

## 8.2. Nederlandse samenvatting en conclusie

### ‘Sarcomeerfunctie en eiwitveranderingen in humane cardiomyopathie: mutatie of fenotype’

#### **SAMENVATTING**

De studies beschreven in dit proefschrift hadden tot doel om meer inzicht te verwerven in de pathofysiologie van hypertrofe (HCM) en gedilateerde (DCM) cardiomyopathie, waarbij de focus vooral gericht was op familiale cardiomyopathieën. Cardiomyopathieën kunnen worden veroorzaakt door mutaties in verschillende genen die coderen voor eiwitten van het sarcomeer, ondanks dat deze eiwitten ieder een specifieke functie hebben. Tevens kunnen mutaties in hetzelfde gen leiden tot HCM of DCM, twee heel verschillende aandoeningen.

We hebben krachtmetingen gedaan om de functionele eigenschappen te bepalen van individuele cardiomyocyten van HCM patiënten met een mutatie in het *MYBPC3* gen (het gen dat codeert voor cardiaal myosine bindend eiwit C (cMyBP-C)), van familiale HCM patiënten waarbij (nog) geen mutatie in sarcomeer eiwitten is gevonden en van familiere DCM patiënten. Tevens hebben we de eiwitsamenstelling in het hartweefsel van deze patiënten bepaald. Door de sarcomeer eigenschappen van deze groepen patiënten te vergelijken met die van donoren zonder hartfalen en patiënten met idiopatische cardiomyopathie, konden we een aantal specifieke veranderingen in sarcomeer functie en eiwitsamenstelling distilleren die mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling van humane familiale cardiomyopathieën. De belangrijkste resultaten van de studies beschreven in dit proefschrift zijn verbeeld in Figuur 8.1. Door het combineren van informatie over de eiwitsamenstelling van het hartweefsel met de functionele eigenschappen van de cardiomyocyten hebben we meer inzicht verkregen in de pathofysiologische mechanismen via welke een gendefect kan

leiden tot cardiomyocyt disfunctie, remodelering van het hart en uiteindelijk cardiomyopathie.

## **Hoofdstuk 1 - Cardiomyopathie en het sarcomeer: algemene introductie**

Dit hoofdstuk is een introductie in de oorzaken en fenotypes van cardiomyopathieën, met name HCM en DCM. Ook worden de componenten van de kleinste functionele contractiele eenheid van het hart, het sarcomeer, en hun rol in de contractie van het hart beschreven.

HCM en DCM kunnen beide worden veroorzaakt door een mutatie in genen die coderen voor sarcomeer eiwitten, maar het fenotype van beide aandoeningen is verschillend. Eén van de eiwitten die het meest frequent is aangedaan in HCM patiënten, is cardiaal myosine bindend eiwit C (cMyBP-C). De rol die dit eiwit speelt in de structuur en functie van cardiomyocyten is nog slecht begrepen, vooral in het humane hart. De functie van sarcomeer eiwitten wordt grotendeels beïnvloed door post-translationele veranderingen zoals fosforylering. Een belangrijk regulatorisch systeem dat hiervan gebruik maakt is het  $\beta$ -adrenerge receptor systeem. Het  $\beta$ -adrenerge receptor systeem zorgt voor een toename in cardiale pompfunctie waarneer het lichaam meer bloedtoevoer nodig heeft, onder andere door fosforylatie van cMyBP-C, troponine I (cTnI) en titine via het enzym proteïne kinase A (PKA).

## **Hoofdstuk 2 – Aanpassingen van het myocard in het falende hart: oorzaak of gevolg?**

In het falende hart treden veel veranderingen op in morfologie en cellulaire eigenschappen van het hart. Deze zijn bedoeld om voldoende pompfunctie van het hart te behouden, maar zijn op de langere termijn schadelijk voor het hart en dragen bij aan de neerwaartse spiraal die leidt tot hartfalen.

Eén van de eigenschappen die is veranderd in het falende hart is het niveau van eiwit fosforylatie, wat deels wordt veroorzaakt door afname van de  $\beta$ -adrenerge receptor activiteit. De data beschreven in dit op uitnodiging geschreven review laten zien dat de fosforylatie van cTnI, een eiwit onder invloed van het  $\beta$ -adrenerge receptor systeem, lager is in harten van patiënten met idiopathische gedilateerde cardiomyopathie (IDCM) en in myectomy weefsel (Morrow procedure) van patiënten met symptomatische HCM. Ook het fosforylatie niveau van cMyBP-C was verlaagd in harten van IDCM en, in iets mindere mate, in HCM patiënten. Deze laatste observatie geeft een verschil in

eiwitsamenstelling tussen verschillende cardiomyopathieën weer en toont het belang aan om subtiele verschillen tussen cardiomyopathieën te onderzoeken om op die manier meer inzicht te krijgen in welke processen de oorzaak en welke het gevolg zijn van humane cardiomyopathie.

