UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin

III. Medizinische Klinik und Poliklinik (Nephrologie/Rheumatologie/Endokrinologie)

Prof. Dr. med. Tobias B. Huber

Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Wirkung des löslichen Aktivin-Rezeptors Typ IIB (sActRIIB) in verschiedenen Krankheitsbildern

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

> Vorgelegt von: Jennie Lisa von der Heide geboren in Henstedt-Ulzburg

> > Hamburg 2024

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.01.2025

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Catherine Meyer-Schwesinger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Tobias B. Huber

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Einführende Erläuterungen	6
1.1.1 Allgemeines zu Myostatin und Aktivin A – ihre Signalkaskade und deren Wi	rkungen 6
1.1.2 Aufbau und Wirkung des sActRIIB und Übersicht zu bisherigen präklinische	n Studien. 8
1.1.3 Bisheriger klinischer Einsatz des sActRIIB	10
1.2 sActRIIB und eine Kalorien-reduzierte Diät als Therapieoptionen für die Auswirkungen von Alterungsprozessen	12
1.2.1 Die Bedeutung von Alterungsprozessen für die Entstehung von Krankheiten.	12
1.2.2 Genetische Grundlage und Phänotyp des Progerie-Mausmodells Ercc1 ^{Δ/-}	13
1.2.3 Bisherige Versuche mit dem sActRIIB im Ercc1 ^{Δ/-} Mausmodell	14
1.2.4 Bisherige Erkenntnisse zum Einfluss einer Kalorien-reduzierten Diät auf Alterungsprozesse im Allgemeinen und in Ercc1 ^{Δ/-} Mäusen	15
1.3 sActRIIB als Therapieoption bei Sichelzellanämie	16
1.3.1 Genetik, Epidemiologie, Symptomatik und bisherige Therapie der Sichelzella	nämie 16
1.3.2 Neue Therapieoptionen für die Sichelzellanämie	17
1.3.3 Genetische Grundlage und Phänotyp des Sichelzell-Mausmodells	18
1.3.4 Mögliche Angriffspunkte des sActRIIB bei Sichelzellanämie	19
1.4 sActRIIB als supportive Therapie gegen die unerwünschten Wirkungen von	Cisplatin 20
1.4.1 Cisplatin – Indikationen und bekannte Nebenwirkungen	20
1.4.2 Bisherige supportive Therapieoptionen bei Gabe von Cisplatin	21
1.4.3 Mögliche Angriffspunkte und vorherige Versuche mit dem sActRIIB	23
1.5 Potenzielle unerwünschte Wirkungen des sActRIIB	24
1.5.1 Mechanismen zur Entstehung und bisher bekannte unerwünschte Wirkungen sActRIIB	des 24
1.5.2 Unerwünschte Wirkungen des sActRIIB auf den reproduktiven Trakt	25
1.6 Formulierung der Fragestellung	26
2. Material	27
2.1 Mauslinien	27
2.1.1 Progeriemodell Ercc1 ^{Δ/-}	27
2.1.2 Sichelzellanämie knock-in Mausmodell	28
2.1.3 Cisplatin Behandlung an CD-1 Mäusen	29
2.1.4 Duchenne Muskeldystrophie Modell mdx und D2-mdx	29
2.2 Chemikalien	30
2.3 Puffer und Lösungen	30
2.3.1 Elektronenmikroskopie	30

2.4 Geräte	31
2.4.1 Mikroskope	31
2.4.2 Weitere Geräte	31
2.5 Verbrauchsmaterialien	31
2.6 Software	32
2.7 Statistik	32
3. Methoden	32
3.1 Fixierung für die Elektronenmikroskopie	32
3.2 Einbettung der Nieren und Muskeln für die darstellende Elektronenmikroskopie	32
3.3 Einbettung der Spermien für die Elektronenmikroskope	33
3.4. Auswertungsmethoden	34
3.4.1. Quantitative Bestimmung der Fußfortsatzbreite in den Nierenglomeruli	34
3.4.2 Qualitative Auswertung der Nieren	34
3.4.3 Qualitative Auswertung der Skelettmuskulatur	34
3.4.4 Qualitative Auswertung der Spermien	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Progeriemodell Ercc1 ^{∆/-}	36
4.1.1 Untersuchungen an der Niere	36
4.1.2 Untersuchungen an der Skelettmuskulatur	40
4.2 Sichelzellanämie-Modell	44
4.2.1 Untersuchungen an der Niere	44
4.2.2 Untersuchungen an der Skelettmuskulatur	47
4.3 Cisplatin-Mausmodell	49
4.3.1 Untersuchungen an der Niere	49
4.3.2 Untersuchungen an der Skelettmuskulatur	53
4.4 Nebenwirkungen des sActRIIB – Spermatozoen bei den Duchenne Muskeldystroph	ie
Mausmodellen mdx und D2-mdx	57
4.4.1 Struktur der Spermatozoen von mdx und D2-mdx-Mäusen bei Behandlung mit PBS (Kontrollgruppe)	57
4.4.2 Struktur der Spermatozoen von mdx und D2-mdx-Mäusen bei Behandlung mit dem sActRIIB	57
5. Diskussion	60
5.1 sActRIIB und eine Kalorien-reduzierte Diät als Therapieoptionen für die Auswirkungen von Alterungsprozessen	60
5.2 sActRIIB als Therapieoption bei Sichelzellanämie	61
5.3 sActRIIB als supportive Therapie gegen die unerwünschten Wirkungen von Cispla	tin
	63
5.4 Potenzielle unerwünschte Wirkungen des sActRIIB	64
	4

5.5. Ausblick: Potenziale und Limitationen des sActRIIB und Spekulation über seinen	
Wirkmechanismus	66
6. Zusammenfassung	69
7. Abkürzungsverzeichnis	71
8. Abbildungsverzeichnis	73
9. Tabellenverzeichnis	73
10. Literaturverzeichnis	74
11. Danksagung	82
12. Eidesstattliche Versicherung	83

1. Einleitung

1.1 Einführende Erläuterungen

1.1.1 Allgemeines zu Myostatin und Aktivin A – ihre Signalkaskade und deren Wirkungen

Myostatin (auch growth differention factor 8) und die Aktivine sind Teil der Transforming Growth Factor beta (TGF- β) Proteinfamilie. Der wichtigste Subtyp der Aktivine ist das Aktivin A. Beide Proteine werden unter anderem (u. a.) in der Skelettmuskulatur exprimiert. Sie wirken autokrin und parakrin auf die Muskelzellen (Han et al. 2013). McPherron et al. (1997) entdeckten das Myostatin-Gen und entwickelten ein Myostatin-Null-Mausmodell, das durch eine Zunahme der Muskelmasse als Resultat von Muskelhypertrophie und -hyperplasie gekennzeichnet ist. Seitdem ist Myostatin als Inhibitor des Muskelwachstums bekannt. Auch die Überexpression von Proteinen, die Myostatin hemmen, wie beispielsweise Follistatin, führt zu einer Zunahme der Muskelmasse (Lee und McPherron 2001). Ein Case Report berichtet über ein Kind mit einer loss-of-function Myostatin-Mutation, bei dem ebenfalls eine starke Muskelhypertrophie und überdurchschnittliche Muskelkraft bestand (Schuelke et al. 2004). Demnach scheint Myostatin auch im Menschen das Muskelwachstum zu hemmen.

Myostatin hemmt zum einen die Myogenese während der Entwicklung (Han et al. 2013). Es wirkt sich aber auch nach abgeschlossener Entwicklung weiter auf die Muskulatur aus. McCroskery et al. (2003) stellten die These auf, dass Myostatin die Aktivierung von Satellitenzellen verhindert. Satellitenzellen sind Stammzellen der Muskulatur, notwendig für Wachstum und Regeneration (Dhawan und Rando 2005). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Myostatin auch über andere Mechanismen auf die Muskulatur wirkt. In einem Mausversuch führte die Hemmung des Aktivin-Myostatin-Signalwegs trotz geringer Aktivität der Satellitenzellen zu einer Muskelhypertrophie. Auch in zwei Mausmodellen mit nicht-funktionalen Satellitenzellen ließ sich eine Muskelhypertrophie erzeugen. Dies indiziert einen direkten Einfluss von Myostatin und Aktivin A auf die Myofibrillen (Lee et al. 2012).

Zum genaueren Verständnis des Einflusses auf die Muskulatur ist eine Erläuterung der durch Aktivin A und Myostatin ausgelöste Signalkaskade notwendig (Abbildung 1.1). Myostatin und Aktivin A interagieren auf der Zelloberfläche mit Rezeptorkomplexen, die aus Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren bestehen. Wichtige Typ 1 Rezeptoren sind die Activin Receptor-Like Kinase 4 (ALK4) und ALK7, die häufigsten Typ 2 Rezeptoren sind der Aktivinrezeptor Typ IIA (ActRIIA) und Typ IIB (ActRIIB) (Olsen et al. 2015). Nach Bindung von Aktivin A oder Myostatin an den ActRIIB (oder ActRIIA) dimerisiert dieser und anschließend werden die Typ 1 Rezeptoren rekrutiert. Diese sind Kinasen und phosphorylieren Smad2 und Smad3, die daraufhin den Smad2/3/4-Komplex bilden. Dieser Komplex wirkt im Zellkern als Transkriptionsfaktor für verschiedene Genprodukte, die letztendlich zum

Muskelabbau führen (Han et al. 2013). Ein weiterer Signalweg von Aktivin A und Myostatin beginnt mit der Hemmung der Proteinkinase B (AKT), was wiederum die forkhead box protein O (FoxO)-Signalkaskade aktiviert. Resultat dessen ist die Aktivierung des Ubiquitin-Protease-Systems und der Autophagie, was den Verlust von Muskelproteinen verstärkt (Lokireddy et al. 2012, Lee et al. 2011).

Aus den Wirkungen von Aktivin A und Myostatin lässt sich ableiten, dass eine Blockade ihrer Signalkaskade eine Behandlungsoption für einen Verlust der Skelettmuskulatur (Sarkopenie) darstellt. Eine Möglichkeit zur Hemmung dieses Signalwegs ist der lösliche ActRIIB (sActRIIB), dessen Aufbau und Wirkungsweise im Folgenden genauer erläutert wird.



Abbildung 1.1: Aktivin-Myostatin-Signalkaskade im Muskel. Aktivin oder Myostatin binden an den ActRIIB auf der Muskelmembran. Dimerisierung und Rekrutierung von Typ 1 Rezeptoren. Diese phosphorylieren Smad2 und Smad 3, die den Smad 2/3/4-Komplex bilden. Der Smad-Komplex wirkt im Zellkern als Transkriptionsfaktor. Außerdem Hemmung der AKT, dadurch Aktivierung der Foxo-Signalkaskade und Aktivierung des Ubiquitin-Protease-Systems sowie der Autophagie. Beide Signalwege führen zu Muskelverlust. (Quelle: Han et al. (2013))

1.1.2 Aufbau und Wirkung des sActRIIB und Übersicht zu bisherigen präklinischen Studien

Der sActRIIB besteht aus einer löslichen Form des ActRIIB gekoppelt an das Fc-Fragment von Maus-IgG. Er wurde u. a. von Relizani et al. (2014) entwickelt. Er wirkt als "Ligand-Trap", das heißt, er komplexiert und neutralisiert die Liganden des ActRIIB, also auch Myostatin und Aktivin A. Bei Wildtyp(WT)-Mäusen und beim Muskeldystrophie-Mausmodell mdx führte eine 4-monatige Behandlung mit dem sActRIIB zu einer signifikanten Zunahme des Körpergewichts und insbesondere der Muskelmasse. Im Gegensatz zum Myostatin-Null-Mausmodell, bei dem bereits pränatal kein Myostatin vorhanden ist, hatte die Blockade in adulten Mäusen keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Muskelfasern (Relizani et al. 2014).

In den letzten Jahren wurde der sActRIIB in präklinischen Studien mit unterschiedlicher Zielsetzung eingesetzt. Ein Forschungsschwerpunkt ist die Erhaltung von Masse und Funktion der Muskulatur. Im Progerie-Mausmodell Ercc1^{Δ/-}, das Alterungsprozesse abbildet, führte die Gabe des sActRIIB zu einer Zunahme der Muskelmasse und -funktion (Alyodawi et al. 2019). Am Beispiel des Mausmodells mdx für die Duchenne Muskeldystrophie demonstrierten Béchir et al. (2016), dass der sActRIIB das Muskelvolumen und die absolute Muskelkraft steigert. Allerdings wiesen sie keinen Effekt auf die spezifische Kraft (bezogen auf das Muskelgewicht), die allgemeine Schwäche und schnelle Ermüdung der Mäuse nach. Die Autor*innen erklären das u. a. durch einen höheren basalen Sauerstoff- und Energieverbrauch, der die Ausdauer der Tiere beeinflussen könnte.

Die Erhaltung der Muskulatur spielt auch im Kontext von Neoplasien eine Rolle. Viele Tumorpatient*innen leiden unter einer Kachexie. Die Kachexie wird definiert als multifaktorielles Syndrom mit einem andauernden Verlust von Skelettmuskelmasse, das durch konventionelle Therapiemaßnahmen nicht komplett reversibel ist und zu funktionellen Beeinträchtigungen führt (Fearon et al. 2011). Das Vorliegen einer Kachexie ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose und einem reduziertem Gesamtüberleben (Dewys et al. 1980, Martin et al. 2015, Fouladiun et al. 2007, Bachmann et al. 2008). Der sActRIIB wurde in verschiedenen Neoplasie-Mausmodellen als Therapieoption beziehungsweise (bzw.) Präventionsmittel gegen eine Kachexie eingesetzt. Dabei zeigte sich eine teilweise Reversibilität der Kachexie mit verbesserter Fitness am Beispiel vom Lungenkarzinom (Busquets et al. 2012, Toledo et al. 2016) und in einigen Studien auch ein verlängertes Gesamtüberleben (Toledo et al. 2016, Zhou et al. 2010, Nissinen et al. 2018). Allerdings sind die Zusammenhänge zwischen der besseren Muskelerhaltung und dem verlängerten Gesamtüberleben noch unklar. In die Frage der Kausalität müssen auch die Effekte des sActRIIB auf andere Organe mit einbezogen werden (Hulmi et al. 2021). Im Gegensatz zu diesen positiven Ergebnissen steht eine Untersuchung von menschlichem und murinem Tumorgewebe aus duktalen Adenokarzinomen des Pankreas. Hierbei wurde Aktivin A als protektiver, die Progression verlangsamender Faktor in präneoplastischen Läsionen des Pankreas identifiziert. Aufgrund dessen sollte ein Einsatz des sActRIIB, auch wenn er gegen die Kachexie-Symptomatik von Neoplasien erfolgversprechend ist, zumindest bei Pankreas-Neoplasien mit Vorsicht betrachtet werden (Zhao et al. 2020).

Im Rahmen von Neoplasien ist auch deren oft aggressive Therapie relevant. Viele Chemotherapeutika führen, unabhängig von einer Tumorerkrankung, zu einem Muskelverlust (Garcia et al. 2008, Hain et al. 2019, Essex et al. 2019). Eine geringere Muskelmasse prädisponiert für eine höhere Toxizität der verwendeten Chemotherapeutika und beeinflusst das Ansprechen auf die Therapie (Kazemi-Bajestani et al. 2016, Pamoukdjian et al. 2018, Surov et al. 2021). In präklinischen Studien hat sich gezeigt, dass der Einsatz des sActRIIB auch einem Chemotherapie-induzierten Muskelverlust entgegenwirken kann (Nissinen et al. 2016, Barreto et al. 2017, Hulmi et al. 2018).

Neben diesen Studien, deren Schwerpunkt auf der Muskulatur liegt, beschäftigen sich einige Arbeitsgruppen auch mit der Wirkung des sActRIIB auf andere Organsysteme. Eine weitere Studie zum Progerie-Mausmodell Ercc1^{$\Delta/-$} schilderte die Auswirkungen des sActRIIB auf das Herz. Dabei ist eine Verbesserung der systolischen Herzfunktion, eine vermehrte Expression antioxidativer Stoffe und eine Reduktion der fibrotischen Prozesse im Herzen festgestellt worden (Clavere et al. 2022).

Aktivin A und Myostatin beeinflussen auch die Struktur und Funktionsweise der Niere. Leonhard et al. (2016) untersuchten dies in drei verschiedenen Mausmodellen der Autosomal-Dominanten Polyzystischen Nierenerkrankung (PKD). In zwei Modellen der Early-Onset-PKD verbesserte die Gabe des sActRIIB die Nierenfunktion und -histologie. In einem Adult-onset-PKD Modell zeigte die bereits früh (ab einem Alter von 46 Tagen) mit sActRIIB behandelte Interventionsgruppe eine längere mediane Überlebenszeit ab dem Behandlungsbeginn (97 Tage vs. 54 Tage bei der Kontrollgruppe). Eine andere Interventionsgruppe, deren Behandlung erst später begann, wies keine signifikant längere mediane Überlebenszeit auf, was auf eine höhere Wirksamkeit des sActRIIB in frühen Krankheitsstadien hindeutete.

Auch im Progerie-Modell Ercc1^{Δ/-} verbesserte der sActRIIB die Nierenfunktion. Bei den behandelten Tieren kam es auf ultrastruktureller Ebene zu weniger Foot Process Effacement (FPE) als bei den unbehandelten Ercc1^{Δ/-} Mäusen. Außerdem sank das Ausmaß der Proteinurie deutlich, wenn auch nicht auf Normalwerte. Die Albumin-Kreatinin-Ratio war bei den unbehandelten Tieren 12-fach erhöht, bei sActRIIB-Gabe noch 3,7-fach. Weitere Effekte betrafen u. a. die Leberfunktion, die Knochen und das Nervensystem. Die Gesundheit war insgesamt verbessert, aber es kam zu keiner Verlängerung der Lebensspanne (Alyodawi et al. 2019).

Solagna et al. (2021) untersuchten den Zusammenhang zwischen der chronischen Niereninsuffizienz und dem dabei häufig auftretenden Muskelverlust. Sie analysierten die Blutproben verschiedener Mausmodelle der chronischen Niereninsuffizienz und fanden signifikant erhöhte Werte von Aktivin A und anderen Stoffen, die einen Muskelverlust begünstigen. Die gesteigerte Produktion von Aktivin A war ausschließlich in der Niere nachweisbar. Mittel Single-Cell-Sequencing wurde festgestellt, dass Fibroblasten und Zellen des Juxtaglomerulären Apparats Aktivin A exprimierten. Erhöhte Serumwerte von Aktivin A wurden auch in einer Kohorte von 75 Patient*innen mit Glomerulonephritis nachgewiesen und die Aktivin A Werte korrelierten negativ mit der errechneten glomerulären Filtrationsrate.

Unter der These, dass die vermehrte Produktion von Aktivin A durch die Niere zum Muskelverlust führt, blockierten sie im Mausmodell der chronischen Niereninsuffizienz das Aktivin-Signaling durch den sActRIIB. Hierdurch wurde der Verlust von Muskelmasse und Muskelkraft aufgehoben. Interessanterweise verbesserten sich auch die Ultrastruktur der Niere und die Nierenfunktion insgesamt. Damit erbrachten die Autor*innen einen starken Hinweis auf eine Interaktion zwischen Niere und Muskulatur und identifizierten das Aktivin-Signaling als Therapieoption für den Muskelverlust im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz (Solagna et al. 2021).

Die eben genannten Studien stellen eine Auswahl der wissenschaftlichen Arbeiten mit dem sActRIIB dar. Deutlich wird, dass insbesondere dem Einfluss des Aktivin-Rezeptor-Signaling auf die Skelettmuskulatur eine große Bedeutung zukommt. In der vorliegenden Arbeit werden die ultrastrukturellen Veränderungen durch den sActRIIB mit Fokus auf die Skelettmuskulatur und die Niere untersucht.

1.1.3 Bisheriger klinischer Einsatz des sActRIIB

Seit Kurzem gibt es eine Zulassung für einen leicht veränderten sActRIIB. Der Wirkstoff Luspatercept besteht aus der extrazellulären Domäne des ActRIIB gekoppelt an den Fc-Teil vom menschlichen IgG. Die Bindungsstelle wurde so modifiziert, dass die Affinität gegenüber Aktivin A stark reduziert ist. Hierdurch sollten die nicht-hämatologischen Wirkungen eingegrenzt werden (Fenaux et al. 2020). Die European Medicines Agency (EMA) hat Luspatercept am 25.6.2020 für zwei Indikationen zugelassen. Dabei handelt es sich um transfusionspflichtige Anämien aufgrund von:

- 1. Myelodysplastischen Neoplasien (MDS) mit Ringsideroblasten, mit sehr niedrigem, niedrigem oder intermediärem Risiko, die auf eine Erythropoetin-basierte Therapie nicht zufriedenstellend angesprochen haben oder dafür nicht geeignet sind
- 2. β -Thalassämie (EMA 2021).

In der Zulassungsstudie für die MDS wurden 229 Patient*innen im Verhältnis 2:1 in eine Interventions- und Placebogruppe randomisiert eingeschlossen. Der primäre Endpunkt der Studie bestand in der Transfusionsfreiheit für ein Intervall von mindestens 8 Wochen binnen der ersten 24 Wochen der Behandlung. 38 % der Interventionsgruppe und 13 % der Placebogruppe erreichten den primären Endpunkt (p<0,001). Der sekundäre Endpunkt war die Transfusionsfreiheit für 12 Wochen oder länger und wurde in der Interventionsgruppe signifikant häufiger erreicht. Unter allen Patient*innen, die den primären Endpunkt erreichten, betrug die mediane Dauer der längsten transfusionsfreien Episode in der Interventionsgruppe 30,6 Wochen, in der Placebogruppe 13,6 Wochen. Die häufigsten berichteten Nebenwirkungen (> 10 %) waren Ermüdung, Diarrhö, Asthenie, Übelkeit, Schwindelgefühl und Rückenschmerzen (Fenaux et al. 2020).

In der Zulassungsstudie für die β -Thalassämie wurden 336 Patient*innen im Verhältnis 2:1 in eine Interventions- und eine Placebogruppe randomisiert eingeschlossen. Der kombinierte primäre Endpunkt bestand in einer Reduktion der Transfusionshäufigkeit um mindestens 33 % in den Wochen 13-24 nach Therapiebeginn und der Einsparung von mindestens 2 Erythrozyten-Konzentraten in diesem Zeitintervall. 21,4 % der Interventionsgruppe und 4,5 % der Placebogruppe erreichten ihn (p<0,001). Bei 40,2 % der Interventionsgruppe sank die Transfusionshäufigkeit sogar um mehr als 50 % (vs. 6,3 % in der Placebogruppe). Die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen (> 5 %) waren Knochenschmerzen, Arthralgien, Schwindelgefühl, Hypertension und Hyperurikämie. Außerdem trat bei 3,6 % der Interventionsgruppe (vs. 0,9 % der Placebogruppe) eine schwerwiegende Nebenwirkung in Form eines thromboembolischen Ereignis auf. Alle diese Patienten waren splenektomiert und hatten mindestens einen weiteren Risikofaktor für thromboembolische Ereignisse, daher verbleibt die ursächliche Zuordnung unklar (Cappellini et al. 2020).

