

VU Research Portal

Familial hypertrophic cardiomyopathy: An energetic story about cellular remodeling and sarcomere function

Witjas-Paalberends, E.R.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Witjas-Paalberends, E. R. (2014). *Familial hypertrophic cardiomyopathy: An energetic story about cellular remodeling and sarcomere function*. [, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse Samenvatting en Conclusies

Familiaire hypertrofische cardiomyopathie: een energiek verhaal over cellulaire remodelering en sarcomeer functie

Familiare hypertrofische cardiomyopathie (HCM) is een genetische cardiovasculaire ziekte die in ongeveer 0,2% van de samenleving voorkomt. De belangrijkste structurele eigenschap (fenotype) is de asymmetrische verdikking (hypertrofie) van het linker ventrikel van het hart. Structurele veranderingen zijn ook zichtbaar op cellulair niveau door misoriëntatie van de hartspiercellen. Er zijn meer dan 1300 HCM geassocieerde DNA mutaties (genotype) gevonden in genen die coderen voor sarcomeereiwitten. Hoe deze mutaties, die veelal leiden tot stoornissen in sarcomeerfunctie, zich verhouden tot structurele veranderingen van het hart is onduidelijk. Het doel van dit proefschrift is dan ook om meer inzicht te verkrijgen in deze complexe relatie tussen het genotype en fenotype in humane HCM. Onderscheid is gemaakt tussen cellulaire structurele veranderingen (remodelering) en intrinsieke HCM mutatie effecten op sarcomeerfunctie. *In vitro* studies in humaan hartspier weefsel zijn gecombineerd met *in vivo* studies naar het functioneren van het menselijk hart. Hierdoor kan worden bekeken of de cellulaire structurele en contractiele veranderingen ook relevant zijn voor de globale hartspierfunctie.

Mutatie versus cellulaire remodelering

Remodelering van de hartspiercellen zou een belangrijke oorzaak kunnen zijn voor de afname in hartspierfunctie. Hoofdstuk 2 beschrijft de verschillen in functie en remodelering op cellulair niveau van HCM patiënten met de R723G mutatie in het gen dat codeert voor het sarcomeereiwit myosine zware keten (*MYH7*) in vergelijking met gezonde hartspiercellen (controlegroep). De maximale kracht die een hartspiercel kan opwekken en de gevoeligheid voor calcium (Ca^{2+}) was lager in R723G hartspiercellen. Hoewel dit laatste werd gecompenseerd door een afname in fosforylering van de contractiele eiwitten bleek de afname in maximale kracht veroorzaakt te worden door een lagere dichtheid en misoriëntatie van de myofibrillen in R723G hartspiercellen.

Naast een directe invloed op hartspierfunctie, kan remodelering ook de directe effecten van de DNA mutaties op sarcomeerfunctie maskeren. In Hoofdstuk 3 is daarom de myofibrildichtheid en de oppervlakte van individuele hartspiercellen met mutaties in genen (*MYBPC3*, *MYH7*, *TPM1*, *TNNI3* en *TNNT2*) die coderen voor verschillende sarcomeereiwitten vergeleken (HCM_{mut}) met HCM hartspiercellen zonder een mutatie (HCM_{smn}), hartspiercellen van patiënten met hypertrofie door aorta stenose (LVH_{ao}) en hartspiercellen van de controlegroep. Niet alleen de oppervlakte van de HCM_{mut} hartspiercellen was groter (cellulaire hypertrofie) dan die van de HCM_{smn} hartspiercellen, ook de afname in myofibril dichtheid was groter in HCM_{mut} dan in HCM_{smn} en LVH_{ao} hartspiercellen ten opzichte van de controlegroep. Bovendien was er een negatieve correlatie tussen myofibrildichtheid en de oppervlakte van de hartspiercellen. Daarnaast is de maximale kracht gemeten in individuele HCM_{mut} , HCM_{smn} , LVH_{ao} en donor hartspiercellen en in myofibrillen. De maximale kracht was lager in alle HCM hartspiercellen, maar vooral in hartspiercellen met *MYH7* mutaties,

vergeleken met hartspiercellen van de controlegroep. Daarbij werd de maximale kracht in *MYH7* hartspiercellen niet genormaliseerd naar donor waarden na correctie voor myofibrildichtheid, wat wel het geval was voor hartspiercellen met een *MYBPC3* mutatie. Dit werd bevestigd door krachtmetingen in individuele myofibrillen met *MYH7* mutaties. De afname in maximale kracht in HCM hartspiercellen wordt dus vooral veroorzaakt door cellulaire hypertrofie en afname in myofibril dichtheid. Echter, als er een *MYH7* mutatie in het spel is, lijken hypocontractiele sarcomeren veroorzaakt te worden door de aanwezige mutatie.

