeptides exhibiting phosphorylation(s) on serine 671 (S671; *n* = 12 peptides) alone or in combination with serine 664 (S664 + S671; *n* = 9 peptides) or serine 667 (S667 + S671; *n* = 7 peptides) are increased (\*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001; Mann-Whitney test) in TAC LV versus sham LV maNav<sub>v</sub>PAN-IPs. **(E)** Experimental workflow used in the study. Once immunoprecipitated using the maNav<sub>v</sub>PAN antibodies, the Na<sub>v</sub> channel complexes from sham and TAC mouse LVs were labeled individually with different TMT<sup>10</sup> tags and combined in the same TMT set for multiplexed LC-MS/MS analysis. Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation sites were identified, quantified, and analyzed by clusters in whole-cell voltage-clamp recordings in HEK-293 cells.

phosphopeptides and the existence of three highly phosphorylated clusters at positions S457-S460, S483-T486, and S664-S671 (Fig. 1 B). In addition, and in contrast to the other phosphorylation sites, the phosphorylated peptides assigning these three phosphorylation clusters are more abundant than their nonphosphorylated counterparts, suggesting that these sites are mostly phosphorylated in native Na<sub>v</sub>1.5 channels in WT mouse left ventricles. Looking into the detailed quantification of single phosphorylation sites inside each of these clusters, however, major differences in phosphopeptide abundance are evident (Fig. 1 C). This is the case, for example, of phosphorylation at S664 or S667, which is ~10-fold more abundant than at residues T670 or S671.

To determine whether phosphorylation of Na<sub>v</sub>1.5 is regulated in heart failure, the relative abundance of each Na<sub>v</sub>1.5 phosphopeptide in TAC versus sham maNav<sub>v</sub>PAN-IPs was calculated using the relative abundance of TMT reporter ions. As illustrated in Fig. 1 D, peptides exhibiting phosphorylation(s) on serine 671 (S671) alone or in combination with serine 664 (S664 + S671) or serine 667 (S667 + S671) are significantly more abundant in the TAC than in the sham maNav<sub>v</sub>PAN-IPs. The relative abundance of their nonphosphorylated counterparts, however, is similar in sham and TAC maNav<sub>v</sub>PAN-IPs. None of the other Na<sub>v</sub>1.5 phosphopeptides showed any significant differences in the sham and TAC maNav<sub>v</sub>PAN-IPs (Table 2). In addition to Na<sub>v</sub>1.5, four phosphorylation sites on Na<sub>v</sub>1.4 and one on Na<sub>v</sub>1.3 could also be detected (Table S3 and Data S1). Taken together, these quantitative phosphoproteomic analyses identified 42 native phosphorylation sites on Na<sub>v</sub>1.5, among which 3 clusters of phosphorylation in the first loop of the channel are highly phosphorylated in mouse left ventricles and one serine at position 671 shows increased phosphorylation in TAC mouse left ventricles.

### Functional mapping of Na<sub>v</sub>1.5 channel phosphorylation clusters

The identification of several clusters of phosphorylation sites on Na<sub>v</sub>1.5 suggests that these sites may be involved in the coordinated regulation of channel expression and/or function. Of the eight clusters of phosphorylation identified in the mouse Na<sub>v</sub>1.5 protein, seven are conserved in the human Na<sub>v</sub>1.5 protein sequence; only the mouse T1105 is not conserved (Fig. S2). To investigate the functional roles of these (seven) phosphorylation clusters, phosphosilent and phosphomimetic Na<sub>v</sub>1.5 channel constructs in the human Na<sub>v</sub>1.5 hHIC cDNA sequence were generated, transiently expressed with the Na<sub>v</sub>β1 channel subunit in HEK-293 cells, and characterized in whole-cell voltage-clamp recordings. In the phosphosilent constructs, mutations were introduced to replace serines/threonines (S/T) with alanines (A),

whereas in the phosphomimetic constructs, mutations were introduced to substitute glutamates (E) for serines/threonines, to mimic phosphorylation.

As illustrated in Fig. 3 B, these whole-cell voltage-clamp analyses demonstrated that the voltage dependence of activation of the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A quadruple phosphosilent channels, in which all four of S664, S667, T670, and S671 are mutated to alanines, is significantly (*P* < 0.001) shifted toward depolarized potentials compared with WT channels (see distributions, detailed properties, and statistics in Fig. S3 A and Table 3). The activation curve of the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E quadruple phosphomimetic channel was also significantly (*P* < 0.001) shifted, although to a lesser extent, when compared with the phosphosilent channel. Together, therefore, these findings suggest that the S664-671 cluster is phosphorylated in HEK-293 cells and that disruption of phosphorylation at these sites shifts the voltage dependence of channel activation toward depolarized potentials. To further support the role of phosphorylation in this effect, the quadruple aspartate (D) phosphomimetic channel, Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D, was generated, and analysis of voltage dependence of channel activation demonstrated no differences when compared with the WT channel (Fig. 3 B, Fig. S3 A, and Table 3). Consequent to these effects, the time to peak *I*<sub>Na</sub> (Fig. 3 D), as well as the inactivation time constants, τ<sub>fast</sub> and τ<sub>slow</sub> (Fig. 3, E and F), of the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A and Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E quadruple phosphomutant channels were shifted toward depolarized potentials compared with the WT Na<sub>v</sub>1.5 and the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D quadruple phosphomimetic channels, until reaching full activation at ~0 mV. In addition, the peak *I*<sub>Na</sub> density of the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E quadruple phosphomimetic channel was significantly (*P* < 0.05 at -20 mV) reduced compared with the WT channel, whereas no significant changes were observed with the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A and Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D quadruple phosphomutant channels (Fig. 3 C; see distributions at -20 mV and statistics in Fig. S3 B and Table 3). Importantly, however, evaluation and comparison of the peak *I*<sub>Na</sub> densities of these four channel constructs is impeded by the differences in voltage dependence of activation, and no significant differences in peak *I*<sub>Na</sub> densities (at -20 or 0 mV) or maximal Na<sup>+</sup> *G* values (data not shown) were observed for the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D, compared with WT, channels. Finally, the voltage dependence of steady-state inactivation (Fig. 3 B, Fig. S3 C, and Table 3) and the kinetics of recovery from inactivation (Fig. S3 D and Table 3) of the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A and Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E quadruple phosphomutant channels were similar to those of the WT channels. Additionally, and to our surprise, no differences in current densities, in the kinetics or voltage dependences of current activation and inactivation, or in the kinetics of recovery from inactivation were observed for

Table 1. Proteins identified in immunoprecipitated Na<sub>v</sub> channel complexes from sham and TAC mouse left ventricles using MS

Protein	UniProt accession number	No. of exclusive unique peptides	Percentage amino acid sequence coverage	TAC/sham ratio	Protein	UniProt accession number	No. of exclusive unique peptides	Percentage amino acid sequence coverage	TAC/sham ratio
Na <sub>v</sub> 1.5 (Q1080)	K3W4N7	310	56%	1.0	N-cadherin	P15116	13	24%	0.8
Na <sub>v</sub> 1.5 (Q1080del)	Q9JJV9								
Na <sub>v</sub> 1.4	G3X8T7	86	40%	0.8	Plakophilin-2	Q9CQ73	13	20%	0.7
Na <sub>v</sub> 1.3	A2AS15	24	17%	0.9	Plakophilin-1	P97350	5	8%	0.8
Na <sub>v</sub> 1.8	Q6QIY3	13	9%	0.9	Telethonin	O70548	5	44%	0.8
Na <sub>v</sub> 1.7	Q62205	3	2%	0.7	Desmoglein-2	O55111	13	19%	0.7
Na <sub>v</sub> 1.9	Q9R053	1	1%	1.2	Flotillin-1	O08917	22	59%	0.9
Na <sub>v</sub> 1.1	A2APX8	1	0.5%	1.3	Flotillin-2	Q60634	21	54%	0.8
Na <sub>v</sub> 1.2	B1AWN6	1	0.5%	1.2	14-3-3 zeta/delta	P63101	5	27%	0.9
Na <sub>v</sub> 1.6	F6U329	1	0.6%	1.0	14-3-3 epsilon	P62259	3	17%	1.0
Na <sub>v</sub> β4	Q7M729	11	44%	0.7	14-3-3 gamma	P61982	3	14%	1.0
Na <sub>v</sub> β1	P97952	9	41%	1.0	14-3-3 beta/alpha	Q9CQV8	1	6%	1.1
Na <sub>v</sub> β2	Q56A07	6	37%	0.8	14-3-3 sigma	O70456	1	3%	0.9
Calmodulin	Q3UKW2	12	53%	0.8	Slmap	Q3URD3	1	1%	1.1
FHF2-VY	P70377	37	84%	0.8	αB-Crystallin	P23927	14	71%	0.7
FHF4	P70379	1	7%	0.7	Cx43	P23242	15	50%	0.7
Ankyrin-G	G5E8K5	47	32%	1.0	Kir2.1	P35561	3	11%	0.8
Ankyrin-R	Q02357	2	2%	1.0	CaMKIIγ	Q923T9	11	26%	0.8
Ankyrin-B	S4R245	1	0.4%	0.8	CaMKIIδ	E9Q1T1	2	6%	1.1
Dystrophin	P11531	88	29%	0.9	CaMKIIα	P11798	2	4%	0.8
α1-Syntrophin	A2AKD7	20	53%	0.8	CaMKIIβ	Q5SVI2	1	3%	0.9
β2-Syntrophin	Q61235	19	35%	0.9	PKA, catalytic subunit, α	P05132	2	9%	1.0
α-Actinin-2	Q9JI91	50	60%	0.5	PKAβ-2	Q6PAM0	1	4%	1.1
Caveolin-1	P49817	6	39%	0.8	PKCβ	P68404	2	3%	1.6
Caveolin-2	Q9WVVC3	3	28%	0.9	Fyn	P39688	1	2%	1.1
Caveolin-3	P51637	2	11%	0.8	PP2A-C	P63330	1	3%	1.1
Vinculin	Q64727	25	29%	0.7					

The numbers of exclusive unique peptides, the percentage amino acid sequence coverages, and the fold change abundance ratios in TAC left ventricle ( $n = 5$ ) versus sham left ventricle ( $n = 4$ ) maNa<sub>v</sub>PAN-IPs for each identified protein are presented. No significant differences in protein abundance were observed between TAC and sham IPs. Cx, connexin; FHF, fibroblast growth factor homologous factor; Kir, inward rectifier K<sup>+</sup> channel; PP2A-C, catalytic subunit of protein phosphatase 2A; Slmap, sarcolemmal membrane-associated protein.

any of the six other heterologously expressed (in HEK-293 cells) paired phosphosilent or phosphomimetic Na<sub>v</sub>1.5 channels (Fig. S3 and Table 3). Taken together, therefore, these analyses suggest a key role for phosphorylation at S664-671 in regulating the voltage dependence of Na<sub>v</sub>1.5 channel activation and peak I<sub>Na</sub> density, whereas the functional impact of the other phosphorylation sites most likely involves more complex mechanisms.

### The S664 and S667 phosphorylation sites regulate the voltage dependence of current activation, whereas S671 regulates the peak I<sub>Na</sub> density

To decipher the respective contributions of the S664, S667, T670, and S671 phosphorylation sites in regulating the voltage dependence of current activation and peak I<sub>Na</sub> density, each of these serine/threonine residues was mutated individually to alanine or glutamate, and the densities and properties of I<sub>Na</sub>

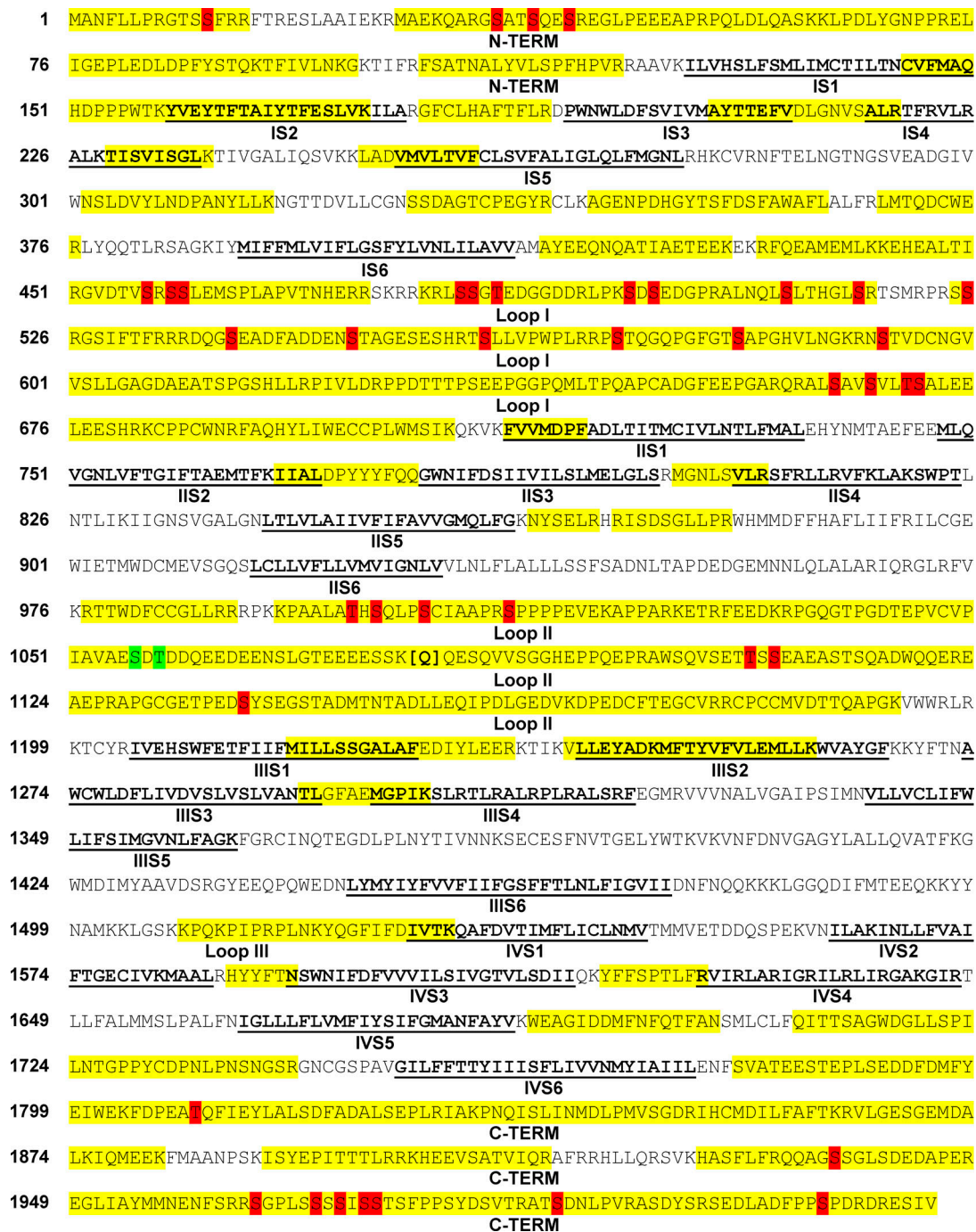


Figure 2. **Na<sub>v</sub>1.5 amino acid sequence coverage and localization of 42 Na<sub>v</sub>1.5 phosphorylation sites in maNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC mouse left ventricles.** Covered sequence and MS-identified phosphorylation sites are highlighted in yellow and red, respectively; transmembrane segments (S1-S6) in each domain (I-IV) are in bold and underlined in black; and loops I, II, and III correspond to interdomains I-II, II-III, and III-IV, respectively. The identification of peptides differing by the presence or absence of a glutamine (Q) at position 1080 ascertains the expression of two Na<sub>v</sub>1.5 variants: the Q1080 variant corresponds to UniProt reference sequence K3W4N7, and the Q1080del variant corresponds to UniProt reference sequence Q9JJV9. Two phosphorylation site locations are possible at amino acids S1056-T1058 (in green). C-TERM, C terminus; N-TERM, N terminus.

produced by the single phosphosilent or phosphomimetic channel mutants, coexpressed transiently with the accessory Na<sub>v</sub>β1 subunit in HEK-293 cells, were determined. These analyses showed that the voltage dependences of activation of the Na<sub>v</sub>1.5-S664 (Fig. 4 A) and Na<sub>v</sub>1.5-S667 (Fig. 4 B) phosphomutant channels are significantly (P < 0.001) shifted toward depolarized potentials

compared with the WT channels, whereas no changes were observed with the Na<sub>v</sub>1.5-T670 or Na<sub>v</sub>1.5-S671 phosphomutant channels (Fig. 4, C and D; see detailed properties and statistics in Table 4). Of note, the ~6-mV shifts observed with the Na<sub>v</sub>1.5-S664A and Na<sub>v</sub>1.5-S667A single phosphosilent channels were twofold smaller than the ~10-mV shift obtained



Table 2. Phosphorylation sites, phosphopeptides, and site-discriminating ions identified in immunoprecipitated Na<sub>v</sub>1.5 proteins from sham and TAC mouse left ventricles using MS

Phosphorylation site(s)	Phosphopeptide sequence	m/z (charge)	-10lgP score	b ion	Phospho b ion	y ion	Phospho y ion	TAC/sham ratio
S12	9-GTS(pS)FRR	560.279 (+2)	21.6	b3 (+1)	(-)	y3	(-)	1.2 (n = 1)
S36	35-G(pS)ATSQESR	616.279 (+2)	32.1	b1	(-)	y7	(-)	1.3 (n = 1)
S42	35-GSATSQE(pS)REGLPEEEAPRPQLDLQASK	887.947 (+4)	73.1	b7 (+1)	(-)	y19 (+2)	y21 (+2)	1.5 ± 0.03 (n = 3)
S39 + S42	35-GSAT(pS)QE(pS)REGLPEEEAPRPQLDLQASK	907.937 (+4)	68.4	b4 (+1)	(-)	y19 (+2)	y21	1.2 ± 0.12 (n = 2)
S457 (+ S459 or S460)	452-GVDTV(pS)RSSLEMSPLAPVTNHER	957.782 (+3)	77.1	b5 (+1)	b7 (-98) (+2)	y14 (+1)	(-)	1.1 ± 0.09 (n = 10)
S459 + S460	452-GVDTVSR(pS)(pS)LEMSPLAPVTNHER	958.117 (+3)	41.5	b7 (+2)	b11 (+2)	y12 (+1)	(-)	1.2 (n = 1)
S460	459-S(pS)LEMSPLAPVTNHER	1039.003 (+2)	61.2	b1 (+1)	b4 (+1)	y14 (+1)	(-)	1.0 ± 0.05 (n = 18)
S483	481-RL(pS)SGTEDGGDDRLPK	561.038 (+4)	52.4	b2	b3	y13 (+2)	(-)	1.0 ± 0.03 (n = 10)
S484	482-LS(pS)GTEDGGDDR	759.319 (+2)	45.7	b2	(-)	y9 (+1)	(-)	1.2 ± 0.07 (n = 12)
T486	484-SG(pT)EDGGDDRLPK	628.973 (+3)	21.9	b1	b5	y8 (+2)	(-)	1.2 (n = 1)
S483 + S484	480-KRL(pS)(pS)GTEDGGDDRLPK	536.476 (+5)	63	b3	(-)	y12 (+2)	(-)	1.3 ± 0.04 (n = 19)
S497	482-LSSGTEDGGDDRLPK(pS)DSEDGPR	732.845 (+4)	60.2	b12 (+2)	(-)	y7 (+1)	y12	1.3 ± 0.07 (n = 7)
S483 + S497	481-RL(pS)SGTEDGGDDRLPK(pS)DSEDGPR	791.862 (+4)	40.1	b2	b3 (-98)	y6 (+1)	y12 (+2)	0.7 (n = 1)
S484 + S497	482-LS(pS)GTEDGGDDRLPK(pS)DSEDGPR	1003.448 (+3)	54.8	b2 (+1)	b3	y7 (+1)	y12 (+2)	1.7 ± 0.04 (n = 2)
S499	497-SD(pS)EDGPR	586.245 (+2)	42	b2	b5	y4 (+1)	y6	1.4 ± 0.17 (n = 3)
S510	505-ALNQL(pS)LTHGLSR	573.643 (+3)	51.8	b4 (+1)	(-)	y7 (+1)	(-)	0.9 ± 0.03 (n = 3)
S516	505-ALNQLSLTHGL(pS)R	573.644 (+3)	46.7	b9	(-)	y1 (+1)	(-)	0.9 (n = 1)
S525	524-S(pS)RGSIFTFR	489.584 (+3)	40.7	b1 (+1)	(-)	y8 (+2)	(-)	0.8 ± 0.09 (n = 3)

Table 2. Phosphorylation sites, phosphopeptides, and site-discriminating ions identified in immunoprecipitated Na<sub>v</sub>1.5 proteins from sham and TAC mouse left ventricles using MS (Continued)

Phosphorylation site(s)	Phosphopeptide sequence	m/z (charge)	-10lgP score	b ion	Phospho b ion	y ion	Phospho y ion	TAC/sham ratio
S539	536-DQG(pS)EADFADDENSTAGESESHK	921.701 (+3)	70.9	b3 (+1)	b5 (+1)	y14 (+1)	(-)	1.5 ± 0.09 (n = 9)
S549	534-RRDQGSEADFADDEN(pS)TAGESESHK	769.579 (+4)	55.3	b15 (+2)	(-)	y9 (+1)	(-)	3.2 (n = 1)
S560	559-T(pS)LLVPWPLR	745.921 (+2)	30.2	b1	b4	y8 (+1)	(-)	1.0 (n = 1)
S571	569-RP(pS)TQGQPGFGTSAPGHVNLGK	911.466 (+3)	55.2	b1 (+1)	b7 (+1), b7 (+2)	y19	(-)	0.8 ± 0.03 (n = 19)
S581	569-RPSTQGQPGFGT(pS)APGHVNLGK	683.856 (+4)	48.5	b12 (+2)	(-)	y8 (+2)	(-)	0.9 (n = 1)
S593	591-RN(pS)TVDCNGVVSLLGAGDAEATSPGSHLLR	841.660 (+4)	71.7	b2	b3	y16 (+1)	(-)	0.8 ± 0.05 (n = 4)
S664	662-AL(pS)AVSVLTSALEELEEESHRK	936.506 (+3)	60.6	b2 (+1)	b5 (+1)	y18 (+2)	(-)	1.0 ± 0.04 (n = 28)
S667	662-ALSAV(pS)VLSALEELEEESHRK	817.416 (+3)	64.1	b5 (+1)	b7 (+1)	y13 (+1)	(-)	0.9 ± 0.06 (n = 12)
T670	662-ALSAVSVL(pT)SALEELEEESHRK	702.629 (+4)	54.3	b7 (+1)	(-)	y12 (+2)	(-)	1.1 ± 0.1 (n = 4)
S671	662-ALSAVSVLT(pS)ALEELEEESHRK	702.629 (+4)	63.2	b9 (+2)	b10 (+2)	y11 (+2)	(-)	1.7 ± 0.17 (n = 12)***
S664 + S667	662-AL(pS)AV(pS)VLSALEELEEESHRK	886.771 (+3)	58.8	b2	b3	y15 (+2)	y18	1.1 ± 0.05 (n = 18)
S664 + T670	662-AL(pS)AVSVL(pT)SALEELEEESHRK	844.072 (+3)	59.3	b2 (+1)	b5 (+1), b8 (+1)	y11 (+1)	(-)	1.0 ± 0.14 (n = 3)
S664 + S671	662-AL(pS)AVSVLT(pS)ALEELEEESHRK	844.072 (+3)	58.3	b2 (+1)	b5 (+1), b9 (+2)	y10 (+1)	(-)	1.8 ± 0.13 (n = 9)***
S667 + T670	662-ALSAV(pS)VL(pT)SALEELEEESHRK	722.621 (+4)	54.1	b5 (+1)	b8	y12 (+2)	(-)	1.2 ± 0.37 (n = 4)
S667 + S671	662-ALSAV(pS)VLT(pS)ALEELEEESHRK	844.073 (+3)	60.5	b5 (+1)	b8 (+1), b9	y10 (+1)	(-)	1.4 ± 0.17 (n = 7)**
T999	993-KPAALA(pT)HSQLPSCIAAPR	824.114 (+3)	48.8	b6 (+1)	(-)	y12 (+1)	(-)	0.8 (n = 1)
S1001	1001-(pS)QLPSCIAAPR	503.591 (+3)	32.6	(-)	b2 (+1)	y8 (+1)	(-)	1.0 ± 0.11 (n = 4)

