

behandelen.

summarize, -ise [sʌmərəʒz] **0.1** same

summar|y¹ [sʌmərəie] <zn., mv.: -ies> **0.**

8.1 Summary, Conclusion and Future perspectives

summary² <bn.> **0.1** *summier* ⇒ *beknopt*

8.2 Nederlandse samenvatting en conclusie

**8.3 Vereenvoudigde
samenvatting**

summation [səmeesjən] **I** <telb.zn.> **0.1** *op*

totaal **0.3** *samenvatting* ⇒ *resumé*;

II <n.-telb.zn.> **0.1** *het optellen*.

summer [sʌmmə] **0.1** *zomer* ⇒ *zomerwe*

mer ⇒ *(levens)jaar* **0.3** *zomer* <fig.> ⇒

(the) ~ in de zomer - *Indien*

8.1 Summary, Conclusion and Future Perspectives

‘Sarcomeric function and protein changes in human cardiomyopathy: mutation or phenotype’

SUMMARY

The work described in this thesis was conducted to gain more insight in the complex pathophysiology of hypertrophic (HCM) and dilated (DCM) cardiomyopathy, with special emphasis on familial cardiomyopathies. Many mutations in genes encoding different sarcomeric proteins cause cardiomyopathies, although the roles of these proteins in sarcomere contractility are diverse. Furthermore, mutations in the same sarcomeric protein can give rise to either HCM or DCM.

We performed functional force measurements in single cardiomyocytes from HCM patients with mutations in *MYBPC3*, the gene encoding cardiac myosin binding protein C (cMyBP-C), from familial HCM patients without an identified mutation in the sarcomeric proteins (mutation negative) and from familial DCM patients. In addition, protein composition of the cardiac tissue was determined in these patients. By comparing sarcomeric properties of these patient groups to those of hearts from non-failing donors and from patients with end-stage failing idiopathic dilated cardiomyopathy we observed alterations in cardiomyocyte function and protein composition that could contribute to the human familial cardiomyopathy phenotypes. The main findings described in this thesis are summarized below and in figure 8.1. By combining information on protein composition with functional force measurements, we provided insight in the pathophysiological mechanisms by which an initial gene

mutation or defect may lead to cardiomyocyte dysfunction, cardiac remodelling and cardiomyopathy.

Chapter 1 – Cardiomyopathy and the sarcomere: general introduction

This chapter gives an introduction on possible causes and phenotypes of cardiomyopathies, focussed on HCM and DCM. It describes the components of the smallest functional contractile unit of the heart, the sarcomere and their role in cardiac contraction.

HCM and DCM can both be caused by mutations in genes encoding proteins of the sarcomere and cause cardiac failure, yet they have very distinct phenotypes. One of the most commonly affected sarcomeric proteins in HCM is cMyBP-C, a protein with structural and functional roles that are still poorly understood, in particular in the human heart. Many sarcomeric proteins are regulated via post-translational modifications, such as phosphorylation. An important regulatory system that increases cardiac output upon increased demand is the β -adrenergic receptor system. Upon activation of β -adrenergic receptors, the downstream effector protein kinase A (PKA) phosphorylates cMyBP-C, as well as sarcomeric proteins troponin I (cTnI) and titin.

Chapter 2 – Myocardial adaptations in the failing heart: Cause or consequence?

Many changes in morphology and cellular properties are reported in the failing heart. They may initially be compensatory, in order to maintain proper cardiac output, but are in the long run harmful to the myocardium and contribute to a negative spiral by worsening cardiac function.

Among the alterations observed in the failing heart is altered protein phosphorylation, in part caused by decreased β -adrenergic receptor signalling. The data provided in this invited review paper demonstrated lower phosphorylation of the β -adrenergic target protein cTnI in hearts from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM) and in myectomy samples (Morrow procedure) from patients with manifest HCM. The phosphorylation level of cMyBP-C was also decreased in cardiac samples from IDCM patients and to a lesser extent in HCM patients, indicating that especially cMyBP-C phosphorylation seems to depend on the specific cardiomyopathy. These results emphasize the need to unravel subtle sarcomere changes in different cardiomyopathies to clarify which pathophysiological processes are the primary

cause of human cardiomyopathy and which are a secondary consequence of altered cardiac performance.

Chapter 3 – A piece of the human heart: Variance of protein phosphorylation in left ventricular samples from end-stage primary cardiomyopathy patients

The availability of human cardiac tissue for research is limited. Often only small cardiac biopsies are available. However, regional differences in protein composition may exist in the healthy heart or may develop during disease progression. Moreover, protein modifications due to cardiomyopathies may not be uniform throughout the heart. To determine if cardiac biopsies are representative for the region they were taken from, we assessed if local differences in sarcomeric protein phosphorylation are more evident in manifest familial HCM and DCM than in non-failing Donor myocardium. Thereto, phosphorylation of the two main target proteins of the β -adrenergic receptor pathway, cTnI and cMyBP-C, was analysed by ProQ phospho stain in small, biopsy-sized pieces from different parts of the free left ventricular wall of end-stage failing HCM and DCM patients and Donor hearts obtained during transplant surgery.

Intra-subject variability in protein phosphorylation was comparable in Donor, HCM and DCM samples, indicating that, within the precision of the measurements, small left ventricular tissue samples are representative for the region they were taken from.

