

# Transcriptional control of cardiac fatty acid metabolism by PPARs

Citation for published version (APA):

Gilde, A. J. (2004). *Transcriptional control of cardiac fatty acid metabolism by PPARs*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Ponsen & Looijen B.V. <https://doi.org/10.26481/dis.20041001ag>

## Document status and date:

Published: 01/01/2004

## DOI:

[10.26481/dis.20041001ag](https://doi.org/10.26481/dis.20041001ag)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## SUMMARY

The heart provides itself and other organs in the body with oxygen-rich blood via the systemic circulation. Oxidizable nutrients reach the blood stream during post-prandial absorption from the small intestines or after release from adipocytes and liver. Like any other organ in the body also the cardiac muscle itself relies on an adequate supply of both oxygen and energy substrates to function properly. Roughly 65% of the energy generated by the heart originates from the oxidation of long-chain fatty acids (FA) and 30% from glucose. The capacity of the cardiac muscle cells to generate high-energy phosphates from FA oxidation is regulated at the transcriptional level by Peroxisome Proliferator- Activated Receptors (PPARs), members of the nuclear-hormone receptor family of transcription factors.

Chapter 2 reviews the role of PPARs in the regulation of gene expression in cardiac and skeletal muscle. The PPAR family consists of three isoforms, i.e., PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , and PPAR $\gamma$ . PPARs can be activated by several FA species ranging from saturated to polyunsaturated and branched FA. Furthermore, they can be activated by synthetic isoform specific ligands. Previously it was described that PPAR $\alpha$  regulates FA oxidation in oxidative tissues and PPAR $\gamma$  regulates the differentiation of adipocytes. A specific function for PPAR $\beta/\delta$  has not been described yet.

To investigate the genomic response of the heart *in vivo* to a rise in circulating FA levels, rats were subjected either to fasting, diabetes, or to high-fat diet (long-chain or medium-chain FA) or treated with the PPAR $\alpha$  ligand Wy-14,643 or the PPAR $\gamma$  ligand Rosiglitazone (Chapter 3). In fasted and diabetic, but not high-fat treated rats, a marked decrease in cardiac expression of genes involved in glucose metabolism was observed (GLUT4 and Hexokinase II). The fasting, diabetes and high-fat diet- induced rise in plasma FA was consistently associated with enhanced cardiac expression of PPAR-responsive genes. Administration of Wy-14,643 resulted in a dramatic increase in expression of FA handling genes in liver, but not in heart. Prolonged treatment with Rosiglitazone had limited effects on hepatic gene expression. Remarkably, the latter treatment resulted in a substantial reduction of the expression of PPAR-responsive genes in cardiac muscle. Collectively, these findings reveal a differential response of heart and liver to metabolic interventions, suggesting the involvement of both PPAR-dependent and

---

independent processes in the transcriptional control of cardiac as well as hepatic energy metabolism.

Previous experimental findings have suggested that the activity of one of the PPAR isoforms (PPAR $\alpha$ ) is attenuated in cardiac hypertrophy and failure, resulting in a shift away from FA to glucose utilization in the affected heart. Accordingly, Chapter 4 addresses the PPAR-mediated transcriptional regulation of FA handling genes under hypertrophic conditions *in vitro*. The hypertrophic stimuli phenylephrine and thyroid hormone affected neither the basal nor PPAR-mediated expression of a panel of lipid metabolising genes. At the promoter level phenylephrine and thyroid hormone attenuated the PPAR-mediated promoter activity of the human muscle-type carnitine palmitoyl transferase-I promoter (MCPT-1). Functionally, however, phenylephrine substantially increased the oxidation rate of palmitate in cardiomyocytes while glucose and pyruvate oxidation rates were unaltered. The collective data challenge the concept that cardiac hypertrophy is associated with a decline in PPAR $\alpha$  activity and, consequently, reduced expression of lipid metabolising genes and impaired FA oxidation rate.

