

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Ph.D. study program: Biochemistry
Doktorský studijní program: Biochemie

Summary of the Ph.D. Thesis
Autoreferát disertační práce



Myocardial cell signaling in spontaneously hypertensive rats
with transgenic and congenic expression of CD36.

Buněčná signalizace v myokardu spontánně hypertenzních
potkanů s transgenní a kongenní expresí CD36.

Mgr. Martina Klevstigová

Supervisor/ Školitel: Doc. RNDr. František Novák, CSc.
Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha, 2013

ABBREVIATIONS/ SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	Adenylyl cyclase/ Adenylylcyklasa
β -AR	β -Adrenoceptor/ β -Adrenoreceptor
BN	Brown Norway
C	Catalytic subunit/ Katalytická podjednotka/
FA	Fatty acid/ Mastná kyselina
FFA	Free fatty acid/ Volná mastná kyselina
FSK	Forskolin
HSD	High-sucrose diet/ Vysokosacharózová dieta
i.p.	Intraperitoneal/ Intraperitoneální
I/R	Ischemia/reperfusion/ Ischemie/reperfúze
IS	Infarct size/ Velikost infarktu
ISO	Isoproterenol
G _i	Inhibitory G protein/ Inhibiční G protein
G _s	Stimulatory G protein/ Stimulační G protein
LCFA	Long-chain fatty acid/ Mastná kyselina s dlouhým řetězem
LV	Left ventricle/ Levá komora
MI	Myocardial infarction/ Infarkt myokardu
PKA	Protein kinase A/ Proteinkinasa A
PKC	Protein kinase C/ Proteinkinasa C
PLB	Phospholamban/ Fosfolamban
PVC	Premature ventricular complexes/ Předčasné komorové stahy
SHR	Spontaneously hypertensive rat/ Spontánně hypertenzní potkan
SHR-4	Congenetic SHR line/ Kongenní SHR
SHR-Cd36	Transgenic SHR line/ Transgenní SHR
TAG	Triacylglycerol
TnI	Troponin I
v/v	Volume to volume/ Objem/objem

CONTENTS/ OBSAH

ABSTRACT	4
ABSTRAKT	5

ENGLISH PART

1	INTRODUCTION	6
2	AIMS	8
3	METHODS	9
4	RESULTS AND DISCUSSION	10
	AIM I	10
	AIM II	13
5	SUMMARY	18

ČESKÁ ČÁST

6	ÚVOD	21
7	CÍLE PRÁCE	22
8	METODY	24
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
	Cíl I	25
	Cíl II	28
10	ZÁVĚR	33
11	REFERENCES/ POUŽITÁ LITERATURA	35
12	CURRICULUM VITAE	40
13	SELECTED PUBLICATIONS/ SEZNAM PUBLIKACÍ	41

ABSTRACT

Long-chain fatty acids (LCFA) are the primary energy source in the myocardium and an imbalance in the LCFA and glucose utilization could cause cardiovascular diseases. More than 50% of LCFA uptake by the heart is mediated by the fatty acid translocase CD36 and disruption of its function has been shown to impair cardiovascular functions. The spontaneously hypertensive rat (SHR) harbors a deletion variant of the Cd36 gene that results in reduced LCFA transport into myocytes. Therefore, the main aim of this thesis was to investigate the importance of a functional CD36 to sustain normal physiological functions of the heart. We used SHR and two genetic modified SHR strains, the congenic SHR-4 and the transgenic SHR-Cd36, with fully functional CD36. They differ in the CD36 expression and in the manner how they were derived from the SHR.

CD36 has been proven to play a role in the pathogenesis of insulin resistance. Therefore we analyzed the effect of a functional CD36 on insulin resistance and protein kinase C (PKC) expression, which is known to be involved in the mechanism of insulin resistance, in the heart of SHR-4 and SHR. We showed that the SHR-4 had lower serum free fatty acids (FFA) and triacylglycerols (TAG) concentrations, indicating improved insulin sensitivity. Furthermore, SHR-4 had increased PKC ϵ expression when compared to the SHR. High sucrose diet (HSD), applied for 14 days, caused the accumulation of heart TAG in the SHR, while increased PKC δ and decreased PKC ϵ expression was found in the SHR-4. These findings suggest that CD36 in the SHR-4 is associated with reduced insulin resistance, in which PKC δ and ϵ may play a role.

Fatty acids (FA) are known to be arrhythmogenic. Using the SHR-Cd36, with a wild-type Cd36, we proved that the insertion of Cd36 onto the SHR genome increases the severity and duration of arrhythmias but lowers the myocardial infarct size after coronary occlusion. In addition, we also showed that the higher arrhythmogenesis in the SHR-Cd36 is independent of FA uptake but it is rather caused by to increased sensitivity of the β -adrenoceptors (β -AR) signaling pathway documented by higher β -AR density, increased expression of adenylyl cyclase and protein kinase A. Taken together, we proved that the wild-type Cd36 affects the ischemia/reperfusion tolerance in the SHR in β -AR signaling pathway dependent manner.

It can be concluded that the CD36 function plays an important role in various pathophysiological conditions of the heart, including insulin resistance and arrhythmias, which are dependent on PKC isoforms and the β -AR signaling pathway, respectively.

ABSTRAKT

Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA) jsou primárním zdrojem energie v myokardu. Špatné využití LCFA a glukózy může způsobit kardiovaskulární onemocnění. Více než 50% transportu LCFA do srdce je zprostředkováno translokázou mastných kyselin CD36 a porucha CD36 zhoršuje kardiovaskulární funkce. Spontánně hypertenzní potkan (SHR) má deleční variantu genu pro Cd36, která vede k omezení transportu LCFA do myocytů. Hlavním cílem této práce bylo objasnit význam funkčního CD36 ve fyziologické funkci srdce. Použili jsme dva geneticky modifikované kmeny SHR, kongenní SHR-4 a transgenní SHR-Cd36 s funkčním CD36. Tyto kmeny se liší v expresi CD36 a způsobu, kterým byly odvozeny z kmene SHR.

Bylo prokázáno, že CD36 hraje roli v patogenezi inzulinové rezistence. Z tohoto důvodu jsme v srdcích SHR-4 a SHR analyzovali vliv funkčního CD36 na inzulinovou rezistenci a expresi proteinkinasy C (PKC), která se v mechanismu inzulinové rezistence také uplatňuje. Ukázali jsme, že kmen SHR-4 měl nižší koncentraci volných mastných kyselin (FFA) a triacylglycerolů (TAG) v séru, což naznačuje na zlepšení citlivosti k inzulinu. Dále měl SHR-4 zvýšenou expresi PKC ϵ ve srovnání s SHR. Vysokosacharózová dieta (HSD), podávaná 14 dnů, způsobila akumulaci TAG v srdcích SHR, zatímco vedla ke zvýšení exprese PKC δ a snížení exprese PKC ϵ u SHR-4 potkanů. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost CD36 u kmene SHR-4 je spojena se sníženou inzulinovou rezistencí, ve které může hrát roli PKC δ a PKC ϵ .

Je známo, že mastné kyseliny (FA) jsou arytmogenní. Použitím SHR-Cd36 s wild-type CD36 jsme dokázali, že vložení Cd36 na genetické pozadí SHR zvyšuje závažnost a výskyt arytmií ale snižuje velikost infarktu myokardu po koronární okluzi. Dále jsme zjistili, že zvýšená arytmogeneze v SHR-CD36 je nezávislá na transportu FA do srdce, ale je dána spíše větší citlivostí signální dráhy β -adrenergních receptorů (β -AR), což bylo dokumentováno vyšší hustotou β -AR a zvýšenou expresí adenylcyklyasy a proteinkinasy A. Prokázali jsme tak, že wild-type Cd36 ovlivňuje ischemicko/reperfuční toleranci SHR v závislosti na β -AR signální dráze. Je možné konstatovat, že funkce CD36 hraje důležitou roli v různých patofyziologických podmínkách v srdci, včetně inzulinové rezistence a vzniku arytmií, které jsou závislé na jednotlivých isoformách PKC, respektive na β -AR signální dráze.

1 INTRODUCTION

Fatty acid translocase CD36, a transmembrane glycoprotein, is expressed on a wide range of cells and tissues, including cardiac and skeletal muscle, monocytes and macrophages. CD36 mediates a broad list of functions including transport of long chain fatty acids (LCFA) into the cells, cardiovascular function and diabetes (Febbraio & Silverstein, 2007). CD36 deficiency has shown to be involved in insulin resistance (Pravenec *et al.*, 1999), and although the exact mechanism is unclear, it has been shown that the protein kinase C (PKC) isoforms may play a role in the mechanism of this disorder and that it can inhibit several steps of the insulin signaling cascade, including contraction induced recruitment of CD36 from intracellular stores to the sarcolemma of cardiac myocytes (Coort *et al.*, 2007). Furthermore, heart hypertrophy (Hajri *et al.*, 2001) as well as impaired tolerance to myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury (Irie *et al.*, 2003) has been connected to CD36 deficiency and impaired LCFA uptake.