Chapter 4 – Protein kinase A treatment unmask differences in myofilament Ca^{2+} -sensitivity between human familial hypertrophic and dilated cardiomyopathy

Familial HCM is characterized by often asymmetric thickening of the left ventricle and septum (concentric remodelling), while DCM is characterized by ventricular dilatation (eccentric remodelling). The pathomechanisms underlying or distinguishing these two cardiomyopathies are largely unknown. We compared sarcomeric protein composition and function in cardiomyocytes from end-stage failing familial HCM (FHCM) and DCM (FDCM) hearts obtained during transplant surgery in order to detect differences that might underlie diverse cardiac function and remodelling. Phosphorylation of the β -adrenergic target proteins cMyBP-C and cTnI was low in both FHCM and FDCM relative to non-failing Donor hearts (Figure 8.1). This was in accordance with an, on

average, increased myofilament Ca²⁺-sensitivity in both patient groups compared to Donor. Force measurements were repeated after incubation with PKA, to establish if cardiomyocytes from FHCM and FDCM were still responsive to β-adrenergic receptor stimulation. After PKA incubation, Ca²⁺-sensitivity of force was comparable between FHCM and Donor, but significantly lower in FDCM. A unique feature of cardiomyocytes from FHCM patients was decreased maximal force development; a characteristic which was not restored by PKA incubation.

The results suggest that some alterations in cardiomyocyte function that may contribute to impaired cardiac function are specific for FHCM (depressed maximal force development) or FDCM (decreased Ca²⁺-sensitivity unmasked by PKA) and thus may underlie or at least contribute to the diverse pathophysiologic remodelling patterns in primary human cardiomyopathies. Differences in sarcomeric properties appeared to be masked at baseline by the activation status of β-adrenergic receptors in the end-stage failing hearts, highlighting the influence of post-translational modifications such as phosphorylation.

Chapter 5 – Cardiac myosin binding protein C mutations and hypertrophic cardiomyopathy: haploinsufficiency, deranged phosphorylation and cardiomyocyte dysfunction

Mutations in *MYBPC3* are a frequent cause of HCM, especially in the Netherlands where approximately 35% of the HCM patients have a founder mutation in *MYBPC3* (*MYBPC3*_{mut}). We compared cardiac myectomy and biopsy samples from *MYBPC3*_{mut} with truncating *MYBPC3* mutations (c.2373dupG or 2864_2865delCT) to non-failing Donor tissue. Messenger RNA (mRNA) analysis revealed the presence of about 20% mutant mRNA in the patient samples, indicating that the mutant allele is transcribed, though at a low level compared to the normal (non-mutant) allele. Specific antibodies directed against cMyBP-C revealed no truncated protein in *MYBPC3*_{mut} cardiac samples. The expression of full length cMyBP-C was reduced by 33% in *MYBPC3*_{mut} compared to Donor. The phosphorylation of cMyBP-C was comparable between *MYBPC3*_{mut} and Donor, whereas cTnI phosphorylation was significantly reduced (Figure 8.1). Antibodies against the PKA phosphorylation sites of cMyBP-C (Ser282) and cTnI (Ser23/24) confirmed this pattern of phosphorylation, indicating divergent phosphorylation of two main target proteins under β-adrenergic control.

Maximal force production was significantly depressed in *MYBPC3*_{mut}, while

myofilament Ca^{2+} -sensitivity was increased compared to Donor. Incubation with PKA lowered the Ca^{2+} -sensitivity and abolished the difference between $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$ and Donor. Maximal force production was not restored after PKA incubation.

In conclusion, truncating *MYBPC3* mutations caused haploinsufficiency, as can be concluded from the low expression level of cMyBPC and the absence of mutant cMyBPC in $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$. Cardiomyocyte dysfunction in $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$ was evident from depressed maximal force development and increased Ca^{2+} -sensitivity of myofilaments. The latter may be explained by low cTnI phosphorylation, which was restored after incubation with PKA.

Chapter 6 – Altered length-dependent activation independent of the mutant protein in human hypertrophic cardiomyopathy

HCM can be caused by mutations in different genes encoding sarcomeric proteins. In order to determine the specific contribution of *MYBPC3* mutations on cardiomyocyte dysfunction opposite to general adaptations in HCM, we compared properties of cardiac myectomy samples from $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$ to those of mutation negative HCM patients in which no mutation was detected upon screening of 9 genes (HCM_{mn}) and to non-failing Donor hearts. The reduced expression of cMyBP-C relative to Donor samples observed in $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$ (Chapter 5) was not found in HCM_{mn} . In addition, phosphorylation of cMyBP-C was decreased in HCM_{mn} but comparable to Donor in $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$. Phosphorylation of cTnI was decreased in both HCM patient groups (Figure 8.1) compared to Donor confirming the results in chapters 2, 4 and 5.

Sarcomeric dysfunction was comparable in $\text{MYBPC3}_{\text{mut}}$ and HCM_{mn} ; both groups had decreased maximal force development and increased myofilament Ca^{2+} -sensitivity compared to Donor cardiomyocytes. Furthermore, we measured the force response to the two mechanisms that are activated upon increased cardiac demand, i.e. the Frank-Starling mechanism (length-dependent activation) and β -adrenergic receptor signalling. Increasing sarcomere length from 1.8 μm to 2.2 μm increased Ca^{2+} -sensitivity of force less in both patient groups than in Donor, indicative of a blunted Frank-Starling mechanism. Incubation with PKA, to mimic β -adrenergic receptor stimulation, abolished the initial difference in myofilament Ca^{2+} -sensitivity between patients and Donor. Interestingly, the Frank-Starling response was also restored after PKA

incubation both in MYBPC3_{mut} and HCM_{mn}.

