

# Fatty acid-mediated gene expression in the cardiac muscle

## Citation for published version (APA):

van der Lee, K. A. J. M. (2001). *Fatty acid-mediated gene expression in the cardiac muscle*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2001

## 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

In order to maintain its function the heart is able to use a variety of energy-providing substrates, including fatty acids, glucose and lactate. For the healthy adult heart fatty acids are the chief source of energy. Under different physiological and pathophysiological conditions a shift in the utilisation of substrates occurs. During perinatal development, and in the adult during fasting and diabetes, the contribution of fatty acids to total cardiac energy production increases. In contrast, the utilisation of fatty acids by the heart decreases during cardiac hypertrophy and cardiac failure. A general introduction into myocardial substrate transport and metabolism is given in *chapter 1*. The activity of substrate-handling proteins can be regulated at short-term and long-term basis. Regulation at the long term, *i.e.* hours to days, includes the alterations of the rate of gene transcription and translation. Recently, it became apparent that fatty acids themselves are able to modulate the expression of certain metabolic genes in a number of cell types. In this thesis the effects of fatty acids on the expression of genes coding for proteins involved in substrate transport and metabolism in cardiac muscle cells is described.

Although the exact mechanism that mediates the fatty acid-induced changes in cardiac gene expression is incompletely understood, a major role has been proposed for the peroxisomal proliferator-activated receptors (PPARs). The potential role of these transcription factors in the regulation of cardiac gene expression is reviewed in *chapter 2*. Fatty acids are able to bind to and, consequently, activate PPARs. In addition, it has already been demonstrated that PPARs play a major role in the regulation of genes coding for proteins involved in whole-body and cellular lipid metabolism. Thus, PPARs may indeed mediate the fatty acid-induced changes in cardiac gene expression.

To determine whether fatty acids are able to modulate gene expression in heart muscle cells, primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were exposed to a combination of palmitic and oleic acid for 48 hours (*chapter 3*). This not only resulted in an increased intracellular accumulation of triacylglycerols but also in marked changes in metabolic gene expression. Whereas genes encoding proteins involved in fatty acid transport and metabolism were consistently upregulated, genes coding for proteins involved in glucose transport and metabolism were downregulated. The changes in gene expression were associated with a significant increase in the capacity of the neonatal cardiomyocytes to oxidise fatty acids. A first link with PPARs was also made. Three PPAR isoforms exist, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ . Here it is shown that a specific ligand for PPAR $\alpha$ , but not for PPAR $\gamma$ , is able to mimic the fatty acid-induced upregulation of genes coding for proteins involved in fatty acid metabolism.

The role of PPARs in cardiac muscle cells was examined in more detail in the study described in *chapter 4*. In this study not only neonatal rat cardiomyocytes were used but also embryonic rat heart-derived H9c2 cells. The latter cells are able to differentiate from myoblasts into multinucleated myotubes and for this reason, among

others, they not only resemble cardiac myocytes but also skeletal muscle cells. Compared to neonatal cardiomyocytes, H9c2 cells respond only modestly to fatty acids. Interestingly, determination of the PPAR isoform distribution at the mRNA level revealed that PPAR $\alpha$  could only be detected in neonatal cardiomyocytes and not in H9c2 cells. In contrast, PPAR $\beta/\delta$  was present in both cell types and PPAR $\gamma$  mRNA was neither in neonatal cardiomyocytes detectable nor in H9c2 cells. The differences in PPAR isoform distribution may explain the modest response of H9c2 cells to fatty acids. The effects of synthetic PPAR isoform specific ligands corroborated the PPAR distribution. Thus, a PPAR $\gamma$  agonist failed to modulate metabolic gene expression in neonatal cardiac myocytes and H9c2 cells, and a PPAR $\alpha$  agonist only increased the expression of fatty acid metabolic genes in neonatal cardiomyocytes. In H9c2 cells a PPAR $\beta/\delta$  agonist clearly mimicked the fatty acid-induced upregulation of genes. In contrast, the effects of the PPAR $\beta/\delta$ -specific ligand were only modest in neonatal cardiomyocytes when compared to the PPAR $\alpha$  ligand-induced changes. These findings point to redundant roles for PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  in cardiac metabolic gene expression.