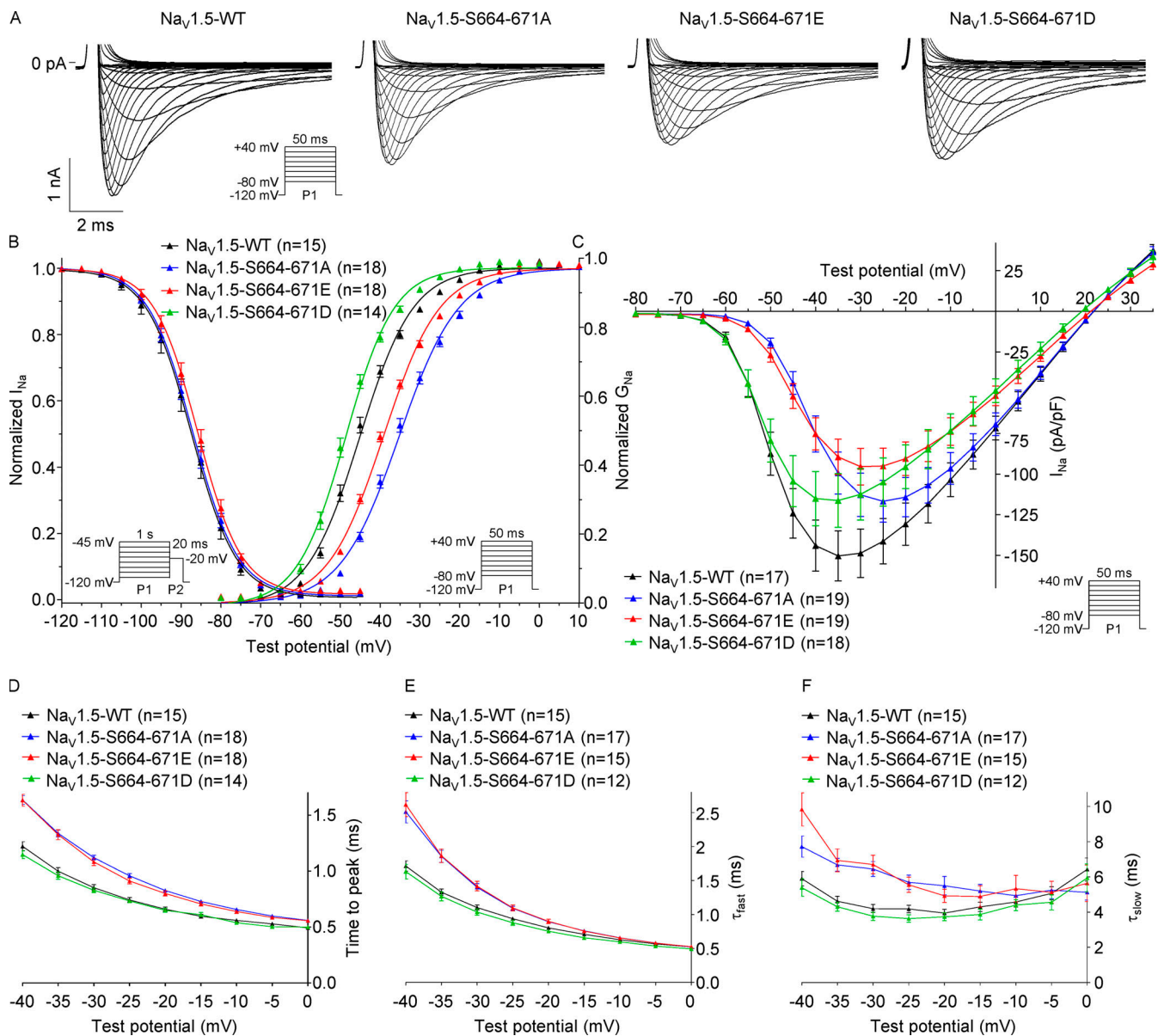
Table 2. Phosphorylation sites, phosphopeptides, and site-discriminating ions identified in immunoprecipitated Na<sub>v</sub>1.5 proteins from sham and TAC mouse left ventricles using MS (Continued)

Phosphorylation site(s)	Phosphopeptide sequence	m/z (charge)	-10lgP score	b ion	Phospho b ion	y ion	Phospho y ion	TAC/sham ratio
S1005	993-KPAALATHSQLP(pS)CIAAPRSPPPPEVEKAPPAR	702.389 (+6)	71.4	b11 (+2)	(-)	y18 (+2)	y21 (+2)	0.8 ± 0.16 (n = 2)
S1012	1012-(pS)PPPPEVEK	759.405 (+2)	42.3	(-)	b1 (+1)	y8 (+1)	(-)	0.9 ± 0.03 (n = 17)
S1056 and/or T1058	1030-FEEDKRPQGTPGDTEPVCVPIAVAESDTEDEEENSLGTEEEESSK (1 Phospho)	1230.559 (+5)	57.3	b24 (+2)	(-)	y11 (+1)	(-)	1.8 ± 0.04 (n = 5)
T1105	1097-AWSQVSET(pT)SSEAEASTSQADWQQR	1070.132 (+3)	64.3	b8 (+1)	b9	y12 (+1)	(-)	1.1 (n = 1)
S1107	1097-AWSQVSETTS(pS)EAEASTSQADWQQR	1070.135 (+3)	69.9	b10 (+1)	b15 (+1)	y14 (+1)	(-)	1.2 (n = 1)
S1138	1136-ED(pS)YSEGSTADMTNTADLLEQIPDLGEDVKDPEDCFTEGCVR	1312.582 (+4)	44.7	(-)	b3 (+1)	y23 (+2)	(-)	1.3 ± 0.01 (n = 2)
T1809	1809-(pT)QFIEYLALSDFADALSEPLR	903.451 (+3)	54.8	(-)	b1, b2 (+1)	y14 (+1)	(-)	0.8 (n = 1)
S1937	1933-QQAG(pS)SGLSDEDAPER	978.430 (+2)	60.1	b4 (+1)	(-)	y11 (+1)	(-)	1.3 (n = 1)
S1964	1964-(pS)GPLSSSSISSTSFPPSYDSVTR	885.752 (+3)	50.3	(-)	b1 (+1), b4 (+1)	y14 (+1)	(-)	1.2 ± 0.11 (n = 3)
S1969	1964-SGPLS(pS)SSISSTSFPPSYDSVTR	885.753 (+3)	56.9	b5	b6 (+2)	y14 (+1)	(-)	1.0 ± 0.04 (n = 3)
S1971	1963-RSGPLSSS(pS)ISSTSFPPSYDSVTR	937.787 (+3)	48.5	b8 (+1)	(-)	y14 (+1)	(-)	0.9 ± 0.09 (n = 3)
S1973	1964-SGPLSSSSI(pS)STSFPPSYDSVTR	885.750 (+3)	61.8	b9 (+1)	b10 (+2)	y13	(-)	0.9 ± 0.02 (n = 6)
S1974	1964-SGPLSSSSIS(pS)TSFPPSYDSVTR	885.750 (+3)	61.8	b10	(-)	y12 (+1)	(-)	0.9 ± 0.03 (n = 2)
S1989	1987-AT(pS)DNLPVR	641.324 (+2)	37.7	b2	b5	y6 (+1)	(-)	0.8 ± 0.07 (n = 2)
S2011	2002-SEDLADFP(pS)PDRDR	675.975 (+3)	38.8	b7 (+1)	(-)	y5 (+2)	y8	1.0 ± 0.05 (n = 15)

The site-discriminating ions observed in MS/MS spectra of each annotated Na<sub>v</sub>1.5 (UniProt reference sequence K3W4N7) phosphopeptide support the assignment of the indicated phosphorylation site(s). The -10lgP scores attest to the quality of peptide identification. The manually verified charge state of unphosphorylated and phosphorylated site-discriminating b and y ions is reported in parentheses. (-) indicates that the ion was not detected. Mean ± SEM phosphopeptide abundance ratios in TAC left ventricles (n = 5) versus sham left ventricles (n = 4) maNa<sub>v</sub>PAN-IPs were calculated from n phosphopeptide(s). \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; Mann-Whitney test. m/z, mass-to-charge ratio.

with the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A quadruple phosphosilent channel, suggesting that the effects at S664 and S667 are additive. Regarding the analysis of the peak I<sub>Na</sub> densities, only the

Na<sub>v</sub>1.5-S671E phosphomimetic channel showed a significant (P < 0.05) decrease, compared with the WT channel (Fig. 4 H), whereas no significant differences were observed



**Figure 3. The phosphorylation sites at positions S664-671 regulate the voltage dependence of current activation and peak  $I_{Na}$  density.** (A) Representative whole-cell voltage-gated  $I_{Na}$  recorded 48 h following transfection of HEK-293 cells with Na<sub>v</sub>1.5-WT + Na<sub>v</sub>β1 (black), Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A + Na<sub>v</sub>β1 (blue), Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E + Na<sub>v</sub>β1 (red), or Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D + Na<sub>v</sub>β1 (green) using the protocols illustrated in each panel. Scale bars are 1 nA and 2 ms. (B) Voltage dependences of current activation and steady-state inactivation. The voltage dependence of current activation is shifted toward depolarized potentials in cells expressing the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A or Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E quadruple phosphomutants compared with cells expressing Na<sub>v</sub>1.5-WT or the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D quadruple phosphomimetic channels. (C) Mean ± SEM peak  $I_{Na}$  densities plotted as a function of test potential. The peak  $I_{Na}$  density is reduced in cells expressing the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E mutant compared with cells expressing Na<sub>v</sub>1.5-WT. (D–F) Mean ± SEM times to peak (D), fast ( $\tau_{fast}$ ; E), and slow ( $\tau_{slow}$ ; F) inactivation time constants plotted as a function of test potential. The times to peak,  $\tau_{fast}$ , and  $\tau_{slow}$  are higher in cells expressing the Na<sub>v</sub>1.5-S664-671A or Na<sub>v</sub>1.5-S664-671E quadruple phosphomutants than in cells expressing Na<sub>v</sub>1.5-WT or Na<sub>v</sub>1.5-S664-671D. Current densities, time- and voltage-dependent properties, and statistical comparisons across groups are provided in Fig. S3 and Table 3.  $G_{Na}$ , sodium conductance.

with any of the other single phosphomutant channels (Fig. 4, E–G).

Because phosphorylation at S671 was found to be increased in the TAC, compared with the sham,  $\alpha$ Na<sub>v</sub>PAN-IPs (Fig. 1 D), and because it was previously suggested that phosphorylation of Na<sub>v</sub>1.5 may mediate increased  $I_{NaL}$  in heart failure (Wagner et al., 2006; Maltsev et al., 2008; Koval et al., 2012; Aiba et al., 2013; Toischer et al., 2013; Glynn et al., 2015),

additional voltage-clamp experiments were designed to test whether phosphorylation at S671 regulates  $I_{NaL}$ . These analyses showed that none of the single mutations at S671 or quadruple mutations at S664-671 affect TTX-sensitive  $I_{NaL}$  density in HEK-293 cells (Fig. S4). Altogether, therefore, these analyses suggest that phosphorylation at S664 and S667 shifts the voltage dependence of current activation toward hyperpolarized potentials in a cumulative manner,



Table 3. Current densities and properties of Na<sub>v</sub>1.5 channels mutant for the phosphorylation clusters in transiently transfected HEK-293 cells

	I <sub>Na</sub> (pA/pF)	Time to peak (ms)	Time course of inactivation			Voltage-dependence of activation		Voltage-dependence of inactivation		Recovery from inactivation τ <sub>rec</sub> (ms)
			τ <sub>fast</sub> (ms)	τ <sub>slow</sub> (ms)	A <sub>fast</sub> /A <sub>slow</sub>	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	
Na <sub>v</sub> 1.5-WT	-130.8 ± 13.1 (25)	0.60 ± 0.01 (19)	0.72 ± 0.02 (18)	3.6 ± 0.2 (18)	15.5 ± 1.0 (18)	-45.7 ± 0.6 (19)	6.8 ± 0.2 (19)	-88.3 ± 0.6 (19)	4.9 ± 0.1 (19)	8.7 ± 0.6 (19)
Na <sub>v</sub> 1.5-S36-42A	-115.7 ± 11.2 (35)	0.63 ± 0.02 (19)	0.75 ± 0.02 (19)	3.6 ± 0.2 (19)	13.3 ± 1.0 (19)	-44.7 ± 0.6 (19)	6.7 ± 0.1 (19)	-86.5 ± 0.8 (19)	4.9 ± 0.1 (19)	7.1 ± 0.6 (18)
Na <sub>v</sub> 1.5-S36-42E	-92.2 ± 11.4 (31)	0.59 ± 0.02 (19)	0.72 ± 0.02 (17)	3.5 ± 0.2 (17)	13.6 ± 1.9 (17)	-45.2 ± 0.6 (19)	6.6 ± 0.1 (19)	-86.1 ± 0.5 (19)	4.6 ± 0.1 (19)	7.3 ± 0.3 (18)
Na <sub>v</sub> 1.5-S457-460A	-136.5 ± 12.1 (24)	0.60 ± 0.01 (18)	0.75 ± 0.02 (18)	4.6 ± 0.4 (18)	15.6 ± 1.2 (18)	-45.4 ± 0.7 (18)	7.0 ± 0.2 (18)	-90.0 ± 0.9 (18)	5.2 ± 0.1 (18)	9.3 ± 0.5 (18)
Na <sub>v</sub> 1.5-S457-460E	-123.3 ± 11.6 (28)	0.60 ± 0.02 (20)	0.74 ± 0.02 (19)	3.7 ± 0.2 (19)	17.5 ± 1.8 (19)	-45.2 ± 0.4 (20)	6.8 ± 0.1 (20)	-87.5 ± 0.5 (19)	4.7 ± 0.1 (19)	8.7 ± 0.4 (19)
Na <sub>v</sub> 1.5-S483-486A	-104.7 ± 11.3 (40)	0.61 ± 0.02 (28)	0.61 ± 0.02 (26)	3.2 ± 0.1 (26)	12.7 ± 1.0 (26)	-47.1 ± 0.6 (28)	6.3 ± 0.2 (28)	-89.1 ± 0.7 (28)	5.0 ± 0.1 (28)	7.1 ± 0.5 (26)
Na <sub>v</sub> 1.5-S483-486E	-117.4 ± 10.4 (29)	0.55 ± 0.02 (19)	0.59 ± 0.02 (16)	2.9 ± 0.2 (16)	14.2 ± 1.2 (16)	-48.2 ± 0.6 (19)	6.3 ± 0.2 (19)	-89.6 ± 0.6 (19)	4.8 ± 0.1 (19)	8.2 ± 0.6 (16)
Na <sub>v</sub> 1.5-S497-499A	-110.5 ± 13.5 (25)	0.62 ± 0.02 (16)	0.76 ± 0.03 (12)	4.6 ± 0.4 (12)	18.0 ± 1.4 (12)	-44.6 ± 0.6 (16)	7.1 ± 0.1 (16)	-88.4 ± 0.7 (16)	4.8 ± 0.1 (16)	8.8 ± 0.7 (15)
Na <sub>v</sub> 1.5-S497-499E	-129.5 ± 13.8 (22)	0.56 ± 0.01 (18)	0.70 ± 0.02 (17)	3.8 ± 0.2 (17)	16.7 ± 1.0 (17)	-46.7 ± 0.5 (18)	7.2 ± 0.1 (18)	-90.2 ± 0.7 (18)	4.9 ± 0.1 (18)	9.5 ± 0.6 (18)
Na <sub>v</sub> 1.5-S664-671A	-109.8 ± 11.8 (19)	0.83 ± 0.02*** (18)	0.89 ± 0.02** (17)	5.5 ± 0.5* (17)	18.1 ± 1.2 (17)	-35.1 ± 0.6*** (18)	7.3 ± 0.1 (18)	-87.1 ± 0.6 (18)	5.4 ± 0.1 (18)	8.4 ± 0.4 (18)
Na <sub>v</sub> 1.5-S664-671E	-74.5 ± 10.2# (23)	0.80 ± 0.02*** (18)	0.90 ± 0.03* (15)	4.9 ± 0.4 (15)	18.8 ± 1.9 (15)	-39.1 ± 0.4*** (18)	7.0 ± 0.1 (18)	-86.1 ± 0.8 (18)	5.1 ± 0.1 (18)	7.7 ± 0.6 (16)
Na <sub>v</sub> 1.5-S664-671D	-92.2 ± 13.2 (18)	0.65 ± 0.02 (14)	0.77 ± 0.03 (12)	3.7 ± 0.2 (12)	15.5 ± 1.7 (12)	-48.7 ± 0.6 (14)	5.9 ± 0.2 (14)			
Na <sub>v</sub> 1.5-S1003-1010A	-103.0 ± 8.5 (38)	0.62 ± 0.01 (19)	0.76 ± 0.02 (19)	4.2 ± 0.2 (19)	7.4 ± 0.7 (19)	-45.3 ± 0.5 (19)	6.5 ± 0.2 (19)	-86.6 ± 0.7 (19)	6.0 ± 0.2 (19)	6.7 ± 0.6 (19)
Na <sub>v</sub> 1.5-S1003-1010E	-99.9 ± 11.9 (23)	0.61 ± 0.01 (15)	0.74 ± 0.02 (15)	3.9 ± 0.1 (15)	7.8 ± 0.6 (15)	-45.8 ± 0.8 (15)	6.5 ± 0.2 (15)	-86.2 ± 0.8 (15)	5.6 ± 0.2 (15)	6.4 ± 0.5 (13)
Na <sub>v</sub> 1.5-S1964-1969A	-115.0 ± 7.4 (23)	0.63 ± 0.01 (21)	0.77 ± 0.02 (20)	4.1 ± 0.2 (20)	15.8 ± 0.9 (20)	-44.9 ± 0.5 (21)	6.6 ± 0.2 (21)	-87.6 ± 0.5 (21)	5.1 ± 0.1 (21)	7.8 ± 0.4 (18)
Na <sub>v</sub> 1.5-S1964-1969E	-132.8 ± 18.3 (26)	0.66 ± 0.02 (17)	0.81 ± 0.02 (15)	4.0 ± 0.2 (15)	13.9 ± 0.8 (15)	-44.1 ± 0.6 (17)	7.2 ± 0.2 (17)	-89.3 ± 0.8 (17)	4.9 ± 0.1 (17)	9.3 ± 0.8 (15)

Whole-cell voltage-gated I<sub>Na</sub> were recorded 48 h following transfection of HEK-293 cells with the WT or the mutant Na<sub>v</sub>1.5 channels and the Na<sub>v</sub>β1 channel subunit using the protocols described in the Materials and methods section. The peak I<sub>Na</sub> density, time to peak, and time course of inactivation properties presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -20 mV (HP = -120 mV). All values are means ± SEMs. The number of cells analyzed is provided in parentheses. #, P < 0.05 versus Na<sub>v</sub>1.5-WT, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001 versus Na<sub>v</sub>1.5-WT; Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test.

whereas phosphorylation at S671 decreases the peak I<sub>Na</sub> density.

### The S671 phosphorylation site regulates the cell surface expression of Na<sub>v</sub>1.5 channels

Additional cell surface biotinylation experiments in transiently transfected HEK-293 cells were designed to determine whether the S671 phosphorylation site regulates the cell surface expression of the Na<sub>v</sub>1.5 channel protein. Interestingly, these experiments revealed that the cell surface expression of the Na<sub>v</sub>1.5-S671E phosphomimetic channel is significantly (P < 0.001) decreased compared with the WT or the Na<sub>v</sub>1.5-

S671A phosphosilent channels, whereas no differences in total Na<sub>v</sub>1.5 protein expression were observed (Fig. 5, A and B). Importantly, the decrease observed with the phosphomimetic mutant, compared with the phosphosilent mutant, suggests that not only this channel locus, but also most probably phosphorylation at this particular site, underlie the observed decrease in cell surface expression. Together with the electrophysiological findings, therefore, these biochemical analyses demonstrate a key role for S671 in regulating the cell surface expression of Na<sub>v</sub>1.5, and suggest that phosphorylation at this site decreases the cell surface expression of Na<sub>v</sub>1.5-encoded channels.

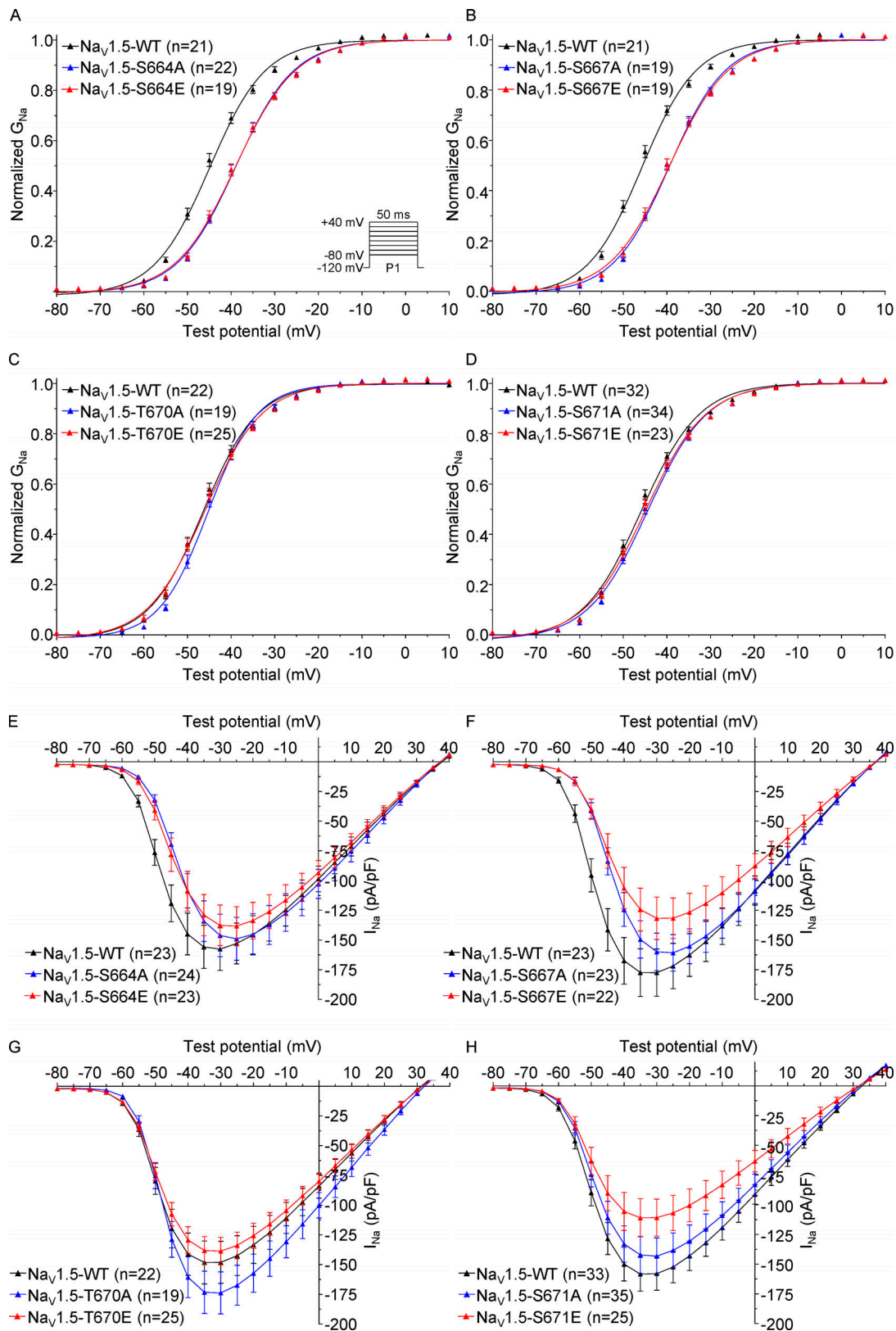


Figure 4. **The S664 and S667 phosphorylation sites regulate the voltage dependence of current activation, whereas the S671 phosphorylation site regulates the peak  $I_{Na}$  density.** Currents were recorded as described in the legend to Fig. 3. (A–D) The voltage dependence of current activation is shifted toward more depolarized potentials in cells expressing  $Na_v1.5$ -S664A (A),  $Na_v1.5$ -S664E (A),  $Na_v1.5$ -S667A (B), or  $Na_v1.5$ -S667E (B) than in cells expressing  $Na_v1.5$ -WT, whereas no significant differences are observed with the  $Na_v1.5$ -T670 (C) or  $Na_v1.5$ -S671 (D) phosphomutants. (E–H) The mean  $\pm$  SEM peak  $I_{Na}$  densities are plotted as a function of test potential. The peak  $I_{Na}$  density is reduced in cells expressing  $Na_v1.5$ -S671E (H), compared with cells expressing  $Na_v1.5$ -WT, whereas no significant differences are observed with the other phosphomutants. Current densities, time- and voltage-dependent properties, and statistical comparisons across groups are provided in Table 4.  $G_{Na}$ , sodium conductance.

