

Hypoxia-induced muscle atrophy

Citation for published version (APA):

De Theye, C. C. (2016). *Hypoxia-induced muscle atrophy: regulation of muscle protein turnover*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20160122cd>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160122cd](https://doi.org/10.26481/dis.20160122cd)

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

Muscle wasting and weakness is a common but often under-recognized extra-pulmonary feature of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) that significantly increases disease burden and even mortality risk. Hypoxemia, either chronic or intermittent, is a typical feature of acute or chronic respiratory failure, but surprisingly its potential impact on muscle maintenance in COPD patients is rather unexplored. In **chapter 1**, we critically reviewed available literature addressing the question whether hypoxia may play a causal role in muscle atrophy and impaired muscle oxidative capacity as seen in patients with COPD. Disrupted regulation of muscle mass and oxidative metabolism observed in available experimental animal models resembled observations in muscle biopsies of patients suffering from COPD, suggestive of but not conclusive for a causal role of hypoxia. To address underlying molecular mechanisms, we developed a 21 days normobaric hypoxia (8% oxygen) mouse model in **chapter 2**. As hypoxia clearly affected food intake, a pair-fed control group was used for appropriate comparison. We hypothesized that hypoxia-induced muscle atrophy and alterations in the regulation of muscle protein turnover include a hypoxia-specific component, in addition to the observed effects of reduction in food intake in response to hypoxia. Hypoxia induced an initial rapid loss of body and muscle mass, which remained throughout the remainder of the experiment and was partially resulting from hypoxia-induced lowered food intake. Hypoxia induced expression of genes involved in protein degradation signaling such as Ub 26S-proteasome E3 ligases of the ubiquitin proteasome system (UPS) and genes involved in the autophagy-lysosomal pathway (ALP) which could only partially be contributed to hypoxia-induced lowered food intake. Interestingly, mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity was reduced by the decreased food intake throughout the experiment, but not under hypoxic conditions. These findings suggest a hypoxia-specific impairment of the coordination between protein synthesis and –degradation signaling in skeletal muscle. Loss of muscle mass in COPD patients can largely be attributed to muscle fiber atrophy, particularly of type II fibers. In addition to the loss of muscle mass, peripheral muscles of patients with COPD often are characterized by a shift from slow oxidative type I fibers towards fast glycolytic type II fibers. To investigate whether hypoxia may trigger such events in different muscle types, the adaptations to hypoxia of the oxidative soleus muscle and the glycolytic extensor digitorum longus (EDL) muscle were investigated in **chapter 3**. Based on muscle mass and fiber cross section area (FSCA), hypoxia-induced muscle atrophy was more prominent in the EDL than the soleus muscle and only partially resulting from reduced food intake. Despite the lowered FCSA, no shift in fiber type was observed in either muscle type. Hypoxia associated adaptation of gene expression for Hypoxia-induced factor 1 α (HIF1 α)-, Glucocorticoid receptor (GR)-, UPS- and ALP signaling were mainly observed in the glycolytic EDL muscle while in the oxidative soleus muscle such

adaptations were mainly resulting from hypoxia-induced reduction in food intake. The capillary structure was also investigated and hypoxia increased the number of capillary contacts (CC) per μm^2 FCSA in both muscles. In the EDL, this was due to type II fiber atrophy, whereas in the soleus the absolute number of CC increased. Combined these results indicate that glycolytic muscle fibers are more sensitive to hypoxia. As increased glucocorticoid concentrations and GR signaling have also been implicated in muscle atrophy, we hypothesized that hypoxia-induced muscle atrophy is GR dependent in **chapter 4**. Using a fiber type II specific GR knockout mouse model (mGRKO), we investigated the role of the GR signaling in hypoxia-induced muscle atrophy after 4 days of hypoxia. Corticosteron levels were equally elevated in the hypoxia and pair-fed group in both mouse models, although elevated downstream GR signaling was diminished by GR deficiency. GR deficiency prevented muscle atrophy in the pair-fed group but not in the hypoxic group. GR deficiency blunted elevated ALP signaling in the pair-fed and hypoxia group, whereas elevated UPS signaling was mainly reduced in the pair-fed group only. Reduced food intake associated inhibition of mTORC1 as seen in chapter 2 is not GR dependent, whereas the lack of mTORC1 inhibition by hypoxia is GR dependent. The deregulation of mTORC1 by hypoxia does not involve AKT1/TSC2 and AKT1/mTOR signaling nor *Redd1* and *Klf15* expression. In **chapter 5**, adaptations to hypoxia were combined with 24 hrs fasting as a mouse model for exacerbation in COPD patients. Reduction in muscle mass by fasting was higher under hypoxic conditions although expression of genes involved protein degradation mechanisms such as expression of UPS and ALP related genes were attenuated compared to the pair-fed controls. mTORC1 activity is inhibited by fasting in the pair-fed controls, however under hypoxic conditions, mTORC1 activity was not diminished by fasting. The mechanism by which hypoxia blocks mTORC1 inhibition does not seem to be through Protein kinase B (AKT1)/Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) nor AKT1/mTOR signaling as seen in chapter 4. mTORC1 activity under normoxic and hypoxic conditions in response to fasting correlated to AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and may involve DNA-damage-inducible transcript 4 (REDD1). It was concluded that the sustained mTORC1 activity through AMPK and elevated protein degradation are responsible for the sensitivity of the muscle to fasting-induced muscle atrophy. To conclude, this thesis shows that systemic hypoxia results in hypoxia-induced muscle atrophy. Glycolytic muscles are more sensitive to hypoxia-induced muscle atrophy. Hypoxia affects the regulation of protein degradation independent of GR signaling, although the exact mechanism remains to be explored. Hypoxia further impaired the inhibition of mTORC1 activity in response to reduced food-intake. This involves GR and AMPK signaling but the exact mechanisms are not fully understood.

