

CD36: a target to restore cardiac function in type 2 diabetes

Citation for published version (APA):

Steinbusch, L. K. M. (2011). *CD36: a target to restore cardiac function in type 2 diabetes*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2011

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

The heart consists of several types of cells of which cardiomyocytes are the cells that are responsible for the contractile activity of the heart. Cardiomyocytes utilize long-chain fatty acids and glucose as main substrates for energy generation. Under normal conditions there is a finely tuned balance between the utilization of these substrates, with long-chain fatty acids providing 60 – 70 % of needed energy. Moreover, a healthy heart is flexible regarding its substrate utilization and is able to temporarily switch to one or another substrate. During cardiac pathology a dysbalance in substrate utilization develops and cardiomyocytes are no longer able to rapidly switch between glucose and fatty acid utilization (loss of flexibility). For example, during ischemia or hypertension the heart relies almost exclusively on glucose. In contrast, substrate metabolism shifts towards fatty acid utilization in case of obesity or diabetes (**Chapter 1**).

Glucose and fatty acid uptake into cardiomyocytes is regulated by insulin, as well as increased cardiac work. Concomitantly, each of these stimuli induces translocation of glucose transporter 4 (GLUT4) and fatty acid transporter (CD36) translocation from intracellular stores to the cell membrane (sarcolemma) (**Chapter 1**). This suggests that similar mechanisms regulate GLUT4 and CD36 translocation. However, it is known that cardiomyocytes isolated from insulin-resistant rats initially show increased sarcolemmal presence of CD36 and take up more fatty acids, without any alteration in GLUT4 localization and in glucose uptake. When the insulin resistance progresses, GLUT4 resides more intracellularly and insulin-stimulated GLUT4 translocation and glucose uptake are reduced, ultimately leading to cardiac dysfunction. As a result, there must be mechanisms that distinguish between the recruitment of GLUT4 and CD36.

In view of the above observations, it was hypothesized that the increased sarcolemmal presence of CD36 contributes to the development of diabetes-related cardiac dysfunction. In this thesis, this hypothesis was tested in an *in vitro* and an *in vivo* study. Firstly, we set up an *in vitro* model in which cellular exposure to a high concentration of insulin, or palmitate, elicited the increased sarcolemmal presence of CD36 (**Chapter 4**). Secondly, we evaluated the involvement of CD36 in the development of cardiac dysfunction in mice on a Western type diet (**Chapter 6**). Furthermore, it was hypothesized that interference with the trafficking of CD36 in the diabetic heart normalizes myocardial lipid metabolism and improves insulin sensitivity, ultimately resulting in amelioration of cardiac dysfunction. To test this last hypothesis we evaluated the involvement of subcellular structures in the trafficking of GLUT4 and CD36 in insulin-sensitive and insulin-resistant cardiomyocytes (**Chapters**

2, 3 and 7). In addition, it was tested if we could bypass defective insulin signaling via contraction mediated signaling and, by doing so; prevent the deleterious increase in basal fatty acid uptake (**Chapter 5**).

We performed a pharmacological study to assess the involvement of specific subcellular structures in GLUT4 and/or CD36 trafficking (**Chapter 3**). We disclosed that GLUT4 and CD36 translocation are regulated differentially on the level of actin reorganization and regulation of endosomal pH (**Chapter 3**). This differential regulation suggests that aberrant functioning of trafficking components may be at the basis of the altered translocation of either GLUT4 or CD36 as occurs in the heart of obese Zucker rats or of rats exposed to a high-fat diet. In addition, in studies with a cardiomyocyte cell line and primary cardiomyocytes it was found that endosomal pH regulation was disturbed in cardiomyocyte cultures for lipid-induced insulin resistance (**Chapter 7**). Hence, the protein complex involved in endosomal pH regulation (v-type ATPase) differently affects glucose and fatty acid uptake (Chapter 3) and its functioning is disturbed in lipid-induced insulin resistance (**Chapter 7**). Together these results suggest that normalization of v-type ATPase functioning would improve cardiomyocyte insulin sensitivity and function. **Chapter 7** provides some suggestions to disclose how v-type ATPase could be involved in the mechanism of GLUT4 and CD36 translocation and glucose and fatty acid uptake in cardiomyocytes.

