

Samenvatting

Post-translationele modificaties zijn belangrijke determinanten van de functie van het hart. Eén van de meest belangrijke post-translationele modificaties waarvan bekend is dat het een regulerende functie heeft op myofilament functie is fosforylering. Het is bekend dat er veranderingen optreden in het fosforyleringsniveau van de contractiele eiwitten in patiënten met hartfalen. Deze veranderingen kunnen nadelig of voordelig zijn voor de ontwikkeling van contractie dysfunctie in het falende hart. Het is daarom van groot belang om er achter te komen welke veranderingen er optreden in het fosforyleringsniveau van de contractiele eiwitten in het humaan falende hart en wat daarvan de invloed is op de functionele eigenschappen van het hartweefsel.

Hoofdstuk 2

In dit hoofdstuk zijn enkele hartspiercellen, geïsoleerd uit weefsel van falende en gezonde donor harten, geïncubeerd met PKC α en PKC ϵ . Op deze manier hebben we de rol van PKC α en ϵ gemedieerde fosforylering op contractiliteit van humane falende en gezonde hartspiercellen onderzocht. Eiwit-analyse liet zien dat incubatie met beide PKC isoformen het fosforyleringsniveau van cTnI en cMyBP-C in falende hartspiercellen deed verhogen. Daarbij werd na een defosforyleringstap van cTnT in donor weefsel duidelijk dat ook cTnT een PKC α substraat is. Beide PKC isoformen verlaagden de Ca²⁺-gevoeligheid in falende hartspiercellen. De Ca²⁺-gevoeligheid van donor hartspiercellen werd niet aangedaan, waarschijnlijk door een hoge basale fosforyleringsniveau. Beide kinasen lieten geen effect zien op de maximale kracht en alleen PKC α resulteerde in een kleine maar significante afname in de passieve kracht. Om de afname in passieve kracht te onderzoeken werd het fosforyleringsniveau van titine bekeken. De resultaten lieten geen toename in fosforylering van titine zien na incubatie met PKC α in zowel donor als falende hartspiercellen.

Hoofdstuk 3

In hoofdstuk 2, hebben we bepaald of de afgenomen Ca²⁺-gevoeligheid na PKC α incubatie door fosforylering van alleen troponin werd veroorzaakt. Om de directe effecten van cTn fosforylering door PKC α te onderzoeken is een elegante troponine uitwisselings methode gebruikt (beschreven in hoofdstuk 1). Het voordeel van deze techniek is dat alleen de directe effecten van PKC α gefosforyleerd troponine complex op de contractiliteit van humane

hartspiercellen wordt bestudeerd zonder veranderingen in andere contractiele eiwitten. In het recombinante troponine complex zijn the protein kinase A (PKA) plaatsen Serine 23 en 24 op troponine I gemuteerd in aspartaat zuur (cTn(DD)) om kruis-fosforylering met de PKA plaatsen te voorkomen. cTn(DD) complex werd geïncubeerd met PKC α (cTnDD + PKC α) en deels (~70%) uitgewisseld met endogeen troponine complex in eind-stadium falende hartspiercellen. De resultaten lieten zien dat uitwisseling met cTn(DD + PKC α) de Ca²⁺-gevoeligheid doet verhogen in vergelijking met de cTn(DD) groep. De Ca²⁺-gevoeligheid werd interessant genoeg verlaagd door subsequeante incubatie van de hartspiercellen met PKC α . Ook werd een afname van de maximale krachtontwikkeling geobserveerd in de hartspiercellen waarin cTn(DD + PKC α) was uitgewisseld. Eiwit analyse van troponine geïncubeerd met PKC α liet fosforylering op de bekende PKC aminozuren van troponine I, Serine 42 en Threonine 143 zien. Daarnaast zijn twee nieuwe fosforylerings plaatsen geïdentificeerd met behulp van massaspectrometrie: Ser199 op cTnI en Ser179 op cTnT. Deze sites zouden mogelijk kunnen bijdragen aan de complexe effecten van PKC α -gemedieerde fosforylering in humaan hartspier weefsel.