### **Hoofdstuk 3 – Een stukje van het humane hart: Variatie in eiwit fosforylatie in linker ventrikel weefsel van eindstadium primaire cardiomyopathie patiënten**

Er is maar een beperkte hoeveelheid humaan cardiaal materiaal beschikbaar voor onderzoek, vaak niet meer dan een klein biopt. Echter, er kunnen regionale verschillen in de eiwitsamenstelling van het hart zijn of ontstaan tijdens voortgang van cardiomyopathieën. Om te bepalen of hartbiopten representatief zijn voor de gehele regio van waaruit ze genomen zijn, hebben we bepaald of de locale variatie in eiwit fosforylatie anders is in myocardium van eindstadium familiale HCM en DCM weefsel in vergelijking met hartweefsel van Donoren zonder cardiomyopathie. Het fosforyleringsniveau van twee belangrijke eiwitten onder controle van het  $\beta$ -adrenerge receptor systeem, cTnI en cMyBP-C, werd geanalyseerd in kleine stukjes cardiaal weefsel ter grootte van biopten van verschillende regio's van de vrije wand van het linker ventrikel.

De variabiliteit van het fosforyleringsniveau van cTnI en cMyBP-C was vergelijkbaar in hartweefsel van HCM en DCM patiënten en Donoren. Dit duidt aan dat, binnen de beperkingen van de gebruikte technieken, kleine stukjes hartweefsel een representatieve afspiegeling zijn van de regio waaruit ze verkregen zijn.

### **Hoofdstuk 4 – Incubatie met proteïne kinase A onthult verschillen in $\text{Ca}^{2+}$ -gevoeligheid tussen humane familiale hypertrofe en gedilateerde cardiomyopathie**

Familiaire HCM wordt gekarakteriseerd door vaak asymetrische verdikking van het linker ventrikel en septum (concentrische remodelering), terwijl DCM wordt gekenmerkt door dilatatie van de ventrikels (eccentrische remodelering). De pathologische mechanismen die verantwoordelijk zijn, of discrimineren, tussen deze cardiomyopathieën zijn grotendeels nog onbekend. In deze studie hebben we de eiwitsamenstelling en de sarcomeerfunctie van cardiomyocyten uit harten verkregen tijdens transplantatie van eindstadium familiale HCM (FHCM) en DCM (FDCM) vergeleken om verschillen te ontdekken die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor deze verschillende vormen van remodelering en

hartfalen. Zowel in FHCM en FDCM harten was het fosforyleringsniveau van cTnI en cMyBP-C lager relatief tot het niveau in harten van Donoren zonder cardiomyopathie (Figuur 8.1). Dit kwam overeen met een (gemiddelde) verlaging van  $Ca^{2+}$ -gevoeligheid in beide patiëntgroepen ten opzichte van Donoren. Krachtmetingen aan individuele cardiomyocyten werden herhaald na incubatie met PKA, om te bepalen of de cardiomyocyten van FHCM en FDCM patiënten nog kunnen reageren op  $\beta$ -adrenerge receptor stimulatie. Na PKA incubatie was de  $Ca^{2+}$ -gevoeligheid vergelijkbaar tussen FHCM en Donor cardiomyocyten, maar significant lager in FDCM cardiomyocyten. Een unieke karakteristiek van FHCM cardiomyocyten was een afname in maximale krachtontwikkeling en dit werd niet hersteld door incubatie met PKA.

Deze resultaten wekken de suggestie dat er specifieke veranderingen zijn in cardiomyocytfunctie die kunnen bijdragen aan cardiale dysfunctie in FHCM (afname in maximale krachtontwikkeling) en FDCM (verlaagde  $Ca^{2+}$ -gevoeligheid die werd blootgelegd door PKA incubatie) en dus mede verantwoordelijk kunnen zijn voor de verschillende typen remodelering in primaire humane cardiomyopathieën. Daarnaast lijkt het dat verschillen in sarcomeer eigenschappen verhuld kunnen worden door de activatie status van de  $\beta$ -adrenerge receptoren, wat het belang benadrukt van post-translationele veranderingen zoals fosforylatie.

