

# Protein kinase D: at the crossroad of cardiac function and metabolism

## Citation for published version (APA):

Dirkx, E. (2012). *Protein kinase D: at the crossroad of cardiac function and metabolism*. BOXPRESS.

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## 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  
Samenvatting

## Summary

Changes in metabolism, contractility or morphology contribute to the development of cardiomyopathy and heart failure. These changes are the result of signals from the body to the heart, which then induce cellular signaling cascades. A signaling cascade is a succession of amplifying intracellular reactions, which starts with the activation of a membrane receptor, followed by activation of other proteins. Kinases are frequently part of signaling cascades, and forward the signal through phosphorylation of target proteins. Protein kinase D (PKD) is such a protein. In the beginning of this study, there were indications that PKD plays a role in signaling cascades involved in glucose uptake and the regulation of contraction, and of development of hypertrophy of heart muscle. However, the link and underlying mechanism(s) of these processes were barely known.

One of the diseases in which the link between metabolism, contractility and morphology is disturbed, is type 2 diabetes. In the diabetic heart, there is an increased uptake of fatty acids, which initially is a compensation for impaired glucose uptake (due to insulin resistance) to safeguard the availability of sufficient substrates for energy production. Ultimately this substrate switch leads to cardiac hypertrophy and dysfunction of heart muscle. An imbalance of cardiac substrate uptake (in this case a relatively high fatty acid uptake at the cost of glucose uptake) is known eventually to lead to heart failure. Based on this, it could be suggested that stimulation of glucose uptake would restore the substrate balance of the diabetic heart where after hypertrophy and heart failure will be restored. Thus, stimulation of (part of) a signaling cascade which specifically increases glucose uptake without inducing fatty acid uptake could be a useful therapy to prevent heart failure in diabetic patients. Previously, AMPK has been extensively studied in this context. Unfortunately, activation of AMPK stimulates the uptake of both glucose and fatty acids and, therefore, AMPK activation is not able to prevent diabetic cardiomyopathy. Preliminary data (using pharmacological agents) indicated that PKD is involved in the translocation of the membrane transporter GLUT4 to the plasma membrane, which is a necessary step to allow cellular glucose uptake. However, the effect of PKD activation on fatty acid uptake had not yet been investigated.

In this study, we started to investigate the role of PKD in cardiac substrate uptake by using cells in culture. In these cultured cells, PKD appeared to stimulate glucose uptake but not fatty acid uptake. By using isolated rat cardiomyocytes, we were able to map part of the pathway, which leads to activation of PKD and PKD-mediated glucose uptake. Specifically, we identified the binding of DAP-kinase to PKD upon contraction-inducing radical production. This binding leads to the activation of PKD, where after GLUT4 translocates to the plasma membrane to facilitate glucose uptake (**Chapter 3**). Additionally, we

showed that PKD and AMPK function in parallel pathways, but both lead to glucose uptake. Later on, we were able to validate these *in vitro* data in intact animals by using microPET imaging of hearts from transgenic mice overexpressing PKD in cardiac muscle (caPKD mice). From these *in vitro* and *in vivo* observations we thus could conclude that PKD is able to increase glucose uptake, without stimulating fatty acid uptake.

Does this suggest that PKD can restore the substrate balance in the diabetic heart? One of the features of the pre-diabetic heart is a decreased insulin sensitivity. Therefore, both PKD and – for comparison – AMPK were studied in cardiomyocytes exposed to culture media with elevated insulin or palmitate concentrations so as to make the cells less insulin sensitive. It was found that both PKD overexpression and AMPK overexpression prevented the decrease in insulin sensitivity. Additionally, it became clear (although this effect was not significant) that PKD overexpression, but not AMPK overexpression, could decrease the fat storage (induced by increased levels of palmitate in the culture medium) in cardiomyocytes (**chapter 6**). From these combined data we conclude that PKD overexpression, but not AMPK overexpression, prevents both excessive fat storage and decreased insulin sensitivity in a cell model of high-fat induced cardiac dysfunction.

