

Aspects of fatty acid handling in the diabetic rat heart

Citation for published version (APA):

Hasselbaink, D. M. (2003). *Aspects of fatty acid handling in the diabetic rat heart*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030613dh>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20030613dh](https://doi.org/10.26481/dis.20030613dh)

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

In the heart the main supply of energy is the oxidation of long-chain fatty acids (FA), which contributes for up to 60% of the cardiac energy need under normal physiological conditions. Besides FA, the heart is capable to use substrates such as lactate, pyruvate, ketone bodies and glucose to fulfil its energy requirements.

During several pathophysiological states, such as diabetes, the relative contribution of the substrates the heart can utilize for energy conversion is altered. The current paradigm concerning diabetes mellitus, a condition characterized primarily by lack of insulin or insulin action, states that during diabetes the contribution of FA to the total cardiac energy need are increased at the expense of glucose utilization.

The research described in this thesis is based on two separate but intertwined paths of investigation. The first path is aimed at gaining insight in the process of protein acylation, which means the covalent attachment of FA derivatives to intracellular proteins. The second research line of this thesis is to elucidate various aspects of FA handling in the diabetic heart, such as the extent of FA oxidation and esterification in this organ. The two paths converge in investigations of alterations in cardiac FA handling under diabetic conditions and the impact thereof on protein acylation.

In the present thesis a multitude of approaches is used which may not only lead to new insights in the role of protein acylation in the diabetic heart but also to knowledge challenging the current paradigm concerning cardiac FA utilization in diabetic conditions.

Chapter 1 contains the introduction to the thesis. The role of FA in maintaining energy homeostasis is briefly discussed, with special reference to other roles of FA besides serving as energy substrate. This includes the transport of FA in combination with the various sites of action to which FA can be channelled. Furthermore, attention is paid to the incorporation of FA into various lipid pools such as phospholipids (PL) and triacylglycerols (TG), as well as the covalent attachment of FA derivatives to proteins. Finally, the research aims of this thesis are described in this chapter.

Chapter 2 gives an extensive overview in the critical steps concerning the handling and utilization of blood-borne FA up until the entering into mitochondria where the FA is oxidized for the formation of ATP. In addition, to gain more insight in the role of protein acylation, the two forms of protein acylation are described in detail. The processes underlying S-acylation and

myristoylation and the consequences of these modifications are discussed. It illustrates the potential role of protein acylation as a mean to influence, for instance, signal transduction pathways and enzyme activity.

In *chapter 3* the use of capillary gas chromatography in cardiac research is described. This method is a sensitive and reliable analytical technique which can provide information on the total amount of FA and the relative fatty acyl composition of FA and the esterified lipid pools, TG and PL, in cardiac tissue and blood plasma. It was found that in blood plasma of diabetic rats both total amounts of FA and PL are doubled, while the TG content was 5.4 fold increased. The total quantities of FA, TG and PL showed a different pattern in cardiac tissue, with a 4.8 fold increase of FA, a 2 fold increase of TG, while the PL pool remained stable. Furthermore, this chapter revealed significant differences in lipid profiles in cardiac tissue as well as blood plasma between control and diabetic rats, supporting earlier observations that in addition to carbohydrate handling, lipid metabolism is also affected during diabetes.

In *chapter 4* the development of a model system is described which was used to study the features of S-acylation and myristoylation in more detail. For this purpose the H9c2 cell line, originating from embryonic rat heart tissue, was used. The distribution and the incorporation of radioactive labelled palmitate and myristate into the various intracellular pools, such as lipids and proteins, were monitored. The outcome of this study showed that more than 99% of the labelled FA taken up by the cell was present in the combined lipid pools, while 0.3 percent of less became covalently attached to proteins. In addition, the effect of increased availability of FA on the amount of acylated proteins as well as the pattern of covalently modified proteins was investigated. It was observed that the rate of protein acylation increased when the amount of extracellular FA was enhanced. Applying autoradiography to visualize radioactively labelled proteins demonstrated that the increased amount of exogenous palmitate commonly led to a decreased visibility of most protein bands, with the most striking exception of a 22 kDa protein band of a yet unknown protein. Furthermore, two known inhibitors of protein acylation, cerulenin and tunicamycin, were used to explore whether this protein modification could be inhibited in the present experimental setting. Both cerulenin and tunicamycin were able to inhibit protein acylation in the H9c2 cells and the mechanism achieving this is most likely different between the two inhibitors.