### **Hoofdstuk 5 – Cardiaal myosine bindend eiwit C en hypertrofe cardiomyopathie: haploinsufficiëntie, verstoorde forsorylatie en cardiomyocyt dysfunctie**

Mutaties in het *MYBPC3* gen zijn een veel voorkomende oorzaak van HCM, vooral in Nederland waar ongeveer 35% van de HCM patiënten een ‘founder’ mutatie heeft in *MYBPC3* (*MYBPC3<sub>mut</sub>*). We hebben myectomy en biopsie materiaal van *MYBPC3<sub>mut</sub>* met een truncatie mutatie (c.2373dupG of c.2864\_2865delCT) vergeleken met cardiaal weefsel van Donoren zonder cardiomyopathie. Analyse van het messenger RNA toonde aan dat nog ongeveer 20% van het aanwezige RNA afkomstig was van het gemuteerde allel, wat dus nog wel wordt afgeschreven in de patiënten, zijnde het in verminderde mate. Antilichamen die specifiek tegen cMyBP-C gericht zijn, toonde echter geen getrunceerd eiwit aan. De expressie van normaal eiwit was 33% lager in *MYBPC3<sub>mut</sub>* dan in Donor. Het forforylatieniveau van cMyBP-C was vergelijkbaar tussen *MYBPC3<sub>mut</sub>* en Donor, terwijl het forforylatieniveau van

cTnI aanzienlijk lager was (Figuur 8.1). Antilichamen specifiek gericht tegen de sites die door PKA gefosforyleerd worden (Ser282 in cMyBP-C en Ser 23/24 in cTnI) bevestigde het fosforylatiepatroon verschilt tussen de twee eiwitten die beide onder regulatie van de  $\beta$ -adrenerge receptoren staan.

Maximale krachtontwikkeling was significant lager in MYBPC3<sub>mut</sub>, terwijl de Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid van het myofilament hoger was in vergelijking met Donor. Incubatie met PKA verlaagde de Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid en het verschil tussen MYBPC3<sub>mut</sub> en Donor was opgeheven. Maximale krachtontwikkeling was niet verbeterd na incubatie met PKA.

We concluderen dat truncerende mutaties in het *MYBPC3* gen leiden tot haploinsufficiënte, wat afgeleid kan worden uit het verlaagde expressie niveau van cMyBP-C en de afwezigheid van getrunceerd eiwit in MYBPC3<sub>mut</sub>. Cardiomyocyt disfunctie werd duidelijk uit de afname van maximale krachtontwikkeling en een toegenomen Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid van de myofilamenten. Dit laatste kan mogelijk worden verklaard door het lage fosforylatieniveau van cTnI, wat werd hersteld na incubatie met PKA.

## **Hoofdstuk 6 – Veranderde lengte-afhankelijke activatie is onafhankelijk van het gemuteerde eiwit in humane hypertrofe cardiomyopathie**

HCM kan worden veroorzaakt door mutaties in verschillende genen die eiwitten van het sarcomeer coderen. Om te bepalen wat de specifieke rol van mutaties in het *MYBPC3* gen is op disfunctie van cardiomyocyten, in vergelijking met algemene veranderingen die optreden bij HCM, hebben we de eigenschappen van myectomy materiaal van MYBPC3<sub>mut</sub> patiënten vergeleken met dat van HCM patiënten waarbij geen mutatie gevonden is na het screenen van 9 genen (HCM<sub>mn</sub>) en met Donoren. De afname in cMyBP-C expressie zoals we die in MYBPC3<sub>mut</sub> hebben aangetoond (Hoofdstuk 5) werd niet bevestigd in HCM<sub>mn</sub>. Het fosforylatieniveau van cMyBP-C was lager in HCM<sub>mn</sub>, in tegenstelling tot het vergelijkbare fosforylatieniveau in MYBPC3<sub>mut</sub> en Donor. Fosforylatie van cTnI was lager dan in Donor in beide HCM patiëntengroepen (Figuur 8.1), wat de resultaten uit hoofdstukken 2, 4 en 5 bevestigt. De mate van sarcomeer disfunctie was gelijk in MYBPC3<sub>mut</sub> en HCM<sub>mn</sub>; in beide groepen was de maximale krachtontwikkeling afgenomen en de Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid van het myofilament toegenomen.