Table 4. Current densities and properties of Na<sub>v</sub>1.5 channels mutant for S664, S667, T670, and S671 in transiently transfected HEK-293 cells

	I <sub>Na</sub> (pA/pF)	Time to peak (ms)	Time course of inactivation			Voltage dependence of activation		Voltage dependence of inactivation		Recovery from inactivation
			τ <sub>fast</sub> (ms)	τ <sub>slow</sub> (ms)	A <sub>fast</sub> /A <sub>slow</sub>	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	V <sub>1/2</sub> (mV)	k (mV)	
Na <sub>v</sub> 1.5-WT	-162.5 ± 18.0 (23)	0.62 ± 0.02 (21)	0.75 ± 0.02 (19)	3.3 ± 0.2 (19)	13.8 ± 1.5 (19)	-45.7 ± 0.6 (21)	6.0 ± 0.2 (21)	-85.0 ± 0.6 (21)	4.7 ± 0.1 (21)	6.0 ± 0.4 (17)
Na <sub>v</sub> 1.5-S664A	-145.2 ± 17.4 (24)	0.75 ± 0.01* (22)	0.82 ± 0.02 (21)	4.1 ± 0.2 (21)	16.7 ± 1.4 (21)	-38.9 ± 0.5*** (22)	6.6 ± 0.1 (22)	-84.0 ± 0.7 (22)	4.8 ± 0.1 (22)	6.6 ± 0.6 (22)
Na <sub>v</sub> 1.5-S664E	-133.6 ± 15.4 (23)	0.73 ± 0.02 (19)	0.79 ± 0.03 (14)	3.3 ± 0.2 (14)	11.7 ± 1.1 (14)	-39.0 ± 0.6*** (19)	6.7 ± 0.1 (19)	-83.4 ± 0.8 (19)	4.7 ± 0.1 (19)	6.1 ± 0.5 (19)
Na <sub>v</sub> 1.5-S667A	-155.3 ± 14.6 (23)	0.75 ± 0.02 (19)	0.78 ± 0.03 (16)	3.9 ± 0.2 (16)	14.1 ± 1.0 (16)	-39.4 ± 0.5*** (19)	6.3 ± 0.2 (19)	-83.7 ± 0.6 (19)	4.9 ± 0.1 (19)	6.0 ± 0.4 (16)
Na <sub>v</sub> 1.5-S667E	-126.7 ± 16.0 (22)	0.76 ± 0.02* (19)	0.81 ± 0.02 (14)	4.0 ± 0.2 (14)	14.9 ± 1.3 (14)	-39.5 ± 0.7*** (19)	6.6 ± 0.1 (19)	-83.8 ± 0.9 (19)	4.7 ± 0.1 (19)	6.7 ± 0.7 (19)
Na <sub>v</sub> 1.5-T670A	-157.2 ± 16.0 (19)	0.63 ± 0.02 (19)	0.64 ± 0.02 (18)	3.0 ± 0.2 (18)	11.2 ± 1.5 (18)	-45.1 ± 0.6 (19)	5.4 ± 0.2 (19)	-86.9 ± 0.9 (16)	4.8 ± 0.1 (16)	8.4 ± 0.6 (14)
Na <sub>v</sub> 1.5-T670E	-125.7 ± 10.5 (25)	0.59 ± 0.02 (25)	0.70 ± 0.02 (22)	3.5 ± 0.4 (22)	14.3 ± 1.9 (22)	-46.2 ± 0.7 (25)	6.3 ± 0.2 (25)	-87.7 ± 1.0 (20)	4.6 ± 0.1 (20)	9.8 ± 1.0 (20)
Na <sub>v</sub> 1.5-S671A	-130.7 ± 13.7 (35)	0.54 ± 0.02 (34)	0.59 ± 0.02 (25)	2.3 ± 0.1 (25)	10.3 ± 0.9 (25)	-44.4 ± 0.5 (34)	6.5 ± 0.1 (34)	-84.9 ± 0.6 (32)	4.5 ± 0.1 (32)	5.6 ± 0.3 (30)
Na <sub>v</sub> 1.5-S671E	-100.6 ± 13.8# (25)	0.52 ± 0.01 (23)	0.65 ± 0.02 (11)	2.7 ± 0.3 (11)	9.9 ± 1.6 (11)	-45.0 ± 0.5 (23)	6.8 ± 0.1 (23)	-86.1 ± 0.5 (23)	4.4 ± 0.1 (23)	6.4 ± 0.3 (21)

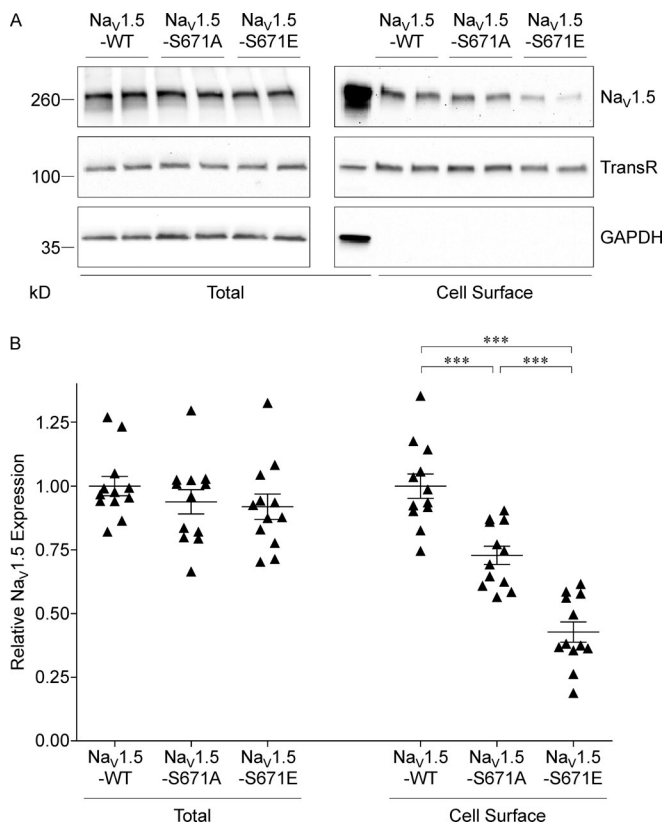
Whole-cell voltage-gated I<sub>Na</sub> were recorded 48 h following transfection of HEK-293 cells with the WT or the mutant Na<sub>v</sub>1.5 channels and the Na<sub>v</sub>β1 channel subunit using the protocols described in the Materials and methods section. The peak I<sub>Na</sub> density, time to peak, and time course of inactivation properties presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to -20 mV (HP = -120 mV). All values are means ± SEMs. The number of cells analyzed is provided in parentheses. #, P < 0.05 versus Na<sub>v</sub>1.5-WT, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test. \*, P < 0.05; \*\*\*, P < 0.001 versus Na<sub>v</sub>1.5-WT; Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test.

### Simulated consequences of phosphorylation on the first intracellular linker loop of Na<sub>v</sub>1.5

Like many heavily phosphorylated protein segments (Iakoucheva et al., 2004; Wright and Dyson, 2015), the first two intracellular linker loops of Na<sub>v</sub>1.5 are predicted to be intrinsically disordered. Conformational heterogeneity is one of the defining hallmarks of intrinsically disordered regions (IDRs). Heterogeneity is manifest in the amplitude of fluctuations of overall size, shape, and local secondary structural preferences. There is growing recognition of sequence specificity whereby the ensembles accessible to an IDR are governed by the amino acid composition, extent of phosphorylation, and patterning of residues within the linear sequence. These sequence-ensemble relationships can be uncovered using all-atom simulations. Given the disparate time scales and length scales involved, a robust and efficient approach is to use Markov chain Metropolis Monte Carlo simulations based on the ABSINTH implicit solvent model as implemented in the CAMPARI simulation (Vitalis and Pappu, 2009b; Mao et al., 2010; Das and Pappu, 2013). Here, we used simulations to quantify sequence-ensemble relationships for the first intracellular linker loop of human Na<sub>v</sub>1.5 containing the phosphorylation clusters S457-460, S483-486, S497-499, and S664-671 identified by MS. For our simulations, we used segments between 30 and 40 residues in length, containing each cluster in an approximately central position (441-480 for S457-460, 465-501 for S483-486, 481-515 for S497-499, 651-684 for S664-671). For each cluster, we performed

simulations for the WT sequence, as well as phosphomimetic mutations where serine(s)/threonine(s) are replaced with glutamate(s). The results of simulations were analyzed using the device of internal scaling plots. These plots quantify the variation of ensemble-averaged distances between residues i and j as a function of sequence separation |j-i|. Multiple pairs of residues contribute to a given sequence separation |j-i|. The internal scaling profiles can be calibrated against reference profiles that pertain to two kinds of random-coil ensembles. These are designated as EV, which pertains to profiles extracted for self-avoiding walks, and FRC, which pertains to profiles extracted for FRCs. Details of these reference ensembles have been published elsewhere.

Simulations of the 441-480 segment showed that the conformational preferences of the unphosphorylated (WT) peptide are akin to those of the FRC reference (Fig. 6 A). This implies that sequence encodes a conformational averaging whereby the peptide-solvent and peptide-peptide interactions are mutually compensatory, thereby giving rise to an ensemble that is maximally heterogeneous. Introduction of phosphomimetic substitutions S457E, S459E, and/or S460E did not have a large effect on the ensemble-averaged internal scaling profiles when compared with the unmodified sequence. We obtained similar results for the 465-501 segment, which is also largely unaffected by the introduction of the phosphomimetic mutation(s) of the S483-486 cluster (Fig. 6 B). Conversely, the 481-515 and 651-684 segments were noticeably sensitive to the addition of



**Figure 5. The S671 phosphorylation site regulates the cell surface expression of  $\text{Na}_V1.5$ .** (A) Representative Western blots of total (left panel) and cell surface (right panel)  $\text{Na}_V1.5$  from HEK-293 cells transiently transfected with  $\text{Na}_V1.5$ -WT +  $\text{Nav}\beta1$ ,  $\text{Na}_V1.5$ -S671A +  $\text{Nav}\beta1$ , or  $\text{Na}_V1.5$ -S671E +  $\text{Nav}\beta1$ . Samples were probed in parallel with the anti-transferrin receptor (TransR) and anti-GAPDH antibodies. (B) Mean  $\pm$  SEM total and cell surface  $\text{Na}_V1.5$  protein expression in transiently transfected HEK-293 cells ( $n = 12$  in six different experiments). Expression of  $\text{Na}_V1.5$  in each sample was first normalized to the TransR protein in the same blot and then expressed relative to  $\text{Na}_V1.5$  protein expression (total or cell surface) in cells transfected with  $\text{Na}_V1.5$ -WT +  $\text{Nav}\beta1$ . Relative (mean  $\pm$  SEM)  $\text{Na}_V1.5$  cell surface expression is different (\*\*\*,  $P < 0.001$ , one-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test) in cells expressing  $\text{Na}_V1.5$ -WT,  $\text{Na}_V1.5$ -S671A, and  $\text{Na}_V1.5$ -S671E channels.

the negative charges (Fig. 6, C and D). When unphosphorylated, these segments preferred conformations that are considerably more compact than the FRC reference. Upon the introduction of cumulative phosphomimetic mutations, these segments gradually expanded in the direction of the EV limit.

Taken together, the results suggest that the intrinsic conformational preferences of the WT sequence dictate the extent of responsiveness of the conformational ensemble to multisite phosphorylation. Sequence stretches that have an intrinsic preference for FRC-like conformations are relatively insensitive to phosphomimetic substitutions of serine/threonine residues. This insensitivity has been quantified for IDRs that undergo multisite phosphorylation (Martin et al., 2016). In contrast, sequences that have an intrinsic preference for compact conformations become responsive to phosphomimetic substitutions. This would appear to derive from the increased fraction of charged residues (FCR; which engenders preferential solvation

and electrostatic repulsions (Mao et al., 2010). The FCR and the net charge per residue are known to be direct determinants of the conformational preferences of IDRs (Holehouse and Pappu, 2018). Both the 441-480 and 465-501 segments have a higher FCR than the 481-515 and 651-684 segments. The addition of a single negative charge would lead to a greater percentage increase in the FCR of the 481-515 and 651-684 segments than it would for the 441-480 and 464-501 segments. As the latter are already expanded, additional charges do not have a large impact on the conformational preference. The more compact starting point of the former allows the phosphomimetic mutations to have a greater effect. While the results for three of the clusters were consistent with the experimental data, those for the S497-499 cluster present an apparent inconsistency. These observations suggest that the ability of this segment to expand due to the addition of charge is not connected to channel gating. Together with the electrophysiological analyses, therefore, these simulations suggest that the effect of phosphorylation at S664 and S667 on the voltage dependence of channel activation is mediated by the expansion of the area containing the phosphorylation sites and that this expansion is likely to regulate channel activation allosterically.

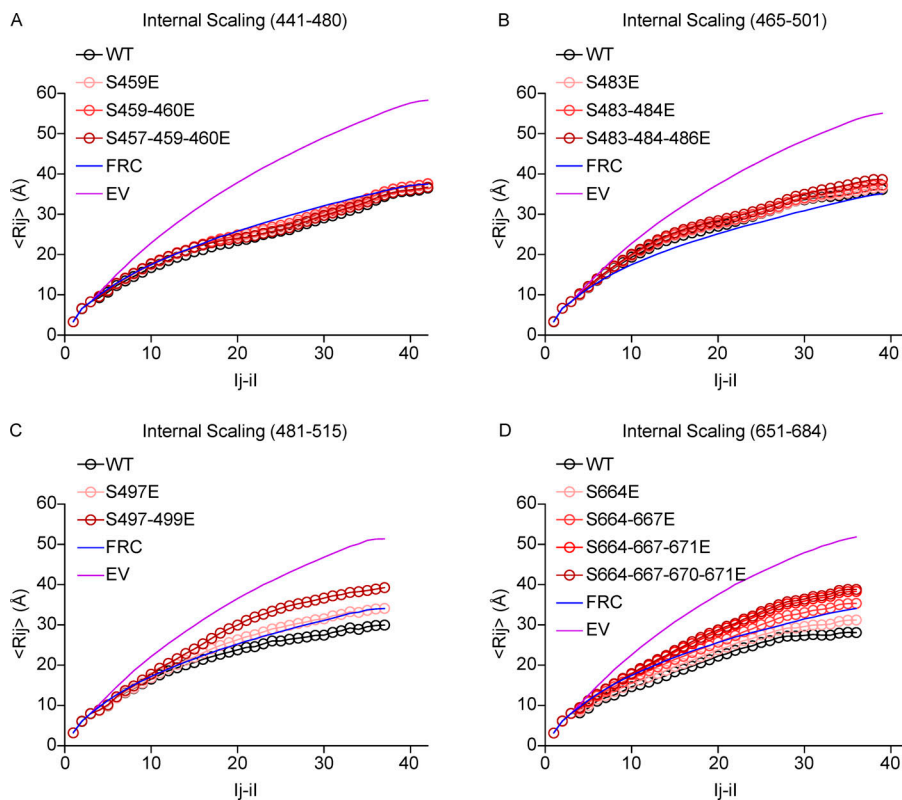
## Discussion

The results presented here provide a novel, detailed phosphorylation map of the native mouse left ventricular  $\text{Na}_V1.5$  channel protein, and identify the functional roles of three of these phosphorylation sites in regulating the expression and gating properties of  $\text{Na}_V1.5$ -encoded channels. The highly phosphorylated S664 and S667 regulate the voltage dependence of channel activation in an additive manner, whereas S671, in which phosphorylation is increased in TAC mouse left ventricles, regulates  $\text{Na}_V1.5$  cell surface expression and peak  $I_{\text{Na}}$  density. No additional roles could be assigned to the other clusters of  $\text{Na}_V1.5$  phosphorylation sites, suggesting additional complexity in the mechanisms mediating the phosphorylation-dependent regulation of cardiac  $\text{Na}_V1.5$  channels.

### Phosphorylation map of native mouse left ventricular $\text{Na}_V1.5$ channels

The present phosphoproteomic analysis confidently identified a total of 42 native phosphorylation sites in the  $\text{Na}_V1.5$  channel protein purified from mouse left ventricles, of which 19 are novel (Table S2). 17 of these sites were also found to be phosphorylated in heterologously expressed human  $\text{Na}_V1.5$  channels (Herren et al., 2015), suggesting that about half of this phosphorylation pattern is conserved among species (mouse and human) and cellular systems (native channels in left ventricles and recombinant channels in HEK-293 cells), whereas the others may be associated with more specific and/or localized regulation. Among the sites identified, only six were previously suggested to be the targets for specific kinases using *in silico* and/or *in vitro* analyses: S36 and S525 were attributed to the regulation by PKA; S484 and S664 were assigned to the serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3 (SGK3); and S516 and S571 were ascribed to CaMKII (reviewed in Marionneau and Abriel,





**Figure 6. Simulations of phosphorylation of segments of the first intracellular linker loop of  $\text{Na}_v1.5$ .** The sequential distance between a pair of residues is on the x axis, and the average spatial distance between a pair of residues separated by the specified sequential distance is on the y axis.  $\langle R_{ij} \rangle$  is the average simulated spatial distance between all residue pairs separated in the amino acid sequence by  $|j-i|$  residues. The WT sequences are plotted in black. Phosphorylation is simulated by single or multiple replacement of serines/threonines with glutamates (E), and resulting simulations are plotted in gradations of red. The FRC (in blue) and EV (in purple) limits are plotted for reference (see text). **(A)** Sequence 441-480 contains the phosphosites S457, S459, and S460. **(B)** Sequence 465-501 contains the phosphosites S483, S484, and T486. **(C)** Sequence 481-515 contains the phosphosites S497 and S499. **(D)** Sequence 651-684 contains the phosphosites S664, S667, T670, and S671.

2015). In marked contrast, several previously described phosphorylation sites were not detected in the present study, including the PKA-dependent S528, the CaMKII-associated T594, the PKC-dependent S1506, the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent T101 (Liu et al., 2019), and the six Fyn-dependent tyrosines (Ahern et al., 2005; Iqbal et al., 2018). Although these latter sites have never been identified in native cardiac tissues and may simply not exist in the myocardium, it is also possible that the MS detection of these sites here was prevented because of technical limitations. Indeed, a few cytoplasmic regions of the channel were not covered in our analysis, most probably because of the presence of too many, or on the contrary not enough, surrounding tryptic cleavage sites (see regions not highlighted in Fig. 2). These areas comprise a total of 24 serine/threonine/tyrosine residues, including T101 and S1506, which may, therefore, have been missed. Additionally, the low levels of threonine and tyrosine phosphorylation, compared with phosphoserines, may have limited the identification of phosphothreonines and phosphotyrosines (Johnson and White, 2012). Overall, of the 188 cytoplasmic serine/threonine/tyrosine residues in  $\text{Na}_v1.5$ , 42 (22%) are phosphorylated, and 24 (13%) are not identified in the MS data acquired.

Strikingly, and consistent with previous studies from our laboratory (Marionneau et al., 2012b; Burel et al., 2017) and the Bers group (Herren et al., 2015), the results obtained and presented here again revealed that the first intracellular linker loop of  $\text{Na}_v1.5$  is a hot spot for phosphorylation, with a total of 21 sites identified. Comparisons of the relative abundances of the

phosphopeptides identified three highly abundant (and highly phosphorylated) clusters of phosphorylation sites in the first intracellular linker loop of  $\text{Na}_v1.5$  in mouse left ventricles. Retrospectively, it is interesting to note that these most abundant phosphorylation sites were already detected in previous less sensitive MS analyses from our laboratory (Marionneau et al., 2012b; Burel et al., 2017; see Table S2). The simplest interpretation of these findings is that these three phosphorylation clusters, at positions S457-S460, S483-T486, and S664-S671, are likely involved in regulating the basal and/or gating properties of native cardiac  $\text{Na}_v1.5$  channels. Conversely, the other phosphorylation sites, with lower stoichiometries, may play spatially or temporally distinct roles in the physiological or more pathological regulation of channel expression or gating. This suggestion is highlighted for residue S671, for example, which is substantially (10-fold) less phosphorylated than the nearby S664 and S667 residues in WT mouse left ventricles, but is (twofold) up-regulated in TAC left ventricles. Remarkably, this MS analysis also revealed that the vast majority of identified phosphorylation sites (at least 26) are clustered, suggesting concomitant phosphorylation and roles in regulating channel expression and/or function. Unexpectedly, however, except for S664, S667, and S671, no apparent effects of phosphomimetic or phosphosilent mutations were observed on heterologously expressed (in HEK-293 cells)  $\text{Na}_v1.5$  current densities or biophysical properties, suggesting a greater complexity than anticipated in the mechanisms contributing to phosphorylation-dependent regulation of  $\text{Na}_v1.5$  channels.

### The S664 and S667 phosphorylation sites regulate the voltage dependence of Na<sub>v</sub>1.5 channel activation

The electrophysiological analyses presented here identified key roles of S664 and S667 in regulating the voltage dependence of Na<sub>v</sub>1.5 channel activation. Indeed, the data demonstrate that the voltage dependence of activation of the quadruple phosphosilent channels at positions S664–671 is shifted toward depolarized potentials, compared with the WT and the quadruple aspartate phosphomimetic channels, whereas the quadruple glutamate phosphomimetic channels display a smaller shift. These findings are consistent with WT channels being phosphorylated at S664 and S667 in HEK-293 cells, as previously reported (Herren et al., 2015), and suggest that disruption of phosphorylation at these sites impacts channel gating.

Further analyses of the roles of each of the four phosphorylation sites in this cluster revealed the specific involvement of S664 and S667 in regulating gating, whereas modifying T670 or S671 was without effects. Interestingly, however, the single glutamate mutations at S664 and S667 produced the same effects as the single phosphosilent mutations. These observations suggest that the consequences of glutamate substitution, which introduces a single negative charge with a small hydrated shell, and the addition of a phosphate group, which introduces two negative charges with a large hydrated shell (Hunter, 2012), are functionally quite distinct. It also seems likely that one glutamate at these loci (in single S664 and S667 phosphomimetic channels) is not sufficient to mimic phosphorylation and that multiple glutamates (i.e., in the quadruple phosphomimetic channel) only partially mimic phosphorylation. The fact that the shifts induced by the single phosphosilent mutations are half the shift generated by the quadruple phosphosilent mutation further supports this hypothesis and suggests that regulation involving these two sites is cumulative and most likely concomitant. Nevertheless, further investigations, aimed at demonstrating the role of phosphorylation, rather than any other structural determinants associated with this locus, are certainly warranted. In this regard, our findings are also in accordance with previous data reporting the role of SGK3 in shifting the voltage dependence of channel activation toward more hyperpolarized potentials in *Xenopus laevis* oocytes, whereas the opposite effect was observed with the Na<sub>v</sub>1.5-S664A phosphosilent channel (Boehmer et al., 2003). Although the involvement of SGK3 and S664 in a shared regulation was not directly shown in this previous study, it is tempting to speculate that SGK3 may constitute the kinase phosphorylating S664 and S667 and mediating this regulation.

The effects of phosphorylation were also analyzed using an all-atom simulations approach to determine how the introduction of negative charges affects the conformational ensemble of the segments containing the phosphorylation clusters identified by MS. These simulations demonstrate that the introduction of negative charges at positions S497–S499 and S664–671 could expand the structure of the containing segments, whereas no effects are likely with the segments containing the S457–460 and S483–486 phosphorylation clusters. Furthermore, for both of the affected segments, the expansion likely gradually increases with the cumulative addition of charges. Interestingly, the simulation

findings are consistent with the additive roles of S664 and S667 in regulating the voltage dependence of channel activation observed in the electrophysiological analyses. Consistent with the proximity of the S664–671 phosphorylation cluster to the DII voltage-sensing domain of Na<sub>v</sub>1.5, which is tightly linked to channel activation (Varga et al., 2015), our findings suggest that phosphorylation at S664 and S667 regulates channel activation through the expansion of the C-terminal extremity of the first intracellular linker loop of the channel. However, no effects on channel gating were observed with the S497–499 phosphomimetic mutant, even though the simulation showed an effect on its ability to expand. This result suggests that the expansion of this segment, which is more distal to the DII voltage-sensing domain, does not regulate channel gating.

### The S671 phosphorylation site regulates Na<sub>v</sub>1.5 channel cell surface expression and peak I<sub>Na</sub> density

The functional analyses also demonstrate that mimicking phosphorylation at S671 decreases the expression of the Na<sub>v</sub>1.5 protein at the cell surface, as well as peak I<sub>Na</sub> density in HEK-293 cells. These results suggest that S671 is not phosphorylated in HEK-293 cells, which is in agreement with the previously published MS analyses (Herren et al., 2015). While the phosphomimetic mutation greatly decreases the cell surface expression of Na<sub>v</sub>1.5, the phosphosilent mutation also reduces Na<sub>v</sub>1.5 surface expression, albeit to a much smaller extent. These confounding results suggest that the regulation mediated by this locus highly depends on structural changes and that the phosphomimetic mutation affects the cell surface expression of the channel in part through a change in the structure of the locus. One could further suggest that the greater effect of the phosphomimetic channel may be caused by additional attributes common to the phosphate group and the glutamate side chain. Together, therefore, these findings highlight the novel role of this locus, and potentially of phosphorylation at this site, in regulating the cell surface expression of Na<sub>v</sub>1.5 channels.

Interestingly, the MS analyses also revealed that phosphorylation at S671 is increased in the left ventricles of TAC mice, suggesting a role in mediating the Na<sub>v</sub> channel defects associated with heart failure. Because previous studies have suggested that CaMKII-dependent phosphorylation of Na<sub>v</sub>1.5 may constitute one of the molecular mechanisms mediating the increased I<sub>NaL</sub> in heart failure (Wagner et al., 2006; Maltsev et al., 2008; Koval et al., 2012; Aiba et al., 2013; Toischer et al., 2013; Glynn et al., 2015), this finding prompted us to examine the I<sub>NaL</sub> generated by the phosphosilent and phosphomimetic Na<sub>v</sub>1.5 mutants at position 671. Our results herein appeared negative, although it cannot be excluded that this regulation may require a specific molecular and cellular environment that is not recapitulated in HEK-293 cells. Additionally, and to our surprise, no changes in phosphorylation at S571 were observed in our TAC model, in contrast with previous findings in nonischemic human heart failure (Koval et al., 2012) and in several animal models of heart disease (Koval et al., 2012; Toischer et al., 2013; Glynn et al., 2015). These seemingly disparate findings may reflect technical and/or experimental differences, including differences in the models used and/or stages of disease.

The results presented here raise the interesting and novel possibility that increased phosphorylation at S671 participates in decreasing the peak  $I_{Na}$  often observed in heart failure. Consistent with this suggestion, a recent study by the Remme group, using superresolution microscopy, showed a reduction in the size of  $Na_v1.5$  clusters in TAC ventricular myocytes without any changes in  $Na_v1.5$  transcript or total protein expression (Rivaud et al., 2017). Although further studies will be required to determine directly whether these observations are causally linked to increased phosphorylation at S671, the results here provide new hints at understanding the molecular basis of the decreased peak  $I_{Na}$  in heart failure.

Altogether, the results presented here demonstrate that native mouse ventricular  $Na_v1.5$  is highly phosphorylated and that the mechanisms mediating the phosphorylation-dependent regulation of  $Na_v1.5$ -encoded channels are site-specific, complex, and dynamic and lead to diverse physiological and/or pathological consequences on both channel gating and expression.