Chapter 5 indicates that capillary gas chromatography can also be used to determine the absolute amount and the relative composition of the fatty acyl chains which are covalently bound to proteins in cardiac tissue derived

from control and diabetic rats. This study showed that there are major differences between S-acylation and myristoylation in response to diabetes. Although the substrate required for both processes, *i.e.* FA, is increased, only the amount of S-acylated proteins was significantly enhanced while the amount of myristoylated proteins remained equal to that in control cardiac tissue. Furthermore, this chapter illustrates that ketone bodies, a substrate which can be oxidized by the heart and the plasma concentration of which is increased under diabetic circumstances, are capable to significantly elevate S-acylation of proteins in cardiac myocytes derived from diabetic rats. This suggests that the presence of ketone bodies in the diabetic animal is a possible explanation for the significantly increased amount of S-acylated proteins in diabetic cardiac tissue.

In *chapter 6* the effect of ketone bodies on several aspects of cardiac fatty acid handling was investigated. To this end, isolated cardiac myocytes derived from control and diabetic rats were used in a variety of experimental conditions mimicking as much as possible the *in situ* circumstances in control and diabetic animals. It was shown that the ketone bodies, acetoacetate (AcAc) and 3- β -hydroxybutyrate (3HB), were not able to influence initial uptake rate either in control or diabetic cardiomyocytes. However, experiments studying FA oxidation showed that AcAc significantly inhibited FA oxidation in both control and diabetic cardiomyocytes, whereas 3HB did not exert any influence on FA oxidation. In addition, diabetic cardiomyocytes incubated under diabetic conditions showed that exposure to AcAc was responsible for an increase in unmetabolized FA inside the cells. Taken together, these findings indicate that ketone bodies are playing an important role in compromising cardiac FA handling under diabetic conditions.

Chapter 7 deals with an explorative study which concerns the metabolic and genetic changes occurring in the heart of a diabetic rat. At the metabolic level, alterations in substrate and co-factor content were measured. An increase in both blood plasma as well as cardiac tissue of almost all substrates was observed, while at the intracellular co-factor level the free carnitine, total carnitine as well as the free CoA pool showed a significant decline. Furthermore, the activity of enzymes playing a key role in cardiac energy conversion was determined, with as most striking results a decline in the pyruvate dehydrogenase activity which is most likely a consequence of the enhanced activity of pyruvate dehydrogenase kinase. At the genetic level, mRNA of proteins and enzymes involved in cardiac glucose and FA utilization was determined, with special attention to uncoupling protein 3. A 4-fold increase in mRNA content of UCP3 associated with a 16-fold increase of this

member of the uncoupling protein family at the protein level was observed. In addition, the effect of ketone bodies on the mRNA levels on a number of metabolic genes was examined. Finally, the effect of FA and/or ketone bodies, either AcAc or 3HB, on the activity of carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT1) was measured with the use of transfected neonatal cardiomyocytes. It was found that 3HB was able to suppress promoter activity of CPT1 in contrast to AcAc, thereby elucidating another level of regulation and complexity of cardiac gene expression. Taken together, this chapter illustrates that the heart adapts in a multiple fashion to the altered circumstances to which it is exposed during diabetes mellitus.

The final chapter of this thesis, *chapter 8*, discusses the major findings and gives suggestions for future research. The impact of the disturbed FA handling on a variety of features, such as signal transduction and lipotoxicity, as seen in diabetes are discussed. The present findings suggest that measures aiming to stimulate cardiac FA oxidation rather than to inhibit cardiac FA utilization should be considered as novel therapeutic interventions to mitigate the lipotoxic effects of FA accumulation in the diabetic heart.

Samenvatting

De voornaamste bron van energie in het hart is de oxidatie van lang-ketenige vetzuren, welke onder fysiologische omstandigheden voor ongeveer 60% bijdragen aan de energie behoefte van het hart. Om in de energie behoefte te voorzien is het hart, naast vetzuren, ook in staat om andere substraten, zoals lactaat, pyruvaat, ketonlichamen en glucose te oxideren.

Verschillende pathofysiologische omstandigheden, zoals diabetes, veroorzaken een verschuiving in de relatieve bijdrage van de diverse substraten aan de energie omzetting in het hart. Het huidige paradigma stelt dat gedurende diabetes mellitus, een ziektebeeld dat gekarakteriseerd wordt door een gebrek aan insuline of de werking van insuline, de bijdrage van vetzuren aan de totale energie behoefte van het hart is verhoogd ten koste van glucose.

Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift is gebaseerd op twee verschillende maar in elkaar verweven onderzoeklijnen. Het eerste deel van het proefschrift is gericht op het verkrijgen van inzicht in het proces van eiwit-acylering, een proces dat gekenmerkt wordt door een covalente binding van vetzuurderivaten aan intracellulaire eiwitten. Het tweede deel van dit proefschrift belicht de verschillende aspecten van vetzuurgebruik, onder andere vetzuuroxidatie en -esterificatie in het diabete hart. Beide aspecten worden verenigd in onderzoek naar de veranderingen in vetzuurgebruik en de impact daarvan op het eiwit acyleringsproces onder diabete omstandigheden.

