

Acute and chronic regulation of CD36-mediated fatty acid uptake by rat heart and skeletal muscle

Citation for published version (APA):

Koonen, D. P. Y. (2004). *Acute and chronic regulation of CD36-mediated fatty acid uptake by rat heart and skeletal muscle*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20040915dk>

Document status and date:

Published: 01/01/2004

DOI:

[10.26481/dis.20040915dk](https://doi.org/10.26481/dis.20040915dk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Glucose and long-chain fatty acids (LCFAs) are the predominant energy substrates for skeletal muscle and heart. Since cardiac and skeletal muscles do not hold an unlimited storage capacity, these tissues rely heavily on the continuous supply of both glucose and LCFAs derived from the circulation. Cellular LCFA uptake is facilitated by putative LCFA transport proteins residing in the plasma membrane of the cell. The bulk of LCFA uptake into (cardiac) myocytes is mediated by fatty acid translocase (FAT)/CD36. Overwhelming evidence was obtained from the generation of transgenic mouse models with either muscle-targeted overexpression of FAT/CD36 or complete absence of the gene for FAT/CD36 (FAT/CD36 knockout mice). These models not only emphasized a physiological role for FAT/CD36 by illustrating that altered changes in muscle LCFA uptake rates paralleled the changes in FAT/CD36 expression, they also demonstrated the importance of the LCFA uptake process to overall LCFA metabolism and glucose utilization.

Like the glucose transporter GLUT4, FAT/CD36 localization is not restricted to the sarcolemma and an intracellular storage compartment for FAT/CD36 has been found. When compared to cellular glucose uptake by GLUT4, the uptake mechanism of LCFAs and its regulation are only poorly understood. However, there are some indications to suggest that a similar regulatory mechanism accounts for cellular LCFA uptake as well. The studies described in this thesis investigate the possible role of FAT/CD36 translocation as underlying mechanism in the acute and chronic regulation of LCFA uptake in heart and skeletal muscle. In addition, a first attempt has been made to unravel the signal transduction cascades involved in insulin- induced FAT/CD36 translocation.

CHAPTER 1 gives a brief description of the main signaling cascades involved in the biological effects of insulin on the regulation of glucose, protein and lipid metabolism. An introduction is given in the main process of cellular LCFA and glucose uptake and the glucose transporters predominantly involved in glucose uptake in heart and skeletal muscle are discussed. After presenting two specific models which are used throughout this thesis, that is *giant sarcolemmal vesicles* and *cardiomyocytes*, a thesis outline is provided.

Besides FAT/CD36, two other putative transport proteins are involved in protein-mediated LCFA uptake, plasma membrane fatty acid binding protein (FABPpm) and fatty acid transport protein (FATP). Although direct proof has not been provided, indirect evidence suggest an interaction of FAT/CD36 with each of these transport proteins. In chapter 2 background information is given about FAT/CD36, FABPpm and FATP, and four hypothetical models of LCFA uptake are described. In addition a review of current concepts and ideas on the regulation of LCFA uptake by insulin and electrical contractions is provided. The potential involvement of candidate proteins (protein kinase A (PKA), protein kinase B (Akt/PKB), protein kinase C (PKC), and mitogen-activated protein kinase (MAPK)) as part of the independent signal transduction kinases induced by insulin and electrical stimulation are highlighted. Finally this chapter describes the current evidence to indicate a role for a disturbed FAT/CD36 translocation in heart- and skeletal muscle of obese and insulin-resistant rats.

To verify whether giant sarcolemmal vesicles can be used as experimental tool system in LCFA uptake studies and to detect plasma membrane alterations in transport proteins, giant vesicles from heart, liver, muscle and adipose tissue were characterized. Therefore, we examined of which cell types (parenchymal/endothelial), membrane-domains or cell regions these giant sarcolemmal vesicles consist. In addition, we determined the existence of FAT/CD36, FABPpm and GLUT4, and of cytoplasmic FABP (FABPc), the intracellular counterpart of albumin. As mentioned in CHAPTER 3, giant vesicles not only consist of parenchymal cells but specific plasma membrane domains, like caveolae which are known to be involved in membrane transport processes, are also represented. Since giant vesicles do not contain subcellular organelles (i.e. mitochondria), but FABPc as well as the transport proteins, FAT/CD36, FABPpm and GLUT4, these giant sarcolemmal vesicles can be very well used to study the uptake mechanism of both glucose and LCFAs in the absence of metabolism (i.e. oxidation).