## Acknowledgments

Olaf S. Andersen served as editor.

The expert technical assistance of Petra Erdmann-Gilmore, Yiling Mi, and Rose Connors is gratefully acknowledged.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0006-01 and ANR-16-CE92-0013-01 to C. Marionneau), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ma 1982/5-1 to L.S. Maier), and the National Institutes of Health (R01-HL148803 to C. Marionneau, R.V. Pappu, and J.R. Silva; R01-HL034161 and R01-HL142520 to J.M. Nerbonne; and 5R01NS056114 to R.V. Pappu). The MS experiments were performed at the Washington University Proteomics Shared Resource (WU-PSR), which is supported in part by the WU Institute of Clinical and Translational Sciences (National Center for Advancing Translational Sciences grant U11 TR000448), the Mass Spectrometry Research Resource (National Institute of General Medical Sciences grant P41 GM103422), and the Siteman Comprehensive Cancer Center Support Grant (National Cancer Institute grant P30 CA091842). M. Lorenzini was supported by a Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire–Société Française de Cardiologie predoctoral fellowship (SFC/GRR2018). S. Burel was supported by a Fondation Lefoulon Delalande postdoctoral fellowship. The content of the research reported is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the funding agencies.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: C. Marionneau designed the study and wrote the paper. C. Marionneau, D. Maloney, J.M. Nerbonne, R.R. Townsend, and L.S. Maier designed, performed, and/or analyzed the MS experiments. M. Lorenzini, S. Burel, A. Lesage, C. Charrière, P.-M. Chevillard, B. Evrard, J.M. Nerbonne, and C. Marionneau designed, performed, and/or analyzed the functional analyses. E. Wagner, K.M. Ruff, R.V. Pappu, and J.R. Silva designed, performed, and/or analyzed the modeling analyses. S. Wagner and L.S. Maier provided the sham/TAC mice and performed mouse echocardiography. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Submitted: 2 May 2020

Revised: 23 October 2020

Accepted: 3 December 2020

## References

- Ahern, C.A., J.F. Zhang, M.J. Wookalis, and R. Horn. 2005. Modulation of the cardiac sodium channel  $Na_v1.5$  by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ. Res.* 96:991–998. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000166324.00524.dd>
- Aiba, T., A.S. Barth, G.G. Hesketh, Y.L. Hashambhoy, K. Chakir, R.S. Tunin, J.L. Greenstein, R.L. Winslow, D.A. Kass, and G.F. Tomaselli. 2013. Cardiac resynchronization therapy improves altered Na channel gating in canine model of dyssynchronous heart failure. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 6:546–554. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.000400>
- Ashpole, N.M., A.W. Herren, K.S. Ginsburg, J.D. Brogan, D.E. Johnson, T.R. Cummins, D.M. Bers, and A. Hudmon. 2012.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel  $Na_v1.5$  gating by multiple phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 287:19856–19869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322537>
- Boehmer, C., V. Wilhelm, M. Palmada, S. Wallisch, G. Henke, H. Brinkmeier, P. Cohen, B. Pieske, and F. Lang. 2003. Serum and glucocorticoid inducible kinases in the regulation of the cardiac sodium channel  $SCN5A$ . *Cardiovasc. Res.* 57:1079–1084. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00837-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00837-4)
- Burel, S., F.C. Coyan, M. Lorenzini, M.R. Meyer, C.F. Lichti, J.H. Brown, G. Loussouarn, F. Charpentier, J.M. Nerbonne, R.R. Townsend, et al. 2017. C-terminal phosphorylation of  $Na_v1.5$  impairs FGF13-dependent regulation of channel inactivation. *J. Biol. Chem.* 292:17431–17448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787788>
- Chen, Z.W., K. Fuchs, W. Sieghart, R.R. Townsend, and A.S. Evers. 2012. Deep amino acid sequencing of native brain GABA<sub>A</sub> receptors using high-resolution mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics.* 11:M111.011445. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011445>
- Das, R.K., and R.V. Pappu. 2013. Conformations of intrinsically disordered proteins are influenced by linear sequence distributions of oppositely charged residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110:13392–13397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304749110>
- Dybckova, N., S. Ahmad, S. Pabel, P. Tirilomis, N. Hartmann, T.H. Fischer, P. Bengel, T. Tirilomis, S. Ljubojevic, A. Renner, et al. 2018. Differential regulation of sodium channels as a novel proarrhythmic mechanism in the human failing heart. *Cardiovasc. Res.* 114:1728–1737. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy152>
- Erde, J., R.R. Loo, and J.A. Loo. 2014. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J. Proteome Res.* 13:1885–1895. <https://doi.org/10.1021/pr4010019>
- Gao, S., D. Ho, D.E. Vatner, and S.F. Vatner. 2011. Echocardiography in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 1:71–83.
- Glynn, P., H. Musa, X. Wu, S.D. Unudurthi, S. Little, L. Qian, P.J. Wright, P.B. Radwanski, S. Gyorke, P.J. Mohler, and T.J. Hund. 2015. Voltage-gated sodium channel phosphorylation at Ser571 regulates late current, arrhythmia, and cardiac function in vivo. *Circulation.* 132:567–577. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.015218>
- Herren, A.W., D.M. Weber, R.R. Rigor, K.B. Margulies, B.S. Phinney, and D.M. Bers. 2015. CaMKII phosphorylation of  $Na(V)1.5$ : novel in vitro sites identified by mass spectrometry and reduced S516 phosphorylation in human heart failure. *J. Proteome Res.* 14:2298–2311. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00107>
- Holehouse, A.S., and R.V. Pappu. 2018. Collapse transitions of proteins and the interplay among backbone, sidechain, and solvent interactions. *Annu. Rev. Biophys.* 47:19–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-032838>
- Hund, T.J., O.M. Koval, J. Li, P.J. Wright, L. Qian, J.S. Snyder, H. Gudmundsson, C.F. Kline, N.P. Davidson, N. Cardona, et al. 2010. A  $\beta$ (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J. Clin. Invest.* 120:3508–3519. <https://doi.org/10.1172/JCI43621>
- Hunter, T. 2012. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367:2513–2516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0013>
- Iakoucheva, L.M., P. Radivojac, C.J. Brown, T.R. O'Connor, J.G. Sikes, Z. Obradovic, and A.K. Dunker. 2004. The importance of intrinsic disorder



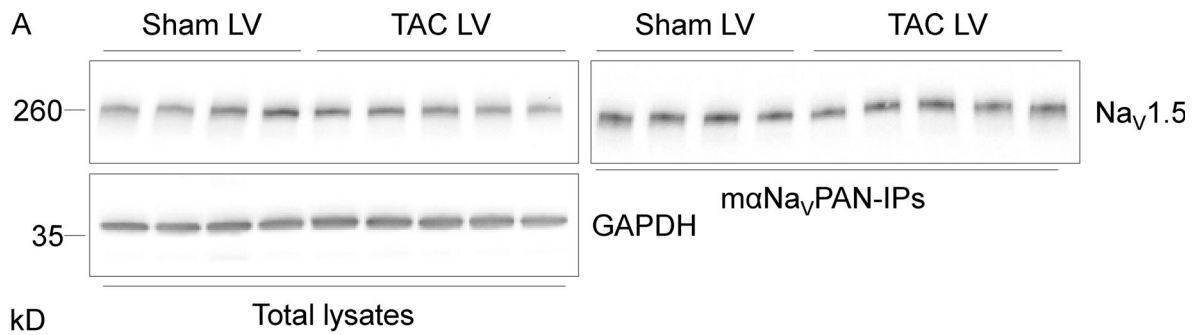
- for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 32:1037–1049. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh253>
- Iqbal, S.M., M. Aufy, W. Shabbir, and R. Lemmens-Gruber. 2018. Identification of phosphorylation sites and binding pockets for modulation of Nav1.5 channel by Fyn tyrosine kinase. *FEBS J.* 285:2520–2530. <https://doi.org/10.1111/febs.14496>
- Johnson, H., and F.M. White. 2012. Toward quantitative phosphotyrosine profiling in vivo. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23:854–862. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.05.008>
- Juang, J.-M.J., C.-T. Tsai, L.-Y. Lin, Y.-B. Liu, C.-C. Yu, J.-J. Hwang, J.-J. Chen, F.-C. Chiu, W.-J. Chen, C.-D. Tseng, et al. 2015. Unique clinical characteristics and SCN5A mutations in patients with Brugada syndrome in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 114:620–626. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.02.002>
- Kääb, S., J. Dixon, J. Duc, D. Ashen, M. Nábauer, D.J. Beuckelmann, G. Steinbeck, D. McKinnon, and G.F. Tomaselli. 1998. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation.* 98:1383–1393. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.14.1383>
- Kapplinger, J.D., D.J. Tester, B.A. Salisbury, J.L. Carr, C. Harris-Kerr, G.D. Pollevick, A.A.M. Wilde, and M.J. Ackerman. 2009. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm.* 6:1297–1303. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.05.021>
- Koval, O.M., J.S. Snyder, R.M. Wolf, R.E. Pavlovic, P. Glynn, J. Curran, N.D. Leymaster, W. Dun, P.J. Wright, N. Cardona, et al. 2012. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-based regulation of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel in cardiac disease. *Circulation.* 126:2084–2094. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.105320>
- Liu, M., L. Gu, M.S. Sulkin, H. Liu, E.M. Jeong, I. Greener, A. Xie, I.R. Efimov, and S.C. Dudley Jr. 2013. Mitochondrial dysfunction causing cardiac sodium channel downregulation in cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 54:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.10.011>
- Liu, X., Z. Chen, Z. Han, Y. Liu, X. Wu, Y. Peng, W. Di, R. Lan, B. Sun, B. Xu, and W. Xu. 2019. AMPK-mediated degradation of Nav1.5 through autophagy. *FASEB J.* 33:5366–5376. <https://doi.org/10.1096/fj.201801583RR>
- Luo, L., F. Ning, Y. Du, B. Song, D. Yang, S.C. Salvage, Y. Wang, J.A. Fraser, S. Zhang, A. Ma, and T. Wang. 2017. Calcium-dependent Nedd4-2 upregulation mediates degradation of the cardiac sodium channel Nav1.5: implications for heart failure. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 221:44–58. <https://doi.org/10.1111/apha.12872>
- Makielski, J.C., B. Ye, C.R. Valdivia, M.D. Pagel, J. Pu, D.J. Tester, and M.J. Ackerman. 2003. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ. Res.* 93:821–828. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000096652.14509.96>
- Maltsev, V.A., N. Silverman, H.N. Sabbah, and A.I. Undrovinas. 2007. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur. J. Heart Fail.* 9:219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2006.08.007>
- Maltsev, V.A., V. Reznikov, N.A. Undrovinas, H.N. Sabbah, and A. Undrovinas. 2008. Modulation of late sodium current by Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294:H1597–H1608. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00484.2007>
- Mao, A.H., S.L. Crick, A. Vitalis, C.L. Chicoine, and R.V. Pappu. 2010. Net charge per residue modulates conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:8183–8188. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911107107>
- Marionneau, C., and H. Abriel. 2015. Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup> channel Nav1.5 by post-translational modifications. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 82: 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.013>
- Marionneau, C., Y. Carrasquillo, A.J. Norris, R.R. Townsend, L.L. Isom, A.J. Link, and J.M. Nerbonne. 2012a. The sodium channel accessory subunit Navβ1 regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Neurosci.* 32:5716–5727. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6450-11.2012>
- Marionneau, C., C.F. Lichti, P. Lindenbaum, F. Charpentier, J.M. Nerbonne, R.R. Townsend, and J. Mérot. 2012b. Mass spectrometry-based identification of native cardiac Nav1.5 channel α subunit phosphorylation sites. *J. Proteome Res.* 11:5994–6007. <https://doi.org/10.1021/pr300702c>
- Martin, E.W., A.S. Holehouse, C.R. Grace, A. Hughes, R.V. Pappu, and T. Mittag. 2016. Sequence determinants of the conformational properties of an intrinsically disordered protein prior to and upon multisite phosphorylation. *J. Am. Chem. Soc.* 138:15323–15335. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10272>
- Mishra, S., V. Reznikov, V.A. Maltsev, N.A. Undrovinas, H.N. Sabbah, and A. Undrovinas. 2015. Contribution of sodium channel neuronal isoform Nav1.1 to late sodium current in ventricular myocytes from failing hearts. *J. Physiol.* 593:1409–1427. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.278259>
- Noyes, A.M., A. Zhou, G. Gao, L. Gu, S. Day, J. Andrew Wasserstrom, and S.C. Dudley. 2017. Abnormal sodium channel mRNA splicing in hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 249:282–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.08.071>
- Pei, Z., Y. Xiao, J. Meng, A. Hudmon, and T.R. Cummins. 2016. Cardiac sodium channel palmitoylation regulates channel availability and myocyte excitability with implications for arrhythmia generation. *Nat. Commun.* 7:12035. <https://doi.org/10.1038/ncomms12035>
- Plant, L.D., D. Xiong, J. Romero, H. Dai, and S.A.N. Goldstein. 2020. Hypoxia produces pro-arrhythmic late sodium current in cardiac myocytes by SUMOylation of Nav1.5 channels. *Cell Rep.* 30:2225–2236.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.025>
- Remme, C.A., A.A.M. Wilde, and C.R. Bezzina. 2008. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc. Med.* 18:78–87. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.01.002>
- Remme, C.A., and C.R. Bezzina. 2010. Sodium channel (dys)function and cardiac arrhythmias. *Cardiovasc. Ther.* 28:287–294. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00210.x>
- Rivaud, M.R., E. Agullo-Pascual, X. Lin, A. Leo-Macias, M. Zhang, E. Rothenberg, C.R. Bezzina, M. Delmar, and C.A. Remme. 2017. Sodium channel remodeling in subcellular microdomains of murine failing cardiomyocytes. *J. Am. Heart Assoc.* 6:e007622. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007622>
- Schneider, C., R.A. Newman, D.R. Sutherland, U. Asser, and M.F. Greaves. 1982. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J. Biol. Chem.* 257:10766–10769.
- Schubert, B., A.M. VanDongen, G.E. Kirsch, and A.M. Brown. 1989. Beta-adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science.* 245:516–519. <https://doi.org/10.1126/science.2547248>
- Shang, L.L., A.E. Pfahnl, S. Sanyal, Z. Jiao, J. Allen, K. Banach, J. Fahrenbach, D. Weiss, W.R. Taylor, A.M. Zafari, and S.C. Dudley Jr. 2007. Human heart failure is associated with abnormal C-terminal splicing variants in the cardiac sodium channel. *Circ. Res.* 101:1146–1154. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152918>
- Toischer, K., N. Hartmann, S. Wagner, T.H. Fischer, J. Herting, B.C. Danner, C.M. Sag, T.J. Hund, P.J. Mohler, L. Belardinelli, et al. 2013. Role of late sodium current as a potential arrhythmogenic mechanism in the progression of pressure-induced heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 61: 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.021>
- Valdivia, C.R., W.W. Chu, J. Pu, J.D. Foell, R.A. Haworth, M.R. Wolff, T.J. Kamp, and J.C. Makielski. 2005. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38:475–483. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.12.012>
- Varga, Z., W. Zhu, A.R. Schubert, J.L. Pardieck, A. Krumholz, E.J. Hsu, M.A. Zaydman, J. Cui, and J.R. Silva. 2015. Direct measurement of cardiac Na<sup>+</sup> channel conformations reveals molecular pathologies of inherited mutations. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 8:1228–1239. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003155>
- Vassilev, P.M., T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science.* 241:1658–1661. <https://doi.org/10.1126/science.2458625>
- Vitalis, A., and R.V. Pappu. 2009a. ABSINTH: a new continuum solvation model for simulations of polypeptides in aqueous solutions. *J. Comput. Chem.* 30:673–699. <https://doi.org/10.1002/jcc.21005>
- Vitalis, A., and R.V. Pappu. 2009b. Methods for Monte Carlo simulations of biomacromolecules. *Annu. Rep. Comput. Chem.* 5:49–76. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(09\)00503-9](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(09)00503-9)
- Wagner, S., N. Dybkova, E.C. Rasenack, C. Jacobshagen, L. Fabritz, P. Kirchhof, S.K. Maier, T. Zhang, G. Hasenfuss, J.H. Brown, et al. 2006. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na<sup>+</sup> channels. *J. Clin. Invest.* 116:3127–3138. <https://doi.org/10.1172/JCI26620>
- Wiśniewski, J.R., A. Zougman, N. Nagaraj, and M. Mann. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods.* 6: 359–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>



- Wright, P.E., and H.J. Dyson. 2015. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:18–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>
- Xi, Y., G. Wu, L. Yang, K. Han, Y. Du, T. Wang, X. Lei, X. Bai, and A. Ma. 2009. Increased late sodium currents are related to transcription of neuronal isoforms in a pressure-overload model. *Eur. J. Heart Fail.* 11:749–757. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp092>
- Yu, P., L. Hu, J. Xie, S. Chen, L. Huang, Z. Xu, X. Liu, Q. Zhou, P. Yuan, X. Yan, et al. 2018. O-GlcNAcylation of cardiac Nav1.5 contributes to the development of arrhythmias in diabetic hearts. *Int. J. Cardiol.* 260:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.02.099>
- Zhang, J., L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G.A. Lajoie, and B. Ma. 2012. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol. Cell. Proteomics.* 11:M111.010587. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010587>
- Zicha, S., V.A. Maltsev, S. Nattel, H.N. Sabbah, and A.I. Undrovinas. 2004. Post-transcriptional alterations in the expression of cardiac Na<sup>+</sup> channel subunits in chronic heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37:91–100. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.04.003>
- Zimmer, T., and R. Surber. 2008. SCN5A channelopathies—an update on mutations and mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98:120–136. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.005>

## Supplemental material

Downloaded from [http://rpress.org/jgp/article-pdf/153/2/e202012646/1407549/jgp\\_202012646.pdf](http://rpress.org/jgp/article-pdf/153/2/e202012646/1407549/jgp_202012646.pdf) by Universitary Library Of Medicine user on 07 September 2022



**B**

Sample	Channel	Normalization factor
Sham LV 1	TMT10-127N	1.04
Sham LV 2	TMT10-127C	0.99
Sham LV 3	TMT10-128N	1.15
Sham LV 4	TMT10-128C	0.99
TAC LV 1	TMT10-129N	1.17
TAC LV 2	TMT10-129C	1.00
TAC LV 3	TMT10-130N	1.26
TAC LV 4	TMT10-130C	1.08
TAC LV 5	TMT10-131	1.22

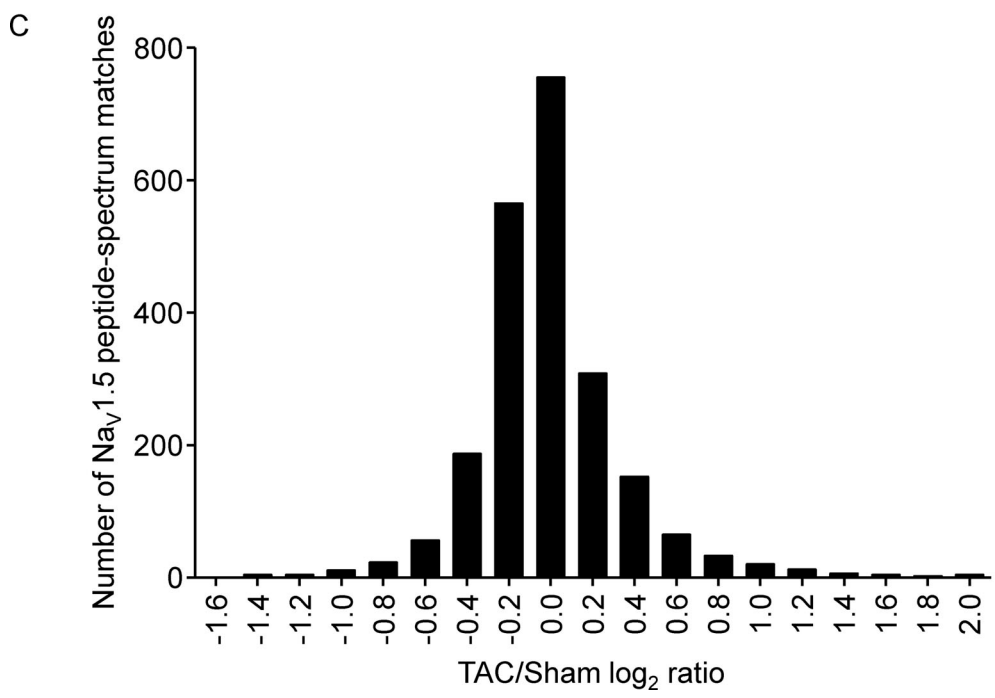


Figure S1. **IP yields and relative quantification of Na<sub>v</sub>1.5 peptide abundances from sham and TAC mouse left ventricles (LVs).** (A) Representative Western blots of total lysates and mcNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC LVs probed with the anti-Na<sub>v</sub>1.5 rabbit polyclonal (RbαNa<sub>v</sub>1.5) and anti-GAPDH mouse mAbs. (B) Normalization factors used in MS1 and MS2 analyses to correct for technical variabilities in Na<sub>v</sub>1.5 protein abundance in mcNa<sub>v</sub>PAN-IPs from sham and TAC LVs. (C) Distribution of TAC/sham log<sub>2</sub>-normalized ratios of Na<sub>v</sub>1.5 peptide spectrum matches. Both biochemical (A) and MS (B and C) analyses of Na<sub>v</sub>1.5 IP yields and peptide relative abundance demonstrate low technical variability.

