



Doctoral Thesis

Ground-based study of gravitational forces acting on muscle cells

Author(s):

Benavides Damm, Tatiana

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010140152> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21740

Ground-Based Study of Gravitational Forces Acting on Muscle Cells

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Tatiana Benavides Damm

MSc en Bioingénierie et biotechnologie
École Polytechnique Fédérale de Lausanne

born on 15th November, 1983

citizen of Mexico

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ralph Müller, examiner

PD Dr. Marcel Egli, co-examiner

Dr. Alfredo Franco-Obregón, co-examiner

2014

Summary

Healthy muscle development is a product of a dynamic balance between regeneration and degeneration. In muscle atrophy, degeneration takes over characterized by a loss in muscle mass and strength over time. This takes place as the myogenic stem cell pool ceases to respond effectively to the input signals, causing a defect in the regeneration process. Such a diseased state occurs normally as we age, as well as in muscle disuse scenarios such as patients confined to a wheelchair or long-term bed rest. In addition, unloading muscle from the force of gravity, as experienced by astronauts during spaceflights, also induces muscle wasting. In fact, an experimental approach that can be used to better understand the fundamental cellular mechanisms modulating muscle development is through the unloading of cells from the force of gravity. As research conducted in space is limited to few experiments because of the elevated costs involved and intrinsic difficulties, several model systems to mimic the effects of microgravity have been developed using ground-based tools, where the results must be reconciled with data obtained from spaceflights. Through these studies, a greater amount of data can be collected, with sufficient experimental repetitions to obtain statistically significant results. A model used to analyze multiple samples in an earth-bound facility at an economical cost is the random positioning machine (RPM). As skeletal muscle has evolved under the force of gravity, it is important to understand how muscle cells are affected when this constant mechanical input is removed. The findings conferred through these analyses are fundamental not only for astronauts undergoing missions in space, but also for humans on earth suffering from muscle atrophy due to aging, trauma, disease, or prolonged periods of rest and immobilization.

Therefore, this doctoral thesis focuses on the following three aims: i) to present the calcium-mediated responses to mechanical input in muscle cells, ii) to assess the state-of-the-art simulation models to study the effects of gravitational forces, and iii) to perform analyses of gene expression and selected proteins, cell cycle progression, proliferation, differentiation, and apoptosis in muscle cells under different gravitational conditions.

In the first part of this thesis, a short introduction into muscle development and a comprehensive summary about diverse mechanical stimuli that affect calcium homeostasis on muscle are provided. In muscle tissue, calcium plays a crucial role in the translation of physical forces to biochemical signals through a process called mechanotransduction. The downstream responses to mechanical forces mediated by changes in intracellular calcium concentration consist of cytoskeletal remodeling, cell cycle progression, growth, differentiation, and apoptosis, all necessary for healthy muscle development, repair, and regeneration. A deregulation from the normal process due to aging, disuse, trauma, or disease can result in clinical conditions such as muscle atrophy, which entails a significant loss of muscle mass and strength. The lack of understanding of the interplay between calcium signaling and the subsequent effects in skeletal muscle raised the need for a systematic investigation of the calcium-mediated responses to mechanical input in muscle cells.

The unyielding force of gravity remains often an unnoticed form of mechanical input sensed by all cellular systems. Thus, in the second part of this thesis, the models used to simulate micro, partial, and hypergravity are presented, where special attention is given to methods that mimic muscle disuse through gravitational unloading. In addition, the novel use of a RPM as a means to simulate partial gravity is described and validated experimentally. The proliferative capacity and cell cycle progression of myoblasts were analyzed and a comparison was made between the gravity exposure level (ranging from 0 to 0.6 g) and three different algorithms used to simulate partial gravity. It was revealed that a linear effect resulted in relation to the gravity level of exposure, as the myoblasts exhibited a reduction in the proliferation rate and an accumulation in the G2/M phase of the cell cycle in parallel with decreasing values of simulated partial gravity.

In the third part of this thesis, the effects of micro and hypergravity on muscle cells were investigated. In an initial study, the early stages of myogenesis and the expression of specific calcium-regulated genes were analyzed in cells cultured on a RPM and compared to results obtained from blocking calcium pharmacologically. This study indicated that cells cultured

under simulated microgravity exhibited a decrease in cell growth, not due to a decline in viability, but due to a delay in the cell cycle progression. In addition, there was a reduction in the expression of the transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) channel, as well as two isoforms of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1), which are transcriptional events regulated by calcium. Also dependent on calcium is myoblast differentiation into myotubes, which was impaired in cells cultured on the RPM. In a subsequent study, a specific analysis on cell cycle progression was conducted for cells cultured under simulated micro and hypergravity. In this study, it was revealed that cells cultured under simulated microgravity were accumulated between the G2 checkpoint and the onset of anaphase, as they were positive for cyclin B expression. When myoblasts were cultured under hypergravity conditions (4 g), no difference in cell growth or cell cycle progression was detected when compared to the 1 g controls.