Skeletal muscle metabolism is remarkably capable of adapting to changes in muscle activity pattern. While it has been shown that increased muscle activity can increase FAT/CD36 and FABPpm, as well as LCFA transport, the effects of reducing muscle activity on LCFA transport and transport proteins are not known. In previous studies, it was demonstrated that LCFA uptake is subject to short-term regulation by a brief period of muscle contraction, involving the translocation of FAT/CD36 from intracellular stores to the sarcolemma. In this respect, it is important to account for changes in LCFA transport by examining both the total muscle content and the plasmalemmal content of FAT/CD36 and FABPpm. CHAPTER 4 therefore describes the effects of altered muscle activity on LCFA transport and the mechanisms involved. For this, we either chronically stimulated or denervated rat hindlimb muscle for a period of 7 consecutive days and measured the total muscle content of FAT/CD36 and FABPpm in these muscles. We used giant sarcolemmal vesicles to measure the rates of LCFA transport and the plasmalemmal content of FAT/CD36 and FABPpm. In this chapter evidence is provided that chronic alterations in muscle activity can alter the rates of LCFA transport via different mechanisms, either 1) by increasing the total muscle content of FAT/CD36 and FABPpm resulting in a concomitant increase at the sarcolemma, or 2) by reducing the plasma membrane content of the proteins, in the absence of any changes in their total muscle content.

Besides a short-term period of electrical stimulation, insulin is also capable of increasing LCFA transport rates in skeletal muscle by inducing FAT/CD36 translocation to the sarcolemma. Chapter 5 describes the direct effect of insulin on cellular uptake of LCFAs by the heart and provides the novel finding of insulin to induce FAT/CD36 translocation in heart in addition to the well-known effect of insulin to stimulate glucose uptake and GLUT4 translocation. Moreover, evidence was found for two independent pathways mediating the insulin-and contraction-induced regulation of LCFA uptake in cardiac myocytes, confining a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent mechanism to insulin-induced LCFA uptake.

Although the regulation of LCFA and glucose uptake appear to be identical, we recently observed evidence that zaprinast, a cGMP-specific phosphodiesterase inhibitor,

selectively modulated the substrate preference of the heart by stimulating glucose uptake and not LCFA uptake. Notably, these observations suggest that different mechanisms are involved in the regulation of glucose and LCFA uptake. Since zaprinast potentially has anti-diabetic properties, we determined the underlying mechanism by which zaprinast is able to selectively stimulate glucose uptake, as described in CHAPTER 6 . Moreover, we rule out a role for p38 MAPK in the stimulation of insulin-induced LCFA uptake in cardiac myocytes, suggesting that FAT/CD36 translocation and not activation is involved in the effect of insulin on LCFA uptake.

In the final chapter (CHAPTER 7), the main results of the studies presented in this thesis are discussed and put into a broader perspective. Suggestions for future research as well as clinical implications in respect to FAT/CD36 as therapeutic potential are given.

Samenvatting

Naast glucose als substraat zijn het hart- en de skeletspieren voor hun energiebehoefte voor een belangrijk deel afhankelijk van de verbranding van vetzuren. Een continue aanvoer van deze voedingsstoffen is gewenst, aangezien er slechts een beperkte opslagcapaciteit voorhanden. Het grootste deel van de vetzuren wordt door de hart- en skeletspiercel opgenomen met behulp van zogenaamde transporteiwitten, die zich in de plasmamembraan van de cel bevinden. Fatty acid translocase (FAT)/CD36 is verantwoordelijk voor meer dan de helft van de cellulaire opname van vetzuren in hart- en skeletspiercellen en neemt daarmee een prominente plaats in binnen het eiwit-gemedieerde vetzuuropname proces. De fysiologische betekenis van dit transporteiwit werd nadrukkelijk bevestigd door de ontwikkeling van transgene diermodellen gericht op zowel spierspecifieke overexpressie van FAT/CD36 of juist deletie van het FAT/CD36 gen. Deze diermodellen lieten niet alleen een parrallel zien tussen veranderingen in vetzuurtransportsnelheid en expressie van FAT/CD36 in de spier, maar benadrukten ook het belang van het vetzuuropname proces voor het vetzuur- en glucose metabolisme in het algemeen.