To further elucidate the role of the three PPAR isoforms in cardiac FA metabolism, cardiomyocytes *in vitro* were treated with PPAR isoform specific ligands (Chapter 5). Consistent with the PPAR isoform expression pattern, the FA oxidation rate increased in cardiomyocytes exposed to PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  ligands, but not in response to PPAR $\gamma$  ligands. Likewise, the FA-mediated expression of FA-handling proteins was mimicked by PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$ , but not by PPAR $\gamma$  ligands. In embryonic rat heart-derived H9c2 cells, that only express PPAR $\beta/\delta$ , the FA-induced expression of genes was mimicked by the PPAR $\beta/\delta$  ligand only, underscoring the notion that the natural ligand, FA, also interact with the PPAR $\beta/\delta$  isoform. In cardiomyocytes addition of PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  ligands dose-dependently induced MCPT-1 promoter activity. In contrast, PPAR $\gamma$  ligands did not activate MCPT-1 promoter activity. Collectively, the present findings demonstrate that, next to PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  plays a prominent role in the regulation of cardiac lipid metabolism. PPAR $\gamma$ , however, does not play a part in this process. Further research into the role of PPAR $\beta/\delta$  in cardiac diseases and the therapeutic potential of PPAR $\beta/\delta$  ligands is warranted.

The co-existence of PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  in the cardiac muscle cell raises the question to what extent functional differences exist. In Chapter 6 the question was addressed whether the activation of these isoforms is regulated in a different manner. In both cardiomyocytes and HEK293 cells differences between PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  in MCPT-1 promoter activation were observed. Unlike PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  over-expression did not show ligand-independent (cryptic) trans-activation activity in cardiomyocytes. Activation of the endogenous PPAR hetero-dimer partner Retinoic X Receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) with its cognate ligand 9-cis-retinoic acid enhanced MCPT-1 promoter activity in both cell types. In addition, over-expression of RXR $\alpha$  both in the absence and presence of 9-cis-retinoic acid, enhanced promoter activity. However, in HEK293 cells, but not in cardiomyocytes, over-expression of RXR $\alpha$  decreased the exogenous PPAR $\alpha$ - and PPAR $\beta/\delta$ -mediated MCPT-1 promoter activation via an as yet unidentified mechanism. Over-expression of the transcriptional co-activator PPAR $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) resulted in MCPT-1 promoter activation in both cardiomyocytes and HEK293 cells. In summary, these studies reveal differences in PPAR $\alpha$ - and PPAR $\beta/\delta$ -mediated MCPT-1 promoter activation. In addition, cell-type specific mechanisms in MCPT-1 promoter activation were observed, suggesting functional differences in the regulatory role of these two PPAR isoforms.

Concluding this thesis, Chapter 7 discusses the models and techniques used with respect to the questions addressed as well as the role and function of PPAR in cardiac (patho)-physiology. Furthermore, future research topics are presented.



---

## SAMENVATTING

Het hart voorziet zowel zichzelf als andere organen in het lichaam van zuurstofrijk bloed via de systemische circulatie. Voedingstoffen worden direct na de maaltijd via de dunne darm in het bloed opgenomen of worden door het vetweefsel of de lever afgegeven aan het bloed. Net als elk ander orgaan is het hart afhankelijk van een continue aanvoer van zuurstof en voedingstoffen om in zijn energiebehoefte te voorzien. Onder normale omstandigheden is ongeveer 65% van de in het hart gegenereerde energie afkomstig van de oxidatie van langketenige vetzuren (VZ), terwijl ongeveer 30% afkomstig is uit glucose oxidatie. De cardiale capaciteit om VZ te oxideren wordt op transcriptie-niveau gereguleerd door Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). Deze PPARs zijn transcriptie factoren die deel uitmaken van de familie van nucleaire hormoon-receptoren.

In Hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de functie die PPARs vervullen in de regulatie van de expressie van genen in het hart en de skeletspier. De PPAR familie bestaat uit 3 leden, te weten PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  en PPAR $\gamma$ . Elk van hen kan door specifieke verbindingen (zgn. liganden) geactiveerd worden. Tot de natuurlijke liganden behoren ondermeer verzadigde en meervoudig onverzadigde VZ. Daarnaast kunnen PPARs door isovorm-specifieke synthetische liganden geactiveerd worden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat PPAR $\alpha$  de VZ oxidatieve capaciteit reguleert in weefsels met een hoog zuurstofverbruik (o.a de hartspier), terwijl PPAR $\gamma$  de differentiatie van vetcellen reguleert. Een specifieke functie voor PPAR $\beta/\delta$  is tot nu toe nog niet beschreven.

Om het effect van een verhoogd aanbod van VZ op genexpressie in het intacte hart te onderzoeken, werden ratten onderworpen aan een regime van vasten, gevoed met een hoog-vet dieet of diabetes gemaakt. Deze interventies leidden tot een stijging van de VZ concentratie in het bloed. Daarnaast werd het effect van de specifieke PPAR $\alpha$ -ligand Wy-14,643 en de specifieke PPAR $\gamma$ -ligand Rosiglitazone op de expressie van cardiale genen onderzocht (Hoofdstuk 3). In tegenstelling tot een hoog-vet dieet onderdrukten vasten en diabetes de expressie van GLUT4 en Hexokinase-II, genen die betrokken zijn bij de cellulaire opname en metabole omzetting van glucose. Daarentegen leidden alle drie de interventies tot een verhoogde expressie van PPAR-gereguleerde genen in het hart. Blootstelling aan Wy-14,643

---

resulteerde in een dramatische toename van mRNA expressie in de lever, maar niet in het hart. Langdurige toediening van Rosiglitazone had een relatief mild effect op de lever. Opmerkelijk genoeg leidde blootstelling aan dezelfde ligand tot een significante verlaging van de expressie van PPAR-gereguleerde genen in de hartspier. Samenvattend kan gesteld worden dat een interventie, die resulteert in een verhoogd aanbod van VZ aan het hart, leidt tot een tegengestelde respons van glucose (verlaging) en VZ metaboliserende genen (verhoging). Daarnaast laat de behandeling met synthetische PPAR liganden zien dat er zowel PPAR-afhankelijke als onafhankelijke mechanismen bijdragen aan de transcriptionele regulatie van de cardiale energiehuishouding.

Een aantal in de literatuur beschreven studies suggereren een afname in transcriptionele activiteit van PPAR $\alpha$  in het hypertrofe en falende hart, hetgeen geacht wordt te resulteren in een afname van de VZ oxidatie capaciteit en een verhoogd glucose gebruik. Om ons inzicht in dit proces te vergroten is in Hoofdstuk 4 de PPAR-afhankelijke transcriptie van VZ metaboliserende genen tijdens hypertrofie onderzocht in een *in vitro* model. De hypertrofe stimuli phenylephrine en schildklierhormoon bleken geen effect te hebben op de basale en PPAR-afhankelijke expressie van een scala van VZ metaboliserende genen. Op promoter niveau leidde de blootstelling van cardiomyocyten aan phenylephrine en schildklierhormoon tot een verlaging van de PPAR-afhankelijke activatie van het spier-type carnitine palmitoyl transferase-I promoter (MCPT-1). Werde echter naar de functie gekeken, dan bleek blootstelling aan phenylephrine tot een verhoogde VZ oxidatie snelheid te leiden, terwijl de oxidatie snelheid van zowel glucose als pyruvaat niet beïnvloed werd. Geconcludeerd kan worden dat deze studie het concept ter discussie stelt waarin een afgenomen expressie van VZ metaboliserende genen, welke leiden tot een afname van de VZ oxidatie capaciteit tijdens hypertrofie, het resultaat zou zijn van een verminderde PPAR $\alpha$  activiteit.