In dit proefschrift zijn diverse benaderingen gebruikt die niet alleen tot nieuwe inzichten leiden in de mogelijke betekenis van eiwit-acylering in het diabete hart, maar ook vraagtekens plaatsen bij het huidige paradigma betreffende het vetzuurgebruik in het diabete hart.

Hoofdstuk 1 bevat de inleiding van dit proefschrift. De rol van vetzuren in het handhaven van de lipidenhomeostase wordt kort besproken, met speciale aandacht voor andere aspecten van vetzuren dan alleen het dienen als energie-leverend substraat. Dit betreft het transport van vetzuren in combinatie met de verschillende plaatsen waar vetzuren hun biologische werking kunnen uitoefenen. Verder is aandacht besteed aan de inbouw van vetzuren in diverse intracellulaire lipiden zoals fosfolipiden (PL) en triacylglycerolen (TG), alsmede de covalente binding van vetzuurderivaten aan eiwitten. Tot slot wordt in dit hoofdstuk het onderzoeksdoel van dit proefschrift besproken.

Hoofdstuk 2 geeft een uitgebreid overzicht van belangrijke stappen in het gebruik van vetzuren die afkomstig zijn uit bloedplasma tot en met de opname in mitochondria waar vetzuren geoxideerd worden voor de vorming van ATP. Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van eiwit-acylering worden de twee verschillende vormen van acylering in detail besproken. De processen die ten grondslag liggen aan S-acylering en myristoylering en de consequenties van deze eiwitmodificatie worden toegelicht. Dit dient ter illustratie van de potentiële rol van eiwit-acylering als middel om bijvoorbeeld signaaltransductie-ketens te beïnvloeden.

In *hoofdstuk 3* wordt beschreven hoe met behulp van capillaire gas chromatografie vetzuren bepaald kunnen worden. Dit is een gevoelige en betrouwbare analytische methode die informatie kan verschaffen over de totale hoeveelheid vetzuren en de relatieve samenstelling van vetzuren en veresterde lipiden, TG en PL, in hartweefsel en in bloedplasma. In bloedplasma van diabete ratten is gevonden dat de totale hoeveelheid van vetzuren en PL verdubbeld is, terwijl de hoeveelheid TG ongeveer 5 maal verhoogd is. De totale hoeveelheden van vetzuren, TG en PL in hart weefsel laten een verschillend patroon zien: een 4.8-voudige verhoging van vetzuren, een 2.0-voudige verhoging van TG, terwijl de hoeveelheid fosfolipiden niet veranderde. Tevens laat dit hoofdstuk significante verschillen in de vetzuur profielen zien in hartweefsel alsmede bloedplasma tussen controle en diabete ratten. Dit resultaat ondersteunt eerdere bevindingen dat naast het koolhydraatmetabolisme, ook het vetzuurmetabolisme is aangedaan onder diabete omstandigheden.

In *hoofdstuk 4* wordt de ontwikkeling van een modelsysteem beschreven dat gebruikt is om de eigenschappen van S-acylering en myristoylering in detail te bestuderen. Voor dit doel is de H9c2 cellijn gebruikt, welke afkomstig is van embryonaal rattenhartweefsel. De distributie en de uiteindelijke inbouw van radioactief gelabeld palmitine zuur en myristine zuur in de verschillende weefsel fracties, zoals lipiden en eiwitten, zijn bepaald. De resultaten van deze studie laten zien dat meer dan 99% van de hoeveelheid opgenomen radioactief gemerkte vetzuren aanwezig zijn in de verschillende lipiden fracties, terwijl 0.3% of minder covalent gebonden worden aan eiwitten. Tevens werd het effect van het verhogen van de beschikbare hoeveelheid vetzuur op de hoeveelheid geacyleerde eiwitten als ook het patroon van de covalent-gemodificeerde eiwitten onderzocht. Het bleek dat de snelheid van eiwit-acylering toegenomen is bij een verhoogd extracellulair vetzuuraanbod. De toepassing van autoradiografie om de radioactief gemerkte eiwitten zichtbaar te maken toonde aan dat een verhoging van het vetzuur aanbod leidt tot een afname van de meerderheid

van de zichtbare eiwit-banden. Een uitzondering hierop vormt een 22 kDa band van een tot nu toe onbekend eiwit. Tevens werden twee inhibitoren van eiwit-acylering, namelijk cerulenine en tunicamycine, toegepast in dit experimentele model. Zowel cerulenine als tunicamycine waren in staat om eiwitacylering tot op zeker hoogte te remmen in de H9c2 cellijn. Tevens bleek dat het mechanisme waarmee eiwit-acylering geremd werd verschillend was tussen deze twee inhibitoren.