Our results demonstrate that alterations in protein composition appear to be, at least partly, related to mutations in *MYBPC3*. In contrast, cardiomyocyte dysfunction, as evident from decreased maximal force development, increased myofilament Ca²⁺-sensitivity and blunting of the Frank-Starling response, represents a general feature of HCM.

Chapter 7 – Preserved cross-bridge kinetics in human hypertrophic cardiomyopathy patients with a *MYBPC3* mutation

The role of cMyBP-C in regulating sarcomeric contraction is not fully understood yet, though it appears that cMyBP-C acts as a brake on cross-bridge cycling. As reported in chapter 5, mutations in *MYBPC3* lead to haploinsufficiency and decreased maximal force development in human. In chapter 7, we investigated if cMyBP-C haploinsufficiency altered cross-bridge kinetics in MYBPC3_{mut}. We measured the rate of force redevelopment (k_{tr}) after a quick shortening and re-stretch maneuver (slack test) and assessed the response to a 5% increase in length. Both in MYBPC3_{mut} and Donor cardiomyocytes, k_{tr} increased with increasing Ca²⁺-concentrations and was comparable in both groups. The rate of force relaxation (k_{rel}) in response to stretch did not differ between MYBPC3_{mut} and Donor. Also the next phase in the stretch activation response, delayed development of force, had a comparable rate constant (k_{df}) and amplitude in MYBPC3_{mut} and Donor. Incubation with PKA lowered k_{tr} slightly but not significantly, while k_{rel} was faster after PKA treatment. k_{df} was faster after PKA incubation only at maximal activation. The response to PKA incubation was similar in MYBPC3_{mut} and Donor, in line with comparable cMyBP-C phosphorylation between both groups.

Thus, we found no alterations in cross-bridge kinetics in MYBPC3_{mut} compared to Donor cardiomyocytes that could explain the low maximal force development in these patients. The reduced amount of cMyBP-C in the MYBPC3_{mut} patients appears to be sufficient to maintain proper cross-bridge kinetics. The ability to influence cross-bridge kinetics through β -adrenergic receptor activation appeared to be preserved in MYBPC3_{mut} patients.