The β -adrenoceptor (β -AR) signaling pathway is known to play a fundamental role in modulating cardiomyocyte contractility (Lissandron & Zaccolo, 2006) and increased β -AR stimulation has been shown to contribute to fatal arrhythmias (Bassiakou *et al.*, 2009), as well as cardiac hypertrophy (Engelhardt *et al.*, 1999; Liggett *et al.*, 2000). β -AR are coupled to trimeric G proteins, which regulate the enzymatic activity of adenylyl cyclase (AC). AC catalyzes the conversion of cellular ATP into cAMP, a key second messenger molecule, which activates protein kinase A (PKA) (Xiao *et al.*, 2006). Activated PKA then enhance the cardiac contraction through phosphorylation of various proteins involved in excitation-contraction coupling (Xiang & Kobilka, 2003).

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is the most studied animal model of human hypertension and under appropriate dietary conditions it exhibits multiple metabolic disorders e.g. insulin resistance and hyperinsulinemia, similar to the human metabolic syndrome (Aitman *et al.*, 1997; Pravenec *et al.*, 1999; Pravenec *et al.*, 2001). Furthermore, when compared to control strains, the SHR exhibits differences in a number of cardiac phenotypes, including increased cardiac mass (Hajri *et al.*, 2001), impaired cardiac ischemic tolerance, and susceptibility to arrhythmias (Ravingerova *et al.*, 2011). Previous studies showed that the SHR harbors a deletion in the Cd36 gene (Aitman *et al.*, 1999) that results in reduced transport of LCFA into cardiomyocytes (Hajri *et al.*, 2001).

Genetic studies have come to be a useful tool in the clarification of molecular mechanisms in different pathophysiological conditions and during the last decade different genetic modified strains have been derived from the SHR. The SHR-4 congenic strain was derived by transferring a segment of chromosome 4 from the inbred normotensive Brown Norway (BN) strain onto the genetic background of the SHR strain (Pravenec *et al.*, 1999). And the SHR-Cd36 transgenic strain was prepared by microinjecting SHR zygotes with wild-type Cd36 cDNA isolated from fat tissue of the Wistar-Kyoto rat (Pravenec *et al.*, 2001). While the congenic SHR-4 strain is 99% genetically identical, the SHR-Cd36 is, except the wild-type Cd36 gene, 100% identical to the SHR progenitor strain. These genetically modified SHR strains have been used to investigate the role of CD36 in insulin resistance as well as in I/R tolerance.

2 AIMS

Aim I

This study was based on the knowledge that the SHR is insulin-resistant and that protein kinase C (PKC) isoforms are known to play a role in the insulin signaling cascade as well as in the mechanisms of numerous cardiovascular diseases e.g. heart hypertrophy and heart failure. Thus, the first aim was to study the relationship between CD36-mediated fatty acid transport, activation of two PKC isoforms, δ and ϵ , and insulin resistance in the heart of the SHR and the congenic strain SHR-4 with an introduced segment of chromosome 4, containing the Cd36 gene, from the insulin sensitive Brown-Norway rats.

Specific aims:

- To compare the concentrations of heart triacylglycerol (TAG) as well as serum glucose, insulin, free FA (FFA), and TAG concentrations in the SHR and SHR-4. Furthermore, to study the effects of a 14-day high-sucrose diet (HSD) feeding on these lipid and glucose metabolites.
- To compare the novel PKC isoforms, δ and ϵ , expression of the two strains, as well as to analyze the effect of a 14 day HSD feeding on the PKC δ and ϵ expression and distribution between the cytosol and particulate fraction in the left ventricular of the two strains.

AIM II

A deletion of CD36 has been shown to affect heart I/R injury tolerance (Irie *et al*, 2003). The second aim was therefore to analyze the effect of the nonfunctional CD36 on susceptibility to ischemic ventricular arrhythmias and myocardial infarction in the SHR-4 congenic and SHR-Cd36 transgenic

strains and to compare it with the SHR progenitor strain, and to search for potential underlying mechanisms of altered ischemic tolerance.

Specific aims:

- To analyze the incidence and severity of ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias and myocardial infarct size (IS) induced by coronary artery occlusion in an open-chest model and in isolated perfused hearts.
- To study the effect of catecholamine depletion on the incidence and severity of ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias and myocardial IS induced by coronary artery occlusion in isolated perfused hearts.
- To compare the serum free FA and TAG, heart TAG and the FA composition in serum and heart phospholipids of the two strains.
- To analyze the heart performance after β_1 -adrenoceptor stimulation using dobutamine echocardiography stress test in the SHR and SHR-Cd36.
- To assess the expression and/or functional properties of the major components of the adenylyl cyclase signaling, including β -adrenoceptor, G proteins, adenylyl cyclase and protein kinase A in the left ventricular of both SHR and SHR-Cd36 rats.

3 METHODS

Dietary intervention

SHR and SHR-4 rats were fed a HSD containing, in caloric %: 60 % sucrose, 20 % proteins and 20 % fats, for 14 days before sacrifice. Control rats were fed a standard laboratory chow.

The experiments consisted of the following steps and methodical approaches:

IS determination and analysis of ventricle arrhythmias

Echocardiographic measurements

Tissue fractionation and Western blot analysis

Enzymatic analysis of TAG, insulin, glucose and FFA concentrations

Analysis of FA profile of serum and myocardial membrane phospholipids

Binding of β -AR

EIA analysis of AC activity

Reserpine treatment

SHR and transgenic SHR-Cd36 rats was pretreated with reserpine (alkaloid that depletes catecholamines; 0.15 mg/kg dissolved in a mixture of glacial acetic acid and saline 1:50 v/v) administered i.p. 24 h before ischemia. Control rats received the same volume of the vehicle.

4 RESULTS AND DISCUSSION

Aim I

Within this aim, we studied the relationship between CD36 mediated FA transport, activation of two PKC isoforms and insulin resistance in the heart of the SHR and its congenic strain SHR-4.

Hypertrophy, lipid and glucose metabolites and the effect of the HSD

We demonstrate in this study that the congenic strain SHR-4 with a functional CD36 was less insulin resistant, which is in line with previous findings (Pravenec *et al.*, 1999). Furthermore, we observed that heart

hypertrophy, a characteristic feature of the SHR progenitor strain, was attenuated in the SHR-4 congenic strain. The functional CD36 contributed as well to lower serum insulin and FFA in the SHR-4 fed a standard chow and helped to prevent hyperglycemia and hyperinsulinemia after the HSD. Under control condition, we found a tendency to higher heart TAG concentration in the SHR-4 which is in line with findings showing an increased FA uptake in the SHR-4 in comparison with SHR (Hajri *et al.*, 2001). While the HSD caused heart TAG accumulation in the SHR, no changes were found in the SHR-4. Previous findings showed that CD36 is located on the mitochondrial membrane and plays a role in FA oxidation (Smith *et al.*, 2011), indicating that the FA taken up by the SHR-4 heart are transported into the mitochondrial compartment by the functional CD36 where they are oxidized thus the heart TAG concentration in SHR-4 stayed unchanged after the HSD. Taken together, our results indicate that the functional CD36 improved the FA metabolism in the SHR-4, which could contribute to the improved hypertrophy as a disruption in the balance of energy utilization cause hypertrophy (Glatz *et al.*, 2006).

PKC δ and ϵ heart expression and the effect of HSD

We observed higher PKC ϵ expression in the SHR-4 (Fig 1) as well as increased membrane localization, indicating its activation. Papers published so far have contradictorily shown that PKC ϵ activation plays a role in the development of insulin resistance in skeletal muscles (Laybutt *et al.*, 1999; Dey *et al.*, 2007; Dasgupta *et al.*, 2011). On the other hand, when activated in the heart, PKC ϵ inhibits the hyperglycemia apoptosis signal, attenuates hyperglycemia induced oxidative stress and thereby prevents diabetic cardiomyopathy (Malhotra *et al.*, 2005). In relation to our results, we presume that the activated PKC ϵ in SHR-4 is connected with the inserted CD36 and the improved LCFA transport to the heart (Hajri *et al.*, 2001), as

it is known that LCFA can activate PKC ϵ (Huang *et al.*, 1997; Ragheb *et al.*, 2009).

HSD stimulation had different effects on the two novel PKC isoforms in the two strains (Fig 1). The PKC δ was upregulated and PKC ϵ downregulated in the heart of SHR-4 after the HSD together with increased insulin serum concentration while no effect was observed in the SHR. Both PKC δ and PKC ϵ are known to be modulators of insulin signaling in skeletal muscle (Laybutt *et al.*, 1999; Waraich *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2010). It seems, however, that the reactions of both PKC δ and PKC ϵ on insulin and glucose infusion in the heart differ from those in skeletal muscle.