So far, the effects of fatty acids on the expression of genes coding for proteins involved in glucose and fatty acid uptake and metabolic conversion were studied. The uncoupling protein UCP-2, able to uncouple oxidative phosphorylation by moving protons from the mitochondrial intermembrane space towards the mitochondrial matrix, has also been suggested to play a role in fatty acid metabolism. In the study presented in *chapter 5* the effects of fatty acids on the cardiac expression of this protein at the mRNA level have been examined. UCP-2 expression was found to be inducible by fatty acids *in vitro* in neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells. *In vivo*, cardiac expression of UCP-2 was increased in newborn rats in which fatty acid levels in the blood are increased following suckling. In contrast, UCP-2 mRNA levels did not alter in the adult rat heart under conditions in which cardiac fatty acid metabolism and/or circulating fatty acid levels are changed (fasting, diabetes, cardiac hypertrophy). At present no explanation can be given for this discrepancy. However, it is conceivable that in the adult heart either fatty acids already maximally induce UCP-2 expression or the sensitivity towards fatty acids has been lost.

The presented studies demonstrate that *in vitro* fatty acids are able to modulate gene expression in cardiac muscle cells, resulting in an altered fatty acid metabolism. In *chapter 6* fasting is used as an *in vivo* model to investigate the effects of fatty acids on the *in situ* rat heart. During fasting, fatty acid levels in the blood are elevated and this is accompanied with an increased utilisation of fatty acids by the heart. It was found that the expression of the majority of cardiac fatty acid metabolic genes and also of the gene coding for the uncoupling protein UCP-3 increased after 46 hours of fasting, whereas the expression of a set of genes coding for glucose-handling proteins declined. By treating the rats with the anti-lipolytic agent nicotinic acid for the final 8 hours of the fasting period, the circulating fatty acid levels were reduced. This did, however, not result in a reversion of the mRNA levels investigated, with exception of UCP3 mRNA. Although it could not be established that fatty acids per se are responsible for the changes in cardiac metabolic gene expression as induced during

fasting, the study demonstrates that the metabolic plasticity of the heart, *in vivo*, may have its origin in changes at the level of gene expression.

In the final chapter of this thesis, *chapter 7*, the major findings are discussed and suggestions for future research are given. The role of PPARs in fatty acid-mediated cardiac gene expression should be elaborated as well as other potential molecular mechanisms involved. Furthermore, it is of interest to examine whether genes other than those coding for metabolic proteins are regulated by fatty acids. Of special interest is the role that fatty acid-mediated gene expression may have in cardiac pathophysiology, an issue with pertinent clinical relevance.



# Samenvatting

Om zijn functie te kunnen waarborgen, is het hart in staat om gebruik te maken van een verscheidenheid aan energie leverende substraten, zoals vetzuren, glucose en melkzuur. Voor het gezonde, volwassen hart vormen vetzuren de belangrijkste energiebron. Tijdens verschillende fysiologische en pathofysiologische omstandigheden kan er echter een verandering optreden in het gebruik van de diverse substraten. Tijdens de perinatale ontwikkeling, en, in de adult, tijdens vasten en diabetes neemt de bijdrage van vetzuren aan de totale cardiale energieproductie toe. Daarentegen neemt het vetzuurverbruik door het hart af tijdens cardiale hypertrofie en hartfalen. Een algemene introductie in het transport en metabolisme van substraten in de hartspiercel is gegeven in *hoofdstuk 1*. De activiteit van de vele eiwitten die hierbij betrokken zijn kan zowel op de korte als op de lange termijn worden gereguleerd. Regulatie op de lange termijn (uren tot dagen) houdt onder ander in dat er veranderingen plaats kunnen vinden in de snelheid van gentranscriptie en translatie. Recent is duidelijk geworden dat vetzuren zelf in staat zijn om de transcriptie van bepaalde metabole genen in verschillende celtypen te moduleren. In dit proefschrift zijn de effecten van vetzuren op de expressie van genen die coderen voor eiwitten betrokken bij het substraattransport en -metabolisme in hartspiercellen beschreven.