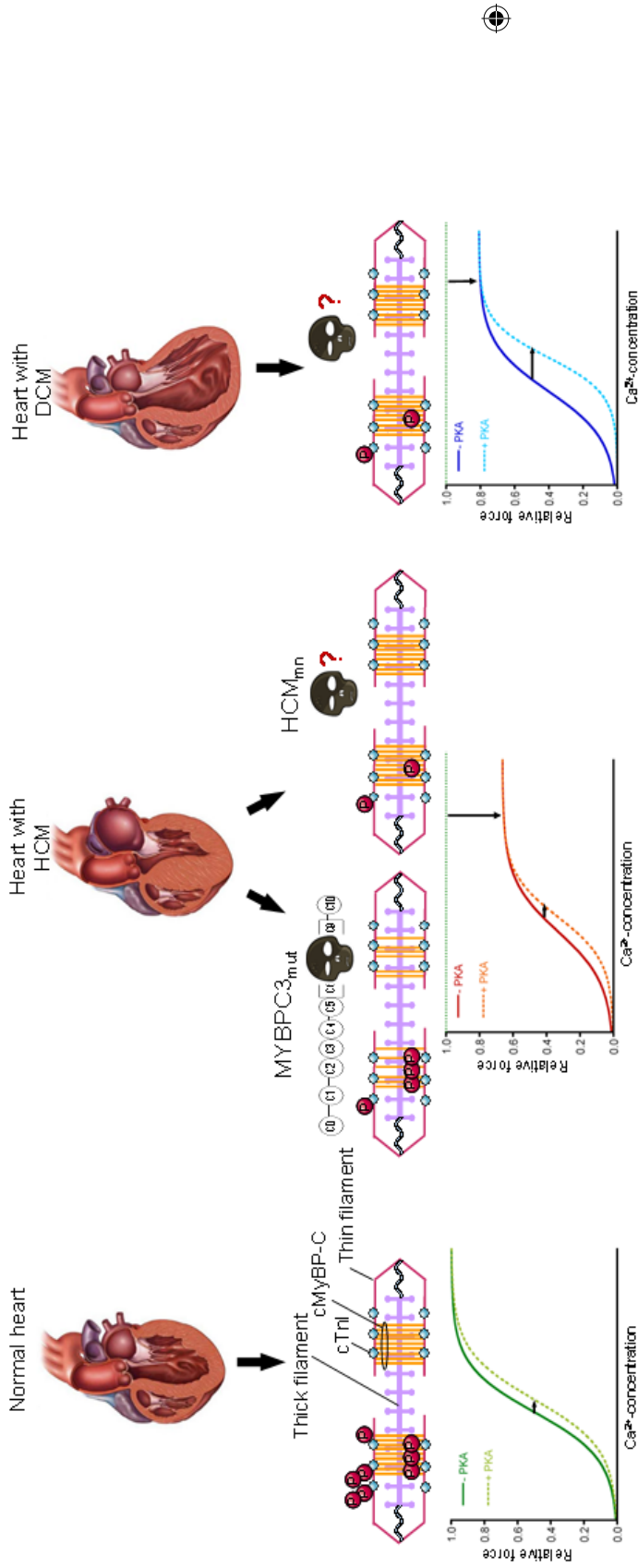


Figure 8.1. Overview of the main findings described in this thesis. In familial hypertrophic cardiomyopathy (FHCM) patients with a mutation in *MYBPC3* (*MYBPC3_{mut}*), the amount of cardiac myosin binding protein C (*cMyBP-C*) was decreased relative to normal hearts (middle part of the figure, less orange stripes). The phosphorylation level (represented by red dots) of *cMyBP-C* was comparable to Donor level. In FHCM patients with an unidentified mutation (mutation negative, *HCM_{mn}*), the expression level of *cMyBP-C* was comparable to Donor, but the phosphorylation was decreased. The phosphorylation of cardiac troponin I (*cTnI*; blue dots) was decreased in both FHCM groups. In end-stage familial dilated cardiomyopathy (FDCM) patients, the phosphorylation of both *cMyBP-C* and *cTnI* was decreased relative to the level in Donor cardiac tissue, which is in agreement with observations in end-stage failing idiopathic dilated cardiomyopathy hearts shown in chapter 2 of this thesis. Cardiac dysfunction (lower part of the figure) in FHCM patients was evident from a significant decrease in maximal force development (black arrow) and increased sensitivity to Ca^{2+} (leftward shift of the curve). Incubation with protein kinase A (PKA) lowered Ca^{2+} -sensitivity to a level comparable to Donor. FDCM patients had an increased baseline Ca^{2+} -sensitivity as well. Incubation with PKA lowered Ca^{2+} -sensitivity remarkably, making the FDCM cardiomyocytes less sensitive to Ca^{2+} than donor cardiomyocytes.

CONCLUSION

As became evident from the studies described in this thesis, cardiomyocytes from FHCM patients have characteristics which are partly distinct from those measured in FDCM and described in other cardiomyopathies, such as ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy.^{70;92;94} The decreased phosphorylation level of cMyBP-C and cTnI in FDCM was comparable to IDCM (Chapter 2: Figure 2.1), as was the increased sensitivity to Ca^{2+} in these cardiomyocytes.^{70;92}

We have shown unique protein changes in cMyBP-C expression and phosphorylation in FHCM patients with a *MYBPC3* mutation which were not present in FHCM patients with no identified sarcomere mutation. Another protein alteration, decreased phosphorylation of cTnI, was common in all FHCM and FDCM patients (Figure 8.1) and likely represents a secondary adaptation in the development of cardiomyopathy. A specific feature of the FHCM patients studied was the decreased average maximal force development of cardiomyocytes, which in the case of *MYBPC3* mutations could not be explained by altered cross-bridge kinetics. Increased myofilament Ca^{2+} -sensitivity was seen in both FHCM and FDCM patient samples and appears to reflect a general property of cardiomyopathies that corresponds to the common reduction in cTnI phosphorylation. Furthermore, we demonstrated the importance of protein phosphorylation on cardiomyocyte dysfunction in cardiomyopathy patients.

Our studies suggest that FHCM causing mutations lead to specific (protein) alterations in the sarcomere, but that this eventually leads to common cardiomyocyte dysfunction. Cardiomyocyte dysfunction may partly contribute to impaired cardiac performance and be a substantial part of the pathophysiology of cardiomyopathies. Decreased force development of cardiomyocytes likely contributes to depressed contractility during systole. Although an increased Ca^{2+} -sensitivity of force in theory would be beneficial for cardiac contractility during systole (i.e. more force will develop at a given $[\text{Ca}^{2+}]$), our results indicate that this mechanism is insufficient to compensate for the decrease in F_{max} in FHCM patients (Chapter 4: Figure 4.7). During diastole an increased Ca^{2+} -sensitivity may even be hampering cardiac performance, as it limits cardiac relaxation needed for proper filling of the heart. Relaxation of the heart is further influenced by passive stiffness of the cardiomyocytes. Even though we

measured no increased F_{pas} in FHCM or FDCM cardiomyocytes, an increased passive stiffness could contribute to diastolic dysfunction by the inability of cells to adequately stretch during cardiac filling.

Furthermore, the timing of sarcomeric contraction is of pivotal importance to cardiac function. Altered cross-bridge kinetics, which we studied by measuring k_{tr} and the kinetics of stretch activation (Chapter 7), can affect systolic as well as diastolic function of the heart. When cross-bridge cycling is too fast, force may not be maintained long enough for systole. Too slow cross-bridge cycling would impair relaxation during diastole. We measured no significant differences in cross-bridge kinetics between MYBPC3_{mut} and Donor (Chapter 7), thus altered cross-bridge cycling appears not to underlie cardiac dysfunction in these HCM patients.

Finally, the cardiac response to increased demand depends on β -adrenergic receptor stimulation and the Frank-Starling mechanism. Stimulation of the β -adrenergic receptors exerts both positive inotropic and lusitropic effects to improve all phases of cardiac contraction during increased cardiac performance. The Frank-Starling mechanism matches cardiac output to increased cardiac filling during increased cardiac demand. The response to β -adrenergic receptor stimulation appeared to be preserved in FHCM and FDCM, as incubation with PKA lowered Ca^{2+} -sensitivity in FHCM to the same extent as in Donor, while the PKA effect in FDCM was even more pronounced (Chapters 4-7). We determined the Frank-Starling response in FHCM and Donor (Chapter 6). The length-dependent increase of Ca^{2+} -sensitivity was blunted in FHCM cardiomyocytes compared to Donor at baseline, but restored after PKA incubation. These results suggest that the mechanisms activated upon increased cardiac demand are still functional in FHCM and FDCM cardiomyocytes.

