

A molecular basis for the loss of muscle oxidative phenotype: Implications for COPD

Citation for published version (APA):

Remels, A. H. V. (2009). *A molecular basis for the loss of muscle oxidative phenotype: Implications for COPD*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20091211ar>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20091211ar](https://doi.org/10.26481/dis.20091211ar)

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

Summary

Loss of exercise capacity is observed in several chronic inflammatory disorders as e.g. chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and chronic heart failure (CHF). Exercise intolerance in these disorders contributes significantly to clinical outcome of these diseases as it impairs patients in their daily activities, diminishes quality of life and increases morbidity of the disease, independent of the primary organ dysfunction. Impaired exercise capacity in COPD might be caused by loss of muscle oxidative phenotype (OXPHEN) which includes a fiber type shift towards a more glycolytic distribution, diminished activity levels of enzymes involved in oxidative metabolism and a reduced mitochondrial content. The exact mechanisms underlying the loss of muscle OXPHEN in chronic inflammatory diseases as COPD to date remain unresolved. The aim of this thesis therefore was to investigate molecular mechanisms underlying loss of skeletal muscle OXPHEN in chronic inflammatory disorders using COPD as a model. Basic molecular mechanisms were investigated *in vitro* using cultured skeletal muscle cells and gathered knowledge was subsequently translated to human subjects by analysis of blood samples and muscle biopsies of patients.

The PGC-1 α /PPAR pathway and muscle OXPHEN in COPD

In the last decade, the PGC-1 α /PPAR pathway has emerged as a key regulatory pathway involved in determination of muscle OXPHEN. In addition, this signal transduction cascade has an array of other physiological implications including modulation of inflammatory responses. Since COPD is characterised by inflammation and clinically significant muscle pathology, **chapter 2** discusses the potential therapeutic implications of the PGC-1 α /PPAR pathway in combating COPD systemic pathology based on an extensive review of existing literature.

The role of the PGC-1 α /PPAR pathway in the regulation of OXPHEN in existing muscle fibres is widely established. The implication of this pathway in the development of OXPHEN during the process of myogenic differentiation however is largely unexplored. **In chapter 3** we investigated multiple aspects of OXPHEN as well as temporal expression profiles of components of the PGC-1 α /PPAR pathway in cultured C2C12 skeletal muscle cells during myogenesis. PPAR transcriptional activity as well as PGC-1 α , Tfam, NRF-1 and PPAR- α mRNA expression levels increased during myogenic differentiation paralleling the development of OXPHEN. PPAR- δ mRNA levels on the other hand remained constant during the entire differentiation process. This suggests that PGC-1 α and PPAR- α might be implicated in the development of OXPHEN during myogenic differentiation, while the role of

PPAR- δ in regulation of skeletal muscle OXPHEN is possibly confined to pre-existing muscle fibers.

Activation or over-expression of the PGC-1 α /PPAR pathway in skeletal muscle of mice results in increased proportions of oxidative fibers, higher activity levels of mitochondrial enzymes and a higher mitochondrial content. Notably, these changes are the opposite of what is observed in muscle tissue of COPD patients. Therefore, in **chapter 4** we investigated muscular content and expression levels of key constituents of the PGC-1 α /PPAR pathway in skeletal muscle of COPD patients and compared these to levels in skeletal muscle of healthy control subjects. This demonstrated that protein content of Tfam, which is the master regulator of mitochondrial biogenesis, and PPAR- δ as well as mRNA transcript levels of PGC-1 α and PPAR- α were decreased in skeletal muscle of COPD patients compared to healthy controls which was most pronounced in the cachectic patients. Moreover, PPAR mRNA expression levels in muscle were inversely related to levels of inflammatory markers in plasma. This implies that a disturbed expression and/or content of these regulatory factors may well underlie the impaired muscle OXPHEN in COPD. Furthermore, it suggests that cachexia and impaired muscle OXPHEN may be intertwined processes, possibly with inflammation as a common denominator. Activation of the PGC-1 α /PPAR pathway therefore may represent an interesting approach to alleviate exercise intolerance in COPD.

Battle between PGC-1 α /PPAR and NF- κ B

Chapter 4 demonstrated that PPAR expression levels in muscle of COPD patients were inversely correlated with circulating levels of TNF- α and its receptors. This suggests that systemic inflammatory status may influence regulation of muscle OXPHEN in COPD patients. To address this in more detail, the link between inflammation and regulation of skeletal muscle OXPHEN was investigated in **chapter 5**.

