

# No time to waste : a glycogen synthase kinase-3 $\beta$ - glucocorticoid receptor signaling axis illuminated

Citation for published version (APA):

Koen Verhees, K. J. P. (2013). No time to waste : a glycogen synthase kinase-3 $\beta$  - glucocorticoid receptor signaling axis illuminated. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20130619kv>

## Document status and date:

Published: 01/01/2013

## DOI:

[10.26481/dis.20130619kv](https://doi.org/10.26481/dis.20130619kv)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## LAYMAN'S SUMMARY



## Layman's summary

Under normal (healthy) conditions skeletal muscle is characterized by a high degree of plasticity which allows it to adapt easily to changes in functional demand. For example, repeated strength training will result in muscle growth (hypertrophy). Conversely, periods of inactivity - for example during casting of a broken leg or under pathological conditions (bedridden patients) - will result in loss of muscle mass (atrophy). Skeletal muscle atrophy commonly occurs in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Loss of muscle mass is associated with skeletal muscle weakness, exercise impairment, decreased health status and increased mortality, independently of the severity of airflow obstruction. Muscle wasting, however, is not exclusive to COPD but occurs in many chronic diseases, such as congestive heart failure (CHF), rheumatoid arthritis (RA) and cancer. In addition to disease specific triggers - for instance pulmonary inflammation in COPD - fasting (starvation) and disuse (inactivity) may also cause "erosion of lean muscle mass", or contribute to the muscle wasting process in chronic disease. Prevention and treatment of muscle wasting is therefore increasingly recognized as a prerequisite in an integrated disease management approach of these chronic disorders. In order to reach this goal it is essential to comprehend the molecular mechanisms that underlie skeletal muscle atrophy, and to identify potential "key regulators" of skeletal muscle plasticity. Thereupon, it is important to assess whether these regulatory signaling molecules may constitute potential candidates for physiological and/or pharmacological modulation, with the purpose of treating uncontrolled loss of muscle mass during acute and chronic disease.

Muscle protein turnover is essentially determined by the balance between protein synthesis (anabolism) and degradation (catabolism). The prototypical *insulin-like growth factor 1* (IGF-I)/Akt pathway is crucial in this process, as it regulates both catabolic as well as anabolic signals in muscle. Reduced protein content associated with skeletal muscle atrophy is the result of an imbalance between muscle protein synthesis and degradation, in favor of the latter. In general, loss of muscle mass is associated with diminished IGF-I/Akt signaling in muscle, and with increased levels of circulating glucocorticoids (GCs). It is well-known that activation of the IGF-I/Akt signaling cascade can counteract the catabolic effects of GCs. However, at this moment it is still largely unclear how GCs exactly cause muscle atrophy, and how increased IGF-I/Akt signaling neutralizes the atrophy-inducing effects of GCs has only been partially elucidated. Enhanced muscle proteolysis during muscle atrophy involves activation of the ATP-dependent ubiquitin 26S-proteasome system (UPS) and the autophagy-lysosomal pathway (ALP). *Glycogen synthase kinase-3 $\beta$*  (GSK-3 $\beta$ ) is a direct *downstream* target in the IGF-I/Akt signaling pathway, and has previously been shown to be involved in skeletal muscle protein degradation. In this dissertation we have discovered that GSK-3 $\beta$  is a central, negative regulator of muscle mass.