FUTURE PERSPECTIVES

Our studies are performed on cardiac tissue from overt cardiomyopathy patients. Therefore, the changes in cardiomyocyte function and sarcomeric protein composition represent the result of many adaptations within the cardiomyocyte over years of disease progression. We lack information on primary pathophysiologic alterations in human cardiomyocytes and disease development over time. Nonetheless, signs of cardiac dysfunction were observed

in individuals carrying a HCM mutation before clinical features of HCM were apparent,¹⁸⁻²⁰ suggesting intrinsic cardiomyocyte dysfunction independent of disease progression. Unfortunately, no specific treatments are available to prevent or reverse cardiac remodelling in cardiomyopathies. As such, it is pivotal to unravel primary pathophysiological defects so that eventually we can intervene in the disease progress before the heart remodels. FHCM has a high prevalence and, in comparison to FDCM, many disease causing mutations are identified. Together with the ability to obtain cardiac samples, especially from patients with left outflow tract obstruction that undergo a myectomy, FHCM patients are very appealing to further study primary pathophysiological defects in.

Functional characteristics of cardiomyocytes from FHCM patients were comparable irrespective of the disease causing mutation (Chapters 4-6), suggesting that shared hypertrophic processes are ongoing. Is the regulation of sarcomeric function by the diverse sarcomeric proteins so entwined that the mutant defect is of inferior importance to the development of FHCM? If so, it would be less relevant to unravel how hypertrophic pathways are activated by mutated proteins in FHCM as it would be sufficient to know which pathways are activated. However, decreased expression of cMyBP-C was exclusively observed in FHCM patients with *MYBPC3* mutations (Chapters 5 and 6). Also *in vitro* studies,¹⁰¹ animal models and human studies¹⁸⁰ showed distinct, sometimes even opposing, effects from different mutations.^{27;103} In conclusion, the disease causing mutations seem relevant for early cardiac dysfunction and the precise (detrimental) function of each sarcomere protein mutation might define how hypertrophic pathways are activated.

Mouse models for HCM provide unique opportunities to follow the time course of disease progression. To date, mouse models are available with many different HCM causing mutations, making it possible to discriminate consequences of defects in specific sarcomeric proteins. Despite the value of transgenic mouse models to study the effects of HCM causing mutations, not only on protein level but also at organ level, results should always be critically evaluated. The physiology of mice is different from human and adaptation processes in response to the transgenic modification might not resemble the human pathophysiological processes.⁷⁷ Promising new approaches to study the physiological consequences of HCM causing mutations in human tissue

are induced pluripotent stem (iPS) cells and engineered heart tissue (EHT). iPS cells are established by reprogramming adult somatic cells and can be differentiated in beating cardiomyocytes.^{181;182} As iPS cells could easily be derived from HCM patients, they closely represent the biological environment, including the HCM causing mutation, of each patient. Combining the iPS cell techniques with cardiac tissue engineering would increase their potential as a disease model even further. EHT makes it possible to conduct force measurements and study cardiomyocytes in a 3D structure. EHT reconstituted from neonatal rat cardiomyocytes and type I collagen displayed contractile characteristics of native myocardium, making it a very promising model to study cardiac function.¹⁸³

We demonstrated haploinsufficiency in HCM patients with a *MYBPC3* mutation evident from only 66% cMyBP-C expression in these patients compared to non-failing myocardium (Chapter 5). This reduced expression might cause cardiomyocyte dysfunction. Homozygous cMyBP-C knock out mice in which cMyBP-C was absent develop hypertrophy already at young age (3 weeks-4 months).^{32;33} In contrast, heterozygous cMyBP-C mice that express 75–90% cMyBP-C develop hypertrophy much later in life (at 30 weeks to 11 months of age).^{33;184} Surprisingly, 40% re-expression of cMyBP-C in cMyBP-C null mice was sufficient to restore systolic dysfunction.^{53;122} It should be noted that these measurements were performed in relative young mice (12-24 weeks) and thus might represent a pre-symptomatic stage of HCM. The stoichiometric proportion of cMyBP-C to myosin and its restricted location in the C-zone limits the number of myosin heads that are directly interfered by cMyBP-C.¹⁸⁵ Apparently cMyBP-C does not require 1:1 interaction to myosin heads to exert its regulatory role, but there is a lower threshold. Learning more on how cMyBP-C regulates cross-bridge cycling and what the minimal amount of cMyBP-C is to do so, might provide insight in the disease pathogenesis of HCM caused by *MYBPC3* mutations.

Cardiomyopathy related mutations are scattered throughout the *MYBPC3* gene. It is plausible that mutations within a certain gene can exert different detrimental effects due to their different locations within the protein. Part of the variation observed between cardiomyopathy patients might be explained by the location of mutations within genes. For several regions of cMyBP-C its interaction with other sarcomeric proteins is known, but the functional

relevance of different regions of cMyBP-C is subject of ongoing investigation. For example, *in vitro* experiments have already shown that the cMyBP-C N-terminus is able to activate cross-bridge cycling even in the absence of Ca^{2+} ,^{186;187} and accelerates the rate of tension redevelopment in skinned cardiomyocytes.^{163;164} However, the role of the N-terminus of cMyBP-C under physiological circumstances and in HCM remains to be investigated.

Next to further research into precise sarcomeric protein function in health and disease, it is important to clarify genetic and environmental factors that alter the disease course of cardiomyopathies. As FHCM and FDCM have no complete disease penetrance and individuals even within one family might present with different symptoms, modifying factors must have an effect on disease progression. Identification of these factors could give more insight in the development of human cardiomyopathy and present additional targets for treatment.