Samenvatting

Patiënten met Chronische Obstructieve Longziekten (COPD) hebben onherstelbare schade aan de longen door bijvoorbeeld roken of fijn stof. Afhankelijk van de ernst van de ziekte hebben deze patiënten een verminderde longfunctie, waardoor de zuurstofopname beperkt is. Hierdoor kan een tekort aan zuurstof in het bloed worden ontwikkeld, hypoxemie genaamd. Het verlies van spiermassa en spierkracht is ook een kenmerk van patiënten met COPD. Deze effecten op spier niveau hebben een grote invloed op het dagelijks leven van COPD patiënten. Daarnaast is de mate van spiermassaverlies een prognostische factor voor vervroegd overlijden.

In **hoofdstuk 1** wordt op basis van de bestaande literatuur besproken of hypoxemie een effect kan hebben op spiermassa en welke onderliggende mechanismes hier mogelijk bij betrokken zijn. Om te onderzoeken hoe hypoxemie de spiermassa regulatie beïnvloed, is er een dier model ontwikkeld om hypoxemie op te wekken. De normale zuurstof concentratie in de lucht op zee niveau is 21%, ook wel normoxische condities genoemd. In het gebruikte diermodel werden muizen onder een conditie van 8% (hypoxie) zuurstof gebracht voor 21 dagen door de zuurstof te vervangen voor stikstof gas, waardoor de zuurstof concentratie in het bloed verlaagt (hypoxemie).

In **hoofdstuk 2** stond de vraag centraal of hypoxemie de aanmaak en afbraak van spiereiwitten kan reguleren, en welke veranderingen in de muis ontstaan door hypoxie met betrekking tot lichaams-, vet- en spier-gewichten en zuurstof waardes in het bloed. Opvallend was dat hypoxie een behoorlijke daling in voedsel inname veroorzaakte, waardoor er een extra normoxische controle groep (PF-groep) muizen in het experiment opgenomen moest worden, waarvan voedsel inname gelijk werd gesteld aan die van de hypoxische muizen.

Hypoxemie veroorzaakte een snelle spiermassa vermindering in de gastrocnemius skeletspier van het achterbeen. Tevens werd de regulatie van eiwit afbraak mechanismen door hypoxemie verhoogd. Beiden effecten werden maar deels verklaard door de verminderde voedselinname, wat duidt op een hypoxie specifiek effect. Opvallend was de bevinding dat de regulatie van eiwit aanmaak (synthese) niet verminderd was onder hypoxische condities, terwijl deze vermindering wel aantoonbaar was bij een gelijke vermindering van voedselinname onder normoxie. Dit betekent dat hypoxemie ervoor zorgt dat de eiwit aanmaaksynthese regulatie gehandhaafd blijft, terwijl ze deze geremd zou moeten worden als aanpassing op de verminderde voedselinname.

Spieren bestaan uit spiervezels van verschillende samenstelling, welke onder meer afhankelijk is van de capaciteit om zuurstof te gebruiken om energie te produceren. Type I en IIa vezels zijn spiervezels met veel mitochondriën (energiefabriekjes) en bloedvaten waardoor ze een energie productie hebben waarbij veel zuurstof wordt verbruikt (oxidatief). Oxidatieve type I vezels zijn voornamelijk