Chapter 5 showed that COPD patients with increased muscle TNF- α expression had higher glycolytic gene expression while expression levels of oxidative genes and their major regulators (PGC-1 α , PPAR- α and Tfam) were significantly lower compared to COPD patients with normal muscle TNF- α mRNA transcript levels. The 'high TNF- α ' group was also characterised by a lower body mass index and fat-free mass index compared to healthy controls, indicative of (pre)cachexia. These findings lead to the notion that a sub-population of COPD patients with increased muscle inflammatory status may be at risk, not only for wasting of muscle mass, but also for impairment of OXPHEN of the remaining muscle. To address causality of the association between TNF- α and decreased muscle oxidative gene expression found in

patients, an *in vitro* approach in which cultured skeletal muscle cells were chronically stimulated with TNF- α was applied. These experiments demonstrated that chronic TNF- α treatment of skeletal muscle cells impaired cellular respiration rates and shifted myosin heavy chain composition towards a more glycolytic distribution resulting in a decreased skeletal muscle OXPHEN. TNF- α also potently inhibited activity and expression levels of the PGC-1 α /PPAR pathway. Importantly, we demonstrate that the effects of TNF- α on muscle OXPHEN depended on activation of one of the most important cellular cascades mediating inflammatory signals, the classical NF- κ B pathway. This implicates the classical NF- κ B pathway not only in skeletal muscle atrophy, as shown previously, but also in the loss of OXPHEN under chronic inflammatory conditions, which is an important novelty in understanding the etiology of muscle abnormalities in COPD.

Interplay between the NF- κ B pathway and the PGC-1 α /PPAR signalling axis has been shown in several tissues. **Chapter 6** was aimed at investigating a potential bi-directional nature of this interaction in skeletal muscle. While NF- κ B activation inhibited PGC-1 α /PPAR signalling in **chapter 5**, experiments in **chapter 6** showed that pharmacological activation of PPAR- γ , but not PPAR- δ or PPAR- α , potently inhibited pro-inflammatory cytokine-induced NF- κ B activation in cultured skeletal muscle cells. This was verified in T2DM patients receiving the PPAR- γ activator Rosiglitazone as anti-diabetic treatment. In line with *in vitro* findings of **chapter 6**, patients receiving Rosiglitazone tended to have decreased muscular transcript levels of a NF- κ B target gene. Interestingly, anti-inflammatory effects mediated by Rosiglitazone-mediated PPAR- γ activation in skeletal muscle *in vitro* described in **chapter 6** appeared to be independent of RelA nuclear translocation or DNA binding suggestive of a transrepression mechanism.

In conclusion, the studies described in this thesis suggest that the PGC-1 α /PPAR pathway is impaired in skeletal muscle of COPD patients and that an increased muscle inflammatory status and subsequent inflammatory signalling through the NF- κ B pathway impairs skeletal muscle OXPHEN. Collectively, this implies that inflammation-induced impairment of the PGC-1 α /PPAR pathway might underlie impaired exercise capacity observed in COPD. Finally, activation of PPAR- γ blocks inflammatory signalling in skeletal muscle and therefore may represent an interesting therapeutic target to alleviate skeletal muscle dysfunction in chronic inflammatory disorders.

Samenvatting

Samenvatting

Chronisch inflammatoire aandoeningen zoals chronisch obstructieve longziekte (COPD) en chronisch hartfalen worden vaak gekenmerkt door een verlies van inspanningscapaciteit. Vermits dit resulteert in een verminderde bewegingsvrijheid en een beperking van het dagelijks functioneren van patiënten draagt dit verlies aan inspanningscapaciteit sterk bij aan een verminderde kwaliteit van leven en verhoogde morbiditeit in deze aandoeningen, onafhankelijk van de primaire aandoening. De verminderde inspanningscapaciteit van patiënten met COPD kan mogelijk toegeschreven worden aan een veranderd oxidatief fenotype van de skeletspieren in de onderste ledematen. Deze veranderingen omvatten onder andere een vezelverschuiving naar een meer glycolytische verdeling, verlaagde activiteit van enzymen betrokken in oxidatief substraatmetabolisme en een verminderde mitochondriële inhoud. De precieze mechanismen die leiden tot een verminderd oxidatief fenotype van de spier in COPD patiënten blijven tot op heden echter onopgehelderd. Het doel van dit proefschrift was dan ook om de moleculaire mechanismen te onderzoeken die aan de basis liggen van het veranderde spier oxidatief fenotype in chronisch inflammatoire aandoeningen zoals COPD. Basale moleculaire mechanismen werden *in vitro* bestudeerd door gebruik te maken van gekweekte spiercellen. Kennis hieruit verkregen werd vervolgens vertaald naar de humane setting door het verzamelen en analyseren van bloed- en spiermonsters van COPD patiënten.