Auch im Bereich der Muskeldystrophien und anderer muskuloskelettaler Erkrankungen wurden klinische Studien mit dem Ziel der Blockade des Aktivin-Myostatin-Signalwegs durchgeführt.

Der Wirkstoff Ramatercept wurde zur Behandlung der Duchenne Muskeldystrophie entwickelt. Ramatercept ist ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des ActRIIB und dem Fc-Teil vom humanen IgG. Im Gegensatz zu Luspatercept bindet er alle Liganden des ActRIIB (Campbell et al. 2017). In den präklinischen Studien mit Ramatercept zeigte sich eine Zunahme des Körpergewichts und Muskelmasse in WT und mdx-Mäusen (Cadena et al. 2010, George Carlson et al. 2011). In der Phase-1-Studie bei postmenopausalen Frauen wurde nach einmaliger Behandlung mit Ramatercept eine dosisabhängige Erhöhung der gesamten fettfreien Körpermasse und eine Zunahme des Volumens der Oberschenkel-Muskulatur gemessen. Die häufigsten unerwünschten Wirkungen waren eine erhöhte Lipase, Kopfschmerzen und Erytheme bzw. Hämatome an der Injektionsstelle (Attie et al. 2013).

In die anschließende Phase-2-Studie wurden insgesamt 24 Jungen mit Duchenne Muskeldystrophie eingeschlossen und im Verhältnis 3:1 randomisiert zwei Interventionsgruppen (verschiedene Dosierungen) und der Placebogruppe zugeteilt. In den funktionellen Messungen zeigte sich ein Trend zu Verbesserungen, zum Beispiel (z. B.) beim 6-Minuten-Lauf. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant. Auch die mittlere fettfreie Körpermasse hatte eine Tendenz zur dosisabhängigen Zunahme. Es traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Allerdings führte das sehr häufige Auftreten von Epistaxis und Teleangiektasien in der Hochdosis-Interventionsgruppe (jeweils 5 von 9 Teilnehmer*innen) zum Abbruch der Studie. Die Autor*innen Campbell et al. (2017) führen die aufgetretenen vaskulären Nebenwirkungen auf die Unselektivität des Rezeptors zurück. Ramatercept bindet neben Myostatin auch andere Mitglieder der TGF-β Familie wie Aktivine und Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs). BMP9 und BMP10 regulieren die Angiogenese (David et al. 2007), daher könnte ihre Hemmung die Ursache für die beobachteten Teleangiektasien, Epistaxis und Gingiva-Blutungen sein.

Neben sActRIIB wurden auch selektive Myostatin-Blocker in klinischen Studien getestet. Zwei verschiedene monoklonale Antikörper gegen Myostatin und ein Adnektin mit ebenfalls Myostatin als Zielstruktur, gingen nach erfolgversprechenden präklinischen und Phase-1-Studien in eine Phase-2-Studie mit Patient*innen verschiedener Muskeldystrophien. Allerdings wurden sie alle wegen fehlender Wirksamkeit abgebrochen (Suh und Lee 2020). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Forschung mit Myostatin-Hemmern und anderen Blockern des Aktivin-Rezeptor-Signalweges (Suh und Lee 2020, Campbell et al. 2017).

1.2 sActRIIB und eine Kalorien-reduzierte Diät als Therapieoptionen für die Auswirkungen von Alterungsprozessen

1.2.1 Die Bedeutung von Alterungsprozessen für die Entstehung von Krankheiten

Der Prozess der Alterung wird definiert als zeit-abhängige Abnahme der molekularen, zellulären und Gewebsfunktionen sowie der Funktion des Gesamtorganismus (Alyodawi et al. 2019). Das Alter ist ein Hauptrisikofaktor für lebensbedrohliche neoplastische, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen (Niccoli und Partridge 2012).

Ein Hauptsymptom der Alterung ist die Sarkopenie, ein altersbedingter Verlust von Masse und Funktion der Skelettmuskulatur (Laurent et al. 2019). Ab dem mittleren Lebensalter reduziert sich die Muskelmasse jährlich um 1-2 %, was zu einer Abnahme der Muskelkraft von 1,5-5 % pro Jahr führt (Keller und Engelhardt 2013). Für die Sarkopenie gibt es international verschiedene Diagnosekriterien. Alle kombinieren eine Messung der Knochen- und fettfreien Körpermasse mit einem oder mehreren Parametern der körperlichen Leistungsfähigkeit (z. B. Griffstärke, Ganggeschwindigkeit) (Laurent et al. 2019). Pacifico et al. (2020) stellten in einem systematischen Review eine hohe Komorbidität der Sarkopenie mit zahlreichen altersassoziierten Erkrankungen fest. Dies betraf kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen, Demenzen und Diabetes mellitus, bei deren Betroffenen die Prävalenz der Sarkopenie jeweils signifikant höher war als bei den nichterkrankten Vergleichsgruppen.

Hieraus lässt sich die Sarkopenie als ein möglicher Mediator zwischen der Alterung und dem Auftreten von Erkrankungen ableiten. Gestützt wird diese These durch eine prospektive Kohortenstudie, in der sich eine höhere Muskelmasse als unabhängiger prognostischer Faktor für eine geringere Mortalität herausstellte (Srikanthan und Karlamangla 2014). Die genauen kausalen Zusammenhänge zwischen den Alterungsprozessen, der Sarkopenie und ihrem Einfluss auf das Überleben sind noch ungeklärt. Dennoch gibt es Grund zur Annahme, dass Interventionen, die dem Erhalt der Muskulatur dienen, auch einen positiven Effekt auf andere Alterserscheinungen und das Gesamtüberleben haben könnten.

1.2.2 Genetische Grundlage und Phänotyp des Progerie-Mausmodells Ercc1^{Δ/-}

Das progeroide Mausmodell Ercc1^{Δ/-} hat im Ercc1-Gen einen Knockout in einem Allel und eine Deletion der letzten sieben c-terminalen Aminosäuren des WT-Proteins im anderen Allel. Ercc1 steht für "Excision repair cross-complementation 1" und ist Bestandteil verschiedener Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparatur-Mechanismen und insbesondere der Nukleotidexzisionsreparatur (Sijbers et al. 1996). Die Nukleotidexzisionsreparatur behebt Schäden in der DNA, die durch UV-Strahlung entstehen. Dazu gehören u. a. Crosslinks und DNA-Addukte. Ercc1 ist Teil eines Komplexes, der die 5'-Inzision zur Entfernung des defekten DNA-Stranges durchführt (Krasikova et al. 2021).

Durch den Funktionsverlust von Ercc1 akkumulieren die DNA-Schäden. Ercc1^{∆/-}Mäusen haben bereits ab der 4. Lebenswoche Alterungsschäden in verschiedenen Organen, die teilweise die Veränderungen in WT-Mäusen am Ende ihrer Lebensspanne übertreffen (Dollé et al. 2011, Gregg et al. 2012). Ihre Lebenserwartung beträgt 19-29 Wochen, die von WT-Mäusen ist etwa sechsmal so hoch (Dollé et al. 2011). Im Folgenden wird der Phänotyp dieses Mausmodells mit Fokus auf die Muskulatur und die Niere beschrieben.

Alyodawi et al. (2019) untersuchten die Muskulatur von Ercc1^{Δ/-} Mäusen im Alter von 16 Wochen. Die Muskelmasse betrug zu diesem Zeitpunkt 40-60 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der Muskelfasern war die Anzahl der Satellitenzellen auf 50 % oder weniger der Normalwerte reduziert und es bestand ein Defizit in ihrer Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit. Die Muskelkraft der Ercc1^{Δ/-} Mäuse, gemessen an ihrer Griffstärke, sowie die spezifische (gewichtsbezogene) Kraft waren signifikant vermindert. Auf ultrastruktureller war die Struktur der Sarkomere deutlich verändert und inhomogen. Die Querstreifung wirkte unregelmäßig durch unterschiedlich dicke oder fehlende Z-Linien und teils aufgespaltene Sarkomere. Die Mitochondriendichte war reduziert, sowohl innerhalb der Muskelfaser als auch direkt unter dem Sarkolemm. Zudem waren die Mitochondrien hypertroph im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Nieren der Ercc1^{Δ/-} Mäuse untersuchten Alyodawi et al. (2019) im Alter von 16 Wochen. Der Albumin-Kreatinin-Quotient im Urin, ein funktioneller Parameter, war bei den Ercc1^{Δ/-} Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe 12-fach erhöht. Dies lässt auf eine massive Proteinurie schließen. Elektronenmikroskopisch fanden sie als auffälligstes Merkmal ein signifikantes FPE. Außerdem waren die Podozyten insgesamt hypertroph und wiesen vergrößerte Mitochondrien auf. Die glomeruläre Basalmembran war signifikant verdickt.

1.2.3 Bisherige Versuche mit dem sActRIIB im Ercc1^{Δ/-} Mausmodell

Als Therapie für die Alterserscheinungen erhielten die Ercc1^{Δ/-}Mäuse in der Studie von Alyodawi et al. (2019) im Alter von 7-16 Wochen zweimal wöchentlich intraperitoneale Injektionen mit dem sActRIIB oder phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) als Placebo. Untersucht wurden die Auswirkungen auf die Muskulatur sowie Niere, Leber und Knochen. Die deutlich reduzierte Lebensspanne wurde durch die Therapie mit dem sActRIIB nicht verändert.

Im Vergleich zu den Placebo-behandelten $\text{Ercc1}^{\Delta/-}$ Mäusen lag in der sActRIIB Gruppe eine signifikante Steigerung der Muskelmasse (30-62 %) vor. Die Masse der anderen untersuchten Organe war unverändert. Im Allgemeinen verhielt sich die sActRIIB Gruppe aktiver und legte größere Strecken zurück als die Placebo Gruppe und die gesunde Kontrollgruppe.

Die Parameter der Muskelfunktion, Griffstärke und spezifischen Kraft konnten durch die Behandlung mit dem sActRIIB signifikant verbessert werden. Innerhalb der Muskelfasern war die Anzahl der Satellitenzellen auch in der sActRIIB Gruppe unverändert erniedrigt. Jedoch war ihre Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit höher als in der Placebo Gruppe. Die in der Placebo Gruppe auftretenden ultrastrukturellen Veränderungen der Sarkomere waren nur noch vereinzelt vorhanden. Die Dichte der Mitochondrien unter dem Sarkolemm war im Vergleich zur Placebogruppe signifikant erhöht. Innerhalb der Muskelfaser war die Mitochondriendichte nicht signifikant verändert. Die Größe der Mitochondrien näherte sich dem Normalwert an.

Auch in der Niere gab es Veränderungen durch die Behandlung mit sActRIIB. Der in der Placebo Gruppe 12-fach erhöhte Albumin-Kreatinin-Quotient sank auf eine 3,7-fache Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Demnach lag eine geringere Proteinurie vor, was auf eine bessere Filterfunktion der Glomeruli hindeutet. Elektronenmikroskopisch waren das FPE sowie die Verdickung der glomerulären Basalmembran in der sActRIIB Gruppe deutlich reduziert. Abschnittsweise erschienen die Fußfortsätze der Podozyten komplett normalisiert, in anderen Bereichen leicht verbreitert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Dicke der glomerulären Basalmembran war im Vergleich zur Placebo Gruppe signifikant reduziert, allerdings nicht auf die Normalwerte. Die Mitochondrien in den Podozyten waren nicht hypertrophiert (Alyodawi et al. 2019).

1.2.4 Bisherige Erkenntnisse zum Einfluss einer Kalorien-reduzierten Diät auf Alterungsprozesse im Allgemeinen und in $\text{Ercc1}^{\Delta/-}$ Mäusen

Die Kalorien-reduzierte Diät als Einflussfaktor auf die Alterung ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Dabei wurden positive Effekte auf die Lebensspanne und spezifische Alterungsprozesse/erkrankungen nachgewiesen.

Eine Kalorien-reduzierte Diät erhöht die Lebensspanne in verschiedenen Spezies wie Hefen, Würmern, Fliegen, Nagetieren und nicht-humanen Primaten. Nagetiere unter einer Kalorienreduzierten Diät haben eine geringere Prävalenz vieler alters-assoziierter Erkrankungen wie Neoplasien, Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose, chronischen Nierenerkrankungen und Kardiomyopathien (Green et al. 2022). Eine Kalorien-reduzierte Diät beeinflusst auch die Sarkopenie. Sie reduziert den Verlust von Muskelmasse und -kraft in Nagetieren (Marzetti et al. 2009) und führt bei Rhesusaffen neben einem geringeren Muskelverlust auch zu mehr körperlicher Aktivität und Stärke (Colman et al. 2008, Yamada et al. 2018). In einer Langzeitstudie mit Rhesusaffen der Universität Wisconsin, mit einer im jungen Erwachsenenalter begonnenen Kalorienreduzierten Diät von 30 %, reduzierte sich die Mortalität durch altersbezogene Erkrankungen sowie die Gesamtmortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Colman et al. 2014). Außerdem verzögerte sich das Auftreten von altersassoziierten Erkrankungen wie Diabetes, Neoplasien, kardiovaskulären Erkrankungen und Gehirnatrophie (Colman et al. 2009). Im Menschen sind die Auswirkungen einer Kalorien-reduzierten Diät auf die Lebensspanne noch unklar. Bekannte Effekte einer (zeitlich begrenzten) Diätrestriktion sind die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren und der Inzidenz von Neoplasien und Fettleber-Erkrankungen sowie eine Zunahme der Insulin-Sensitivität (Green et al. 2022).

Auch im progeroiden Mausmodell $\operatorname{Ercc1}^{\Delta'-}$ wurde der Einfluss einer Kalorien-reduzierten Diät bereits untersucht. Die Kalorien-reduzierte Diät begann in der 7. Lebenswoche mit einer Reduktion um 10 % und wurde bis zur 9. Lebenswoche auf 30 % gesteigert. Dies resultierte in einer starken Steigerung der medianen Lebensspanne bei den diätreduzierten Mäusen. In den männlichen Tieren verlängerte sich die mediane weitere Lebensspanne (ab Beginn der Kalorien-reduzierten Diät) von 10 auf 35 Wochen, in den weiblichen Tieren von 13 auf 39 Wochen. Ein Fokus der Untersuchungen lag in der neurologischen Funktion, gemessen anhand des Auftretens von Tremor, Gleichgewichtsstörungen und Paresen. In den ad libitum $\operatorname{Ercc1}^{\Delta'-}$ Mäusen trat ein neurologischer Funktionsverlust bereits in einem Alter von 10-20 Wochen bei allen Versuchstieren auf. In der diätreduzierten Gruppe war dies stark verzögert. Es traten keine neurologischen Störungen vor der 30. Lebenswoche auf und nicht alle Tiere waren betroffen. Quantifizierungen der Neurone bestätigten, dass die Neurodegeneration teilweise verhindert wurde. Die diätreduzierten Ercc1^{$\Delta'-}</sup>$ Mäuse wiesen 50 % mehr Neurone im Neokortex und auch signifikant mehr Motoneurone im $Rückenmark auf. Die Griffstärke als ein Parameter der Muskelkraft war bei den Ercc1^{<math>\Delta'-}$ </sup> Mäusen im</sup> Alter von 16 Wochen erniedrigt ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Ernährungsformen. Demnach sind die bessere neurologische Funktion und die höhere Anzahl an Motoneuronen nicht direkt auf die motorischen Funktionen übertragbar. Außerdem wurde die Histologie der Niere untersucht. Dabei zeigten sich bei den $\text{Ercc1}^{\Delta/-}$ Mäusen unabhängig von der Ernährungsform eine verminderte Anzahl und vielfach degenerierte Tubuli sowie eine starke Anisokaryose (Vermeij et al. 2016).

Die möglichen Auswirkungen einer Kalorien-reduzierten Diät bei $\text{Ercc1}^{\Delta-}$ Mäusen auf die Ultrastruktur von Muskulatur und Niere sowie die Kombination dieser Intervention mit der Gabe von sActRIIB sind bisher nicht untersucht worden und sind Teil der vorliegenden Arbeit.

1.3 sActRIIB als Therapieoption bei Sichelzellanämie

1.3.1 Genetik, Epidemiologie, Symptomatik und bisherige Therapie der Sichelzellanämie

Die Sichelzellanämie (SCD) ist die weltweit häufigste korpuskuläre Anämieform mit der höchsten Prävalenz im östlichen Mittelmeerraum, Zentralafrika und Amerika (Herold 2022). In Deutschland beträgt die Prävalenz laut Schätzungen mindestens 2000, davon tragen 75 % die homozygote Mutation (Kunz et al. 2020). Die SCD ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit einer qualitativen Hämoglobinveränderung. Durch eine Punktmutation im Genlokus des β-Globins auf Chromosom 11 wird ein strukturverändertes Hämoglobin, genannt HbS, exprimiert. Im deoxygenierten Zustand polymerisiert das HbS, wodurch die Erythrozyten eine Sichelform annehmen. Dies verringert ihre Flexibilität und verkürzt ihre Lebensdauer, was Okklusionen der Mikrozirkulation in Form von akuten Organinfarkten und langfristigen Organschäden verursacht (Herold 2022).

Heterozygote Träger sind meist asymptomatisch, bei starker körperlicher Belastung und Aufenthalten in großer Höhe sind Symptome möglich. Bei Homozygoten entstehen bereits im Kindesalter eine chronisch-hämolytische Anämie, schmerzhafte vaso-okklusive Krisen und Organinfarkte, die vor allem die Milz, das Gehirn, pulmonale Gefäße und die Knochen betreffen. Im Laufe des Lebens resultieren längerfristige Komplikationen wie eine funktionelle Asplenie (und daraus folgender Anfälligkeit für bakterielle Infektionen), aseptische Knochennekrosen, eine chronische Glomerulonephritis der Niere, eine pulmonale Hypertonie und eine Panzytopenie (Herold 2022).

Die Basistherapie der SCD umfasst die Vermeidung von Unterkühlung und Exsikkose sowie eine Infektionsprophylaxe durch Impfungen und gegebenenfalls eine Antibiotika-Prophylaxe. Die vasookklusiven Krisen werden vorwiegend symptomatisch mittels Hydrierung, Analgetika und Bluttransfusionen behandelt. Als Prophylaxe dient Hydroxycarbamid, welches den Gehalt an fetalem Hämoglobin erhöht und dadurch die Häufigkeit von schweren Schmerzkrisen senkt. Die bisher einzige kausale Therapieoption stellt eine allogene Stammzelltransplantation dar, die nur bei schweren Verläufen durchgeführt wird. Die Morbidität und Mortalität der Erkrankung ist abhängig vom Phänotyp und der Qualität der medizinischen Versorgung (Herold 2022).

1.3.2 Neue Therapieoptionen für die Sichelzellanämie

Seit der Zulassung zeigten mehrere Studien, dass Hydroxycarbamid die Krankheitslast abmildert. Es treten weniger vaso-okklusive Krisen auf (Tonin et al. 2023) und die Mortalität ist reduziert (Steinberg et al. 2003). Dennoch wird das Medikament bisher nicht bei allen Patient*innen eingesetzt. Grund hierfür sind seine Nebenwirkungen, die unklare Teratogenität bzw. der Einfluss auf die Fertilität und die bisher unklare Evidenz bezüglich der Prävention von Langzeit-Organschäden (Cappellini et al. 2021).

In den letzten Jahren hat die EMA zwei neue Therapeutika zugelassen:

Voxelotor erhöht die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin und reduziert so die Polymerisation bei Deoxygenierung (Metcalf et al. 2017). In der Phase-3-Studie wurde eine signifikante Erhöhung der Hämoglobin-Konzentration und eine Reduktion der Hämolyse-Parameter festgestellt. Die Anzahl der vaso-okklusiven Krisen war nicht signifikant verändert (Vichinsky et al. 2019). Voxelotor wurde 2022 zur Behandlung der hämolytischen Anämie aufgrund der SCD als Monotherapie oder in Kombination mit Hydroxycarbamid zugelassen (EMA 2022).

Crizanlizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen P-Selektin, einem wichtigen Mediator der Vaso-Okklusion. Crizanlizumab führte in der Phase-2-Studie zu einer signifikanten Reduktion vasookklusiver Krisen sowie einer signifikant längeren medianen Zeit bis zum Auftreten der ersten Krise. Die Hämoglobin-Konzentration und die Hämolyse-Parameter waren unverändert (Ataga et al. 2017). Crizanlizumab wurde 2020 zur Prävention von Schmerzkrisen aufgrund der SCD als Monotherapie oder in Kombination mit Hydroxycarbamid zugelassen (EMA 2020).

Eine neue innovative Therapieoption ist die Gentherapie. Das generelle Prinzip der Gentherapien umfasst die Gewinnung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut, deren Kultivierung ex vivo und anschließende genetische Modifikation. Danach werden sie den Patient*innen reinfundiert (Dunbar 2021). Eine noch laufende Phase-1/2-Studie nutzt den Wirkstoff LentiGlobin, der für ein modifiziertes β-Globin-Gen kodiert, das ein antisickling Hämoglobin produziert. In einer Versuchsgruppe mit 35 Patient*innen folgte auf die Therapie ein Anstieg des medianen gesamten Hämoglobins von 8,5 g/dl auf mindestens 11 g/dl nach 6 Monaten, der auch im Follow-Up nach 36 Monaten erhalten blieb. Allerdings wurden zu diesem Zeitpunkt nur noch zwei Patient*innen untersucht. Außerdem traten unter den 25 Patient*innen mit mindestens 6 Monaten Follow-Up keine schweren vaso-okklusiven Krisen mehr auf. Langfristige Ergebnisse und größere Versuchsgruppen zum Effektivitätsnachweis sind noch ausstehend (Kanter et al. 2022).

1.3.3 Genetische Grundlage und Phänotyp des Sichelzell-Mausmodells

Das knock-in Sichelzell-Mausmodell wurde von Wu et al. (2006) entwickelt. Die Mäuse tragen humane Transgene anstelle der α -, β - und γ -Hämoglobin-Gene und sind homozygot für die häufigste Mutation, die im Menschen zur Bildung des HbS und demnach zur SCD führt (Herold 2022, The Jackson Laboratory 2024). Die HbS-Mäuse tauschen in der ersten Lebenswoche das fetale Hämoglobin durch das adulte HbS aus und entwickeln eine schwere Anämie (Wu et al. 2006). In vitro nehmen 92 % der Erythrozyten bei Deoxygenierung die Sichelzell-Konfiguration an (Alvarez-Argote et al. 2023).

Alvarez-Argote et al. (2023) führten kürzlich eine umfangreiche pathophysiologische Charakterisierung des Mausmodells durch. Die HbS-Mäuse hatten einen reduzierten Hämoglobin-Wert bei erhöhten Hämolyse-Parametern. Nach einer hypoxischen Episode von sechs Stunden nahmen der Hämoglobin-Wert, die Thrombozyten- und die Leukozytenzahl signifikant ab, während sie in der Kontrollgruppe der Hämoglobin-A-Mäuse (HbA) stabil blieben. Die Parameter der Nierenfunktion zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den HbA- und HbS-Mäusen. Unerwarteterweise bestand ein Trend zu einer erhöhten Urin Protein-Kreatinin-Ratio bei den HbA-Mäusen (Alvarez-Argote et al. 2023). Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen von Kasztan et al. (2019), die in männlichen HbS-Mäusen eine signifikant erhöhte Proteinurie und eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate feststellten. In den weiblichen Mäusen gab es keinen signifikanten Unterschied. Histopathologisch beschrieben Alvarez-Argote et al. (2023) eine vaskuläre Okklusion der Lunge, der Nieren, der Milz und der Leber sowie vermehrte Eisenablagerungen in der Niere und Leber der HbS-Mäuse.