We hebben ook de kracht gemeten in respons op twee mechanismen die

geactiveerd worden bij een toegenomen vraag op het hart, namelijk het Frank-Starling mechanisme (lengte-afhankelijke activatie) en  $\beta$ -adrenerge receptor stimulatie. Een toename in sarcomeerlengte van 1,8 naar 2,2  $\mu\text{m}$  resulteerde in een kleinere toename in  $\text{Ca}^{2+}$ -gevoeligheid in beide HCM groepen dan in Donor. Opvallend was dat incubatie met PKA het Frank-Starling mechanisme herstelde in de HCM patiënten.

Onze resultaten tonen aan dat veranderingen in eiwitsamenstelling, tenminste deels, samen te lijken hangen met een mutatie in *MYBPC3*. Cardiomyocyt disfunctie, zoals die blijkt uit afgenomen maximale krachtontwikkeling, toegenomen  $\text{Ca}^{2+}$ -gevoeligheid en een verstoord Frank-Starling mechanisme, lijkt daarentegen een algemeen verschijnsel van HCM te zijn.

### **Hoofdstuk 7 – Behouden cross-bridge kinetiek in humane hypertrofe cardiomyopathie patiënten met een *MYBPC3* mutatie**

Hoewel de rol van cMyBP-C op sarcomeer contractie nog niet geheel wordt begrepen, lijkt het dat cMyBP-C een rem is op de cross-bridge cyclus. In hoofdstuk 5 valt te lezen dat mutaties in *MYBPC3* leiden tot haploinsufficiënte en een verminderde maximale krachtontwikkeling in de cardiomyocyten. In hoofdstuk 7 beschrijven we ons onderzoek naar de invloed van cMyBP-C haploinsufficiëntie op cross-bridge kinetiek in *MYBPC3*<sub>mut</sub> patiënten. We hebben bepaald met welke snelheid cardiomyocyten kracht herontwikkelen ( $k_{tr}$ ) na het snel verkorten en terug op lengte brengen (slack test) en hun respons op een 5% toename in lengte. Zowel in *MYBPC3*<sub>mut</sub> als in Donor neemt  $k_{tr}$  toe met toenemende  $\text{Ca}^{2+}$ -concentraties. De snelheid van relaxatie ( $k_{rel}$ ) na een 5% oprekking verschilde niet tussen *MYBPC3*<sub>mut</sub> en Donor. Ook de volgende fase in respons op oprekking, vertraagde kracht herontwikkeling, had een vergelijkbare snelheid ( $k_{df}$ ) en amplitude in beide groepen. Incubatie met PKA vertraagde  $k_{tr}$  enigszins, terwijl  $k_{rel}$  juist iets sneller werd.  $k_{df}$  was alleen sneller na PKA incubatie bij maximale activatie. Wat belangrijk is om op te merken is dat de invloed van PKA incubatie gelijk was op *MYBPC3*<sub>mut</sub> en Donor, wat in lijn ligt met het gelijke fosforylatieniveau van cMyBP-C in deze groepen.

Onze resultaten tonen geen verschillen in cross-bridge kinetiek tussen *MYBPC3*<sub>mut</sub> en Donor die de lage maximale krachtontwikkeling in eerst genoemde groep kunnen verklaren. De afgenomen hoeveelheid cMyBP-C in *MYBPC3*<sub>mut</sub> patiënten lijkt nog voldoende om juiste cross-bridge kinetiek te

behouden. Ook lijkt de mogelijkheid om cross-bridge kinetiek te beïnvloeden via  $\beta$ -adrenerge receptor stimulatie behouden in MYBPC3<sub>mut</sub> patiënten.

## CONCLUSIE

Uit de studies beschreven in dit proefschrift blijkt dat karakteristieken van cardiomyocyten van FHCM patiënten deels verschillen van die bestudeerd in FDCM patiënten en beschreven in andere cardiomyopathieën zoals ischemische en idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie.<sup>70;92;94</sup> Het afgenomen fosforylatieniveau van cMyBP-C en cTnI was vergelijkbaar tussen FDCM en IDCM (Hoofdstuk 2: Figuur 2.1), net als de verhoogde Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid in deze cardiomyopathieën.<sup>70;92</sup>

We hebben unieke veranderingen in cMyBP-C expressie en fosforylatie aangetoond in FHCM patiënten met een mutatie in het MYBPC3 gen, welke niet aanwezig waren in FHCM patiënten waarvan de sarcomeer mutatie niet is aangetoond. Verlaagde cTnI fosforylatie werd gevonden in alle FHCM en FDCM patiënten (Figuur 8.1) en is waarschijnlijk een secundaire aanpassing die ontstaat gedurende de ontwikkeling van cardiomyopathieën. Een specifieke eigenschap van de bestudeerde FHCM patiënten was verminderde maximale krachtontwikkeling, welke in de MYBPC3<sub>mut</sub> patiënten niet kon worden verklaard door een verandering in cross-bridge kinetiek. Een toename in myofilament Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid werd gemeten in zowel FHCM als in FDCM patiënten en lijkt een algemene eigenschap van cardiomyopathieën te zijn, die overeenkomt met de verlaagde cTnI fosforylatie. Ook toonden we met onze studies het belang van eiwitfosforylatie op cardiomyocytfunctie in cardiomyopathieën aan.

