

Contractile Function of the Human Myocardium

Impact of Troponin Phosphorylation

Viola Kooij

ISBN: 978-90-8570-716-5

Cover: Schematic representation of the cardiac thin filament

Printed by: Wöhrmann Print Service

Acknowledgements:

Financial support by the Netherlands Heart Foundation and the J.E. Jurriaanse Stichting for the publication of this thesis is gratefully acknowledged. Additional financial support was kindly provided by the Dondersfonds.

VRIJE UNIVERSITEIT

Contractile Function of the Human Myocardium

Impact of Troponin Phosphorylation

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad Doctor aan
de Vrije Universiteit Amsterdam,
op gezag van de rector magnificus
prof.dr. L.M. Bouter,
in het openbaar te verdedigen
ten overstaan van de promotiecommissie
van de faculteit der Geneeskunde
op dinsdag 15 februari 2011 om 13.45 uur
in de aula van de universiteit,
De Boelelaan 1105

door

Viola Kooij

geboren te Rotterdam

promotor: prof.dr. G.J.M. Stienen

copromotor: dr. J. van der Velden

Contents

Chapter 1:	General introduction and outline of the thesis	9
Chapter 2:	PKC α and PKC ϵ phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca ²⁺ -sensitivity in human myocardium	23
Chapter 3:	Protein kinase C α -mediated phosphorylation of cardiac troponin reduces maximal force and increases Ca ²⁺ -sensitivity in human cardiomyocytes.....	43
Chapter 4:	Effect of troponin I Ser23/24 phosphorylation on Ca ²⁺ -sensitivity in human myocardium depends on the phosphorylation background	63
Chapter 5:	Comparison of the contractile effects of PKA mediated phosphorylation and pseudo phosphorylation of cardiac troponin I in human cardiomyocytes.....	87
Chapter 6:	Conclusions & Future perspectives	103
Chapter 7:	Summary & Samenvatting.....	107
Chapter 8:	Bibliography	115
	List of publications	133
	Dankwoord.....	135
	Curriculum vitae.....	139

Chapter 7

Summary & Samenvatting



Summary

Post-translational protein modifications are important determinants of cardiac performance. One of the most important post-translational modifications known to exert a regulatory role in myofilament function is phosphorylation. Alterations are known to occur in the phosphorylation status of contractile proteins in patients with heart failure. They can be detrimental or beneficial for the progression of the contractile dysfunction of heart failure. Therefore, it is of great importance to reveal the alterations in the phosphorylation status of contractile proteins in human heart failure and their influence on the functional properties of cardiac tissue.

In this thesis, the effects of PKA- and PKC-mediated phosphorylation of contractile proteins on force development were studied in healthy and failing human cardiac tissue.

Chapter 1

In Chapter 1, a general overview is given concerning: heart failure; cardiac contraction; structures of the sarcomeres; and phosphorylation of the myofilament proteins in the healthy and failing heart. Furthermore, an introduction to the methods used in these studies is given and the aim of this thesis is defined.

Chapter 2

In this chapter, single cardiomyocytes isolated from end-stage failing hearts and healthy donor tissue were incubated with PKC α and PKC ϵ . Hereby, we investigated the role of PKC α and PKC ϵ mediated phosphorylation on contractility in human failing and healthy cardiomyocytes. Protein analysis showed that incubation with both PKC isoforms increased the phosphorylation of cTnI and cMyBP-C in failing cardiomyocytes. Furthermore, after dephosphorylation of cTnT by AP in donor tissue, it became apparent that cTnT is also a substrate for PKC α . Both PKC isoforms caused a decrease in Ca²⁺-sensitivity in failing cardiomyocytes. The Ca²⁺-sensitivity of donor cardiomyocytes was not affected, presumably caused by an overall high basal phosphorylation level. Both PKC α and PKC ϵ showed no effects on maximal force and only PKC α resulted in a modest but significant reduction in passive force. To investigate the reduction in passive force, the phosphorylation level of the filament protein titin was analysed. However, the results showed no significant increase in phosphorylation of titin upon incubation with PKC α in either donor or failing cardiomyocytes.