Kasztan et al. (2019) führten weiterführende histopathologische Untersuchungen der Nieren von HbS-Mäusen durch. Sie stellen sowohl glomeruläre als auch tubuläre Veränderungen fest. Die glomerulären Schädigungen umfassten in unterschiedlichem Ausmaß eine Sklerosierung und Hypertrophie der Glomeruli, eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und den Verlust von Podozyten und ganzen Glomeruli. In weiblichen Mäusen waren diese Veränderungen nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden. Die tubulären Schädigungen betrafen beide Geschlechter gleichermaßen und umfassten einen graduellen Verlust des Bürstensaums der proximalen Tubuli sowie eine interstitielle Fibrose. Diese Ergebnisse wurden gestützt durch erhöhte Werte des kidney injury marker 1, einem Marker für die Schädigung in proximalen Tubuli. Ultrastrukturelle Untersuchungen der Niere von HbS-Mäusen wurden in den beschriebenen Publikationen nicht durchgeführt.

Über die Veränderungen der Skelettmuskulatur von HbS-Mäusen ist bisher nur wenig bekannt. HbS-Mäuse haben eine signifikant reduzierte Muskelkraft gegenüber HbA-Mäusen (Chatel et al. 2018). Im Zeitraum vom 2. Bis 4. Lebensmonat kommt es zu einer Abnahme der spezifischen Kraft ohne Veränderung des Muskelvolumens (Michel et al. 2023). Histologische bzw. ultrastrukturelle Veränderungen der Skelettmuskulatur von HbS-Mäusen wurden bisher nicht konkret beschrieben.

1.3.4 Mögliche Angriffspunkte des sActRIIB bei Sichelzellanämie

Aktivin A und andere Mitglieder der TGF- β Superfamilie beeinflussen die Erythropoese (Bataller et al. 2019). Luspatercept, ein sActRIIB mit unterdrückter Bindung von Aktivin A, wurde von der EMA für die β -Thalassämie und das MDS zugelassen (EMA 2021).

Da in bisherigen Studien kein Konsens darüber besteht, ob Aktivin A eine stimulierende oder eine inhibitorische Wirkung auf die Erythropoese ausübt, untersuchten Voskaridou et al. (2019) die Bedeutung von Aktivin A für verschiedene Hämoglobinopathien. Eingeschlossen wurden insgesamt 227 Patient*innen mit einer β -Thalassämie Major (TM, n=58), β -Thalassämie Intermedia (TI, n=43), einer kombiniert heterozygoten SCD und β -Thalassämie (HbS/beta-thal, n=109) sowie einer homozygoten SCD (n=17). Der primäre Endpunkt war die Höhe des Serum Aktivin A im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Patient*innen mit TM und HbS/beta-thal wiesen erhöhte Aktivin A Serumwerte auf. Bei den TM-Patient*innen wurde außerdem eine signifikante negative Korrelation zwischen den Aktivin A Serumwerten und der Hämoglobin-Konzentration festgestellt. Die Ergebnisse unterstützen die These, dass Aktivin A einen inhibitorischen Einfluss auf die Erythropoese ausübt. Bei den Patient*innen mit TI und SCD waren diese Zusammenhänge nicht signifikant. Die Autor*innen begründen die nicht erhöhten Aktivin A Werte bei der SCD zum einen mit der reduzierten statistischen Aussagekraft durch die kleine Versuchsgruppe, zum anderen mit dem Pathomechanismus der SCD, der im Gegensatz zu den Thalassämien nicht in einer ineffektiven Erythropoese, sondern in einem veränderten Hämoglobin-Molekül bestehe.

Nach den Versuchen von Voskaridou et. al und dem klinischen Einsatz von Luspatercept ist noch unklar, ob der sActRIIB auch bei der SCD zu einer verbesserten Hämatopoese führen könnte. Bisher wurden keine Versuche mit dem sActRIIB in diesem Setting durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der sActRIIB erstmalig in einem Mausmodell der SCD eingesetzt und es wurden die Ultrastruktur von Muskulatur und Niere untersucht.

1.4 sActRIIB als supportive Therapie gegen die unerwünschten Wirkungen von Cisplatin

1.4.1 Cisplatin – Indikationen und bekannte Nebenwirkungen

Cisplatin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylanzien. Diese übertragen Alkylgruppen auf die DNA, dadurch bilden sich Crosslinks zwischen den beiden DNA-Strängen, was die Replikation verhindert (Herold 2022). Cisplatin ist als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Zytostatika zur Therapie zahlreicher Tumoren zugelassen, darunter Hodentumoren, gynäkologische Tumoren, Bronchialkarzinome, Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs, Harnblasenkarzinome, Osteosarkome und Ösophaguskarzinome. Die Applikation erfolgt intravenös (Ribosepharm 2018).

Die Fachinformation zu Cisplatin weist zahlreiche unerwünschte Wirkungen aus:

Cisplatin ist stark nephrotoxisch, bei bis zu 1/3 der Patient*innen tritt nach Cisplatin-Gabe ein akutes Nierenversagen auf (Ribosepharm 2018). Die Entwicklung eines akuten Nierenversagens erhöht die Wahrscheinlichkeit für ein chronisches Nierenversagen und die Mortalität (Chawla et al. 2014). Da die Nephrotoxizität einen wichtigen dosis-limitierenden Faktor für den Einsatz von Cisplatin darstellt, wird sie in Cisplatin-Tiermodellen, im Wesentlichen an Nagetieren, untersucht. Der Wirkstoff gelangt in der Niere über verschiedene aktive Transporte sowie über passive Diffusion in das Tubulusepithel, vor allem in den proximalen und distalen Tubulus. Dort sind zahlreiche toxische Auswirkungen dokumentiert (Perše und Večerić-Haler 2018). Histologische Veränderungen umfassen eine Vakuolenbildung im Zytoplasma, den Verlust des Bürstensaums, eine tubuläre Dilatation und die Nekrose von Tubuluszellen bis hin zur Tubulusdegeneration (Bazmandegan et al. 2021, Katagiri et al. 2016). Eine repetitive Gabe von Cisplatin induziert zudem eine tubulointerstitielle Fibrose (Fu et al. 2019, Katagiri et al. 2016).

Störungen der Skelettmuskulatur werden in der Fachinformation in Form von Muskelkrämpfen und Myalgien mit unklarer Häufigkeit beschrieben (Ribosepharm 2018). Darüber hinaus wird bei Patient*innen, die mit Cisplatin behandelt werden, häufig ein signifikanter Gewichtsverlust beobachtet, der im Wesentlichen aus einer Muskelatrophie resultiert (Chen et al. 2015b). Die Muskeltoxizität von Zytostatika wie Cisplatin ist von besonderer Bedeutung, denn zahlreiche Studien assoziieren eine Sarkopenie, niedrige Muskelgröße oder geringe fettfreie Körpermasse mit einer erhöhten Toxizität der angewendeten Zytostatika und einer erhöhten Mortalität (Kazemi-Bajestani et al. 2016, Pamoukdjian et al. 2018, Surov et al. 2021). Somit ergibt sich ein Zirkelschluss aus dem Verlust an Muskelmasse und der Toxizität, der zu einer Dosislimitierung der Cisplatin-Therapie führen kann. Chargi et al. (2022) untersuchten in einer retrospektiven Studie anhand von Patient*innen mit Kopf-Hals-Tumoren, inwiefern die Skelettmuskelmasse zum Diagnosezeitpunkt das Risiko für eine dosis-limitierende Toxizität von Cisplatin vorhersagen kann. Dabei fanden sie bei Patient*innen mit einer niedrigen Skelettmuskelmasse ein signifikant höheres Risiko. Ein

niedriger BMI war nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Demnach könnte die Bestimmung der Skelettmuskelmasse zukünftig Risikopatient*innen identifizieren und zur Dosisplanung eingesetzt werden.

Weitere sehr häufige Nebenwirkungen von Cisplatin sind eine Ototoxizität, eine Knochenmarkssuppression, die Reizung des Gastrointestinaltraktes, Hyponatriämie und Fieber. Selten führt Cisplatin zu Neuropathien, die Ästhesie, Propriozeption, Pallästhesie und Motorik betreffen können. Eine regelmäßige Überwachung potenzieller Nebenwirkungen ist notwendig (Ribosepharm 2018).

1.4.2 Bisherige supportive Therapieoptionen bei Gabe von Cisplatin

Die Fachinformation für Cisplatin empfiehlt zur Prophylaxe von Nierenschäden bei allen Patient*innen eine ausreichende Hydratation und Diurese. Hierfür erfolgt einige Stunden vor der Applikation von Cisplatin eine Prähydratation sowie eine anschießende Posthydratation jeweils mit isotonischer Natriumchloridlösung. Wird hierdurch keine ausreichende Diurese erreicht oder werden hohe Cisplatin-Dosen eingesetzt, ist eine forcierte Diurese durch Gabe von D-Mannitol indiziert. Zudem wird ein engmaschiges Monitoring der Elektrolyt-Werte und bei Bedarf eine Substitution empfohlen, insbesondere von Kalium-, Magnesium- und Calcium-Ionen (Ribosepharm 2018).

Hamroun et al. (2019) analysierten in einem systematischen Review die Wirksamkeit der bisherigen nephroprotektiven Maßnahmen. Primärer Endpunkt war das Auftreten eines Cisplatin-induzierten akuten Nierenversagens. Dabei fanden sie keine klare Evidenz für den Einsatz von D-Mannitol. Die retrospektiven Studien ergaben uneinheitliche Ergebnisse und die einzige randomisiert-kontrollierte Studie zeigte sogar einen schädlichen Effekt von D-Mannitol auf die Nierenfunktion. Auch die anderen Präventionsansätze wie die Verbesserung der Nierendurchblutung durch Amifostine und der Einsatz von Antioxidantien erbrachten bisher keinen Wirksamkeitsnachweis. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Hemmung des Organic Cation Transporters 2 (OCT2). Cisplatin wird als Substrat dieses Transporters in den proximalen Tubulus aufgenommen, wo es akkumuliert und toxische Effekte hat. Die direkte Inhibition des OCT2 durch Fosfomycin und Cimetidin hat bisher ebenfalls keinen nachgewiesenen nephroprotektiven Effekt. Ein anderer Ansatz zur Hemmung des OCT2 ist die Magnesium-Supplementation. Die hierzu durchgeführte Meta-Analyse aus 15 Studien ergab bei Magnesium-Gabe ein signifikant niedrigeres Risiko für die Entwicklung eines Cisplatin-induzierten akuten Nierenversagens. Somit identifizierten Hamroun et. al Magnesium als potenziell nephroprotektiven Wirkstoff bei Gabe von Cisplatin.

Gezieltere Therapie- und Prophylaxe-Maßnahmen zur Nephroprotektion sind bisher nicht etabliert. Ein kürzlich erschienener Nature Review fasste die präklinischen Tierversuchs-Studien zur Identifikation von nephroprotektiven Ansatzpunkten zusammen. Dazu zählen u. a. die Hemmung der Cisplatin-Aufnahme in die Niere sowie seiner Aktivierung, die Reduktion des oxidativen Stresses und die Vermeidung von Zelltod. Weitere Studien sind notwendig, um ihren Einfluss auf die antineoplastische Aktivität von Cisplatin zu untersuchen und soweit möglich eine nierenspezifische Wirkung zu erreichen (Tang et al. 2023).

Die S3-Leitlinie zur supportiven Therapie von onkologischen Patient*innen empfiehlt eine regelmäßige körperliche Aktivität mit dem Ziel, Muskelkraft und Koordination zu fördern. Außerdem empfiehlt sie eine ausreichend kalorische Ernährung, um der tumorassoziierten Kachexie und dem, dadurch verstärkten Osteoporose- und Frakturrisiko entgegenzuwirken. Allerdings ist die Wirksamkeit dieser Intervention bei einer bereits ausgeprägten Kachexie umstritten (Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Gezielte Therapiemaßnahmen gegen den Muskelverlust durch (platinhaltige) Zytostatika sind bisher nicht etabliert, werden aber in einigen klinischen Studien untersucht:

Ein mögliches Target ist die Reduktion der Inflammation, die bisher aber nur in wenigen randomisiert-kontrollierten Studien betrachtet wurde. Die Therapie mit Clarithromycin, einem Antibiotikum, resultierte in einer Zunahme des Körpergewichts und des Gesamtüberlebens von Patient*innen mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, die mit Cisplatin therapiert wurden (Sakamoto et al. 2001, Mikasa et al. 1997). Der Einsatz von Thalidomid, einem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-Inhibitor, reduzierte bei Patient*innen eines fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms den Neoplasie-induzierten Gewichts- und Muskelverlust (Gordon et al. 2005). Celecoxib, nichtsteroidales Antirheumatikum, wurde in einer Phase-2-Studie an Patient*innen mit unterschiedlichen Neoplasien getestet. Es zeigte sich eine Zunahme der fettfreien Körpermasse und eine Reduktion der Serumkonzentration von TNF- α (Mantovani et al. 2010).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Gabe von Ghrelin. Ghrelin ist ein endogener Ligand des Wachstumshormon-Rezeptors und induziert eine Appetitsteigerung sowie eine Zunahme von Fettund Muskelmasse (Chen et al. 2015a). Außerdem fördert Ghrelin die hepatische Produktion des Insulin-like growth factor 1, welcher durch Steigerung der Proteinsynthese und Hemmung der Proteolyse zur Muskelerhaltung beiträgt (Ali et al. 2013). Chen et al. (2015a) demonstrierten in zwei Mausmodellen, dass Ghrelin den Tumor- und Cisplatin-induzierten Muskelverlust signifikant reduziert und die Griffstärke erhöht.

Eine weitere Therapieoption ist die Gabe von Bisphosphonaten. Diese basiert auf der Theorie des Muscle-bone crosstalk, die davon ausgeht, dass Muskulatur und Knochen als endokrine Organe agieren und sich gegenseitig beeinflussen (Bonewald 2019). In verschiedenen Mausmodellen mit Knochenmetastasen trug aus der Knochenmatrix sezerniertes TGF- β direkt zur Schwächung der Muskulatur bei (Waning et al. 2015). Myofibrillen einer Zellkultur atrophierten, als sie einem Knochen-konditionierten Medium von Cisplatin-behandelten Mäusen ausgesetzt waren. Der

Muscle-bone crosstalk scheint also auch bei Zytostatika-induzierten Muskel- und Knochenschädigungen stattzufinden (Essex et al. 2019). Davon ausgehend erhielten in einer Studie Mäuse Cisplatin allein und in Kombination mit dem Bisphosphonat Zolendronsäure. Wie erwartet, resultierte die Cisplatin-Gabe in einem Verlust des Körpergewichts und der Muskelmasse sowie in einer Abnahme der Knochenmasse und -dichte. In der Versuchsgruppe, die die Kombination mit Zolendronsäure erhielt, gab es keinen Effekt auf das Körpergewicht. Jedoch entsprachen das Knochenvolumen und die Trabekelstruktur der Kontrollgruppe ohne Cisplatin-Therapie. Die Muskelmasse und -kraft waren verbessert, erreichten aber nicht das Niveau der Kontrollgruppe (Essex et al. 2019).

1.4.3 Mögliche Angriffspunkte und vorherige Versuche mit dem sActRIIB

Ein Mechanismus, durch den Cisplatin seine Toxizität auf die Muskulatur ausübt, ist die Überexpression von Myostatin (Sakai et al. 2014, Chen et al. 2015a). Hieraus ergibt sich ein möglicher Angriffspunkt für den sActRIIB. Die Blockade des Aktivin-Myostatin-Signalweges durch den sActRIIB wurde bei anderen Zytostatika in Mausmodellen bereits eingesetzt.

Nissinen et al. (2016) untersuchten die Wirkung von Doxorubicin in Kombination mit dem sActRIIB. Dabei führte die Applikation von Doxorubicin zu einem geringeren Körpergewicht, Muskelmasse und Mukelfaserdurchmesser. Diese Effekte wurden durch die zusätzliche Gabe des sActRIIB komplett verhindert. Funktionell war die Laufperformance durch Doxorubicin verschlechtert, worauf der sActRIIB keinen Effekt hatte. In einem Kurzversuch mit Mäusen, denen durch Lewis lung cells ein Tumor induziert wurde, wirkte der sActRIIB ebenfalls antikachektisch. Das Tumoransprechen auf die Therapie mit Doxorubicin war unverändert.

In einer anderen Studie wurde der sActRIIB in Kombination mit dem Folfiri-Chemotherapieschema (bestehend aus 5-Fluoruracil, Leucovorin und Irinotecan) eingesetzt. Der durch die Zytostatika induzierte Verlust von Körpergewicht, Muskelmasse, Muskelfaserdurchmesser und der Griffstärke wurde durch die Kombination mit dem sActRIIB komplett verhindert (Barreto et al. 2017).

Hatakeyama et al. (2016) untersuchten den Effekt des Aktivin-Myostatin-Signalwegs auf die muskulären Nebenwirkungen von Cisplatin anhand des CT-26 Kolon-Karzinom-Kachexie-Mausmodells. Sie verwendeten eine murinisierte Form des humanen Antikörpers Bimagrumab, der kompetitiv an den ActRII bindet und den Signalweg direkt hemmt. Die Therapien wurden nach Auftreten einer Tumorkachexie begonnen. Hierbei stellten sie bei zusätzlicher Gabe von Bimagrumab einen signifikant verringerten Gewichtsverlust gegenüber der alleinigen Gabe von Cisplatin und dem Placebo fest. Somit konnte der zusätzliche negative Effekt von Cisplatin auf das Gewicht komplett verhindert werden. Außerdem zeigte sich die Tendenz zu einem reduzierten Verlust an Muskelmasse, signifikant war diese jedoch nur bei einem von drei untersuchten Muskeln. Das Tumoransprechen auf die Therapie mit Cisplatin wurde durch Bimagrumab nicht beeinflusst.

Somit stellt die Gabe des sActRIIB bzw. die Blockade des Aktivin-Myostatin-Signalweges eine potenzielle Therapie des Zytostatika-induzierten Muskelverlustes dar. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss auf die Nephrotoxizität von Cisplatin und anderen Zytostatika bisher noch nicht untersucht worden.

1.5 Potenzielle unerwünschte Wirkungen des sActRIIB

1.5.1 Mechanismen zur Entstehung und bisher bekannte unerwünschte Wirkungen des sActRIIB

Der sActRIIB bindet nicht nur Myostatin, sondern auch andere Liganden des ActRIIB, dazu gehören die Aktivine A, B und AB sowie die BMPs 9, 10 und 11 (Souza et al. 2008). Im Gegensatz zu Myostatin, das hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert wird, werden die Aktivine und BMPs in Vielzahl von Geweben gebildet. Daher hat ihre Hemmung höheres einer ein Nebenwirkungspotenzial (Suh und Lee 2020). Allein Aktivin A beeinflusst zahlreiche Systeme im Körper, darunter das Reproduktionssystem, das zentrale Nervensystem, das kardiovaskuläre System, den Gastrointestinaltrakt, die Niere, das Immunsystem, das respiratorische System sowie das muskuloskelettale System (Bloise et al. 2019).

Die klinischen Studien mit dem sActRIIB berichteten von verschiedenen Nebenwirkungen. Die Phase-2-Studie eines sActRIIB an Jungen mit Duchenne Muskeldystrophie wurde vorzeitig abgebrochen, da Nasenbluten, Zahnfleischbluten, Teleangiektasien und Erytheme auftraten. Dies führen die Autor*innen Campbell et al. (2017) auf die Hemmung von BMP 9 und 10 zurück. Luspatercept, ein modifizierter sActRIIB mit stark reduzierter Affinität zu Aktivinen und BMPs, hatte diese Nebenwirkungen in den Zulassungsstudien für das MDS und die β - Thalassämie nicht. Häufige Nebenwirkungen waren Knochenschmerzen und Arthralgien, Diarrhoen, Schwindel und Übelkeit (Fenaux et al. 2020, Cappellini et al. 2020).

In einer Maus-Studie verursachte der sActRIIB eine Gewichtszunahme des Pankreas und der Milz und eine eingeschränkte Glukose-Toleranz. Die Serumwerte von Insulin, Glukagon und den Kortikosteroiden waren nicht verändert. Die Splenomegalie erklären die Autor*innen durch eine vermehrte extramedulläre Hämatopoese (Latres et al. 2017).

Aktivin A wird physiologisch auch im reproduktiven Trakt exprimiert. Es stimuliert die Hypophyse zur Synthese und Sekretion des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH). Im Umkehrschluss reduziert sich der FSH-Spiegel, wenn Aktivin A gehemmt wird (Bloise et al. 2019). Eine Einzeldosis von sActRIIB führte bei gesunden postmenopausalen Frauen zu einer Reduktion von FSH um bis zu

43 % (Attie et al. 2013). In einer 20-wöchigen randomisiert-kontrollierten Studie mit postmenopausalen Frauen, die zweimalig den ActRII-Antikörper Bimagrumab erhielten, war der FSH-Spiegel ebenfalls signifikant reduziert. Allerdings war dieser Effekt reversibel nach dem Absetzen und trat nicht bei Männern auf. Die Östrogen- und Androgenspiegel waren unverändert (Garito et al. 2018). Aktivin A reguliert auch die fetale Entwicklung der Ovarien mit ihren Primordialfollikeln und ist an der Follikelreifung und den Umwandlungsprozessen des Endometriums beteiligt (Bloise et al. 2019). Aktivine spielen zudem eine Rolle in der postnatalen Entwicklung des Hodens bei Mäusen. Sie fördern die frühe postnatale Sertoli-Zell-Entwicklung sowie die Reifung der Spermatogonien im juvenilen Alter (Buzzard et al. 2003, Mithraprabhu et al. 2010). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung von Aktivin A für die Entwicklung und Funktion des reproduktiven Systems.

Bisher wurden in den klinischen Studien mit dem sActRIIB keine unerwünschten Wirkungen des reproduktiven Trakts berichtet. Die Langzeitfolgen einer Blockade des Aktivin-Myostatin-Signalwegs auf die Fertilität sind unklar. Die Maus-Studien zu den Auswirkungen auf das reproduktive System werden im folgenden Kapitel beschrieben.