Het exacte mechanisme dat de door vetzuren geïnduceerde veranderingen in cardiale genexpressie medieert is nog niet helemaal begrepen. Wel is er gesuggereerd dat de peroxisoom proliferator geactiveerde receptoren (PPARs) hierbij een belangrijke rol spelen. Vetzuren zijn in staat om een interactie aan te gaan met deze transcriptiefactoren en ze daardoor te activeren. Daarnaast is aangetoond dat PPARs betrokken zijn bij de regulatie van genen die coderen voor eiwitten die nodig zijn voor het systemische en intracellulaire vetmetabolisme. Het lijkt er dus op dat PPARs inderdaad de door vetzuren geïnduceerde veranderingen in de cardiale genexpressie kunnen mediëren. De mogelijke functie van deze transcriptiefactoren in het hart is uitgebreid besproken in *hoofdstuk 2*.

Om te testen of vetzuren in staat zijn de genexpressie in hartspiercellen te moduleren, zijn primaire kweken van neonatale rattenhartspiercellen 48 uur lang blootgesteld aan een combinatie van palmitine- en oliezuur (*hoofdstuk 3*). Deze blootstelling resulteerde niet alleen in een accumulatie van triglyceriden, maar ook in een duidelijke veranderingen in de mRNA gehalten van metabole eiwitten. De expressie van genen die coderen voor eiwitten betrokken bij het transport en metabolisme van vetzuren nam consequent toe. Daarentegen nam de expressie van genen coderende voor eiwitten betrokken bij het transport en metabolisme van glucose af. Deze veranderingen in genexpressie bleken geassocieerd te zijn met een significante toename in de capaciteit van de neonatale cardiomyocyten om vetzuren te oxideren. In de in hoofdstuk 3 gepresenteerde studie werd ook een eerste verband gelegd met PPARs. Er bestaan drie PPAR isovormen: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  en PPAR $\gamma$ . Hier is aangetoond dat een specifieke ligand voor PPAR $\alpha$ , maar niet voor PPAR $\gamma$ , in staat is

om de door vetzuren geïnduceerde toename van de expressie van genen die coderen voor eiwitten betrokken bij het vetzuurmetabolisme na te bootsen.

De rol van PPARs in hartspiercellen is vervolgens nader onderzocht (*hoofdstuk 4*). Hiertoe zijn niet alleen neonatale rattencardiomyocyten gebruikt, maar ook de H9c2 cellijn, die afkomstig zijn van een embryonaal rattenhart. H9c2 cellen zijn in staat om te differentiëren van myoblasten naar meerkernige, zogenaamde myotubes. Onder meer om deze reden vertonen ze niet alleen overeenkomsten met hartspiercellen, maar ook met skeletspiercellen. Vergeleken met neonatale cardiomyocyten, reageren de H9c2 cellen slechts minimaal op vetzuren. Interessant is, dat uit de bepaling van de PPAR isovorm distributie op mRNA niveau bleek, dat PPAR $\alpha$  alleen in de neonatale cardiomyocyten aanwezig was en niet in H9c2 cellen. Dit in tegenstelling tot PPAR $\beta/\delta$ , die in beide celtypen gedetecteerd kon worden, en PPAR $\gamma$ , die helemaal niet detecteerbaar was in de neonatale hartspiercellen of H9c2 cellen. De verschillen in distributie van de PPAR isovormen zouden de minimale respons van de H9c2 cellen op vetzuren kunnen verklaren. De effecten van synthetische liganden, die specifiek binden aan één PPAR isovorm, bevestigen de PPAR distributie nog eens. Een PPAR $\gamma$  agonist bleek aldus niet in staat te zijn om de metabole genexpressie in neonatale hartspiercellen en in H9c2 cellen te veranderen, terwijl een PPAR $\alpha$  agonist alleen in neonatale cardiomyocyten de expressie van vetzuur-metabole genen verhoogde. In H9c2 cellen bootste een PPAR $\beta/\delta$  agonist de door vetzuren veroorzaakte toename in genexpressie duidelijk na. Daarentegen had de PPAR $\beta/\delta$ -specifieke ligand, vergeleken met de PPAR $\alpha$ -specifieke ligand, slechts een gering effect in neonatale cardiomyocyten. Deze bevindingen wijzen erop dat PPAR $\alpha$  en PPAR $\beta/\delta$  elkaars rol in de cardiale metabole genexpressie kunnen opvangen.