Net als GLUT4, de voornaamste glucose transporter in hart-en skeletspiercellen, bevindt FAT/CD36 zich niet uitsluitend in de plasmamembraan van de cel, maar komt dit eiwit ook voor in intracellulaire compartimenten. Ten opzichte van het bekende fenomeen dat de cellulaire glucose opname gereguleerd wordt door de hoeveelheid GLUT4 op de celmembraan, zijn er slechts aanwijzingen dat FAT/CD36 via eenzelfde mechanisme in staat is om de vetzuuropname te reguleren. De studies die in dit proefschrift beschreven worden, onderzoeken de mogelijke rol van het translocatiemechanisme van FAT/CD36 in de chronische en acute regulatie van vetzuuropname in het hart en de skeletspier van de rat. Daarnaast is het signaaltransductiemechanisme onderzocht waarmee externe acute stimuli, zoals insuline en kortdurende elektrische contracties de translocatie van FAT/CD36 in deze weefsels kunnen induceren.

In HOOFDSTUK 1 wordt een beknopte beschrijving gegeven van de signaaltransductie-cascades die betrokken zijn bij de insuline-gemedieerde regulatie van het glucose-, eiwit- en vetzuurmetabolisme. Daarnaast wordt de aandacht gevestigd op vetzuur- en glucose opname in het algemeen en komen behalve de vetzuurtransporter FAT/CD36 ook de belangrijkste glucosetransporters voor het hart en de skeletspier, GLUT1 en GLUT4, specifiek aan bod. Na een kennismaking met de twee modellen die in het proefschrift gebruikt worden om de opname en de regulatie van vetzuren te bestuderen, namelijk *giant sarcolemmal vesicles* en *cardiomyocyten*, wordt de opzet van het proefschrift uiteengezet.

Naast FAT/CD36 zijn nog twee transporteiwitten betrokken bij de eiwit-gemedieerde vetzuuropname, te weten plasma membraan fatty acid binding protein (FABPpm), en fatty acid transport protein (FATP). Hoewel concrete aanwijzingen nog niet geleverd zijn, is er indirect bewijs voorhanden om te veronderstellen dat FAT/CD36 met elk van deze eiwitten een interactie aangaat. In HOOFDSTUK 2 wordt dieper ingegaan op deze drie vetzuurbindende eiwitten en worden vier hypothetische modellen van vetzuuropname uitgewerkt. Daarnaast beschrijft dit hoofdstuk de stand van zaken omtrent de acute

regulatie van de vetzuuropname in hart en skeletspieren onder invloed van insuline en elektrische stimulatie. De onafhankelijke signaaltransductie cascades behorende bij de acute stimulatie van FAT/CD36 translocatie en potentiële kandidaateiwitten die binnen deze cascades een belangrijke rol kunnen spelen zoals proteïne kinase A (PKA), proteïne kinase B (Akt/PKB), proteïne kinase C (PKC), en mitogen-activated proteïne-kinase (MAPK) komen aan de orde. De aanwijzingen voor een verstoorde translocatie van FAT/CD36 in hart- en skeletspier van obese en insuline-resistente ratten worden eveneens besproken. Om te verifiëren of *giant sarcolemmal vesicles* als onderzoeksmodel in vetzuuropname-studies gebruikt kunnen worden om veranderingen in transporteiwitten op de plasmamembraan aan te tonen, hebben we onderzocht uit welke cellen (parenchymaal of endotheel) en celgedeeltes/compartimenten (onder andere caveolae en T-tubuli) de plasmamembraan van *giant vesicles* opgebouwd is. Ook hebben we de aanwezigheid bepaald van FAT/CD36, FABPpm en GLUT4, en van cytoplasmatisch FABP (FABPc), de intracellulaire tegenhanger van albumine. Zoals vermeld in HOOFDSTUK 3 blijkt dat *giant sarcolemmal vesicles* niet alleen opgebouwd zijn uit de plasmamembraan van parenchymale cellen, maar ook dat specifieke plasmamembraan domeinen betrokken bij membraan transport processen zoals caveolae vertegenwoordigd zijn. Aangezien subcellulaire organellen waaronder mitochondriën ontbreken, maar zowel de substraat transporters als FABPc aangetoond konden worden in deze *giant sarcolemmal vesicles*, kunnen deze vesicles bij uitstek toegepast worden ter bestudering van het opname mechanisme van glucose en vetzuren in afwezigheid van metabole processen (bijv. β -oxidatie).