1.5.2 Unerwünschte Wirkungen des sActRIIB auf den reproduktiven Trakt

Vaughan et al. (2020b) untersuchten die Auswirkungen des sActRIIB auf den Reproduktionstrakt von männlichen Mäusen in unterschiedlichen Versuchsbedingungen. In einer ersten Studie setzten sie den sActRIIB an gesunden WT-Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen ein. Dabei resultierte sowohl bei einer sehr frühen, präpubertären Gabe als auch bei Gabe im Erwachsenenalter eine signifikante Abnahme des Hodengewichts und der Spermatozoenzahl. Die Anzahl der Sertoli-Zellen und der Stamm-Spermatogonien war unverändert. Bei Therapie im präpubertären Alter zeigte sich im Alter von 180 Tagen eine teilweise Erholung bei immer noch reduzierter Spermatozoenzahl. In einem zusätzlichen Versuch im progeroiden Mausmodell Ercc1^{Δ/-} führte die Therapie mit sActRIIB zu einer kompletten Elimination der Spermienproduktion (Vaughan et al. 2020b).

In einer Folgestudie wurden die Auswirkungen des sActRIIB an zwei Mausmodellen der Duchenne Muskeldystrophie untersucht. Die Wirkung des sActRIIB entsprach der in vorherigen Versuchen. Der sActRIIB reduzierte in beiden Mausmodellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant das Hodengewicht und die Anzahl der Spermatozoen. Dies war auf eine verringerte Zellproliferation zurückzuführen. Die Quantifizierung der Spermatozoen ergab eine Reduktion von 62 % im mdx-Mausmodell und 70 % im D2-mdx-Mausmodell. Die Spermienmobilität war signifikant reduziert (Vaughan et al. 2020a). Auch qualitativ waren die Spermatozoen beeinträchtigt. Hierfür wurde die Ultrastruktur untersucht, was Teil der vorliegenden Arbeit ist und daher im Ergebnisteil berichtet wird.

Die neueste Studie betrachtete insbesondere die molekularen Mechanismen, die den Hodenveränderungen zugrunde liegen. Untersucht wurde dies im Alter von 37 Tagen (kurz nach Beendigung der Therapie) und 120 Tagen. Hodengewicht, Spermatozoenzahl und Mobilität waren im Einklang mit den vorherigen Untersuchungen auch im Alter von 120 Tagen deutlich reduziert. Die Anzahl der Gene mit veränderter Expression erhöhte sich zum späteren Untersuchungszeitpunkt um ein Vielfaches. Die Autor*innen gehen davon aus, dass die tatsächliche Zahl aufgrund methodischer Ungenauigkeit noch höher liegt. Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass die Wirkungen auf das reproduktive System von Dauer sind (Vaughan et al. 2021).

1.6 Formulierung der Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erweiterung der Kenntnisse über die therapeutischen Potenziale des sActRIIB und seine Limitierungen durch mögliche unerwünschte Wirkungen. Beurteilt wird dies anhand der ultrastrukturellen Veränderungen verschiedener Gewebe mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Es wurden drei Mausmodelle ausgewählt, bei denen der sActRIIB als Therapie eingesetzt wurde. Das Progerie-Modell Ercc1^{Δ/-} bildet Alterungsprozesse ab. Hier wurde der sActRIIB bereits erfolgreich eingesetzt. Die Neuerung besteht in der Kombination dieser Intervention mit einer Kalorien-reduzierten Diät. In einem knock-in Mausmodell der Sichelzellanämie, wurde der sActRIIB, im Gegensatz zu anderen Anämieformen, erstmalig eingesetzt. Als drittes Modell wurde Mäusen Cisplatin verabreicht, dessen Nebenwirkungen durch den häufigen Einsatz und die hohe Nephrotoxizität eine besondere Relevanz haben. Bisher wurde der sActRIIB nur zur Prävention der unerwünschten Wirkungen anderer Zytostatika eingesetzt. Zur Beurteilung der Wirkung des sActRIIB wurden in allen drei Modellen die Ultrastruktur der Skelettmuskulatur und der Niere beurteilt.

Da neuere Erkenntnisse indizierten, dass der sActRIIB Auswirkungen auf die Fertilität haben könnte, wurde in zwei Mausmodellen der Duchenne Muskeldystrophie (mdx und D2-mdx) die Spermatozoen-Qualität anhand ihrer Ultrastruktur beurteilt.

2. Material

In diesem Kapitel sind alle verwendeten Materialien aufgeführt. Die Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt. Zur Deionisation wurde der Ionenaustauscher GREEN-LINE DIA 2800 verwendet.

2.1 Mauslinien

Bei der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mauslinien verwendet, die im Folgenden beschrieben werden. Die Mäuse wurden in Partnerlaboren gezüchtet und gehalten, wobei diverse funktionelle Daten gesammelt wurden, die größtenteils noch unveröffentlicht und nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind. Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist die elektronenmikroskopische Betrachtung unterschiedlicher Gewebematerialien der Mäuse.

2.1.1 Progeriemodell Ercc1^{Δ /-}

In den vorliegenden Versuchen wurde die Ercc1^{$\Delta/-$} Mauslinie verwendet. Die transgene Mauslinie Ercc1^{$\Delta/-$} trägt in einem Allel eine Deletion der letzten sieben c-terminalen Aminosäuren des WT-Proteins, im anderen Allel liegt ein Knockout vor. Ercc1^{+/+} Mäuse im gleichen Alter dienten als WT-Kontrollen. Die Mäuse der Kontrollgruppe (Ercc1^{+/+}, WT) und der transgenen Gruppe (Ercc1^{$\Delta/-$}, $\Delta/-$) wurden gezüchtet wie zuvor beschrieben (Dollé et al. 2011, Weeda et al. 1997) und im Labor von Prof. Ketan Patel in Reading (Großbritannien) nach den Standards des Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Großbritannien) gehalten.

Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen unter pathogen-freien Bedingungen bei 20-22 °C und einem 12 h-Licht/12 h-Dunkelheit-Zeit-Zyklus gehalten. Da die Ercc1^{Δ/-} Mäuse kleiner waren, erhielten sie ihre Nahrung innerhalb des Käfigs und es wurden Trinkflaschen mit längeren Mundstücken verwendet.

Es gab acht verschiedene Versuchsgruppen, die durch die genetischen Unterschiede, die Behandlung mit sActRIIB und zwei verschiedene Kostformen definiert wurden.

Der post-natale Myostatin/Activin-Block wurde in 7 Wochen alten männlichen Mäusen induziert durch intraperitoneale (IP) Injektion von sActRIIB-Fc in der Dosierung 10 mg/kg. Die Injektionen erfolgten zweimal wöchentlich bis zu einem Alter von 16 Wochen.

Die Mäuse erhielten entweder Futter und Wasser nach Belieben (ad libitum, AL) oder wurden einer Kalorien-reduzierten Diät unterzogen (KR). Die Kalorien-reduzierte Diät begann im Alter von 7 Wochen mit zunächst 10% Kalorienreduktion, diese wurde wöchentlich gesteigert, bis ab einem Alter von 9 Wochen kontinuierlich eine 30% Reduktion durchgeführt wurde. WT-Mäuse nahmen im

Durchschnitt 3 g Futtermittel pro Tag zu sich und erhielten unter 30% Kalorienrestriktion 2,1 g pro Tag. Ercc1^{Δ/-} Mäuse aßen im Durschnitt 2,3 g pro Tag und erhielten unter 30% Kalorienrestriktion 1,6 g pro Tag. Zur Kontrolle der vorher ermittelten Nahrungsmengen wurde die Nahrungsaufnahme der AL Mäuse kontinuierlich dokumentiert.

Die Gruppen werden in den Abbildungsbeschreibungen folgendermaßen abgekürzt:

WT	Wildtyp/ Ercc1 ^{+/+}
Δ / -	Progeriemodell / Ercc1 ^{Δ/-}
sActRIIB	erhielt sActRIIB-Fc
mock	erhielt Placebo
AL	ad libitum, Futter und Wasser nach Belieben
KR	Kalorien-reduzierte Diät

2.1.2 Sichelzellanämie knock-in Mausmodell

In den vorliegenden Versuchen zur SCD wurde das humanisierte knock-in Mausmodell verwendet, das ursprünglich von Wu et al. (2006) entwickelt wurde und die Bezeichnung B6;129-Hbb^{tm2(HBG1,HBB*)Tow}/Hbb^{tm3(HBG1,HBB)Tow} Hba^{tm1(HBA)Tow}/J trägt. Die Mäuse tragen humane Transgene für die α , β und γ -Ketten des Hämoglobins an den jeweiligen Maus-Genloci und haben den genetischen Hintergrund C56BL/6. Es wurde entweder das HbA oder das HbS β -Globin eingebracht. Das HbS β -Globin hat eine Transversion von Adenin zu Thymin im sechsten Codon, die in einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Valin resultiert. Homozygote Tiere mit dem HbS β -Globin entwickeln den SCD-Phänotyp. Homozygote Mäuse mit dem HbA β -Globin im gleichen Alter dienten als gesunde Kontrollgruppe (The Jackson Laboratory 2024).

Die Mäuse wurden initial von The Jackson Laboratory (Jax strain #:013071) zur Verfügung gestellt und wurden im Labor von Dr. Pierre-Louis Tharaux in Paris (Frankreich) nach den Standards der European community guidelines gehalten. Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen unter pathogen-freien Bedingungen bei 20-22 °C und einem 12 h-Licht/12 h-Dunkelheit-Zeit-Zyklus gehalten. Sie erhielten Nahrung und Wasser zur freien Verfügung.

Es gab vier verschiedene Versuchsgruppen, die sich durch die genetischen Unterschiede und die Behandlung mit sActRIIB voneinander unterschieden.

Der post-natale Myostatin/Activin-Block wurde in 7 Wochen alten männlichen Mäusen induziert durch IP-Injektion von 10 mg/kg sActRIIB-Fc. Die Injektionen erfolgten zweimal wöchentlich bis zu einem Alter von 13 Wochen.

2.1.3 Cisplatin Behandlung an CD-1 Mäusen

In den vorliegenden Versuchen wurde die CD-1® IGS-Mauslinie verwendet, welche von den Charles River Laboratories zur Verfügung gestellt wurde. Dabei handelt es sich um eine seit 1926 bestehende Linie, die multifunktionell in zahlreichen Forschungsgebieten eingesetzt wird (Charles River Laboratories 2023). Die Mäuse wurden im Labor von Prof. Ketan Patel in Reading (Großbritannien) nach den Standards des Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Großbritannien) gehalten. Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen unter pathogen-freien Bedingungen bei 20-22 °C und einem 12 h-Licht/12 h-Dunkelheit-Zeit-Zyklus gehalten. Sie erhielten Nahrung und Wasser zur freien Verfügung.

Es gab vier verschiedene Versuchsgruppen, die sich anhand der Gabe von Cisplatin oder eines Kontrollwirkstoffs sowie der Behandlung mit dem sActRIIB voneinander unterschieden.

Die Cisplatin-Gabe erfolgte durch IP-Injektion von 5 mg/kg an Tag 18, 24, 28 und 36.

Der post-natale Myostatin/Activin-Block erfolgte durch IP-Injektion von 10mg/kg sActRIIB-Fc ab Tag 17 zweimal wöchentlich bis Tag 39.

2.1.4 Duchenne Muskeldystrophie Modell mdx und D2-mdx

In den vorliegenden Versuchen wurden zwei verschiedene Mausmodelle der Duchenne Muskeldystrophie verwendet. Die muscular dystrophy x-linked (mdx) Mauslinie hat den genetischen Hintergrund C57BL/10 und weist x-chromosomal eine Punktmutation von Guanin zu Adenin im Dystrophin-Gen auf, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon in Exon 23 führt (Bulfield et al. 1984, Sicinski et al. 1989). C57BL/10 Mäuse im gleichen Alter dienten als WT-Kontrollen. Die DBA/2-mdx (D2-mdx) Mauslinie wurde durch Rückkreuzung der C57BL/10-mdx Mauslinie mit der DBA/2 Mauslinie über mehr als 5 Generationen gezüchtet (Fukada et al. 2010). So entstand die D2-mdx Mauslinie, die sich von dem vorherigen Muskeldystrophie-Modell durch ihren genetischen Hintergrund unterscheidet. DBA/2 Mäuse im gleichen Alter dienten als WT-Kontrollen. Die Mäuse wurden im Labor von Prof. Ketan Patel in Reading (Großbritannien) nach den Standards des Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Großbritannien) gehalten.

Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen unter pathogen-freien Bedingungen bei 20-22 °C und einem 12 h-Licht/12 h-Dunkelheit-Zeit-Zyklus gehalten. Sie erhielten Nahrung und Wasser zur freien Verfügung.

Es gab vier verschiedene Versuchsgruppen, die sich durch die genetischen Unterschiede und die Behandlung mit sActRIIB voneinander unterschieden. Der post-natale Myostatin/Activin-Block erfolgte durch IP-Injektion von 10 mg/kg sActRIIB-Fc ab Tag 21 zweimal wöchentlich bis zu einem Alter von 56 Tagen.

2.2 Chemikalien

Agarose	Thermo Scientific, Braunschweig
Blei(II)nitrat	Merck, Darmstadt
Durcupan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (EtOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH) 1 mol/l	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Phosphatpuffer (PB)	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Propylenoxid	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Spüllösung (Aqua)	Braun AG, Melsungen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Uranylacetat	Plano, Wetzlar

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung der Ultrastruktur des Gewebes wurden die Gewebsstücke in zwei Schritten kontrastiert (siehe Tabelle 2.1), bevor sie in Durcupan eingebettet wurden. Nach der Einbettung und dem Anfertigen der Ultradünnschnitte erfolgte der letzte Kontrastierungsschritt.

Tabelle 2.1: Verw	endete Lösungen zu	r Kontrastierung in der	Elektronenmikroskopie
-------------------	--------------------	-------------------------	-----------------------

	Menge / Volumen	Chemikalie / Lösung
1. Stückkontrastierung	4% gelöst in dH ₂ O	Osmiumtetroxid
	6,86%	Saccharose
	0,2 molar (M)	PB
2. Stückkontrastierung	1%	Uranylacetat
	70%	EtOH
Schnittkontrastierung	1,33 g	Blei(II)nitrat
	1,76 g	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

43 ml	Deionisiertes Wasser
7 ml	NaOH 1 mol/l

2.4 Geräte

2.4.1 Mikroskope

Transmissionslektronenmikroskop CM100	Philips, Hamburg
mit Kamera Quemesa TEM CCD camera	Olympus, Hamburg

2.4.2 Weitere Geräte

Diamantmesser Ultra 45 °	Diatome, Hatfield, PS (USA)
Ionenaustauscher GREEN-LINE DIA 2800	EnviroFALK, Hamburg
Magnetrührer mit Wärmeplatte MAG-H	Gerhardt, Königswinter
Trockenschrank 2711	Köttermann, Uetze
Ultramikrotom EM UC7	Leica, Wetzlar
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY (USA)
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg

2.5 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
2 ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Bügelklingen	Carl Roth, Karlsruhe
Einbettungsmulden PELCO	Ted Pella, Redding, CA (USA)
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalpipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe Micro-Touch, Nitra-Tex	Ansell, Brüssel (Belgien)
KIMTECH Science Präzisionstücher	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer Grids	Plano, Wetzlar
Papierfilter rund	Schleicher & Schuell
Parafilm "M"	Bemis Company, Oshkosh, WI (USA)
Pasteurpipetten 150 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen (Ø 35 mm, 10 mm)	Becton Dickison, Franklin (USA)
Pinzette Dumont Typ N7, Dumoxel	Plano, Wetzlar
Rollenpflaster Leukoplast	BSN Medical, Hamburg
Schnappdeckelglas 5 ml	Th. Geyer, Renningen

Skalpell Wimper mit Halterung Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 30 ml) B. Braun AG, MelsungenTed Pella, Redding, CA (USA)Sigma-Aldrich, Steinheim

2.6 Software

iTEM (ResAlta) Microsoft Office 365 (Microsoft) Paint.NET (Washington State University, Microsoft)

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung aller Experimente wurde mit Excel (Microsoft Office 365) durchgeführt. Die Signifikanzniveaus der Daten (Fußfortsatzbreite) der jeweils unterschiedlichen Gruppen wurden mit dem Student's T-Test berechnet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse inklusive der Standardabweichung erfolgte ebenfalls mit Excel. Als Signifikanzniveaus wurden vorausgesetzt:

* $p \le 0.05$ ** $p \le 0.01$ *** $p \le 0.001$

3. Methoden

In diesem Kapitel sind alle verwendeten Methoden ausgeführt.

3.1 Fixierung für die Elektronenmikroskopie

Die Fixierung der Nieren- und Skelettmuskelgewebe sowie der Spermien erfolgte extern in den Laboren, die die Mäuse hielten. Zur optimalen Erhaltung der Ultrastruktur wurde der Fixierlösung aus 4% PFA zusätzlich 2,5% Glutaraldehyd zugefügt. Das Gewebe wurde in dieser Lösung bei 4 °C gelagert und transportiert.

3.2 Einbettung der Nieren und Muskeln für die darstellende Elektronenmikroskopie

Die mit 4% PFA und 2,5% Glutaraldehyd fixierten Nieren und Skelettmuskelstücke wurden, wenn nötig, mit einem Skalpell weiter zerkleinert, bis zu einer Größe von circa 1 mm³. Anschließend erfolgte der erste Kontrastierungsschritt (siehe Tabelle 2.1) in einer Lösung aus 4% Osmiumtetroxid

und Saccharosepuffer im Verhältnis 1:4 für 45 Minuten. Darauf folgte die Entwässerung der Stücke. Dafür wurden diese jeweils für 15 Minuten in 35% EtOH und in 50% EtOH überführt. Während der Entwässerung erfolgte der zweite Kontrastierungsschritt (siehe Tabelle 2.1) mit 1% Uranylacetat in 70% EtOH für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht.

Zur weiteren Entwässerung wurden die Stücke für 15 Minuten in 96% EtOH und dann zweimal für 15 Minuten in 100% EtOH überführt.

Danach erfolgte die Vorbereitung für die Einbettung in das Kunstharz Durcupan. Hierfür wurden die Stücke zweimal für jeweils 15 Minuten in Propylenoxid überführt und anschließend für 2 h in einer 1:1-Mischung aus Propylenoxid und Durcupan inkubiert, bevor sie schließlich in 100% Durcupan überführt und darin über Nacht inkubiert wurden.

Am nächsten Tag wurden die Stücke in Einbettungsmulden gegeben, welche anschließend mit Durcupan befüllt wurden. Die Aushärtung des Harzes erfolgte im Wärmeschrank bei 60 °C für 24 h.

Die entstandenen Harzblöcke wurden auf eine Fläche von etwa 1 mm² getrimmt und anschließend mit einem Ultramikrotom mit Hilfe eines Diamantmessers 85 nm dick geschnitten. Die Schnitte wurden auf Kupfer-Grids aufgebracht.

An den auf den Grids aufgebrachten Schnitten erfolgte der letzte Kontrastierungsschritt mit Bleicitrat (siehe Tabelle 2.1) für 3 Minuten, anschließend wurden die Schnitte mit 5 ml destilliertem Wasser gewaschen.

3.3 Einbettung der Spermien für die Elektronenmikroskope

Die mit 4% PFA und 2,5 % Glutaraldehyd fixierten Spermien wurden zunächst in den 1,5 ml Safe-Lock Tubes für 10 Minuten bei 300 rounds per minute (rpm) (10 x g) zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet absetzte. Der Überstand (100-200 µl) wurde abpipettiert. Anschließend wurde der erste Kontrastierungsschritt mit 1% Osmiumtetroxit (siehe Tabelle 2.1, Verdünnung mit Saccharosepuffer im Verhältnis 1:4) durchgeführt, bis das Zellpellet sich dunkel anfärbte. Dies dauerte im Durchschnitt 10 Minuten. Danach wurde der Überstand erneut abpipettiert. Auf einem Magnetrührer mit integrierter Wärmeplatte wurde 3% Agarose aus 18 ml dH₂O und 540 mg Agarose angesetzt. Diese wurde noch warm in die Safe-Lock Tubes auf das Zellpellet pipettiert und härtete darin aus. Der ausgehärtete Agaroseblock wurde aus den Tubes in ein Glasgefäß überführt und es folgte im Weiteren die normale Einbettungsprozedur bestehend aus der aufsteigenden Alkoholreihe, der weiteren Kontrastierung mit Uranylacetat in 70% EtOH, dem Überführen in Propylenoxid und der Inkubation in Durcupan über Nacht. Die Agaroseblöcke wurden noch einmal geteilt, bevor sie schließlich in die Einbettungsmulden gegeben und mit Durcupan bedeckt wurden, welches 24 h bei 60 °C aushärtete. Die weitere Prozedur entsprach dem Standard, wie in Kapitel 3.2 beschrieben.

3.4. Auswertungsmethoden

3.4.1. Quantitative Bestimmung der Fußfortsatzbreite in den Nierenglomeruli

Für die Bestimmung der Fußfortsatzbreite wurden die kontrastierten Ultradünnschnitte zunächst mit dem Transmissionselektronenmikroskop CM100 von Philips mit einer Vergrößerung von 1650 bis 2950 begutachtet und pro Tier mindestens 10 unterschiedliche Ausschnitte eines Glomerulums aufgenommen. Anschließend wurden mithilfe der Software iTEM auf jedem Bild die Länge der Basalmembran und die Anzahl der daran anliegenden Fußfortsätze gemessen. Die quantitative Auswertung der so erhaltenen Werte erfolgte mit der Software Excel. Dabei wurde jeweils die Gesamtlänge der Basalmembranen durch die Anzahl der Fußfortsätze geteilt und dieses Ergebnis anschließend erneut durch den Korrekturfaktor $4^*\pi$ geteilt.

Fußfortsatzbreite (nm) = $\frac{\frac{\text{Länge der Basalmembran (nm)}}{\text{Anzahl Fußfortsätze}}}{4 * \Pi}$

3.4.2 Qualitative Auswertung der Nieren

Zur qualitativen Auswertung der Nierenschnitte wurden pro Versuchsgruppe ein oder mehrere komplette Ultradünnschnitte systematisch elektronenmikroskopisch angesehen. In der Struktur der vorhandenen Glomeruli wurden die Breite der glomerulären Basalmembran, die Intaktheit des Endothels, der Zustand der Podozyten und insbesondere die Architektur der Fußfortsätze untersucht. Ergab sich hieraus der Verdacht auf verbreiterte Fußfortsätze (FPE), so wurde quantitativ weiter verfahren, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Des Weiteren wurden die verschiedenen Abschnitte des Tubulussystems untersucht. Je nach vorhandener Fragestellung und bekannten Auswirkungen der untersuchten Erkrankung bzw. der Behandlung wurde ein Fokus auf bestimmte Abschnitte des Tubulussystems gelegt.

3.4.3 Qualitative Auswertung der Skelettmuskulatur

Zur qualitativen Auswertung der Skelettmuskulatur wurden pro Versuchsgruppe ein oder mehrere komplette Ultradünnschnitte systematisch elektronenmikroskopisch angesehen. Die längsgeschnittenen Muskelfasern wurden auf den normalen Aufbau der Sarkomere und deren Anordnung zueinander untersucht. Außerdem wurden die Mitochondrien innerhalb der Faser und unterhalb des Sarkolemms hinsichtlich ihrer Anzahl, Größe und Struktur beurteilt. Zudem wurden die Struktur und Lage der Zellkerne begutachtet. Gab es bei den vorher getätigten Mausexperimenten

einen Hinweis auf eine verzögerte oder gestörte Erregungsübertragung, so wurde an Querschnitten zusätzlich ein Fokus auf die Struktur der neuromuskulären Endplatten gelegt.