To ascertain whether GSK-3 $\beta$  could constitute a possible link between IGF-I/Akt and GC signaling in muscle, we made use of the C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cell culture system (*in vitro*) of mouse skeletal muscle myoblasts, which can evolve (differentiate) into multinucleated muscle fibers (myotubes). Experiments conducted in **chapter 3** showed that genetic deletion of GSK-3 $\beta$  in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes, using small interfering RNA (siRNA), suppressed both basal and atrophy stimulus-induced transcript levels of the essential UPS-related atrogen-1 and MuRF1 genes (atrogenes). Furthermore, loss of GSK-3 $\beta$  expression resulted in specific sparing of several contractile proteins (muscle proteins), including *myosin heavy chain fast* (MyHC-f) and *myosin light chains 1* (MyLC-1) and -3 (MyLC-3), and myotube size in response to synthetic GC-treatment (dexamethasone, hereinafter termed Dex), or blockade of IGF-I/Akt signaling (using LY294002 as an inhibitor). Interestingly, in contrast to their dependency on GSK-3 $\beta$  expression, the increase in atrogen-1 and MuRF1 mRNA transcript levels differentially relied on GSK-3 $\beta$  activity, as enzymatic GSK-3 $\beta$  inhibition, using either LiCl or CHIR99021, only attenuated atrophy stimulus-induced atrogen-1 expression, while MuRF1 expression levels remained unaffected.

In **chapter 4**, we confirmed the dependency of atrogene expression on GSK-3 $\beta$  in an animal model (*in vivo*), by using genetically modified mice (knockout mice) lacking GSK-3 $\beta$  expression specifically in skeletal muscle. Using these muscle-specific GSK-3 $\beta$  knockout mice we evaluated the direct contribution of GSK-3 $\beta$  in two different models of GC-associated muscle wasting, i.e. fasting as endogenous model, and synthetic GC administration as exogenous model. In these studies we have convincingly demonstrated that knocking out GSK-3 $\beta$  in muscle prevented starvation-induced loss of muscle mass, and inhibited skeletal muscle atrophy following chronic Dex-treatment. Starvation also significantly upregulated an ALP-related transcriptional program, which appeared to be partially dependent on GSK-3 $\beta$ . *Forkhead Box O* (FoXO) transcription factors act as critical liaison molecules coordinately regulating the expression of both ALP-related, as well UPS-associated transcriptional programs in muscle. Starvation resulted in markedly upregulated FoXO mRNA levels, which were attenuated in absence of GSK-3 $\beta$ . Furthermore, loss of *glucocorticoid receptor* (GR) expression in muscle (muscle-specific GR knockout) demonstrated that intact GC-signaling was required for the induction of proteolytic -and GC sensitive gene expression following Dex-treatment. These data were mirrored by similar observations made in GSK-3 $\beta$  knockout animals in response to fasting. On the whole, the striking similarities between the GSK-3 $\beta$  and GR knockout studies with regard to GC-sensitive gene expression, and the dependency of FoXO on GSK-3 $\beta$  and *downstream* UPS -and ALP-related transcriptional programs, were suggestive of a GSK-3 $\beta$ - GR signaling mechanism operating *upstream* of FoXO.

The possible interplay between GSK-3 $\beta$  and the GR with regard to atrophy signaling in muscle was further investigated in **chapter 5**. In this study we again made

use of muscle-specific GSK-3 $\beta$  and GR knockout mice, but this time muscle atrophy was brought about by acute pulmonary inflammation, induced by the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS). LPS-induced pulmonary inflammation was accompanied by increases in circulating GCs (corticosterone) and associated GC-sensitive gene expression. Similar to the observations made in **chapter 4**, skeletal muscle-restricted depletion of GSK-3 $\beta$  and the GR conveyed resistance to pulmonary inflammation-induced muscle atrophy and proteolytic signaling. Another important observation was that in addition to proteolytic (UPS and ALP) and GC-sensitive gene expression, also FoXO mRNA and protein expression were dependent on the presence of GR and GSK-3 $\beta$  in muscle. The current paradigm of FoXO regulation is centered around **canonical** or classical control of FoXO transcription factors, which relies on “inactivation through phosphorylation”. As such, dephosphorylation of FoXO results in nuclear translocation, and subsequent regulation of proteolytic gene expression. In contrast, we postulated that FoXO was a direct target gene of the GR, and that the observed reductions in UPS -and ALP-related gene expression in the GSK-3 $\beta$  and GR knockout studies were likely the result of decreased nuclear FoXO accumulation, as a direct consequence of reduced FoXO expression. Concretely, **non-canonical**, or non-classical **FoXO regulation** implies that GSK-3 $\beta$  translocates (moves) to the cell nucleus, where it stimulates GR-dependent gene expression, which, in turn, results in *de novo* FoXO. We therefore postulate that FoXO expression is GR-dependent, and that GSK-3 $\beta$  operates *upstream* of the GR, regulating its transcriptional activity. Consequently, regulation of UPS -and ALP-related gene expression occurs *downstream* of FoXO. In conclusion, in **chapter 5** we proposed a novel GSK-3 $\beta$  - GR-mediated signaling axis controlling FoXO-dependent UPS -and ALP-associated gene expression by regulation of *de novo* FoXO expression, capable of overruling FoXO phosphorylation and nuclear exclusion mechanisms, and therefore referred to as non-canonical regulation of FoXO.