Onze studies lijken erop te wijzen dat mutaties die tot FHCM leiden specifieke (eiwit)veranderingen in het sarcomeer teweeg brengen, maar dat deze uiteindelijk leiden tot algemene cardiomyocyt disfunctie. Cardiomyocyt disfunctie kan deels bijdragen aan verslechterde werking van het hart en dus een substantieel onderdeel van de pathofysiologie van cardiomyopathieën vormen. Een afname in krachtontwikkeling van cardiomyocyten draagt waarschijnlijk bij aan verminderde contractie van het hart tijdens systole. Hoewel een toename in myofilament Ca<sup>2+</sup>-gevoeligheid in theorie een verbetering zou opleveren tijdens systole (namelijk door meer krachtontwikkeling bij een bepaalde [Ca<sup>2+</sup>]), laten onze resultaten zien dat dit mechanisme onvoldoende

is om de afname in  $F_{\max}$  te compenseren in FHCM patiënten (Hoofdstuk 4: Figuur 4.7). Een toename in  $\text{Ca}^{2+}$ -gevoeligheid kan daarnaast leiden tot een verminderde hartfunctie tijdens diastole, omdat het de relaxatie van het hart die nodig is voor de vulling belemmert. De relaxatie van het hart wordt daarnaast beïnvloed door de passieve stijfheid van cardiomyocyten, omdat een verhoogde passieve kracht het uitrekken van cardiomyocyten tijdens de vulling van het hart bemoeilijkt. Echter, wij hebben geen toename in  $F_{\text{pas}}$  gemeten in FHCM en FDCM cardiomyocyten.

Daarnaast is ook de timing van contractie van cruciaal belang voor een juiste hartfunctie. Veranderingen in cross-bridge kinetiek, die we hebben bestudeerd aan de hand van  $k_{\text{tr}}$  en de kinetiek van de respons op oprekking (Hoofdstuk 7), kunnen zowel de systolische als de diastolische functie van het hart verstoren. Te snelle cross-bridge kinetiek kan ervoor zorgen dat de kracht niet lang genoeg behouden blijft voor voldoende ejectie tijdens systole. Te trage cross-bridge kinetiek zou de relaxatie tijdens diastole kunnen hinderen. Onze studie toonde geen significante verschillen in cross-bridge kinetiek aan tussen MYBPC3<sub>mut</sub> en Donor (Hoofdstuk 7), wat er op wijst dat een verandering in cross-bridge kinetiek niet de onderliggende oorzaak van cardiale disfunctie is in deze HCM patiënten.

Tenslotte hangt de respons van het hart op een toegenomen vraag af van  $\beta$ -adrenerge receptor stimulatie en het Frank-Starling mechanisme. Stimulatie van de  $\beta$ -adrenerge receptoren heeft zowel inotrope als lusitrope effecten om alle fasen van contractie te verbeteren bij een verhoogde werking van het hart. Het Frank-Starling mechanisme zorgt ervoor dat de pompfunctie van het hart wordt aangepast aan de (toegenomen) vulling als het hart meer moet werken. De harten van FHCM en FDCM patiënten bleken nog goed te kunnen reageren op  $\beta$ -adrenerge receptor stimulatie, aangezien incubatie met PKA de  $\text{Ca}^{2+}$ -gevoeligheid deed afnemen in FHCM patiënten tot hetzelfde niveau al dat we maten in Donoren. Het effect van PKA op was  $\text{Ca}^{2+}$ -gevoeligheid was zelfs nog uitgesprokener in FDCM patiënten (Hoofdstukken 4-7). De Frank-Starling respons hebben we gemeten in FHCM en in Donoren (Hoofdstuk 6). Deze bleek verstoord in FHCM patiënten, maar kon worden hersteld door de cardiomyocyten te incuberen met PKA. Deze resultaten tonen aan dat de mechanismen die in werking treden bij een toegenome vraag op het hart nog functioneel zijn in FHCM en FDCM cardiomyocyten.