3.4.4 Qualitative Auswertung der Spermien

Zur qualitativen Auswertung der Spermien wurden pro Versuchsgruppe ein oder mehrere Ultradünnschnitte systematisch elektronenmikroskopisch angesehen. Im Allgemeinen wurde das Verhältnis der korrekt gebildeten Spermien zu den abnormalen Spermien beurteilt. Um die Spermien in diese Kategorien einteilen zu können, wurde die Morphologie der drei Abschnitte des Spermiums überprüft: Am Kopfteil die Morphologie des Kernes, die Menge des Zytoplasmas und, wenn sichtbar, die Struktur des Akrosoms, am Mittelstück die 9+2 Struktur der längs angeordneten Mikrotubuli sowie die sich ringsherum befindlichen Mitochondrien und am Schwanz ebenfalls die Mikrotubulistruktur. Entsprach einer dieser Abschnitte nicht der Norm, so wurde das Spermium als abnormal klassifiziert. Zudem wurden die auftretenden Veränderungen genauer betrachtet und dokumentiert.

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aller Untersuchungen dargestellt, die zu den einzelnen (Krankheits-)Modellen durchgeführt wurden. Als Beispiele für die Wirkung des sActRIIB wurden die Ultrastruktur der Niere und der Skelettmuskulatur (am Beispiel des M. biceps brachii), als potenzielle Nebenwirkung, die von Spermatozoen untersucht.

4.1 Progeriemodell Ercc1^{Δ/-}

Im Folgenden werden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen dargestellt, die anhand der Progerie-Mauslinie Ercc1^{Δ/-} durchgeführt wurden. Es werden die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsmethoden sActRIIB und der Kalorien-reduzierten Diät (KR) auf WT-Mäuse und anschließend auf die Progerie-Mäuse beschrieben. Untersucht wurde die Ultrastruktur der Niere und der Skelettmuskulatur.

4.1.1 Untersuchungen an der Niere

4.1.1.1 Auswirkungen des sActRIIB und der Kalorien-reduzierten Diät auf WT-Mäuse

Als Kontrollgruppen zu dem Progeriemodell wurden an WT-Mäusen (Ercc1^{+/+}) die Auswirkungen des sActRIIB sowie der Kalorien-reduzierten Diät untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den vier Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 4.1). Die Tiere aller Gruppen wiesen eine normale glomeruläre Struktur auf. Das fenestrierte Endothel zeigte keine Auffälligkeiten, die glomeruläre Basalmembran war normal und gleichmäßig dick und die von den Podozyten gebildeten Fußfortsätze wiesen eine regelhafte Morphologie auf. Quantitative Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Breite der Fußfortsätze zwischen den einzelnen Behandlungsmethoden (Abbildung 4.1.e, WT Mock AL 288±61 nm, WT Mock KR 313±35 nm, WT sActRIIB AL 294±47 nm, WT sActRIIB KR 295±30 nm).


Abbildung 4.1: Keine Auswirkungen durch den sActRIIB und die KR auf die Glomeruli von WT-Mäusen sichtbar. EM-Untersuchung der Struktur der Podozyten bei WT-Mäusen unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. (a) WT Mock AL. (b) WT Mock KR. (c) WT sActRIIB AL. (d) WT sActRIIB KR. (e) Quantitative Untersuchung der Fußfortsatzbreite (WT Mock AL 288±61 nm, WT Mock KR 313±35 nm, WT sActRIIB AL 294±47 nm, WT sActRIIB KR 295±30 nm).

4.1.1.2 Phänotyp des Progeriemodells (Ercc1^{△/-})

Nach der Untersuchung der Kontrolltiere wurden der Phänotyp der Ercc1^{$\Delta/-$} Mauslinie beurteilt. In den Glomeruli zeigte sich als auffälligstes Merkmal eine Verbreiterung der Fußfortsätze (FPE) im Vergleich zu den WT-Tieren (Abbildung 4.2.b-c, WT Mock AL 288±61 nm, $\Delta/-$ Mock AL 544±137 nm, p≤0,001). Zudem fanden sich vermehrt hypertrophe Mitochondrien. Sonstige Veränderungen der Glomeruli und des Tubulussystems konnten nicht festgestellt werden.



Abbildung 4.2: **Phänotyp des Glomerulums bei Ercc1**^{Δl -} **Mäusen**. EM-Untersuchung des Ultrastruktur der Niere von WT- und Ercc1^{Δl -} Mäusen. Ercc1^{Δl -} Mäuse weisen signifikant mehr FPE auf. Auffällig sind zudem hypertrophe Mitochondrien (rote Pfeile). (a) WT Mock AL. (b) Δl - Mock AL. (c) Quantitative Auswertung der FP-Breite (WT Mock AL 288± 61 nm, Δl - Mock AL 544±137 nm, p≤ 0,001).

4.1.1.3 Auswirkungen des sActRIIB und der Kalorien-reduzierten Diät auf Ercc1^{Δ/-}– Mäuse

Es wurde ein Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsmethoden durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bereits der Einsatz einer der beiden Behandlungsmethoden zu einem reduzierten FPE führte (Abbildung 4.3.d,c). Dies konnte auch in den quantitativen Auswertungen nachgewiesen werden (Abbildung 4.3.e Δ /- Mock AL 544±137 nm, Δ /- Mock KR 440±74 nm, p ≤ 0,001; Δ /- sActRIIB AL 433±86 nm, p ≤ 0,001). Die Behandlung mit dem sActRIIB wies einen Trend dazu auf, effektiver zu sein, der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant (p=0,72). In der Gruppe, bei der eine Doppelbehandlung stattfand, konnte ebenfalls eine starke Reduktion des FPE festgestellt werden (Abbildung 4.3.d-e Δ /- sActRIIB KR 390±57 nm, p ≤ 0,001), sie war auch schwach signifikant gegenüber den Einfachbehandlungsgruppen. Bei keiner der Behandlungsgruppen entsprach die Breite der Fußfortsätze den Normalwerten der Kontrollgruppe. In allen Behandlungsgruppen waren weniger hypertrophe Mitochondrien erkennbar.



Abbildung 4.3: **sActRIIB und KR führen zu einer Verringerung des FPE bei Ercc1**^{Δ /-} **Mäusen.** EM-Untersuchung der Struktur der Podozyten bei Ercc1 Δ /- Mäusen ohne Behandlung und unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. Ercc1 Δ /- Mäuse zeigen ein deutliches FPE. sActRIIB und KR führen zu weniger breiten FP. Keine hypertrophen Mitochondrien sichtbar. (a) Δ /- Mock AL. (b) Δ /- Mock KR. (c) Δ /- sActRIIB AL. (d) Δ /- sActRIIB KR (e) Quantitative Auswertung der FP-Breite (Δ /- Mock AL 544±137 nm, Δ /- Mock KR 440±74 nm, p ≤ 0,001; Δ /- sActRIIB AL 433±86 nm, p ≤ 0,001, Δ /- sActRIIB KR 390±57 nm, p ≤ 0,001)

4.1.2 Untersuchungen an der Skelettmuskulatur

4.1.2.1 Auswirkungen des sActRIIB und der Kalorien-reduzierten Diät auf WT-Mäuse

Wie auch bei den Nieren wurden bei der Skelettmuskulatur als Kontrollgruppen die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsmethoden an WT-Mäusen (Ercc1^{+/+}) getestet. Die Muskulatur wurde im Längsschnitt betrachtet. Dabei konnten keine durch die Behandlung ausgelösten Veränderungen festgestellt werden. Die Muskulatur wies regelhaft strukturierte Sarkomere auf, die Zellkerne zeigten keine Auffälligkeiten, die Größe und Lage der Mitochondrien entsprachen der Norm (Abbildung 4.4).



Abbildung 4.4: Keine Auswirkungen durch den sActRIIB und die KR auf die Struktur der Skelettmuskulatur von WT-Mäusen sichtbar. EM-Untersuchung der Struktur des M. biceps brachii bei WT-Mäusen unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. Die Bilder sind repräsentativ für alle Bestandteile der quergestreiften Muskulatur (a) WT Mock AL. (b) WT Mock KR. (c) WT sActRIIB AL. (d) WT sActRIIB KR.

4.1.2.2 Phänotyp des Progerie-Modells (Ercc1^{Δ/-}) ohne Therapie

Im Vergleich zu den WT-Tieren wurde die Ultrastruktur der Skelettmuskulatur von Ercc1^{∆/-}Mäusen untersucht. Dabei fanden sich einige Auffälligkeiten. Die Sarkomere wiesen eine irreguläre Struktur mit unregelmäßig verteilten, teils verbreiterten oder fehlenden Z-Banden auf. Das Tubulussystem wirkte stellenweise erweitert. Die Verteilung der Mitochondrien war weitestgehend regelrecht. Die Morphologie der Zellkerne war unauffällig (Abbildung 4.5.a).

Da elektrophysiologische Tests (durchgeführt im Labor von Prof. Ketan Patel) ergaben, dass die Signalübertragung vom peripheren Nervensystem auf die Skelettmuskulatur geschädigt sei, wurde die Struktur der motorischen Endplatten unter Einfluss der verschiedenen Behandlungsmethoden untersucht. Dabei fanden sich bei den Ercc1^{$\Delta/-$} Mäusen ohne Behandlung Auffälligkeiten im Bereich der Postsynapse. Dort bildet das Sarkolemm zahlreiche bis zu 1 µm tiefe Einstülpungen, den sogenannten Subneuralen Faltenapparat, der einer Vergrößerung der Oberfläche dient. An den tiefsten Punkten der Einstülpungen kommt es jeweils zu einer Verdickung des Sarkolemms (Hall und Sanes 1993). Die Einstülpungen werden auch als Fragmentierung des Sarkolemms bezeichnet. Bei den Ercc1^{$\Delta/-}$ </sup> Mäusen war diese erheblich flacher und unregelmäßiger ausgeprägt, als dies bei WT-Mäusen der Fall ist. An den Endknöpfchen der Motoneuronen sowie an deren myelinisierten Fasern konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden (Abbildung 4.6.a,f).

4.1.2.3 Auswirkungen des sActRIIB und der Kalorien-reduzierten Diät auf Ercc1^{∆/-}– Mäuse

Die allgemeine Ultrastruktur der Skelettmuskulatur war sowohl bei den mit dem sActRIIB behandelten Mäusen als auch bei der Doppelintervention mit der Kalorien-reduzierten Diät größtenteils regelhaft. Die Sarkomere wiesen einen regelmäßigen Aufbau mit gleichförmigen Z-Linien auf (Abbildung 4.5.c-d). Im Gegensatz dazu führte die alleinige Therapie durch die Kalorienreduzierte Diät nicht zu einer Verbesserung der Sarkomerstruktur (Abbildung 4.5.b)

Im Bereich der neuromuskulären Endplatten zeigte sich unter Behandlung der Mäuse in Form der Kalorien-reduzierten Diät eine deutlich verbesserte Struktur des fragmentierten Sarkolemms. Die Einstülpungen waren zahlreicher und tiefer, waren aber nicht so gleichmäßig wie bei einem WT-Tier (Abbildung 4.6.b). Die Behandlung mit dem sActRIIB hatte einen ähnlichen Einfluss auf die Fragmentierung des Sarkolemms der motorischen Endplatte. Auch bei diesen Tieren näherten sich die Tiefe und die Anzahl der Membraneinstülpungen dem normalen Aussehen bei WT-Mäusen an, dennoch fehlte es auch bei dieser Behandlungsmethode an Gleichmäßigkeit (Abbildung 4.6.c). Die Kombination des sActRIIB und der Kalorien-reduzierten Diät führte zu einer erneuten Verbesserung des Phänotyps (Abbildung 4.6.d). Die Einstülpungen des Sarkolemms waren ähnlich tief und zahlreich wie bei den Einzeltherapien. Zusätzlich wurden bei den doppelt behandelten Tieren eine Gleichmäßigkeit und Parallelität dieser deutlich, sodass das Gesamtbild dem eines WT-Tieres glich. Die Struktur der neuromuskulären Endplatten wurde anhand einer Schemazeichnung von Hall und Sanes (1993) beurteilt (Abbildung 4.6.e).



Abbildung 4.5: sActRIIB und Doppelintervention mit KR verbessern die Ultrastruktur der Skelettmuskulatur. EM-Untersuchung der Struktur der Skelettmuskulatur bei Ercc1^{$\Delta/-$} Mäusen ohne Behandlung und unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. Ercc1^{$\Delta/-$} Mäuse zeigen unregelmäßige Sarkomere. Unter alleiniger KR keine Verbesserung. Bei Therapie mit dem sActRIIB und bei Doppelintervention regelrechte Ultrastruktur. (a) $\Delta/-$ Mock AL. (b) $\Delta/-$ Mock KR. (c) $\Delta/-$ sActRIIB AL. (d) $\Delta/-$ sActRIIB KR.



Abbildung 4.6: sActRIIB und KR verbessern die Struktur der motorischen Endplatte bei Ercc1^{$\Delta/-$} Skelettmuskeln. EM-Untersuchung der Struktur der motorischen Endplatte bei Ercc1^{$\Delta/-$} Mäusen ohne Behandlung und unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. Ercc1^{$\Delta/-$} Mäuse zeigen eine unregelmäßigere und flachere Fragmentierung des Sarkolemms. (a) $\Delta/-$ Mock AL. (b) $\Delta/-$ Mock KR. (c) $\Delta/-$ sActRIIB AL. (d) $\Delta/-$ sActRIIB KR. (e) $\Delta/-$ Mock KR myeliniserte Nervenfasern in der Skelettmuskulatur. (f) Schema einer regulären motorischen Endplatte (Quelle: verändert nach Hall und Sanes (1993)).

4.2 Sichelzellanämie-Modell

Im Folgenden werden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen dargestellt, die anhand der knock-in Sichelzellanämie-Mauslinie, entwickelt von Wu et al. (2006), durchgeführt wurden. Es werden der Phänotyp der HbS-Mäuse und die Auswirkung der Behandlung mit dem sActRIIB beschrieben. Untersucht wurden die ultrastrukturellen Eigenschaften der Niere und der Skelettmuskulatur.

4.2.1 Untersuchungen an der Niere

4.2.1.1 Phänotyp der HbS-Mauslinie

Es wurde die Ultrastruktur in der Niere der HbS-Mäuse untersucht. Die Glomeruli zeigten in beiden Versuchsgruppen keine morphologischen Auffälligkeiten (Abbildung 4.7.a-b). Es gab kein sichtbares FPE, in den quantitativen Messungen fanden wir geringfügig, aber signifikant breitere Fußfortsätze in der sActRIIB-Gruppe (HbS PBS 356±65 nm, HbS sActRIIB 407±76 nm, p=0,003). Das Tubulussystem der HbS-Mäuse wies zahlreiche Auffälligkeiten auf. In proximalen und distalen Tubuli sowie in Sammelrohren zeigten sich ein vermehrter Zelltod oder eine Degeneration des Tubulus (Abbildung 4.7.d-f). Die Henle-Schleife war davon nicht betroffen (Abbildung 4.7.g). Des Weiteren fanden sich massive Kollageneinlagerungen zwischen benachbarten Tubuli sowie zwischen Tubuli und der Basalmembran von Gefäßen, die auf eine Fibrosierung des Organs hindeuten (Abbildung 4.7.h).



Abbildung 4.7: **Das Tubulussystem der Niere ist bei HbS-Mäusen geschädigt.** EM-Untersuchung der Struktur der Niere von HbS-Mäusen. Es gibt keine Veränderungen in den Glomeruli. (a) HbS PBS Glomerulum. (b) HbS + sActRIIB Glomerulum. Das Tubulussystem zeigt vermehrten Zelltod und Degeneration. Die Henle-Schleife ist nicht betroffen. Außerdem gibt es Fibrosierungen. (a, d-f) HbS-Mäuse ohne Therapie. (c) Quantitative Messung der FP-Breite (HbS PBS 356±65 nm, HbS sActRIIB 407±76 nm, p=0,003). (d) Proximaler Tubulus. (e) Distaler Tubulus. (f) Sammelrohr. (g) Henle-Schleife. (h) Kollageneinlagerung zwischen zwei Tubuli (rote Pfeile).

4.2.1.2 Auswirkungen des sActRIIB auf die HbS-Mäuse

Bei den mit dem sActRIIB behandelten Tieren konnten keine Hinweise auf einen vermehrten Zelltod oder degenerierte Tubuli gefunden werden. Das Tubulussystem in Nierenkortex und Nierenmark war vollständig intakt (Abbildung 4.8.a-d). Eine Fibrose im Ausmaß der unbehandelten Tiere konnte nicht festgestellt werden. Jedoch fanden sich an einigen Stellen schmale submembranöse Kollageneinlagerungen (Abbildung 4.8.b). Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren muss dennoch, aufgrund der maßgeblich geringen Ausprägung, von einer deutlichen Reduktion der Fibrosierung ausgegangen werden.



Abbildung 4.8: **Der sActRIIB reduziert Schädigungen des Tubulussystems.** EM-Untersuchung der Struktur der Niere von HbS-Mäusen, die mit dem sActRIIB therapiert wurden. Das Tubulussystem ist intakt. Ein vermehrter Zelltod im proximalen Tubulus (a), distalen Tubulus (b) oder Sammelrohr (c) ist nicht erkennbar. Die Henle-Schleife (d) ist ebenfalls regelhaft. Schmale submembranöse Kollageneinlagerungen (rote Pfeile) sind sichtbar.

4.2.2 Untersuchungen an der Skelettmuskulatur

4.2.2.1 Auswirkungen des sActRIIB auf WT-Mäuse

Als Kontrollgruppe wurden die Auswirkungen des sActRIIB auf die Skelettmuskulatur von WT-Mäusen untersucht. Dabei wurde die Muskulatur im Längsschnitt begutachtet. Simultan zu den Ergebnissen der Kontrollgruppe im Progerie-Modell zeigten sich auch hier keine Auffälligkeiten. Es lagen regelhaft strukturierte Sarkomere vor, die Morphologie und Lage der Zellkerne sowie Größe und Lage der Mitochondrien entsprachen der Norm (Abbildung 4.9)



Abbildung 4.9: **Keine Auswirkungen durch den sActRIIB auf die Struktur der Skelettmuskulatur von WT-Mäusen sichtbar**. EM-Untersuchung der Struktur des M. biceps brachii bei WT-Mäusen unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. Die Bilder sind repräsentativ für alle Bestandteile der quergestreiften Muskulatur (a) WT PBS. (b) WT sActRIIB.

4.2.2.2 Phänotyp der HbS-Mauslinie

Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren wurde die Ultrastruktur der Skelettmuskulatur von HbS-Mäusen untersucht. Dabei fanden sich zahlreiche Auffälligkeiten. Die Sarkomere wiesen eine irreguläre Struktur mit verbreiterten Z-Banden und kaum sichtbaren oder komplett fehlenden M-Banden auf (Abbildung 4.10.a). Die Dichte der Myofibrillen war verringert und das Tubulussystem erweitert (Abbildung 4.10.a). Die Verteilung der Mitochondrien wich ebenfalls von der Norm ab. Zum einen zeigten sich innerhalb der Faser große Stränge von zusammenhängenden Mitochondrien, wo normalerweise meist nur Paare zu finden sind (Abbildung 4.10.b) und zum anderen gab es submembranös Abschnitte scheinbar "leeren" Sarkoplasmas anstelle kompakt gelagerter Mitochondrien (Abbildung 4.10.c). Außerdem kam es zu flächigen Kollageneinlagerungen zwischen benachbarten Faserabschnitten, was genau wie in der Niere auf einen fibrotischen Umbau des Gewebes hindeutet (Abbildung 4.10.d). Die Morphologie der Zellkerne war unauffällig.



Abbildung 4.10: **Die Skelettmuskulatur der HbS-Mäuse zeigt zahlreiche Veränderungen.** EM-Untersuchung der Ultrastruktur der Skelettmuskulatur von HbS-Mäusen. Es finden sich schlecht organisierte Sarkomere (erweiterte Z-Banden, fehlende M-Banden) (a-d) ein erweitertes Tubulussystem (rote Pfeilspitze,a), eine nicht regelhafte Mitochondrienverteilung (blauer Pfeil, b-c) sowie Kollageneinlagerungen (roter Pfeil,d).

4.2.2.3 Auswirkungen des sActRIIB auf die HbS-Mäuse

In der mit dem sActRIIB behandelten Versuchsgruppe konnten, im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren, nahezu keine Abnormalitäten festgestellt werden. Die Sarkomere waren normal strukturiert und alle Banden in regelhafter Ausprägung. Größe und Lage der Mitochondrien waren unauffällig und es gab keine Anzeichen einer Fibrose. Lediglich das Tubulussystem war etwas erweitert (Abbildung 4.11).



Abbildung 4.11: **sActRIIB reduziert die strukturellen Veränderungen, die bei HbS-Mäusen auftreten.** EM-Untersuchung der Skelettmuskulatur von HbS-Mäusen, die mit dem sActRIIB therapiert wurden. Es zeigt sich eine regelhafte Struktur der Sarkomere sowie eine normale Lage und Größe der Mitochondrien. Keine Anzeichen von Fibrose. Das Tubulussystem ist leicht erweitert. (a) Auszug aus einer längs geschnittenen Faser. (b) Regelhafte submembranöse Mitochondrien.

4.3 Cisplatin-Mausmodell

Im Folgenden werden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung dargestellt, die an CD-1 Mäusen erfolgt sind. Es wurden die kurz- und langfristigen Auswirkungen der Cisplatin-Gabe bei jungen Mäusen getestet. Anschließend wird der Effekt einer simultanen Therapie mit dem sActRIIB beschrieben. Untersucht wurden die Ultrastruktur von Niere und Skelettmuskulatur zu zwei Zeitpunkten. Das Alter von 37 Tagen (37 d) liegt einen Tag nach der letzten Cisplatin-Injektion und repräsentiert somit die kurzfristigen Auswirkungen. Bei den 120 Tage (120 d) alten Mäusen lag die letzte Injektion 12 Wochen zurück, hiermit sollen die langfristigen Auswirkungen abgebildet werden. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse, die ausschließlich PBS oder dieses in der Kombination mit dem sActRIIB injiziert bekamen.

4.3.1 Untersuchungen an der Niere

4.3.1.1 Auswirkungen der Cisplatin-Gabe auf die Struktur der Niere zu den Zeitpunkten 37 d und 120 d im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS-Gabe)

Es wurden die Struktur der Glomeruli und des Tubulussystems zu den Zeitpunkten 37 d und 120 d untersucht.

Zum Zeitpunkt 37 d konnten bei den Cisplatin-behandelten Tieren innerhalb der Glomeruli keinerlei Veränderungen gefunden werden. Die Podozyten waren intakt und ihre Fußfortsätze wiesen keine Verbreiterung auf, das Endothel der Kapillaren erschien regelhaft und die glomeruläre Basalmembran nicht verdickt (Abbildung 4.12.a). Bei der Untersuchung des Tubulussystems erschienen die meisten Abschnitte ebenfalls unverändert. Jedoch zeigte sich ein vermehrter Zelltod, der insbesondere in proximalen Tubuli sehr häufig auftrat (Abbildung 4.12.b). Dies betraf in der Regel einen großen Anteil der Tubuluszellen, sodass man von einer globalen Schädigung dieser Tubuli ausgehen kann. Die anderen Abschnitte des Tubulussystems waren davon nur geringfügig betroffen.