Besides the metabolic aberrations, the diabetic heart also has to cope with a decreased contraction. It was previously published that PKD affects the contractility of heart muscle by phosphorylating sarcomeric proteins. However, it was unknown which proteins are phosphorylated and what the functional relevance is of these PKD-mediated phosphorylations. In **chapter 5**, we demonstrated that PKD is able to phosphorylate cMyBP-C. By using cMyBP-C knock-out mice, we showed that this protein is part of the contractile apparatus and upon phosphorylation strengthens the contraction. The latter effect is important especially during increased contraction-frequency, when the demand for energy is highest. This observation suggests that PKD act as a link between cardiac metabolism and contractility. In that case, PKD would operate as a mediator, which during increased activity of the heart strengthens both the contractility and the uptake of glucose so as to provide the contracting cells of sufficient fuel for energy production.

From literature it is known that an increased glucose uptake is associated with hypertrophy and heart failure. Assuming the hypothesis that a balanced substrate uptake is essential for normal heart function, hypertrophy associated with an increased glucose uptake might be counterbalanced and/or prevented by increasing fatty acid uptake. In **chapter 7** we demonstrated that this indeed is the case. CaPKD mice display hypertrophy associated with an increased glucose uptake, and these mice die at a young age (less than 6 months old). Moreover, by using wild-type mice on a high fat diet, we showed that also

increased fatty acid uptake is associated with hypertrophic remodeling. These wild type mice on a high fat diet developed decreased insulin sensitivity and displayed cardiac hypertrophy. In contrast, feeding caPKD mice a high fat diet restored cardiac substrate uptake (similar contributions from glucose and fatty acids) and insulin sensitivity. As a result, the hypertrophy of the caPKD mice was significantly less than caPKD mice on a low fat diet while they had a natural life span. Taken together, these data convincingly underscore that a balanced substrate uptake is crucial for the normal functioning of the heart.

Because caPKD mice displayed both increased cardiac glucose uptake and cardiac hypertrophy, it became plausible that PKD connects cardiac hypertrophy and metabolism. In **chapter 7**, we demonstrated that PKD induces activation of the transcription factor MEF2D. MEF2D is one of the most prominent transcription factors involved in the regulation of both the GLUT4 gene and a group of genes associated with hypertrophic remodeling.

The findings described in this thesis emphasize the importance of integral studies for the functioning of the heart. Signaling proteins, like kinases, appear able to function in or connect several pathways. Linking such pathways contributes to the overall picture of how these processes are controlled in a cardiomyocyte. This thesis shows the role of PKD in metabolism, contractility and cell growth, and how these processes could influence each other. In this way, PKD can stimulate the functional association of independent processes, however this seems to happen in concert with other factors (**chapter 8**). Thus, it is the integration and communication of several pathways, which is important. This especially points to multifactorial diseases like diabetic cardiomyopathy, by which defective functioning processes are often dependent on several signaling cascades. Therefore, scientists should try to broaden their view and to explore interdisciplinary borders in order to overlook the overall picture.

## Samenvatting

Veranderingen in zowel metabolisme, contractiliteit als morfologie dragen bij aan de ontwikkeling van cardiomyopathie en hartfalen. Deze veranderingen zijn het gevolg van signalen vanuit het lichaam die het hart bereiken en bepaalde signaleringscascades in gang zetten. Een signaleringscascade is een serie elkaar versterkende, intracellulaire reacties die start met de activering van een membraan receptor en vervolgens wordt doorgegeven aan intracellulaire eiwitten of eiwitcomplexen. Kinases zijn vaak onderdeel van zo'n signaleringscascade en geven het signaal door via fosforylering van andere eiwitten. Protein kinase D (PKD) is zulk een eiwit. Bij de aanvang van deze studie waren er aanwijzingen dat PKD een rol speelt in cascades betrokken bij de cellulaire glucose opname en de regulatie van contractiliteit en van hypertrofie van de hartspier. Echter, het verband en de mechanismen van deze processen waren nauwelijks gekend.

