

Heart fatty acid-binding proteins : role in cardiac fatty acid uptake and marker for cellular damage

Citation for published version (APA):

van Nieuwenhoven, F. A. (1996). *Heart fatty acid-binding proteins : role in cardiac fatty acid uptake and marker for cellular damage*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19960626fn>

Document status and date:

Published: 01/01/1996

DOI:

[10.26481/dis.19960626fn](https://doi.org/10.26481/dis.19960626fn)

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

Oxidation of exogenous long-chain fatty acids (FA) represents the main supply of energy for the heart under physiological conditions. The FA are derived from the circulation and have to cross several barriers before they can be oxidized or, alternatively, incorporated in triacylglycerols or phospholipids. Since FA are poorly soluble in aqueous environments, several non-enzymatic FA-binding proteins (FABPs) are involved in sequestering and transporting FA throughout the body.

The present thesis deals with some aspects of the transport of FA from the circulation to the mitochondria and the role therein of membrane-associated and cytoplasmic FABPs. In addition, the use of the cytoplasmic (heart-type) FABP in the diagnosis of cardiac tissue injury was studied.

A general introduction and outline of the thesis is provided in chapter 1. A short review on the possible functions of cellular fatty acid-binding proteins in heart fatty acid metabolism is given in chapter 2. The roles of the cytoplasmic FABPs and of the more recently discovered membrane-associated FABPs are discussed. The regulation of expression of the membrane protein fatty acid translocase (FAT) and of H-FABP is reviewed in more detail, since these proteins are the main subject of the research described in this thesis.

FA transport across the endothelial cytoplasm was thought to be facilitated by an intracellular FABP. Studies described in chapter 3, however, show that the endothelial cells contain only minor amounts of H-FABP or liver-type (L-) FABP. In addition, no significant fatty acid-binding activity was found in the cytosolic protein fraction of these cells. We conclude that diffusion of non-protein bound ('free') FA is the main mechanism of FA-transport across the endothelial cytoplasm.

Several membrane-associated proteins are implicated in the transport of FA across the sarcolemma of cardiomyocytes. One of these proteins is the 88 kDa membrane protein FAT. In chapter 4, it is shown that FAT and H-FABP are co-expressed in heart and skeletal muscles, and that both proteins show a similar upregulation during heart development. Co-expression of FAT and H-FABP indicates that the proteins might have related biological functions. In addition, the expression of both proteins in tissues with high FA metabolism and the upregulation during heart development, when FA utilization increases, support the suggested roles for both proteins in FA metabolism.

To find more definite proof for the role of FAT in FA-uptake, this protein was transfected in a cell-line derived from rat heart (H9c2). This cell-line was found to have both cardiac and skeletal muscle characteristics and since H9c2 cells do not express FAT, we reasoned that this cell-line forms a suitable model system to study FAT function. Chapter 5 describes the transfection technique and shows that we achieved to stably transfect H9c2 cells with FAT, yielding several FAT expressing cell-lines. These cell-lines are now available for FA-uptake studies.

The second part of the thesis (chapter 6 through 8) handles the applicability of measuring the release of intracellular proteins to detect cellular damage. A brief introduction on cellular protein release as marker for myocardial tissue injury is given in chapter 6.

Since the issue was not settled whether small proteins are released earlier from damaged cells than are larger proteins, studies were performed on the release characteristics of proteins with different molecular masses from damaged neonatal cardiomyocytes. As is shown in chapter 7, the release of soluble cytoplasmic proteins is independent of molecular mass. It is concluded that the disruption of the sarcolemma is

a relatively fast process resulting in the simultaneous release of the soluble cytoplasmic proteins, irrespective of their molecular mass.

Chapter 8 discusses the problem that H-FABP and myoglobin are non-specific markers for heart tissue injury, since both proteins are also present in skeletal muscles. It is demonstrated, that the ratio of myoglobin over H-FABP in plasma after tissue injury reflects the ratio of both proteins in the affected tissue. Since this ratio differs between heart (5) and skeletal muscles (20-70) it can be used to differentiate myocardial injury from skeletal muscle injury.