In der Kontrollgruppe mit ausschließlicher Gabe von PBS waren alle Abschnitte des Tubulussystems sowie die Glomeruli intakt. Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch bei den Tieren der Versuchsgruppe, die zusätzlich mit dem sActRIIB behandelt worden waren. Diese wiesen ebenfalls intakte Glomeruli (nicht abgebildet) und keine Anzeichen einer Schädigung des Tubulussystems auf (Abbildung 4.12.c-e).

Auch zum Zeitpunkt 120 d gab es innerhalb der Glomeruli in allen Versuchsgruppen keinerlei Auffälligkeiten (Abbildung 4.13.a,d,e). In den Kontrollgruppen mit und ohne Behandlung durch den sActRIIB waren auch alle Abschnitte des Tubulussystems weiterhin intakt (Abbildung 4.13.d-f). Bei den Mäusen, die Cisplatin erhalten hatten, fand sich eine Vielzahl komplett degenerierter Tubuli, von denen nur noch Zelltrümmer verblieben (Abbildung 4.13.b-c). Die Lage im Kortex innerhalb von

Verbänden von proximalen bzw. distalen Tubuli sowie das Wissen um den bereits früher aufgetretenen Zelltod in proximalen Tubuli, deuteten darauf hin, dass es sich bei diesen Überbleibseln größtenteils um proximale Tubuli gehandelt haben könnte.



Abbildung 4.12: **Zeitpunkt 37 d - Therapie mit Cisplatin führt zu Degeneration des proximalen Tubulus.** (a-b) Glomerulum und proximaler Tubulus unter Cisplatin-Therapie. (c-d) Kontrollgruppe PBS. (e) PBS + sActRIIB.



Abbildung 4.13: **Zeitpunkt 120 d – Komplett degenerierte proximale Tubuli nach Therapie mit Cisplatin.** (a) Glomerulum nach Cisplatin-Therapie. (b-c) Degenerierte Tubuli nach Cisplatin-Therapie. (d) Kontrollgruppe PBS. (e-f) PBS + sActRIIB.

4.3.1.2 Struktur der Niere bei simultaner sActRIIB-Behandlung neben einer Cisplatin-Therapie

Es wurde die Struktur der Niere von Mäusen untersucht, die simultan zu einer Cisplatin-Therapie den sActRIIB injiziert bekommen haben. Vergleichbar mit den anderen Versuchsgruppen wiesen auch bei diesen Tieren die Glomeruli eine normale Struktur auf. Es gab keine Anzeichen von FPE oder Podozytenverlust, einer verdickten Membran oder Schädigungen der Kapillarschlingen (Abbildung 4.14.a-b). Im Gegensatz zu der ausschließlichen Cisplatin-Gabe konnte bei simultaner Behandlung mit dem sActRIIB zum Zeitpunkt 37 d kein vermehrter Zelltod innerhalb der proximalen Tubuli festgestellt werden (Abbildung 4.14.c-d). Auch die Henle-Schleifen, distalen Tubuli und Sammelrohre wiesen keinerlei Auffälligkeiten auf (nicht abgebildet). Zum Zeitpunkt 120 d zeigte sich ebenfalls ein völlig intaktes Tubulussystem, es kam also auch langfristig nicht zu vermehrtem Zelltod oder Degeneration von Tubuli (Abbildung 4.14.e-f).



Abbildung 4.14: **Erhaltenes Tubulussystem bei simultaner Behandlung mit Cisplatin + sActRIIB.** (a) 37 d intaktes Glomerulum. (b) 120 d intaktes Glomerulum. (c-d) 37 d unauffällige proximale und distale Tubuli. (e-f) 120 d unauffällige proximale Tubuli.

4.3.2 Untersuchungen an der Skelettmuskulatur

4.3.2.1 Auswirkungen der Cisplatin-Gabe auf die Struktur der Skelettmuskulatur zu den Zeitpunkten37 d und 120 d im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Struktur der Skelettmuskulatur nach Cisplatin-Gabe wurde am Beispiel des M. biceps brachii zu den Zeitpunkten 37 d und 120 d untersucht.

Bei den Tieren, die Cisplatin erhielten, zeigten sich dabei zum Zeitpunkt 37 d zahlreiche und massive Veränderungen. Die Länge und Querstreifung der Sarkomere war uneinheitlich. Insbesondere die Z-Bande fiel durch eine Verbreiterung und unklare Begrenzung auf, die restlichen Banden wiederum waren zumeist schwer voneinander abzugrenzen. Stellenweise war zudem das Tubulussystem erweitert (Abbildung 4.15.a-c). Des Weiteren fanden sich innerhalb der Muskelfaser zahlreiche hypertrophe Mitochondrien mit vermehrten Lipideinschlüssen (Abbildung 4.15.a,c). Die Struktur und Lage der Zellkerne waren unauffällig, auch die submembranös gelagerten Mitochondrien zeigten keine Veränderungen (Abbildung 4.15.a-c). Die motorischen Endplatten waren regelhaft strukturiert (Abbildung 4.15.b).

Besonders auffällig war, dass nicht alle Abschnitte der Skelettmuskulatur von diesen Veränderungen betroffen waren. So gab es benachbarte, durch eine Membran voneinander abgetrennte Faserabschnitte, die eine unterschiedliche Ausprägung der Schädigungen zeigten (Abbildung 4.15.c).

In der komplett unbehandelten Kontrollgruppe zeigten sich keine Auffälligkeiten in der Struktur der Muskulatur. Bei den nur mit dem sActRIIB behandelten Tieren fand sich, wie auch schon in vorherigen Versuchen, ein leicht erweitert erscheinendes Tubulussystem. Die Muskulatur wies keine weiteren Veränderungen auf (Abbildung 4.15.d-e).

Zum Zeitpunkt 120 d konnte bei den Cisplatin-behandelten Tieren eine starke Verbesserung der vorher bestehenden Schädigungen festgestellt werden. Es lag eine regelhafte Struktur mit einer klar erkennbaren Querstreifung vor. Es lagen keine hypertrophen Mitochondrien vor. Allerdings war die Erweiterung des Tubulussystems weiterhin vorhanden. Abgesehen davon konnten keine weiteren Schädigungen festgestellt werden. Auch die Morphologie und Lage der Zellkerne waren unverändert (Abbildung 4.16.a-c).

In den Kontrollgruppen fand keine Veränderung im Vergleich zum früheren Zeitpunkt statt. Die unbehandelte Gruppe zeigte weiterhin eine durchweg regelhafte Struktur der Muskulatur, die nur mit dem sActRIIB behandelten Tiere wiesen ein erweitertes Tubulussystem auf, ansonsten war die Struktur unverändert (Abbildung 4.16.d-e).



Abbildung 4.15: Zeitpunkt 37 d - Therapie mit Cisplatin führt zu strukturellen Veränderungen der quergestreiften Muskulatur. (a-c) Cisplatin-Therapie. Auffälligkeiten sind eine veränderte Querstreifung (a-c), hypertrophe Mitochondrien mit Lipideinschlüssen (blaue Pfeile, a,c), ein erweitertes Tubulussystem (rote Pfeilspitze, a-c). (b) Unauffällige neuromuskuläre Endplatte (Stern). (d) Kontrollgruppe PBS. (e) PBS + sActRIIB mit erweitertem Tubulussystem (rote Pfeilspitze).



Abbildung 4.16: **Zeitpunkt 120 d - Teilweise Erholung der strukturellen Veränderungen unter Cisplatin-Therapie.** (a-c) Cisplatin-Therapie. Regelhafte Querstreifung bei erweitertem Tubulussystem. Unauffällige Mitochondrien und Zellkerne. (d) Kontrollgruppe PBS. (e) PBS + sActRIIB.

4.3.2.3 Struktur der Skelettmuskulatur bei simultaner sActRIIB-Behandlung neben einer Cisplatin-Therapie

Es wurde die Struktur der Muskulatur von Mäusen untersucht, die simultan zur Applikation von Cisplatin den sActRIIB erhalten haben. Zum Zeitpunkt 37 d zeigte sich, im Vergleich zu den nur mit Cisplatin behandelten Tieren, eine deutlich besser erhaltene Struktur (Abbildung 4.17.a-c). Die Querstreifung der Muskulatur war größtenteils regelhaft, alle Banden waren sichtbar und wiesen eine normale Breite auf. Insbesondere die Z-Banden waren scharf abgrenzbar, was im Kontrast zur diffusen Verbreiterung in der Cisplatin-Gruppe steht. Allerdings unterschieden sich benachbarte Sarkomere teils in ihrer Länge und ergaben so ein ungleichmäßiges Gesamtbild (Abbildung 4.17.b). Die Mitochondrien innerhalb der Muskelfaser und submembranös waren in ihrer Größe und

Verteilung unauffällig, es waren keine Lipideinlagerungen erkennbar (Abbildung 4.17.c). Das Tubulussystem schien auch in dieser Gruppe leicht erweitert. Abgesehen davon wiesen die Tiere keine weiteren Auffälligkeiten auf. Die Zellkerne hatten eine regelhafte Morphologie und Lage. Es gab keine vermehrte Kollagenbildung. Zum Zeitpunkt 120 d zeigte sich auch in dieser Gruppe ein Erholungseffekt der Tiere mit nun unauffälliger Querstreifung. Wie bei den nur mit Cisplatin behandelten Tieren war das Tubulussystem weiterhin etwas erweitert (Abbildung 4.17.d-f).



Abbildung 4.17: **Erhaltene Struktur der Skelettmuskulatur bei simultaner Gabe von Cisplatin + sActRIB.** (a-c) Zeitpunkt 37 d. (a) Unauffällige Querstreifung und Mitochondrien bei erweitertem Tubulussystem. (b) Unterschiedliche lange Sarkomere. (c) Unauffällige submembranöse Mitochondrien. (d-f) Zeitpunkt 120 d, unauffällige Querstreifung und Mitochondrien bei erweitertem Tubulussystem.

4.4 Nebenwirkungen des sActRIIB – Spermatozoen bei den Duchenne Muskeldystrophie Mausmodellen mdx und D2-mdx

Im Folgenden werden die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung dargestellt, die an den Duchenne Muskeldystrophie Mauslinien mdx und D2-mdx erfolgt sind. Ziel der Untersuchung war es, mögliche Nebenwirkungen des sActRIIB zu dokumentieren. In dieser Arbeit wurde eine Untersuchung der Spermatozoen durchgeführt. Beschrieben wird der Phänotyp der Spermatozoen bei PBS-behandelten (Kontrollgruppe) im Vergleich zu sActRIIB-behandelten Mäusen der mdx und D2-mdx-Mauslinien.

4.4.1 Struktur der Spermatozoen von mdx und D2-mdx-Mäusen bei Behandlung mit PBS (Kontrollgruppe)

Bei Behandlung mit PBS zeigte sich im mdx und D2-mdx-Mausmodell eine regelhafte Ultrastruktur der Spermatozoen (Abbildung 4.18). Sie wiesen normal konfigurierte Köpfe mit einem länglichen Zellkern und der aufgelagerten Akrosomenplatte, Mittelstücke mit der typischen Mitochondrienmanschette und Schwänze mit einem konzentrisch angeordneten Mikrotubuli-Fasersystem im Sinne des Axonem auf. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen.



Abbildung 4.18: **Normale Ultrastruktur der Spermatozoen nach PBS-Behandlung**. (a) Spermatozoen der mdx-Mauslinie. Normale Ultrastruktur mit länglichen Zellkernen und Akrosomenplatte (Stern), Mittelstücken mit Mitochondrienmanschette (Längschnitt roter Pfeil, Querschnitt blauer Pfeil) und Schwänzen (Pfeilspitze). (b) Spermatozoen der D2-mdx-Mauslinie. Normale Ultrastruktur (gleiche Beschriftung).

4.4.2 Struktur der Spermatozoen von mdx und D2-mdx-Mäusen bei Behandlung mit dem sActRIIB

Nach Behandlung der mdx-Mäuse mit dem sActRIIB zeigten sich nur noch wenige regulär konfigurierte Spermatozoen (Abbildung 4.19.a). Neben diesen fanden sich vermehrt Zelltrümmer (Abbildung 4.19.b) und es traten zahlreiche irregulär ausgereifte Spermatozoen auf. Einige Spermatozoen wiesen eine rundliche oder unregelmäßige Konfiguration mit viel Zytoplasma auf

(Abbildung 4.19.b-d). Andere zeigten eine irreguläre Zellkern-Morphologie (Abbildung 4.19.c-d). Außerdem fanden sich vermehrt unorganisierte Zellorganellen wie Mikrotubuli und Mitochondrien, die nicht Teil des konzentrisch angeordneten Axonem bzw. der normalen Mitochondrienmanschette waren. Teils lagen verdoppelte Zellorganellen vor (Abbildung 4.19.b-d).

Die Spermatozoen der mit dem sActRIIB behandelten D2-mdx-Mäuse zeigten einen vergleichbaren Phänotyp. Auch hier waren nur sehr wenige normal konfigurierte Spermatozoen vorhanden (Abbildung 4.20.a). Stattdessen fanden sich vermehrt Zelltrümmer (nicht abgebildet) und veränderte Spermatozoen mit runder bzw. pleomorpher Konfiguration und viel Zytoplasma und einer irregulären Morphologie des Zellkerns sowie anderer Zellorganellen wie der Mikrotubuli und Mitochondrien (Abbildung 4.20.a-d).



Abbildung 4.19: **Spermatozoen des mdx-Mausmodells nach Behandlung mit dem sActRIIB.** (a) Wenige normale Spermatozoen mit länglichen Köpfen (Stern), Mittelstücken (roter Pfeil) und Schwänzen (blaue Pfeilspitze). (b) Zahlreiche Zelltrümmer (rote Pfeilspitze). (b-c) Rundliche Spermatozoen mit viel Zytoplasma (rote Pfeile). (c-d) Malformierte Zellkerne (Stern), unorganisierte (rote Pfeilspitze) und doppelte (blaue Pfeile) Zellorganellen.



Abbildung 4.20: **Spermatozoen des D2-mdx-Mausmodells nach Behandlung mit dem sActRIIB.** Runde (b) bzw. pleomorphe Zellen (a,c,d) mit viel Zytoplasma, deformierten Zellkernen (Stern), unorganisierten (rote Pfeilspitze) und doppelten (blaue Pfeile) Zellorganellen.

5. Diskussion

5.1 sActRIIB und eine Kalorien-reduzierte Diät als Therapieoptionen für die Auswirkungen von Alterungsprozessen

Die Alterung ist ein Hauptrisikofaktor für neoplastische, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, die die Lebensqualität beeinflussen und die Mortalität erhöhen (Niccoli und Partridge 2012). Der altersbedingte Verlust von Masse und Funktion der Skelettmuskulatur ist die Sarkopenie (Laurent et al. 2019). Sie hat eine hohe Komorbidität mit altersassoziierten Erkrankungen (Pacifico et al. 2020) und ist ein prognostischer Faktor für die Mortalität (Srikanthan und Karlamangla 2014). Alterungsprozesse führen auch zu strukturellen Veränderungen der Niere, wodurch sich die Nierenfunktion verschlechtert (Hommos et al. 2017). Die Podozyten haben eine besondere Bedeutung für die Nierenfunktion. Ihre Fußfortsätze sind Teil der glomerulären Filtrationsbarriere, die essenziell für die Nierenfunktion ist. Werden sie geschädigt, kommt es zum FPE, was die Funktion der Filtrationsbarriere beeinträchtigt (Garg 2018). Alters-assoziierte Schäden an den Podozyten oder der Verlust von Podozyten beeinflussen andere Zelltypen negativ und resultieren langfristig in einer Glomerulosklerose (Wiggins 2012). Demnach ist die Erhaltung der Podozyten und ihrer Fußfortsätze von besonderer Bedeutung in der Prävention alters-assoziierter Nierenschäden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Alterungsprozesse anhand des Progerie-Mausmodells Ercc1^{Δ/-} untersucht, das bereits früh Alterungsschäden in verschiedenen Organen aufweist und eine deutlich reduzierte Lebenserwartung hat (Dollé et al. 2011). Dabei wurden erstmalig die ultrastrukturellen Veränderungen der Skelettmuskulatur und Niere durch eine Kalorien-reduzierte Diät beschrieben. Zudem wurde der Einfluss eines kombinierten Therapieregimes bestehend aus der Gabe des sActRIIB und einer Kalorien-reduzierten Diät auf Alterungsprozesse in Niere und Skelettmuskulatur getestet.

In der Skelettmuskulatur fanden sich im Einklang mit den Untersuchungen von Alyodawi et al. (2019) starke Veränderungen der Sarkomerstruktur bei den $\text{Ercc1}^{\Delta/-}$ Mäusen, die durch die Gabe des sActRIIB größtenteils verhindert wurden. Die Therapiekombination mit einer Kalorien-reduzierten Diät zeigte ähnliche Ergebnisse. Außerdem wurden erstmalig Veränderungen der neuromuskulären Endplatte in den $\text{Ercc1}^{\Delta/-}$ Mäusen beschrieben. Nur bei der Kombinationstherapie war deren normale Struktur erhalten. In der Studie von Alyodawi et. al verbesserte der sActRIIB auch die Muskelmasse und -kraft signifikant. Das deutet darauf hin, dass die ultrastrukturellen Verbesserungen auf Funktion der Muskulatur übertragbar sind. In einer vorherigen Studie zur Kalorien-reduzierten Diät bei $\text{Ercc1}^{\Delta/-}$ Mäusen wurden weniger neurologische Symptome und eine erhöhte Anzahl von Motoneuronen nachgewiesen, jedoch kein Effekt auf die Muskelkraft festgestellt (Vermeij et al. 2016). Dies passt dazu, dass die Ultrastruktur der Muskulatur insgesamt sowie der neuromuskulären

Endplatte durch eine Kalorien-reduzierte Diät allein nicht wesentlich verbessert wurden. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht, dass in mehreren Tierstudien zu Alterungsprozessen, beispielsweise bei Rhesusaffen, die Muskelmasse und -kraft durch eine Kalorien-reduzierte Diät erhöht wurde (Colman et al. 2008, Yamada et al. 2018).

In der Niere zeigte sich wie in den Untersuchungen von Alyodawi et. al ein starkes FPE bei den Ercc1^{$\Delta/-$} Mäusen, welches durch die Gabe des sActRIIB signifikant reduziert wurde. Interessanterweise hatten die Kalorien-reduzierte Diät allein und die Kombinationstherapie den gleichen Effekt. Vermeij et al. (2016) beschrieben in ihrem Paper zur Wirkung einer Kalorien-reduzierten Diät auf das Ercc1^{$\Delta/-$} Mausmodell in der Niere histologisch nur tubuläre Veränderungen in Form von vermehrter Degeneration und Anisokaryose, die durch eine Kalorien-reduzierte Diät nicht verbessert wurden. Diese Veränderungen waren elektronenmikroskopisch in der vorliegenden Arbeit nicht reproduzierbar. In einer anderen Studie wurde in älteren Ratten festgestellt, dass die Kalorien-reduzierte Diät den altersbedingten Verlust und die Hypertrophie der Podozyten verhindert (Wiggins 2012). Das passt zur Reduktion des FPE in der vorliegenden Arbeit.

Vergleicht man die Effekte der einzelnen Interventionen in beiden Organen, so fällt ein Unterschied auf. Im Muskel ergaben sich durch den sActRIIB und die Kalorien-reduzierte Diät synergistische Effekte, die Einzelinterventionen führten nicht zu einer kompletten Aufhebung der Veränderungen. In der Niere bewirkten beide Interventionen bereits einzeln eine starke Reduktion des FPE, ohne deutliche additive Effekte durch die Kombination.

5.2 sActRIIB als Therapieoption bei Sichelzellanämie

Die Sichelzellanämie (SCD) ist eine schwerwiegende Systemerkrankung, die neben einer chronischhämolytischen Anämie auch zu Organinfarkten und langfristigen Organkomplikationen führt (Herold 2022). Trotz der hohen Morbidität sind die Therapieoptionen begrenzt. Neben der Standardtherapie mit Hydroxycarbamid wurden bisher zwei neue Therapeutika zugelassen, deren langfristige Effekte noch unklar sind (EMA 2022, EMA 2020). Der sActRIIB Luspatercept reduzierte signifikant die Transfusionshäufigkeit in den Zulassungsstudien für die β-Thalassämie und die Myelodysplastischen Neoplasien (MDS) (Fenaux et al. 2020, Cappellini et al. 2020). Im Kontext der SCD wurde der sActRIIB bisher noch nicht eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines knock-in Mausmodells der SCD der sActRIIB erstmals als Therapieoption getestet und die Ultrastruktur der Niere und der Skelettmuskulatur untersucht. In der Niere der HbS-Mäuse gab es Zeichen einer tubulären Degeneration in verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems und massive Kollageneinlagerungen, die auf eine Fibrosierung hindeuteten. Dies stimmt teilweise mit den Untersuchungen von Kasztan et al. (2019) überein, die einen Verlust des Bürstensaums in den proximalen Tubuli, eine vermehrte interstitielle

Fibrose und erhöhte Marker für eine Schädigung der proximalen Tubuli feststellten. Zusätzlich dazu beschrieben sie glomeruläre Schädigungen, jedoch nur in männlichen Mäusen und in sehr unterschiedlichem Ausmaß. In der vorliegenden Arbeit gab es keine Hinweise auf eine Glomerulosklerose oder sonstige Veränderungen in den Glomeruli. Bei Therapie mit dem sActRIIB war das Tubulussystem vollständig intakt mit geringfügigen Kollageneinlagerungen. Die Skelettmuskulatur der HbS-Mäuse hatte zahlreiche Auffälligkeiten, beispielsweise eine irreguläre Sarkomerstruktur, ein erweitertes Tubulussystem, eine veränderte Anordnung der Mitochondrien sowie auch Kollageneinlagerungen. Hiermit wurde erstmalig die Ultrastruktur der Skelettmuskulatur von HbS-Mäusen untersucht, die Ergebnisse passen jedoch zu der bekannten reduzierten Muskelkraft von HbS-Mäusen (Chatel et al. 2018), die im Laufe der ersten Lebensmonate weiter abnimmt (Michel et al. 2023). Bei Therapie mit dem sActRIIB waren bis auf eine leichte Erweiterung des Tubulussystems keine Auffälligkeiten vorhanden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten auf einen positiven Einfluss des sActRIIB auf die SCD hin, zumindest auf die Ultrastruktur von Niere und Muskulatur. Zur weiteren Einordnung ist die Untersuchung weiterer Organe, wie beispielsweise der oft betroffenen Milz, notwendig. Außerdem bedarf es weiterer Untersuchungen an den Mäusen zur Erfassung des Gesamtzustandes (durchgeführt im Partnerlabor von Dr. Pierre-Louis Tharaux, Manuskript in Bearbeitung).