Tot zo ver zijn de effecten van vetzuren onderzocht op genen die coderen voor eiwitten die iets te maken hebben met de opname en het metabolisme van glucose en vetzuren. Het ontkoppelingseiwit ("uncoupling protein") UCP-2 is in staat om ATP synthase te ontkoppelen van de ademhalingsketen, door protonen uit de intermembraanruimte door te sluizen naar de mitochondriële matrix. Er is gesuggereerd dat de tot nu toe onbekende functie van UCP-2 op enigerlei wijze te maken heeft met het vetzuurmetabolisme. In de studie die beschreven is in *hoofdstuk 5*, zijn de effecten van vetzuren op de cardiale expressie van dit eiwit op mRNA niveau onderzocht. De UCP-2 expressie bleek door vetzuren induceerbaar te zijn in gekweekte neonatale rattencardiomyocyten en in H9c2 cellen. Ook bleek de cardiale expressie van UCP-2 *in vivo* toe te nemen in pasgeboren ratten, waarbij direct na het zogen de vetzuurspiegels in het bloed stijgen. Het gehalte aan UCP-2 mRNA veranderde echter niet in het adulte rattenhart onder condities waarbij het cardiale vetzuurmetabolisme en/of de circulerende vetzuurspiegels veranderd zijn (vasten, diabetes, cardiale hypertrofie). Tot nu toe is nog geen verklaring voor gevonden voor deze verschillen. Wel is het denkbaar, dat normale bloedconcentraties van vetzuren de expressie van UCP-2 al maximaal induceren in het adulte hart of dat het adulte hart niet meer gevoelig is voor vetzuren.

Bovenstaande studies tonen aan dat vetzuren *in vitro* in staat zijn om de expressie van genen die coderen voor eiwitten, waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij

vetzuurtransport of -metabolisme, te moduleren in hartspiercellen. Om de effecten van vetzuren op het intacte rattenhart te bestuderen, werden ratten 46 uur lang gevast (*hoofdstuk 6*). Tijdens zo'n periode van vasten zijn de vetzuurspiegels in het bloed verhoogd en neemt het verbruik van vetzuren door het hart toe. De expressie van de meerderheid van de cardiale vetzuur-metabole genen en ook van het gen coderend voor het ontkoppelingseiwit UCP-3 bleek na het vasten te zijn toegenomen, terwijl de expressie van de onderzochte glucose-metabole genen afnam. Door de ratten gedurende de laatste acht uur van de vastenperiode te behandelen met het anti-lipolytische agens nicotinezuur, daalden de vetzuurspiegels weer. Dit zorgde er echter niet voor dat de veranderde mRNA gehalten terugkeerden naar hun normaalwaarden, met uitzondering van het UCP3 mRNA. Hoewel niet kon worden vastgesteld dat vetzuren zelf verantwoordelijk zijn voor de veranderingen in de expressie van cardiale genen tijdens vasten, toont deze studie wel aan, dat de metabole plasticiteit van het *in vivo* hart zijn oorsprong al kan hebben op het niveau van genexpressie.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, *hoofdstuk 7*, zijn de belangrijkste bevindingen bediscussieerd en zijn suggesties gegeven voor toekomstig onderzoek. De rol van PPARs in de vetzuur-gemedieerde genexpressie in het hart zou nader onderzocht moeten worden evenals mogelijke andere mechanismen die hierbij betrokken kunnen zijn. Verder is het interessant om te onderzoeken welke genen, die niet coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij het metabolisme, gereguleerd kunnen worden door vetzuren. Van bijzonder belang is de rol die vetzuur-gemedieerde genexpressie zou kunnen hebben in de cardiale pathofysiologie, een onderwerp met een klinische betekenis.