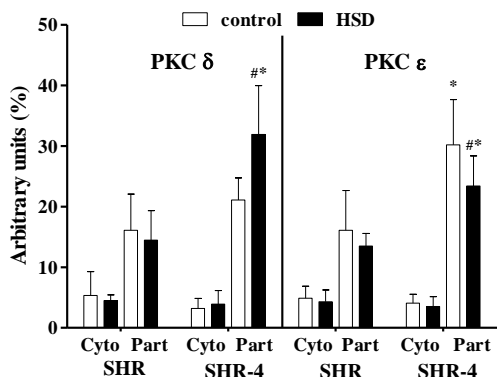


Fig 1: PKC δ and ϵ expression in the cytosol (cyto) and particulate fraction (part) in left ventricle of SHR and SHR-4 rats fed either a control or high sucrose diet (HSD). Values are mean \pm SEM; * P <0.05 SHR-4 vs. corresponding SHR; # P <0.05 HSD vs. corresponding control

Luiken *et al.* (2009) did not observe any change in PKC δ and/or PKC ϵ expression or translocation after acute insulin administration in isolated cardiac myocytes from Lewis rats. Moreover, D'Alessandro *et al.* (2008) showed increased expression of PKC ϵ in the particulate fraction in the heart of HSD-induced insulin resistant rats. The aforementioned findings lead us

to the assumption that the PKC isoforms in our study could as well be regulated by other factors than the elevated insulin concentration. As has been documented, HSD feeding represents a metabolic stress and is accompanied by enhanced production of reactive oxygen species (Busserolles *et al.*, 2002) which are known to regulate PKCs (Duquesnes *et al.*, 2011). We suppose that our results present a possible link between the function of CD36 and PKC δ activation in reaction to the HSD feeding induced stress in the genetically manipulated SHR-4.

Aim II

After studying PKC and insulin resistance in the SHR-4 congenic strain and the SHR we decided to examine the tolerance to I/R injury in these strains. We found a tendency to a smaller IS as well as higher amount of PVCs in the SHR-4 when compared to the SHR. Since the differences between the strains were not significant, we choose to compare another CD36 genetic modified model, SHR-Cd36, which is 100% genetically identical to the SHR progenitor strain, except the wild-type Cd36. The higher CD36 expression in the transgenic SHR-CD36 strain (Pravenec *et al.*, 2008a) could explain the discrepancies in the tolerance to I/R injury between the SHR-4 and SHR-Cd36.

Effect of CD36 on I/R injury

In the current study, we found the functional CD36 in the transgenic SHR-Cd36 strain was associated with markedly increased incidence of ischemic ventricular arrhythmias (Fig 2). It has been suggested that increased FA uptake by the heart after MI might cause fatal arrhythmias during acute myocardial ischemia (Oliver, 2001). Accordingly, it is possible that SHR-Cd36 with wild-type Cd36 is predisposed to arrhythmias due to increased FA uptake. However, we found that isolated hearts of SHR-Cd36

perfused with a crystalloid solution devoid of FA were also more susceptible to I/R arrhythmias as compared to the SHR.

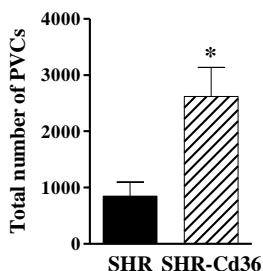


Fig 2: Total number of premature ventricular complexes (PVCs) during ischemia. Values are mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. SHR

This finding suggests that the proarrhythmic effect is an intrinsic myocardial property independent of FA uptake during acute ischemic insult. Moreover, the abolishment of catecholamines by reserpine completely eliminated the increased arrhythmogenesis in the SHR-Cd36 heart, indicating an important role of adrenoceptor in triggering the ischemia induced arrhythmias in this strain. Indeed, previous finding showed an impaired response to both α -AR as well as β -ARs in the SHR (Labarthe *et al.*, 2005). In addition, Cd36 was originally identified as a quantitative trait gene regulating β -AR stimulation induced lipolysis in isolated adipocytes when the SHR mutant allele was associated with reduced sensitivity to catecholamines (Aitman *et al.*, 1997). In contrast to the proarrhythmic affect, the IS in both open chest as well as perfused hearts were significantly smaller in the SHR-Cd36 when compared to the SHR (Fig 3).

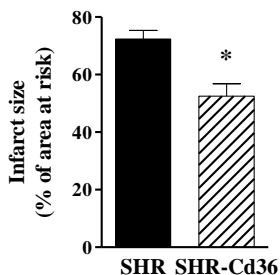


Fig 3: Myocardial infarct size expressed as percent of the area at risk. Values are mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. SHR

Opposite changes of the two endpoints of ischemia can be explained by different factors that are involved in the pathogenic mechanisms. In line with our results Irie *et al.* (2003) found that Cd36-null mice were energetically deficient and more sensitive to acute ischemic insult, similarly to the SHR. However, inhibition of CD36 exerted reduced IS after I/R injury (Bessi *et al.*, 2012). Whereas CD36 inhibition prevented the loss of cardiac function in a model of lipid induced cardiac insulin resistance (Angin *et al.*, 2012), on the other hand the cardiac performance in Cd36 knockout mice were depressed (Pietka *et al.*, 2012). In view of the limited data available, it is currently impossible to explain these discrepancies. Taken together, the description up to date of the CD36 role on cardiac function as well as tolerance to I/R injury have been contradictory,

Membrane fluidity changes due to altered FA composition of membrane phospholipids have been proven to play a role in the protection against I/R injury (Hlavackova *et al.*, 2007; Zeghichi-Hamri *et al.*, 2010). Furthermore, the FA composition of myocardial membrane phospholipid is sensitive to the type of FA consumed in the diet (Hlavackova *et al.*, 2007; Balkova *et al.*, 2009; Slee *et al.*, 2010). Therefore, one would expect an increased incorporation of LCFA into the myocardial membrane phospholipids in the SHR-Cd36, however no differences were observed. Accordingly, we can presume that the increased amount of FA taken up by the SHR-Cd36 myocardium is used for energy production.

β -AR signaling pathway in the proarrhythmogenic effect of CD36

While investigating the involvement of the β -AR signaling pathway in the increased arrhythmogenesis in the SHR-Cd36, we found increased myocardial β -AR density (Fig 4) and responsiveness to the β_1 -AR agonist dobutamine stimulation in SHR-Cd36 when compared to SHR. These results are in consistence with finding showing that increased β -AR

stimulation contributes to fatal arrhythmias (Bassiakou *et al.*, 2009). Moreover, myocardial IS and arrhythmias induced by coronary artery ligation can be reduced by blockade of β -ARs, which results in a diminution of intracellular cAMP levels and PKA activation (Lu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

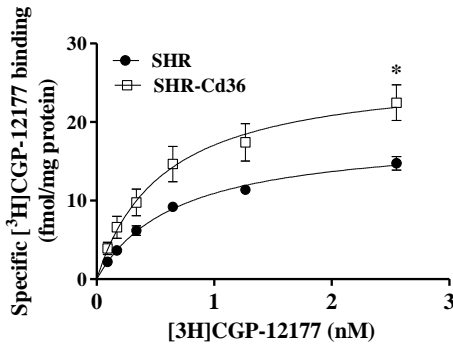


Fig 4: Saturation binding curves showing specific binding of [³H]CGP-12177 to crude myocardial membranes of SHR (closed symbols) and SHR-Cd36 (open symbols). Values are mean \pm SEM; * P <0.05 vs. SHR

Trimeric G proteins functions as key regulatory elements in signal transduction from activated β -ARs and they can be altered under different pathophysiological conditions, such as cardiac hypertrophy, arrhythmia and heart failure (Zolk *et al.*, 2000; Slotkin *et al.*, 2003). Although there were no appreciable changes in the stimulatory G (G_s) and inhibitory (G_i) protein expression, differently regulated AC activity was higher in myocardial membranes from SHR-Cd36 than SHR (Fig 5). A significantly increased AC activity was determined after direct stimulation of the enzyme by Mn^{2+} ions or after stimulation of both the enzyme and G_s protein by forskolin, as well as after stimulation of G_s protein by GTP γ S or after stimulation of β -ARs by isoproterenol. The enhanced sensitivity of the enzyme to stimulation may be explained by higher protein expression of AC5/6 in myocardial preparations from SHR-CD36. Both AC5 and AC6 have been shown to play an important role in the contractile response of heart muscle. Reduced contractility response upon β -AR stimulation have been observed

both in AC5 knockout mice (Okumura *et al.*, 2007) as well as after AC6 deletion (Tang *et al.*, 2008). On the other hand, mice overexpressing AC6 displayed an increased contractile response to dobutamine (Takahashi *et al.*, 2006).

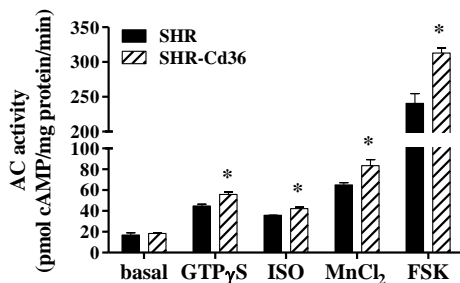


Fig 5: Adenylyl cyclase activity measured under basal conditions and after stimulation by GTP γ S, isoproterenol (ISO), manganese (MnCl₂) or forskolin (FSK) (B). Results are the mean \pm SEM; *P<0.05 vs. SHR

PKA phosphorylates and activates a number of key excitation-contraction coupling proteins, such as phospholamban (PLB), L-type Ca²⁺ channel, ryanodine receptor 2 and troponin I (TnI) (Xiang & Kobilka, 2003). It has previously been shown that β -AR stimulation leads to PKA-mediated phosphorylation of PLB and TnI (Di Benedetto *et al.*, 2008) and PKA overexpression results in dilated cardiomyopathy and arrhythmias (Antos *et al.*, 2001).