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 β -adrenerge receptor systeem. Het β -adrenerge receptor systeem zorgt voor een toename in cardiale pompfunctie wanneer 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 β -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 β -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 β -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 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 β -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 β -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_{mut}*). We hebben myectomy en biopsie materiaal van *MYBPC3_{mut}* 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_{mut}* dan in Donor. Het forforylatieniveau van cMyBP-C was vergelijkbaar tussen *MYBPC3_{mut}* 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 β -adrenerge receptoren staan.

Maximale krachtontwikkeling was significant lager in MYBPC3_{mut}, terwijl de Ca²⁺-gevoeligheid van het myofilament hoger was in vergelijking met Donor. Incubatie met PKA verlaagde de Ca²⁺-gevoeligheid en het verschil tussen MYBPC3_{mut} 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_{mut}. Cardiomyocyt disfunctie werd duidelijk uit de afname van maximale krachtontwikkeling en een toegenomen Ca²⁺-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_{mut} patiënten vergeleken met dat van HCM patiënten waarbij geen mutatie gevonden is na het screenen van 9 genen (HCM_{mn}) en met Donoren. De afname in cMyBP-C expressie zoals we die in MYBPC3_{mut} hebben aangetoond (Hoofdstuk 5) werd niet bevestigd in HCM_{mn}. Het fosforylatieniveau van cMyBP-C was lager in HCM_{mn}, in tegenstelling tot het vergelijkbare fosforylatieniveau in MYBPC3_{mut} 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_{mut} en HCM_{mn}; in beide groepen was de maximale krachtontwikkeling afgenomen en de Ca²⁺-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 β -adrenerge receptor stimulatie. Een toename in sarcomeerlengte van 1,8 naar 2,2 μm resulteerde in een kleinere toename in 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 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*_{mut} 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*_{mut} als in Donor neemt k_{tr} toe met toenemende Ca^{2+} -concentraties. De snelheid van relaxatie (k_{rel}) na een 5% oprekking verschilde niet tussen *MYBPC3*_{mut} 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*_{mut} 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*_{mut} en Donor die de lage maximale krachtontwikkeling in eerst genoemde groep kunnen verklaren. De afgenomen hoeveelheid cMyBP-C in *MYBPC3*_{mut} patiënten lijkt nog voldoende om juiste cross-bridge kinetiek te

behouden. Ook lijkt de mogelijkheid om cross-bridge kinetiek te beïnvloeden via β -adrenerge receptor stimulatie behouden in MYBPC3_{mut} 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 idiopatisch gedilateerde cardiomyopathie.^{70;92;94} Het afgenomen fosforylatieniveau van cMyBP-C en cTnI was vergelijkbaar tussen FDCM en IDCM (Hoofdstuk 2: Figuur 2.1), net als de verhoogde Ca²⁺-gevoeligheid in deze cardiomyopathieën.^{70;92}

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_{mut} patiënten niet kon worden verklaard door een verandering in cross-bridge kinetiek. Een toename in myofilament Ca²⁺-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 Ca²⁺-gevoeligheid in theorie een verbetering zou opleveren tijdens systole (namelijk door meer krachtontwikkeling bij een bepaalde [Ca²⁺]), 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 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_{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_{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_{mut} 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 β -adrenerge receptor stimulatie en het Frank-Starling mechanisme. Stimulatie van de β -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 β -adrenerge receptor stimulatie, aangezien incubatie met PKA de Ca^{2+} -gevoeligheid deed afnemen in FHCM patiënten tot hetzelfde niveau al dat we maten in Donoren. Het effect van PKA op was 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.

8.3 Vereenvoudigde samenvatting

Het hart is een spier die continu samentrekt en weer ontspant om het bloed door het lichaam heen te pompen. Wanneer het hart onvoldoende werkt om genoeg bloed naar de organen te krijgen, spreekt men van hartfalen. Hartfalen is er in verschillende mate van ernst, uiteenlopend van bijna geen klachten tot klachten zelfs bij rust. Hartfalen kan verschillende oorzaken hebben, zoals een hartinfarct, verhoogde bloeddruk of een ziekte van het hart. In dit laatste geval is de hartspier zelf ziek en is er sprake van een cardiomyopathie (cardio= hart, myo= spier en pathie= ziekte). Het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift richt zich op deze laatste aandoening, met name op de vraag hoe afwijkingen in het hart leiden tot cardiomyopathie.

HYPERTROFE EN GEDILATEERDE CARDIOMYOPATHIE

Er zijn verschillende soorten cardiomyopathieën, die verschillende oorzaken hebben (die niet altijd bekend zijn) en zich op verschillende manieren uiten (zie figuur 1.1). Ons onderzoek heeft zich gericht op hypertrofe (HCM) en gedilateerde (DCM) cardiomyopathie. HCM is een ziekte die redelijk vaak voorkomt (bij 1 op de 500 mensen) en waarbij het hart heel dik wordt, met name het tussenschot en de linker kamer van het hart (zie figuur 1.2). DCM komt iets minder vaak voor en bij deze cardiomyopathie wordt het hart heel groot en dun: het lubbert uit. Beide cardiomyopathieën kunnen erfelijk zijn (familiaal), waarbij er vaak een fout zit in het DNA dat zorgt voor de eiwitten in de hartspiercel.

