

Contractile Function of the Human Myocardium

Impact of Troponin Phosphorylation

Viola Kooij

ISBN: 978-90-8570-716-5

Cover: Schematic representation of the cardiac thin filament

Printed by: Wöhrmann Print Service

Acknowledgements:

Financial support by the Netherlands Heart Foundation and the J.E. Jurriaanse Stichting for the publication of this thesis is gratefully acknowledged. Additional financial support was kindly provided by the Dondersfonds.

VRIJE UNIVERSITEIT

Contractile Function of the Human Myocardium

Impact of Troponin Phosphorylation

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad Doctor aan
de Vrije Universiteit Amsterdam,
op gezag van de rector magnificus
prof.dr. L.M. Bouter,
in het openbaar te verdedigen
ten overstaan van de promotiecommissie
van de faculteit der Geneeskunde
op dinsdag 15 februari 2011 om 13.45 uur
in de aula van de universiteit,
De Boelelaan 1105

door

Viola Kooij

geboren te Rotterdam

promotor: prof.dr. G.J.M. Stienen

copromotor: dr. J. van der Velden

Contents

Chapter 1:	General introduction and outline of the thesis	9
Chapter 2:	PKC α and PKC ϵ phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca ²⁺ -sensitivity in human myocardium	23
Chapter 3:	Protein kinase C α -mediated phosphorylation of cardiac troponin reduces maximal force and increases Ca ²⁺ -sensitivity in human cardiomyocytes.....	43
Chapter 4:	Effect of troponin I Ser23/24 phosphorylation on Ca ²⁺ -sensitivity in human myocardium depends on the phosphorylation background	63
Chapter 5:	Comparison of the contractile effects of PKA mediated phosphorylation and pseudo phosphorylation of cardiac troponin I in human cardiomyocytes.....	87
Chapter 6:	Conclusions & Future perspectives	103
Chapter 7:	Summary & Samenvatting.....	107
Chapter 8:	Bibliography	115
	List of publications	133
	Dankwoord.....	135
	Curriculum vitae.....	139