In conclusion, this thesis shed more light on the development of muscle under different gravitational conditions. All together, the results indicated that a decrease in proliferation caused by a calcium-dependent delay in the cell cycle progression characterizes the mechanoreponse of muscle cells to gravitational unloading. In the future, the information that the G2/M phase is prolonged in myoblasts cultured under hypogravity can be used to develop therapeutic options. These countermeasures would assist to accelerate the progression of the G2/M phase under scenarios of gravity withdrawal and perhaps under situations of muscle atrophy due to aging, disuse, trauma, or disease as well. Thus, a potential treatment against muscle atrophy could be designed to recuperate cell growth and diminish the subsequent loss.

Zusammenfassung

Gesunde Muskelentwicklung ist ein Produkt eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Neubildung und Rückbildung. Bei der Muskelatrophie überwiegt die Rückbildung, was sich über die Zeit in einen Verlust an Muskelmasse und Kraft manifestiert. Dies erfolgt, da der Myogene Stammzellpool nicht mehr wirksam auf die Eingangssignale antworten kann, was einen Defekt im Regenerationsprozess verursacht. Solch ein Krankheitszustand tritt normalerweise mit dem Altern, wie auch bei körperlicher Inaktivität und Immobilisierung auf. Außerdem wird Muskelschwund auch bei der Entlastung der Muskeln von der Schwerkraft, wie von Astronauten während Raumflügen erlebt, induziert. In der Tat ist die Entlastung von Muskelzellen von der Schwerkraft ein experimenteller Ansatz, der verwendet werden kann, um die grundlegenden zellulären Mechanismen der Muskelentwicklungsregulierung besser zu verstehen. Da die Durchführung von Forschung im Weltraum auf Grund der hohen Kosten und intrinsischen Schwierigkeiten auf wenige Experimente beschränkt ist, wurden mehrere Modelle entwickelt, um Schwerelosigkeitsbedingungen am Boden zu simulieren. Da es sich um Modelle handelt, müssen jedoch die Ergebnisse mit Daten aus Weltraumexperimenten bestätigt werden. Durch solche Studien kann eine große Menge an Daten gesammelt werden und Versuche wiederholt werden, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Ein häufig benutztes Bodenmodell, welches erlaubt grosse Mengen an Proben kostengünstig Bedingungen auszusetzen, die der Schwerelosigkeit ähnlich sind, ist die Random Positioning Machine (RPM). Da sich die Skelettmuskulatur unter der Schwerkraft entwickelt hat, ist es wichtig zu verstehen, wie Muskelzellen reagieren, wenn dieser konstante mechanische Input nicht vorhanden ist. Die durch diese Analysen gewonnenen Erkenntnisse sind von grundlegender Bedeutung, nicht nur für Astronauten während Weltraumflügen, sondern auch für die Menschen auf der Erde, die unter Muskelatrophie durch Alterung, Trauma, Krankheit oder körperlicher Inaktivität und Immobilisierung leiden .

Daher konzentrierte sich diese Doktorarbeit auf folgende drei Ziele: i) die Vorstellung Kalziumvermittelter Reaktionen auf mechanische Reize in Muskelzellen, ii) die Bewertung

des Standes der Technik bezüglich Simulationsmodellen, um die Auswirkung der Gravitationskräfte auf Zellen zu studieren und iii) die Untersuchung der Genexpression und ausgewählter Proteine, des Zellzyklus, der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose in Muskelzellen unter verschiedenen Gravitationsbedingungen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird eine kurze Einführung in die Muskelentwicklung und eine umfassende Übersicht über diverse mechanische Reize, die die Kalzium-Homöostase in Muskelzellen beeinflussen, gegeben. In Muskelgewebe spielt Kalzium eine entscheidende Rolle bei der Uebersetzung von physikalischen Kräften in biochemische Signale durch einen Prozess namens Mechanotransduktion. Die nachgeschalteten Reaktionen auf mechanische Kräfte, vermittelt durch Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, bestehen aus Zytoskeletumbau, Zellzyklusprogression, Wachstum, Differenzierung und Apoptose; alle notwendig für eine gesunde Muskelentwicklung, Aufbau und Neubildung. Eine Deregulierung aus dem normalen Prozess durch Alterung, Nichtgebrauch, Trauma oder Erkrankung kann in einen klinischen Zustand wie Muskelatrophie führen, die einen erheblichen Verlust an Muskelmasse und Kraft mit sich bringt. Das fehlende Verständnis der Wechselwirkung zwischen Kalziumsignalwege und den Folgewirkungen im Skelettmuskel erhöht die Notwendigkeit für eine systematische Untersuchung der Kalzium-vermittelten Reaktionen auf mechanische Reize in Muskelzellen.