De PGC-1 α /PPAR cascade en spier oxidatief fenotype in COPD

Recent onderzoek heeft aangetoond dat de PGC-1 α /PPAR cascade een belangrijke regulator is van spier oxidatief fenotype. Daarnaast is gebleken dat deze signaalcascade betrokken is in verschillende andere fysiologische processen zoals bijvoorbeeld modulatie van inflammatoire signaaltransductie. Vermits COPD gekenmerkt wordt ontstekingsprocessen alsook een verstoord spiermetabolisme handelt **hoofdstuk 2** over de mogelijke therapeutische rol van de PGC-1 α /PPAR cascade in de behandeling van systemische afwijkingen geassocieerd met COPD. Dit overzicht is gebaseerd op een uitgebreide literatuurstudie.

De rol van de PGC-1 α /PPAR cascade in de regulatie van oxidatief fenotype van bestaande spiervezels is overtuigend aangetoond. De rol van deze signaaltransductieweg in de ontwikkeling van oxidatief fenotype gedurende differentiatie van spiercellen naar spiervezels is echter onbekend. In **hoofdstuk 3** werden verschillende parameters alsook belangrijke regulatoren van spier oxidatief fenotype onderzocht in gekweekte C2C12 spiercellen die gedifferentieerd werden naar spiervezels. De transcriptionele activiteit van de

PPARs alsook mRNA expressie niveaus van PPAR- α , PGC-1 α , Tfam en NRF-1, die allen beschouwd worden als belangrijke regulatoren van spier oxidatief fenotype, stegen in parallel met de ontwikkeling van het oxidatief fenotype in deze cellen tijdens differentiatie. In tegenstelling, mRNA expressie niveaus van PPAR- δ bleven constant tijdens differentiatie ondanks een duidelijk beschreven rol van PPAR- δ in de regulatie van spier oxidatief fenotype. Dit suggereert dat PGC-1 α en PPAR- α betrokken zijn in de ontwikkeling van spier oxidatief fenotype gedurende differentiatie terwijl de rol van PPAR- δ in de regulatie van spier oxidatief fenotype mogelijk beperkt is tot bestaande spiervezels.

Het is overtuigend aangetoond dat activatie of over expressie van componenten van de PGC-1 α /PPAR cascade, in de skeletspier van muizen, resulteert in een verhoogd spier oxidatief fenotype gekenmerkt door een toename in het aantal oxidatieve vezels en hogere activiteit van mitochondriële enzymen. Het is opmerkelijk dat deze veranderingen precies het omgekeerde zijn van de afwijkingen die vastgesteld zijn in de spieren van COPD patiënten. Daarom werd in **hoofdstuk 4** onderzocht of skeletspieren van COPD patiënten gekenmerkt worden door veranderde expressie niveaus of eiwitinhoud van componenten van de PGC-1 α /PPAR cascade vergeleken met gezonde controle personen. Deze experimenten toonden aan dat eiwitinhoud alsook mRNA expressieniveaus van bestanddelen van de PGC-1 α /PPAR cascade, waaronder Tfam, PGC-1 α en PPAR- α , verlaagd waren in de spieren van COPD patiënten vergeleken met gezonde controles. Een hoogst interessante bevinding was dat deze verlaging het meest uitgesproken was in de cachectische patiënten en omgekeerd evenredig was met de hoeveelheid ontstekingsmediatoren in plasma. Deze bevindingen geven aan dat veranderingen in de hoeveelheid van expressie niveaus en eiwitinhoud van bestanddelen van de PGC-1 α /PPAR cascade mogelijk aan de basis liggen van het verminderde spier oxidatief fenotype geobserveerd in COPD patiënten. Aanvullend geven deze data aan dat cachexia en verstoord spier oxidatief fenotype mogelijk met elkaar verbonden zijn, met inflammatoire processen als mogelijk gemeenschappelijke basis. De therapeutische implicatie van deze bevindingen is dat activatie van de PGC-1 α /PPAR cascade in de spieren van COPD patiënten een eventuele strategie kan zijn om inspanningsintolerantie in deze ziekte te behandelen.

