

**Ca²⁺ homeostasis and effects of β -adrenergic signalling
on myofibrillar biomechanics in a mouse model of
familial hypertrophic cardiomyopathy**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Desirée Martha Möhner
aus Wuppertal

Köln, 2017

Berichtersteller:

Prof. Dr. Thomas Langer

Prof. Dr. Stefan Herzig

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Mai 2017

Summary

Familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) is the leading cause of sudden cardiac death especially in young athletes. It is an autosomal dominant inherited disease caused by mutations within genes encoding for sarcomeric proteins. Hallmarks of the disease are diastolic dysfunction and hypertrophy. Skinned cardiac fibres and subcellular myofibrillar bundles of transgenic mice carrying the FHC-linked mutation cTnI^{ΔK184} (ΔK184) display an enhanced Ca²⁺-sensitivity, slowed relaxation and increased passive stiffness - signs of diastolic dysfunction - which cannot be ascribed to altered phosphorylation of sarcomeric proteins. The mutation-linked biomechanical alterations were conserved in aged mice.

Current therapy focuses on the treatment of diastolic dysfunction using β-blockers. However, their specific modulatory effects are controversial. High-dose propranolol pretreatment of WT and ΔK184 mice before sacrifice increased Ca²⁺-sensitivity and either Ca²⁺-dependent thin filament activation and/or isometric cross-bridge cycling turnover kinetics only in ΔK184 myofilament. The negative lusitropic effect of propranolol was blunted by the mutation. Therefore, sympathetic modulation of cardiac function was altered in the ΔK184 myocardium and β-blocker pretreatment was not able to restore the mechanical dysfunctions in the ΔK184 mice.

PKA-mediated phosphorylation of sarcomeric proteins via β-adrenergic signalling cascades is an important regulator of cardiac function. The ΔK184 mutation does not uncouple PKA-mediated cTnI phosphorylation from Ca²⁺-sensitivity modulation but blunts the PKA effects on the contraction and relaxation kinetics. These effects highly depend on the phosphorylation propensity of the Ser-23/24 residues at cTnI.

Imbalances in intracellular Ca²⁺ handling have been implicated as an underlying mechanism in the pathophysiology of FHC. This work indicates a decreased Ca²⁺ extrusion activity of the NCX in combination with a possible functionally compensatory activity of SERCA in ΔK184 atria. Hence, an increase in the Ca²⁺ fraction cycling between the cytosol and the SR might contribute to the development of diastolic dysfunction of the ΔK184 mice. Ca²⁺ loading capacity was not impaired by the ΔK184 mutation. An I_{NaL}-mediated Na⁺ overload does not account for increased Ca²⁺ fraction in ΔK184 mice. Future studies have to show whether NCX and SERCA are promising targets for the treatment of FHC.

Zusammenfassung

Die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (FHC) ist eine autosomal-dominant vererbte Herzmuskelerkrankung mit variabler Penetranz, häufig charakterisiert durch eine asymmetrische Hypertrophie des links- wie auch rechtsventrikulären Myokards. Ätiologisch liegen Mutationen in Genen zu Grunde, die für sarkomerische Proteine kodieren. Gehäutete kardiale Muskelfasern und Myofibrillen der transgenen FHC-Maus (cTnI^{ΔK184}, ΔK184) zeichnen sich durch eine erhöhte Ca²⁺-Sensitivität und passive Steifigkeit aus, sowie einer verlangsamten Relaxationskinetik - Zeichen einer, für FHC-charakteristischen, diastolischen Dysfunktion. Diese Veränderungen stehen nicht im Zusammenhang mit einem modifizierten Phosphorylierungsmuster der hier untersuchten sarkomerischen Proteine.

Die sympathische Regulation der Herzfunktion scheint verändert im transgenen Tiermodell. Ausschließlich in ΔK184 Mäusen führte eine intraperitoneale Injektion des hochdosierten β-Blockers Propranolol zu einer erhöhten Ca²⁺-Sensitivität des Myokards und zu einer Beschleunigung der Ca²⁺-induzierten Kraftzunahme bzw. der Querbrückenkinetik. Der negative lusitrope Effekt war dagegen durch die Mutation maskiert. Eine kurzzeitige β-Blockerbehandlung war somit nicht hinreichend die kardiale, mechanische Dysfunktion in der ΔK184 Maus zu normalisieren.

Die Aktivierung β-adrenerger Rezeptoren erhöht nach intrazellulärer Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) die Kontraktionskraft und die Relaxationsrate, vermittelt u.a. durch Phosphorylierung von cTnI an den Serinresten 23 und 24. In der ΔK184 Maus induzierte PKA eine Desensitivierung des Myokards, doch die Effekte auf die Kontraktions- und Relaxationskinetik waren nicht sichtbar. Zudem scheinen die PKA-Effekte nur vermittelt zu werden, wenn die Serinreste phosphoryliert werden können.

Pathophysiologisch werden der FHC ebenfalls Veränderungen in der Ca²⁺-Homöostase zu Grunde gelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine verringerte Transportaktivität des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers und einer kompensatorischen Aktivität der SERCA im transgenen FHC-Tiermodell hin. Diese Veränderungen könnten mögliche Ursachen für die erhöhte zwischen dem Zytosol und dem SR zirkulierende Ca²⁺-Fraktion darstellen. Potentiell führt dies zu einer erhöhten diastolischen Ca²⁺-Konzentration und zusammen mit der unvollständigen Inaktivierung der Querbrücken zu der Entstehung der diastolischen Dysfunktion. Es konnte gezeigt werden, dass ein I_{NaL}-vermittelter Na⁺-Anstieg nicht die Ursache für diese erhöhte Ca²⁺-Fraktion ist.