Hoofdstuk 4

In hoofdstuk 4 hebben we bepaald of de PKA-geïnduceerde afname in Ca²⁺-gevoeligheid alleen door troponine fosforylering werd veroorzaakt of dat dit effect ook afhankelijk is van het fosforyleringsniveau van de andere sarcomeer eiwitten. Met behulp van dezelfde uitwisselings methode als gebruikt in hoofdstuk 3 is gezond weefsel met een hoog basaal troponine I fosforyleringsniveau uitgewisseld (tot wel 66%) met ongefosforyleerd complex. PKA geïncubeerd troponine (cTn(PKA)) complex werd uitgewisseld in zieke hartspiercellen waarin troponine voornamelijk in ongefosforyleerde vorm voorkomt. Phos-tag (een methode om fosforylerings vormen van een eiwit te onderscheiden) liet een toename van ongefosforyleerd troponine in gezonde cellen uitgewisseld met troponine complex zien, echter lieten zieke cellen uitgewisseld met cTn(PKA) een toename van bis-gefosforyleerd troponine complex zien. De gezonde controle en het zieke weefsel uitgewisseld met PKA-gefosforyleerd troponine complex resulteerden in een zeer vergelijkbare verdeling van on-, mono- en bis-gefosforyleerd troponine I.

Gezonde hartspiercellen lieten een toename in Ca²⁺-gevoeligheid zien na uitwisseling met ongefosforyleerd troponine complex relatief aan de controle. Uitwisseling van cTn(PKA) in zieke hartspiercellen leidde niet tot een effect op de Ca²⁺-gevoeligheid in vergelijking met de controle cellen. Incubatie van de hartspiercellen met PKA resulteerde vervolgens in een

significante afname van de Ca^{2+} -gevoeligheid in zowel gezond als in ziek weefsel. Deze resultaten impliceren dat de fosforylerings achtergrond van de andere myofilament eiwitten van invloed zijn op de mate van effect van PKA fosforylering van cTnI op de Ca^{2+} -gevoeligheid.

Hoofdstuk 5

Aangezien pseudo-fosforylering vaak gebruikt wordt om de functionele implicaties van cTnI fosforylering te bestuderen, werd bepaald of pseudo-fosforylering van Serines 23 en 24 de fysiologische effecten van PKA nabootst. In dit hoofdstuk is recombinant troponine complex gebruikt waarin Serines 23 en 24 vervangen zijn door aspartaat zuur (D). Endogeen troponine complex in zieke hartspiercellen werd deels (~70%) vervangen door recombinant cTn(PKA) en cTn(DD) complex. Krachtmetingen werden uitgevoerd om de effecten op de contractiele eigenschappen van de hartspiercellen te bepalen. Een significant verlaagde Ca^{2+} -gevoeligheid werd waargenomen in hartspiercellen uitgewisseld met cTn(DD). Daarentegen bleef de Ca^{2+} -gevoeligheid onveranderd in de hartspiercellen uitgewisseld met cTn(PKA). Deze verschillende effecten zouden geïntroduceerd kunnen zijn door enige mate van defosforylering van de cTn(PKA) groep of doordat de invloed van de fosforyleringsachtergrond is afgenomen. Defosforylering (~19%) van het cTn(PKA) complex zou kunnen resulteren in een discrepant resultaat tussen de bis-fosforyleringsniveau's van cTn(PKA) en cTn(DD) aangezien cTn(DD) niet gedefosforyleerd kan worden. Om dit probleem te onderzoeken hebben we uitwisselingsexperimenten uitgevoerd waarin ~45% exogeen cTn(DD) geïncorporeerd werd in de zieke hartspiercellen. Dit zou leiden toch een lager cTnI bis-fosforyleringsniveau (voorspeld niveau van 51.2%) vergeleken met cellen uitgewisseld met ~70% cTn(PKA) (voorspeld niveau van 59.4%). Een kleine maar significante afname in Ca^{2+} -gevoeligheid werd waargenomen met ~45% uitwisseling met het cTn(DD) complex. Dit effect was niet aanwezig in de zieke hartspiercellen uitgewisseld met cTn(PKA) complex. Deze resultaten ondersteunen het idee dat de invloed van de fosforylerings achtergrond alleen aanwezig is in de cTn(PKA) groep en mogelijk niet meer aanwezig is in de cTn(DD) groep.