A general discussion of the studies presented in this thesis is provided in chapter 9. The main conclusions from the research described in the present thesis are the following:

- 1) Since endothelial cells contain only minor amounts of a cytoplasmic FABP, the main mechanism of transport of fatty acids across the endothelial cytoplasm involves diffusion of the non-protein bound ('free') fatty acids rather than FABP-facilitated diffusion.
- 2) The process of fatty acid uptake across the sarcolemma is still incompletely understood and may include a role of membrane-associated fatty acid-binding proteins, like fatty acid translocase (FAT). Since fatty acids are the most important energy substrate for the heart, the uptake process is important and further research is required to gain a better understanding of the mechanism of fatty acid uptake, and its regulation, by the cardiomyocyte.
- 3) The release of cytoplasmic proteins from damaged cardiomyocytes is independent of their molecular mass. Proteins from other cellular compartments, however, show different release characteristics.
- 4) Determination of the ratio of myoglobin over H-FABP in plasma upon muscle tissue injury is a useful method to distinguish myocardial from skeletal muscle injury. Clinical trials will have to confirm our findings, and rapid tests to determine myoglobin and H-FABP values in plasma will have to be developed, before this ratio can become clinically applicable.



SAMENVATTING

Het tweede gedeelte van dit proefschrift behandelt het gebruik van de uitstort van intracellulaire eiwitten om celschade aan te tonen. Dit principe kan bijvoorbeeld gebruikt worden om de hartschade na een hartinfarct te bepalen. Hoofdstuk 6 bevat een korte inleiding over het gebruik van de uitstort van celeiwitten om hartspier beschadiging aan te tonen.

Omdat het onduidelijk was of kleine eiwitten na celschade eerder de cel uitstromen dan grotere eiwitten werd een studie verricht naar het uitstortgedrag van eiwitten met verschillende molecuulmassa's. Zoals in hoofdstuk 7 is beschreven, is aangetoond dat het uitstortgedrag onafhankelijk is van de molecuulmassa van het eiwit. De conclusie is dat de beschadiging van de celmembranen een relatief snel proces is waarna de oplosbare eiwitten in de cel tegelijkertijd worden uitgestort.

Hoofdstuk 8 behandelt het probleem dat zowel H-FABP en myoglobine niet specifieke markers zijn voor hartspierschade, omdat beide eiwitten ook in skeletspierweefsel voorkomen. In dit hoofdstuk is aangetoond dat de verhouding van myoglobine ten opzichte van H-FABP in bloedplasma na weefselbeschadiging overeenkomt met de verhouding in het beschadigde weefsel. Omdat de verhouding myoglobine/H-FABP sterk verschilt tussen hart (5) en skeletspierweefsel (20-70), kan deze goed gebruikt worden om onderscheid te maken tussen hartschade en skeletspierschade.

Hoofdstuk 9 bevat een algemene discussie gebaseerd op de resultaten van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift. De belangrijkste conclusies zijn:

- 1) Omdat endotheelcellen slechts zeer kleine hoeveelheden cytoplasmatisch FABP bevatten is diffusie van niet aan eiwit gebonden vetzuren het belangrijkste mechanisme van vetzuurtransport door het cytoplasma van deze cel.
- 2) Het proces van de opname van vetzuren over de celmembranen van hartspiercellen is nog steeds niet helemaal duidelijk en waarschijnlijk spelen membraaneiwitten zoals het fatty acid translocase (FAT) hierin ook een rol. Omdat vetzuren de belangrijkste energiebron van het hart zijn, is kennis over dit opnameproces belangrijk. Vervolgonderzoek is dan ook nodig om het mechanisme van vetzuropname, en de regulatie hiervan, beter te kunnen begrijpen.
- 3) De uitstort van oplosbare cytoplasmatische eiwitten uit beschadigde hartspiercellen is onafhankelijk van hun molecuulmassa. Eiwitten uit andere cel-compartimenten vertonen echter een verschillend uitstortgedrag.
- 4) Bepaling van de verhouding van de concentraties van myoglobine en H-FABP in plasma na spierweefselbeschadiging is een bruikbare methode om hartspierschade te onderscheiden van skeletspierschade. Voordat deze bevinding in de praktijk toegepast kan worden zullen grote klinische onderzoeken de door ons gevonden resultaten moeten bevestigen en zullen er snelle testen ontwikkeld moeten worden om myoglobine en H-FABP in plasma te bepalen.