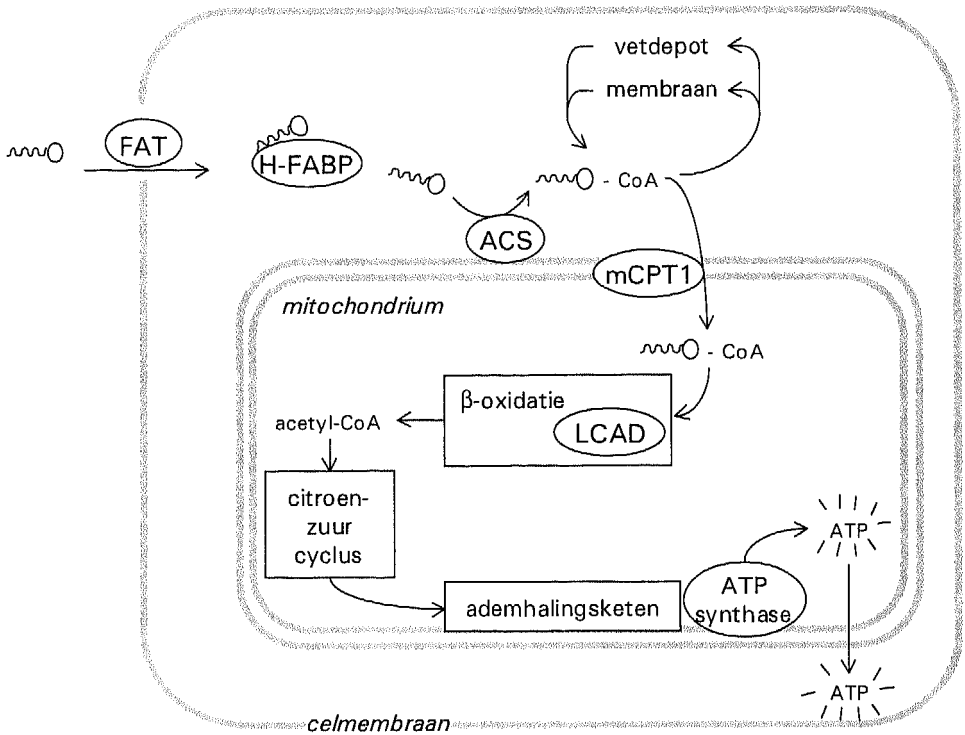




## Samenvatting voor niet-vakgenoten

Het hart kan gezien worden als een pomp. Doordat het hart ritmisch samentrekt, zorgt het ervoor dat alle organen in het lichaam van bloed worden voorzien. Om deze activiteit te kunnen waarborgen is het hart afhankelijk van een continue toevoer van zuurstof en voedingsstoffen. Deze stoffen worden aangeleverd via de kransslagaderen. Het hart kan verschillende soorten voedingsstoffen, ook wel substraten genoemd, gebruiken om er energie uit te winnen. Onder normale omstandigheden gebruikt het hart voornamelijk glucose en vetzuren als substraat. De bijdrage van vetzuren aan de energieproductie door het hart is zelfs bijna 70%. Dit aandeel kan echter onder bepaalde omstandigheden veranderen. Zo is het hart van een ongebooren mens of dier voor het grootste deel van glucose afhankelijk en neemt het vetzuurverbruik na de geboorte toe. Tijdens een periode van vasten en bij diabetici neemt het aandeel van vetzuren in de energieproductie door het hart nog verder toe tot ruim boven de 70%. In het geval van een vergrote hartspier (cardiale hypertrofie) en van hartfalen neemt het gebruik van vetzuren daarentegen af en dat van glucose toe.

