

v-ATPase is a key player in lipid-induced cardiomyopathy

Citation for published version (APA):

Liu, Y. (2016). v-ATPase is a key player in lipid-induced cardiomyopathy. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2016

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

CD36 is the predominant membrane fatty acid transporter in the heart and a main contributor to the regulation of cardiac fatty acid uptake and metabolism. The basis of this regulation is that upon specific stimuli, such as increased contraction or hormones (e.g., insulin), CD36 translocates from intracellular storage compartments to the sarcolemma to increase fatty acid uptake. However, during overexposure of the heart to lipids (e.g., diet with a high fat content) CD36 preferentially locates to the sarcolemma, thereby stimulating myocardial fatty acid uptake and utilization, initiating a vicious cycle of excess intracellular lipid storage, lipid-induced insulin resistance and ultimately cardiac contractile dysfunction. As a result, CD36 is a key player in lipid-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction, which subsequently leads to type 2 diabetes and diabetic cardiomyopathy.

It has been generally accepted that CD36-mediated fatty acid uptake is a primary contributor to myocellular lipid accumulation that causes insulin resistance, which in turn leads to contractile dysfunction. Although several key mediators, in particular lipid metabolites, have been proposed to contribute downstream of CD36 to the onset of insulin resistance which then results in contractile dysfunction, some observations have indicated that lipids themselves can directly induce contractile dysfunction (reviewed in **Chapter 2**). Several pieces of evidence have been reported to support this hypothesis, but the exact underlying molecular mechanism has not yet been unraveled. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the upstream events leading CD36 to preferentially locate at the sarcolemma upon exposure to high fat, so as to further disclose the molecular mechanism of lipid-induced cardiac contractile dysfunction.

Focus was on the endosomes that constitute the major intracellular CD36 storage compartment, and in particular on vacuolar-type H⁺-ATPase (v-ATPase) that is responsible for endosomal acidification. Preliminary evidence had shown that v-ATPase is malfunctioning during lipid overload, leading to CD36 expulsion to the sarcolemma. Indeed, exposure of rat hearts *in vivo* to high lipids, or of either rodent or human cardiomyocyte cultures to high lipid media led to endosomal alkalinization, followed by insulin resistance, and subsequently decreased sarcomere shortening (**Chapter 3**). Genetic silencing or pharmacological inhibition of v-ATPase in cardiomyocytes was found to reduce insulin sensitivity, insulin-stimulated glucose uptake, and cardiac contractility, which were rescued by CD36 silencing. We further disclosed the potential underlying mechanism: this involves the disassembly of the two sub-complexes of v-ATPase, with one sub-complex (V₀) remaining at the endosomal membrane and the other sub-complex (V₁) dissociating into the cytoplasm. This disassembly caused loss of enzymatic activity (proton pumping) of v-ATPase, thereby decreasing endosomal acidification. The resulting

alkalinization of the endosomal lumen induced CD36 relocation from endosomes to the sarcolemma, subsequently leading to insulin resistance, and ultimately contractile dysfunction of the heart.

To further study the association between CD36 and v-ATPase, **Chapter 4** establishes a novel approach to image CD36 fluorescently based on the introduction of a tetracysteine sequence in the extracellular loop and application of biarsenical dyes. Three CD36 mutants were constructed, each encoding the tetracysteine motif at a different site within the extracellular domain of CD36. One of these mutants showed normal biological function, and microscopic analysis after staining with a biarsenical dye was in agreement with the expected endosomal localization of CD36. The two sub-complexes of v-ATPase were stained via a classical immunofluorescent approach using distinct antibodies against specific subunits within each sub-complex. The V_0 sub-complex co-localized with CD36 under both low-palmitate and high-palmitate culturing conditions, whereas co-localization of V_1 sub-complex and CD36 was only observed under low-palmitate culturing condition. These data further confirmed disassembly of v-ATPase upon lipid oversupply. Taken together, this new approach provides an alternative methodology to study CD36 trafficking dynamics.

The reversible assembly/disassembly of the two sub-complexes appears as a main regulatory mechanism of v-ATPase activity in both yeast and kidney cells. In yeast, assembly/disassembly cycles have been reported to be regulated by glucose availability, with glucose-enriched conditions favoring assembly and hence increased endosomal acidification. Taking this a step further, we observed that high glucose concentrations may stimulate v-ATPase reassembly in lipid-overloaded cardiomyocytes (**Chapter 5**). Since 2-deoxy-D-glucose did not induce v-ATPase reassembly, glucose did not act directly but possibly via a glycolytic metabolite. In the meanwhile, A-769662, a potent AMP-activated protein kinase (AMPK) activator, also exerted beneficial effects on restoring the loss of lipid-induced v-ATPase dysfunction and preventing excess CD36 translocation to the sarcolemma, thereby suggesting the possible involvement of AMPK-mediated phosphorylation at a specific subunit in the regulation of v-ATPase assembly/disassembly.