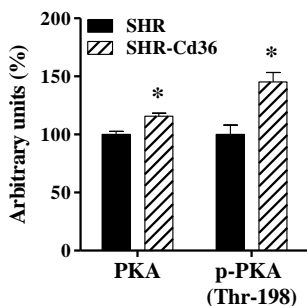


Fig 6: Expression of protein kinase A catalytic subunits and their phosphorylated forms (Thr-198) in SHR and SHR-Cd36. Values are mean \pm SEM; *P<0.05 vs. SHR

Our present results are in agreement with these observations. SHR-Cd36 with increased arrhythmias and contractility response had increased myocardial expression of the PKA catalytic (C) subunits, phosphorylated PKA C subunits Thr-198 (Fig 6) as well as the p-PKA/PKA ratio, which indicates increased PKA activity.

5 SUMMARY

The main aim of this work was to investigate the effect of wild-type Cd36 on cardiac function and on different signaling pathways in the SHR and the genetically modified strains, SHR-4 and SHR-Cd36.

AIM I

- We demonstrated that insertion of a segment of chromosome 4, which contains the Cd36 gene, from the BN strain into SHR genome lowered the serum FFA, insulin and glucose concentrations, indicating improved insulin sensitivity in the SHR-4 congenic strain.
- The SHR-4 exhibited higher PKC ϵ expression and its increased translocation to membrane fraction, suggesting elevated PKC ϵ activation. This is supporting the proposal that the SHR-4 strain have improved LCFA uptake in comparison with the SHR, which can activate this PKC isoform.
- We found different response of the two strains to the HSD feeding. Whereas the HSD impaired the lipid and glucose metabolic traits in the SHR, the SHR-4 tolerated the sucrose overload and did not exhibit any signs of insulin resistance. Furthermore, the PKC ϵ and PKC δ isoforms were affected by the HSD feeding only in the SHR-4. These

results show that the Cd36 gene affects the ability to respond to a sucrose overload by regulating the PKC δ and PKC ϵ expression.

AIM II

- Using the transgenic SHR-Cd36 strain, with a wild-type Cd36, we showed that the insertion of the Cd36 gene affects ischemic tolerance. We found that SHR-Cd36 had increased incidence and severity of ischemic ventricular arrhythmias and smaller myocardial IS induced by coronary artery occlusion.
- We did not observe any significant difference in the FA composition of heart and serum phospholipids between the strains, indicating that the increased arrhythmogenesis in the SHR-Cd36 is not due to altered FA composition of heart phospholipids, which are known to be involved in the tolerance against I/R injury.
- Reserpine abrogated the increased incidence and severity of ischemic ventricular arrhythmias in the SHR-Cd36, suggesting the involvement of catecholamines. The dobutamine stress test intensified this hypothesis, as we observed an increased heart response to β -AR stimulation in the transgenic strain.
- We demonstrated that the presence of wild-type Cd36 upregulated some components of the β -AR signaling pathway. We observed increased β -AR density, AC responsiveness and higher protein expression of AC and PKA. These findings indicate a connection between the Cd36 gene, β -AR signaling pathway and susceptibility to I/R arrhythmias in the SHR.

It can be concluded that the CD36 function plays an important role in the heart energy metabolism through the regulation of the PKC δ and PKC ϵ isoforms. Furthermore, CD36 also modulates the tolerance to I/R injury in a β -AR signaling pathway-dependent manner. Taken together, the function of CD36 affects various pathophysiological mechanisms and signaling pathways in the heart and is an important component in maintaining normal physiological cardiovascular functions.

6 ÚVOD

Translokáza mastných kyselin CD36 je transmembránový glykoprotein, který je exprimován řadou buněk a tkání, včetně srdečního a kosterního svalu, monocytů a makrofágů. CD36 má spoustu důležitých funkcí, uplatňuje se v transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA) do buňky, má úlohu v kardiovaskulárním systému a v diabetu (Febbraio & Silverstein, 2007). Ukázalo se, že deficit CD36 se uplatňuje v inzulinové rezistenci (Pravenec *et al.*, 1999). Přestože přesný mechanismus je dosud nejasný, bylo prokázáno, že v mechanismu tohoto onemocnění mohou hrát roli některé isoformy proteinkinasy C (PKC), které mohou inhibovat několik kroků kaskády inzulinové signalizace, včetně translokace CD36 z nitrobuněčných zásob na sarkolemu kardiomyocytů vyvolanou kontrakcí myokardu (Coort *et al.*, 2007). Kromě toho bylo zjištěno, že deficit CD36 a porucha transportu LCFA do srdeční buněk je spojena se srdeční hypertrofií (Hajri *et al.*, 2001) a také se sníženou tolerancí myokardu k ischemicko/reperfučnímu (I/R) poškození (Irie *et al.*, 2003).

Je známo, že signální dráha β -adrenergických receptorů (β -AR) hraje zásadní roli při regulaci kontraktility kardiomyocytů (Lissandron & Zaccolo, 2006). Dále bylo prokázáno, že zvýšená β -AR stimulace přispívá k vzniku fatálních arytmií (Bassiakou *et al.*, 2009) a srdeční hypertrofii (Engelhardt *et al.*, 1999; Liggett *et al.*, 2000). β -AR jsou spojeny s trimerními G proteiny, které regulují enzymatickou aktivitu adenylylcyklasy (AC). AC katalyzuje přeměnu buněčného ATP na klíčový druhý posel cAMP, který aktivuje proteinkinazu A (PKA) (Xiao *et al.*, 2006). Aktivovaná PKA pak zvyšuje srdeční kontrakce přes fosforylaci různých proteinů zapojených v mechanismu excitace-kontrakce (Xiang & Kobilka, 2003).

Spontánně hypertenzní potkan (SHR) je nejvíce studovaný zvířecí model lidské hypertenze a za vhodných dietních podmínek vykazuje několik

metabolických poruch např. inzulinovou resistencí a hyperinzulinémií, podobnou lidskému metabolickému syndromu (Aitman *et al.*, 1997; Pravenec *et al.*, 1999; Pravenec *et al.*, 2001). Kromě toho vykazuje SHR v porovnání s kontrolními kmeny rozdíly v řadě srdečních fenotypů, včetně zvýšené srdeční hmoty (Hajri *et al.*, 2001), zhoršené srdeční ischemické tolerance a vyšší náchylnosti k arytmiím (Ravingerova *et al.*, 2011). Předchozí studie ukázaly, že SHR má deficit v genu pro Cd36 (Aitman *et al.*, 1999), způsobující nefunkční protein, a tak snížený transport LCFA do kardiomyocytů (Hajri *et al.*, 2001).

Genetické studie se staly užitečným nástrojem v objasňování molekulárních mechanismů různých patofyziologických stavů a během posledního desetiletí byly od SHR odvozeny různé geneticky modifikované kmeny. Kongenní kmen SHR-4 byl získán vložením segmentu chromozómu 4 z normotenzního kmene Brown Norway (BN) na genetické pozadí kmene SHR (Pravenec *et al.*, 1999). Transgenní kmen SHR-Cd36 byl připraven mikroinjekcí zygot SHR konstruktem cDNA wild-type Cd36 izolovaným z tukové tkáně potkanů Wistar-Kyoto (Pravenec *et al.*, 2001). Zatímco kongenní kmen SHR-4 je z 99% geneticky identický s kmenem SHR, SHR-Cd36 je kromě wild-type genu Cd36 100% identický s kmenem SHR. Tyto geneticky modifikované kmeny SHR byly použity ke zkoumání role CD36 v inzulinové rezistenci a toleranci vůči I/R.

7 CÍLE PRÁCE

Cíl I

Tato studie byla založena na poznání, že kmen SHR je méně citlivý na inzulin ve srovnání s původním kmenem a že isoformy PKC hrají roli v inzulinové signalizační kaskádě, podobně jako v mechanismu mnoha kardiovaskulárních chorob, jako je např. hypertrofie a srdečního selhání.

První cílem této práce bylo studovat vztah mezi CD36 transportujícím FA, expresí a aktivací PKC δ a ϵ , a inzulinovou rezistencí v srdcích kmene SHR a kongenního kmene SHR-4, který má segment chromozomu 4 obsahující gen CD36 z BN, která je citlivá na inzulin.

Specifické cíle:

- Porovnat koncentraci glukózy, inzulinu, volných FA (FFA) a triacylglycerolů (TAG) v sérových a srdečních TAG u SHR a SHR-4. Dále, studovat účinek vysokosacharóvé diety (HSD) podávané po dobu 14 dnů na koncentraci glukózy a metabolitů lipidů.
- Porovnat expresi srdeční PKC δ a PKC ϵ u obou kmenů, analyzovat účinek 14-ti denní HSD na expresi a distribuci PKC δ a ϵ mezi cytosolickou a membránovou frakcí v levě komoře (LV).