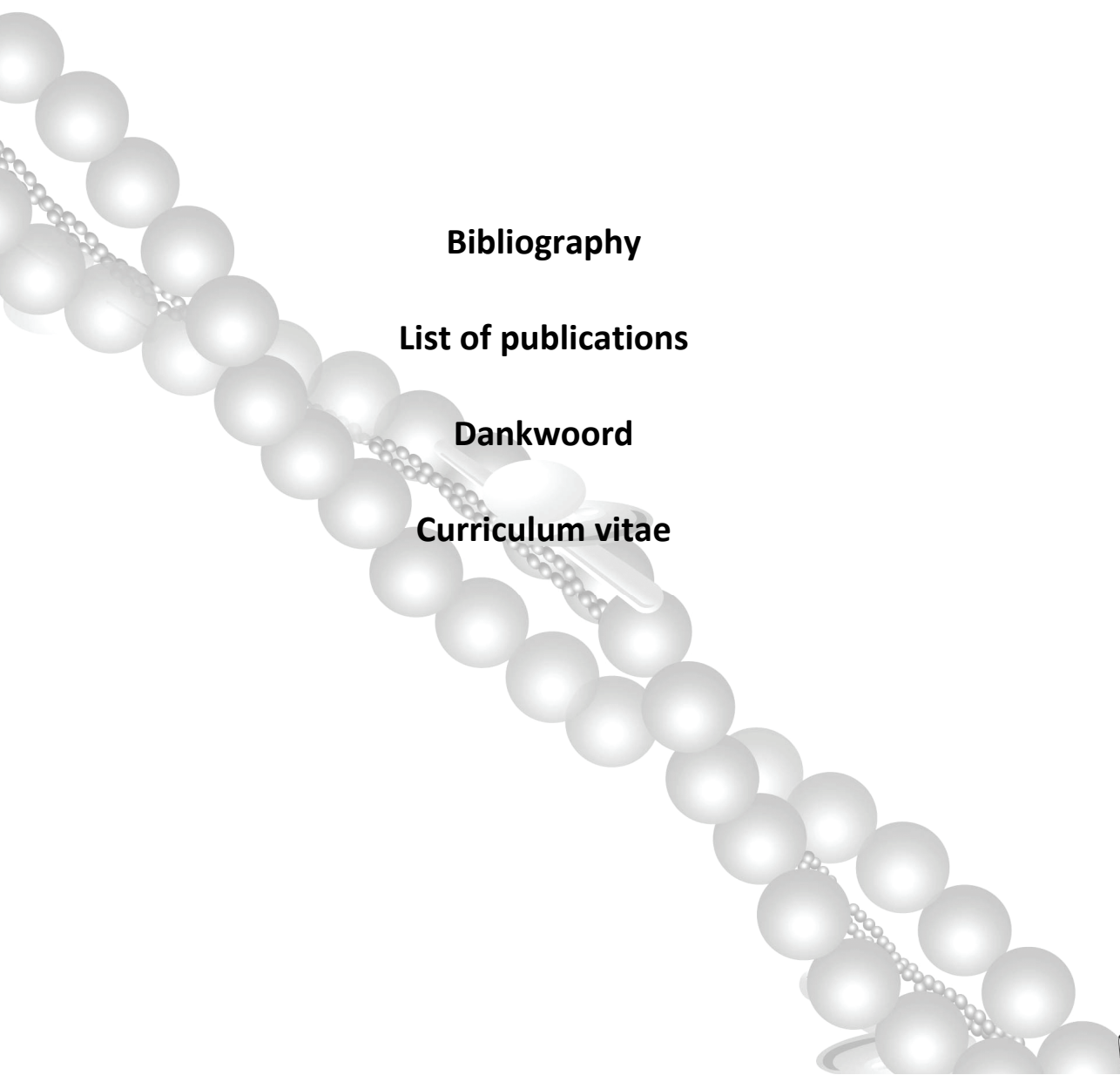
Chapter 8

Bibliography

List of publications

Dankwoord

Curriculum vitae



1. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. (1997). The epidemiology of heart failure. *Eur. Heart J.* 18, 208-225
 2. Mudd JO, Kass DA. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928
 3. Widmaier E.P., Hershel R. & Strang K.T. *Vander's human physiology: the mechanisms of body function.* (2006).
 4. Guyton A.C. & Hall J.E. *Textbook of medical physiology.* (2001).
 5. Marieb E.N. *Human anatomy and physiology.* (2001).
 6. Mohrman D.E. & Heller L.J. *Cardiovascular physiology.* (2003).
 7. Gregorio CC, Antin PB. (2000). To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* 10, 355-362
 8. Squire JM. (1997). Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 247-257
 9. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 80, 853-924
 10. Oakley CE, Hambly BD, Curmi PM, Brown LJ. (2004). Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Res.* 14, 95-110
 11. Harris S, Foord SM. (2000). Transgenic gene knock-outs: functional genomics and therapeutic target selection. *Pharmacogenomics.* 1, 433-443
 12. Moolman-Smook J, Flashman E, de Lange W, Li Z, Corfield V, Redwood C, Watkins H. (2002). Identification of novel interactions between domains of Myosin binding protein-C that are modulated by hypertrophic cardiomyopathy missense mutations. *Circ. Res.* 91, 704-711
-

13. Squire JM, Luther PK, Knupp C. (2003). Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J. Mol. Biol.* 331, 713-724
 14. Whitten AE, Jeffries CM, Harris SP, Trewheella J. (2008). Cardiac myosin-binding protein C decorates F-actin: implications for cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 18360-18365
 15. LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H. (2007). Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clin. Chim. Acta* 375, 1-9
 16. LeWinter MM, Granzier H. (2010). Cardiac titin: a multifunctional giant. *Circulation* 121, 2137-2145
 17. Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 44-49
 18. Kobayashi T, Solaro RJ. (2005). Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu. Rev. Physiol* 67, 39-67
 19. Wolska BM, Wieczorek DM. (2003). The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation. *Pflugers Arch.* 446, 1-8
 20. Solaro RJ, Van Eyk J. (1996). Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28, 217-230
 21. Geeves MA, Goody RS, Gutfreund H. (1984). Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 5, 351-361
 22. Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA. (1997). Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 96, 1495-1500
 23. Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, dos Remedios CG, Duncker DJ, Stienen GJM, van der Velden J. (2008). Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 77, 649-658
-

24. Kooij V, Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, dos Remedios CG, Stienen GJM, van der Velden J. (2010). Protein kinase C alpha and epsilon phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca^{2+} -sensitivity in human myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 105, 289-300
 25. Mittmann K, Jaquet K, Heilmeyer LM Jr. (1990). A common motif of two adjacent phosphoserines in bovine, rabbit and human cardiac troponin I. *FEBS Lett.* 273, 41-45
 26. Zhang R, Zhao J, Mandveno A, Potter JD. (1995). Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ. Res.* 76, 1028-1035
 27. Zhang R, Zhao J, Potter JD. (1995). Phosphorylation of both serine residues in cardiac troponin I is required to decrease the Ca^{2+} affinity of cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 270, 30773-30780
 28. Mittmann K, Jaquet K, Heilmeyer LM, Jr. (1992). Ordered phosphorylation of a duplicated minimal recognition motif for cAMP-dependent protein kinase present in cardiac troponin I. *FEBS Lett.* 302, 133-137
 29. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S, . (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* 59, 297-309
 30. Messer AE, Jacques AM, Marston SB. (2007). Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42, 247-259
 31. van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM. (2003). Increased Ca^{2+} -sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* 57, 37-47
-

32. Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S. (1995). Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J.* 14, 1952-1960
 33. Mohamed AS, Dignam JD, Schlender KK. (1998). Cardiac myosin-binding protein C (MyBP-C): identification of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 313-319
 34. Jia W, Shaffer JF, Harris SP, Leary JA. (2010). Identification of novel protein kinase A phosphorylation sites in the M-domain of human and murine cardiac myosin binding protein-C using mass spectrometry analysis. *J. Proteome. Res.* 9, 1843-1853
 35. Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. (2002). Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ. Res.* 90, 594-601
 36. Stelzer JE, Fitzsimons DP, Moss RL. (2006). Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium. *Biophys. J.* 90, 4119-4127
 37. Stelzer JE, Patel JR, Moss RL. (2006). Protein kinase A-mediated acceleration of the stretch activation response in murine skinned myocardium is eliminated by ablation of cMyBP-C. *Circ. Res.* 99, 884-890
 38. Shaffer JF, Kensler RW, Harris SP. (2009). The myosin-binding protein C motif binds to F-actin in a phosphorylation-sensitive manner. *J. Biol. Chem.* 284, 12318-12327
 39. Kruger M, Linke WA. (2006). Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27, 435-444
 40. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. (2002). Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 90, 1181-1188
-

41. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJM, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ. (2006). Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113, 1966-1973
 42. Metzger JM, Westfall MV. (2004). Covalent and noncovalent modification of thin filament action: the essential role of troponin in cardiac muscle regulation. *Circ. Res.* 94, 146-158
 43. Cockcroft S, Thomas GM. (1992). Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem. J.* 288 (Pt 1), 1-14
 44. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 279, L429-L438
 45. Noland TA, Jr., Raynor RL, Kuo JF. (1989). Identification of sites phosphorylated in bovine cardiac troponin I and troponin T by protein kinase C and comparative substrate activity of synthetic peptides containing the phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 264, 20778-20785
 46. Jideama NM, Noland TA, Jr., Raynor RL, Blobe GC, Fabbro D, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hannun YA, Kuo JF. (1996). Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J. Biol. Chem.* 271, 23277-23283
 47. Swiderek K, Jaquet K, Meyer HE, Schachtele C, Hofmann F, Heilmeyer LM, Jr. (1990). Sites phosphorylated in bovine cardiac troponin T and I. Characterization by ³¹P-NMR spectroscopy and phosphorylation by protein kinases. *Eur. J. Biochem.* 190, 575-582
 48. Gusev NB, Dobrovolskii AB, Severin SE. (1980). Isolation and some properties of troponin T kinase from rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* 189, 219-226
 49. Burkart EM, Sumandea MP, Kobayashi T, Nili M, Martin AF, Homsher E, Solaro RJ. (2003). Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on
-

- cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity. *J. Biol. Chem.* 278, 11265-11272
50. Layland J, Solaro RJ, Shah AM. (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* 66, 12-21
51. Noland TA Jr., Guo X, Raynor RL, Jideama NM, Averyhart-Fullard V, Solaro RJ, Kuo JF. (1995). Cardiac troponin I mutants. Phosphorylation by protein kinases C and A and regulation of Ca^{2+} -stimulated MgATPase of reconstituted actomyosin S-1. *J. Biol. Chem.* 270, 25445-25454
52. Pyle WG, Sumandea MP, Solaro RJ, de Tombe PP. (2002). Troponin I serines 43/45 and regulation of cardiac myofilament function. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 283, H1215-H1224
53. Ramirez-Correa GA, Cortassa S, Stanley B, Gao WD, Murphy AM. (2010). Calcium sensitivity, force frequency relationship and cardiac troponin I: Critical role of PKA and PKC phosphorylation sites. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48, 943-953
54. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. (2007). Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ. Res.* 101, 195-204
55. Wang H, Grant JE, Doede CM, Sadayappan S, Robbins J, Walker JW. (2006). PKC-beta1 sensitizes cardiac myofilaments to Ca^{2+} by phosphorylating troponin I on threonine-144. *J. Mol. Cell Cardiol.* 41, 823-833
56. Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H. (2009). PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ. Res.* 105, 631-8, 17
57. van der Velden J, Narolska NA, Lamberts RR, Boontje NM, Borbely A, Zaremba R, Bronzwaer JG, Papp Z, Jaquet K, Paulus WJ, Stienen GJM. (2006). Functional effects of
-

- protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium. *Cardiovasc. Res.* 69, 876-887
58. Gomes AV, Barnes JA, Harada K, Potter JD. (2004). Role of troponin T in disease. *Mol. Cell Biochem.* 263, 115-129
59. van der Velden J, Klein LJ, van der BM, Huybregts MA, Stooker W, Witkop J, Eijnsman L, Visser CA, Visser FC, Stienen GJM. (1998). Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc. Res.* 38, 414-423
60. Huang X, Walker JW. (2004). Myofilament anchoring of protein kinase C-epsilon in cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* 117, 1971-1978
61. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ. (1999). Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation* 99, 384-391
62. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkentin JD. (2004). PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.* 10, 248-254
63. Hahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC, Bodi I, Liggett SB, Schwartz A, Dorn GW. (2003). Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy. *Circ. Res.* 93, 1111-1119
64. Hambleton M, Hahn H, Pleger ST, Kuhn MC, Klevitsky R, Carr AN, Kimball TF, Hewett TE, Dorn GW, Koch WJ, Molkentin JD. (2006). Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation* 114, 574-582
65. Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK,
-

- Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG. (2005). Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ. Res.* 96, 756-766
66. Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D. (1999). Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 12798-12803
67. Huang XP, Pi Y, Lokuta AJ, Greaser ML, Walker JW. (1997). Arachidonic acid stimulates protein kinase C-epsilon redistribution in heart cells. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 14), 1625-1634
68. Xiao L, Zhao Q, Du Y, Yuan C, Solaro RJ, Buttrick PM. (2007). PKCepsilon increases phosphorylation of the cardiac myosin binding protein C at serine 302 both in vitro and in vivo. *Biochemistry* 46, 7054-7061
69. Goldspink PH, Montgomery DE, Walker LA, Urboniene D, McKinney RD, Geenen DL, Solaro RJ, Buttrick PM. (2004). Protein kinase Cepsilon overexpression alters myofilament properties and composition during the progression of heart failure. *Circ. Res.* 95, 424-432
70. Solaro RJ, Rosevear P, Kobayashi T. (2008). The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 82-87
71. Sumandea MP, Rybin VO, Hinken AC, Wang C, Kobayashi T, Harleton E, Sievert G, Balke CW, Feinmark SJ, Solaro RJ, Steinberg SF. (2008). Tyrosine phosphorylation modifies protein kinase C delta-dependent phosphorylation of cardiac troponin I. *J. Biol. Chem.* 283, 22680-22689
72. Noguchi T, Hunlich M, Camp PC, Begin KJ, El Zaru M, Patten R, Leavitt BJ, Littleman FP, Alpert NR, LeWinter MM, VanBuren P. (2004). Thin-filament-based modulation of contractile performance in human heart failure. *Circulation* 110, 982-987
-

73. Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter M, Engman S, Samarel AM. (2003). Alterations in protein kinase C isoenzyme expression and autophosphorylation during the progression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Mol. Cell Biochem.* 242, 145-152
 74. Johnsen DD, Kacimi R, Anderson BE, Thomas TA, Said S, Gerdes AM. (2005). Protein kinase C isozymes in hypertension and hypertrophy: insight from SHHF rat hearts. *Mol. Cell Biochem.* 270, 63-69
 75. Narolska NA, Piroddi N, Belus A, Boontje NM, Scellini B, Deppermann S, Zaremba R, Musters RJ, dos Remedios C., Jaquet K, Foster DB, Murphy AM, van Eyk JE, Tesi C, Poggesi C, van der Velden J, Stienen GJM. (2006). Impaired diastolic function after exchange of endogenous troponin I with C-terminal truncated troponin I in human cardiac muscle. *Circ. Res.* 99, 1012-1020
 76. van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, Stienen GJM. (2003). The effect of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca^{2+} - sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 57, 505-514
 77. Verduyn SC, Zaremba R, van der Velden J, Stienen GJ. (2007). Effects of contractile protein phosphorylation on force development in permeabilized rat cardiac myocytes. *Basic Res. Cardiol.* 102, 476-487
 78. Morano I, Hofmann F, Zimmer M, Ruegg JC. (1985). The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres. *FEBS Lett.* 189, 221-224
 79. Gao WD, Murphy AM. (2007). Local control in thin filament activation of cardiac muscle. *J. Physiol* 580, 358
 80. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJM, Paulus WJ. (2009). Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ. Res.* 104, 780-786
-

81. Zaremba R, Merkus D, Hamdani N, Lamers JM, Paulus WJ, dos Remedios C., Duncker DJ, Stienen GJM, van der Velden J. (2007). Quantitative analysis of myofilament protein phosphorylation in small cardiac biopsies. *Proteomics Clin Appl* 1, 1285-1290
 82. Bokenes J, Aronsen JM, Birkeland JA, Henriksen UL, Louch WE, Sjaastad I, Sejersted OM. (2008). Slow contractions characterize failing rat hearts. *Basic Res. Cardiol.* 103, 328-344
 83. del Monte F, Johnson CM, Stepanek AC, Doye AA, Gwathmey JK. (2002). Defects in calcium control. *J. Card Fail.* 8, S421-S431
 84. Kobayashi T, Yang X, Walker LA, Van Breemen RB, Solaro RJ. (2005). A non-equilibrium isoelectric focusing method to determine states of phosphorylation of cardiac troponin I: identification of Ser-23 and Ser-24 as significant sites of phosphorylation by protein kinase C. *J. Mol. Cell Cardiol.* 38, 213-218
 85. Sumandea MP, Pyle WG, Kobayashi T, de Tombe PP, Solaro RJ. (2003). Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. *J. Biol. Chem.* 278, 35135-35144
 86. Montgomery DE, Chandra M, Huang Q, Jin J, Solaro RJ. (2001). Transgenic incorporation of skeletal TnT into cardiac myofilaments blunts PKC-mediated depression of force. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H1011-H1018
 87. Zabrouskov V, Ge Y, Schwartz J, Walker JW. (2008). Unraveling molecular complexity of phosphorylated human cardiac troponin I by top down electron capture dissociation/electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 7, 1838-1849
 88. Molnar A, Borbely A, Czuriga D, Ivetta SM, Szilagyi S, Hertelendi Z, Pasztor ET, Balogh A, Galajda Z, Szerafin T, Jaquet K, Papp Z, Edes I, Toth A. (2009). Protein kinase C contributes to the maintenance of contractile force in human ventricular cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 1031-1039
-

89. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJM, Paulus WJ. (2005). Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111, 774-781
 90. Linke WA. (2008). Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 77, 637-648
 91. Kruger M, Kotter S, Grutzner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ. Res.* 104, 87-94
 92. Marston SB, de Tombe PP. (2008). Troponin phosphorylation and myofilament Ca²⁺-sensitivity in heart failure: Increased or decreased? *J. Mol. Cell Cardiol.*
 93. Noland TA, Jr., Kuo JF. (1993). Phosphorylation of cardiac myosin light chain 2 by protein kinase C and myosin light chain kinase increases Ca²⁺-stimulated actomyosin MgATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 254-260
 94. Sancho Solis R, Ge Y, Walker JW. (2008). Single amino acid sequence polymorphisms in rat cardiac troponin revealed by top-down tandem mass spectrometry. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 29, 203-212
 95. Kooij V, Saes M, Jaquet K, Zaremba R, Foster DB, Murphy AM, dos Remedios C., van der Velden J, Stienen GJM. (2010). Effect of troponin I Ser23/24 phosphorylation on Ca²⁺-sensitivity in human myocardium depends on the phosphorylation background. *J. Mol. Cell Cardiol.* 48, 954-963
 96. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858
 97. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* 74, 5383-5392
-