So far our work indicated that GSK-3 $\beta$  may be considered as a central regulator of muscle mass maintenance. In **chapter 6**, the potential therapeutic effects of enzymatic GSK-3 inhibition on muscle wasting were assessed *in vivo*. By making use of a highly selective GSK-3 inhibitor we showed that enzymatic GSK-3 inhibition could be a promising treatment strategy to prevent loss of muscle mass and to stimulate muscle growth in chronic diseases such as COPD. Similar to the study design in **chapter 5**, LPS was used to induce pulmonary inflammation. However, this time guinea pigs were chronically exposed to LPS, as opposed to the acute LPS model in mice employed in **chapter 5**. Here too, LPS-treatment resulted in pulmonary inflammation and loss of peripheral muscle mass. Interestingly, our findings illustrated that neither chronic LPS-treatment, nor pharmacological GSK-3 inhibition had any profound effect on muscle protein synthesis and degradation signaling (FoXO). Nevertheless, chronic lung inflammation was associated with a decrease in muscle mass and size of the individual muscle fiber diameter. However, topical (local)

application of the GSK-3 inhibitor (in the lung) inhibited peripheral muscle atrophy without affecting pulmonary inflammation. Subsequent *in vitro* experiments clearly showed that pharmacological GSK-3 inhibition could improve the differentiation of muscle cells (as part of muscle regeneration) in the presence of GCs and the inflammatory mediator *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Our data seem in line with the presumption that improved muscle regeneration, following GSK-3 inhibition, after an initial period of muscle atrophy, may have led to protection against loss of muscle mass. However, it cannot be ruled out that GSK-3 inhibition may have decreased proteolytic signaling during the early phase of muscle atrophy. On the whole, the results in this study indicate that treatment with a selective GSK-3 inhibitor could prevent or reverse skeletal muscle atrophy, suggesting that GSK-3 could constitute a novel therapeutic target to combat muscle loss in chronic diseases such as COPD.

Based on the above-mentioned findings, enclosed in the **research chapters 3, 4, 5 and 6**, we conclude that the signaling protein GSK-3 $\beta$  is a central, negative regulator of muscle mass maintenance. Finally, in **chapter 7** we inquired into the possibility of targeting GSK-3 $\beta$  activity by physiological, nutritional and pharmacological means, with the purpose of fighting the often complex and multifactorial phenomenon of muscle atrophy in COPD. We conclude that breaking through the GSK-3 $\beta$  - GR signaling axis could constitute an important and promising treatment strategy to prevent loss of muscle mass and enhance muscle growth in COPD and other chronic diseases.