Eén van de ziektes waarbij het verband tussen deze processen van belang is, is type 2 diabetes. In het diabete hart is er een verhoogde opname van vetzuren waardoor er hypertrofie en dysfunctie van de hartspier ontstaat. Deze onevenwichtigheid in cardiale substraat opname (relatief veel vetzuren en relatief weinig glucose) zal uiteindelijk leiden tot hartfalen. Op basis hiervan zou men kunnen veronderstellen dat specifieke stimulatie van de glucose opname de substraat balans in het diabete hart weer in evenwicht kan brengen, waardoor hypertrofie en hartfalen tegengegaan danwel voorkomen kan worden. Indien we dus een (onderdeel van een) signaleringscascade zouden kunnen vinden die uitsluitend de glucose opname stimuleert zonder de vetzuur opname te bevorderen, zou dat kunnen leiden tot een nieuwe therapie voor diabete patiënten die lijden aan hartfalen.

Eerder is in deze context AMPK uitgebreid bestudeerd. Echter, AMPK activatie leidt tot zowel een verhoogde opname van glucose als van vetzuren, waardoor activatie van AMPK uiteindelijk niet in staat is de ontwikkeling van diabete cardiomyopathie tegen te gaan. In verkennende studies (met farmacologische stoffen) was gevonden dat PKD betrokken is bij de verplaatsing van de glucose transporter GLUT4 naar de plasmamembraan, nodig voor de opname van glucose. Echter, de effecten van PKD op de vetzuur opname waren niet bekend. Daarom hebben we eerst in gekweekte cellen uitgezocht wat de rol is van PKD bij de substraat opname. PKD bleek de glucose opname te stimuleren, maar niet de vetzuur opname. En passant brachten we een deel van de signaleringscascade in kaart die leidt tot activatie van PKD en een PKD-aangestuurde glucose opname. We ontdekten een binding van DAP-kinase aan PKD die het gevolg is van contractie-gegenereerde radicalen. Deze binding leidt tot de activatie van PKD, waardoor GLUT4 naar de plasmamembraan kan worden verplaatst om glucose op te nemen (**hoofdstuk 3**). Verder hebben we

gevonden dat PKD en AMPK parallel functioneren, maar wel allebei leiden tot glucose opname. Deze, in een cellijn, gemeten effecten van PKD op de cardiale substraat opname werden bevestigd in geïsoleerde hartspiercellen. Later bleken deze resultaten ook te kloppen toen gebruik kon worden gemaakt van *in vivo* microPET beeldvorming in harten van transgene muizen met een overmaat aan productie van PKD (caPKD muizen).

Eén van de kenmerken van het diabete hart is een verminderde insulinegevoeligheid. In een experimenteel model van hartspiercellen met een verminderde insulinegevoeligheid (verkregen door te cellen te kweken in een medium met een verhoogde hoeveelheid insulin of palmitaat) de werking van AMPK en PKD bestudeerd. Door gebruik te maken van dit model is gebleken dat zowel een overmaat aan PKD als van AMPK de vermindering in insulinegevoeligheid kan tegengaan. Ook werd duidelijk dat PKD overexpressie, maar niet AMPK overexpressie de vetstapeling in de hartspiercellen (geïnduceerd door een verhoogde dosis palmitaat in het medium) kan tegengaan (**hoofdstuk 6**).

Uit de bovenstaande gegevens concluderen we dat PKD de glucose opname stimuleert zonder de opname vetzuren te bevorderen. Naast de metabole afwijkingen heeft het diabete hart ook te maken met verminderde contractie. Van PKD was al bekend dat het effect zou hebben op de contractiliteit van de hartspier door fosforylatie van sarcomere eiwitten, maar het was onbekend welke sarcomere eiwitten door PKD worden gefosforyleerd en wat de functionele relevantie hiervan is. In **hoofdstuk 4** is gebruik gemaakt van cMyBP-C knock-out muizen, en laten we zien dat PKD in staat is om het eiwit cMyBP-C te fosforyleren. Dit eiwit maakt deel uit van het contractiele apparaat van de hartspier. Door deze fosforylatie neemt de kracht van de contractie toe en dit is van belang bij een verhoogde contractie-frequentie, wanneer de vraag naar energie steeds groter wordt. Dit doet ons veronderstellen dat PKD een verband legt tussen het cardiale metabolisme en contractiliteit. PKD dient dan als een mediator die bij grotere activiteit van het hart enerzijds de contractiliteit versterkt en anderzijds – door de glucose opname te stimuleren – ervoor zorgt dat de cel genoeg energie kan produceren.