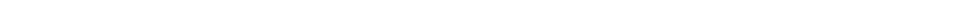
98. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 4646-4658
 99. Hofmann PA, Miller WP, Moss RL. (1993). Altered calcium sensitivity of isometric tension in myocyte-sized preparations of porcine postischemic stunned myocardium. *Circ. Res.* 72, 50-56
 100. van der Velden J, Boontje NM, Papp Z, Klein LJ, Visser FC, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Stienen GJM. (2002). Calcium sensitivity of force in human ventricular cardiomyocytes from donor and failing hearts. *Basic Res. Cardiol.* 97 Suppl 1, I118-I126
 101. Dohet C, al Hillawi E, Trayer IP, Ruegg JC. (1995). Reconstitution of skinned cardiac fibres with human recombinant cardiac troponin-I mutants and troponin-C. *FEBS Lett.* 377, 131-134
 102. Lu QW, Hinken AC, Patrick SE, Solaro RJ, Kobayashi T. (2010). Phosphorylation of cardiac troponin I at protein kinase C site threonine-144 depresses cooperative activation of thin filaments. *J. Biol. Chem.*
 103. Solaro RJ, Arteaga GM. (2007). Heart failure, ischemia/reperfusion injury and cardiac troponin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 592, 191-200
 104. Garvey JL, Kranias EG, Solaro RJ. (1988). Phosphorylation of C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem. J.* 249, 709-714
 105. Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ. (2001). Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ. Res.* 88, 1059-1065
 106. Pi Y, Zhang D, Kemnitz KR, Wang H, Walker JW. (2003). Protein kinase C and A sites on troponin I regulate myofilament Ca^{2+} sensitivity and ATPase activity in the mouse myocardium. *J. Physiol* 552, 845-857
 107. El Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, Dobrev D, Eschenhagen T, Carrier L. (2007). Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-
-

- binding protein-C in human and experimental heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 43, 223-229
108. Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM. (1991). Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ. Res.* 69, 1450-1457
 109. Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N. (1997). Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29, 265-272
 110. Brenner B, Kraft T, Yu LC, Chalovich JM. (1999). Thin filament activation probed by fluorescence of N-((2-(Iodoacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle. *Biophys. J.* 77, 2677-2691
 111. Piroddi N, Tesi C, Pellegrino MA, Tobacman LS, Homsher E, Poggesi C. (2003). Contractile effects of the exchange of cardiac troponin for fast skeletal troponin in rabbit psoas single myofibrils. *J. Physiol* 552, 917-931
 112. She M, Trimble D, Yu LC, Chalovich JM. (2000). Factors contributing to troponin exchange in myofibrils and in solution. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21, 737-745
 113. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 5, 749-757
 114. Messer AE, Gallon CE, McKenna WJ, dos Remedios C.G., Marston SB. (2009). The use of phosphate-affinity SDS-PAGE to measure the cardiac troponin I phosphorylation site distribution in human heart muscle. *Proteomics Clin Appl* 3, 1-12
 115. Brodde OE, Michel MC. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* 51, 651-690
-

116. Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 42, 254-261
 117. Marston SB, Walker JW. (2009). Back to the future: new techniques show that forgotten phosphorylation sites are present in contractile proteins of the heart whilst intensively studied sites appear to be absent. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 30, 93-95
 118. Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM. (1996). Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J. Clin Invest* 98, 167-176
 119. Sadayappan S, Gulick J, Osinska H, Martin LA, Hahn HS, Dorn GW, Klevitsky R, Seidman CE, Seidman JG, Robbins J. (2005). Cardiac myosin-binding protein-C phosphorylation and cardiac function. *Circ. Res.* 97, 1156-1163
 120. Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Kramer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A. (2006). Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc. Res.* 69, 370-380
 121. Yasuda S, Coutu P, Sadayappan S, Robbins J, Metzger JM. (2007). Cardiac transgenic and gene transfer strategies converge to support an important role for troponin I in regulating relaxation in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 101, 377-386
 122. Hofmann PA, Hartzell HC, Moss RL. (1991). Alterations in Ca²⁺ sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol* 97, 1141-1163
 123. Tachampa K, Kobayashi T, Wang H, Martin AF, Biesiadecki BJ, Solaro RJ, de Tombe PP. (2008). Increased cross-bridge cycling kinetics after exchange of C-terminal truncated troponin I in skinned rat cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 15114-15121
-