## SAMENVATTING





## Samenvatting

De gezonde skeletspier heeft een enorm vermogen om zich aan te passen aan veranderingen in het type en intensiteit van spieractiviteit, en voedseltoestand, alsook de capaciteit om zich te herstellen na spierschade (regeneratie). Dit aanpassingsvermogen van de spier wordt ook wel spierplasticiteit genoemd. Deze aanpassingen betreffen de massa, het uithoudingsvermogen en de stofwisseling van de spier. Zo zal bij krachttraining (weerstandstraining), omwille van het verhoogde spiergebruik, na een bepaalde periode een toename in spieromvang waar te nemen vallen. Op celniveau betekent dit meestal dat de spiervezels in grootte zijn toegenomen (spierhypertrofie). Daartegenover staat dat bijvoorbeeld tijdens starvatie (uithongering) of tijdens langdurige inactiviteit (immobiliteit) de spiermassa in omvang afneemt (spieratrofie). Skeletspieratrofie treedt ook vaak op bij chronische inflammatoire ziektebeelden, waaronder chronische obstructieve longziekten (COPD), chronisch hartfalen, bepaalde ontstekingsziekten van de darm, reumatoïde artritis en kanker. Atrofie leidt tot spierzwakte, een verlaagde inspanningstolerantie, een verminderde levenskwaliteit, én zelfs tot een verhoogd sterfterisico, onafhankelijk van de primaire aandoening. Preventie en behandeling van spiermassaverlies worden daarom in toenemende mate onderkend als belangrijke pijlers in een geïntegreerde aanpak van deze chronische ziekten. Hiertoe is het essentieel om de moleculaire mechanismen van spierafbraak in kaart te brengen, en op zoek te gaan naar mogelijke “centrale schakelstations” van skeletspierplasticiteit. Vervolgens is het interessant om na te gaan of deze centrale regulatoire signaleringseiwitten geschikte kandidaten zijn voor fysiologische en/of farmacologische modulatie, teneinde spiermassaverlies in acute en chronische ziekten in te perken.

De regulatie van spiermassa wordt in grote mate bepaald door de balans tussen enerzijds eiwitopbouw (eiwitsynthese) en eiwitafbraak (eiwitdegradatie) anderzijds. In dit proces is een belangrijke rol weggelegd voor de *insulin-like growth factor 1* (IGF-I)/Akt signaleringsroute, die in staat is zowel anabole (eiwitsynthese) als katabole (eiwitdegradatie) prikkels in de spier te reguleren. Zoals eerder aangegeven kan spieratrofie op verschillende manieren tot stand komen. Over het algemeen gaat verlies aan spiermassa gepaard met verminderde IGF-I/Akt signalering in de spier, en verhoogde niveaus van circulerende glucocorticoiden (GCs). Het is tevens bekend dat het stimuleren van IGF-I/Akt signalering de nefaste (katabole) effecten van GCs kan teniet doen. Op dit moment is het echter nog steeds onduidelijk hoe GCs precies spieratrofie veroorzaken, en hoe activatie van IGF-I/Akt signalering de katabole effecten van GCs kan neutraliseren. Verhoogde spiereiwitafbraak verloopt via de activatie van het 26S-proteasoom (UPS) en het lysosomale autofagie systeem (ALP). *Glycogeen synthase kinase-3β* is een signaleringseiwit dat deel uitmaakt van de IGF-I/Akt signaleringsroute, en in dit proefschrift hebben we ontdekt dat GSK-3β een centrale, negatieve regulator is van spiermassaregulatie.

Om te achterhalen of GSK-3 $\beta$  mogelijk een link zou kunnen zijn tussen IGF-I/Akt en GC signalering in de spier, hebben we gebruik gemaakt van een celkweekstelsel (*in vitro*) van muizen skeletspier myoblasten (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cellen) die zich kunnen omvormen (differentiëren) tot meerkernige spiervezels (myotubes). Experimenten in **hoofdstuk 3** toonden aan dat genetisch deletie (siRNA) van GSK-3 $\beta$  een toename in de mRNA niveaus van atrogenin-1 en MuRF1, beiden essentiële UPS-gerelateerde genen (*atrogenen*), na behandeling met een synthetisch GC (Dex), of na inhibitie van IGF-I/Akt signalering (LY294002 inhibitor), kon voorkomen. De afwezigheid van GSK-3 $\beta$  remde tevens de afbraak van verschillende contractiele eiwitten (spiereiwitten), waaronder *myosin heavy chain fast* (MyHC-f) en *myosin light chains 1* (MyLC-1) en 3 (MyLC-3), en beschermde de myotubes tegen atrofie. Een hoogst interessante bevinding was dat farmacologische remming van GSK-3 activiteit, in tegenstelling tot genetische inhibitie, enkel de toename in atrogenin-1 mRNA kon onderdrukken, terwijl MuRF1 expressie niveaus ongevoelig waren voor de inhibitie van GSK-3 enzym activiteit.