Strijd tussen PGC-1 α /PPAR en NF- κ B

Hoofdstuk 4 van dit proefschrift toont aan dat PPAR expressie niveaus in de skeletspier van COPD patiënten omgekeerd gerelateerd zijn aan de hoeveelheid TNF- α en zijn receptoren in de circulatie. Dit geeft aan dat inflammatoire status van patiënten mogelijk de regulatie van spier oxidatief fenotype beïnvloedt. De relatie tussen inflammatoire processen en spier

oxidatief fenotype werd daarom in meer detail onderzocht in **hoofdstuk 5**. Experimenten uit **hoofdstuk 5** toonden aan dat COPD patiënten met een verhoogde expressie van TNF- α in de spier gekenmerkt werden door verlaagde expressie niveaus van oxidatieve genen en hun regulatoren (PGC-1 α /PPAR) alsook door een verlaagde body mass index en vet-vrije massa (spier). Dit suggereert dat COPD patiënten met een verhoogde spier inflammatoire status het risico lopen niet alleen spiermassa maar ook spier oxidatief fenotype te verliezen. De relatie tussen inflammatie en verlaagde oxidatieve genexpressie werd bevestigd door de bevinding dat chronische TNF- α behandeling van gekweekte C2C12 cellen resulteerde in een verminderde celrespiratie, een verlaagde mitochondriële inhoud en een verschuiving naar een meer glycolytische vezelverdeling. TNF- α stimulatie van spiercellen in kweek had ook een verlaging van de activiteit en expressie niveaus van de PGC-1 α /PPAR cascade tot gevolg. Een belangrijke observatie in **hoofdstuk 5** was dat de effecten van TNF- α op spieroxidatief fenotype gemedieerd werden door 1 van de belangrijkste signaaltransductiewegen betrokken in de transmissie van inflammatoire signalen namelijk de klassieke NF- κ B signaalcascade. Dit impliceert de klassieke NF- κ B signaalcascade niet alleen in het verlies van spiermassa, wat in het verleden overtuigend is aangetoond, maar ook in verlies van spier oxidatief fenotype, wat een belangrijk nieuw inzicht is in de ontwikkeling van spierafwijkingen in COPD.

Het is bekend dat de NF- κ B cascade en de PGC-1 α /PPAR signaaltransductieweg met elkaar kunnen interfereren. In **hoofdstuk 6** werd onderzocht of activatie van de PGC-1 α /PPAR cascade kan interfereren met inflammatoire cytokine-gemedieerde activatie van de NF- κ B cascade in spiercellen. In **hoofdstuk 5** is beschreven dat activatie van NF- κ B de PGC-1 α /PPAR signaalweg kan remmen. In **hoofdstuk 6** tonen we aan dat farmacologische activatie van PPAR- γ (Rosiglitazone), maar niet van PPAR- δ of PPAR- α , resulteert in een sterke inhibitie van NF- κ B signalering in gekweekte spiercellen. Dit werd bevestigd in patiënten met type 2 diabetes mellitus die Rosiglitazone kregen als behandeling voor hun ziekte. De ontstekingsremmende effecten van Rosiglitazone behandeling in cellen bleken echter onafhankelijk van RelA translocatie naar de nucleus of binding aan het DNA, wijzend op een transrepressie mechanisme.

Samengevat beschrijven de studies in deze thesis dat COPD patiënten gekenmerkt worden door verlaagde niveaus van componenten van de PGC-1 α /PPAR cascade in de spieren van hun onderste ledematen. Aanvullend geven de studies van deze thesis aan dat ontstekings-gemedieerde signaaltransductie de regulatie van spier oxidatief fenotype kan remmen. Dit suggereert dat ontstekings-gemedieerde remming van de PGC-1 α /PPAR

cascade mogelijk aan de basis ligt van de verminderde inspanningscapaciteit van COPD patiënten. Ter afsluiting tonen we aan dat farmacologische activatie van PPAR- γ resulteert in een inhibitie van inflammatoire signalering wat mogelijk interessante therapeutische implicaties heeft gezien de, in deze thesis aangetoonde, negatieve effecten van inflammatoire signalering op spier oxidatief fenotype.