124. Keane NE, Quirk PG, Gao Y, Patchell VB, Perry SV, Levine BA. (1997). The ordered phosphorylation of cardiac troponin I by the cAMP-dependent protein kinase-- structural consequences and functional implications. *Eur. J. Biochem.* 248, 329-337
 125. Walker LA, Walker JS, Ambler K, Buttrick PM. (2009). Stage-specific changes in myofilament protein phosphorylation following myocardial infarction in mice. *J. Mol. Cell Cardiol.*
 126. Takimoto E, Soergel DG, Janssen PM, Stull LB, Kass DA, Murphy AM. (2004). Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo by troponin I with constitutively active protein kinase A phosphorylation sites. *Circ. Res.* 94, 496-504
 127. Gaponenko V, Abusamhadneh E, Abbott MB, Finley N, Gasmi-Seabrook G, Solaro RJ, Rance M, Rosevear PR. (1999). Effects of troponin I phosphorylation on conformational exchange in the regulatory domain of cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 274, 16681-16684
 128. Sakthivel S, Finley NL, Rosevear PR, Lorenz JN, Gulick J, Kim S, VanBuren P, Martin LA, Robbins J. (2005). In vivo and in vitro analysis of cardiac troponin I phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 703-714
 129. Wu SC, Solaro RJ. (2007). Protein kinase C zeta. A novel regulator of both phosphorylation and de-phosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 30691-30698
 130. Matsuba D, Terui T, Uchi J, Tanaka H, Ojima T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. (2009). Protein kinase A-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in cardiac and fast skeletal muscles after reconstitution with cardiac troponin. *J. Gen. Physiol.* 133, 571-581
 131. Cuello F, Bardswell SC, Haworth RS, Yin X, Lutz S, Wieland T, Mayr M, Kentish JC, Avkiran M. (2007). Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament Ca^{2+} sensitivity in ventricular myocytes. *Circ. Res.* 100, 864-873
-

132. El Armouche A, Pamminer T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T. (2004). Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc. Res.* 61, 87-93
 133. Oliver CJ, Shenolikar S. (1998). Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci.* 3, D961-D972
 134. Finley NL, Rosevear PR. (2004). Introduction of negative charge mimicking protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I. Effects on cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 279, 54833-54840
 135. Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Kranias EG, Potter JD, Solaro RJ. (1982). The effect of troponin I phosphorylation on the Ca²⁺-binding properties of the Ca²⁺-regulatory site of bovine cardiac troponin. *J. Biol. Chem.* 257, 260-263
 136. Finley N, Abbott MB, Abusamhadneh E, Gaponenko V, Dong W, Gasmir-Seabrook G, Howarth JW, Rance M, Solaro RJ, Cheung HC, Rosevear PR. (1999). NMR analysis of cardiac troponin C-troponin I complexes: effects of phosphorylation. *FEBS Lett.* 453, 107-112
-



List of publications

Full papers

Hamdani N, Borbely A, Veenstra SPGR, [Kooij V](#), Vrydag W, Zaremba R, dos Remedios C, Niessen HWM, Michel MC, Paulus WJ, Stienen GJM, van der Velden J (2010) More severe cellular phenotype in human idiopathic dilated cardiomyopathy compared to ischemic heart disease. *J Muscle Res Cell Motil*, in press.

De Oliveira IFF, de Sousa Borges A, [Kooij V](#), Bartosiak-Jentys J, Jeff Errington J, Luirink J, Scheffer D-J (2010). Characterization of *ftsZ* mutations that render *B. subtilis* resistant to MinC. *PLoS ONE*; 5: e12048.

[Kooij V](#), Saes M, Jaquet K, Foster DB, Murphy AM, dos Remedios C, van der Velden J, Stienen GJM (2010). Impact of troponin I phosphorylation by PKA on Ca^{2+} -sensitivity in human myocardium depends on the phosphorylation background. *J Mol Cell Cardiol*; 48: 954-963.

[Kooij V](#), Boontje N, Zaremba R, Jaquet K, dos Remedios C, Stienen GJM, van der Velden J. (2010). Protein kinase C α and ϵ phosphorylation of troponin and myosin binding protein C reduce Ca^{2+} -sensitivity in human myocardium. *Basic Res Cardiol*; 105: 289-300.

Hamdani N, [Kooij V](#), van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, dos Remedios C, Duncker DJ, Stienen GJM, van der Velden J (2008). Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*; 77: 649-658.

Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje N, [Kooij V](#), van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, dos Remedios C, Duncker D, Borbely A, Papp Z, Paulus WJ, Stienen GJM, Marston SB, van der Velden J (2008). Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil*; 29: 189-201.

Abstracts

Zhang P, Kooij V, Murphy AM, van der Velden J, dos Remedios C, van Eyk JE (2010). Site-specific quantification of phosphorylated cardiac troponin I by MS-based multiple reaction monitoring. International symposium on electro- and liquid- phase separation techniques, Baltimore, USA.

Kooij V, Piersma SR, Tang KW, Jiménez CR, Zang P, van Eyk JE, Murphy AM, van der Velden J, Stienen GJM (2010). Identification of a novel protein kinase C α phosphorylation site on both human cardiac troponin I and T. *Biophysical J*.

Kooij V, van der Velden J, Stienen GJM. (2009). Effect of troponin I Ser23/24 bis-phosphorylation on Ca²⁺-sensitivity is dependent on PKA phosphorylation of other contractile proteins. *Biophysical J*; 96: 501a-502a.

Kooij V, Boontje NM, Zaremba R, Stienen GJM, dos remedios C, van der Velden J. (2008) Protein kinase C- α and ϵ reduce Ca²⁺-sensitivity of force development in human myocardium by phosphorylation of troponin. *J Muscle Res Cell Motil*; 29: 257-314.