Mouse 1	MANFLLPRGTS	FRFRFTRESLAAIEKRMAEKQARG	AT	QE	REGLPPEEEAPRPQLDLQASKKLPDLYGNPPREL
Human 1	MANFLLPRGTS	FRFRFTRESLAAIEKRMAEKQARG	AT	QE	REGLPPEEEAPRPQLDLQASKKLPDLYGNPPREL
		<b>N-TERM</b>		36	42
Mouse 76	IGEPLELDLDPFYSTQKTFIVLNKGTIFRFSATNALYVLSPFHPVRAAVK <u>ILVHSLFSLMIMCTILTNCFVMAQ</u>				
Human 76	IGEPLELDLDPFYSTQKTFIVLNKGTIFRFSATNALYVLSPFHPVRAAVK <u>ILVHSLFSLMIMCTILTNCFVMAQ</u>				
		<b>N-TERM</b>		IS1	
Mouse 151	HDPPPWTK <u>YVEYTFTAIYTFESLVKILAR</u> GFCLHAFTFLRD <u>PWNWLDVSVIMAYTTEFV</u> DLGNVS <u>ALRTRFVLR</u>				
Human 151	HDPPPWTK <u>YVEYTFTAIYTFESLVKILAR</u> GFCLHAFTFLRD <u>PWNWLDVSVIMAYTTEFV</u> DLGNVS <u>ALRTRFVLR</u>				
		IS2		IS3	IS4
Mouse 226	<u>ALKTISVISGLKTI</u> VGALIQSVKKLAD <u>VMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNL</u> RHKCVRNFTALNGTNGSVEADGIV				
Human 226	<u>ALKTISVISGLKTI</u> VGALIQSVKKLAD <u>VMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNL</u> RHKCVRNFTALNGTNGSVEADGIV				
		<b>IS5</b>			
Mouse 301	WNSLDVYLNDPANYLLKNGTDDVLLCGNSSDAGTCPEGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAWAFALFLRMTQDCWE				
Human 301	WESLDLYLSDPENYLLKNGTDDVLLCGNSSDAGTCPEGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAWAFALFLRMTQDCWE				
Mouse 376	RLYQQTLRSAGKIY <u>MIFFMLVIFLGSFYLVNLI</u> LAVVAMAYEEQNQATIAETEEKEKRQEAEMMLKKEHEALT				
Human 376	RLYQQTLRSAGKIY <u>MIFFMLVIFLGSFYLVNLI</u> LAVVAMAYEEQNQATIAETEEKEKRQEAEMMLKKEHEALT				
		<b>IS6</b>			
Mouse 451	RGVDTV	RS	LEMSPLAPVNTNHERRSKRRKRL	SSG	EDGGDDRLPKD
Human 451	RGVDTV	RS	LEMSPLAPVNSHERRSKRRKRL	SSG	EECGEDRLPKD
					EDGPRALNQLSLTHGLSRTSMRPRS
					EDGPRAMNHLSTRGLSRTSMKPRS
		457 460	<b>Loop I</b>	483 486	497 499
Mouse 526	RGSI	FTFR	RDDG	LEAD	FADDEN
Human 526	RGSI	FTFR	RDDG	LEAD	FADDEN
					STAGESESHRTLLVPWPLRRPSTQQQPGFGTAPGHVNLGKRNITVDCNGV
					STAGESESHHTLLVPWPLRRPSTQQQPSPGTAPGHVNLGKRNITVDCNGV
		<b>Loop I</b>			
Mouse 601	VSLLGAGDAEATSPGSHLLRPVILDRPDDTTTPEEPPGQMLTQAPCADGFEEPGARQALSAVSVLTALEE				
Human 601	VSLLGAGDPEATSPGSHLLRPVLMLEHPPDDTTTPEEPPGQMLTQAPCADGFEEPGARQALSAVSVLTALEE				
		<b>Loop I</b>			
Mouse 676	LEESHRK	PCPNR	LAQRYLI	WECCPL	WMSIKQGVK
Human 676	LEESHRK	PCPNR	LAQRYLI	WECCPL	WMSIKQGVK
					FVVMDFADLITMCI
					VNLTFM
					ALHEHYNMTAEFEEMLQ
					ALHEHYNMTSEFEEMLQ
					664 671
		<b>IS1</b>			
Mouse 751	<u>VGNLVFTGIFTAEMTFKII</u> ALDPYIFYFQQGWNIFDSIIVILSLMELGLSRMNSL <u>VLRSFRLR</u> VFKLAKSWPTL				
Human 751	<u>VGNLVFTGIFTAEMTFKII</u> ALDPYIFYFQQGWNIFDSIIVILSLMELGLSRMNSL <u>VLRSFRLR</u> VFKLAKSWPTL				
		IS2		IS3	IS4
Mouse 826	NTLIKI	IGNSV	GALGNL	<u>LTLVLAIVFIVFAVVMQLFG</u>	KNYSELRRHISDSGLLPRWHMMDFHAFILIFRILCGE
Human 826	NTLIKI	IGNSV	GALGNL	<u>LTLVLAIVFIVFAVVMQLFG</u>	KNYSELRD--SDSGLLPRWHMMDFHAFILIFRILCGE
		<b>IS5</b>			
Mouse 901	WIETWDC	MEVSGQ	<u>LCLLVFLVMVIGNLV</u>	VNLFL	LALLSSFSADNLTAPDE
Human 899	WIETWDC	MEVSGQ	<u>LCLLVFLVMVIGNLV</u>	VNLFL	LALLSSFSADNLTAPDE
					DREMNQLALARIQGRGRFV
					DREMNQLALARIQGRGRFV
		<b>IS6</b>			
Mouse 976	KRTTWF	FCGLLR	RPKPAALA	HL	OLESCIAAPR
Human 974	KRTTWF	FCGLLR	RPKPAALAAQQLP	SC	IAATPY
					PPPEVEKAPPARKETRFEEEDKRPQGTPGDEPEVCVP
					PPPETEKVPPTRKTRFEEEGEQPGQTPGDEPEVCVP
					1003 1010
		<b>Loop II</b>			
Mouse 1051	I	VAE	SD	DDQ	EDEENSLGTEEESSKQ
Human 1049	I	VAE	SD	DDQ	EDEENSLGTEEESSKQ
					ESQVVS
					GGHEPPQEPRAWSQVSET
					SS
					EAEASTSQADWQERE
					EAEASQADWRQWK
		<b>Loop II</b>			
Mouse 1124	AEPRAP	CGGETP	ED	SY	SEG
Human 1121	AEPRAP	CGGETP	ED	SY	SEG
					STADMTNTADLLEQIPDLGEDVKDPEDCFTEGCVRRCPCCMVDTTQAPGKVVWRLR
					STADMTNTAELLEQIPDLGDQVKDPEDCFTEGCVRRCPCCAVDTTQAPGKVVWRLR
		<b>Loop II</b>			
Mouse 1199	KTCYR	<u>IVEHSWFETFI</u>	<u>IFMILLSSGALAF</u>	EDI	LEERKTIKVL
Human 1196	KTCYH	<u>IVEHSWFETFI</u>	<u>IFMILLSSGALAF</u>	EDI	LEERKTIKVL
					LLEYADKMFTYV
					FVLEMLLKWVAYG
					FKKYFTNA
					LLEYADKMFTYV
					FVLEMLLKWVAYG
					FKKYFTNA
		<b>IS1</b>		<b>IS2</b>	
Mouse 1274	<u>WCWLDFLIVD</u> VSLVSLVANTL <u>GFAEMGPIKSLR</u> TLRALRPLRALSRFEGMRVVNALVGAIPSIMNVLLVCLIFW				
Human 1271	<u>WCWLDFLIVD</u> VSLVSLVANTL <u>GFAEMGPIKSLR</u> TLRALRPLRALSRFEGMRVVNALVGAIPSIMNVLLVCLIFW				
		<b>IS3</b>		<b>IS4</b>	
Mouse 1349	<u>LIFSIMGVNL</u> FAGKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSECESFNVTGELYWKVKVNFNDVNGAGYALLQVATFKG				
Human 1346	<u>LIFSIMGVNL</u> FAGKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSECESFNVTGELYWKVKVNFNDVNGAGYALLQVATFKG				
		<b>IS5</b>			
Mouse 1424	WMDIMYAAVDSRGYEEQPQWEDN <u>LYMYIYFVFI</u> IFGSSFTLNLFIGVII				
Human 1421	WMDIMYAAVDSRGYEEQPQWEDN <u>LYMYIYFVFI</u> IFGSSFTLNLFIGVII				
					DNFNQKKLGGQDIFMTEEQKYY
					DNFNQKKLGGQDIFMTEEQKYY
		<b>IS6</b>			
Mouse 1499	NAMKKL	GSKKPK	QKPI	IPRPL	NKYQGFIFD
Human 1496	NAMKKL	GSKKPK	QKPI	IPRPL	NKYQGFIFD
					IVTKQAFDVTIMFLICLNMVTMMVETDDQSPKVINILAKINLLFVAI
					IVTKQAFDVTIMFLICLNMVTMMVETDDQSPKVINILAKINLLFVAI
		<b>Loop III</b>		<b>IS1</b>	
Mouse 1574	<u>FTGECIVKMAAL</u> RHYFYFTNSWNIFDFVVVILSVIGTVLSDII				
Human 1571	<u>FTGECIVKMAAL</u> RHYFYFTNSWNIFDFVVVILSVIGTVLSDII				
					QKYFFSPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIR
					QKYFFSPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIR
		<b>IS3</b>		<b>IS4</b>	
Mouse 1649	LLFALMMSLPALFN <u>IGLLFLVMFIYSIFGMANFAYV</u> KWEAGIDDMFNQTFANSMCLCFQITTSAGWDGLLSP				
Human 1646	LLFALMMSLPALFN <u>IGLLFLVMFIYSIFGMANFAYV</u> KWEAGIDDMFNQTFANSMCLCFQITTSAGWDGLLSP				
		<b>IS5</b>			
Mouse 1724	LNTGPPYCDPNLPSNGSRGCGSPAV <u>GILFFTTYIIISFLIVNMYIAI</u> LENFSVATEESTPELSEDDDFMFY				
Human 1721	LNTGPPYCDPTLPSNGSRGCGSPAV <u>GILFFTTYIIISFLIVNMYIAI</u> LENFSVATEESTPELSEDDDFMFY				
		<b>IS6</b>			
Mouse 1799	EIWEK	FDPEA	Q	FI	EYLSVSD
Human 1796	EIWEK	FDPEA	Q	FI	EYLSVSD
					FADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRHCDILFAFTRKRVLGESGEMDA
					FADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRHCDILFAFTRKRVLGESGEMDA
		<b>C-TERM</b>			
Mouse 1874	LKIQMEEKFMAANPSKISYEPITTTLLRRKHEEVSATVIRAFRRHLLQRSVKHASFLFRQQAG				
Human 1871	LKIQMEEKFMAANPSKISYEPITTTLLRRKHEEVSAMVIRAFRRHLLQRSVKHASFLFRQQAG				
					SGLSDEDAPER
					SGLSDEDAPER
		<b>C-TERM</b>			
Mouse 1949	EGLIAY	MNENFS	RR	G	PLSS
Human 1944	EGLIAY	MNENFS	RR	G	PLSS
					IS3
					TSFPPSYDSVTRAT
					DNLPVRASDYSRSEDLADFP
					PDRDRESIV
					IS3
					TSFPPSYDSVTRAT
					DNLPVRASDYSRSEDLADFP
					PDRDRESIV
		<b>C-TERM</b>			
		1964	1969		

Figure S2. Conservation of phosphorylation sites in mouse and human Na<sub>v</sub>1.5. The mouse (reference sequence NP\_001240789.1) and human (NP\_000326.2) Na<sub>v</sub>1.5 sequences are aligned, and phosphorylation sites identified on the mouse sequence and conserved in human are highlighted in red. Two phosphorylation site locations are possible at amino acids S1056-T1058 (in green). Transmembrane segments (S1-S6) in each domain (I-IV) are bold and underlined in black; loops I, II, and III correspond to interdomains I-II, II-III, and III-IV, respectively. The seven phosphorylation clusters analyzed electrophysiologically are boxed in red. C-TERM, C terminus; N-TERM, N terminus.

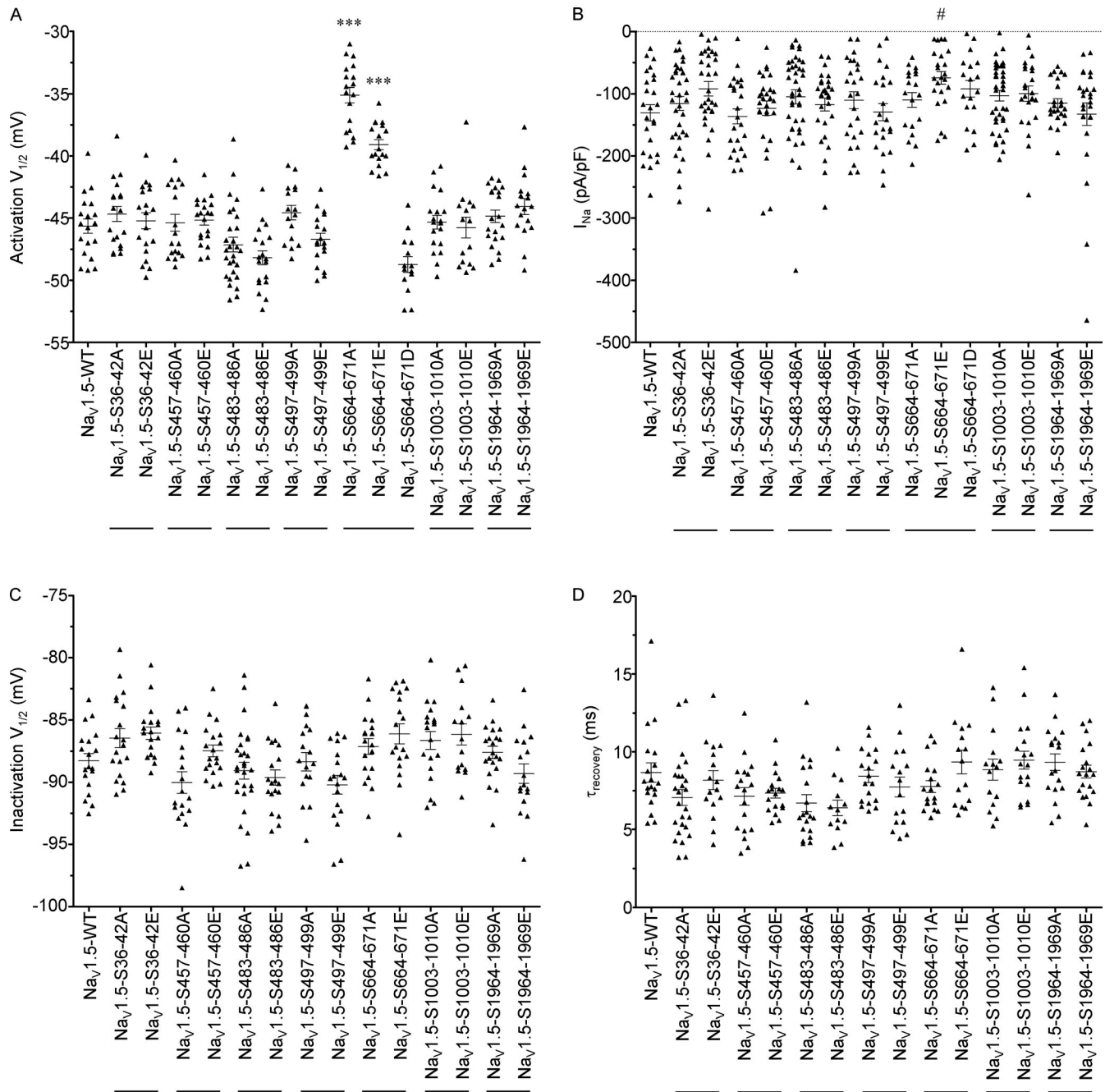


Figure S3. **Distributions and mean  $\pm$  SEM membrane potentials for half-activation and half-inactivation, peak  $I_{Na}$  densities, and time constants of recovery from inactivation of WT and mutant  $Na_v1.5$  channels.** Half-activation (A), peak  $I_{Na}$  densities (B), half-inactivation (C), and time constants of recovery from inactivation (D) of WT and mutant  $Na_v1.5$  channels. Currents were recorded as described in the legend to Fig. 3. The  $I_{Na}$  densities presented were determined from analyses of records obtained on depolarizations to  $-20$  mV (HP =  $-120$  mV),  $P < 0.05$  versus  $Na_v1.5$ -WT, one-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test. \*\*\*,  $P < 0.001$  versus  $Na_v1.5$ -WT, Kruskal-Wallis followed by the Dunn's post-hoc test. Current densities, time- and voltage-dependent properties, and statistical comparisons across groups are provided in Table 3.

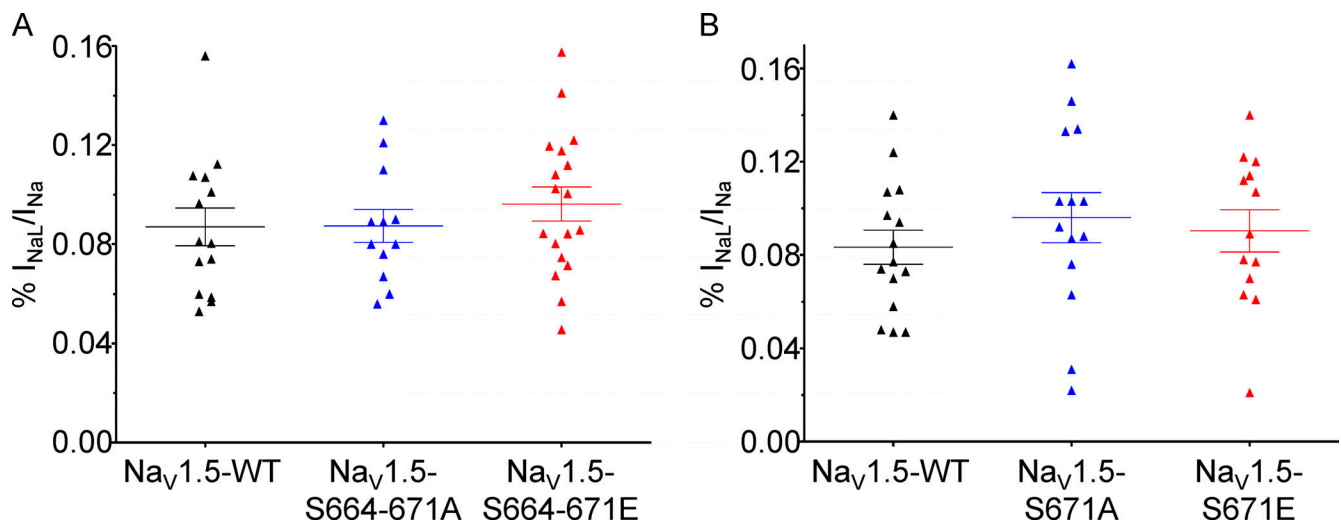


Figure S4. **Distributions and mean  $\pm$  SEM.** (A and B) TTX-sensitive  $I_{NaL}$  densities of quadruple S664-671 (A) and simple S671 (B)  $Na_v1.5$  phosphomutants. TTX-sensitive  $I_{NaL}$  were evoked during prolonged depolarizations (350 ms at  $-20$  mV; HP =  $-120$  mV) 48 h after transfection of HEK-293 cells with WT (black), phosphosilent (blue), and phosphomimetic (red)  $Na_v1.5$  channels and  $Na_v\beta1$ . No significant differences between mutant and WT channels were observed.

Provided online are three tables and one data file. Table S1 lists echocardiographic parameters of sham and TAC mice before and 5 wk after surgery. Table S2 summarizes  $Na_v1.5$  phosphorylation sites identified in the present and previous studies. Table S3 lists phosphorylation sites, phosphopeptides, and site-discriminating ions identified in coimmunoprecipitated  $Na_v\alpha$  subunits from sham and TAC mouse left ventricles using MS. Data S1 lists representative MS/MS spectra of singly or doubly phosphorylated  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.4$ , and  $Na_v1.3$  tryptic peptides.



Annexe 3 : Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp





OPEN

## Computer modeling of whole-cell voltage-clamp analyses to delineate guidelines for good practice of manual and automated patch-clamp

Jérôme Montnach<sup>1,4</sup>, Maxime Lorenzini<sup>1,4</sup>, Adrien Lesage<sup>1</sup>, Isabelle Simon<sup>1</sup>, Sébastien Nicolas<sup>1</sup>, Eléonore Moreau<sup>1,3</sup>, Céline Marionneau<sup>1</sup>, Isabelle Baró<sup>1</sup>, Michel De Waard<sup>1,2</sup> & Gildas Lousouarn<sup>1</sup>✉

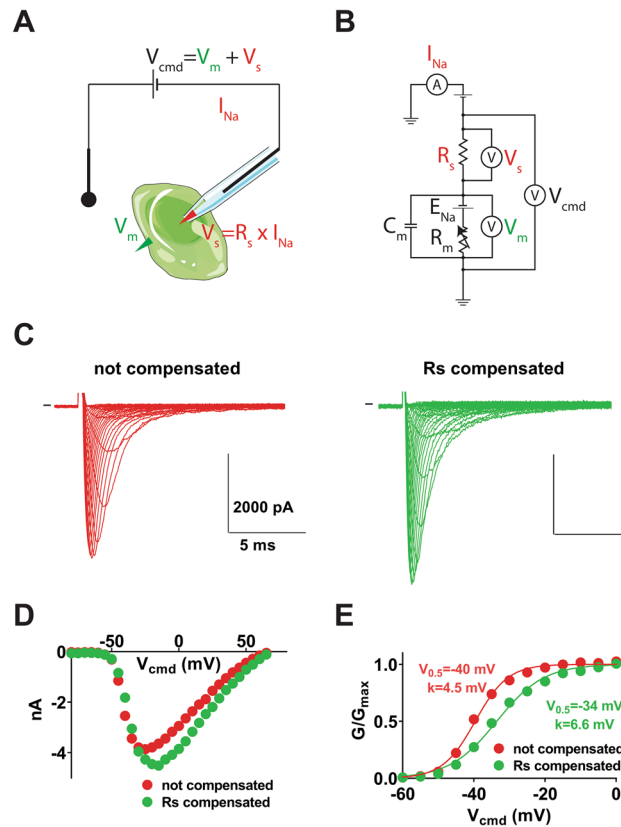
The patch-clamp technique and more recently the high throughput patch-clamp technique have contributed to major advances in the characterization of ion channels. However, the whole-cell voltage-clamp technique presents certain limits that need to be considered for robust data generation. One major caveat is that increasing current amplitude profoundly impacts the accuracy of the biophysical analyses of macroscopic ion currents under study. Using mathematical kinetic models of a cardiac voltage-gated sodium channel and a cardiac voltage-gated potassium channel, we demonstrated how large current amplitude and series resistance artefacts induce an undetected alteration in the actual membrane potential and affect the characterization of voltage-dependent activation and inactivation processes. We also computed how dose–response curves are hindered by high current amplitudes. This is of high interest since stable cell lines frequently demonstrating high current amplitudes are used for safety pharmacology using the high throughput patch-clamp technique. It is therefore critical to set experimental limits for current amplitude recordings to prevent inaccuracy in the characterization of channel properties or drug activity, such limits being different from one channel type to another. Based on the predictions generated by the kinetic models, we draw simple guidelines for good practice of whole-cell voltage-clamp recordings.

The patch-clamp technique has contributed to major advances in the characterization of ion channel biophysical properties and pharmacology, thanks to the versatility of the readouts: (i) unitary currents allowing the study of a single channel conductance, open probability and kinetics, and (ii) whole-cell currents allowing characterization of a population of channels, their pharmacology, the macroscopic properties of the gates, but also the gating kinetics<sup>1,2</sup>.

As for any technique, some practical limits have to be taken into account. As schematized in Fig. 1A,B, a major caveat in the whole-cell configuration of the voltage-clamp technique is due to the fact that the pipette tip in manual patch-clamp, or the glass perforation in planar automated patch-clamp, creates a series resistance ( $R_s$ ) in the order of the M $\Omega$ . Consequently, according to the Ohm's law, when a current flowing through the pipette is in the order of the nA, it leads to a voltage deviation of several mV at the pipette tip or the glass perforation. The actual voltage applied to the cell membrane ( $V_m$ ) is therefore different than the voltage clamped by the amplifier and applied between the two electrodes (pipette and bath electrodes,  $V_{cmd}$ ). This leads for example to an erroneous characterization of a channel voltage-dependent activation process.

This caveat was described early on when the patch-clamp technique was developed<sup>3</sup>. However, with the development of automated patch-clamp for the industry and academia, the technique that was formerly used

<sup>1</sup>Université de Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France. <sup>2</sup>LabEx "Ion Channels, Science & Therapeutics", 06560 Valbonne, France. <sup>3</sup>Present address: Laboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et des Récepteurs (SiFCIR), UPRES EA 2647, USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, UFR Sciences, Université d'Angers, Angers, France. <sup>4</sup>These authors contributed equally: Jérôme Montnach and Maxime Lorenzini. ✉email: gildas.lousouarn@inserm.fr

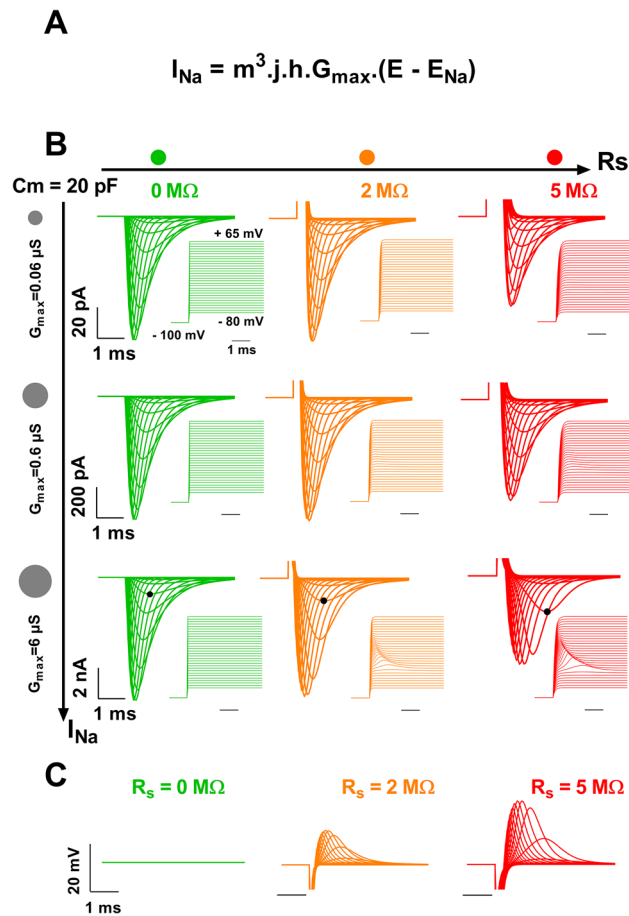


**Figure 1.** (A) Simplified scheme of a cell studied in voltage-clamp, illustrating how the potential clamped between the two electrodes is split between the membrane potential and a potential generated at the pipette tip. (B) Scheme of the equivalent electrical circuit. Pipette capacitance and leak current due to imperfect seal between the pipette and the cell have been omitted for the sake of clarity.  $R_m$ : cell resistance for  $\text{Na}^+$ . This value depends on the  $\text{Na}^+$  channel expression level and the fraction of expressed  $\text{Na}^+$  channels that are open (the higher the value, the less active are the  $\text{Na}^+$  channels). The fraction of channels in the open state depends on voltage and time.  $E_{\text{Na}}$ : value of the reversal potential for  $\text{Na}^+$  (determined by intra- and extracellular  $\text{Na}^+$  concentrations according to the Nernst equation);  $C_m$ : cell capacitance (the higher the value, the larger is the cell). (C) Left, representative, superimposed recordings of heterologously-expressed  $\text{Na}_v1.5$  during an activation voltage protocol (from HP =  $-100$  mV depolarization to steps from  $-80$  to  $+65$  mV), with no compensation. Right, recordings of the same cell with  $R_s$  compensation. (D) I/V curves in the two conditions presented in (C). (E) Activation curves in the two conditions presented in (C).

exclusively by specialized electrophysiologists, has been popularized to scientists that are not always aware of the limits of the technique. In that respect, we now extensively witness new publications that report ionic currents in the range of several nA, that undoubtedly have led to incorrect voltage clamp and erroneous conclusions. Early on, this problem was partially solved by the development of amplifiers with the capacity to add a potential equivalent to the lost one ( $V_s$ ), a function which is called  $R_s$  compensation<sup>4</sup>. Examples of  $\text{Na}^+$  currents generated by  $\text{Na}_v1.5$  voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels, recorded from a transfected COS-7 cell, with and without  $R_s$  compensation, are shown in Fig. 1C–E. These recordings illustrate the kind of errors that can be induced in evaluating activation in the absence of  $R_s$  compensation. However, compensation rarely reaches 100% and some high-throughput systems have limited compensation abilities, to avoid over-compensation and consequent current oscillation that can lead to seal disruption.