geschikt voor langdurig langzame bewegingen zoals in duursporten het geval is. Type II(b/x) vezels hebben minder mitochondriën en kunnen daardoor beperkt zuurstof gebruiken in hun energie productie. Ze zijn dus vooral aangewezen op de zuurstof onafhankelijke energie productie (glycolyse). Spiermassaverlies in COPD patiënten is vooral te zien in glycolytische type II(b/x) vezels, tevens is er een verschuiving in het aantal vezels van oxidatieve type I naar glycolytische type II waargenomen. Om te onderzoeken hoe verschillende type spieren reageren op hypoxemie, hebben we de aanpassingen in de oxidatieve soleus spier (type I en IIa) en glycolytische extensor digitorum longus (EDL) (type IIa en IIb/x) vergeleken in **hoofdstuk 3**. Verlies van spiermassa en spiervezelgrootte door hypoxemie was het sterkst aanwezig in de glycolytische spier, terwijl de oxidatieve spier enkel door de verminderde voeding was aangedaan. De volgorde van moleculen in het genomisch DNA bepalen welke eiwitten gevormd worden, dit gebeurt met tussenkomst van het RNA in de vorm van mRNA. Vooral in de glycolytische spier werd het mRNA verhoogd die direct worden aangestuurd door een hypoxie gevoelig regulator-eiwit Hypoxia induced factor 1 α (HIF1 α) genaamd. Tevens werd het RNA gelinkt aan de regulatie van eiwitafbraak en was de glucocorticoïd receptor (GR), een stress-sensor, geactiveerd in de spier. Ook is er onderzocht of er aanpassingen zijn van de bloedvaten en contactpunten tussen het bloedvat en de spiervezel. Door de verlaging van de vezelgrootte in de glycolytische spier waren er meer bloedvat contact punten per oppervlakte maat in de vezel. Wellicht kan de vezel door deze aanpassing beter voorzien worden van zuurstof en voedingsstoffen. In de oxidatieve spier was er geen verlaging van de vezelgrootte maar hadden we een verhoging in het aantal contact punten van het bloedvat met de vezel gemeten, hierdoor is ook de oxidatieve vezel beter voorzien van zuurstof en voedingsstoffen. Dus beide spieren zorgen voor aanpassingen waardoor de spier beter aan zuurstof en voedingsstoffen kan komen, wel doen ze dit op verschillende manieren.

In **hoofdstuk 4** is onderzocht of glucocorticoïden (een hormoon) via de glucocorticoïd receptor (GR) in de spier een rol spelen in de hypoxemie gestimuleerde spierafbraak. De rol van GR is onderzocht door gebruik te maken van een genetisch gemodificeerde muis, hierbij wordt het gen dat codeert voor GR uitgeschakeld waardoor het RNA en het uiteindelijke GR-eiwit niet meer geproduceerd kan worden. Hoewel het verwijderen van GR het spiermassaverlies na verminderde voeding wel voorkwam, was dit niet het geval voor het hypoxie-afhankelijke deel van de spiermassaverlies. De verhoogde eiwit afbraak regulatie was grotendeels GR afhankelijk na verminderd voedsel inname in de PF-groep, maar niet na hypoxemie. Daarentegen was de veranderde eiwit aanmaak regulatie door hypoxemie wel afhankelijk van GR.

Omdat tijdens perioden van verslechtering van de ziekte de spiermassa van COPD patiënten niet enkel beïnvloed kunnen worden door hypoxemie, maar ook door een acute afname van nutriënten als gevolg van een verminderde eetlust, is in **hoofdstuk 5** onderzocht of hypoxemie de effecten van vasten versterkt. Hypoxemie zorgt inderdaad voor een verhoogd spieraafbraak tijdens vasten en dit kwam deels door verminderd voedsel inname voorafgaand aan vasten. Ondanks dat het spiermassa verlies na vasten het meest uitgesproken was onder hypoxie, bleek de eiwitafbraak regulatie minder sterk geactiveerd. Daarentegen was de eiwitaanmaak regulatie ook onder deze omstandigheden ook niet verminderd, terwijl dit compleet was uitgeschakeld na vasten onder normoxie. De regulatie van eiwit-afbraak en –aanmaak op dit niveau kan het versterkte verlies van spiermassa onder hypoxie niet verklaren. Echter, verdere bestudering van de aansturing van de eiwitaanmaak regulatie duiden op het eiwit AMPK-activated protein kinase (AMPK) als mogelijk oorzaak voor de veranderde eiwitaanmaak regulatie onder hypoxemie.

Concluderend, blijkt uit de hier beschreven experimenten dat hypoxemie verlies van spiermassa veroorzaakt en dit deels wordt verklaard door de verminderde voedselinname. Glycolytische spieren zijn gevoeliger dan oxidatieve spieren voor verlies van spiermassa door hypoxemie. De verhoogde eiwit afbraak regulatie door hypoxemie is grotendeels GR onafhankelijk. Hypoxemie verandert de eiwitaanmaak regulatie. Hierbij lijken GR en AMPK betrokken, maar dient het exacte mechanisme nog te worden ontrafeld. Deze resultaten suggereren dat hypoxemie een belangrijke rol kan spelen in spiermassaverlies in COPD patiënten en bieden aanknopingspunten voor verder onderzoek voor de ontwikkeling van medicijnen die het verlies van spiermassa tegen kunnen gaan.