Kooij V, van der Velden J, Stienen GJM. (2007) Impact of troponin phosphorylation on myofilament function in human myocardium. *J Muscle Res Cell Motil*; 28: 429-480.

Dankwoord

Ruim vier jaar geleden tijdens mijn stage in Stockholm kwam ik een advertentie tegen voor een baan op de afdeling fysiologie van het Vumc. Dit leek mij wel wat. Nu vier jaar later zit ik Baltimore waar ik net begonnen ben als post-doc het dankwoord te schrijven voor mijn proefschrift. De afgelopen vier jaar zijn ontzettend snel gegaan! Er zijn dan ook heel wat mensen die direct en indirect hebben meegeholpen aan dit boekje en die wil ik hierbij bedanken.

Als allereerste wil ik mijn promotor Ger Stienen bedanken. We hebben in de afgelopen vier jaar heel wat keren gebotst, maar dit boekje laat wel zien dat we toch ook heel goed samen kunnen werken! Ik heb het altijd erg gewaardeerd dat je eigenlijk altijd klaar stond en tijd had voor mijn project. Je hebt de hele goede eigenschap ontzettend kritisch te zijn over data en, ook al vond ik dit wel eens irritant, ik heb er wel heel veel van geleerd. Ger, bedankt voor alles!

Als tweede natuurlijk mijn co-promotor, Jolanda van der Velden. Beste Jolanda, ik heb afgelopen vier jaar erg fijn met je samengewerkt. Ik heb heel veel bewondering voor je enthousiasme en gedrevenheid. Met je ideeën wist je altijd het project weer op de rails te krijgen als het dreigde te ontsporen. Het boekje is zeker ook mede dankzij jou zo mooi geworden, bedankt!

Conny Jaquet from the Ruhr University in Bochum provided the recombinant troponin complex used in this thesis. I visited the lab two times and had a great time in Bochum, thank you for everything! From the Johns Hopkins Hospital in Baltimore, I would like to thank Anne Murphy, Brian Foster, Jenny van Eyk and Pingbo Zhang for their collaboration. I am very proud and happy that I had the opportunity to join your group! Connie Jimenez en Sander Piersma van het CCA wil ik bedanken voor alle hulp die zij mij geboden hebben met alle mass spectrometry experimenten.

De volgende die ik wil bedanken is een hele groep: Groep Stienen! Nazha, Sabine, Nicky, Ruud, Coen, Paul, Diederik en Josien; ik ben altijd erg blij geweest dat ik in onze groep werkte.

Nazha, van de vier jaar heb ik drie jaar met jou op een kamer gezeten. En tja, je bent natuurlijk niet voor niets mijn paranimf... het waren drie super gezellige jaren! We hadden verreweg de mooiste kamer (door de rode vloer natuurlijk) en altijd een volle snoeppot. Je bent

door de jaren heen een hele goede vriendin geworden. Altijd neem je de tijd om me te helpen en ook altijd heb je een luisterend oor. Bedankt voor de super goede tijd! Sabien, jij bent een paar maanden na mij begonnen en daardoor liep bij ons alles een beetje gelijk op. We zijn samen naar heel wat leuke congressen en cursussen geweest; Boston, New York, Oxford, San Francisco, maar ook papendal was altijd onwijs gezellig. Al onze werk frustraties besproken we in het DE café, dat mis ik wel. Succes met het afronden van jouw boekje! Nicky, van jou heb ik zo'n beetje alles geleerd op het lab en dus ook zeker mede dankzij jou is dit boekje er. Ik heb 4 jaar echt super leuk met je samengewerkt. Jij zorgde voor de gezelligheid in de groep met alle etentjes en borrels die je regelde. Als dit boekje klaar is heb je vast al een behoorlijke buik... heel veel geluk aan jou en Thomas met de baby! Ruud, jij bent de grote brompot van de groep, maar gelukkig had ik al snel door dat dit eigenlijk reuze mee valt en je eigenlijk harstikke gezellig bent (vooral na een biertje)! Coen, jij kwam vanuit het verre Tuscon naar ons lab toe. Al vanaf dag 1 lag je goed in de groep en was het altijd lachen met jou. Ik heb heel veel bewondering voor jou als onderzoeker... de beurzen blijven bij jou binnenstromen. Heel veel succes met alles! Paul, Jij bent zo'n beetje mijn opvolger qua project. De experimenten geven nogal eens frustraties, maar het komt allemaal goed kan ik je vertellen. Hou je taai tussen de meiden op je kamer... ik weet dat je ze aan kan! Diederik, na Nazha kwam jij naast mij zitten op de kamer. Dit was gelijk erg gezellig! Ik was vooral heel veel aan het stressen, maar gelukkig bracht jij weer wat rust in de kamer. Heel veel succes met jouw afronding en wie weet delen we in de toekomst weer een kamer. Josien (aka myosine), jij kwam als laatste bij ons op de kamer. Met jou kwam er een hoop gezelligheid en M&M's mee. Heel veel succes komende vier jaar met al je stripjes!