Here, we used a mathematical model to study in detail the impact of various levels of  $R_s$  and current amplitude on the steady-state activation and dose–response curves of the cardiac voltage-dependent  $\text{Na}^+$  current  $I_{\text{Na}}$ , as well as the steady-state activation curve of the cardiac voltage-dependent  $\text{K}^+$  current  $I_{\text{to}}$ . We then predicted the impact of various levels of  $R_s$  on the  $\text{Na}^+$  current activation parameters and compared this prediction to whole-cell voltage-clamp recordings obtained in manual patch-clamp analyses of cells transiently expressing  $\text{Na}_v1.5$  channels. Finally, we looked at the impact of  $R_s$  in whole-cell voltage-clamp recordings of  $\text{Na}_v1.5$  currents obtained in automated patch-clamp using the Nanion SyncroPatch 384PE. This study highlights potential incorrect interpretations of the data and allows proposing simple guidelines for the study of voltage-gated channels in patch-clamp, which will help in the design of experiments and in the rationalization of data analyses to avoid misinterpretations.

The aim of this study was thus to use kinetic models of specific ion currents to generate current ‘recordings’ that take into account the voltage error made using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique.



**Figure 2.** Kinetic model of cardiac  $I_{\text{Na}}$  current ( $\text{Na}_v1.5$ )—computed effects of increasing series resistance and current amplitude range on current recordings. **(A)** Expression of the  $\text{Na}^+$  current depending on the activation gate ( $m^3$ ), inactivation gate ( $j \cdot h$ ), the maximal conductance ( $G_{\text{max}}$ ) and the reversal potential for  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ )<sup>5,16</sup>. **(B)** Superimposed computed  $I_{\text{Na}}$ , for increasing current amplitude range ( $I_{\text{Na}}$ , see vertical scales, top to bottom) and series resistance ( $R_s$ , left to right). The activation voltage protocol shown (in inset, holding potential:  $-100 \text{ mV}$ ; 50-ms pulse at the indicated potentials; one sweep every 2 s) corresponds to the potential at the membrane, not the command potential between the two electrodes. It is thus altered when ( $R_s \times I$ ) is elevated, its maximum deflection reaching 26 mV at  $V_{\text{cmd}} = -40 \text{ mV}$  (cf text). **(C)** Superimposed computed voltage deviation for the highest amplitude (10 nA) and various  $R_s$ , as in **(B)**.

We then used and compared these data and experimental observations to propose simple rules for good quality patch-clamp recordings.

## Results

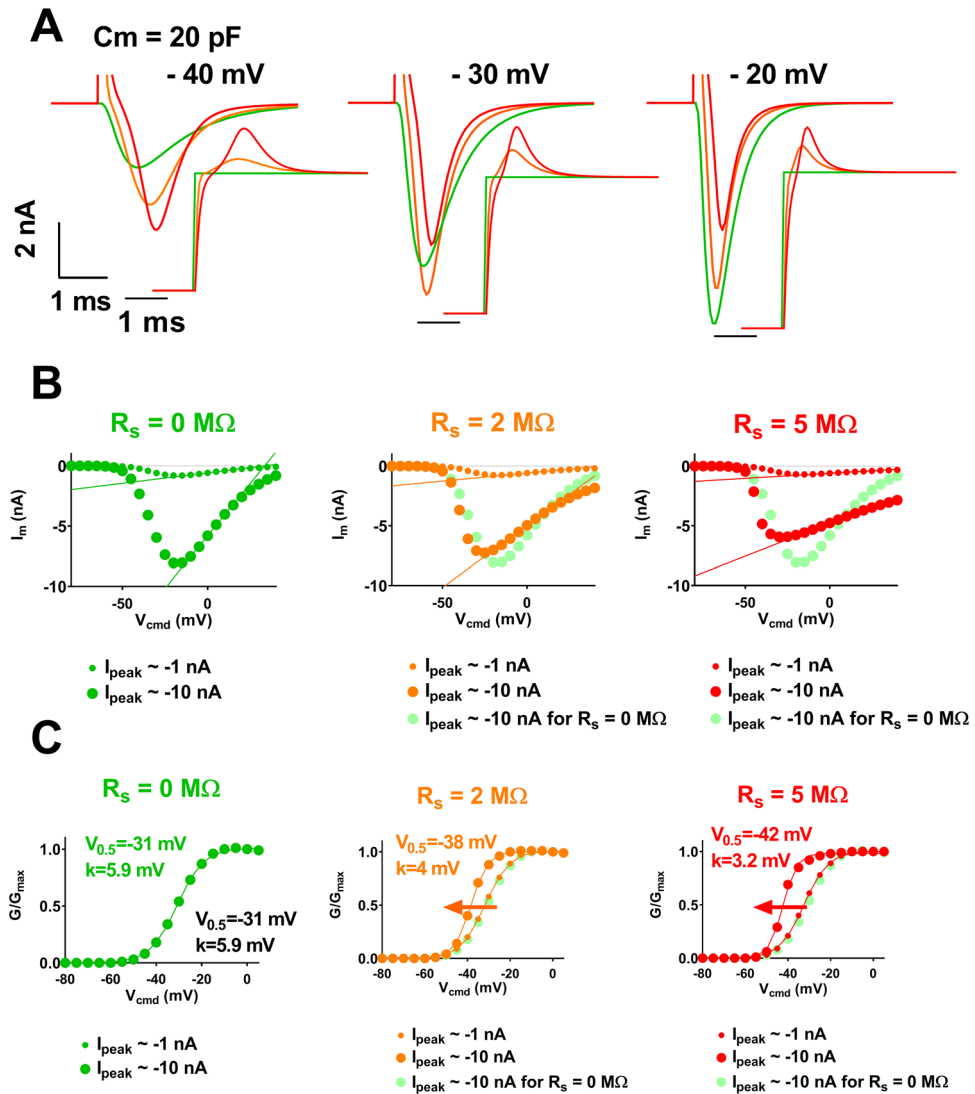
In order to calculate the current ( $I$ ) recorded at a given voltage, in a cell, we used Hodgkin–Huxley models of voltage-gated channels<sup>5</sup>. For this calculation, we need to determine the actual membrane potential ( $V_m$ ) but we only know the potential applied between the pipette and reference electrodes ( $V_{\text{cmd}}$ ), illustrated in Fig. 1A,B. The voltage error between  $V_m$  and  $V_{\text{cmd}}$  is the voltage generated at the pipette tip ( $V_s$ ), which depends on the series resistance ( $R_s$ ) and the current.

$$V_m = V_{\text{cmd}} - R_s \times I$$

$I$  is the resultant of the membrane resistance variations, due to channels opening or closing,  $R_m$ . For voltage-gated channels,  $R_m$  varies with voltage,  $V_m$ , and time.

Since  $I$  is a function of  $V_m$ , through channels voltage-dependence, and  $V_m$  depends on  $I$  (cf. the equation above), the value of  $I$  can only be obtained through an iterative calculation at each time step (see supplemental information with a limited number of equations, for further details).

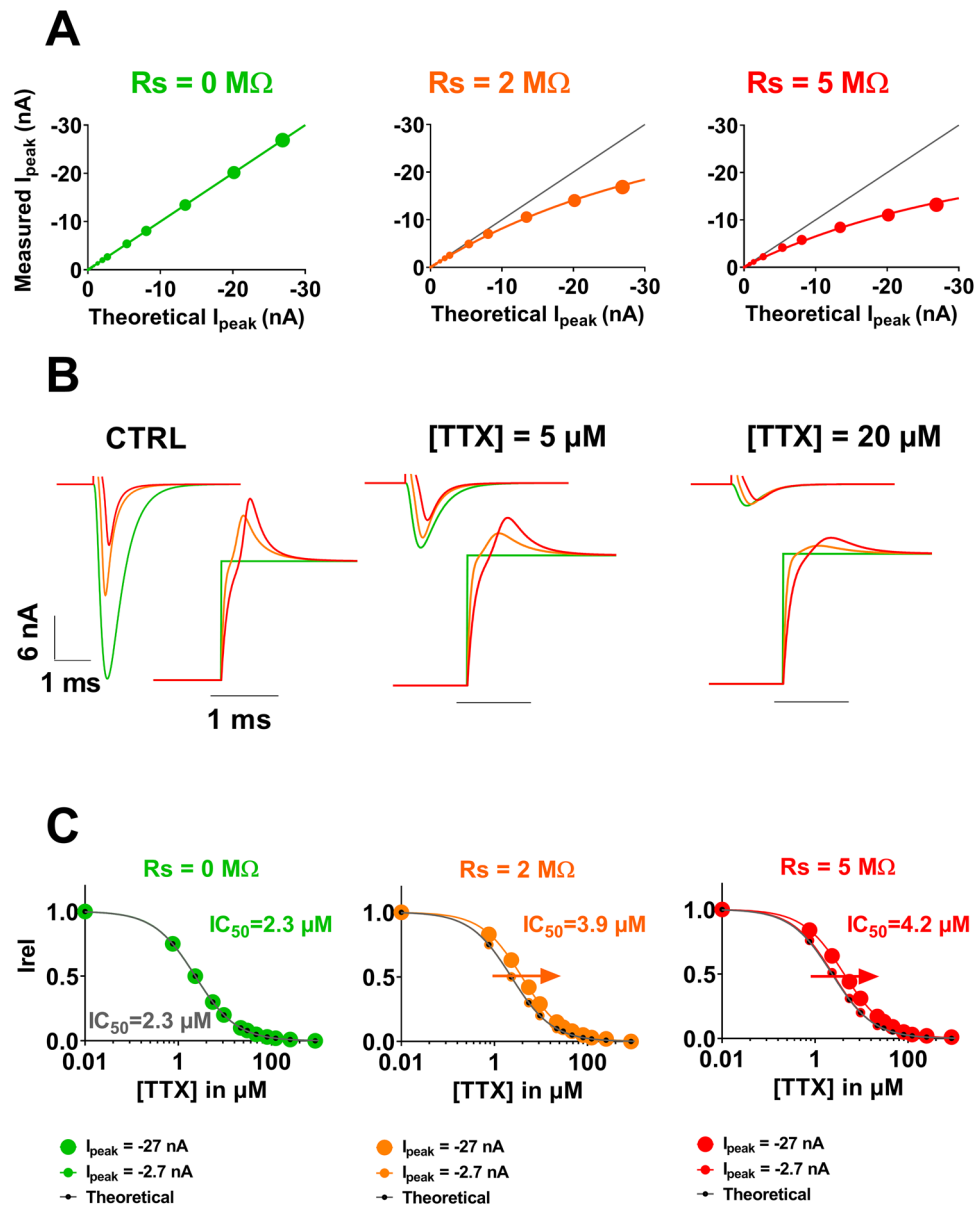
We started to model the current conducted by cardiac voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels ( $\text{Na}_v1.5$  for the vast majority) for a combination of series resistance ( $R_s$ ) values and current amplitude ranges (depending on the amount of active channels in the membrane, Fig. 2A,B). First, when  $R_s$  is null (the ideal condition, which can almost be reached experimentally if  $R_s$  compensation is close to 100%), the voltage error is null and the shapes of the recordings are identical, independent of the current amplitude (in green in Fig. 2B). Consistent with the voltage error being proportional to both  $R_s$  and current amplitude values, we observed that combined increase in  $R_s$  and



**Figure 3.** Kinetic model of cardiac  $I_{Na}$  current ( $Na_v1.5$ )—computed effects of increasing series resistance and current amplitude range on apparent current parameters. **(A)** Computed time course of  $I_{Na}$  current at the indicated command potential, for various values of  $R_s$ , as indicated by colors. **(B)** Peak current/voltage ( $I/V$ ) relationships in the three conditions. Optimal  $I/V$  curve is repeated (light green), allowing easy comparison. Straight lines are fits of the  $I/V$  curves when voltage-dependent activation is achieved. The slope of the linear function corresponds to the maximal conductance. **(C)** Activation curves ( $G/G_{max}$  vs  $V_{cmd}$ ) in various conditions as indicated by color and symbol size. Theoretical half-activation potential ( $V_{0.5}$ ) and slope ( $k$ ) values in black.  $V_{0.5}$  and  $k$  for  $R_s$  of 0, 2 and 5  $M\Omega$  and current range of 10 nA are indicated in colors.

current amplitude leads to alteration in the current traces, due to a deviation of  $V_m$  from  $V_{cmd}$  (Fig. 2B). When  $R_s$  is equal to 2  $M\Omega$  (in orange), alterations in the shape of the currents are observed only when current amplitude reaches several nA (high expression of ion channels, bottom), with, for instance, time to peak at  $-45 \text{ mV}$  increasing from 0.9 ms (at  $R_s = 0 \text{ M}\Omega$ ) to 1.15 ms (at  $R_s = 2 \text{ M}\Omega$ ). When increasing  $R_s$  to 5  $M\Omega$ , alterations are minor in the medium range of current, but are emphasized when currents are large (middle and bottom, in red), with time to peak at  $-45 \text{ mV}$  reaching 1.6 ms. As illustrated in Fig. 2B, when  $I$  and  $R_s$  are elevated, the voltage applied to the membrane,  $V_m$ , can reach  $-14 \text{ mV}$ , whereas the applied voltage command,  $V_{cmd}$ , is  $-40 \text{ mV}$  (bottom right,  $V_m$  inset). Thus, in these conditions, the voltage deviation represents 26 mV at the peak of the effect, which is not insignificant (Fig. 2C).

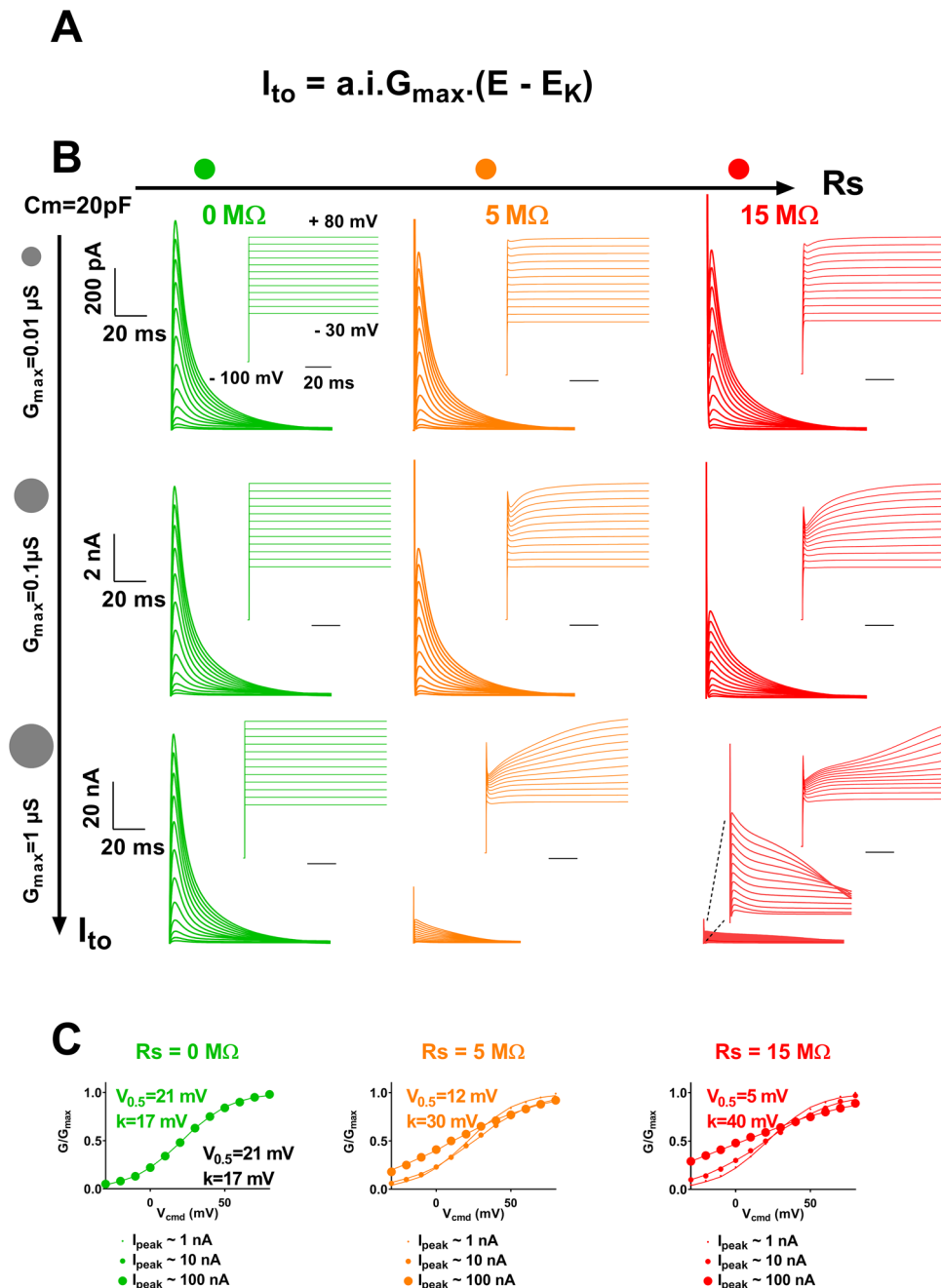
The impact of  $R_s$  on current amplitude is the highest for large amplitudes (Fig. 3A, 10-nA range), e.g. at potentials between  $-40$  and  $-20 \text{ mV}$ . At such potentials, activation and inactivation time courses are clearly altered by high  $R_s$  values. Altogether, this leads to major artefactual modifications of the current–voltage and activation curves (Fig. 3B,C). Indeed, except when  $R_s$  is null, increasing the current amplitude range, from 1 to 10 nA, shifts the voltage-dependence of activation ( $V_{0.5}$ ) towards hyperpolarized potentials (Fig. 3C). For the largest currents, series resistance of 2 and 5  $M\Omega$  induces  $-7 \text{ mV}$  and  $-11 \text{ mV}$  shifts of  $V_{0.5}$ , respectively. The slope factor  $k$  is also drastically reduced by a factor of 1.5 and 1.8, respectively.



**Figure 4.** Kinetic model of cardiac  $I_{Na}$  current ( $Na_v1.5$ )—computed effects of increasing series resistance and current amplitude on apparent TTX effects. **(A)** Relationships between the theoretical values of peak  $I_{Na}$  (with no voltage error) and the measured values of  $I_{Na}$  for three different values of  $R_s$  (0, 2 and 5 MΩ). **(B)** Computed recordings of the  $I_{Na}$  current at the indicated TTX concentrations, for various values of  $R_s$ , as indicated by colors. **(C)** Computed dose–response curves for three  $R_s$  conditions ( $R_s = 0, 2$  and 5 MΩ) and two amplitude ranges ( $I_{peak} = -2.7$  and  $-27$  nA).

Besides impact on the characteristics of voltage-dependent activation,  $R_s$  may also impact channel pharmacological characteristics. In order to model this impact, we established, for various values of  $R_s$ , the relationship between the theoretical values of the peak  $Na^+$  current,  $I_{peak}$  (with no voltage error) and the measured values of  $I_{peak}$ . We calculated this relationship at a potential that could be used to establish the dose–response curve, here  $-20$  mV. First, when  $R_s$  is null, the voltage error is null and both values (theoretical and computed values) are the same. As  $R_s$  increases, the measured  $I_{Na}$  curve is inflected accordingly (Fig. 4A, middle and right).

We used this relationship to look at the impact of  $R_s$  on the apparent effects of a channel blocker—tetrodotoxin (TTX)—on the  $Na^+$  current. We started with published data on TTX<sup>6</sup> to generate the theoretical ( $R_s = 0$  MΩ) dose–response curve and current traces in the presence of various concentrations of TTX (Fig. 4B,C, green). Then we used the relationship between the theoretical and measured values of  $I_{peak}$  at  $R_s$  of 2 and 5 MΩ (established in Fig. 4A), to build the dose–response curves, for these  $R_s$  values (see “Methods” section for details). In the absence of TTX (Fig. 4B, left), current amplitude is high and voltage-clamp is not efficient, thus there are major differences between theoretical (green) and measured (orange and red) amplitudes. When inhibitor concentration increases, remaining current amplitudes decrease and the voltage-clamp improves. Hence, with higher TTX

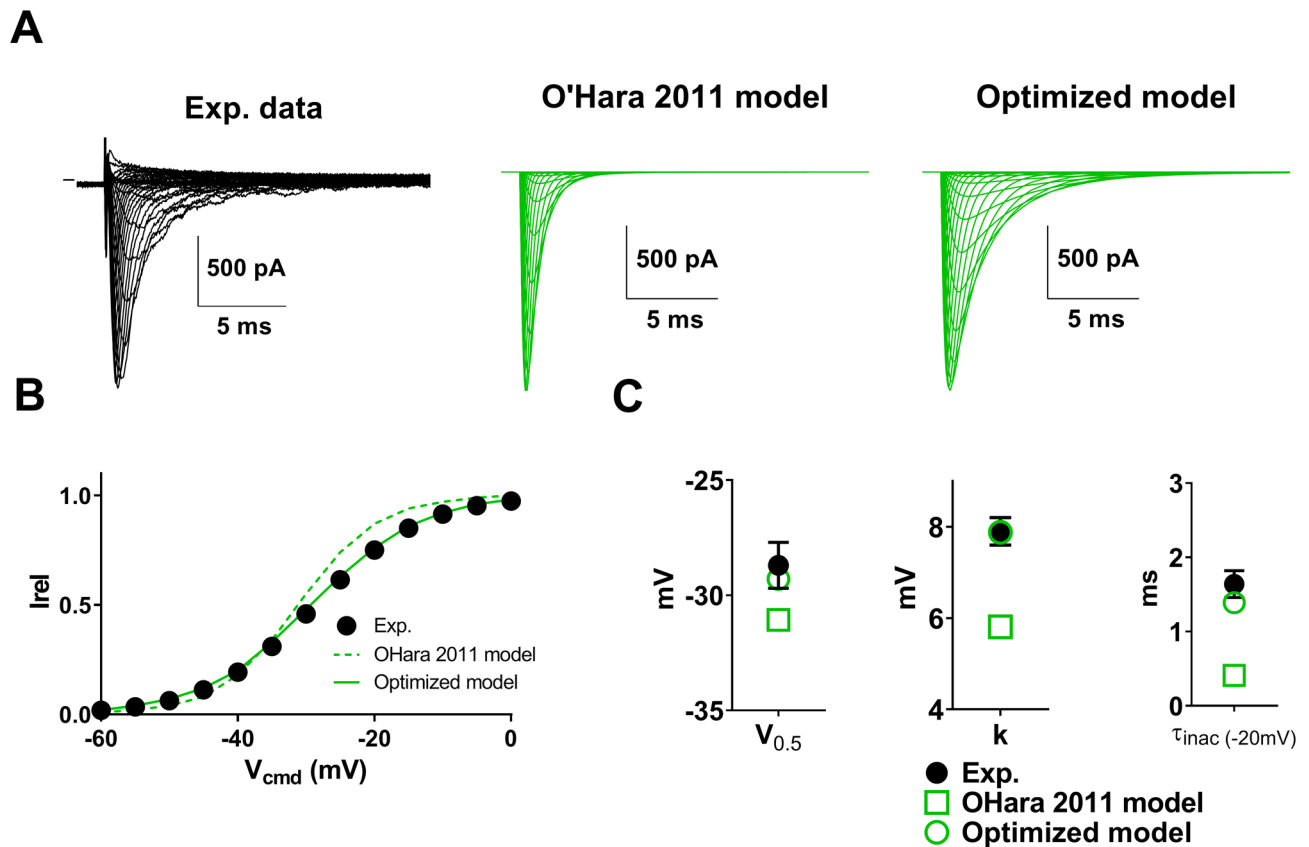


**Figure 5.** Kinetic model of cardiac  $I_{to}$  current—computed effects of increasing series resistance and current amplitude on current recordings. (A) Expression of the  $K^+$  current depending on the activation gate (a), inactivation gate (i), the maximal conductance ( $G_{max}$ ) and the reversal potential for  $K^+$  ( $E_K$ )<sup>5</sup>. (B) Computed superimposed recordings of the  $I_{to}$  current, for various current amplitudes and series resistances ( $R_s$ ), as indicated. The activation voltage protocol shown (holding potential:  $-100 \text{ mV}$ ; 100-ms pulse at the indicated potentials; one sweep every 2 s) corresponds to the potential experienced by the membrane ( $V_m$ ), not the potential between the two electrodes ( $V_{cmd}$ ). It is thus altered when ( $R_s \times I$ ) is elevated. (C) Activation curves ( $G/G_{max}$  vs  $V_{cmd}$ ) in the three conditions represented in (B). Theoretical half-activation potentials ( $V_{0.5}$ ) and slopes (k) are indicated in black.  $V_{0.5}$  and k for  $R_s$  of 0, 5 and 15 M $\Omega$  and  $I_{peak}$  of 100 nA are indicated in colors.

does the theoretical and measured values become closer, independent of the  $R_s$  values (Fig. 4B, right). This leads to an artefactual shift of the resulting dose–response curve towards higher concentrations (Fig. 4C). For  $I_{peak} = -27 \text{ nA}$ ,  $R_s$  of 2 and 5 M $\Omega$  induce an increase of  $IC_{50}$  by a factor of 1.7 and 1.8, respectively. For low  $I_{peak}$  ( $-2.7 \text{ nA}$ ), these modifications are minimal.