Cíl II

Bylo dokázáno, že deficit funkčního CD36 má vliv na toleranci k srdečnímu I/R poškození (Irie *et al.*, 2003). Druhým cílem bylo tedy analyzovat vliv funkčního CD36 na citlivost vůči ischemickým komorovým arytmiím a rozsah infarktu myokardu (MI) u kolenního kmene SHR-4 a transgenních kmenech SHR-Cd36 a porovnat s kontrolním kmenem SHR, a hledat potenciální mechanismy.

Specifické cíle:

- Analyzovat výskyt a závažnost ischemických a reperfúzních komorových arytmií a velikost infarktu vyvolaného okluzí koronární arterie na modelu otevřeného hrudníku a na modelu izolovaných perfundovaných srdcí.
- Zkoumat vliv deplece katecholaminů na výskyt a závažnost ischemických a reperfúzních komorových arytmií a velikost MI

vyvolaného okluzí koronární arterie v izolovaných perfundovaných srdcích.

- Srovnat koncentraci FFA a TAG v séru, TAG v srdci a složení FA v sérových a srdečních fosfolipidech u SHR a SHR-Cd36.
- Analyzovat výkon srdce zátěžovými testy po β_1 -AR dobutaminové stimulaci pomocí echokardiografie v obou kmenech.
- Stanovit expresi a funkční vlastnosti hlavních komponentů AC signalizace, včetně β -ARs, G proteinů, AC a PKA v LV myokardu u potkanů SHR a SHR-Cd36.

8 METODY

Vysokosacharózová dieta

Potkani SHR a SHR-4 byly po dobu 14 dnů krmeny HSD obsahující v % kalorií: 60 % sacharózy, 20 % proteinů a 20 % tuků. Kontrolní potkani dostávali standardní krmění.

Experimenty se skládaly z následujících kroků a metodických přístupů:

Stanovení velikosti infarktu a komorových arytmií

Echokardiografické měření

Příprava homogenitu, cytosolické a membránové frakce ze srdeční tkáně, elektroforéza a Western blot

Stanovení koncentrace TAG, inzulinu, glukózy a FFA pomocí enzymatické analýzy

Analýza profilu FA v sérových a srdečních fosfolipidech

Vazebné studie β -AR

EIA analýza aktivity AC

Podání reserpinu

SHR a transgenním SHR-Cd36 potkanům byl podán reserpin (alkaloid, který snižuje množství katecholaminů; 0,15 mg/kg rozpuštěno ve směsi bezvodé kyseliny octové a fyziologického roztoku 1:50 v/v) i.p. 24 h před ischemií. Kontrolní skupina potkanů dostala stejný objem směsi bez reserpinu.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cíl I

V rámci tohoto cíle jsme studovali vztah mezi CD36, aktivací isoformem PKC δ a ϵ a projevy inzulínové rezistence v srdcích kmene SHR a kongenního kmene SHR-4.

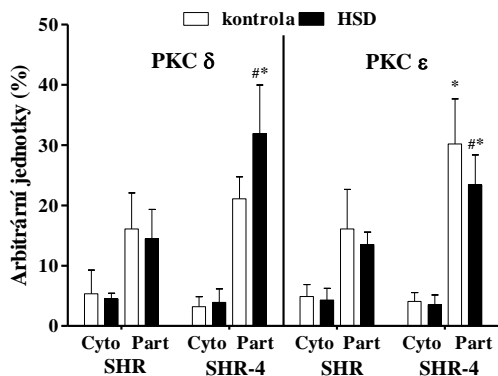
Hypertrofie, metabolity lipidů a glukózy a vliv podání HSD

V této studii jsme prokázali, že kongenní kmen SHR-4 s funkčním CD36 byl méně inzulín-rezistentní, což je v souladu s předchozími poznatky (Pravenec *et al.*, 1999). Dále jsme pozorovali, že srdeční hypertrofie, charakteristický rys progenitorového kmene SHR, byla u kongenního kmene SHR-4 potlačena. Přítomnost funkčního CD36 přispěla také k snížení hladiny sérového inzulínu a FFA u SHR-4 krměného standardní laboratorní dietou a pomohla tak zabránit hyperglykémii a hyperinzulinémií po podání HSD. U SHR-4 zvířat krměných standardní laboratorní dietou jsme pozorovali tendenci k vyšší koncentraci srdečních TAG, což podporuje zjištění, že transport FA do srdce je vyšší u SHR-4 ve srovnání s SHR (Hajri *et al.*, 2001). Zatímco HSD způsobila akumulaci TAG v srdcích SHR, u SHR-4 k žádnému navýšení nedošlo. Předchozí nálezy ukázaly, že CD36 se také nachází na mitochondriální membráně a hraje roli v oxidaci FA (Smith *et al.*, 2011), což naznačuje, že přijaté FA jsou v srdcích SHR-4

transportovány do mitochondrií pomocí funkčního CD36 a dochází zde k jejich oxidaci. To by mohlo vysvětlit, proč po podání HSD nedochází u SHR-4 ke změnám v koncentraci TAG v srdci. Naše výsledky naznačují, že funkční CD36 zlepšuje metabolismus FA v SHR-4, což by mohlo přispět ke snížení hypertrofie. Bylo publikováno, že porucha energetické rovnováhy může vést k hypertrofii (Glatz *et al.*, 2006).

Expresí PKC δ a ϵ v srdci a vliv HSD

U SHR-4 jsme pozorovali vyšší expresi PKC ϵ než u SHR (Obr. 1) a zvýšenou lokalizaci na membránovou, která znamená aktivaci enzymu. Dosavadní studie nicméně ukázaly, že zvýšená aktivace PKC ϵ hraje roli při vývoji inzulínové rezistence v kosterním svalu (Laybutt *et al.*, 1999; Dey *et al.*, 2007; Dasgupta *et al.*, 2011).



Obr. 1: Expresí PKC δ a ϵ v cytosolu (cyto) a membránové frakci (part) levé komoře potkanů SHR a SHR-4 krměných kontrolní nebo vysokosacharózovou dietou (HSD). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM; * $P < 0.05$ SHR-4 vs. odpovídající SHR; # $P < 0.05$ HSD vs. odpovídající kontroly

Naše výsledky podporuje skutečnost, že aktivace PKC ϵ v srdci inhibuje apoptózu vyvolanou hyperglykemií a také snižuje hyperglykemií způsobenou oxidačním stresem, a tak zabraňuje diabetické kardiomyopatii (Malhotra *et al.*, 2005). V kontextu s našimi výsledky předpokládáme, že aktivovaná PKC ϵ v srdci SHR-4 je spojena se zlepšeným transportem LCFA do srdce po vložení CD36 (Hajri *et al.*, 2001). Naše představa koreluje se zjištěním že LCFA mohou PKC ϵ aktivovat (Huang *et al.*, 1997; Ragheb *et al.*, 2009).

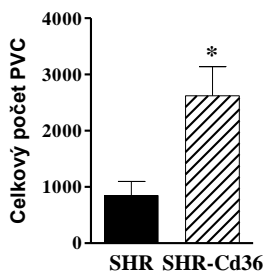
Stimulace HSD měla odlišné účinky na isoformy PKC δ a ϵ u obou kmenů (Obr. 1). Po podání HSD byla PKC δ zvýšena a PKC ϵ snížena v srdcích SHR-4 společně se zvýšenou koncentrací inzulinu v séru, zatímco u SHR nebyl pozorován žádný efekt. Luiken *et al.* (2009) nepozorovali žádnou změnu v expresi PKC δ a PKC ϵ , nebo její translokaci po akutním podání inzulinu v izolovaných srdečních myocytech potkanů (Lewis rat). Je známo, že PKC δ i PKC ϵ jsou modulátory inzulinové signalizace v kosterním svalu (Laybutt *et al.*, 1999; Waraich *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2010). Zdá se však, že se v srdci reakce PKC δ a PKC ϵ na zvýšenou koncentraci inzulinu a glukózy od kosterního svalu liší. Navíc D'Alessandro *et al.* (2008) našli zvýšenou expresi PKC ϵ v membránové frakci ze srdcí inzulin rezistentních potkanů po podávání HSD. Vzhledem k těmto kontroverzním výsledkům se domníváme, že isoformy PKC by v naší studii mohly být regulovány ještě dalšími faktory vedle zvýšené koncentrace inzulinu. Bylo dokumentováno, že chronické podávání HSD představuje metabolický stres, který je provázen zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (Busserolles *et al.*, 2002), které mohou regulovat PKC (Duquesnes *et al.*, 2011). Domníváme se proto, že naše výsledky představují možnou souvislost mezi funkčním CD36 a aktivací PKC δ v reakci na stres vyvolaný po podávání HSD u geneticky manipulované SHR-4.

Cíl II

Po studiu PKC a inzulinové rezistence v kongenním kmenu SHR-4 a SHR jsme se rozhodli zkoumat toleranci k I / R poškození v těchto kmenů. Zjistili jsme tendence k menšího IS, stejně jako tendence k většímu množství PVC v SHR-4 ve srovnání s SHR. Vzhledem k tomu, že rozdíly mezi kmeny nebyly statisticky významné, jsme se rozhodli porovnat další CD36 genetické upravený model, SHR-Cd36, který je kromě wild-typ genu Cd36 100% geneticky identické s kmenem SHR. Vyšší exprese Cd36 u transgenního kmene SHR-Cd36 (Pravenec et al., 2008a) může vysvětlit rozdíly v toleranci k I / R zranění mezi SHR-4 a SHR-Cd36.