Der Mechanismus, über den der sActRIIB im Rahmen einer SCD wirken könnte, ist noch unklar. Es ist bekannt, dass Aktivin A und andere Mitglieder der TGFβ-Proteinfamilie die Erythropoese beeinflussen (Bataller et al. 2019). Voskaridou et al. (2019) stellten bei der Thalassämie Major und der kombiniert heterozygoten Sichelzellanämie mit β-Thalassämie signifikant erhöhte Aktivin A Werte und eine negative Korrelation zwischen der Höhe des Aktivin A und dem Hämoglobin-Wert fest, was auf eine inhibitorische Wirkung von Aktivin A auf die Erythropoese hindeutet. Allerdings wurde bei den Patient*innen mit einer SCD kein signifikanter Effekt beobachtet, was jedoch das Resultat der kleinen Versuchsgruppe sein könnte. Interessanterweise ist bei dem bereits zugelassenen Luspatercept die Bindung von Aktivin A und den knochenmorphogenetischen Proteinen (BMPs) unterdrückt (Fenaux et al. 2020), daher kann der positive Einfluss auf die Erythropoese nicht ausschließlich über eine Hemmung dieser Liganden zustande kommen. Die Bedeutung von Myostatin für die Erythropoese ist weitestgehend ungeklärt. Myostatin wird in humanen Granulozyten und Lymphozyten exprimiert, aber nicht in Erythrozyten (Fernández-Nocelo et al. 2019). Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass Myostatin die Erythropoese beeinflussen könnte. Myostatin förderte die Differenzierung von K562-Zellen (Fernández-Nocelo et al. 2019). K562 ist eine humane Zelllinie der chronischen myeloischen Leukämie, die u. a. zu Erythrozyten ausdifferenzieren kann (Duncan et al. 2016). Außerdem wurde in Erythrozyten von Rindern sowohl Myostatin als auch der ActRII nachgewiesen. Ein Myostatin-Knockout reduzierte den oxidativen Stress in den Erythrozyten (Zhu et al. 2022). Dies deutet darauf hin, dass Myostatin auch ausgereifte Erythrozyten beeinflussen könnte. Dennoch verbleibt der Mechanismus der positiven Wirkung des sActRIIB auf Anämien wie die SCD unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3 sActRIIB als supportive Therapie gegen die unerwünschten Wirkungen von Cisplatin

Cisplatin wird als Zytostatikum für zahlreiche Neoplasien eingesetzt (Ribosepharm 2018), daher hat die Prävention seiner unerwünschten Wirkungen eine besondere Bedeutung. Cisplatin löst bei bis zu 1/3 der Patient*innen ein akutes Nierenversagen aus (Ribosepharm 2018). Die Nephrotoxizität ist ein häufiger dosis-limitierender Faktor und erhöht die Mortalität (Chawla et al. 2014). Cisplatin führt auch zu Muskelkrämpfen, Myalgien und einem durch Muskelatrophie bedingten Gewichtsverlust (Ribosepharm 2018, Chen et al. 2015b). Eine niedrige Skelettmuskelmasse wiederum ist assoziiert mit einem höheren Risiko für eine dosis-limitierende Toxizität von Zytostatika (Chargi et al. 2022). In der vorliegenden Arbeit wurde die Ultrastruktur der Niere und der Skelettmuskulatur von Mäusen untersucht, die Cisplatin erhielten. Außerdem wurde der sActRIIB als Therapieoption für die unerwünschten Wirkungen eingesetzt. Beurteilt wurden jeweils die Zeitpunkte 37 d und 120 d, wobei die Cisplatin-Therapie nur bis zum ersten Zeitpunkt durchgeführt wurde, sodass der spätere Zeitpunkt längerfristige Auswirkungen abbildet.

In der Niere fiel zum Zeitpunkt 37 d ein vermehrter Zelltod vor allem in den proximalen Tubuli auf, der in einer kompletten Degeneration resultierte. Demnach führte die Gabe von Cisplatin zu irreversiblen Schädigungen des Tubulussystems. Die Glomeruli waren zu keinem Zeitpunkt verändert, sie scheinen also nicht an der nephrotoxischen Wirkung von Cisplatin beteiligt zu sein. Laut den bisherigen Erkenntnissen gelangt Cisplatin in der Niere über verschiedene Transportmechanismen vor allem in den proximalen, aber auch in den distalen Tubulus (Perše und Večerić-Haler 2018). Die Konzentration der Schädigungen auf den proximalen Tubulus passt dazu, allerdings wurden nur in sehr geringem Ausmaß Schädigungen an distalen Tubuli festgestellt. Bei zusätzlicher Gabe des sActRIIB wirkte das Tubulussystem der Niere regelhaft, es trat kein vermehrter Zelltod auf. Demnach wurde erstmals ein positiver Effekt des sActRIIB auf die nephrotoxischen Wirkungen von Cisplatin nachgewiesen. Zur Einordnung sind weitere Versuche zur Bestimmung der Nierenfunktion und des Einflusses auf den Gesamtorganismus notwendig. Da bisher keine gezielten nephroprotektiven Maßnahmen bei der Therapie mit Cisplatin etabliert sind, hätte die Entdeckung eines Wirkstoffs, der die Nephrotoxizität abmildert, eine hohe klinische Bedeutung.

In der Skelettmuskulatur führte die Cisplatin-Gabe zum Zeitpunkt 37 d zu starken Veränderungen der Sarkomerstruktur, hypertrophen Mitochondrien mit Lipideinschlüssen und einem erweiterten Tubulussystem. Besonders auffällig war, dass nicht alle Abschnitte betroffen waren und teils

benachbarte Faserabschnitte eine sehr unterschiedliche Ausprägung der Schädigungen aufwiesen. Es ist bekannt, dass Cisplatin zu einer Muskelatrophie führen kann (Chen et al. 2015b), allerdings wurden die histologischen Veränderungen durch Cisplatin bisher nicht untersucht und der genaue Mechanismus der Toxizität ist unklar. Darum lässt sich das Schädigungsmuster aus den bisherigen Erkenntnissen nicht erklären. In der Versuchsgruppe, die zusätzlich den sActRIIB erhielt, war zum Zeitpunkt 37 d die Sarkomerstruktur deutlich besser erhalten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Nissinen et al. (2016) und Barreto et al. (2017), die in Mausmodellen mit anderen Zytostatika eine positive Wirkung des sActRIIB u. a. auf das Körpergewicht und die Muskelmasse feststellten. Im Kontext von Cisplatin wurde bisher nur Bimagrumab eingesetzt, um der durch die Neoplasie und das Zytostatikum induzierten Kachexie entgegenzuwirken. Es resultierte ein signifikant geringerer Gewichtsverlust und eine Tendenz zu einem reduzierten Verlust an Muskelmasse (Hatakeyama et al. 2016). Die vorliegende Arbeit dokumentiert nun auch ultrastrukturelle Verbesserungen der Skelettmuskulatur durch den sActRIIB im Rahmen der kurzfristigen Cisplatin-Therapie. Interessanterweise lag zum Zeitpunkt 120 d sowohl bei der alleinigen Cisplatin-Gabe als auch bei Kombination mit dem sActRIIB eine regelhafte Ultrastruktur mit einer gut erkennbaren Querstreifung und unauffälligen Mitochondrien vor. Lediglich das Tubulussystem war in beiden Versuchsgruppen noch leicht erweitert. Das deutet darauf hin, dass die Skelettmuskulatur im Gegensatz zur Niere das Potenzial haben könnte, sich nach einer Cisplatin-Therapie selbst zu regenerieren. Zukünftig sollte dies in präklinischen Versuchen mit Tumormausmodellen verifiziert werden und auch in klinischen Studien zu den Langzeiteffekten von Cisplatin der Verlauf der Muskelmasse und -funktion untersucht werden.

Zum Zeitpunkt 120 d wurde also keine Wirkung des sActRIIB auf die Ultrastruktur der Muskulatur bei Cisplatin-Gabe festgestellt. Betrachtet man den deutlichen Effekt zum früheren Zeitpunkt und die positive Wirkung auf die Niere, so stellt der sActRIIB dennoch einen vielversprechenden Ansatz zur Reduktion unerwünschter Wirkungen von Cisplatin dar.

5.4 Potenzielle unerwünschte Wirkungen des sActRIIB

Der sActRIIB bindet nicht nur Myostatin, sondern auch die Aktivine A, B und AB sowie die BMPs 9, 10 und 11 (Souza et al. 2008). Die verschiedenen Liganden bedingen unterschiedliche Nebenwirkungspotenziale. In der Phase-2-Studie zur Duchenne Muskeldystrophie traten hämatologische Nebenwirkungen in Form von Nasenbluten, Zahnfleischbluten, Teleangiektasien und Erythemen auf (Campbell et al. 2017). In den Zulassungsstudien mit Luspatercept, einem modifizierten sActRIIB mit stark reduzierter Affinität zu Aktivinen und BMPs, gab es keine hämatologischen Veränderungen. Häufige, eher unspezifische Nebenwirkungen waren Knochenschmerzen und Arthralgien, Schwindel und Übelkeit und Diarrhoen (Fenaux et al. 2020). In einer Maus-Studie verursachte der sActRIIB zudem eine

Gewichtszunahme von Pankreas und Milz und eine eingeschränkte Glukose-Toleranz, jedoch ohne Veränderung der Serumwerte von Insulin, Glukagon und den Kortikosteroiden (Latres et al. 2017).

Aktivin A beeinflusst auch den reproduktiven Trakt, u. a. in dem es die Hypophyse zur Synthese und Sekretion des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) anregt (Bloise et al. 2019). Aktivine fördern zudem die postnatale Entwicklung des Hodens bei Mäusen. Sie stimulieren die frühe postnatale Sertoli-Zell-Entwicklung sowie die Reifung der Spermatogonien im juvenilen Alter (Buzzard et al. 2003, Mithraprabhu et al. 2010). Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Ultrastruktur der Spermatozoen von Mäusen untersucht, die den sActRIIB erhielten.

Nach Behandlung mit dem sActRIIB gab es nur wenige regulär geformte Spermatozoen, daneben viel Zellschrott und Spermatozoen mit ultrastrukturellen Anomalien. Dazu zählten eine irreguläre Zellkern-Morphologie, doppelte oder unorganisierte Zellorganellen sowie zu viel Zytoplasma und eine pleomorphe Zellkonfiguration. Die Ergebnisse passen zu weiteren Untersuchungen an den Mäusen, die ein signifikant reduziertes Hodengewicht sowie eine signifikant reduzierte Spermienkonzentration und -motilität ergaben (Vaughan et al. 2020a). Insgesamt deuten sie auf eine möglicherweise eingeschränkte Fertilität der männlichen Mäuse hin.

Auch bei Frauen beeinflusst Aktivin A das reproduktive System. Aktivin A reguliert sowohl die fetale Entwicklung der Ovarien als auch die Follikelreifung und die Umwandlungsprozesse des Endometriums im weiteren Leben (Bloise et al. 2019). Sowohl die Gabe des sActRIIB als auch des ActRII-Antikörpers Bimagrumab führte bei postmenopausalen Frauen zu einer Reduktion des FSH-Spiegels ohne Veränderung der Östrogen- und Androgen-Spiegel (Attie et al. 2013, Garito et al. 2018). Demnach ist die fehlende Untersuchung von weiblichen Mäusen eine Limitierung der vorliegenden Arbeit. Zukünftig wären Langzeitstudien mit dem sActRIIB auch an weiblichen Mäusen im Hinblick auf Wirkungen auf den reproduktiven Trakt notwendig. Eine weitere Limitierung ist die kurze Studiendauer. Die Mäuse erhielten den sActRIIB bis zum Alter von 56 Tagen und wurden an Tag 69 getötet. Erkenntnisse über die Langzeit-Auswirkungen des sActRIIB sind hieraus nicht möglich. In einer Folgestudie fanden Vaughan et al. (2021) auch im Alter von 120 Tagen, etwa 80 Tage nach Beendigung der Therapie noch ähnliche ultrastrukturelle Veränderungen, ein weiterhin geringes Hodengewicht und eine verringerte Spermatozoenzahl. Zusammen mit der zu diesem Zeitpunkt stark veränderten Genexpression deutet dies darauf hin, dass die Wirkungen des sActRIIB auf den reproduktiven Trakt längerfristig andauern könnten. Im Rahmen von Muskelverlust-Erkrankungen und chronischen Anämien wäre jedoch eine längerfristige oder dauerhafte Therapie notwendig. Daher sollten bei zukünftigen Studien mit dem sActRIIB und in der Phase-4-Studie mit Luspatercept die Auswirkungen auf den reproduktiven Trakt besonders beachtet werden.

Um die möglichen Nebenwirkungen des sActRIIB einzugrenzen, schlagen Vaughan et al. (2020a) drei Optionen vor. Erstens eine geringere Dosierung. In den präklinischen Studien mit dem sActRIIB werde zum Wirkungsnachweis eine schnelle Zunahme der Muskulatur angestrebt. Im klinischen Szenario eines Muskelverlustes sei das Therapieziel eher die Erhaltung des Ist-Zustandes. Für diesen Endpunkt könnten geringere Dosen ausreichend sein. Zweitens eine zielgerichtete Therapie, bei der die Liganden des ActRIIB nur im Körperkreislauf, also intravasal, neutralisiert werden (Vaughan et al. 2020a). Rodino-Klapac et al. (2009) entwickelten eine Gentherapie mit einem Follistatin-Derivat, das zirkulierendes Aktivin und Myostatin hemmt, aber keine direkte Wirkung in Geweben hat. In WT und mdx-Mäusen sowie nicht-humanen Primaten steigerte dies die Muskelmasse und -kraft ohne erkennbare Nebenwirkungen auf das reproduktive System. Eine solche Modifikation wäre auch für den sActRIIB denkbar, im Optimalfall mit einer noch spezifischeren Wirkung an der Muskulatur. Drittens das Targeting von jeweils nur Aktivin A oder Myostatin (Vaughan et al. 2020a). Es ist bekannt, dass Aktivin A zahlreiche Organsysteme im Körper beeinflusst und daher ein hohes Nebenwirkungspotenzial hat (Bloise et al. 2019). BMP 9 und 10, ebenfalls Liganden des sActRIIB, regulieren die Angiogenese (David et al. 2007) und werden für die oben genannten Nebenwirkungen in der klinischen Studie zur Behandlung der Duchenne Muskeldystrophie verantwortlich gemacht (Campbell et al. 2017). Da Myostatin am spezifischsten in der Muskulatur exprimiert wird, hat es das geringste Nebenwirkungspotenzial und kommt daher am ehesten als alleiniges Target in Betracht (Suh und Lee 2020).

5.5. Ausblick: Potenziale und Limitationen des sActRIIB und Spekulation über seinen Wirkmechanismus

Der sActRIIB hat ein großes Potenzial für den klinischen Einsatz. Bereits zugelassen und klinisch eingesetzt wird er im Bereich hämatologischer Erkrankungen für das MDS und die β -Thalassämie (EMA 2021). Eine klinische Studie zur Duchenne Muskeldystrophie wurde wegen unerwünschten Wirkungen vorzeitig abgebrochen (Campbell et al. 2017). Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die ultrastrukturellen Veränderungen in der Niere und der Skelettmuskulatur durch den sActRIIB und hat neue therapeutische Potenziale aufgezeigt. Im Progerie-Mausmodell Ercc1^{Δ/-} wurden die ausgeprägten ultrastrukturellen Veränderungen in Niere und Muskulatur durch den sActRIIB allein und synergistisch mit der Kalorien-reduzierten Diät verringert. Dieses Modell eines beschleunigten Alterungsprozesses hat eine außerordentliche Relevanz, da es den Prozess der natürlichen Alterung abbildet, der ein Hauptrisikofaktor für zahlreiche Erkrankungen und eine erhöhte Mortalität ist (Pacifico et al. 2020, Srikanthan und Karlamangla 2014). Im Mausmodell der SCD verhinderte der sActRIIB in der Niere die tubuläre Degeneration und normalisierte in der Muskulatur die stark veränderte Sarkomerstruktur. Damit stellt der sActRIIB eine Therapieoption für eine weitere chronische Anämieform dar. Das Cisplatin-Mausmodell bildete keine vorbestehende Erkrankung ab, sondern ein häufig verabreichtes Therapeutikum mit ausgeprägten unerwünschten Wirkungen. Diese treffen durch die Indikationsstellung im Rahmen neoplastischer Erkrankungen auf einen oft bereits geschwächten Organismus und können zu Therapielimitierungen führen. In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell eine Reduktion der tubulären Degeneration in der Niere festgestellt. Da bei bis zu 1/3 der Patient*innen unter Cisplatin eine akute Niereninsuffizienz auftritt (Ribosepharm 2018), hat dies eine hohe klinische Relevanz. Außerdem zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung der Ultrastruktur der Skelettmuskulatur, zumindest was den kurzfristigen Untersuchungszeitpunkt betraf. Demnach könnte die Behandlung mit dem sActRIIB möglicherweise präventiv eingesetzt werden, um die unerwünschten Wirkungen von Cisplatin abzumildern.

Wie jeder Wirkstoff hat der sActRIIB auch potenzielle unerwünschte Wirkungen. In den Zulassungsstudien für Luspatercept traten vor allem leichte Nebenwirkungen auf wie Ermüdung, Diarrhöen, Schwindel, Knochen- oder Gelenkschmerzen (Cappellini et al. 2020, Fenaux et al. 2020). Eine Studie zur Duchenne Muskeldystrophie wurde wegen hämatologischer Nebenwirkungen abgebrochen (Campbell et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden die möglichen Wirkungen auf das reproduktive System untersucht. Bisher berichtete nur eine klinische Studie nach Gabe des sActRIIB über eine Reduktion des FSH-Spiegels (Attie et al. 2013), in Maus-Versuchen wurde eine Abnahme des Hodenvolumens, der Spermatozoenzahl und deren Mobilität nachgewiesen (Vaughan et al. 2021, Vaughan et al. 2020a, Vaughan et al. 2020b). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung ergab bei Therapie mit dem sActRIIB nur wenige regelhafte Spermatozoen, dafür zahlreiche Zelltrümmer und Spermatozoen mit ultrastrukturellen Anomalien. Diese Erkenntnisse sollten im Rahmen der weiteren präklinischen und klinischen Studien mit dem sActRIIB dringend beachtet und die langfristigen Auswirkungen auf den reproduktiven Trakt untersucht werden. Sollten Fertilitätseinschränkungen nachgewiesen werden, so könnte dies für das jüngere Patient*innenkollektiv eine (relative) Kontraindikation darstellen.

Der sActRIIB hat also therapeutische Potenziale in verschiedenen Krankheitsmodellen, in denen er jeweils zu ultrastrukturellen Verbesserungen der Niere und der Skelettmuskulatur führt. Der genaue Wirkmechanismus und die Angriffspunkte des sActRIIB sind aber noch nicht eindeutig geklärt. Seine Wirkung basiert auf dem Signalweg des ActRIIB und seinen Liganden, vor allem Myostatin und Aktivin A. Dieser Signalweg induziert über verschiedene Mechanismen eine Inhibition der Proteinsynthese und Förderung der Proteolyse. Daraus resultiert ein Muskelverlust (Han et al. 2013). Bei einer chronischen Niereninsuffizienz wird vermehrt Aktivin A gebildet und zusätzlich Myostatin akkumuliert, was ebenfalls einen Muskelverlust herbeiführen oder verstärken kann. Zudem korrelieren sowohl Aktivin A als auch Myostatin negativ mit der glomerulären Filtrationsrate (Solagna et al. 2021, Bataille et al. 2022). Der sActRIIB bindet die Liganden des ActRIIB und hemmt dadurch den Signalweg (Relizani et al. 2014). Welche Zelltypen der Niere den ActRIIB exprimieren und damit die direkten Zielzellen des sActRIIB sind, ist bislang unklar. In der Niere kam es zum

einen zu einer deutlichen Reduktion des FPE durch den sActRIIB. Dies lässt eine direkte Wirkung auf den Podozyten vermuten, am ehesten auf das aus dem Protein Aktin bestehende Zytoskelett der Fußfortsätze (Garg 2018), alternativ wäre aber auch eine indirekte Wirkung über andere Zellen des Glomerulums denkbar, die den ActRIIB exprimieren (Solagna et al. 2021). Zum anderen wurden auch morphologische Veränderungen des renalen Tubulussystems deutlich abgemildert. Demnach ist die Wirkungsweise des sActRIIB nicht auf die Glomeruli begrenzt. Auch im Muskel liegt anscheinend ein multifaktorielles Geschehen vor, da je nach Krankheitsmodell sowohl die Sarkomerstruktur als auch die Mitochondrienverteilung und die Struktur der neuromuskulären Endplatte durch den sActRIIB beeinflusst wurden. Solagna et al. (2021) beschrieben anhand eines Mausmodells der chronischen Niereninsuffizienz außerdem erstmals eine direkte Interaktion zwischen der Niere und der Muskulatur, die durch verschiedene lösliche Faktoren im Blut, darunter auch Aktivin A, vermittelt wird. Dies legt nahe, dass der sActRIIB auch in organübergreifende Interaktionen eingreifen könnte. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu überprüfen, ob diese Interaktionen auch im Kontext der Alterung sowie Schädigungen durch die SCD und durch Zytostatika eine Bedeutung haben.

Zusammenfassend eröffnen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Wirkung des sActRIIB ein weites Forschungsfeld bezüglich verschiedener, neuer therapeutischer Potenziale. Sie zeigen aber auch die möglichen Limitationen durch Nebenwirkungen im Reproduktionstrakt auf. Zur Verbesserung möglicher zukünftiger klinischer Einsatzmöglichkeiten muss jedoch auch der genaue Wirkmechanismus des sActRIIB weiter untersucht werden, um gegebenenfalls durch zielgerichtete Modifikationen sein Nebenwirkungspotenzial zu reduzieren.