Om de betekenis van de drie PPAR isovormen voor de regulatie van het cardiale VZ metabolisme nader te onderzoeken, werden cardiomyocyten *in vitro* blootgesteld aan PPAR-isovorm specifieke, synthetische liganden (Hoofdstuk 5). Overeenkomstig aan het expressie patroon van de te onderscheiden PPAR isovormen in hartweefsel, resulteerde de blootstelling aan PPAR $\alpha$ - en PPAR $\beta/\delta$ -liganden in een verhoogde VZ oxidatie snelheid, terwijl PPAR $\gamma$ -liganden dit effect niet lieten zien. De VZ-geïnduceerde expressie van VZ-metaboliserende genen werd ook door PPAR $\alpha$ - en PPAR $\beta/\delta$ -liganden nagebootst, maar niet door PPAR $\gamma$ -

liganden. In H9c2 cellen, afkomstig van het embryonale rattenhart, komt alleen PPAR $\beta/\delta$  tot expressie. In dit cel-type was alleen een PPAR $\beta/\delta$ -ligand in staat de expressie van VZ-metaboliserende genen te activeren, hetgeen de hypothese onderbouwt dat VZ ook natuurlijke liganden zijn voor deze PPAR isovorm. In cardiomyocyten verhoogden PPAR $\alpha$ - en PPAR $\beta/\delta$ -liganden, maar niet PPAR $\gamma$ -liganden, de activiteit van de MCPT-1 promotor. Deze experimenten laten zien dat in de hartspier behalve PPAR $\alpha$  ook PPAR $\beta/\delta$  het VZ metabolisme reguleert. PPAR $\gamma$  lijkt niet betrokken te zijn bij dit proces. Verder onderzoek naar de rol van PPAR $\beta/\delta$  in het hart en de mogelijkheid om PPAR $\beta/\delta$ -liganden als therapeutisch middel bij cardiale aandoeningen aan te wenden is dringend gewenst.

Nu blijkt dat PPAR $\alpha$  en PPAR $\beta/\delta$  beide in de hartspier tot expressie komen, rijst de vraag wat de functionele betekenis van beide PPAR isovormen is in dit orgaan. In Hoofdstuk 6 wordt onderzocht wat de overeenkomsten en verschillen zijn in het reguleren van de promotor activiteit door deze twee PPAR isovormen. In zowel cardiomyocyten als humane niercellen (HEK293) werden verschillen tussen PPAR $\alpha$  en PPAR $\beta/\delta$  aangetoond met betrekking tot MCPT-1 promotor activatie. Anders dan bij PPAR $\alpha$ , leidde over-expressie van PPAR $\beta/\delta$  niet tot een ligand-onafhankelijke (kryptische) trans-activatie van de MCPT-1 promotor in de hartspiercel. Activatie van de endogene PPAR hetero-dimeer partner Retinoic X Receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) door haar specifieke ligand 9-cis-retinoic acid verhoogde de MCPT-1 promotor activiteit in zowel cardiomyocyten als HEK293 cellen. Daarnaast deed over-expressie van RXR $\alpha$  de promotor activiteit in zowel aan- als afwezigheid van 9-cis-retinoic acid toenemen. Echter, in HEK293 cellen werd de door exogeen PPAR $\alpha$  en PPAR $\beta/\delta$  gestimuleerde MCPT-1 promotor activiteit verlaagd door over-expressie van RXR $\alpha$ . Het mechanisme hierachter is nog onduidelijk. Deze remmende werking werd niet aangetroffen in cardiomyocyten. Over-expressie van de transcriptionele co-activator PPAR $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) resulteerde in MCPT-1 promotor activatie in zowel cardiomyocyten als HEK293 cellen. Samenvattend kan worden gesteld dat in een aantal opzichten verschillen bestaan tussen PPAR $\alpha$ - en PPAR $\beta/\delta$ -afhankelijke MCPT-1 promotor activatie. Daarnaast zijn cel-type gerelateerde verschillen aangetoond. Deze bevindingen suggereren in sterke mate dat er verschillen bestaan in de regulatie van de activiteit van PPAR $\alpha$  en PPAR $\beta/\delta$ .



---

Ter afsluiting van dit proefschrift worden in Hoofdstuk 7 de gebruikte modellen en technieken bediscussieerd, evenals de functie van de PPARs in het normale en zieke hart. Daarnaast worden suggesties gedaan voor interessant vervolgonderzoek.