Collectively, this thesis offers new insights on the molecular mechanisms by which excess lipids ultimately lead to cardiac contractile dysfunction and diabetic cardiomyopathy. Loss of v-ATPase activity appears to be a key player in the initiation of the sequence of events that lead to this pathological condition. As another result, strategies to re-activate v-ATPase might restore endosomal CD36 retention, cardiac insulin sensitivity and contractile function, which eventually would combat lipid-induced cardiomyopathy.

Samenvatting

CD36 is het belangrijkste membraangebonden vetzuur-transporterende eiwit in het hart en het draagt in grote mate bij aan de regulatie van de vetzuuropname en het vetzuurmetabolisme. Deze regulatie vindt als volgt plaats: na blootstelling aan specifieke stimuli, zoals een toegenomen contractie van de hartspier of een verandering in de bloedspiegel van hormonen (bijv. insuline) migreert dit CD36 van intracellulaire opslagplaatsen (endosomen) naar het sarcolemma (plasmamembraan) alwaar de vetzuuropname snelheid kan worden vergroot. Wanneer het hart echter wordt geconfronteerd met een grote hoeveelheden vetten (lipiden) – bijvoorbeeld na een voeding met een hoog vetgehalte – blijkt het CD36 zich voornamelijk te bevinden op het sarcolemma, waardoor de vetzuuropname in rustcondities al is verhoogd is. Het gevolg hiervan is dat zich een overschot aan vetten in de cel opstapelt, waarna er op termijn insuline resistentie optreedt en tenslotte een afname van de hartfunctie. CD36 vervult dus een sleutelrol bij lipide-geïnduceerde insulineresistentie en de daarmee gepaard gaande afnemende contractie van het hart, wat vervolgens kan leiden tot zogenaamde diabete cardiomyopathie.

Alhoewel voor verschillende lipide-metabolieten is gesuggereerd dat zij de verbindende schakel zijn tussen de CD36-gemedieerde vetzuuropname en het ontstaan van insulineresistentie en afname van de contractiekracht van het hart, is het ook mogelijk dat deze lipide-metabolieten *direct* verantwoordelijk zijn voor de afname van de hartfunctie (zonder tussenkomst van insuline resistentie) (**Hoofdstuk 2**). Het preciese onderliggende moleculaire mechanisme is echter nog niet bekend. Het belangrijkste doel van dit proefschrift was dan ook om de gebeurtenissen voorafgaand aan de bovengenoemde CD36 re-lokalisatie naar het sarcolemma als gevolg van verhoogde blootstelling aan lipiden te onderzoeken, en daarmee de eerste stappen van het moleculaire mechanisme van lipide-geïnduceerd hartfalen verder te ontrafelen.

De focus van dit onderzoek lag op het endosomale compartiment dat de belangrijkste intracellulaire opslagplaats van CD36 vormt, en met name op het eiwit vacuole-specifiek H⁺-ATPase (v-ATPase) dat verantwoordelijk is voor verzuring van de endosomen. De eerste experimenten lieten zien dat gedurende blootstelling van hartspiercellen aan grote hoeveelheden lipiden v-ATPase niet goed functioneert (de endosomen worden minder zuur) en leidt tot verplaatsing van CD36 naar het sarcolemma. In vervolggexperimenten bleek dat na genetische manipulatie van hartspiercellen waarbij de hoeveelheid v-ATPase is gehalveerd, of bij farmacologische remming van het v-ATPase zowel de insuline gevoeligheid, de insuline-gestimuleerde glucose opname als de contractiekracht afnamen. Deze afname kon worden hersteld door met genetische technieken het CD36 gehalte te verlagen (**Hoofdstuk 3**). Hierna konden we het onderliggende mechanisme ontrafelen: de afname van v-ATPase activiteit bleek samen te gaan met het uiteenvallen van v-ATPase in

twee sub-complexen waarbij het ene sub-complex (V_0) in het endosomale membraan blijft en het andere sub-complex (V_1) wegdrijft in het cytoplasma. Het wegvallen van de verbinding tussen deze twee sub-complexen veroorzaakt verlies van enzymatische activiteit (protonpomp functie) van v-ATPase, waardoor de endosomale zuurgraad afneemt. De resulterende alkalinerende van de endosomale binnenruimte induceert de verplaatsing van CD36 van endosomen naar het sarcolemma, hetgeen vervolgens leidt tot insuline resistentie en afname van contractiele functie van de hartspiercellen.