Uit de literatuur is gebleken dat een overmaat aan glucose opname ook geassocieerd is met hypertrofie en hartfalen. Uitgaande van de stelling dat een evenwichtige substraatopname essentieel is voor het normaal functioneren van het hart, zou in het geval van hypertrofie geassocieerd met een verhoogde glucose opname, een verhoogde vetzuur opname deze hypertrofie kunnen tegengaan. In **hoofdstuk 7** tonen we aan dat dit inderdaad het geval is. caPKD muizen vertonen hypertrofie geassocieerd met een verhoogde glucose opname, en daardoor sterven deze dieren jong (levensverwachting minder dan een half jaar). Daarentegen ontwikkelen wild-type muizen op een hoge vet voeding een

verminderde insulinegevoeligheid en vertonen ze cardiale hypertrofie, maar hebben wel een redelijk normale levensverwachting. Wanneer caPKD muizen op een hoog vet voeding worden gezet bleek de insulinegevoeligheid en de morfologie van het hart niet afwijkend van de controlegroep. Door deze muizen een hoog vet voeding te geven wordt de cardiale substraatopname weer gebalanceerd (opname van vergelijkbare hoeveelheden glucose en vetzuren) en de hypertrofie significant verminderd. Dit ging samen met een normale levensverwachting. Dit alles wijst er op dat de substraatbalans van cruciaal belang is bij het goed functioneren van het hart.

Omdat caPKD muizen zowel een verhoogde cardiale glucose opname als hypertrofie vertonen, leek het ons aannemelijk dat PKD ook de cardiale hypertrofie en het metabolisme verbindt. In **hoofdstuk 7** tonen we aan dat PKD activatie van de transcriptiefactor MEF2D induceert. MEF2D is een van de belangrijkste transcriptiefactoren betrokken bij de regulatie van zowel het GLUT4 gen alsook van een grote groep genen betrokken bij hypertrofie. De experimentele hoofdstukken van dit proefschrift laten zien dat aansturing van cardiale contractie, metabolisme en hypertrofie voor een deel door PKD gebeurt. Om de rol van PKD in perspectief te plaatsen, laten we in **hoofdstuk 8** zien dat dit slechts een klein facet is van de regelsystemen die deze processen besturen.

De in de experimentele hoofdstukken beschreven bevindingen onderstrepen het belang van integrale studies naar het functioneren van het hart. Men kan dit benaderen door het gebruik van arrays maar ook door onderzoek naar het functioneren van een eiwit dat bij meerdere processen betrokken is. Signaaleiwitten zoals kinases blijken in verschillende signaalcascades te kunnen functioneren of deze te kunnen verbinden. Het samenvoegen van dergelijke cascades draagt bij tot het totaalbeeld van hoe de processen in een cardiomyocyt worden aangestuurd. De in dit proefschrift beschreven studies laten zien welke rol PKD speelt in zowel het metabolisme, de contractiliteit als in de celgroei en hoe deze processen elkaar kunnen beïnvloeden. Op deze manier kan PKD de functionele samenhang van onafhankelijke processen bevorderen, al blijkt dat in samenspraak met veel andere factoren te moeten gebeuren (**hoofdstuk 8**). De integratie en communicatie van verschillende signaalcascades blijkt dus van belang. Dit geldt zeker voor multifactoriele aandoeningen, zoals diabete cardiomyopathy, waar gebrekkig functionerende processen vaak afhankelijk zijn van meerdere signaleringscascades. In dit soort studies moeten wetenschappers proberen hun blik te verruimen en interdisciplinaire grenzen af te tasten om zo vat te krijgen op het geheel.