Het tweede gedeelte van dit proefschrift behandelt het gebruik van de uitstort van intracellulaire eiwitten om celschade aan te tonen. Dit principe kan bijvoorbeeld gebruikt worden om de hartschade na een hartinfarct te bepalen. Hoofdstuk 6 bevat een korte inleiding over het gebruik van de uitstort van celeiwitten om hartspier beschadiging aan te tonen.

Omdat het onduidelijk was of kleine eiwitten na celschade eerder de cel uitstromen dan grotere eiwitten werd een studie verricht naar het uitstortgedrag van eiwitten met verschillende molecuulmassa's. Zoals in hoofdstuk 7 is beschreven, is aangetoond dat het uitstortgedrag onafhankelijk is van de molecuulmassa van het eiwit. De conclusie is dat de beschadiging van de celmembranen een relatief snel proces is waarna de oplosbare eiwitten in de cel tegelijkertijd worden uitgestort.

Hoofdstuk 8 behandelt het probleem dat zowel H-FABP en myoglobine niet specifieke markers zijn voor hartspierschade, omdat beide eiwitten ook in skeletspierweefsel voorkomen. In dit hoofdstuk is aangetoond dat de verhouding van myoglobine ten opzichte van H-FABP in bloedplasma na weefselbeschadiging overeenkomt met de verhouding in het beschadigde weefsel. Omdat de verhouding myoglobine/H-FABP sterk verschilt tussen hart (5) en skeletspierweefsel (20-70), kan deze goed gebruikt worden om onderscheid te maken tussen hartschade en skeletspierschade.

Hoofdstuk 9 bevat een algemene discussie gebaseerd op de resultaten van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift. De belangrijkste conclusies zijn:

- 1) Omdat endotheelcellen slechts zeer kleine hoeveelheden cytoplasmatisch FABP bevatten is diffusie van niet aan eiwit gebonden vetzuren het belangrijkste mechanisme van vetzuurtransport door het cytoplasma van deze cel.
- 2) Het proces van de opname van vetzuren over de celmembranen van hartspiercellen is nog steeds niet helemaal duidelijk en waarschijnlijk spelen membraaneiwitten zoals het fatty acid translocase (FAT) hierin ook een rol. Omdat vetzuren de belangrijkste energiebron van het hart zijn, is kennis over dit opnameproces belangrijk. Vervolgonderzoek is dan ook nodig om het mechanisme van vetzuropname, en de regulatie hiervan, beter te kunnen begrijpen.
- 3) De uitstort van oplosbare cytoplasmatische eiwitten uit beschadigde hartspiercellen is onafhankelijk van hun molecuulmassa. Eiwitten uit andere cel-compartimenten vertonen echter een verschillend uitstortgedrag.
- 4) Bepaling van de verhouding van de concentraties van myoglobine en H-FABP in plasma na spierweefselbeschadiging is een bruikbare methode om hartspierschade te onderscheiden van skeletspierschade. Voordat deze bevinding in de praktijk toegepast kan worden zullen grote klinische onderzoeken de door ons gevonden resultaten moeten bevestigen en zullen er snelle testen ontwikkeld moeten worden om myoglobine en H-FABP in plasma te bepalen.