Om het verband tussen CD36 en v-ATPase verder te onderzoeken, is een nieuwe benadering opgezet om CD36 via fluorescentie in beeld te brengen. Deze benadering is gebaseerd op het inbrengen van een tetracysteïne sequentie in het extracellulaire domein van CD36 en het labelen met bi-arsenicum kleurstoffen (**Hoofdstuk 4**). Drie CD36 mutanten werden geconstrueerd, waarbij het tetracysteïne motief op verschillende plaatsen in het extracellulaire domein van CD36 werd ingebracht. Eén van deze mutanten toonde een normale biologische functie, en ook het microscopische kleuringspatroon na kleuring met het bi-arsenicum was in overeenstemming met de verwachte endosomale lokalisatie van CD36. De twee sub-complexen van v-ATPase werden gekleurd via een klassieke immunofluorescente benadering met behulp van verschillende antilichamen gericht tegen specifieke sub-units van elk sub-complex. De lokalisatie van het V_0 sub-complex overlapt met die van CD36 onder zowel lage als hoge lipide-concentraties in het kweekmedium, terwijl co-lokalisatie tussen het V_1 sub-complex en CD36 alleen optrad bij lage lipide-concentraties. Deze resultaten bevestigen het mechanisme van het uiteenvallen van v-ATPase tijdens een verhoogde blootstelling aan lipiden. Bovendien vormt deze nieuwe experimentele benadering een alternatieve methode om verandering in de cellulaire lokalisatie van CD36 te bestuderen.

Het omkeerbare proces van assemblage en uiteenvallen van de twee sub-complexen van v-ATPase is al een bekend regelmechanisme voor de activiteit van v-ATPase in gist. Cycli van assemblage en uiteenvallen van de sub-complexen worden in gist gereguleerd door de mate van beschikbaarheid van glucose, waarbij hoge glucose spiegels assemblage bevorderen alsook endosomale verzuring. Gebruikmakend van deze inzichten hebben wij ook waargenomen dat in hartspiercellen blootgesteld aan hoge lipide-spiegels de toevoeging van een hoge glucose concentratie de re-assemblage van v-ATPase weer bewerkstelligt (**Hoofdstuk 5**). Aangezien 2-deoxy-D-glucose deze re-assemblage van v-ATPase niet bleek te herstellen, is het aannemelijk dat glucose dit effect teweegbrengt via een metaboliet uit de glycolyse. Ook vonden we dat A-769662, een sterke activator van AMP-activated protein kinase (AMPK) het lipide-geïnduceerde verlies aan v-ATPase functie en de daaraan gekoppelde excessieve verplaatsing van CD36 naar de sarcolemma eveneens herstelt. Dit laatste doet vermoeden dat v-ATPase assemblage wordt gereguleerd door AMPK-gemedieerde fosforylering van een specifieke sub-unit.

Samengevat verschaft dit proefschrift een aantal nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen waarbij verhoogde lipide-spiegels uiteindelijk leiden tot verlies van de contractiekracht van het hart en het ontstaan van diabete cardiomyopathie. Een afgenomen v-ATPase activiteit blijkt een hoofdoorzaak te zijn bij de initiatie van een keten aan veranderingen die tesamen leiden tot dit ziektebeeld. Hiermee samenhangend kunnen strategiën die erop gericht zijn om de activiteit van v-ATPase te herstellen bijdragen aan de internalisatie van CD36 naar endosomale opslag, waarna de insuline gevoeligheid en de contractiele functie van het hart hersteld kunnen worden en in breder perspectief diabete cardiomyopathie bestreden kan worden.

总结

CD36是存在于心脏的主要膜脂肪转运体，通过调节心脏脂肪的吸收和代谢从而调节心肌细胞的脂质水平。在增加收缩或激素（例如胰岛素）等特定条件的刺激下，CD36从细胞内储存室转运至肌膜以增加脂肪酸的摄取。然而，当心脏过度暴露于脂质的情况下（例如，摄入具有高脂肪含量的饮食），CD36倾向于定位在肌膜，从而刺激心肌脂肪酸的摄取和利用而引发细胞内多余脂质的存储，脂质引发的胰岛素抵抗并最终导致心肌收缩功能障碍的恶性循环。因此，CD36在脂质诱导的心肌胰岛素抵抗和收缩功能障碍中扮演着关键的角色，这一系列的病变随后导致2型糖尿病和糖尿病心肌疾病的发生。