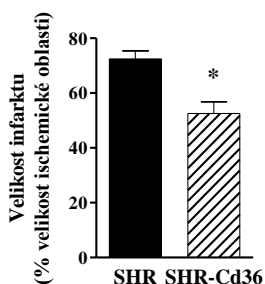
Vliv CD36 na I/R poškození

V této studii jsme zjistili, že přítomnost funkčního CD36 u transgenního kmene SHR-Cd36 byla spojena se zvýšeným výskytem ischemických komorových arytmií (Obr. 2). Bylo navrženo, že fatální arytmie při akutní ischemii myokardu by mohl způsobit zvýšený transport FA do srdce během MI (Oliver, 2001). Bylo by tedy možné, že SHR-Cd36 s wild-type Cd36 je náchylný k arytmiím vzhledem k zvýšenému transportu FA. Tento předpoklad vyvrátil experimenty, kdy jsme izolované srdce SHR-Cd36 perfundoval Krebsovým-Henseleitovým roztokem, který neobsahoval FA a přesto zvýšená náchylnost k arytmiím přetrvávala.



Obr. 2: Celkový počet předčasných komorových stahů (PVCs) během ischemie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SEM; $P < 0.05$ vs. SHR

Toto zjištění naznačuje, že proarytmický účinek je výsledkem vnitřního faktoru nezávislého na zvýšeném příjmu FA srdečními buňkami při akutním ischemickém poškození. Další experimenty proto vycházely z předpokladu, že roli může hrát vyšší citlivost ke stimulaci katecholaminy u SHR-Cd36. Deplece katecholaminů reserpinem totiž zcela eliminovala zvýšenou arytmogenezí v srdcích SHR-Cd36, což naznačuje významnou roli adrenergických receptorů při vzniku arytmií během ischemií u SHR-Cd36. Předchozí studie skutečně ukázaly na zhoršenou odezvu po stimulaci α -AR, stejně jako β -AR u SHR (Labarthe *et al.*, 2005). Kromě toho byl Cd36 původně identifikován jako gen regulující lipolýzu vyvolanou stimulací β -AR v izolovaných tukových buňkách a zmutovaná alela u SHR byla spojena se sníženou citlivostí na katecholaminy (Aitman *et al.*, 1997). Na rozdíl od proarytmického efektu, byla velikost infarktu na modelu otevřeného hrudníku (Obr. 3) stejně jako v perfundovaném srdci významně menší u SHR-Cd36, než u SHR.



Obr. 3: Velikost infarktu myokardu vyjádřená jako procento ischemické oblasti. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM; $P < 0.05$ vs. SHR

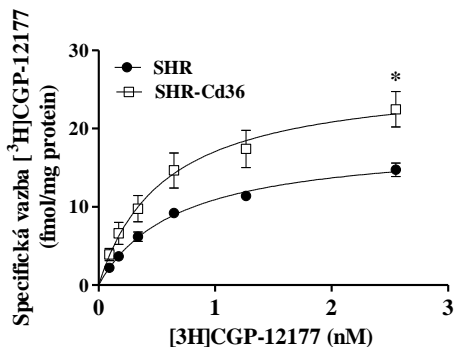
Opačné změny dvou koncových bodů ischemie lze vysvětlit různými faktory, které se podílejí na patogenních mechanismech. Irie *et al.* (2003) pozorovali vyšší citlivost k akutní ischemii kvůli energetickému deficitu u Cd36-null myši, což je v souladu s našimi výsledky. Nicméně v jiné studii, inhibice CD36 způsobila menší IS po I/R poškození (Bessi *et al.*, 2012). Dále bylo zjištěno, že inhibice CD36 brání ztrátě srdeční funkce na modelu

inzulinové rezistence vyvolané lipidy v srdci (Angin *et al.*, 2012), na druhou stranu u Cd36 knock-out myši se snížil srdeční výkon (Pietka *et al.*, 2012). Role CD36 v mechanismu srdeční funkce a toleranci k I/R poškození je zatím rozporuplná a informace jsou velmi omezené, proto nedovedeme tyto kontraverzní výsledky vysvětlit.

Bylo prokázáno, že fluidita membrány závislá na složení FA v membránových fosfolipidech, hraje roli v protekci před I/R poškozením (Hlavackova *et al.*, 2007; Zeghichi-Hamri *et al.*, 2010). Zároveň je složení FA v membránách fosfolipidů myokardu citlivé na druh FA přijímaných ve stravě (Hlavackova *et al.*, 2007; Balkova *et al.*, 2009; Slee *et al.*, 2010). Proto by se dalo očekávat zvýšené zabudování LCFA do membránových fosfolipidů myokardu u SHR-Cd36. Překvapivě však nebyly pozorovány mezi oběma kmeny žádné rozdíly v zastoupení FA srdečních fosfolipidů. Předpokládáme proto, že zvýšené množství FA transportované do myokardu SHR-CD36 slouží především jako zdroj energie.

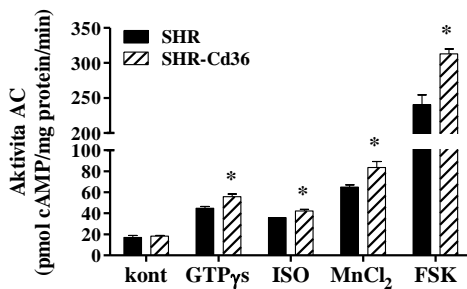
β -AR signální dráha v proarytmogenním efektu CD36

Při analýze zapojení β -AR signální dráhy ve zvýšené arytmogenezi u SHR-Cd36 jsme u tohoto kmene našli zvýšenou hustotu β -AR (Obr. 4) a zvýšenou reakci na stimulaci agonistou β 1-AR, dobutaminem, ve srovnání s SHR. Tyto výsledky jsou v souladu se studií, kde zvýšená stimulace β -AR přispívá k fatálním arytmiím (Bassiakou *et al.*, 2009). Dále blokací β -AR lze snížit ischemický MI a arytmiie vyvolané podvazem, což má za následek snížení koncentrace intracelulárního cAMP a aktivaci PKA (Lu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).



Obr. 4: Saturační křivky zobrazující specifickou vazbu [³H]CGP-12177 v buněčných membránách myokardu SHR (uzavřené symboly) a SHR-Cd36 (otevřené symboly). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SEM; *P<0.05 vs. SHR

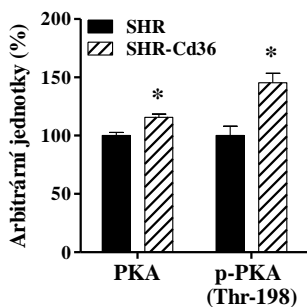
Trimerní G proteiny fungují jako klíčové regulační komponenty v signalizaci aktivované β -AR a mohou být ovlivněné různými patofyziologickými podmínkami, jako je srdeční hypertrofie, arytmie a srdeční selhání (Zolk *et al.*, 2000; Slotkin *et al.*, 2003). Přestože nebyly nalezené žádné výrazné změny v expresi stimulačních G (G_s) a inhibičních G proteinů (G_i), aktivita AC po různé stimulaci byla vyšší v membráně myokardu SHR-Cd36 než u SHR (Obr. 5).



Obr. 5: Aktivita adenylylcyklasy měřená při normálních podmínkách a po stimulaci GTP γ S, isoproterenolem (ISO), chloridem manganatým (MnCl₂) nebo forskolinem (FSK). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SEM; *P<0.05 vs. SHR

Zvýšená aktivita AC byla pozorována po přímé stimulaci enzymu Mn^{2+} ionty nebo po stimulaci enzymu a G_s proteinu forskolinem a také po stimulaci G_s proteinu GTP γ S. Stimulace β -AR isoproterenolem zároveň zvýšila aktivitu AC. Zvýšená citlivost enzymu AC k stimulaci lze vysvětlit vyšší proteinovou expresí AC5/6 v myokardu SHR-Cd36. Bylo prokázáno, že AC5 i AC6 hrají důležitou roli v kontraktilní odpovědi srdečního svalu. Snížená kontraktilita po stimulaci β -AR byla pozorována jak v AC5 knock-out myších (Okumura *et al.*, 2007), tak po odstranění AC6 (Tang *et al.*, 2008). Myši s nadměrnou expresí AC6 zároveň projeví zvýšenou kontraktilní odpověď na dobutamin (Takahashi *et al.*, 2006).

PKA fosforyluje a aktivuje řadu klíčových proteinů spojovaných s mechanismem excitace-kontrakce, jako je fosfolamban (PLB), L-tyt Ca^{2+} kanálů, ryanodinový receptor 2 a troponin I (TnI) (Xiang & Kobilka, 2003). Již dříve bylo prokázáno, že stimulace β -AR vedla k fosforylaci PKA, PLB a TnI (Di Benedetto *et al.*, 2008) a zvýšená exprese PKA vedla k dilatační kardiomyopatii a arytmiím (Antos *et al.*, 2001). Naše současné výsledky jsou v souladu s těmito poznatky. SHR-Cd36 se zvýšenými arytmiemi a kontrakční odezvou měl vyšší expresi katalytických (C) podjednotek PKA, fosforylované C podjednotky PKA (Obr. 6), ale i zvýšený poměr p-PKA/PKA, naznačující zvýšenou aktivitu PKA.