Chapter 3

Triggered by the findings of Chapter 2, we determined whether the decreased Ca^{2+} -sensitivity after $\text{PKC}\alpha$ incubation was due to phosphorylation of only troponin. To explore the direct effects of cTn phosphorylation by $\text{PKC}\alpha$, an elegant cTn exchange method was used. The advantage of this technique is that it allows to study the direct effects of $\text{PKC}\alpha$ phosphorylated cTn complex on contractility in human cardiac myocytes without altering other contractile proteins. In this cTn complex, the protein kinase A (PKA) sites Ser23/24 on cTnI are mutated into aspartic acids (cTnDD) to rule out *in vitro* cross-phosphorylation of these sites by $\text{PKC}\alpha$. cTn(DD) complex was pre-treated with $\text{PKC}\alpha$ (cTn(DD + $\text{PKC}\alpha$)) and partially exchanged (~70%) with endogenous cTn complex in end-stage failing cardiomyocytes. Results showed that exchange with cTn(DD + $\text{PKC}\alpha$) increased the Ca^{2+} sensitivity compared to the cTn(DD) group. Interestingly, the Ca^{2+} -sensitivity was decreased by subsequent incubation of the exchanged cardiomyocytes with $\text{PKC}\alpha$. Furthermore, a depression of the maximal force generating capacity of the cardiomyocytes was observed in the cells exchanged with cTn(DD + $\text{PKC}\alpha$). Western blot analysis of cTn incubated with $\text{PKC}\alpha$ revealed phosphorylation at known PKC sites on cTnI, Ser42 and Thr143. Furthermore, two novel phosphorylation sites were identified using mass spectrometry: Ser199 on cTnI and Ser179 on cTnT. These sites may contribute to the complex effects of $\text{PKC}\alpha$ -mediated phosphorylation observed in human myocardium.

Chapter 4

In Chapter 4, we determined whether a PKA-induced decrease in Ca^{2+} -sensitivity was solely due to cTnI phosphorylation or depends on the phosphorylation status of other sarcomeric proteins. Using the same exchange method as used in Chapter 3, endogenous cTn in donor tissue (with a high baseline cTnI phosphorylation level) was exchanged (up to 66%) with unphosphorylated cTn complex (cTn). PKA incubated cTn (cTn(PKA)) complex was exchanged into failing cardiomyocytes in which cTnI was largely dephosphorylated. Phos-tag (a method to distinguish phosphorylation species of a protein) gel analysis showed an increase of un-phosphorylated cTn in donor cells exchanged with cTn complex, while failing cells exchanged with cTn(PKA) demonstrated an increase in bis-phosphorylated cTn complex. A very similar distribution of un-, mono- and bis-phosphorylated cTnI in donor control and in failing tissue exchanged with PKA-phosphorylated cTn complex was observed.

Donor cardiomyocytes showed an increase in Ca^{2+} -sensitivity upon exchange with unphosphorylated cTn complex relative to the donor control value. Exchange of cTn(PKA) in failing cardiomyocytes showed no effect on the Ca^{2+} -sensitivity relative to the failing control. Subsequent incubation of the cardiomyocytes with PKA resulted in a significant decrease in Ca^{2+} -sensitivity in both donor and failing tissue. These results indicate that the phosphorylation background of other myofilament proteins influences the impact of PKA phosphorylation of cTn on Ca^{2+} -sensitivity. We demonstrate that the other myofibrillar targets of PKA, notably cMyBP-C and/or titin, might play an important role in modulating the effect of cTnI phosphorylation on Ca^{2+} -sensitivity in human myocardium.

Chapter 5

Since pseudo-phosphorylation is often used to study the functional implications of cTnI phosphorylation, we determined whether pseudo-phosphorylation of Ser23/24 mimics the physiological effects. In this chapter recombinant cTn complex is used in which Ser 23 and 24 on cTn are replaced by aspartic acids (D). Endogenous cTn complex in failing cardiomyocytes is partially (~70%) replaced by recombinant cTn(PKA) and cTn(DD) complex. Force measurements were conducted to compare the effects on the contractile properties of the cardiomyocytes. A significantly reduced Ca^{2+} -sensitivity was observed in the cardiomyocytes exchanged with cTn(DD), however Ca^{2+} -sensitivity remained unaltered after exchange with cTn(PKA). This dissimilar effect could be due to some dephosphorylation of the contractile proteins of the cardiomyocytes in the cTn(PKA) group, or due to the influence of the phosphorylation background that is abolished in the cTn(DD) group. Dephosphorylation (~19%) of the cTn(PKA) complex could result in a discrepancy between the bis-phosphorylation levels of cTn(PKA) and cTn(DD), since cTn(DD) is not able to dephosphorylate. To tackle this problem, we conducted exchange experiments where ~45% exogenous cTn(DD) complex is incorporated in the failing cardiomyocytes. This would lead to a lower level of cTnI bis-phosphorylation (predicted value 51.2%) compared to cells exchanged with ~70% cTn(PKA) (predicted value 59.4%). A small but significant reduction in Ca^{2+} -sensitivity of force was observed with ~45% exchange of cTn(DD) complex, which was not present in failing cardiomyocytes exchanged with cTn(PKA) complex. These results support the idea that the influence of the phosphorylation background is only present in the cTn(PKA) group and might be abolished in the cTn(DD) group.

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.