Hoofdstuk 5 laat zien dat capillaire gaschromatografie ook gebruikt kan worden om de absolute hoeveelheid en de relatieve samenstelling van de vetzuurketens die covalent gebonden zijn aan eiwitten te bepalen. Deze studie toonde aan dat er grote verschillen bestaan tussen S-acylering en myristoylering van eiwitten tussen diabete en controle harten. Ondanks het feit dat het substraat dat voor beide processen nodig is onder diabete omstandigheden is verhoogd, is alleen de hoeveelheid S-geacyleerde eiwitten significant toegenomen, terwijl de hoeveelheid gemyristoyleerde eiwitten niet toeneemt. Verder laat dit hoofdstuk zien dat keton-lichamen, een substraat dat verhoogd in bloedplasma aanwezig is en geoxideerd kan worden door de hartspier, in staat zijn om de mate van S-acylering van eiwitten significant te doen toenemen in hartspiercellen verkregen uit diabete ratten. Dit suggereert dat de toegenomen aanwezigheid van keton-lichamen in het diabete dier een mogelijke verklaring is voor de significant verhoogde aanwezigheid van S-geacyleerde eiwitten in diabete hart weefsel.

In *hoofdstuk 6* is de rol van keton-lichamen op diverse aspecten van vetzuurgebruik onderzocht. Hiervoor zijn geïsoleerde cardiomyocyten van controle en diabete ratten geïncubeerd onder experimentele condities die de *in situ* situatie zoveel mogelijk nabootsten. Hieruit bleek dat de keton-lichamen, acetoacetaat (AcAc) en 3- β -hydroxybutyraat (3HB), niet in staat waren om de initiële opname van vetzuren in controle en diabete cardiomyocyten te beïnvloeden. Experimenten met betrekking tot vetzuuroxidatie laten echter zien dat AcAc in staat is om de vetzuuroxidatie significant te remmen in controle alsmede diabete hartspiercellen, terwijl 3HB hiertoe niet in staat bleek te zijn. Daarbij komt dat diabete hartspiercellen geïncubeerd onder diabete omstandigheden lieten zien dat blootstelling aan AcAc verantwoordelijk is voor een toename van niet omgezet vetzuur in de cellen. Samenvattend, deze bevindingen tonen aan dat keton-lichamen een belangrijke rol spelen in de veranderde vetzuurhuishouding in het hart onder diabete omstandigheden.

Hoofdstuk 7 beschrijft een verkennende studie betreffende de metabole en genetische veranderingen die optreden in het hart van de diabete rat. Op het metabole niveau zijn de veranderingen in de hoeveelheden substraat en

co-factoren gemeten. In zowel bloedplasma als hartweefsel waren bijna alle substraat niveau's verhoogd, terwijl het intracellulaire cofactor gehalte van vrij carnitine, totaal carnitine en de vrij CoA een significante afname liet zien. Bovendien werd de activiteit bepaald van enzymen die een sleutelrol spelen bij de energieomzetting in het hart, met als meest opvallende resultaat een afname in de pyruvaat dehydrogenase activiteit, waarschijnlijk als gevolg van de toegenomen activiteit van het pyruvaat dehydrogenase kinase. Op genetisch niveau werden de hoeveelheden mRNA bepaald van eiwitten en enzymen die betrokken zijn bij glucose- en vetzuurgebruik in het hart, met speciale aandacht voor uncoupling protein 3. Een 4-voudige toename in het mRNA gehalte van dit eiwit ging gepaard met een 16-voudige toename op eiwitniveau. Voorts werd het effect van keton-lichamen op de hoeveelheden mRNA van een aantal metabole genen bestudeerd. Tenslotte werd de invloed van vetzuren en/of keton-lichamen (hetzij AcAc of 3HB) op de activiteit van carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT1) gemeten door gebruik te maken van getransfecteerde neonatale cardiomyocyten. In tegenstelling tot AcAc bleek 3HB wel in staat om de CPT1 promoteractiviteit te onderdrukken, hetgeen de complexiteit van de regulatie van de expressie van metabole genen in het hart benadrukt. Samengevat illustreert dit hoofdstuk dat de hartspier zich op velerlei manieren aanpast aan de gewijzigde omstandigheden zoals die zich voordoen bij diabetes mellitus.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, *hoofdstuk 8*, worden de belangrijkste bevindingen bediscussieerd en suggesties aangereikt voor toekomstig onderzoek. De mogelijke consequenties van het verstoorde vetzuurgebruik in het diabete hart voor processen zoals signaaltransductie en lipotoxiciteit, zoals aangetroffen bij diabetes, worden besproken. De huidige bevindingen suggereren dat ingrijpen met als doel het stimuleren van de vetzuroxidatie in het hart in plaats van het remmen ervan beschouwd dient te worden als een potentiële therapeutische interventie om de lipotoxische effecten van vetzuurophoping in het diabete hart te verminderen.