An *in vitro* model was developed to study the effect of novel treatment targets on the development of insulin resistance and contractile dysfunction (**Chapters 4 and 5**). For this purpose, adult rat cardiomyocytes were cultured for 48 hours in media containing a high concentration of insulin or of palmitate. It was observed that each medium induces the following maladaptive changes: enhanced sarcolemmal CD36, increase in basal palmitate uptake, excessive lipid accumulation, reduced insulin sensitivity and contractile dysfunction. Hence, our model shows the same maladaptive changes as seen *in vivo*, i.e. in hearts from insulin resistant rats, thus making this model particularly suited for experimental studies.

To test the hypothesis that an increased sarcolemmal presence of CD36 contributes to the development of diabetes-related cardiac dysfunction, we compared the ability of several CD36 ligands to block CD36-mediated fatty acid uptake and used this knowledge in the *in vitro* model described above (**Chapter 4**). The anti-CD36 monoclonal antibody clone 63 inhibited fatty acid uptake into rat cardiomyocytes. In addition, presence of anti-CD36 monoclonal antibody clone 63 prevented reduction of insulin-sensitivity, lipid accumulation and contractile dysfunction in cardiomyocytes exposed to a medium containing a high concentration of insulin or of palmitate. Thus, pharmacological CD36 inhibition may be considered a treatment

strategy to prevent lipid-induced cardiomyocyte dysfunction.

Furthermore, it was tested if bypassing defective insulin signaling via contraction-mediated signaling could prevent the loss of insulin-stimulated glucose uptake and increased CD36-mediated basal palmitate uptake in the in-vitro model described above (**Chapter 5**). Candidates in the contraction signaling pathway are AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase D (PKD) because each of these kinases mediates contraction-mediated glucose uptake into cardiomyocytes. Adenoviral overexpression of each of these kinases in the above described in-vitro model prevented loss of insulin-stimulated glucose uptake. However, each acted through different mechanisms: AMPK prevented loss of insulin signaling, and PKD prevented lipid accumulation. Further research should focus on development of specific PKD activators, and should reveal by which mechanisms these kinases perform their preventive action, in order to evaluate the suitability of these kinases as treatment targets.

Most cardiac patients both have diabetes and hypertension, whereas most animal research towards cardiometabolic disease study these pathological processes separately. We aimed to study the interaction of these two cardiac stresses and wanted to obtain proof of principle for the role of CD36 in the development of cardiac dysfunction in cardiometabolic stress (**Chapter 6**). Metabolic stress alone, e.g. Western-type diet or ablation of CD36, did not affect cardiac function. However, the metabolic stress in combination with mechanophysical stress (by pressure overload) resulted in greater cardiac hypertrophy and dysfunction than when no metabolic stress was present. Moreover, ablation of CD36 prevented lipid accumulation upon exposure to a Western-type diet and thus prevented the development of cardiac dysfunction in these mice. These results suggest that metabolic and mechanophysical stresses interact and aggravate the development of cardiac hypertrophy and dysfunction. The preventive action of anti-CD36 monoclonal antibody clone 63 in cardiomyocyte cultured under insulin-resistance inducing conditions (**Chapter 4**), or ablation of CD36 in mice exposed to a Western-type diet (**Chapter 6**), may not only be ascribed to inhibition of CD36-mediated fatty acid uptake. CD36 has many other functions, amongst others it is involved in intracellular signaling (**Chapter 7**). Further research should reveal the importance of the different functions of CD36 in cardiac metabolism and function and to what extent manipulation of CD36 presence or activity is an effective tool to prevent or regress cardiometabolic diseases.

In this thesis selected promising new targets for the development of new cardiometabolic treatment have been evaluated and tested in *in vitro* and *in vivo* models for insulin resistance. Hopefully these new treatments can aid people in the process of life-style changes preventing and treating cardiometabolic disease.

Samenvatting

Het hart bestaat uit verschillende soorten cellen maar het zijn de hartspiercellen die verantwoordelijk zijn voor het samentrekken van het hart. Hartspiercellen gebruiken vetten/vetzuren (60-70%), maar ook suikers/glucose (30-40%), voor de productie van energie. Daarnaast kunnen deze cellen onder normale omstandigheden makkelijk, kortdurend, overschakelen op één van deze brandstoffen. Tijdens chronische stress, zoals zuurstoftekort of hoge bloeddruk, geeft het hart de voorkeur aan opname van glucose als brandstof. Andere stressfactoren, bijvoorbeeld overgewicht of type 2 diabetes, zorgen er juist voor dat hartspiercellen meer vetzuren gaan gebruiken om energie te produceren. Daarnaast zijn hartspiercellen in het gestressede hart niet meer goed in staat om tussen glucose- of vetzuurgebruik te wisselen (**Hoofdstuk 1 en 2**).