Regionale versus globale contractiliteit

HCM patiënten krijgen in de kliniek niet de diagnose systolische disfunctie, terwijl HCM mutaties zowel direct als indirect een afname in maximale kracht op cellulair niveau lijken te veroorzaken (Hoofdstuk 2&3). Daarom is in Hoofdstuk 4 naast de *in vitro* maximale krachtmetingen in de hartspiercellen van HCM patiënten met verschillende mutaties ook gekeken naar *in vivo* regionale hartspierfunctie met behulp van speckle tracking echocardiografie bij dezelfde HCM patiënten. De regionale deformatie van de hartspier was afgenomen in de HCM patiënten tijdens de systole, welke positief correleerde met de afname in maximale kracht, gegenereerd door de individuele hartspiercellen van deze patiënten. Ook al is de globale systolische functie van HCM patiënten dus veelal intact, op regionaal niveau is de systolische functie wel afgenomen door de lagere maximale kracht van de hartspiercellen.

Energetische disfunctie op sarcomeer niveau

Een maat voor de energetische status in het hart is de PCr/ATP ratio. Bij hartfalen is deze ratio lager, wat aangeeft dat er een mismatch is tussen ATP (energie) aanbod en ATP-verbruik. Dat deze mismatch ook aanwezig is in HCM met verschillende mutaties is gebleken uit zowel dieren- als patiëntenstudies. Een eerdere studie in humaan HCM weefsel met de R403Q mutatie in *MYH7*, coderend voor het dikke filament eiwit myosine zware keten, legde het verband tussen een snellere interactie van myosine met actine (i.e. kruisbrug kinetiek) en ATP-verbruik. In Hoofdstuk 5 is dit verband direct aangetoond. De R403Q mutatie is interessant, omdat het zich bevindt in het myosine kopje (S1) dat direct interacteert met actine. Relaxatie kinetiek is gemeten in myofibrillen van een drietal patiënten met deze mutatie en de energetische kosten (ATP-verbruik) om een bepaalde hoeveelheid kracht te genereren in multicellulaire hartspierstripjes van deze drie patiënten. Als controlegroep werd weefsel van HCM_{smn} patiënten gebruikt. De relaxatie kinetiek was sneller in de R403Q myofibrillen en het ATP-verbruik was inderdaad hoger wat ten koste ging van de hoeveelheid kracht die gegenereerd werd door R403Q hartspierstripjes. De R403Q mutatie is een heterozygote mutatie wat zowel een gezond als een ziek allel oplevert. 100% expressie van het gemuteerde eiwit in het sarcomeer komt vrijwel niet voor. De relaxatie kinetiek van de kruisbruggen was positief gecorreleerd aan de energetische kosten om kracht te genereren, maar beide parameters waren onafhankelijk van de hoeveelheid aanwezige gemuteerde *MYH7* mRNA. Hoofdstuk 6 beschrijft de effecten van een homozygote mutatie op sarcomeerfunctie. De K280N mutatie in *TNNT2*, coderend voor het dunne filament eiwit troponine T, levert 100% gemuteerd eiwit op, wat ook in het

sarcomeer ingebouwd wordt. Ook de K280N mutatie laat een toename zien in kruisbrugrelaxatie vergeleken met controle myofibrillen. Ook hier waren de energetische kosten om kracht te genereren vele malen hoger in K280N spierstripjes vergeleken met HCM_{smn}. De aanwezigheid van een homozygote mutatie in het hartspierweefsel bood de mogelijkheid om te onderzoeken of het daadwerkelijk de mutatie was die interfereerde met kruisbrugkinetiek en ATP-verbruik. Het uitwisselen van het gemuteerde eiwit met recombinant gezond eiwit in zowel myofibrillen als de multicellulaire hartspierstripjes verlaagde zowel de relaxatie kinetiek als de energetische kosten om kracht te genereren. Dit bevestigde het causale verband tussen de aanwezigheid van de mutatie en de gevonden functionele sarcomeerdefecten.