We applied the same modeling strategy to study the impact of  $R_s$  on the ‘measurement’ of the voltage-gated  $K^+$  current  $I_{to}$ , using a Hodgkin–Huxley model of this current<sup>5</sup> (Fig. 5A). As for the  $Na^+$  current, we modeled

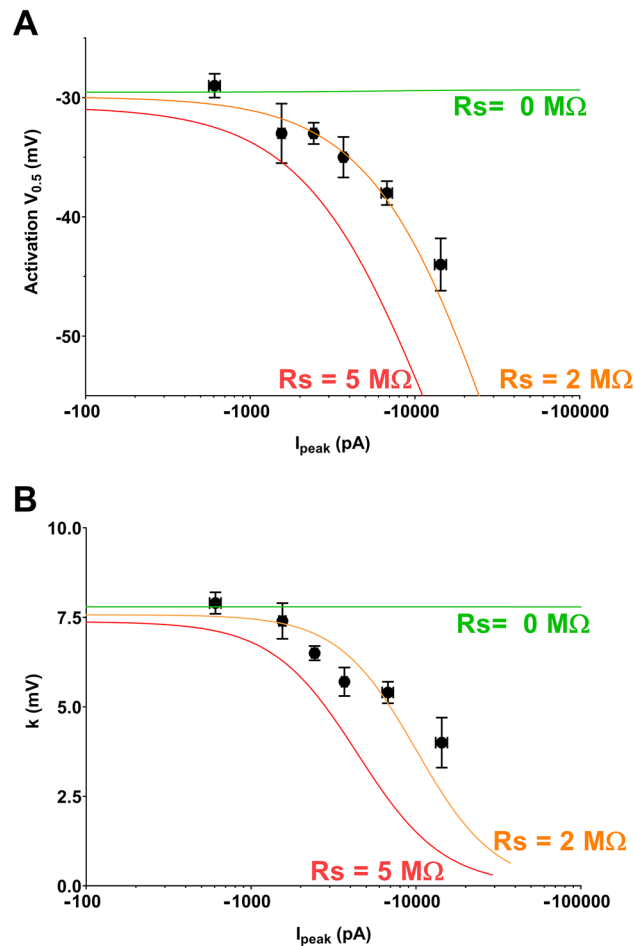




**Figure 6.** Optimization of the Kinetic model presented in Fig. 2 to fit the recordings of heterologously-expressed  $\text{Na}_v1.5$ . (A) Left, representative, superimposed recordings of heterologously-expressed  $\text{Na}_v1.5$  during an activation voltage protocol (same as in Fig. 2). Middle, computed recordings using the same protocol, and the equation of<sup>5</sup>. Right, computed recordings using the same protocol, and the optimized model, to fit the biophysical characteristics of heterologously-expressed  $\text{Na}_v1.5$ . (B) Activation curves in the three conditions presented in (A). (C) Half-activation potentials, slopes and time constants of inactivation in the three conditions.

the  $I_{to}$  current for a combination of values of series resistance and current amplitude. Again, when  $R_s$  is null, the voltage error is null and the shapes of the recordings are identical, independent of the current amplitude (in green in Fig. 5B). Consistent with voltage error being proportional to both  $R_s$  and current amplitude, we observed that combined increase in  $R_s$  and current amplitude leads to alteration in the recordings, due to a deviation of  $V_m$  from  $V_{cmd}$  (Fig. 5B).  $I_{to}$  current characteristics, nonetheless, are less sensitive to  $R_s$  and current amplitude than  $I_{Na}$ : when  $R_s$  is equal to 5 M $\Omega$  (in orange), alteration in the shape of the recordings is significant only when current amplitude is tenfold higher than  $\text{Na}^+$  currents (Fig. 5B, bottom center). However, a reduction in current amplitude is readily obtained for intermediate  $R_s$  and current amplitudes. When  $R_s$  reaches 15 M $\Omega$  and current amplitude is equal to several tens of nA, conditions routinely observed in automated patch-clamp with stable cell lines<sup>7,8</sup>, the model predicts a major modification of the activation curve and apparition of a delayed inactivation (Fig. 5B, bottom right). When  $R_s$  is not null, increasing peak current amplitude up to 100 nA leads to a major shift in voltage-dependence of activation as follows: for a peak current of 100 nA,  $R_s$  of 5 and 15 M $\Omega$  induces -9 mV and -16 mV shifts of the half-activation potential, respectively. The slope is also drastically increased by a factor of 1.8 and 2.4, respectively (Fig. 5C). Noteworthy, when  $R_s$  is 15 M $\Omega$  and amplitudes are in the order of several tens of nA, major voltage deviation occurs, decreasing the current amplitude by a factor of ten. This may falsely give the impression that the current is not high and thus that the introduced voltage error is negligible.

In order to test whether the model reproduces experimental data, we used a set of data of heterologously-expressed  $\text{Na}_v1.5$  currents recorded in COS-7 cells using manual voltage-clamp (qualitatively validated or not, to include highly 'artefacted', erroneous data). When using transient transfection systems, recorded currents are very variable from cell to cell, with peak currents measured at -20 mV ranging from 391 pA to 17.8 nA in the chosen cell set (52 cells). We used this variability to study the effect of current amplitude on the activation curve properties. First, in order for the model to be as close as possible to experimental data, we modified the previously published Hodgkin-Huxley model to match the properties of the  $\text{Na}_v1.5$  current obtained in optimal experimental conditions (Fig. 6). We used as reference group, the cells presenting peak current amplitudes (measured at -20 mV) in a range smaller than 1 nA (7 cells), and with  $R_s$  compensation allowing residual  $R_s$  of around 2 M $\Omega$ . The initial model (Fig. 3) suggests negligible alteration of  $V_{0.5}$  and  $k$  in these conditions. The model was



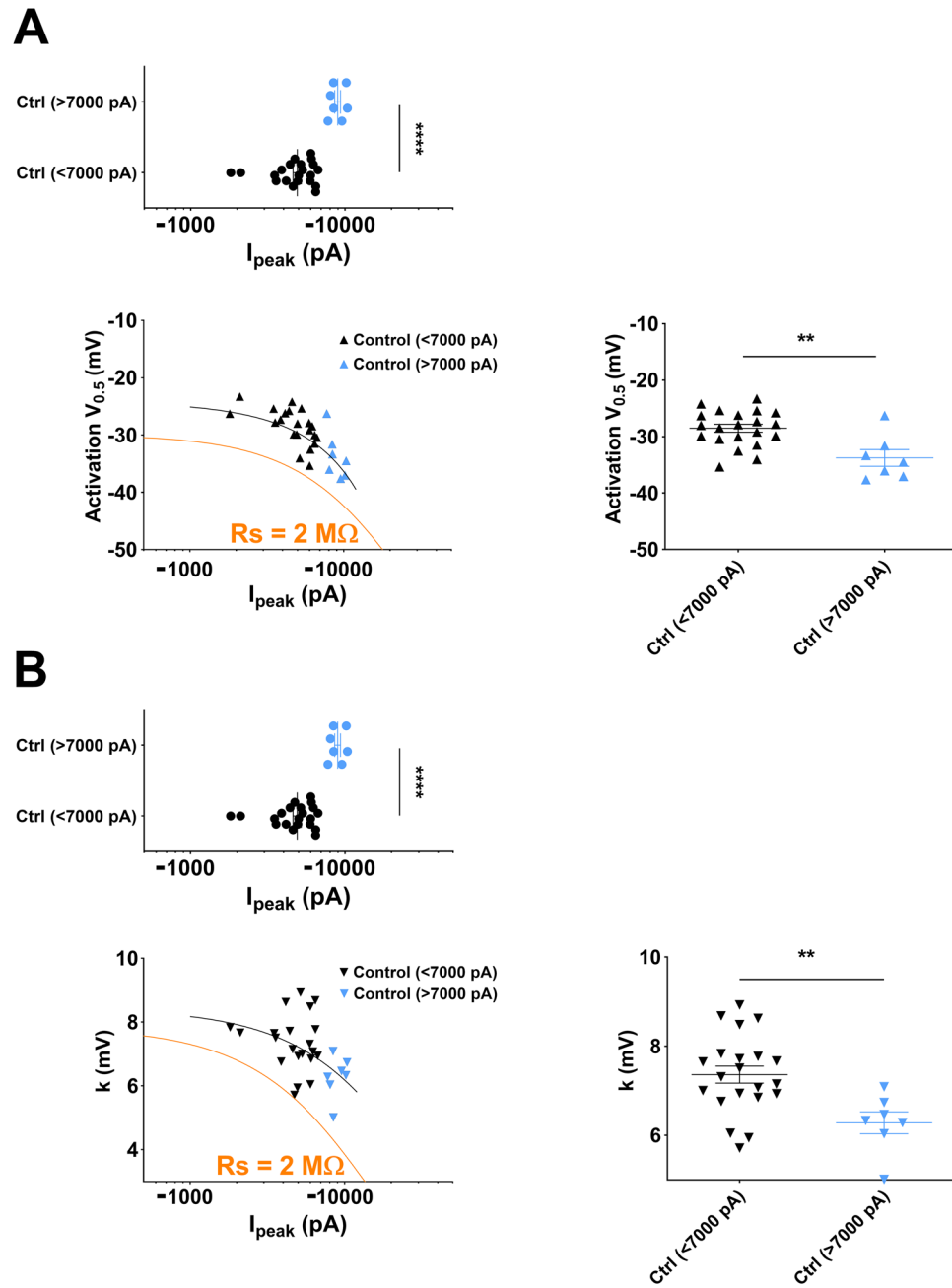
**Figure 7.**  $V_{0.5}$  vs. amplitude plots and slope vs. amplitude plots of heterologously-expressed Na<sub>v</sub>1.5 currents recorded in COS-7 using manual patch-clamp. (A) Symbols represent the mean  $\pm$  sem of pooled experimental values of  $V_{0.5}$  as a function of mean  $\pm$  sem values of current amplitudes. Lines correspond to fit of computed values obtained from the kinetic model that has been optimized in Fig. 6 and in which  $R_s$  has been set to 0, 2 and 5 M $\Omega$  (compensated  $C_m = 20$  pF). (B) Pooled experimental values of the activation slope as a function of mean  $\pm$  sem values of current amplitudes.

then optimized by adjusting the Hodgkin-Huxley equations (Eqs. 9 and 10 in the “Methods” section) to obtain  $V_{0.5}$ ,  $k$  and inactivation time constants that are similar to averaged values of the 7 reference cells (Fig. 6B,C).

We then split the 52 cells in six groups according to current amplitude range (the 7 reference cells, then four groups of 10 cells, and a last group of 5 cells with a peak  $I_{-20\text{mV}}$  greater than 10 nA), and plotted, for each group, the mean  $V_{0.5}$  (Fig. 7A) and  $k$  values (Fig. 7B) as a function of mean current amplitude. We observed a decrease in both  $V_{0.5}$  and  $k$  when current range increases. These relationships were successfully fitted by the computer model when  $R_s$  was set to 2 M $\Omega$ , which is close to the experimental value, after compensation ( $R_s = 2.3 \pm 0.2$  M $\Omega$ ). In these conditions, if we accept maximal inward peak current amplitudes up to 7 nA, the error in  $V_{0.5}$  is below 10 mV and  $k$  remains greater than 5 mV. Experimentally, current amplitudes larger than 7 nA should be prevented or discarded, to prevent larger errors in evaluating  $V_{0.5}$  and  $k$ . Nevertheless, the benefit of such a representation (Fig. 7) is obvious as a correlation can be drawn between current amplitude and  $V_{0.5}$  and  $k$  values, with a more reliable evaluation of these values at low current amplitude levels.

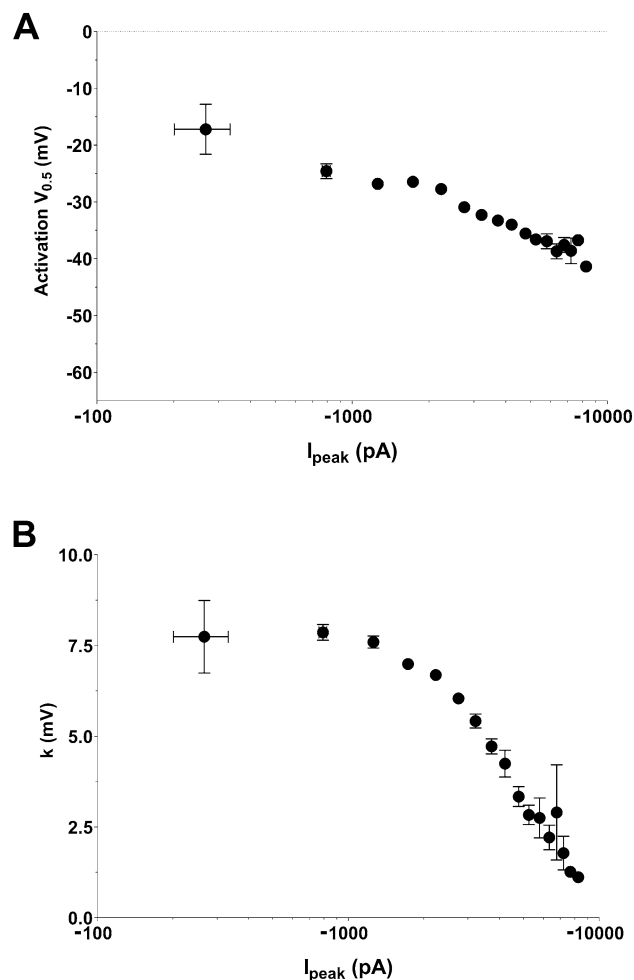
We then used a dataset of  $I_{\text{Na}}$  currents obtained from neonatal mouse ventricular cardiomyocytes, with values of current amplitudes that are frequently published, ranging from 1.8 to 10.3 nA, and using 80% series resistance compensation. We drew similar plots as in Fig. 7, of the experimental activation parameters,  $V_{0.5}$  and  $k$ , as a function of current amplitude in Fig. 8A,B, respectively, and we added the model of heterologously-expressed Na<sub>v</sub>1.5 currents (in orange) generated above. The model does not fit exactly to the data, suggesting that  $I_{\text{Na}}$  properties are slightly different in cardiomyocytes and transfected COS-7 cells. Interestingly, however, the exponential fits of the data follow the same trend, parallel to the COS-7 model, suggesting the same effect of  $R_s$  on  $V_{0.5}$  and  $k$ . Similar to transfected COS-7 cells, cardiomyocytes with currents greater than 7 nA display mean  $V_{0.5} \sim 5$ -mV more negative, and mean  $k \sim 1$ -mV smaller than cardiomyocytes with currents smaller than 7 nA (Fig. 8A,B), suggesting that using a 7 nA amplitude cut-off is appropriate. This comparison shows that differences in activation parameters may be blurred or exaggerated by inappropriate data pooling of cells with excessive current amplitude.





**Figure 8.**  $V_{0.5}$  vs. amplitude and slope vs. amplitude plots of  $I_{\text{Na}}$  measured from neonatal mouse ventricular cardiomyocytes using manual patch clamp. **(A)** Top, distribution of  $I_{\text{peak}}$  amplitudes of the data set. Blue data points correspond to a subset of cells with absolute amplitudes greater than 7000 pA. Left, symbols represent  $V_{0.5}$  values as a function of current amplitude values. The black line corresponds to exponential fit of the data, and the orange line corresponds to fit of computed values obtained from the kinetic model that has been optimized for heterologously-expressed  $\text{Na}_v1.5$  currents in COS-7 cells and in which  $R_s$  has been set to  $2 \text{ M}\Omega$ . Right, mean  $\pm$  sem activation  $V_{0.5}$  for cells with current amplitudes smaller or greater than 7000 pA. \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ , \*\*,  $p < 0.01$ , Mann–Whitney test ( $I_{\text{peak}}$ ) and student's t-test ( $V_{0.5}$ ). **(B)** Same as in A for the slope of the activation curve. \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ , \*\*,  $p < 0.01$ , Mann–Whitney test ( $I_{\text{peak}}$ ) and student's t-test ( $k$ ).

Finally, we used a set of data from HEK293 cells stably expressing the  $\text{Na}_v1.5$  channels, obtained using the automated patch-clamp set-up Syncropatch 384PE (Fig. 9). Cells were grouped by intervals of 500 pA: 0–500 pA, 500–1000 pA, etc. The first experimental group has a mean inward current amplitude lower than the reference group of transfected COS-7 cells ( $-267 \pm 67 \text{ pA}$ ,  $n = 7$  vs  $-608 \pm 48 \text{ pA}$ ,  $n = 7$ , respectively). It should be noticed that in this amplitude range, activation parameters are more difficult to determine. This is reflected by the large s.e.m. values for mean  $V_{0.5}$  and  $k$ . We postulate that HEK293 endogenous currents may non-specifically affect the properties of the recorded currents when they are in the 0–500 pA range. For the following groups with larger



**Figure 9.**  $V_{0.5}$  vs. amplitude plots and slope vs. amplitude plots for  $I_{Na}$  in HEK293 cells stably expressing  $Na_v1.5$  measured using a Nanion Syncropatch 384PE. (A) Symbols represent the mean  $\pm$  sem of pooled values of  $V_{0.5}$  as a function of mean  $\pm$  sem values of current amplitudes. Data points were pooled by 500 pA amplitudes intervals (0–500, 500–1000, etc.) (B) Pooled experimental values of the activation slope as a function of mean  $\pm$  sem values of current amplitudes.

$I_{Na}$  amplitudes,  $V_{0.5}$  seems to be stable. Hence, a  $V_{0.5}$  value around  $-25$  mV appears to be reliable. When current amplitudes are lower than 3.5 nA, the  $V_{0.5}$  change is less than 10 mV and  $k$  remains greater than 5 mV. Therefore, it is essential to perform experiments in conditions in which the inward current value is comprised between 500 pA and 3.5 nA when using such an automated patch-clamp system, and to exclude data with higher peak current amplitudes. These limits are more stringent than for manual patch-clamp as seen above (7 nA), but this is consistent with the limited compensation capabilities of some automated patch-clamp systems demonstrating slow response time for  $R_S$  compensation to avoid over-compensation and consequent current oscillation that can lead to seal disruption.

## Discussion

Even though effects of series resistance have been described very early<sup>3</sup>, a lot of published measured currents are in the range of several nA, which often leads to incorrect voltage clamp. We developed a simple model, using published kinetic models of ion currents, to simulate and describe such a caveat. We used both an inward current generated by a voltage-gated  $Na^+$  channel and an outward current generated by a voltage-gated  $K^+$  channel, both of them characterized by fast activation kinetics. Using these models and experimental recordings, we observed that large series resistance may give erroneous activation curves (Figs. 1,2,3,5,7,8,9) and dose–response curves (Fig. 4).

A similar mathematical model, taking into account the  $R_S$  impact has been used to study the causes of variability of current recordings obtained from the voltage-gated  $K^+$  channel  $K_v11.1$ <sup>9</sup>. Here we used such a model to provide a guideline focusing on parameters that the manipulator can easily act on: current amplitude and  $R_S$ .

We observed that the activation parameters of cardiac voltage-gated  $Na^+$  current  $I_{Na}$  are much more sensitive than those of the cardiac voltage-gated  $K^+$  current  $I_{to}$ : a current amplitude range of 10 nA combined with a  $R_S$  of 5 M $\Omega$  shows almost no alteration of the activation curve of the voltage-gated  $K^+$  channel (Fig. 5B, center and

Fig. 5C, middle), whereas the same condition with the voltage-gated Na<sup>+</sup> channel, shows a major alteration of the activation curve (Fig. 2B, bottom right and Fig. 3C, right). The simplest interpretation of this observation may be associated with the fact that, for Na<sup>+</sup> channels, the increase in Na<sup>+</sup> entry induced by depolarization further depolarizes the membrane and creates instability. For K<sup>+</sup> channels, the increase of K<sup>+</sup> outflow induced by depolarization tends to repolarize the membrane and limits instability. However, in extreme cases, repolarization prevents the occurrence of inactivation, leading to delayed inactivation (Fig. 5B, bottom right).

For the voltage-gated Na<sup>+</sup> channel Na<sub>v</sub>1.5, we concluded that it is essential to prevent recording inward current amplitudes greater than 7 nA when residual R<sub>s</sub> is around 2 MΩ to get a reasonable estimate of the activation gate characteristics in the manual patch-clamp technique (Fig. 7). When using an automated patch system, the limit is lowered to 3.5 nA (Fig. 9).

In order to test for activation changes, induced, for example, by drugs, mutations or post-translational modifications that are associated with current amplitude changes, it is advisable to generate plots of V<sub>0.5</sub> or K as a function of I<sub>peak</sub> in both conditions to early detect artefacts due to excessive current amplitude. This a priori caution will allow adapting experimental conditions to record currents below 7 nA.

To summarize, we suggest simple guidelines for the voltage-gated Na<sup>+</sup> channel Na<sub>v</sub>1.5:

1. Always compensate R<sub>s</sub> as much as possible,
2. R<sub>s</sub> values around 2 MΩ after compensation allow recordings with a maximal inward current of 7 nA in manual patch-clamp,
3. Using Nanion Syncropatch 384PE, recordings with a maximal inward current of 3.5 nA can be used.

These guidelines may be extended to other Na<sub>v</sub> isoforms contingent of generation of plots as in Figs. 7 and 9.

The guidelines are less stringent to record reliable K<sup>+</sup> outward currents. However, one should always compensate R<sub>s</sub> as much as possible. From Fig. 5B,C, for R<sub>s</sub> values up to 5 MΩ after compensation, recordings with a maximal current of 10 nA will be highly reliable. With Nanion Syncropatch384PE, R<sub>s</sub> values up to 15 MΩ after compensation allow recordings with a maximal current of 10 nA, but inhibitors or various transient transfection conditions should be used to make sure that the measured current amplitude is not saturating due to voltage deviation (Fig. 5B, bottom right).

For any current generated by voltage-gated channels, it is judicious to draw activation slope vs. amplitude plots and activation V<sub>0.5</sub> vs. amplitude plots in a preliminary study to determine adapted conditions, a prerequisite to obtain reliable data and results.

For any other ion-channel type—ligand-gated, lipid-gated, regulated by second messengers or else—low membrane resistance i.e. high expression of active ion channels associated with high R<sub>s</sub> values will also interfere with adequate voltage command and current measurements.

Several simple adaptations can be made to reach optimal experimental conditions:

1. R<sub>s</sub> values are much lower when pipettes with low resistance ('large' pipettes) are used. When using amplifiers combining R<sub>s</sub> and C<sub>m</sub> compensation, suppression of pipette capacitance currents is of high interest since uncompensated pipette capacitance has a detrimental effect on the stability of the series resistance correction circuitry. This can be achieved by the use of borosilicate glass pipettes and wax or Sylgard coating<sup>10</sup>. When using Nanion Syncropatch384PE or other automated patch-clamp systems, low resistance chips are preferred.
2. When over-expressed channels are studied, transfection has to be adapted to produce a reasonable amount of channels to generate the desired current amplitude, or, when cell lines stably expressing the channel of interest are used, the clones generating the desired current amplitude range are preferably chosen. Any current, including native currents, can also be reduced when pipette and extracellular concentrations of the carried ion are reduced. In addition, the concentration gradient can be changed to limit the electrochemical gradient. Also inhibitors, such as TTX for Na<sub>v</sub> channels, may be used at low concentration to reduce the current amplitude, as long as the inhibitor does not modify the biophysics of the WT and/or mutant channels, and it does not interfere with the action of other pharmacological compounds.

Therefore, any patch-clamp experiment needs to be carefully designed to reach appropriate conditions, guaranteeing rigorous analysis of the current. Finally, in native cells (excitable or non-excitable), the current passing through an ion channel type is always recorded in combination with other currents (leak current, at the minimum), and is generally isolated pharmacologically (e.g., TTX) or through other means, all involving subtraction of currents (e.g., P/n). The voltage error caused by R<sub>s</sub> also depends on these other currents. Thus, it would be interesting to also model this situation to have a more integrated view of R<sub>s</sub>-induced incorrect voltage clamp.

## Methods

**Computer models.** Application to whole-cell ion currents. I<sub>Na</sub> and I<sub>to</sub> currents were modeled using a Hodgkin–Huxley model of channel gating based on previously published models (O'Hara et al., 2011).

For cardiac I<sub>Na</sub>, we did not include the slow component of h, which only represents 1% of h inactivation (O'Hara et al., 2011).

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_m + 39.57}{9.871}\right)} \quad (1)$$

$$\tau_m = \frac{1}{6.765 \times \exp\left(\frac{V_m+11.64}{34.77}\right) + 8.552 \times \exp\left(-\frac{V_m+77.42}{5.955}\right)} \quad (2)$$

$$j_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m+82.9}{6.086}\right)} \quad (3)$$

$$\tau_j = 2.038 + \frac{1}{0.02136 \times \exp\left(-\frac{V_m+100.6}{8.281}\right) + 0.3052 \times \exp\left(\frac{V_m+0.9941}{38.45}\right)} \quad (4)$$

$$h_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m+82.9}{6.086}\right)} \quad (5)$$

$$\tau_h = \frac{1}{1.432 \times 10^{-5} \times \exp\left(-\frac{V_m+1.196}{6.285}\right) + 6.149 \times \exp\left(\frac{V_m+0.5096}{20.27}\right)} \quad (6)$$

The time-dependent gate values (m, h and j), were computed at every time step<sup>11</sup> with an “adaptive time-step” method as:

$$y_{t+tstep} = y_\infty - (y_\infty - y_t) \times \exp(-t/tstep) \quad (7a)$$

with y being the time-dependent gate value, and tstep, an adaptive time step. tstep was initialized to 0.1  $\mu$ s, doubled when all the relative variations of m, h, or j were smaller than  $0.5 \times 10^{-5}$  and was halved when one of the relative variations of m, h, and j was greater than  $10^{-5}$ . When this limit was reached, the computation went one tstep backward and repeated again with the reduced tstep value to prevent divergence.

To validate this method, we also used an “LSODE” method (cf. example in supplemental Fig. 1). m, h and j were solved as:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{y_\infty - y}{\tau_y} \quad (7b)$$

using R software (v3.6.3, <https://www.r-project.org>) and the LSODE<sup>12</sup> method from deSolve package (v1.28).