DE HARTSPIERCEL EN HET SARCOMEER

Het pompen van het hart wordt mogelijk gemaakt door de samentrekking van de hartspiercellen. In de hartspiercellen zitten verschillende bouwstenen, de eiwitten, die samenwerken om het samentrekken voor elkaar te krijgen. De kleinste unit van eiwitten die op deze manier samenwerken heet het sarcomeer (zie figuur 1.3). Functioneel bestaat het sarcomeer uit twee delen: het dikke en het dunne filament. Het dikke filament bestaat vooral uit het eiwit myosine

en het dunne filament uit actine. Daarnaast zijn er nog vele eiwitten die er voor zorgen dat het samentrekken van de hartspiercel goed verloopt, zoals troponine C (cTnC), troponine I (cTnI), troponine T (cTnT), tropomyosine en myosine bindend eiwit C (cMyBP-C). De samentrekking van de hartspiercel wordt aan en uit gezet door het stofje calcium (Ca²⁺), dat je inderdaad ook nodig hebt voor sterke botten. Als er Ca²⁺ in de hartspiercel komt, bindt dit aan cTnC. Daardoor trekt cTnC aan cTnI en cTnT, die vervolgens weer aan tropomyosine trekken. Als al deze eiwitten weggetrokken zijn voor actine, is er ruimte voor myosine om aan actine vast te gaan zitten en het een stukje langs zich heen te trekken. Dit proces zorgt voor de samentrekking van de hartspiercel. Zoals de naam misschien al deed vermoeden, zit cMyBP-C vast aan myosine en kan dit eiwit ervoor zorgen dat het samentrekken van myosine en actine moeilijker of juist makkelijker verloopt. Fouten in al deze eiwitten kunnen leiden tot een cardiomyopathie.

Fouten komen in het ene eiwit vaker voor dan in het andere eiwit. Eén van de eiwitten die het vaakst kapot is in HCM is cMyBP-C. Dit eiwit is nog niet zolang geleden ontdekt en het is nog niet helemaal duidelijk hoe het precies werkt. cMyBP-C kan met verschillende andere eiwitten in het sarcomeer samenwerken (zie figuur 1.4) en het is bekend dat cMyBP-C zorgt dat het sarcomeer stevig opgebouwd wordt, maar ook dat het op de een of andere manier de snelheid van samentrekken van de hartspiercel controleert. Ook in Nederland komen fouten in cMyBP-C vaak voor en dit zijn vaak ook dezelfde fouten. Dit gaf ons de mogelijkheid om veel hartspierweefsel te verkrijgen van verschillende HCM patiënten met dezelfde fout in hun eiwit en daarom heb ik mijn onderzoek grotendeels gericht op defect cMyBP-C.

FOSFORYLATIE

Een eiwit wordt altijd hetzelfde gemaakt door het lichaam en werkt daardoor in principe ook steeds hetzelfde. Maar onder verschillende omstandigheden kan het nodig zijn dat een eiwit beter werkt, of juist wat minder. Net als dat een verwarming warm moet zijn als je thuis bent, maar niet hoeft te branden als je weg bent. Het lichaam kan zich aan vele omstandigheden aanpassen en heeft dus wat trucjes om de eiwitten te controleren. Eén daarvan is fosforylatie, wat betekent dat er een stofje (fosfaat) aan het eiwit vastgemaakt wordt. Sommige

eiwitten gaan hierdoor slechter werken, alsof de fosforylatie een last is die ze mee moeten torsen. Andere eiwitten gebruiken de fosforylatie juist en gaan beter werken, alsof er wieltjes onder de last gezet worden.

Als het hart harder moet werken, zoals bij sporten of bij stress, wordt er een systeem aangezet, het β -adrenerge systeem. Hierdoor kan het eiwit proteïne kinase A (PKA) een aantal eiwitten in het sarcomeer fosforyleren, vooral de eiwitten cTnI en cMyBP-C (zie figuur 1.5), en zo hun functie aanpassen aan de omstandigheden. Bij mensen met cardiomyopathie werkt dit systeem vaak niet goed meer. Medicijnen zoals β -blokkers worden dan ook vaak gebruikt om dit systeem zoveel mogelijk te herstellen.

HET DOEL VAN HET ONDERZOEK

Hoewel ieder sarcomeereiwit zijn eigen functie heeft, kunnen ze allemaal tot dezelfde ziekte leiden wanneer ze stuk zijn. Andersom is het ook zo dat een kapot eiwit de ene keer HCM veroorzaakt en in een ander geval DCM. Het is nog niet duidelijk hoe een kapot eiwit de functie van de hartspiercel verstoort en uiteindelijk tot cardiomyopathie leidt. Om meer inzicht te krijgen in dit proces, hebben we gekeken welke eiwitten veranderd zijn in hartspiercellen van cardiomyopathie patiënten en of de kracht van de hartspiercellen veranderd is. Door gegevens over eiwitsamenstelling en functie te combineren, hebben we geprobeerd om veranderde processen te vinden die het slechte functioneren van het hart te verklaren.

Omdat het hart zich altijd probeert aan te passen zodat het zijn werk zo lang mogelijk goed kan doen, zijn sommige veranderingen een gevolg van de ziekte en geen oorzaak. Door verschillende groepen patiënten met elkaar te vergelijken, hebben we gezocht naar veranderingen die ze allemaal hadden en welke waarschijnlijk een gevolg van het slechte functioneren van het hart zijn en naar veranderingen die uniek zijn en dus mogelijk een oorzaak kunnen zijn. We hebben een vergelijking gemaakt tussen patiënten met HCM en met DCM om te onderzoeken of de verschillende vervormingen van het hart bij deze ziekten verklaard kan worden door verschillen in functie van de hartspiercellen. Binnen de HCM patiënten hebben we een vergelijking gemaakt tussen degenen met een mutatie in cMyBP-C (de MYBPC3_{mut} groep) en degenen waarbij geen mutatie gevonden is (mutatie negatief; de HCM_{mn} groep). Alle gegevens zijn

vergeleken met die van Donoren, dit zijn harten zonder ziekte die niet voor transplantatie gebruikt konden worden.