Obr. 6: Exprese katalytické podjednotky proteinkinasy A a její fosforylované formy (Thr-198) v SHR a SHR-Cd36. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. SHR

10 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo studovat úlohu CD36 v signálních drahách spojených s inzulinovou rezistencí a tolerancí k I/R poškození v myokardu, proto jsme srovnávali SHR s nefunkčním CD36 s jeho geneticky modifikovanými kmeny, SHR-4 a SHR-Cd36.

Cíl I

- Prokázali jsme, že vložení úseku chromozomu 4 obsahujícího gen pro Cd36 z kmene BN na genom SHR, snížilo koncentraci FFA, inzulinu a glukózy v séru, což naznačuje zlepšení citlivosti k inzulinu u kongenního kmene SHR-4.
- SHR-4 vykázal vyšší expresi PKC ϵ a zvýšenou translokaci na membrány, což naznačuje zvýšenou aktivitu PKC ϵ . Tyto nálezy podporují představu, že kmen SHR-4 má ve srovnání s SHR zlepšený transport LCFA do myokardu, který může být aktivován touto isoformou PKC.
- Pozorovali jsme rozdílnou reakci obou kmenů na HSD. Zatímco HSD zhoršila metabolické traits lipidů a glukózy u SHR, SHR-4 při přetížení sacharózou nevykazoval žádné známky inzulinové rezistence. HSD ovlivnila PKC ϵ a PKC δ pouze u SHR-4. Tyto výsledky ukazují, že gen pro Cd36 ovlivňuje schopnost reagovat na sacharózové přetížení tím, že reguluje expresi PKC δ a PKC ϵ .

Cíl II

- Pomocí transgenního kmene SHR-Cd36 s wild-type Cd36 jsme ukázali, že vložení genu pro Cd36 ovlivní ischemickou toleranci. Zjistili jsme, že u SHR-Cd36 byl zvýšený výskyt a závažnost ischemických komorových arytmií a menší velikost infarktu vyvolaného okluzí koronární arterie.
- Nepozorovali jsme žádné významné rozdíly v složení FA srdečních fosfolipidů mezi kmeny, což naznačuje, že zvýšená arytmogeneze v SHR-Cd36 není důsledkem změn ve složení FA membránových fosfolipidů, které mohou hrát roli v toleranci vůči I/R poškození.
- Reserpin potlačil zvýšený výskyt a závažnost ischemických komorových arytmií v SHR-Cd36, což naznačuje na zapojení katecholaminů. Dobutaminový stresový test zesílil tento předpoklad, kde jsme u transgenních kmenů zaznamenali zvýšenou odpověď na stimulaci β -AR.
- Ukázali jsme, že přítomnost wild-typu Cd36 regulovala některé složky β -AR signální dráhy. Pozorovali jsme zvýšenou hustotu β -AR, zvýšenou citlivost AC a vyšší expresi proteinů AC a PKA. Tato zjištění ukazují na spojení mezi genem CD36, β -AR signální dráhou a zvýšenou citlivostí na I/R arytmiie u SHR.

Můžeme konstatovat, že CD36 hraje důležitou roli regulaci energetického metabolismu v srdečního svalu prostřednictvím PKC δ a PKC ϵ . CD36 rovněž ovlivňuje toleranci srdci k I/R poškození v závislosti na β -AR signální dráze. Z našich výsledků vyplývá, že CD36 je nejen

důležitým faktorem pro udržení fyziologické funkce srdce, ale také hraje důležitou roli v signálních dráhách, které se uplatňují za různých patologických stavů.

11 REFERENCES/ POUŽITÁ LITERATURA

- Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahim A, Abumrad NA, Stanton LW & Scott J (1999). Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* **21**, 76-83.
- Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Dore C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M & Scott J (1997). Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* **16**, 197-201.
- Angin Y, Steinbusch LK, Simons PJ, Greulich S, Hoebbers NT, Douma K, van Zandvoort MA, Coumans WA, Wijnen W, Diamant M, Ouwens DM, Glatz JF & Luiken JJ (2012). CD36 inhibition prevents lipid accumulation and contractile dysfunction in rat cardiomyocytes. *Biochem J* **448**, 43-53.
- Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR & Olson EN (2001). Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ Res* **89**, 997-1004.
- Balkova P, Jezkova J, Hlavackova M, Neckar J, Stankova B, Kolar F, Novak F & Novakova O (2009). Dietary polyunsaturated fatty acids and adaptation to chronic hypoxia alter acyl composition of serum and heart lipids. *Brit J Nutr* **102**, 1297-1307.
- Bassiakou E, Xanthos T & Papadimitriou L (2009). The potential beneficial effects of beta adrenergic blockade in the treatment of ventricular fibrillation. *Eur J Pharmacol* **616**, 1-6.
- Bessi VL, Labbe SM, Huynh DN, Menard L, Jossart C, Febbraio M, Guerin B, Bentourkia M, Lecomte R, Carpentier AC, Ong H & Marleau S (2012). EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischæmic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res* **96**, 99-108.
- Busserolles J, Zimowska W, Rock E, Rayssiguier Y & Mazur A (2002). Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci* **71**, 1303-1312.

- Coort SLM, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JFC, Luiken JJFP (2007) Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol Cell Biochem* **299**, 5-18
- D'Alessandro ME, Chicco A & Lombardo YB (2008). Dietary fish oil reverses lipotoxicity, altered glucose metabolism, and nPKC epsilon translocation in the heart of dyslipemic insulin-resistant rats. *Metabolism* **57**, 911-919.
- Dasgupta S, Bhattacharya S, Maitra S, Pal D, Majumdar SS, Datta A & Bhattacharya S (2011). Mechanism of lipid induced insulin resistance: Activated PKC epsilon is a key regulator. *Bba-Mol Basis Dis* **1812**, 495-506.
- Dey D, Bhattacharya A, Roy S & Bhattacharya S (2007). Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase C epsilon. *Biochem Bioph Res Co* **357**, 474-479.
- Di Benedetto G, Zoccarato A, Lissandron V, Terrin A, Li X, Houslay MD, Baillie GS & Zaccolo M (2008). Protein kinase a type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res* **103**, 836-844.
- Duquesnes N, Lezoualc'h F & Crozatier B (2011). PKC-delta and PKC-epsilon: Foes of the same family or strangers? *J Mol Cell Cardiol* **51**, 665-673.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F & Lohse MJ (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *P Natl Acad Sci USA* **96**, 7059-7064.
- Febbraio M & Silverstein RL (2007). CD36: Implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell B* **39**, 2012-2030.
- Glatz JFC, Bonen A, Ouwens DM & Luiken JJFP (2006). Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart. *Cardiovasc Drug Ther* **20**, 471-476.
- Hajri T, Ibrahimi A, Coburn CT, Knapp FF, Kurtz T, Pravenec M & Abumrad NA (2001). Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* **276**, 23661-23666.
- Hlavackova M, Neckar J, Jezkova J, Balkova P, Stankova B, Novakova O, Kolar F & Novak F (2007). Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med* **232**, 823-832.
- Huang XP, Pi YQ, Lokuta AJ, Greaser ML & Walker JW (1997). Arachidonic acid stimulates protein kinase C-epsilon redistribution in heart cells. *J Cell Sci* **110**, 1625-1634.
- Irie H, Krukenkamp IB, Brinkmann JF, Gaudette GR, Saltman AE, Jou W, Glatz JF, Abumrad NA & Ibrahimi A (2003). Myocardial recovery from ischemia is impaired in CD36-null mice and restored by myocyte CD36 expression or medium-chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6819-6824.