En nu natuurlijk alle aio's van de afdeling die ik heb meegemaakt: Gerrina, Jurrian, Yeun Ying, Sabine, Paul, Ester, Charissa, Lonneke, Christine, Evi, Daniël, Kakkhee, Nazha, Francis&Louis, Lynda, Wineke, Koen, Robert, Loek, Diederik, Josiene, Melanie, Cora en Everaldo. Ik heb echt een super leuke tijd met jullie gehad. Borrels, etentjes, uitjes, TPO weekenden en natuurlijk niet te vergeten de promo-weekenden met sommigen van jullie. Lonneke, het was super lachen om samen met jou die piste's af te stuntelen! Everaldo, je moet me op de hoogte blijven houden van alle coole manga's, hoor!

Op woensdag ochtend als ik de kamer binnen kwam lag er bij één buro een blauwe rugzak, dat betekende dat Loek ergens in het donker aan het werk was. De woensdagen waren altijd gezellig als jij er was. Succes met je opleiding en het afronden van je boekje!

Elke dag hoorden we bij ons op de kamer een hele hoop gelach vanuit de kamer naast ons komen. Caro-lynn, Sylvia, Nicky en Ingrid, de afdeling zou zeker niet zo goed lopen zonder zulke super analisten als jullie!

Aimée en Hans, zonder jullie zou de afdeling één grote chaos zijn. Bedankt voor alles!

Ivor, Jasper, Matthijs, Rogier en Niek... onze woensdag game avond! Gelukkig kon ik hier altijd weer al mijn frustraties kwijt. Van Dungeons & Dragons (damn wat een nerds zijn jullie toch) tot koehandel, het is altijd lachen. We hebben het heel wat jaartjes volgehouden, maar nu ik in Amerika zit, Niek in Japan, Rogier in Brabant en Matthijs drie kids heeft wordt het toch wel heel lastig. Wie weet als iedereen weer terug is en de kinderen ietsjes groter zijn...

Paula, Tjeerd, Gintare, Mulder, Dijk, Ivo, Mies, Mike en Bernard, tijdens mijn studie en promotie hebben we heel wat feesten afgelopen en ook heel wat festivals in Duitsland meegemaakt. Het was altijd super gezellig met jullie en ik mis het nog erg vaak!

Jaja... bij Genomes and Gene Expression is ons groepje ontstaan: Ruben (aka Rubber), Vicky (aka MiVi), Ron (aka Lonnie), Jelle (aka Jelly) en natuurlijk Emilie (aka Emulsie). Van cocktails, bowlen en zelfs ranzige Dixies, met jullie is het altijd een feestje. Ik hoop dat we onze avondjes nog lang volhouden!! Vicky, heel veel geluk met jullie baby!

Ik was zeker niet zover gekomen zonder twee hele belangrijke mensen in mijn leven, mijn lieve ouders. Pap en mam, heel erg bedankt dat jullie me altijd door dik en dun steunen. Het maakt niet uit wat ik doe of kies, ik weet dat jullie altijd achter me staan. Ik ben super blij met jullie! Tan, mijn favoriete zus en mijn paranimf. Naast een hele lieve zus ben je ook mijn beste vriendin en kan ik met niemand zo goed huilen en lachen als met jou! Ik ben erg blij dat je Kel gevonden hebt en ik hoop dat we nog veel leuke dingen met zijn viertjes zullen doen! Ook mijn schoonfamilie, Marijke, Leo, Malou, Thierry en Lisette. Ik hoop dat er nog vele Sinterklaas feestjes, verjaardagen en etentjes komen. Ik voel me altijd erg thuis bij jullie!

Last but not least, Martijn. Alweer meer dan 10 jaar zijn we samen en we zijn nu zelfs getrouwd! Mijn hele studie tijd en promotie heb je van begin tot einde meegemaakt. Zonder al jouw steun was ik zeker niet zo ver gekomen. Ik ben heel erg blij dat we samen aan ons Baltimore avontuur zijn begonnen. Ik hou van jou!

Viola Castel-Kooij



Curriculum vitae

Viola Kooij is geboren op 10 september 1981 te Rotterdam. In 1999 behaalde zij haar HAVO diploma aan het Ashram College in Alphen aan den Rijn. In dat zelfde jaar startte zij met de opleiding Life Sciences aan de hogeschool van Utrecht waar zij haar Bachelor in Moleculaire Biologie behaalde. Tijdens deze studie liep zij negen maanden stage op de Virologie afdeling van het LUMC in Leiden en werd haar interesse voor wetenschappelijk onderzoek gewekt. Na deze studie besloot zij daarom verder te studeren aan de Vrije Universiteit in Amsterdam om haar Master in Biomedische Wetenschappen te behalen. Haar eerste onderzoeksstage liep zij intern bij de afdeling Moleculaire Microbiologie en haar tweede stage heeft zij op de afdeling Biochemie aan de Universiteit van Stockholm in Zweden gelopen. In september 2006 heeft zij haar doctoraalexamen behaald. In de zelfde maand begon zij als promovendus bij de afdeling Fysiologie van het VU Medisch Centrum in Amsterdam. De resultaten die uit dit onderzoek zijn voort gekomen zijn in dit proefschrift beschreven. Per 1 november 2010 is zij begonnen bij het Johns Hopkins University in Baltimore, Amerika. Hier zal zij haar onderzoek naar de fosforylering van cardiale myofilament eiwitten voortzetten.