Om energie te kunnen winnen uit de diverse substraten, bezitten de spiercellen in het hart een scala aan eiwitten. Deze eiwitten zijn nodig om substraten te transporteren (transporteiwitten) of om te zetten (metabole eiwitten ofwel enzymen). In de figuur op de volgende pagina staat de route die vetzuren in de cel volgen schematisch weergegeven samen met de belangrijkste eiwitten die erbij betrokken zijn. Vetzuren bestaan uit een waterafstotende keten van koolstofatomen met aan het eind een waterminnende kop. Ze kunnen de hartspiercel passief binnenkomen of met behulp van een transporteiwit, zoals het vetzuur translocase (FAT), dat zich in het membraan van de hartspiercel bevindt. In de cel vindt het transport van vetzuren plaats door het hart-type vetzuurbindende eiwit (H-FABP). Om te kunnen worden omgezet, moet een vetzuur eerst worden geactiveerd. Dit gebeurt door het enzym acyl-CoA synthetase (ACS), dat de kop van het vetzuur bindt aan co-enzym A (CoA). Na activatie kan het vetzuur verschillende kanten opgaan. Zo kan het in het vetdepot van de cel worden ingebouwd of in het membraan van de cel terechtkomen. Voor de productie van energie wordt het geactiveerde vetzuur echter stapsgewijs afgebroken. Dit gebeurt in de mitochondria, de energiefabriekjes van de cel. Geactiveerde vetzuren kunnen de mitochondria binnenkomen via een ingenieus shuttle mechanisme, waar het spier-type carnitine palmitoyl transferase 1 (mCPT1) bij betrokken is. In het mitochondrium wordt het geactiveerde vetzuur ingekort in een proces dat  $\beta$ -oxidatie heet. De eerste stap hiervan wordt verzorgd door het enzym langketenig acyl-CoA dehydrogenase (LCAD). Aan het eind van de  $\beta$ -oxidatie ontstaat acetyl-CoA (een verbinding tussen azijnzuur en CoA), dat de citroenzuurcyclus binnengaat. In deze cyclus worden de waterstofatomen van het azijnzuur verwijderd. Deze waterstofatomen worden via de ademhalingsketen aan zuurstof gekoppeld, waarbij water als eindproduct ontstaat. De energie die hierbij vrijkomt, wordt door



Schematische voorstelling van transport en afbraak van vetzuren in de hartspiercel. FAT, vetzuur translocase; H-FABP, hart-type vetzuurbindend eiwit; ACS, acyl-CoA synthetase; mCPT1, spier-type carnitine palmitoyl transferase 1; LCAD, langketenig acyl-CoA dehydrogenase; CoA, co-enzym A.

het enzym ATP synthase geïnvesteerd in de vorming van ATP, een energierijke fosfaatverbinding.

De snelheid waarmee substraten worden verbruikt is afhankelijk van de activiteit van de enzymen die het substraat omzetten. Deze activiteit kan op verschillende manieren gereguleerd worden. Zo is de aanwezigheid van een bepaald substraat een stimulans voor de bijbehorende enzymen om het substraat om te zetten. Een grote hoeveelheid van het product dat ontstaat uit zo'n enzymatische reactie kan de activiteit van het enzym daarentegen juist remmen. De activiteit van een enzym kan ook veranderd worden door de structuur van het enzym te veranderen. Deze mechanismen hebben allemaal op de korte termijn een effect. Op de lange termijn (uren tot dagen) kan echter ook de hoeveelheid enzym aangepast worden. Dit kan door de snelheid van vertaling van mRNA in eiwit te veranderen, maar ook door het aflezen van een gen te beïnvloeden (zie kader voor toelichting).

Van verschillende hormonen, zoals insuline en het schildklierhormoon, is bekend dat ze de transcriptie kunnen reguleren van genen die coderen voor eiwitten betrokken bij de afbraak van vetzuren. Recent is gebleken dat niet alleen hormonen, maar ook vetzuren zelf de expressie van deze genen kunnen reguleren in levercellen,

vetcellen en skeletspiercellen. Er zijn zelfs transcriptiefactoren ontdekt waar vetzuren aan kunnen binden. Deze transcriptiefactoren worden peroxisome proliferator geactiveerde receptoren (PPARs) genoemd. Na binding van een vetzuur, wordt een PPAR geactiveerd. Een geactiveerd PPAR kan in de niet-coderende regio van een gen een bepaald gebied herkennen en er een interactie mee aangaan. Dat gebied is bestempeld als een peroxisome proliferator responsief element (PPRE). Door deze interactie kan de transcriptie van het betreffende gen gestimuleerd worden, waardoor er meer mRNA wordt gevormd. Vetzuren zouden de expressie van genen dus via PPAR kunnen reguleren.