- Jacob AI, Horovitz-Fried M, Aga-Mizrachi S, Brutman-Barazani T, Okhrimenko H, Zick Y, Brodie C & Sampson SR (2010). The regulatory domain of protein kinase C delta positively regulates insulin receptor signaling. *J Mol Endocrinol* **44**, 155-169.
- Labarthe F, Khairallah M, Bouchard B, Stanley WC & Des Rosiers C (2005). Fatty acid oxidation and its impact on response of spontaneously hypertensive rat hearts to an adrenergic stress: benefits of a medium-chain fatty acid. *Am J Physiol-Heart C* **288**, H1425-H1436.
- Laybutt DR, Schmitz-Peiffer C, Saha AK, Ruderman NB, Biden TJ & Kraegen EW (1999). Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am J Physiol-Endoc M* **277**, E1070-E1076.
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A & Dorn GW (2000). Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts - Critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707-1714.
- Lissandron V & Zaccolo M (2006). Compartmentalized cAMP/PKA signalling regulates cardiac excitation-contraction coupling. *J Muscle Res Cell M* **27**, 399-403.
- Lu YJ, Zhang Y, Shan HL, Pan ZW, Li XL, Li BX, Xu CQ, Zhang BS, Zhang FM, Dong DL, Song WQ, Qiao GF & Yang BF (2009). MicroRNA-1 downregulation by propranolol in a rat model of myocardial infarction: a new mechanism for ischaemic cardioprotection. *Cardiovasc Res* **84**, 434-441.
- Luiken JJFP, Omens DM, Habets DDJ, van der Zon GCM, Coumans WA, Schwenk RW, Bonen A & Glatz JFC (2009). Permissive action of protein kinase C-zeta in insulin-induced CD36-and GLUT4 translocation in cardiac myocytes. *J Endocrinol* **201**, 199-209.
- Malhotra A, Begley R, Kang BPS, Rana I, Liu J, Yang GP, Mochly-Rosen D & Meggs LG (2005). PKC-epsilon-dependent survival signals in diabetic hearts. *Am J Physiol-Heart C* **289**, H1343-H1350.
- Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, Bai Y, Gao SM, Yuan ZR, Iwatsubo K, Uluhan C, Kawabe J, Ghosh K, Vatner SF & Ishikawa Y (2007). Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation* **116**, 1776-1783.
- Oliver MF (2001). Prevention of ventricular fibrillation during acute myocardial ischemia: control of free fatty acids. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **6**, 213-217.
- Pietka TA, Sulkin MS, Kuda O, Wang W, Zhou D, Yamada KA, Yang K, Su X, Gross RW, Nerbonne JM, Efimov IR & Abumrad NA (2012). CD36 influences myocardial Ca²⁺ homeostasis and phospholipid metabolism: Conduction anomalies in CD36 deficient mice during fasting. *J Biol Chem* **287**, 38901-38912.

- Pravenec M, Landa V, Zidek V, Musilova A, Kren V, Kazdova L, Aitman TJ, Glazier AM, Ibrahim A, Abumrad NA, Qi NN, Wang JM, St Lezin EM & Kurtz TW (2001). Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet* **27**, 156-158.
- Pravenec M, Zidek V, Simakova M, Kren V, Krenova D, Horky K, Jachymova M, Mikova B, Kazdova L, Aitman TJ, Churchill PC, Webb RC, Hingarh NH, Yang Y, Wang JM, St Lezin EM & Kurtz TW (1999). Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors in spontaneous hypertension. *J Clin Invest* **103**, 1651-1657.
- Ragheb R, Shanab GML, Medhat AM, Seoudi DM, Adeli K & Fantus IG (2009). Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: Evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. *Biochem Bioph Res Co* **389**, 211-216.
- Ravingerova T, Bernatova I, Matejikova J, Ledvenyiova V, Nemcekova M, Pechanova O, Tribulova N & Slezak J (2011). Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Exp Clin Cardiol* **16**, E23-E29.
- Slee EL, McLennan PL, Owen AJ & Theiss ML (2010). Low dietary fish-oil threshold for myocardial membrane n-3 PUFA enrichment independent of n-6 PUFA intake in rats. *J Lipid Res* **51**, 1841-1848.
- Slotkin TA, Auman JT & Seidler FJ (2003). Ontogenesis of beta-adrenoceptor signaling: Implications for perinatal physiology and for fetal effects of tocolytic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 1-7.
- Smith BK, Jain SS, Rimbaud S, Dam A, Quadriatero J, Ventura-Clapier R, Bonen A & Holloway GP (2011). FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane, upstream of long-chain acyl-CoA synthetase, and regulates palmitate oxidation. *Biochem J* **437**, 125-134.
- Takahashi T, Tang T, Lai NC, Roth DM, Rebolledo B, Saito M, Lew WYW, Clopton P & Hammond HK (2006). Increased cardiac adenylyl cyclase expression is associated with increased survival after myocardial infarction. *Circulation* **114**, 388-396.
- Tang T, Gao MH, Lai NC, Firth AL, Takahashi T, Guo T, Yuan JXJ, Roth DM & Hammond HK (2008). Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular function via impaired calcium handling. *Circulation* **117**, 61-69.
- Waraich RS, Weigert C, Kalbacher H, Hennige AM, Lutz SZ, Haring HU, Schleicher ED, Voelter W & Lehmann R (2008). Phosphorylation of Ser(357) of rat insulin receptor substrate-1 mediates adverse effects of protein kinase C-delta on insulin action in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **283**, 11226-11233.
- Xiang Y & Kobilka BK (2003). Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* **300**, 1530-1532.

- Xiao RP, Zhu WZ, Zheng M, Cao CM, Zhang YY, Lakatta EG & Han Q (2006). Subtype-specific alpha(1)- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 330-337.
- Zeghichi-Hamri S, de Lorgeril M, Salen P, Chibane M, de Leiris J, Boucher F & Laporte F (2010). Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats. *Nutr Res* **30**, 849-857.
- Zhang L, Xu CQ, Hong YA, Zhang JL, Liu Y, Zhao M, Cao YX, Lu YJ, Yang BF & Shan HL (2010). Propranolol regulates cardiac transient outward potassium channel in rat myocardium via cAMP/PKA after short-term but not after long-term ischemia. *N-S Arch Pharmacol* **382**, 63-71.
- Zolk O, Kouchi I, Schnabel P & Bohm M (2000). Heterotrimeric G proteins in heart disease. *Can J Physiol Pharm* **78**, 187-198.

12 CURRICULUM VITAE

Martina J Klevstig

Born September 24th, 1981 in Norrkoping, Sweden

Education:

- 2007-present Ph.D. studies, Department of Biochemistry, Charles University in Prague, Czech Republic
- 2002-2007 Biochemistry at the Faculty of Science, Charles University in Prague; Master in Science, Thesis: Protein kinase C delta expression in myocardium of spontaneously hypertensive rats: Effect of FAT/CD36 fatty acid translocator.

Teaching experience:

- 2011-present Assistant in the course “Practical course of Biochemistry”, Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic
- 2007-2010 Assistant in the course “Clinical biochemistry - practical course”, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Languages:

- English Advanced (Certificate in Advanced English, University of Cambridge)
- Swedish Native

Grants:

- 2011-2013 Grant Agency of Charles University (GAUK 429611); Altered myocardial ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rat transgenic strain SHR-Tg19 with functional fatty acid transporter FAT/CD36
- 2008-2011 Participant of the grant GACR 305/08/H037 from the Grant Agency of the Czech Republic

13 SELECTED PUBLICATIONS/ SEZNAM PUBLIKACÍ

Publications in international journals:

Publikace článků v mezinárodních časopisech:

Klevstig M, Manakov D, Kasparova D, Brabcova I, Papousek F, Zurmanova J, Zidek V, Silhavy J, Neckar J, Pravenec M, Kolar F, Novakova O, Novotny J (2013). Transgenic rescue of defective Cd36 enhances myocardial adenylyl cyclase signaling in spontaneously hypertensive rats. *Pflug Arch Eur J Phy* (Accepted for publication). IF=4.463

Neckář J, Šilhavý J, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Šimáková M, Seidman JG, Seidman C, Kazdová L, **Klevstig M**, Novák F, Vecka M, Papoušek F, Kurtz TW, Kolář F, Michal Pravenec M (2012). CD36 overexpression predisposes to arrhythmias but reduces infarct size in spontaneously hypertensive rats: gene expression profile analysis. *Physiol Genomics* **44**, 173-182. IF=2.735

Klevstig MJ, Markova I, Burianova J, Kazdova L, Pravenec M, Novakova O, Novak F (2011). Role of FAT/CD36 in novel PKC isoform activation in heart of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* **357**, 163-169. IF=2.057

Publications in collective volume:

Publikace ve sbornících:

Klevstigova M, Markova I, Kazdova L, Burianova J, Novakova O, Novak F (2008). Role of FAT/CD36 in the insulin regulation of PKC- δ and ϵ isoforms expression in rat myocardium. *Atherosklerosa* ISBN 978-80-254-2834-4, 26–29.

Publication of abstracts in international journals:

Publikace abstraktů v mezinárodních časopisech:

Neckar J, Silhavy J, Papousek F, **Klevstig M**, Manakov D, Novotny J, Novakova O, Novak F, Pravenec M, Kolar F (2012). Effect of Cd36 on cardiac ischemic tolerance and adrenergic signaling in spontaneously hypertensive rats. *FASEB J* **26**, 1136.9.

Klevstigova M, Silhavy J, Manakov D, Papousek F, Novotny J, Pravenec M, Kolar F, Novakova O, Novak F, Neckar J (2012). Effect of Cd36 on cardiac ischemic tolerance and adrenergic signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **93**, 110-111.

Neckar J, Silhavy J, Papousek F, **Klevstig M**, Manakov D, Novotny J, Novakova O, Novak F, Pravenec M, Kolar F (2010). Effect of Cd36 on cardiac ischemic tolerance and adrenergic signaling in spontaneously hypertensive rats. *FASEB J* **24**.

Klevstigova M, Markova I, Novakova O, Kazdova L, Pravenec M, Novak F (2009). Transgenic (congenic) expression of FAT/CD36 in spontaneously hypertensive rats ameliorates insulin resistance and upregulates protein kinase C. *FEBS J* **276**, 80.

Klevstigova M, Markova I, Novakova O, Kazdova L, Novak F (2008). Effect of FAT/CD36 on myocardial PKC delta expression and triacylglycerol accumulation in SHR rats. *J Mol Cell Cardiol* **163**, 44.