In gezonde hartspiercellen wordt het brandstofgebruik gereguleerd door insuline en door samentrekking van het hart. Beide stimuli verhogen de aanwezigheid van de glucose transporter 4 (GLUT4) en de vetzuurtransporter CD36 in het celmembraan en daarmee de glucose- en vetzuuropname in de hartspiercellen. Dit suggereert dat gelijkaardige mechanismen van invloed zijn op GLUT4 en CD36 verplaatsing in de hartspiercel. Onderzoek naar de onderliggende moleculaire veranderingen tijdens cardiale stress heeft echter aangetoond dat GLUT4 en CD36 translocatie, en glucose en vetzuuropname, bij insuline resistentie verschillend beïnvloed zijn. Hartspiercellen van insuline resistente ratten bleken in de eerste stadia van insuline resistentie meer CD36 in het celmembraan te huisvesten en meer vetzuren op te nemen dan hartspiercellen van controle ratten, terwijl glucose opname dan nog niet is aangetast. In een later stadium veranderde ook de subcellulaire GLUT4 lokalizatie. In tegenstelling tot CD36 verschoof GLUT4 naar meer intracellulair vanwege defecten in de insuline gemedieerde GLUT4 translocatie, uiteindelijk resulterend in verlaagde hartfunctie (**Hoofdstuk 1 en 2**).

Deze resultaten brachten ons tot de hypothese dat de chronische aanwezigheid van CD36 op het celmembraan bijdraagt aan de ontwikkeling van diabetes gerelateerde hartproblemen. Daarnaast suggereert dit dat de beïnvloeding van de verplaatsing van CD36 in de hartspiercel de ontwikkeling van cardiale insuline resistentie en hartdysfunctie zou kunnen voorkomen. In dit promotieproject zijn deze twee hypothesen bestudeerd in celsystemen en in diermodellen voor type 2 diabetes.

Om te kunnen intervenieren in een verstoorde CD36 translocatie in zieke cellen hebben we eerst de CD36 verplaatsing bestudeerd in gezonde hartspiercellen. Verschillende farmacologische hulpmiddelen zijn gebruikt om te achterhalen welke

cellulaire processen en eiwitten betrokken zijn bij de verplaatsing van GLUT4 en CD36 in hartspiercellen van de rat (**Hoofdstuk 3**). Het bleek dat actine filamenten en de proton pomp (v-type ATPase), welke betrokken is bij regulatie van endosomale pH, verschillende functies hebben binnen GLUT4 en CD36 translocatie. De verschillende functies van de v-type ATPase leken erg op de veranderingen die in hartspiercellen van diabete ratten geobserveerd waren. Wij hebben de bestaande kennis omtrent subcellulaire processen betrokken bij GLUT4 en CD36 translocatie samengebracht in een review artikel (**Hoofdstuk 3**). Bovendien hebben wij gevonden dat endosomale pH regulatie verstoord was in celsystemen voor insuline resistentie (**Hoofdstuk 7**). De v-type ATPase is verschillend betrokken bij glucose en vetzuuropname en in insuline resistente cellen vertoont het een verstoord functioneren. Dit suggereert dat normalisering van het functioneren van de v-type ATPase tot gevolg zou kunnen hebben dat de insuline sensitiviteit en het functioneren van de cardiomyocyte verbetert. **Hoofdstuk 7** geeft enkele suggesties hoe v-type ATPase precies betrokken zou kunnen zijn bij GLUT4 en CD36 translocatie en hoe dit onderzocht zou kunnen worden.