In **hoofdstuk 4** van dit proefschrift is de afhankelijkheid van *atrogenen* expressie (atrogenin-1 en MuRF1) voor het GSK-3 $\beta$  signaleringseiwit bevestigd in een diermodel (*in vivo*). Dit hebben we gedaan door gebruik te maken van genetisch gewijzigde muizen waarbij het GSK-3 $\beta$  gen specifiek in de spier werd uitgeschakeld (ook wel een spierspecifieke GSK-3 $\beta$  knockout muis genoemd). Door GSK-3 $\beta$  expressie in de spier te inhiberen waren we in staat de rol van dit signaleringsmolecule te onderzoeken in een endogeen (starvatie) en exogeen (Dex) model van GC-geassocieerde skeletspieratrofie. In deze studies hebben we overtuigend aangetoond dat het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  in de spier het verlies aan spiermassa, ten gevolge van starvatie of behandeling met een synthetisch GC (Dex), kan tegengaan. Verder kwam uit vervolganalyses naar voren dat genetische inhibitie van GSK-3 $\beta$  ook de toename van ALP-gerelateerde genen deels kon onderdrukken. Uit de starvatiestudie bleek tevens dat de stijging in mRNA expressie van de *Forkhead Box O* (FoxO) transcriptiefactoren ook onderhevig was aan de afwezigheid van GSK-3 $\beta$ . Daarnaast was de inductie van aantal GC-gevoelige genen onderdrukt in GSK-3 $\beta$  en GR knockout muizen. Zowel UPS - als ALP-geassocieerde expressie programma's staan onder controle van FoXOs, en ook is het bewezen dat intacte GC signalering - via de *glucocorticoid receptor* (GR) - vereist is voor de totstandkoming van proteolytische genexpressie (UPS en FoXO). Het groot aantal overeenkomstigheden tussen de GSK-3 $\beta$  en GR knockout studies, met betrekking tot proteolytische genexpressie, deden het vermoeden rijzen dat deze bevindingen indicatief waren voor een GSK-3 $\beta$  - GR signaleringsmechanisme dat *upstream*, oftewel boven FoXO opereerde.

De mogelijke relatie tussen GSK-3 $\beta$  en GR met betrekking tot atrofiesignalering werd in **hoofdstuk 5** in meer detail onderzocht. Voor deze vraagstelling werden opnieuw spierspecifieke GSK-3 $\beta$  en GR knockout muizen gebruikt. Ditmaal echter,

werd spieratrofie bewerkstelligd door het induceren van een acute longontsteking met behulp van lipopolysaccharide (LPS), een bacterieel endotoxine. Acute longinflammatie ging gepaard met een toename in circulerende GCs (corticosterone) niveaus, en de daarbij horende GC-gevoelige genexpressie. Vergelijkbaar met de bevindingen in **hoofdstuk 4**, waren spierspecifieke GSK-3 $\beta$  en GR knockout muizen volledig beschermd tegen longinflammatie-geïnduceerde skeletspieratrofie. Een andere belangrijke observatie was dat naast proteolytische (UPS en ALP) en GC-gevoelige genexpressie ook FoXO mRNA -en eiwitexpressie afhankelijk bleken te zijn van GR én GSK-3 $\beta$  aanwezigheid in de spier. Het huidige paradigma van FoXO regulatie is gecentreerd rond “inactivatie door fosforylatie” van FoXO transcriptie factoren (**canonical** of klassieke FoXO regulatie). Wij, daarentegen, hebben gesteld dat FoXO een direct *target* of doel-gen was van de GR, en dat de geobserveerde afname in UPS -en ALP-gerelateerde genexpressie, in de GSK-3 $\beta$  en GR knockout muizen, waarschijnlijk het resultaat was van verminderde FoXO activiteit in de celkern, als een direct gevolg van verminderde FoXO expressie (*non-canonical*, oftewel niet-klassieke FoXO regulatie). **Non-canonical**, oftewel niet-klassieke **FoXO regulatie** houdt in dat GSK-3 $\beta$  naar de celkern transloceert (zich verplaatst), om aldaar GR-afhankelijke genexpressie te stimuleren, hetgeen resulteert in *de novo* FoXO expressie. FoXO expressie is met andere woorden GR-afhankelijk, en GSK-3 $\beta$  opereert *upstream* van de GR, en reguleert als dusdanig zijn transcriptionele activiteit. Regulatie van UPS -en ALP-gerelateerde genen gebeurt vervolgens *downstream*, oftewel onder FoXO. Over het geheel genomen hebben we in **hoofdstuk 5** het bestaan van een nieuwe GSK-3 $\beta$  - GR signaleringsroute voorgesteld, die proteolytische genexpressie aanstuurt via *de novo* synthese van FoXO transcriptiefactoren.