In dit proefschrift zijn een aantal studies gepresenteerd die betrekking hebben op bovenstaande gegevens. Het eerste hoofdstuk is een uitgebreide inleiding, waarin de hypothesen staan die voorafgaand aan het onderzoek werden geformuleerd. De belangrijkste daarvan zijn de volgende:

1. Vetzuren verhogen de expressie van genen die coderen voor eiwitten betrokken bij het transport en de afbraak van vetzuren in gekweekte hartspiercellen;
2. PPARs zijn betrokken bij de door vetzuren geïnduceerde veranderingen in mRNA gehalten in hartspiercellen;
3. Vetzuren kunnen de hoeveelheid mRNA van UCP-2, een eiwit met een nog onbekende functie, in het hart verhogen;
4. Wanneer de vetzuurspiegels in het bloed stijgen, resulteert dit in een toename in de genexpressie van vetzuurtransporterende en -afbrekende eiwitten in het hart.

De studies die beschreven zijn in hoofdstuk 3 t/m 6 zijn opgezet om bovenstaande hypothesen te toetsen. In hoofdstuk 2 wordt dieper ingegaan op de theorie van de vetzuur-gereguleerde genexpressie in het hart. Het legt de nadruk op de rol die PPARs hierbij kunnen spelen.

Om te testen of vetzuren ook in hartspiercellen de expressie van genen kunnen beïnvloeden, is gebruik gemaakt van hartspiercellen van pasgeboren ratten (hoofdstuk 3). Deze cellen kunnen namelijk relatief eenvoudig gekweekt worden in een laboratoriumschaaltje. Voor dit onderzoek zijn ze blootgesteld aan verschillende substraten: glucose, vetzuren of een combinatie van glucose en vetzuren. De mRNA gehalten van een aantal eiwitten die betrokken zijn bij het transport (FAT, H-FABP) en de afbraak (ACS, LCAD) van vetzuren bleken inderdaad hoger te zijn in de hartspiercellen die waren blootgesteld aan vetzuren, dan in de cellen die alleen aan glucose waren blootgesteld. Met deze bevinding kan de eerste hypothese dus bevestigd worden.

Vervolgens is het mechanisme, dat achter de door vetzuren veroorzaakte veranderingen in genexpressie zou kunnen zitten, onderzocht. De resultaten hiervan staan beschreven in hoofdstuk 4. Zoals gezegd bestaan er transcriptiefactoren waaraan vetzuren kunnen binden, de PPARs. Er zijn drie PPAR subtypen bekend: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  en PPAR $\gamma$ . Alleen PPAR $\alpha$  en PPAR $\beta/\delta$  blijken aanwezig te zijn in hartspiercellen. Blootstelling van de gekweekte rattenhartspiercellen aan chemische stoffen, die specifiek aan één van de drie PPAR subtypen kunnen binden, bevestigt dit. Een stof die alleen kan binden aan PPAR $\gamma$  had namelijk geen effect op de expressie van de onderzochte genen. Daarentegen verhoogden de PPAR $\alpha$ - en PPAR $\beta/\delta$ -specifieke stoffen, net zoals vetzuren, de mRNA gehalten van ACS en LCAD

in de hartspiercellen. Deze resultaten geven aan dat PPARs daadwerkelijk betrokken zouden kunnen zijn bij de door vetzuren geïnduceerde veranderingen in genexpressie.

UCP-2 (*uncoupling protein-2* ofwel *ontkoppelingseiwit-2*) is een eiwit met een tot nu toe nog onbekende functie in de hartspiercel. Wel is bekend dat dit eiwit ATP synthase ont koppelt van de ademhalingsketen, waardoor er minder ATP geproduceerd kan worden. Er is geopperd dat UCP-2 een rol zou kunnen spelen bij de omzetting van vetzuren. Daarom is in de in hoofdstuk 5 beschreven studie gekeken of vetzuren ook het mRNA gehalte van dit eiwit kunnen verhogen. In gekweekte rattenhartspiercellen bleek dit inderdaad het geval te zijn. In het rattenhart zelf bleek de hoeveelheid UCP-2 mRNA toe te nemen na de geboorte. Dit zou kunnen worden veroorzaakt door een stijging van de vetzuurspiegels in het bloed van de dieren, zodra ze moedermelk gaan drinken. Een verandering van de vetzuurspiegels in een volwassen rat, resulteerde echter niet in een verandering in de expressie van UCP-2. Met deze bevindingen kan de derde hypothese daarom slechts gedeeltelijk bevestigd worden.