Die permanent vorhandene Schwerkraft bleibt oft eine unbemerkte Form eines mechanischen Reizes, der von allen Zellsystemen wahrgenommen wird. So werden im zweiten Teil dieser Arbeit, die verwendeten Modelle zur Simulation von Mikro-, Teil- und Hypergravitation vorgestellt, wobei besondere Aufmerksamkeit auf Verfahren gegeben wird, die die Muskelnichtnutzung durch Gravitationsentlastung nachahmen. Darüber hinaus wird die neuartige Verwendung der RPM als Mittel zur Teilschwerkraftsimulation beschrieben und experimentell validiert. Die Fähigkeit zur Proliferation und die Zellzyklusprogression von Myoblasten wurden analysiert, und es wurde ein Vergleich zwischen verschiedenen Schwerkraften (im Bereich von 0 bis 0,6 g) und drei verschiedenen Algorithmen, die verwendet wurden, um die Beschleunigungen zu berechnen, gemacht. Es zeigte sich, daß

ein linearer Effekt resultiert bezogen auf den Schwerkraftsgrad, da die Myoblasten eine Verringerung der Proliferationsrate und eine Akkumulation in der G2/M Phase des Zellzyklus parallel mit abnehmenden Werten der simulierten Schwerkraft aufweisen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Mikro und Hypergravitation auf Muskelzellen untersucht. In einer ersten Studie wurden die frühen Stadien der Myogenese und die Expression spezifischer Kalziumregulierter Gene in Zellen, welche auf der RPM kultiviert wurden, analysiert und mit Ergebnissen verglichen, wo Kalzium pharmakologisch blockiert wurde. Diese Studie zeigte, dass die unter simulierten Mikrogravitation kultivierten Zellen eine Abnahme des Zellwachstums auswiesen, nicht Aufgrund einer Abnahme der Lebensfähigkeit, jedoch wegen einer Verzögerung in der Zellzyklusprogression. Darüber hinaus gab es eine Verringerung der Expression des Transient Receptor Potential Canonical 1 (TRPC1) Kanals, sowie von zwei Isoformen des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), deren Transkription durch Kalzium reguliert wird. Auch abhängig von Kalzium ist die Myoblastendifferenzierung zu Myotuben, die für Zellen, die auf der RPM kultiviert worden waren, beeinträchtigt war. In einer nachfolgenden Studie wurde eine spezifische Analyse der Zellzyklusprogression für Zellen, die unter simulierter Mikro- und Hypergravitation kultiviert worden waren, durchgeführt. In dieser Studie zeigte sich, dass kultivierte Zellen unter simulierter Mikrogravitation zwischen dem G2-Kontrollpunkt und dem Beginn der Anaphase angereichert werden, da sie positiv für Cyclin B Expression waren. Wenn Myoblasten unter Hypergravitations-Bedingungen (4 g) kultiviert wurden, konnte kein Unterschied im Zellwachstum oder im Zellzyklus im Vergleich zur 1 g Kontrolle festgestellt werden.

Zusammengefasst wirft diese Arbeit mehr Licht auf die Muskelentwicklung unter verschiedenen Schwerkraftsbedingungen. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass eine Proliferationsabnahme durch eine Kalziumabhängige Verzögerung in der Zellzyklusprogression die Antwort der Muskelzellen zu einer Schwerkraftsentlastung charakterisiert. In Zukunft kann die Information, dass die G2/M Phase in unter Hypogravitation kultivierten Myoblasten verlängert ist, verwendet werden, um

Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Diese könnten das Fortschreiten der G2/M Phase beschleunigen unter Schwerelosigkeitsbedingungen und vielleicht sogar unter Situationen von Muskelatrophie aufgrund von Altern, Nichtnutzung, Trauma oder Erkrankung. Auf diese Weise, könnte eine potenzielle Behandlung von Muskelatrophie entwickelt werden, um Zellwachstum wiederherzustellen und die nachfolgende Rückbildung zu vermindern.