Een ander onderdeel van dit promotieproject was gericht op het opzetten van een hartspiercelsysteem om daarin vervolgens de effectiviteit van nieuwe medicinale doeleiwitten te kunnen bestuderen. Wij hebben hartspiercellen van volwassen ratten twee dagen gekweekt in media die een hoge concentratie insuline of vetzuren bevatten. Deze media zorgden voor maladaptieve veranderingen zoals permanente verplaatsing van CD36 naar het celmembran, een verhoogde vetstapeling, verlaagde insuline gevoeligheid en verslechterde samentrekking van de hartspiercellen (**Hoofdstuk 4 en 5**). Deze veranderingen zijn gelijk aan de veranderingen die optreden in hartspiercellen wat dit model geschikt maakt voor experimentele studies.

De hypothese dat de chronische aanwezigheid van CD36 op het celmembran bijdraagt aan de ontwikkeling van diabetes gerelateerde hartproblemen werd getest in het hierboven beschreven celsysteem (**Hoofdstuk 4**). Eerst werden verscheidene anti-CD36 peptiden en antilichamen getest op hun vermogen om de vetzuuropname te remmen. Vervolgens werd getoond dat het bij uitstek geschikte anti-CD36 antilichaam (kloon 63) de ontwikkeling van vetstapeling, insuline resistentie en hartspierceldysfunctie kon voorkomen in het eerder beschreven celsysteem. CD36 inhibitie lijkt zodoende een zinvol doeleiwit om lipide geïnduceerde hartspiercel dysfunctie te voorkomen.

Daarnaast is ook getest of een verstoorde insuline signalering in insuline resistente cellen voorkómen kan worden door activatie van de processen betrokken bij samentrekken van hartspiercellen (**Hoofdstuk 5**). Kandidaateiwitten

in het contractieproces zijn AMP-geactiveerde proteïne kinase (AMPK) en proteïne kinase D (PKD) omdat beide nodig zijn voor de stimulatie van glucose opname in hartspiercellen. Adenovirale overexpressie van AMPK of van PKD in het eerder beschreven celsysteem voorkwam verlies van insuline-gemedieerde glucose opname. AMPK overexpressie voorkwam verlies van insuline signalering, en PKD overexpressie voorkwam vetstapeling. Dus, AMPK en PKD beschermen tegen verlies van insuline-gemedieerde glucose opname in gekweekte hartspiercellen onder insuline-resistentie inducerende condities, maar zij doen dit via verschillende mechanismen. Verder onderzoek zou zich kunnen richten op de ontwikkeling van specifieke PKD activators en zou kunnen focussen op de specifieke werkingsmechanismen van deze kinases.

Vele hartpatiënten hebben naast diabetes ook een hoge bloeddruk. In de meeste moleculaire studies worden deze processen apart bestudeerd terwijl juist de interactie tussen beide pathologiën van invloed kan zijn op de uitkomst voor de patient. Ons doel was om de interactie tussen de twee onderliggende stressoren te bestuderen in een muismodel, en om de rol van CD36 in deze pathologie aan te tonen (**Hoofdstuk 6**). Metabole stress, bijvoorbeeld een Westerse voeding of afwezigheid van CD36, had geen effect op het functioneren van het hart. De metabole stress werd zichtbaar nadat bloeddruk overbelasting werd geïnduceerd middels vernauwen van de aorta. Gezamenlijk leidden metabole stress en bloeddruk overbelasting tot een sterkere hypertrofie van het hart en tot hartdysfunctie. Bovendien voorkwam afwezigheid van CD36 vetstapeling in het hart wanneer de muizen een Westers dieet kregen. Op die manier werd hartdysfunctie voorkomen in deze muizen. De preventieve werking van anti-CD36 kloon 63 in gekweekte hartspiercellen onder insuline-resistentie inducerende condities (**Hoofdstuk 4**), of afwezigheid van CD36 in muizen blootgesteld aan een Westers dieet (**Hoofdstuk 6**), kon niet alleen maar toegeschreven worden aan vermindering van de vetzuuropname. CD36 heeft vele andere functies, waaronder ook intracellulaire signalering (**Hoofdstuk 7**). Verder onderzoek moet aantonen wat de rol is van deze verschillende functies van CD36 in het metabolisme en het functioneren van het hart.

In dit proefschrift zijn veelbelovende nieuwe doeleiwitten voor de ontwikkeling van nieuwe hartmetabole behandelingen bestudeerd en getest in *in vitro* en *in vivo* modellen voor insuline resistentie. Hopelijk helpen deze nieuwe inzichten mensen in het proces van leefstijlverandering die ook nodig zijn voor het voorkomen en het behandelen van hartmetabole ziektes.