

## Abstract

Sarcopenia is an aging-related condition characterized by low skeletal muscle mass, strength and impaired physical performance. During aging, mitochondrial DNA (mtDNA) deletions accumulate to detrimental levels in few myofibers, ultimately leading to respiratory chain defects, segmental fiber atrophy, breakage and loss. However, the role of these mtDNA deletions-induced myofiber defects in sarcopenia is still poorly defined. It is also not clear yet whether accumulation of mtDNA deletions in muscle stem cells (MuSC) can contribute to sarcopenia development. We expressed a dominant-negative variant of the mitochondrial TWINKLE helicase under the control of myosin light chain 1f (MLC1f)-Cre and paired Box 7 (Pax7)-Cre<sup>ET</sup>, thereby generating two mouse models that accumulate mtDNA deletions specifically in differentiated myofibers (K320E-Twinkle<sup>skm</sup>) and MuSc (K320E-Twinkle<sup>MuSc</sup>), respectively. Despite robust accumulation of mtDNA deletions and RC defects, K320E-Twinkle<sup>skm</sup> did not exhibit accelerated loss of muscle mass, muscle strength and impaired physical performance compared to control mice. Histological analyses revealed few ragged red fibers (RFF), a modest increase in slow type I fibers and increased regeneration. Transcriptomic analyses demonstrated induction of Akt-mTORC1 signaling, *de novo* serine synthesis, transsulfuration and mitochondrial folate pathways, as well as upregulation of amino acid transporters, protein synthesis and glycolytic pathways, which might have compensated for the detrimental effects of accumulated mtDNA deletions. Moreover, genes involved in muscle protein proteolysis were also upregulated, as well as several myokines including fibroblast growth factor 21 (*FGF21*), C1q/TNF-related protein-3 (*Ctrp3*), and growth differentiation factor 15 (*Gdf15*). K320E-Twinkle<sup>MuSc</sup> mice muscles exhibited impaired regeneration upon injury as evidenced by dystrophic changes, increased fibrosis, RRFs, fat, non-muscle cells infiltration and reduced mass compared to controls. In conclusion, our results suggest that mtDNA deletions-induced respiratory chain dysfunction in few myofibers is not sufficient to cause sarcopenia but might act in synergy with other pro-sarcopenic factors. In contrast, accumulation of mtDNA deletions in activated MuSc might contribute to the development of sarcopenic phenotype by impairing repair or regeneration of myofibers

## Zusammenfassung

Sarkopenie ist eine altersassoziierte Erkrankung, welche durch den Verlust der skelettalen Muskelmasse sowie der Muskelkraft charakterisiert wird. Dieser Verlust geht mit der Einschränkung der physischen Aktivität einher. Im Alterungsprozess häufen sich Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) in einigen wenigen Muskelfasern zu so verheerenden Mengen an, dass dies unmittelbar zu Defekten in der Atmungskette und damit zur Atrophie, Brüchen und schließlich dem Verlust von Muskelfasern führt. Dennoch ist bis heute wenig bekannt über die Rolle dieser mtDNA-Deletion-induzierten Muskelfaserdefekten bei Sarkopenie. Unklar ist zudem, ob die Akkumulation von mtDNA Deletionen in Muskelstammzellen (MuSCs) zu der Krankheitsentwicklung beiträgt. In dieser Studie wird eine dominant-negative Variante der mitochondrialen TWINKLE Helikase sowohl unter der Kontrolle der Myosin Leichtkette 1f (MLC1f-Cre) als auch von paired box 7 (Pax7)-Cre<sup>ET</sup> exprimiert. Damit ergeben sich zwei Mausmodelle, die vermehrt mtDNA Deletionen akkumulieren, eines in differenzierten Muskelfasern (K320E-Twinkle<sup>Sk<sup>m</sup></sup>) und das andere in MuSCs (K320E-Twinkle<sup>MuSC</sup>). Trotz der erhöhten mtDNA-Deletionslast und der Atmungskettendefekte zeigten K320E-Twinkle<sup>Sk<sup>m</sup></sup> Mäuse keinen beschleunigten Verlust der skelettalen Muskelmasse, Muskelkraft oder der physischen Aktivität im Vergleich zu Kontrolltieren. Histologische Untersuchungen offenbarten wenige zerrissene, rote Fasern („ragged red fibers“), einen moderaten Anstieg von langsam zuckenden Typ I Fasern sowie eine erhöhte Regeneration. Die Transkriptomanalyse des Skelettmuskels wies auf eine Aktivierung des Akt-mTOR-Signalwegs, *de novo* Serinsynthese, Transulfuration und den mitochondrialen Folsäure-Metabolismus hin sowie auf eine Hochregulation von Aminosäuretransportern, Proteinsynthese und Glykolyse. Diese Veränderungen könnten als Kompensationsreaktion in Folge der schädigenden Effekte durch die mtDNA Deletionen aufgetreten sein. Des Weiteren waren Gene hochreguliert, welche an der Lyse von Muskelproteinen beteiligt sind, sowie einige Myokine einschließlich des Fibroblasten Wachstumsfaktor 21 (*Fgf21*), des C1q/TNF-bezogenen Protein-3 (*Ctrp3*) und des Wachstumsdifferenzierungsfaktors 15 (*Gdf15*). K320E-Twinkle<sup>MuSC</sup> Mäuse wiesen eine beeinträchtigte Regeneration nach Schädigung des Muskels mittels Kardiotoxin Im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Diese äußerte sich durch dystrophische Veränderungen, wie eine erhöhte Fibrose, die Ansammlung von so genannten *red ragged* Fasern,

Infiltration von Nicht-Muskel- sowie Fettzellen und einer Atrophie des Muskels. Die Ergebnisse der Studie zeigen auf der einen Seite, dass durch mtDNA Deletionen induzierte Atmungskettendefekte allein nicht ausreichend sind für die Ausbildung von Sarkopenie. Vielmehr treten sie assoziativ mit anderen Faktoren auf. Auf der anderen Seite können mtDNA Deletionen in aktivierten MuSCs durch Beeinträchtigung der Muskelregeneration tatsächlich zur Krankheitsbildung beitragen.