De effecten van vetzuren op de expressie van genen die coderen voor eiwitten, waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij vetzuurtransport of -afbraak, zijn alleen nog bestudeerd in gekweekte hartspiercellen. Het is de vraag of vetzuren ook een effect hebben op de genexpressie in het hart van een levend dier. Tijdens vasten stijgen de vetzuurspiegels in het bloed van een dier. Ook neemt dan de afbraak van vetzuren in het hart toe. In hoofdstuk 6 is te zien dat de mRNA gehaltes van FAT, H-FABP, mCPT1 en LCAD eveneens toenemen in het rattenhart na twee dagen vasten. Door de dieren gedurende de laatste acht uur van de vastenperiode te behandelen met de stof nicotinezuur, dalen de vetzuurspiegels weer. Dit resulteert echter niet in een daling van de mRNA gehaltes naar hun oorspronkelijke waarden. In deze studie kan daarom niet worden vastgesteld dat vetzuren zelf verantwoordelijk zijn voor de veranderingen in de expressie van genen in het hart. Wel is bewezen, dat de toename in de afbraak van vetzuren in het hart tijdens vasten zijn oorsprong al kan hebben op het niveau van genexpressie.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, hoofdstuk 7, zijn de voornaamste bevindingen nog eens bediscussieerd. Tevens zijn hierin een aantal suggesties gegeven voor eventuele vervolgstudies. Zo zou de rol die PPARs spelen in de vetzuur-gemedieerde genexpressie in het hart nader onderzocht moeten worden. Ook is de mogelijkheid nog niet uitgesloten dat andere mechanismen dan PPARs bij de vetzuur-gemedieerde genexpressie betrokken zijn. Verder zou het interessant zijn om de rol die vetzuren zouden kunnen hebben in het ontstaan van ziekten als hartfalen nader te onderzoeken.

Tot slot de belangrijkste conclusie uit dit proefschrift: vetzuren zijn in staat om hun eigen afbraak in hartspiercellen al op een zeer basaal niveau te reguleren, namelijk op het niveau van genexpressie.

## Van DNA naar eiwit

In de kern van een hartspiercel van de mens bevinden zich 23 paar chromosomen. Elk chromosoom is opgebouwd uit twee strengen DNA die als een spiraal om elkaar heen zijn gedraaid. Op zo'n chromosoom bevinden zich vele genen. In totaal zijn dit er bij de mens 30 000 tot 40 000. Een gen bevat de code (genetische informatie) voor de vorming van één of meer eiwitten. Zo zijn er genen die coderen voor de transporteiwitten en enzymen die in dit proefschrift ter sprake komen. Een gen is op een bepaalde manier opgebouwd. De basis hiervan is het gedeelte dat codeert voor het eiwit, de zogenaamde coderende regio.

Om eiwit te kunnen vormen, wordt de coderende regio van een gen eerst overgeschreven van DNA in RNA, een proces dat transcriptie wordt genoemd. RNA draagt dezelfde code als het DNA, maar is mobieler en daardoor makkelijker verplaatsbaar naar de plek waar het eiwit wordt geproduceerd. Alvorens dit precursor-RNA verplaatst wordt, wordt het eerst nog bewerkt. Het bewerkte RNA wordt boodschapper RNA (*messenger RNA*; mRNA) genoemd. Het mRNA draagt de gecodeerde boodschap over aan een machinerie, die de code uiteindelijk vertaalt ("transleert") in eiwit.

Het resterende deel van een gen, de niet-coderende regio, is betrokken bij de regulatie van de transcriptie. Hierin bevinden zich allerlei gebieden die herkend worden door specifieke transcriptiefactoren. Deze transcriptiefactoren kunnen aan de gebieden binden en er vervolgens voor zorgen dat de vorming van RNA wordt gestimuleerd of geremd. Op deze manier kunnen ze de expressie van genen beïnvloeden.