Naast de invloed van de aanwezigheid van een mutatie op sarcomeerfunctie is ook de invloed van mutatielocatie interessant. Hoofdstuk 7 beschrijft dit effect op de energetische kosten om kracht te genereren, gericht op mutaties in *MYBPC3*, coderend voor myosine bindend eiwit C, en *MYH7*. Ook is de mogelijke invloed van linkerventrikel hypertrofie meegenomen. Daartoe is hartspierweefsel van zowel HCM_{smn} patiënten als van LVH_{ao} patiënten als controlegroep gebruikt. De energetische kosten om kracht te genereren waren hoger in zowel de *MYBPC3* als *MYH7* mutatiegroepen, wat de invloed van de aanwezigheid van een mutatie bevestigt. Daarbij bleken mutaties in het C5-C7 domein van myosine bindend eiwit C en mutaties in het S1 domein van myosine zware keten meer effect te hebben op sarcomeerfunctie vergeleken met mutaties in de andere domeinen wat de invloed van mutatielocatie weergeeft. Een even grote toename in de energetische kosten om kracht te genereren was zichtbaar in hartspierstripjes van LVH_{ao} patiënten als in de hartspierstripjes van HCM_{mut} patiënten. Echter, de mate van linkerventrikel hypertrofie was groter in de HCM patiënten vergeleken met LVH_{ao} patiënten. Linkerventrikel remodelering heeft dus effect op de energetische kosten om krachten te genereren op sarcomeer niveau. Het onderliggende mechanisme in secundaire linkerventrikel hypertrofie zoals aanwezig in LVH_{ao} patiënten lijkt te verschillen met primaire linkerventrikel hypertrofie in HCM.

Omdat de energetische kosten om kracht te genereren op cellulair niveau hoger is in hartspierweefsel van manifeste HCM patiënten, was de volgende vraag of dit ook al zichtbaar is op globaal niveau in een vroeg stadium van HCM. Namelijk, het stadium waarbij de mutatie aanwezig is, maar de karakteristieke linkerventrikel hypertrofie niet. Dit wordt beschreven in Hoofdstuk 8. Ook hier zijn de *in vitro* metingen in hartspierweefsel van manifeste HCM patiënten met *MYBPC3* en *MYH7* mutaties gekoppeld aan *in vivo* bepalingen van de efficiëntie van het hart in pre-hypertrofische dragers van deze mutaties. Voor het *in vitro* deel is weefsel van HCM_{smn} patiënten als controle gebruikt en voor het *in vivo* deel zijn gezonde vrijwilligers gebruikt. Naast de gevonden hogere energetische kosten om kracht te genereren in de spierstripjes met deze mutaties, bleek de myocardiale externe efficiëntie (MEE) onderzocht met behulp van PET en MRI, lager in de pre-hypertrofische mutatiedragers dan in de gezonde vrijwilligers. Bovendien waren beide parameters meer aangedaan in zowel de manifeste HCM patiënten met *MYH7* mutaties als de pre-hypertrofe *MYH7* mutatiedragers. Dit bewijst dat in humaan HCM een metabolische behandeling, gericht op de energiehuishouding in het hart al in een vroeg stadium van HCM bevorderlijk kan zijn.

De conclusies van dit proefschrift

De afname in maximale krachtgeneratie door HCM hartspiercellen met verschillende mutaties in genen die coderen voor sarcomeerproteïnen wordt veroorzaakt door cellulaire remodelering in de vorm van cellulaire hypertrofie en afname in myofibrildichtheid. Echter, een gemuteerde vorm van myosine zware keten, ingebouwd in het sarcomeer, draagt direct bij aan de afname in maximale kracht en veroorzaakt hypocontractiele sarcomeren (Hoofdstukken 2&3). Bovendien, correleert de afname in maximale kracht met de systolische deformatie van het hart op regionaal niveau. Regionale systolische dysfunctie lijkt HCM ontwikkeling te initiëren, vooral in HCM met *MYH7* mutaties (Hoofdstuk 4). HCM mutaties beïnvloeden, naast de maximale krachtontwikkeling van HCM hartspiercellen, ook de relaxatie kinetiek van de sarcomeren en energetische kosten om krachten te genereren. Zowel de *MYH7* R403Q en *TNNT2* K280N mutatie verhogen de relaxatie kinetiek, wat direct correleerde met een toename in de energetische kosten om kracht te genereren (Hoofdstuk 5&6). Veranderingen in deze parameters van sarcomeerfunctie werden tenietgedaan wanneer het gemuteerde K280N troponine T vervangen werd door het recombinante gezonde eiwit (Hoofdstuk 6). Het is gebleken dat mutaties in *MYBPC3* en *MYH7* de efficiëntie van het hart doen afnemen in zowel manifest HCM weefsel als in pre-hypertrofische mutatiedragers (Hoofdstukken 7&8). Dit effect was het meest zichtbaar in individuen met *MYH7* mutaties, maar sterk afhankelijk van mutatielocatie (Hoofdstuk 7). Een toekomstig medicijn ter voorkoming van of als behandeling van manifeste HCM zou zich moeten richten op de efficiëntie van de pompfunctie van het hart (Hoofdstukken 7&8).