CD36介导的脂肪酸摄取被普遍认为是导致肌细胞脂质堆积的主要原因。大量的脂肪酸摄取导致胰岛素抵抗，并最终诱发心肌收缩功能障碍。虽然很多假设提出几个关键介质，特别是脂质代谢物介导了CD36下游的信号通路从而诱发胰岛素抵抗，并导致心肌收缩功能障碍，然而也有另外一些观察表明，脂质本身可以直接诱导心肌收缩功能障碍（第2章中综述提及）。一些支持这些假说的证据已经被发现，但确切的分子机制依然没有被解开。因此，本论文的目的是通过研究导致CD36倾向于定位在肌膜的上游信号通路，从而进一步揭开脂质引起的心肌收缩功能障碍的分子机制。

第三章的重点集中在主要构成细胞内CD36储藏室的内涵体，尤其是负责内涵体酸化的液泡型氢离子三磷酸腺苷酶（v-ATPase）。初步证据表明，v-ATPase在脂质过载时出现功能性障碍，导致CD36定位在肌膜。事实上，无论是体内实验使大鼠的心脏暴露于高脂质条件下，或是体外实验将啮齿动物或人的心肌细胞培养在高浓度脂质培养液中都能够发现高脂质能够导致内涵体碱化，随之引发胰岛素抵抗，并且伴随肌节收缩的降低（第3章）。通过基因敲除或药理性地抑制心肌细胞的v-ATPase均使胰岛素的敏感性、胰岛素刺激的葡萄糖摄取以及心肌的收缩力降低，然而这些水平的降低可通过基因敲除CD36而恢复正常水平。进一步的研究发现导致v-ATPase失去其正常功能的潜在机制涉及到v-ATPase两个子复合体的分离。在高脂质的条件下，其中一个子复合体（ V_0 ）残留在内涵体膜，而另一个子复合体（ V_1 ）游离到细胞质中。这一分离导致v-ATPase（质子泵）活性的丧失，从而降低内涵体的酸化。碱化的内涵体腔诱导CD36从内涵体转移到肌膜，从而产生胰岛素抵抗，并最终导致心肌收缩功能障碍。

为了进一步研究CD36和v-ATPase的联系，第4章通过在CD36的胞外环引入四半胱氨酸序列并应用双硫染料而建立了一个新的荧光方法来观察CD36成像。四半胱氨酸序列被编码在CD36胞外环的三个不同位置从而构造出不同的突变体。其中一个突变体表现了正常的生物学功能，并且与我们预想的一样，用双硫染料染色后在显微镜下观测到CD36定位在内涵体。通过经典的免疫荧光染色方法，v-ATPase的两个子复合体分别被不同的抗体染色。在低脂质或高脂质的条件下， V_0 子复合体都与CD36的定位重合；然而 V_1 子复合体仅仅在低脂质的情况下才与CD36定位重合。这些数据进一步证实了脂质过载导致v-ATPase两个子复合体的分离。总之，这种新的方法提供了另外一种研究CD36失调性动态转运的方法学。

在酵母和肾细胞中，两个子复合体可逆性的组装/分离被认为是v-ATPase活性的主要调节机制。在酵母的研究报告中发现了这种循环性的组装/分离是由可利用的葡萄糖来调节。具体来说是高浓度的葡萄糖条件有利于v-ATPase两个子复合体的组装，并因此增加了内涵体的酸化。更进一步的观察发现，高浓度葡萄糖可刺激脂质过载的心肌细胞中v-ATPase的重组（第5章）。由于脱氧葡萄糖（2-deoxy-D-glucose）不能诱导v-ATPase的重组，由此可见葡萄糖并未不能直接促使重组而是可能通过糖酵解代谢作用。与此同时，一种有效的AMP活化蛋白激酶（AMPK）活化剂A-769662也对脂质诱导的v-ATPase失活起到恢复作用，并能够防止过量CD36转移到肌膜，从而表明AMPK在v-ATPase特定亚基介导的磷酸化可能参与调节v-ATPase组装/分离。

总的来说，本论文对脂质过载所导致的心脏收缩功能障碍和糖尿病心肌疾病提出了新的见解。v-ATPase的失活可能在其激发的一序列病理状态中发挥着关键性的角色。因此，重新激活v-ATPase的活性可能促使CD36定位在内涵体，提高心肌胰岛素的敏感性以及心肌收缩功能，并最终对抗脂质诱发的心肌疾病。