DE BELANGRIJKSTE RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK

Figuur 8.1 geeft een overzicht van de belangrijkste resultaten die we hebben gevonden. Onze resultaten laten zien dat de eiwitsamenstelling niet verschilt tussen HCM en DCM patiënten, maar dat ze wel afwijken van de Donoren. De fosforylatie van cTnI en cMyBP-C is erg laag in de patiënten, wat waarschijnlijk komt door slecht functioneren van het β -adrenerge systeem (in figuur 8.1 zie je minder fosfaat [rode bolletjes] aan de eiwitten in het midden van het figuur). Als gevolg hiervan, reageerden de cardiomyocyten sterker op calcium. Ze waren gevoeliger voor Ca^{2+} , wat betekent dat er meer kracht (meer samentrekking) geleverd werd bij eenzelfde Ca^{2+} -concentratie (in figuur 8.1 is dit aangegeven doordat de grafiekjes naar links zijn verschoven: ze gaan eerder omhoog). Dit is slecht voor het hart omdat het hart nu ook bij lage Ca^{2+} -concentratie al wat samentrekt, waardoor het hart niet kan ontspannen op het moment dat er bloed in zou moeten stromen. Toen we probeerden deze verandering in Ca^{2+} -gevoeligheid te herstellen door het β -adrenerge systeem na te doen door de cellen PKA te geven, kwam een verschil aan het licht tussen HCM en DCM. In HCM cellen kon PKA de gevoeligheid voor Ca^{2+} herstellen, maar de hartspiercellen van DCM patiënten werden juist extra *ongevoelig* voor Ca^{2+} (in figuur 8.1 zie je een groot verschil in de grafiek met en zonder PKA bij de DCM patiënten). Hierdoor zouden ze te weinig kracht kunnen leveren wanneer het hart samen moet trekken, omdat ze niet reageren op het Ca^{2+} dat de samentrekking aan moet zetten. Deze resultaten laten ook zien dat de fosforylatie van eiwitten belangrijk is voor hun functie: pas toen we die normaal gemaakt hadden met PKA zagen we dat hartspiercellen van DCM patiënten anders werkten.

Een unieke eigenschap van de hartspiercellen van HCM patiënten is dat ze niet zo sterk zijn. Wanneer we extreem veel Ca^{2+} aan de cellen gaven en ze dus maximaal zouden moeten werken, trokken de hartspiercellen van HCM patiënten niet zoveel samen als die van DCM patiënten of Donoren (dit is aangegeven in figuur 8.1 doordat de grafiek van HCM patiënten lager is, zie de

pijl naar beneden). Dit konden we niet herstellen door PKA te geven, dus dit defect komt niet door slecht functioneren van het β -adrenerge systeem. Omdat cMyBP-C de snelheid van samentrekken van de hartspiercel kan beïnvloeden, hebben we in de MYBPC3_{mut} patiënten gekeken hoe snel de samentrekking van de hartspiercellen verliep. Als dit te snel gaat, kan het namelijk zo zijn dat de kracht niet goed volgehouden wordt en te snel weer verloren gaat. Te langzame krachtontwikkeling kan er toe leiden dat de maximale kracht niet eens bereikt wordt, de hartspiercellen zijn dan te traag. We vonden echter geen verschillen in snelheid tussen de hartspiercellen van MYBPC3_{mut} en Donoren en we hebben nog geen verklaring gevonden voor de afname in kracht in de hartspiercellen van HCM patiënten.

Door HCM patiënten met en zonder een fout in cMyBP-C te vergelijken, wilden we meer leren over de rol van dit eiwit in deze ziekte. Een unieke bevinding is dat het kapotte cMyBP-C niet aanwezig is in de harten van MYBPC3_{mut} patiënten. Hierdoor hebben ze minder cMyBP-C dan HCM_{mn} patiënten en Donoren (in figuur 8.1 zijn minder oranje streepjes getekend bij de MYBPC3_{mut} patiënten). Opvallend is dat de fosforylatie van cMyBP-C hetzelfde is in deze patiënten als in Donoren en niet lager zoals we bij de andere HCM patiënten vonden. Zoals hierboven al gezegd is, komt de lage fosforylatie van cMyBP-C waarschijnlijk door het slechte functioneren van het β -adrenerge systeem. Het kan zijn dat dit systeem nog net genoeg werkt om het kleine beetje cMyBP-C dat aanwezig is in de MYBPC3_{mut} patiënten nog wel te kunnen fosforyleren. De krachtontwikkeling van de hartspiercellen van MYBPC3_{mut} en HCM_{mn} was hetzelfde en lijkt dus onafhankelijk van het kapotte cMyBP-C.

Al met al hebben we dus afwijkingen in de eiwitten aangetoond die het slechte functioneren van hartspiercellen zouden kunnen verklaren. Verschillen in werking van hartspiercellen zouden verschillen in vervorming van het hart kunnen verklaren. Daarnaast hebben we laten zijn dat fosforylatie van eiwitten door het β -adrenerge systeem belangrijk is in de functie van het hart en ook in het ontstaan van cardiomyopathieën. Aangezien het β -adrenerge systeem vaak niet goed functioneert in patiënten met hartfalen, moet hier rekening mee gehouden worden in het onderzoek naar de rol van (kapotte) eiwitten in het ontstaan van cardiomyopathie.