

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Fosforylatie van Cardiaal Troponine I: Uitwisseling van Ideeën

In hoofdstuk 1 worden de achtergronden en methoden van de studies beschreven.

In hoofdstuk 2 hebben we het fosforyleringsniveau van cTnI en van andere myofilament eiwitten bestudeerd in gezond donor hartspierweefsel en in hartspierweefsel van patiënten met ischemische cardiomyopathie (ICM) en idiopathisch gedilateerde cardiomyopathie (IDCM) samen met de contractiliteit van de hartspiercellen. Verder hebben we de expressie van eiwit fosfatase (PP) type 2A bestudeerd, PP2A activiteit en het effect van PP2A incubatie in gezonde hartspiercellen en in ICM en IDCM. cTnI-Ser23/24 defosforylatie door PP2A werd bestudeerd met behulp van western blot.

In hoofdstuk 3 zijn de effecten van plaats-specifieke fosforylatie van de PKA-plaatsen Ser23 en Ser24 van cTnI bestudeerd op de contractiliteit van humane hartspiercellen. Vier verschillende troponine complexen werden gemaakt door plaatsgerichte mutaties te introduceren in cTnI-Ser23/24: 23A/24A, 23A/24D, 23D/24A, 23D/24D. De krachtsontwikkeling werd gemeten in membraan-gepermeabiliseerde hartspiercellen waarin endogene troponine complex was vervangen door een van de 4 recombinante troponine complexen. De effecten van bisfosforylatie op de Ca^{2+} -gevoeligheid werden getitreerd in IDCM weefsel.

In hoofdstuk 4 zijn de effecten van PKC-gemedieerde fosforylatie van cTnI-Thr143 bestudeerd op de lengte-afhankelijkheid van de myofilament krachtsontwikkeling. Daarvoor werd recombinant wild-type (Wt) troponine complex en pseudo-ge(de)fosforyleerd troponine complex op Thr143 uitgewisseld in donor hartspierweefsel en in IDCM hartspierweefsel. Vervolgens werd de isometrische kracht gemeten op een sarcomeerlengte van 1.8 μm en op een lengte van 2.2 μm . Gecombineerde effecten van PKA-gemedieerde fosforylatie en Thr143 pseudo-fosforylatie werden bestudeerd op de lengte-afhankelijkheid van de myofilament krachtsontwikkeling in donor hartspiercellen.

In hoofdstuk 5 worden de functionele effecten van PKC-gemedieerde fosforylatie van cTnI-Ser42/44 beschreven. Daarvoor werd recombinant Wt troponine complex en pseudo-ge(de)fosforyleerd troponine complex op Ser42/44 uitgewisseld in donor hartspierweefsel en in IDCM hartspierweefsel. Effecten van pseudo-fosforylatie op de krachtsontwikkeling werden bepaald. Gecombineerde effecten van PKA-gemedieerde fosforylatie en Ser42/44 pseudo-fosforylatie werden bestudeerd op de lengte-afhankelijkheid van de myofilament krachtsontwikkeling in donor hartspiercellen. ATPase activiteit werd gemeten in humane spierstripjes nadat troponine was uitgewisseld.

In hoofdstuk 6 zijn de effecten van cTnI fosforylatie bestudeerd op een recentelijk aangetoonde PKC-gemedieerde fosforylatie plaats, cTnI-Ser199. Daarvoor werd recombinant Wt troponine complex en pseudo-ge(de)fosforyleerd troponine complex op Ser199 uitgewisseld in donor hartspierweefsel en in IDCM hartspierweefsel. Effecten van pseudo-fosforylatie op de krachtsontwikkeling werden bepaald. De effecten van Ser199 pseudo-fosforylatie op de Ca^{2+} -gevoeligheid werden getitreerd in IDCM en donor hartspierweefsel.

In hoofdstuk 7 hebben we onderzocht of verhoogde myofilament Ca^{2+} -gevoeligheid en verstoorde lengte-afhankelijke activatie kenmerken zijn van humane hypertrofische cardiomyopathie (HCM) met mutaties in de eiwitten van de dikke en dunne filamenten. Daarom hebben wij hart samples vergeleken van patiënten met HCM mutaties in genen die coderen voor dikke (*MYH7*, *MYBPC3*) en dunne (*TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*) filament eiwitten met sarcomeer mutatie-negatieve HCM en gezonde donoren. Lengte-afhankelijke activatie werd bestudeerd in patiënten met mutaties in *TNNT2* en *TNNI3* na vervanging van gemuteerde troponine door Wt troponine.

In hoofdstuk 8 wordt een samenvatting van de studies gegeven en worden de conclusies en de belangrijkste bevindingen van de studies beschreven, gevolgd door de toekomstperspectieven.