In the most critical condition: with a large  $\text{Na}^+$  current ( $G_{\text{max}} = 6 \mu\text{S}$ ) and large series resistance ( $R_s = 5 \text{ M}\Omega$ ), both methods gave identical  $\text{Na}^+$  currents (cf. supplemental Fig. 1). Therefore, the “adaptive time-step” method was used to compute m, h and j values.

$I_{\text{Na}}$  was calculated as follows:

$$I_{\text{Na}} = G_{\text{Na}} \times (V_m - E_{\text{Na}}) \times m^3 \times j \times h \quad (8)$$

with  $E_{\text{Na}} = \frac{RT}{zF} \log\left(\frac{[\text{Na}^+]_{\text{out}}}{[\text{Na}^+]_{\text{int}}}\right)$ ,  $[\text{Na}^+]_{\text{out}} = 145 \text{ mM}$  and  $[\text{Na}^+]_{\text{in}} = 10 \text{ mM}$ .

To model overexpressed  $\text{Na}_v1.5$  currents, we adjusted some parameters, shown in bold, to fit the characteristics of the current when peak amplitude is less than 1 nA (cf results section and Fig. 6).

$$m_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_m+42.57}{12}\right)} \quad (9)$$

$$\tau_h = \frac{4}{1.432 \times 10^{-5} \times \exp\left(-\frac{V_m+1.196}{6.285}\right) + 6.149 \times \exp\left(\frac{V_m+0.5096}{20.27}\right)} \quad (10)$$

To model cardiac  $I_{\text{to}}$ , we did not include the CaMK dependent component, since at low  $\text{Ca}^{2+}$  pipette concentration ( $< 100 \text{ nM}$ ), this component is negligible (2%) (O’Hara et al., 2011).

$$a_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_m-14.34}{14.82}\right)} \quad (11)$$

$$\tau_a = \frac{1.0515}{\frac{1}{1.2089 \times (1 + \exp\left(-\frac{V_m-18.41}{29.38}\right))} + \frac{3.5}{1 + \exp\left(\frac{V_m+100}{29.38}\right)}} \quad (12)$$

$$i_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m+43.94}{5.711}\right)} \quad (13)$$

$$\tau_{i_{\text{fast}}} = 4.562 + \frac{1}{0.3933 \times \exp\left(-\frac{V_m+100}{100}\right) + 0.08004 \times \exp\left(\frac{V_m+50}{16.59}\right)} \quad (14)$$

$$\tau_{i,slow} = 23.62 + \frac{1}{0.001416 \times \exp\left(-\frac{Vm+96.52}{59.05}\right) + 1.78 \times 10^{-8} \times \exp\left(\frac{Vm+114.1}{8.079}\right)} \quad (15)$$

$$A_{i,fast} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{Vm-213.6}{151.2}\right)} \quad (16)$$

$$A_{i,slow} = 1 - A_{i,fast} \quad (17)$$

$$i = A_{i,fast} \times i_{fast} + A_{i,slow} \times i_{slow} \quad (18)$$

$a$ ,  $i_{fast}$  and  $i_{slow}$  were computed at every time step<sup>11</sup> using the “adaptive time-step” method (see above).  $I_{to}$  was calculated as follows:

$$I_{to} = G_{to} \times (Vm - E_K) \times a \times i \quad (19)$$

with  $E_K = \frac{RT}{zF} \log\left(\frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{int}}\right)$ ,  $[K^+]_{out} = 5$  mM and  $[K^+]_{int} = 145$  mM.

For details on the kinetic models, please see<sup>5</sup>.

Membrane potential was computed as follows at each time step:

$$\frac{dVm}{dt} = \frac{Vcmd - Vm}{R_s \times C_m} - \frac{i}{C_m} \quad (20)$$

We hypothesized that the amplifier response time was not limiting. Membrane capacitance used was 20 pF and considered electronically compensated. Errors due to poor space clamp were considered negligible in small cells like COS-7 cells but it is worth mentioning that they should potentially be taken into account in bigger cells such as cardiomyocytes and in cells with complex morphologies such as neurons. Noteworthy, in some situations, specific protocols can reduce these artefacts linked to poor space-clamp<sup>13</sup>. Beyond technical issues due to the patch pipette, additional resistances, due to the narrow T-tubular lumen, are also not negligible in cardiac cell T-tubules and lead to delay in T-tubular membrane depolarization<sup>14</sup>.

**Application to pharmacological investigations.** Before investigating the effects of TTX, we computed the incidence of peak current amplitude at  $-20$  mV on its measured value with various  $R_s$  values (Fig. 4A). TTX effects were modeled by first constructing the theoretical dose–response curve with  $R_s = 0$  M $\Omega$ . Knowing the experimental  $IC_{50}$  and Hill coefficient<sup>6</sup>, we calculated the TTX concentrations necessary to get 0.75 of the current ( $G_{Na} = 1.5$   $\mu$ S instead of  $G_{Na} = 2$   $\mu$ S in the absence of TTX), 0.5 ( $G_{Na} = 1$   $\mu$ S instead of  $G_{Na} = 2$   $\mu$ S in the absence of TTX), 0.3, ... and  $10^{-3}$  of the current. Then, for a given  $R_s$  (2 or 5 M $\Omega$ ), we used the relationship between theoretical and observed measured values of peak current (Fig. 4A) to deduce the corresponding measured  $I_{peak}$  value of the residual current after TTX application. For instance, when  $R_s = 5$  M $\Omega$ , for a theoretical current of  $-27$  nA, the measured current is about  $-13$  nA (see in Fig. 4A red chart). The effects of a 50% reduction of the theoretical value of  $-27$  nA (corresponding to the effect of 2.3  $\mu$ M TTX, the  $IC_{50}$  value) results in a measured remaining current of  $-8.3$  nA when  $R_s = 5$  M $\Omega$  (see in Fig. 4A red chart). Therefore, the apparent effect of 2.3  $\mu$ M TTX on a measured current of  $-13$  nA is modeled by a  $-8.3/-13 \approx 0.64$  factor on  $G_{Na}$  in Eq. (8). Similar computations have been conducted for different control current amplitudes,  $R_s$  values, and TTX “doses”, and the corresponding dose–response curves have been built.

**Cell culture and transfection.** The African green monkey kidney-derived cell line, COS-7, was obtained from the American Type Culture Collection (CRL-1651) and cultured in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin) at 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, maintained at 37 °C in a humidified incubator. Cells were transfected in 35-mm Petri dishes when the culture reached 50–60% confluence, with DNA (2  $\mu$ g total DNA) complexed with jetPEI (Polyplus transfection) according to the standard protocol recommended by the manufacturer. COS-7 cells were co-transfected with 200 ng of pCI-SCN5A (NM\_000335.4), 200 ng of pRC-SCN1B (NM\_001037) (kind gifts of AL George, Northwestern University, Feinberg School of Medicine) and 1.6  $\mu$ g pEGFP-N3 plasmid (Clontech). Cells were re-plated onto 35-mm Petri dishes the day after transfection for patch-clamp experiments. HEK293 cells stably expressing hNav1.5 were cultured in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM pyruvic acid, 2 mM glutamine, 400  $\mu$ g/ml of G418 (Sigma), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco, Grand Island, NY) at 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, maintained at 37 °C in a humidified incubator.

**Statement on the use of mice.** All investigations conformed to directive 2010/63/EU of the European Parliament, to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1985) and to local institutional guidelines.

**Neonatal mouse ventricular cardiomyocyte isolation and culture.** Single cardiomyocytes were isolated from the ventricles of mouse neonates aged from postnatal day 0 to 3 by enzymatic and mechanical dissociation in a semi-automated procedure by using the Neonatal Heart Dissociation Kit and the GentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec). Briefly, hearts were harvested, and the ventricles were separated from the atria, and digested in

the GentleMACS™ Dissociator. After termination of the program, the digestion was stopped by adding medium containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The cell suspension was filtered to remove undissociated tissue fragments, and centrifugated. The cell pellet was resuspended in culture medium, and the cells were plated in 60 mm-diameter Petri dishes at 37 °C for 1.5 h. The non-plated myocytes were then resuspended, plated on laminin-coated dishes at a density of 50 000 cells per plate, and incubated in 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>; 95% air incubator. After 24 h-plating, medium was replaced by DMEM supplemented with 1% fetal bovine serum and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, and electrophysiological experiments were performed 48 h following isolation.

**Manual electrophysiology on transfected COS-7 cells.** One or 2 days after splitting, COS-7 cells were mounted on the stage of an inverted microscope and constantly perfused by a Tyrode solution maintained at  $22.0 \pm 2.0$  °C at a rate of 1–3 mL/min; HEPES-buffered Tyrode solution contained (in mmol/L): NaCl 145, KCl 4, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1, HEPES 5, glucose 5, pH adjusted to 7.4 with NaOH. During Na<sup>+</sup> current recording, the studied cell was locally superfused<sup>15</sup> with an extracellular solution used to prevent endogenous K<sup>+</sup> currents, containing (in mmol/L): NaCl, 145; CsCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 1; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 5; glucose, 5; pH adjusted to 7.4 with NaOH. Patch pipettes (tip resistance: 0.8 to 1.3 MΩ) were pulled from soda lime glass capillaries (Kimble-Chase) and coated with dental wax to decrease pipette capacitive currents. The pipette was filled with Na<sup>+</sup> intracellular medium containing (in mmol/L): CsCl, 80; gluconic acid, 45; NaCl, 10; MgCl<sub>2</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; EGTA, 5; HEPES, 10; pH adjusted to 7.2 with CsOH. Stimulation and data recording were performed with pClamp 10, an A/D converter (Digidata 1440A) and an Axopatch 200B (all Molecular Devices) or an Alembic amplifier (Alembic Instruments). Currents were acquired in the whole-cell configuration, filtered at 10 kHz and recorded at a sampling rate of 33 kHz. Before series resistance compensation, a series of 50 25-ms steps were applied from –70 mV to –80 mV to subsequently calculate off-line C<sub>m</sub> and R<sub>s</sub> values from the recorded current. To generate the Na<sub>v</sub>1.5 activation curve, the membrane was depolarized from a holding potential of –100 mV to values between –80 mV and +50 mV (+5-mV increment) for 50 ms, every 2 s. Activation curves were fitted by a Boltzmann equation:  $G = G_{\max} / (1 + \exp(-(V_m - V_{0.5})/k))$ , in which G is the conductance, V<sub>0.5</sub> is the membrane potential of half-activation and k is the slope factor. For Fig. 7, cells were grouped by 10, except the first group which includes the cells with an absolute peak I<sub>-20 mV</sub> of less than 1000 pA (n = 7) and the last group which includes the cells with a peak I<sub>-20 mV</sub> greater than 10 nA (n = 5).

**Electrophysiology on cardiomyocytes.** Whole-cell Na<sub>v</sub> currents were recorded at room temperature 48 h after cell isolation with pClamp 10, an A/D converter (Digidata 1440A) and an Axopatch 200B amplifier (all Molecular Devices). Current signals were filtered at 10 kHz prior to digitization at 50 kHz and storage. Patch-clamp pipettes were fabricated from borosilicate glass (OD: 1.5 mm, ID: 0.86 mm, Sutter Instrument, Novato, CA) using a P-97 micropipette puller (Sutter Instrument), coated with wax, and fire-polished to a resistance between 0.8 and 1.5 MΩ when filled with internal solution. The internal solution contained (in mM): NaCl 5, CsF 115, CsCl 20, HEPES 10, EGTA 10 (pH 7.35 with CsOH, ~300 mosM). The external solution contained (in mM): NaCl 20, CsCl 103, TEA-Cl (tetraethylammonium chloride) 25, HEPES 10, glucose 5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2 (pH 7.4 with HCl, ~300 mosM). All chemicals were purchased from Sigma. After establishing the whole-cell configuration, stabilization of voltage-dependence of activation and inactivation properties was allowed during 10 min. Before series resistance compensation, series of 25-ms steps were applied from –70 mV to –80 mV and to –60 mV to subsequently off-line calculate C<sub>m</sub> and R<sub>s</sub> values from the recorded currents. After compensation of series resistance (80%), the membrane was held at a HP of –120 mV, and the voltage-clamp protocol was carried out as follows. To determine peak Na<sup>+</sup> current–voltage relationships, currents were elicited by 50-ms depolarizing pulses to potentials ranging from –80 to +40 mV (presented at 5-s intervals in 5-mV increments) from a HP of –120 mV. Peak current amplitudes were defined as the maximal currents evoked at each voltage, and were subsequently leak-corrected. To analyze voltage-dependence of activation properties, conductances (G) were calculated, and conductance–voltage relationships were fitted with a Boltzmann equation. Data were compiled and analyzed using ClampFit 10 (Axon Instruments), Microsoft Excel, and Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

**High-throughput electrophysiology.** Automated patch-clamp recordings were performed using the SyncroPatch 384PE from Nanion (München, Germany). Single-hole, 384-well recording chips with medium resistance ( $4.77 \pm 0.01$  MΩ, n = 384) were used for recordings of HEK293 cells stably expressing human Na<sub>v</sub>1.5 channel (300 000 cells/mL) in whole-cell configuration. Pulse generation and data collection were performed with the PatchControl384 v1.5.2 software (Nanion) and the Biomek v1.0 interface (Beckman Coulter). Whole-cell recordings were conducted according to the recommended procedures of Nanion. Cells were stored in a cell hotel reservoir at 10 °C with shaking speed at 60 RPM. After initiating the experiment, cell catching, sealing, whole-cell formation, buffer exchanges, recording, and data acquisition were all performed sequentially and automatically. The intracellular solution contained (in mM): 10 CsCl, 110 CsF, 10 NaCl, 10 EGTA and 10 HEPES (pH 7.2, osmolarity 280 mOsm), and the extracellular solution contained (in mM): 60 NaCl, 4 KCl, 100 NMDG, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose and 10 HEPES (pH 7.4, osmolarity 298 mOsm). Whole-cell experiments were performed at a holding potential of –100 mV at room temperature (18–22 °C). Currents were sampled at 20 kHz. Activation curves were built by 50 ms-lasting depolarization from –80 mV to 70 mV (+5 mV increment), every 5 s. Activation curves were fitted by Boltzmann equation. Stringent criteria were used to include individual cell recordings for data analysis (seal resistance > 0.5 GΩ and estimated series resistance < 10 MΩ).



Received: 8 May 2020; Accepted: 21 December 2020

Published online: 08 February 2021

## References

- Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. (Sinauer Associates (distributed by W.H. Freeman), 2001).
- Celentano, J. J. & Hawkes, A. G. Use of the covariance matrix in directly fitting kinetic parameters: Application to GABAA receptors. *Biophys. J.* **87**, 276–294 (2004).
- Ebihara, L. & Johnson, E. A. Fast sodium current in cardiac muscle. A quantitative description. *Biophys. J.* **32**, 779–790 (1980).
- Sherman, A. J., Shrier, A. & Cooper, E. Series resistance compensation for whole-cell patch-clamp studies using a membrane state estimator. *Biophys. J.* **77**, 2590–2601 (1999).
- O'Hara, T., Virág, L., Varró, A. & Rudy, Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: Model formulation and experimental validation. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002061 (2011).
- Wang, G. K., Russell, G. & Wang, S.-Y. Persistent human cardiac Na<sup>+</sup> currents in stably transfected mammalian cells: Robust expression and distinct open-channel selectivity among Class 1 antiarrhythmics. *Channels* **7**, 263–274 (2013).
- Oliver, K. L. *et al.* Myoclonus epilepsy and ataxia due to *KCNK1* mutation: Analysis of 20 cases and K<sup>+</sup> channel properties: MEAK. *Ann. Neurol.* **81**, 677–689 (2017).
- Ranjan, R. *et al.* A kinetic map of the homomeric voltage-gated potassium channel (Kv) family. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 358 (2019).
- Lei, C. L. *et al.* Accounting for variability in ion current recordings using a mathematical model of artefacts in voltage-clamp experiments. *Philos. Trans. R. Soc. A.* **378**, 20190348 (2020).
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100 (1981).
- Rush, S. & Larsen, H. A practical algorithm for solving dynamic membrane equations. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-25**, 389–392 (1978).
- Hindmarsh, A. C. LSODE and LSODI, two new initial value ordinary differential equation solvers. *SIGNUM Newsl.* **15**, 10–11 (1980).
- Milescu, L. S., Bean, B. P. & Smith, J. C. Isolation of somatic Na<sup>+</sup> currents by selective inactivation of axonal channels with a voltage prepulse. *J. Neurosci.* **30**, 7740–7748 (2010).
- Vermij, S. H., Abriel, H. & Kucera, J. P. Modeling depolarization delay, sodium currents, and electrical potentials in cardiac transverse tubules. *Front. Physiol.* **10**, 1487 (2019).
- Loussouarn, G., Baró, I. & Escande, D. KCNQ1 K<sup>+</sup> channel mediated cardiac channelopathies. in *Ion Channels* (eds. Stockand, J. D. & Shapiro, M. S.) 167–183 <https://doi.org/10.1385/1-59745-095-2:167> (Humana Press, 2006).
- Luo, C. H. & Rudy, Y. A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ. Res.* **68**, 1501–1526 (1991).

## Acknowledgements

We are indebted to Dr. Massimo Mantegazza for providing the stable cell line expressing human Na<sub>v</sub>1.5. The authors wish to thank Drs Massimo Mantegazza and Flavien Charpentier for their critical reading of the manuscript. M. De Waard thanks the Agence Nationale de la Recherche for its financial support to the laboratory of excellence “Ion Channels, Science and Therapeutics” (Grant no. ANR-11-LABX-0015). This work was supported by a grant from the Fédération Française de Cardiologie and by the Fondation Leducq in the frame of its program of ERPT equipment support (purchase of an automated patch-clamp system), by a grant “New Team” of the Région Pays de la Loire to M. De Waard, and by a European FEDER grant in support of the automated patch-clamp system of Nanion. The salary of S. Nicolas is supported by the Fondation Leducq, while the fellowship of J. Montnach is provided by a National Research Agency Grant to M. De Waard entitled OptChemCom (Grant no. ANR-18-CE19-0024-01). C. Marionneau thanks the Agence Nationale de la Recherche [ANR-15-CE14-0006-01 and ANR-16-CE92-0013-01]. M. Lorenzini was supported by a Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire-Société Française de Cardiologie predoctoral fellowship [SFC/GRRC2018]. We thank Marja Steenman for proofreading of the manuscript.

## Author contributions

J.M. and S.N. carried out automated patch-clamp experiments on Na<sub>v</sub>1.5, under the supervision of M.D.W. M.L. and A.L. carried out the patch-clamp experiments on mouse cardiomyocytes, under the supervision of C.M. I.S. and E.M. carried out the manual patch-clamp experiments on transfected COS-7 cells, under the supervision of I.B. J.M. carried out the model computation in R.G.L. carried out the model computation in C++ and wrote the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82077-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to G.L.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



**Titre :** Régulation des canaux  $\text{Na}_v1.5$  cardiaques par la phosphorylation de la protéine partenaire FHF2

**Mots clés :**  $\text{Na}_v1.5$ , Phosphorylation, FHF2, Cardiomyocytes

**Résumé :** Les canaux sodiques dépendants du potentiel  $\text{Na}_v1.5$  sont responsables de l'initiation et de la propagation rapide des potentiels d'action cardiaques, et tout défaut de fonctionnement ou de régulation de ces canaux est à l'origine de diverses formes d'arythmies cardiaques. Bien que le rôle de la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  du canal  $\text{Na}_v1.5$  soit bien connu dans la régulation de l'expression et du fonctionnement du canal, la régulation des canaux  $\text{Na}_v1.5$  par la phosphorylation de ses protéines partenaires reste largement inexplorée. Une analyse phosphoprotéomique des complexes canaux  $\text{Na}_v1.5$  purifiés à partir de ventricules gauches de souris a été développée au laboratoire afin d'identifier les sites de phosphorylation des protéines partenaires du canal. Parmi elles, la protéine FHF2 (Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 2) a montré une forte phosphorylation au niveau de 9 sites spécifiques. Afin de déterminer les rôles fonctionnels de ces sites de phosphorylation dans la régulation des canaux  $\text{Na}_v1.5$ , nous avons développé deux modèles de cardiomyocytes en culture dans lesquels l'expression endogène de FHF2 est éteinte et restaurée à l'aide d'adénovirus par l'isoforme FHF2-VY sous sa forme sauvage (WT), phosphosilencieuse (mutations des sérines/thréonines d'intérêt en alanines) ou phosphomimétique (mutations en glutamates) dans des cardiomyocytes ventriculaires isolés à partir de souris néonatales ou adultes. Le système d'expression hétérologue HEK-293 a également été utilisé en parallèle. Les analyses de voltage-clamp en configuration cellule entière ont démontré que l'extinction de FHF2 accélère l'inactivation des canaux  $\text{Na}_v$  à partir des états fermé et ouvert dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris

néonatales et adultes. De façon intéressante, l'extinction de FHF2 déplace également la dépendance au potentiel de l'activation des canaux  $\text{Na}_v$  vers des potentiels hyperpolarisés dans les cardiomyocytes ventriculaires néonataux. Bien que la restauration de l'expression de FHF2-VY restaure les propriétés d'inactivation des canaux  $\text{Na}_v$  dans les deux modèles de cardiomyocytes, aucune réversion des propriétés d'activation n'a été obtenue dans les cardiomyocytes néonataux, suggérant l'implication potentielle d'une autre isoforme de FHF2 dans la régulation des propriétés d'activation des canaux  $\text{Na}_v$  néonataux. Cependant, malgré les nombreux phosphomutants testés, chacun d'entre eux a rétabli les propriétés d'inactivation des canaux  $\text{Na}_v$  de manière similaire au construit FHF2-VY sauvage dans les deux modèles de cardiomyocytes, ne permettant pas d'identifier les rôles des sites de phosphorylation du FHF2 nouvellement identifiés dans la régulation des canaux  $\text{Na}_v1.5$ . De manière similaire, aucun rôle des sites de phosphorylation n'a pu être révélé dans la régulation du courant sodique persistant dans les cardiomyocytes ventriculaires adultes. En conclusion, nos résultats démontrent que la protéine FHF2 est fortement phosphorylée dans le ventricule gauche de souris, confirment les rôles régulateurs de FHF2 dans la régulation des propriétés d'inactivation des canaux  $\text{Na}_v1.5$ , révèlent le rôle potentiel des isoformes de FHF2 dans la régulation des propriétés d'activation du canal, et suggèrent que la régulation des canaux par la phosphorylation de FHF2 est probablement très complexe.

**Title :** Regulation of cardiac  $\text{Na}_v1.5$  channels by FHF2 phosphorylation

**Keywords :**  $\text{Na}_v1.5$ , Phosphorylation, FHF2, Cardiomyocytes

**Abstract :** The voltage-gated sodium channels  $\text{Na}_v1.5$  are responsible for the initiation and fast propagation of cardiac action potentials, and dysregulations of this channel underlie diverse forms of inherited or acquired cardiac disease. While phosphorylation of the  $\text{Na}_v1.5$  channel pore-forming subunit is extensive and recognized to mediate several molecular aspects of channel expression and function, the regulation of  $\text{Na}_v1.5$  channels by phosphorylation of its accessory proteins remains largely unexplored. A mass spectrometry-based phosphoproteomic analysis of mouse ventricular  $\text{Na}_v1.5$  channel complexes was undertaken to identify the native phosphorylation sites of  $\text{Na}_v1.5$  channel accessory proteins. Among the various accessory proteins identified in  $\text{Na}_v1.5$  channel complexes, the Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 2 (FHF2) showed extensive phosphorylation at 9 specific sites. In order to determine the functional roles of these newly-identified FHF2 phosphorylation sites, we developed two novel cellular models in which the expression of endogenous FHF2 is knockeddown in isolated neonatal mouse ventricular cardiomyocytes using shRNA-expressing adenoviruses, or adult ventricular cardiomyocytes isolated from cardiac-specific FHF2 knockdown mice. The expression of FHF2 was then rescued in both cellular models using adenoviruses expressing the major ventricular FHF2 isoform, FHF2-VY, in its wild-type (WT), phosphosilent (mutations to alanine) or phosphomimetic (mutations to glutamate) forms at specific sites

Whole cell voltage-clamp analyses demonstrated that FHF2 knockdown accelerates the rate of closed-state and open-state inactivation of  $\text{Na}_v$  channels in both neonatal and adult cardiomyocytes. Interestingly, FHF2 knockdown also shifted the voltage-dependence of  $\text{Na}_v$  channel activation towards hyperpolarized potentials in neonatal cardiomyocytes. Although the rescue of FHF2 with WT FHF2-VY restored the inactivation properties of  $\text{Na}_v$  channels in both neonatal and adult cardiomyocytes, no restoration of the activation properties was obtained in neonatal cardiomyocytes, suggesting the involvement of another FHF2 isoform in regulating the activation properties of  $\text{Na}_v$  channels in neonatal cardiomyocytes. However, similar to WT FHF2-VY, each of the analyzed FHF2-VY phosphomutants restored the inactivation properties of  $\text{Na}_v$  channels in both cellular models, preventing to identify roles for FHF2 phosphorylation sites in regulating  $\text{Na}_v1.5$  channels. Further investigation also demonstrated that FHF2 knockdown increases the late  $\text{Na}^+$  current in adult cardiomyocytes, which was similarly restored with WT and phosphosilent FHF2-VY. Taken together, our results demonstrate that ventricular FHF2 is highly phosphorylated, implicate critical and differential roles for FHF2 in regulating  $\text{Na}_v1.5$  channels in neonatal and adult ventricular cardiomyocytes, and suggest that the regulation of  $\text{Na}_v1.5$  channels by FHF2 phosphorylation is certainly highly complex.