Skeletspieren kunnen hun energiebehoefte gemakkelijk aanpassingen aan eventuele veranderingen in het spieractiviteitspatroon. Uit eerder onderzoek is gebleken dat een verhoogde spieractiviteit zowel een toename teweegbrengt in de vetzuurtransport-snelheid als ook in de hoeveelheid beschikbare transporteiwitten van FAT/CD36 en FABPpm in de spier. Echter, het is niet bekend wat het effect is van een afname van spieractiviteit op deze parameters. Bovendien blijkt uit eerder onderzoek dat het toebrengen van kortdurende elektrische stimulaties de vetzuuropname in staat is te reguleren door middel van het induceren van FAT/CD36 translocatie naar de plasmamembraan. Het is daarom belangrijk om veranderingen in vetzuurtransport snelheid te relateren aan zowel het totale gehalte van FAT/CD36 en FABPpm in de spier als ook aan de hoeveelheid van deze eiwitten op de sarcolemma. In HOOFDSTUK 4 wordt het effect van veranderingen in spieractiviteit op vetzuurtransport en de hierbij betrokken mechanismen behandeld. Hiervoor, was het van belang om de achterpootspieren van de rat gedurende een aaneengesloten periode van 7 dagen ofwel chronisch te stimuleren of te denerveren. Vervolgens werd het totale gehalte van FAT/CD36 en FABPpm in deze spieren bepaald. De vetzuurtransport-snelheid alsmede de hoeveelheid van deze transporteiwitten op de plasmamembraan werd gemeten met behulp van *giant sarcolemmal vesicles* geïsoleerd uit deze spieren. In dit hoofdstuk wordt bewijs geleverd dat chronische veranderingen in spieractiviteit de vetzuurtransport-snelheid via verschillende mechanismen kunnen beïnvloeden. Ten eerste door middel van het verhogen van de totale hoeveelheid aan transporteiwitten en ten tweede door

het verminderen van het gehalte van FAT/CD36 en FABPpm op de plasmamembraan, zonder dat er een verandering optreedt in het totale aantal transporteiwitten in de spier. Uit recent onderzoek is gebleken dat naast kortdurende elektrische stimulaties ook insuline in staat is om in de skeletspier de vetzuuropname te stimuleren via het verhogen van het gehalte van FAT/CD36 op de plasmamembraan. HOOFDSTUK 5 beschrijft de nieuwe bevinding dat, insuline niet alleen de glucose opname stimuleert via GLUT4 translocatie, maar ook de vetzuuropname positief beïnvloedt via het induceren van FAT/CD36 translocatie naar de plasmamembraan. Daarnaast blijken insuline en contracties niet via hetzelfde signaaltransductiemechanisme de vetzuuropname te reguleren waarbij activering van fosfatidylinositol-3-OH-kinase (PI(3)K) alleen betrokken is bij het effect van insuline op de vetzuuropname.

Hoewel de regulatie van glucose als vetzuren identiek lijkt te zijn, komt uit recent onderzoek naar voren dat zaprinast, een cGMP-phosphodiesterase remmer, in staat is om de substraatvoorkeur voor het hart selectief te beïnvloeden. Zonder de vetzuuropname te veranderen, wordt de glucose opname van het hart verhoogd, wat erop duidt dat verschillende mechanismen betrokken zijn bij de regulatie van glucose- en vetzuuropname. Aangezien zaprinast hypothetisch gezien bij diabetes gebruikt kan worden om de glucose opname te stimuleren, wordt in HOOFDSTUK 6 het mechanisme ontrafeld van het specifieke effect van zaprinast op de glucoseopname in het hart. Op basis van de bevindingen kunnen we eveneens een rol voor p38 MAPK in de insuline-geïnduceerde stimulatie van de vetzuuropname uitsluiten waardoor vermoedelijk alleen FAT/CD36 translocatie en niet FAT/CD36 activatie als onderliggend mechanisme hierbij betrokken zijn.

IN HOOFDSTUK 7 worden uiteindelijk de belangrijkste resultaten van dit proefschrift bediscussieerd en in een breder perspectief geplaatst. Tenslotte worden in dit hoofdstuk suggesties voor verder onderzoek en potentiële klinische toepassingen van FAT/CD36 aan de orde gebracht.