Uit het werk zoals hier voorgesteld blijkt dat GSK-3 $\beta$  centraal staat in de regulatie van spierbehoud. In **hoofdstuk 6** hebben we de mogelijkheid getoetst om GSK-3 $\beta$  farmacologisch te moduleren *in vivo*. Door gebruik te maken van een reeds beschikbare hoog selectieve farmacologische remmer van GSK-3 $\beta$  hebben we getoond dat GSK-3 $\beta$  inhibitie mogelijk een veelbelovende behandelingsstrategie zou kunnen worden om spiermassaverlies te voorkomen en spiergroei te bevorderen in chronische ziekten zoals COPD. In deze studie werd opnieuw een LPS model gehanteerd zoals beschreven in **hoofdstuk 5**, hoewel het ditmaal geen acuut maar een chronisch model betrof. Niet muizen, maar cavia's ondergingen een chronische LPS-behandeling hetgeen resulteerde in een longontsteking en verlies aan perifeer spierweefsel. Onze data toonden geen bewijs van verhoogde eiwitdegradatie (FoXO), noch van verlaagde eiwitsynthese niveaus. Desalniettemin ging chronische longontsteking gepaard met een afname van spiermassa en de grootte van individuele spiervezeldoorsnede. Lokale inhibitie (in de long) van GSK-3, daarentegen, verhinderde spieratrofie zonder de long inflammatie te beïnvloeden. Verder toonden *in vitro* experimenten aan dat farmacologische GSK-3 inhibitie de differentiatie van spiercellen (onderdeel van spierregeneratie) kon verbeteren in het bijzijn van GCs en

de ontstekingsstof *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Onze data lijken in lijn met de veronderstelling dat verbeterde spierregeneratie met behulp van een GSK-3 inhibitor, na een initiële periode van spieratrofie, al dan niet verhinderd door GSK-3 inhibitie, heeft geleid tot de bescherming tegen spiermassaverlies. De resultaten uit deze studie tonen dus aan dat GSK-3 $\beta$  een therapeutisch doelwit zou kunnen zijn in de strijd tegen spierverlies in chronische ziekten zoals COPD.

Gebaseerd op de bovenstaande bevindingen, omsloten in de **onderzoeks- hoofdstukken 3, 4, 5 en 6** concluderen we dat het signaleringseiwit GSK-3 $\beta$  een centrale, negatieve regulator is van spiermassabehoud. Ten slotte werd in **hoofdstuk 7** de mogelijkheid om door middel van fysiologische, nutritionele of farmacologische modulatie van GSK-3 $\beta$  activiteit een krachtig antwoord te bieden tegen het vaak complexe, en multifactoriële verschijnsel van spieratrofie bij COPD, besproken. We besluiten dat het doorbreken van de GSK-3 $\beta$  - GR signaleringsas een veelbelovende behandelingsstrategie lijkt om spiermassaverlies te voorkomen en spiergroei te bevorderen in COPD en andere chronische aandoeningen.