6. Zusammenfassung

Myostatin und Aktivin A regulieren den Proteinstoffwechsel und hemmen das Muskelwachstum. Die Depletion von Myostatin führt sowohl in einem Myostatin-Null-Mausmodell als auch bei einer Loss-of-function-Mutation im Menschen zu einer starken Muskelhypertrophie und Zunahme der Muskelkraft. Aktivin A beeinflusst zahlreiche weitere Organsysteme, darunter die Niere, das Nervensystem, das kardiovaskuläre System, den Gastrointestinaltrakt und das Reproduktionssystem. Der Myostatin/Aktivin-Signalweg beginnt mit der Bindung an den Aktivinrezeptor, am häufigsten den Aktivinrezeptor Typ IIB (ActRIIB). Der lösliche ActRIIB (sActRIIB) besteht aus der löslichen Form des ActRIIB gekoppelt an das Fc-Fragment von Maus-IgG. Er komplexiert und neutralisiert die Liganden des ActRIIB und hemmt somit die Wirkung von Aktivin A und Myostatin. In mehreren präklinischen Studien führte der sActRIIB zu einer Zunahme der Skelettmuskelmasse und -kraft und reduzierte funktionelle Beeinträchtigungen der Niere und anderer Organe. In der vorliegenden Arbeit wurde der sActRIIB in verschiedenen Mausmodellen der akuten und chronischen Nierenerkrankung sowie der Sarkopenie eingesetzt, um weitere Therapiepotenziale zu untersuchen. Beurteilt wurde dies anhand ultrastruktureller Veränderungen der Skelettmuskulatur und der Niere mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Im Progerie-Mausmodell $\text{Ercc1}^{\Delta-}$, das natürliche Alterungsprozesse abbildet, hatte der sActRIIB positive Effekte auf die Ultrastruktur der Niere und der Skelettmuskulatur. Bei Kombination der sActRIIB-Therapie mit einer Kalorien-reduzierten Diät, die bekannterweise das Auftreten und die Progression altersbezogener Erkrankungen verzögert und die Lebenserwartung im Tiermodell steigert, ergaben sich synergistische Effekte. Diese Ergebnisse zeigen eine starke Korrelation mit den bekannten funktionellen Verbesserungen in beiden Organen. Im knock-in Sichelzellmausmodell reduzierte der sActRIIB ebenfalls die tubulären Veränderungen in der Niere und die veränderte Ultrastruktur der Muskulatur. Überdies wurde der sActRIIB in Mäusen eingesetzt, die Cisplatin erhielten, ein häufig verwendetes Zytostatikum mit starken unerwünschten Wirkungen in der Niere. Die sActRIIB-Therapie führte zu einer Abmilderung der beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen in der Niere und der Skelettmuskulatur nach Cisplatin-Therapie. Darüber hinaus bestätigte die vorliegende Arbeit auf ultrastruktureller Ebene die vorbeschriebenen funktionellen Nebenwirkungen auf den männlichen reproduktiven Trakt. Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit neue therapeutische Potenziale des sActRIIB aufgezeigt, aber auch Limitationen durch mögliche Nebenwirkungen auf die männliche Fertilität. Weitere Untersuchungen zum molekularen Wirkmechanismus des sActRIIB sind notwendig, um mögliche Nebenwirkungen zu reduzieren und das volle therapeutische Potential der sActRIIB-Therapie auszuschöpfen.

Summary

Myostatin and activin A regulate protein metabolism and inhibit muscle growth. Depletion of myostatin leads to strong muscle hypertrophy and an increase in muscle strength both in myostatin null mice and in a loss-of-function mutation in humans. Activin A influences numerous other organ systems, including the kidney, the nervous system, the cardiovascular system, the gastrointestinal tract and the reproductive system. Myostatin and activin A bind to activin receptors, most commonly the activin type IIB receptor (ActRIIB). The soluble ActRIIB (sActRIIB) consists of the soluble form of ActRIIB fused with the Fc-fragment of mouse IgG. It binds and neutralises the ligands of ActRIIB and thus inhibits the effect of activin A and myostatin. In several preclinical studies, sActRIIB induced an increase in skeletal muscle mass and strength and attenuated functional impairments in the kidney and other organs. In the present study, sActRIIB was used in various mouse models for acute and chronic kidney disease as well as for sarcopenia to further investigate its therapeutic potential. This was assessed based on ultrastructural changes in the skeletal muscle and kidney using transmission electron microscopy. In the progeria mouse model $\text{Ercc1}^{\Delta/2}$, which depicts natural ageing processes, sActRIB had positive effects on the ultrastructure of the kidney and the skeletal muscle. The combination of sActRIIB treatment with calorie restriction, which is known to postpone the onset and progression of age-related diseases and to increase life expectancy in animal models, resulted in synergistic effects. These findings strongly correlate with the functional improvement found in both organs. In the sickle cell mouse model sActRIIB also attenuated the tubular changes in the kidney and the ultrastructure of the muscle. Finally, sActRIIB treatment of mice receiving cisplatin, a commonly used cytostatic drug with strong adverse effects in the kidney, attenuated the ultrastructural alterations observed in the skeletal muscles and in the kidney after cisplatin therapy. Moreover, at the ultrastructural level the present study could confirm functional side effects of sActRIIB on the male reproductive tract as described earlier. In summary, the present study has demonstrated new therapeutic potentials of sActRIIB, but also limitations due to possible side effects on male fertility. To reduce possible side effects and to harness the full therapeutic potential of the sActRIIB treatment future research is needed to better understand the molecular mechanism of sActRIIB signalling.

7. Abkürzungsverzeichnis

Δ/-	Ercc1 ^{Δ/-}
ActRIIA	ACVR2A (ein Typ 2 Aktivin Rezeptor)
ActRIIB	ACVR2B (ein Typ 2 Aktivin Rezeptor)
AKT	Proteinkinase B
ALK4	Activin Receptor-Like Kinase 4
AL	ad libitum (Nahrung und Wasser zu freier Verfügung)
BMPs	bone morphogenetic proteins (Knochenmorphogenetische Proteine)
bzw.	beziehungsweise
dH2O	deionisiertes Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EM	Elektronenmikroskopie
EMA	European Medicines Agency
EtOH	Ethanol
FoxO	forkhead box protein O
FP	foot processes (Fußfortsätze)
FPE	foot process effacement (Fußfortsatzverbreiterung)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
h	Stunden
HbA	Hämoglobin A
HbS	Hämoglobin S
HbS/beta-thal	kombiniert heterozygote SCD und β-Thalassämie
IP	intraperitoneal
KR	Kalorien-reduzierte Diät
М	molar
MDS	Myelodysplastische Neoplasien
mock	Ersatzpräparat
NaOH	Natronlauge
OCT 2	Organic Cation Transporter 2
PB	phosphat buffer (Phosphatpuffer)
PBS	phosphat buffered sodium (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd

PKD	polycystic kidney disease (Polyzystische Nierenerkrankung)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SCD	sickle cell disease (Sichelzellanämie)
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TI	Thalassämie intermedia
ТМ	Thalassämie major
TNF-α	Tumornekrosefaktor-a
u. a.	unter anderem
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aktivin-Myostatin-Signalkaskade im Muskel. (Quelle: Han et al. (2013))7
Abbildung 4.1: Keine Auswirkungen durch den sActRIIB und die KR auf die Glomeruli von WT-
Mäusen sichtbar
Abbildung 4.2: Phänotyp des Glomerulums bei Ercc1 ^{Δ/-} Mäusen
Abbildung 4.3: sActRIIB und KR führen zu einer Verringerung des FPE bei Ercc1 ^{4/-} Mäusen 39
Abbildung 4.4: Keine Auswirkungen durch den sActRIIB und die KR auf die Struktur der
Skelettmuskulatur von WT-Mäusen sichtbar
Abbildung 4.5: sActRIIB und Doppelintervention mit KR verbessern die Ultrastruktur der
Skelettmuskulatur. 42
Abbildung 4.6: sActRIIB und KR verbessern die Struktur der motorischen Endplatte bei Ercc1 ^{Δ/-}
Skelettmuskeln
Abbildung 4.7: Das Tubulussystem der Niere ist bei HbS-Mäusen geschädigt
Abbildung 4.8: Der sActRIIB reduziert Schädigungen des Tubulussystems
Abbildung 4.9: Keine Auswirkungen durch den sActRIIB auf die Struktur der Skelettmuskulatur
von WT-Mäusen sichtbar
Abbildung 4.10: Die Skelettmuskulatur der HbS-Mäuse zeigt zahlreiche Veränderungen
Abbildung 4.11: sActRIIB reduziert die strukturellen Veränderungen, die bei HbS-Mäusen
auftreten
Abbildung 4.12: Zeitpunkt 37 d - Therapie mit Cisplatin führt zu Degeneration des proximalen
Tubulus
Abbildung 4.13: Zeitpunkt 120 d – Komplett degenerierte proximale Tubuli nach Therapie mit
Cisplatin. 51
Abbildung 4.14: Erhaltenes Tubulussystem bei simultaner Behandlung mit Cisplatin + sActRIIB.
Abbildung 4.15: Zeitpunkt 37 d - Therapie mit Cisplatin führt zu strukturellen Veränderungen der
quergestreiften Muskulatur. 54
Abbildung 4.16: Zeitpunkt 120 d - Teilweise Erholung der strukturellen Veränderungen unter
Cisplatin-Therapie
Abbildung 4.17: Erhaltene Struktur der Skelettmuskulatur bei simultaner Gabe von Cisplatin +
sActRIIB
Abbildung 4.18: Normale Ultrastruktur der Spermatozoen nach PBS-Behandlung
Abbildung 4.19: Spermatozoen des mdx-Mausmodells nach Behandlung mit dem sActRIIB 58
Abbildung 4.20: Spermatozoen des D2-mdx-Mausmodells nach Behandlung mit dem sActRIIB. 59

9. Tabellenverzeichnis

10. Literaturverzeichnis

- Ali S, Chen JA & Garcia JM (2013) Clinical development of ghrelin axis-derived molecules for cancer cachexia treatment. *Curr Opin Support Palliat Care*, **7:** 368-75.
- Alvarez-Argote J, Dlugi TA, Sundararajan T, Kleynerman A, Faber ML, McKillop WM & Medin JA (2023) Pathophysiological characterization of the Townes mouse model for sickle cell disease. *Transl Res*, 254: 77-91.
- Alyodawi K, Vermeij WP, Omairi S, Kretz O, Hopkinson M, Solagna F, Joch B, Brandt RMC, Barnhoorn S, van Vliet N, Ridwan Y, Essers J, Mitchell R, Morash T, Pasternack A, Ritvos O, Matsakas A, Collins-Hooper H, Huber TB, Hoeijmakers JHJ & Patel K (2019) Compression of morbidity in a progeroid mouse model through the attenuation of myostatin/activin signalling. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 10: 662-686.
- Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, Guthrie TH, Knight-Madden J, Alvarez OA, Gordeuk VR, Gualandro S, Colella MP, Smith WR, Rollins SA, Stocker JW & Rother RP (2017) Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. N Engl J Med, 376: 429-439.
- Attie KM, Borgstein NG, Yang Y, Condon CH, Wilson DM, Pearsall AE, Kumar R, Willins DA, Seehra JS & Sherman ML (2013) A single ascending-dose study of muscle regulator ACE-031 in healthy volunteers. *Muscle Nerve*, 47: 416-23.
- Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H & Martignoni ME (2008) Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. J Gastrointest Surg, 12: 1193-201.
- Barreto R, Kitase Y, Matsumoto T, Pin F, Colston KC, Couch KE, O'Connell TM, Couch ME, Bonewald LF & Bonetto A (2017) ACVR2B/Fc counteracts chemotherapy-induced loss of muscle and bone mass. *Sci Rep*, 7: 14470.
- Bataille S, Dou L, Bartoli M, Sallée M, Aniort J, Ferkak B, Chermiti R, McKay N, Da Silva N, Burtey S
 & Poitevin S (2022) Mechanisms of myostatin and activin A accumulation in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 37: 1249-1260.
- Bataller A, Montalban-Bravo G, Soltysiak KA & Garcia-Manero G (2019) The role of TGFβ in hematopoiesis and myeloid disorders. *Leukemia*, 33: 1076-1089.
- Bazmandegan G, Fatemi I, Kaeidi A, Khademalhosseini M, Fathinejad A & Amirteimoury M (2021) Calcium dobesilate prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating oxidative and histopathological changes in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 394: 515-521.
- Béchir N, Pecchi E, Vilmen C, Le Fur Y, Amthor H, Bernard M, Bendahan D & Giannesini B (2016) ActRIIB blockade increases force-generating capacity and preserves energy supply in exercising mdx mouse muscle in vivo. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 30: 3551-3562.
- Bloise E, Ciarmela P, Dela Cruz C, Luisi S, Petraglia F & Reis FM (2019) Activin A in Mammalian Physiology. *Physiol Rev*, 99: 739-780.
- Bonewald L (2019) Use it or lose it to age: A review of bone and muscle communication. *Bone*, 120: 212-218.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA & Moore KJ (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 1189-1192.
- Busquets S, Toledo M, Orpí M, Massa D, Porta M, Capdevila E, Padilla N, Frailis V, López-Soriano FJ, Han HQ & Argilés JM (2012) Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 3: 37-43.

- Buzzard JJ, Farnworth PG, De Kretser DM, O'Connor AE, Wreford NG & Morrison JR (2003) Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology*, 144: 474-83.
- Cadena SM, Tomkinson KN, Monnell TE, Spaits MS, Kumar R, Underwood KW, Pearsall RS & Lachey JL (2010) Administration of a soluble activin type IIB receptor promotes skeletal muscle growth independent of fiber type. *J Appl Physiol (1985),* 109: 635-42.
- Campbell C, McMillan HJ, Mah JK, Tarnopolsky M, Selby K, McClure T, Wilson DM, Sherman ML, Escolar D & Attie KM (2017) Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve*, 55: 458-464.
- Cappellini MD, Marcon A, Fattizzo B & Motta I (2021) Innovative Treatments for Rare Anemias. Hemasphere, 5: e576.
- Cappellini MD, Viprakasit V, Taher AT, Georgiev P, Kuo KHM, Coates T, Voskaridou E, Liew HK, Pazgal-Kobrowski I, Forni GL, Perrotta S, Khelif A, Lal A, Kattamis A, Vlachaki E, Origa R, Aydinok Y, Bejaoui M, Ho PJ, Chew LP, Bee PC, Lim SM, Lu MY, Tantiworawit A, Ganeva P, Gercheva L, Shah F, Neufeld EJ, Thompson A, Laadem A, Shetty JK, Zou J, Zhang J, Miteva D, Zinger T, Linde PG, Sherman ML, Hermine O, Porter J & Piga A (2020) A Phase 3 Trial of Luspatercept in Patients with Transfusion-Dependent β-Thalassemia. *N Engl J Med*, 382: 1219-1231.
- Chargi N, Bashiri F, Wendrich AW, Smid EJ, de Jong PA, Huitema ADR, Devriese LA & de Bree R (2022) Image-based analysis of skeletal muscle mass predicts cisplatin dose-limiting toxicity in patients with locally advanced head and neck cancer. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 279: 3685-3694.
- Charles River Laboratories (2023) CD-1[®] IGS Mouse Details. [Online im Internet]. URL: <u>https://www.criver.com/products-services/find-model/cd-1r-igs-mouse?region=23</u> [Stand: 13.12.2023, 16:30].
- Chatel B, Messonnier LA, Barge Q, Vilmen C, Noirez P, Bernard M, Pialoux V & Bendahan D (2018) Endurance training reduces exercise-induced acidosis and improves muscle function in a mouse model of sickle cell disease. *Mol Genet Metab*, 123: 400-410.
- Chawla LS, Eggers PW, Star RA & Kimmel PL (2014) Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med*, 371: 58-66.
- Chen JA, Splenser A, Guillory B, Luo J, Mendiratta M, Belinova B, Halder T, Zhang G, Li YP & Garcia JM (2015a) Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 6: 132-43.
- Chen MC, Chen YL, Lee CF, Hung CH & Chou TC (2015b) Supplementation of Magnolol Attenuates Skeletal Muscle Atrophy in Bladder Cancer-Bearing Mice Undergoing Chemotherapy via Suppression of FoxO3 Activation and Induction of IGF-1. *PLoS One*, 10: e0143594.
- Clavere NG, Alqallaf A, Rostron KA, Parnell A, Mitchell R, Patel K & Boateng SY (2022) Inhibition of activin A receptor signalling attenuates age-related pathological cardiac remodelling. *Dis Model Mech*, 15(5): dmm049424.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW & Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325: 201-4.
- Colman RJ, Beasley TM, Allison DB & Weindruch R (2008) Attenuation of sarcopenia by dietary restriction in rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63: 556-9.
- Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R & Anderson RM (2014) Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun*, 5: 3557.
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ & Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109: 1953-61.

- Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO, Jr., Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW & Tormey DC (1980) Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Med, 69: 491-7.
- Dhawan J & Rando TA (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol*, 15: 666-73.
- Dollé MET, Kuiper RV, Roodbergen M, Robinson J, de Vlugt S, Wijnhoven SWP, Beems RB, de la Fonteyne L, de With P, van der Pluijm I, Niedernhofer LJ, Hasty P, Vijg J, Hoeijmakers JHJ & van Steeg H (2011) Broad segmental progeroid changes in short-lived Ercc1(-/Δ7) mice. *Pathobiology of aging & age related diseases*, 1: 10.3402/pba.v1i0.7219.
- Dunbar CE (2021) A plethora of gene therapies for hemoglobinopathies. *Nature Medicine*, 27: 202-204.
- Duncan MT, DeLuca TA, Kuo H-Y, Yi M, Mrksich M & Miller WM (2016) SIRT1 is a critical regulator of K562 cell growth, survival, and differentiation. *Experimental Cell Research*, 344: 40-52.
- EMA (2020) Adakveo / Crizanlizumab. [Online im Internet]. URL: <u>https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adakveo</u> [Stand: 01.06.2022, 13:40].
- EMA (2021) Fachinformation / Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels: Reblozyl® 25 mg/75 mg Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung. [Online im Internet]. URL: <u>https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/reblozyl-epar-product-information_de.pdf</u> [Stand: 22.04.2022, 15:00].
- EMA (2022) Oxbryta / Voxelotor. [Online im Internet]. URL: <u>https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/oxbryta</u> [Stand: 01.06.2022, 16:15].
- Essex AL, Pin F, Huot JR, Bonewald LF, Plotkin LI & Bonetto A (2019) Bisphosphonate Treatment Ameliorates Chemotherapy-Induced Bone and Muscle Abnormalities in Young Mice. *Frontiers in Endocrinology*, 10: 809.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S & Baracos VE (2011) Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*, 12: 489-95.
- Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, Garcia-Manero G, Buckstein R, Santini V, Díez-Campelo M, Finelli C, Cazzola M, Ilhan O, Sekeres MA, Falantes JF, Arrizabalaga B, Salvi F, Giai V, Vyas P, Bowen D, Selleslag D, DeZern AE, Jurcic JG, Germing U, Götze KS, Quesnel B, Beyne-Rauzy O, Cluzeau T, Voso MT, Mazure D, Vellenga E, Greenberg PL, Hellström-Lindberg E, Zeidan AM, Adès L, Verma A, Savona MR, Laadem A, Benzohra A, Zhang J, Rampersad A, Dunshee DR, Linde PG, Sherman ML, Komrokji RS & List AF (2020) Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. N Engl J Med, 382: 140-151.
- Fernández-Nocelo S, Gallego R, Costoya JA & Arce VM (2019) Expression of myostatin in human hematopoietic cells unveils novel autocrine/paracrine actions for the hormone. *Journal of Cellular Physiology*, 234: 7236-7246.
- Fouladiun M, Körner U, Gunnebo L, Sixt-Ammilon P, Bosaeus I & Lundholm K (2007) Daily physicalrest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. *Clin Cancer Res*, 13: 6379-85.
- Fu Y, Cai J, Li F, Liu Z, Shu S, Wang Y, Liu Y, Tang C & Dong Z (2019) Chronic effects of repeated lowdose cisplatin treatment in mouse kidneys and renal tubular cells. Am J Physiol Renal Physiol, 317: F1582-f1592.
- Fukada S-i, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda Si, Tsujikawa K & Yamamoto H (2010) Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *The American journal of pathology*, 176: 2414-2424.

- Garcia JM, Cata JP, Dougherty PM & Smith RG (2008) Ghrelin prevents cisplatin-induced mechanical hyperalgesia and cachexia. *Endocrinology*, 149: 455-60.
- Garg P (2018) A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol*, 47 Suppl 1: 3-13.
- Garito T, Zakaria M, Papanicolaou DA, Li Y, Pinot P, Petricoul O, Laurent D, Rooks D, Rondon JC & Roubenoff R (2018) Effects of bimagrumab, an activin receptor type II inhibitor, on pituitary neurohormonal axes. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 88: 908-919.
- George Carlson C, Bruemmer K, Sesti J, Stefanski C, Curtis H, Ucran J, Lachey J & Seehra JS (2011) Soluble activin receptor type IIB increases forward pulling tension in the mdx mouse. *Muscle Nerve*, 43: 694-9.
- Gordon JN, Trebble TM, Ellis RD, Duncan HD, Johns T & Goggin PM (2005) Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut*, 54: 540-5.
- Green CL, Lamming DW & Fontana L (2022) Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23: 56-73.
- Gregg SQ, Gutiérrez V, Robinson AR, Woodell T, Nakao A, Ross MA, Michalopoulos GK, Rigatti L, Rothermel CE, Kamileri I, Garinis GA, Stolz DB & Niedernhofer LJ (2012) A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*, 55: 609-21.
- Hain BA, Xu H, Wilcox JR, Mutua D & Waning DL (2019) Chemotherapy-induced loss of bone and muscle mass in a mouse model of breast cancer bone metastases and cachexia. JCSM Rapid Communications, 2: 1-12.
- Hall ZW & Sanes JR (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72: 99-121.
- Hamroun A, Lenain R, Bigna JJ, Speyer E, Bui L, Chamley P, Pottier N, Cauffiez C, Dewaeles E, Dhalluin X, Scherpereel A, Hazzan M, Maanaoui M & Glowacki F (2019) Prevention of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs*, 79: 1567-1582.
- Han H, Zhou X, Mitch WE & Goldberg AL (2013) Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45: 2333-2347.
- Hatakeyama S, Summermatter S, Jourdain M, Melly S, Minetti GC & Lach-Trifilieff E (2016) ActRII blockade protects mice from cancer cachexia and prolongs survival in the presence of anticancer treatments. *Skelet Muscle*, 6: 26.
- Herold G (2022) Innere Medizin 2022. De Gruyter, Köln, 48, 118.
- Hommos MS, Glassock RJ & Rule AD (2017) Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging. J Am Soc Nephrol, 28: 2838-2844.
- Hulmi JJ, Nissinen TA, Penna F & Bonetto A (2021) Targeting the Activin Receptor Signaling to Counteract the Multi-Systemic Complications of Cancer and Its Treatments. *Cells*, 10: 516.
- Hulmi JJ, Nissinen TA, Räsänen M, Degerman J, Lautaoja JH, Hemanthakumar KA, Backman JT, Ritvos O, Silvennoinen M & Kivelä R (2018) Prevention of chemotherapy-induced cachexia by ACVR2B ligand blocking has different effects on heart and skeletal muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 9: 417-432.
- Kanter J, Walters MC, Krishnamurti L, Mapara MY, Kwiatkowski JL, Rifkin-Zenenberg S, Aygun B, Kasow KA, Pierciey FJ, Jr., Bonner M, Miller A, Zhang X, Lynch J, Kim D, Ribeil JA, Asmal M, Goyal S, Thompson AA & Tisdale JF (2022) Biologic and Clinical Efficacy of LentiGlobin for Sickle Cell Disease. N Engl J Med, 386: 617-628.
- Kasztan M, Fox BM, Lebensburger JD, Hyndman KA, Speed JS, Pollock JS & Pollock DM (2019) Hyperfiltration predicts long-term renal outcomes in humanized sickle cell mice. *Blood Adv*, 3: 1460-1475.
- Katagiri D, Hamasaki Y, Doi K, Negishi K, Sugaya T, Nangaku M & Noiri E (2016) Interstitial renal fibrosis due to multiple cisplatin treatments is ameliorated by semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition. *Kidney Int*, 89: 374-85.
- Kazemi-Bajestani SM, Mazurak VC & Baracos V (2016) Computed tomography-defined muscle and fat wasting are associated with cancer clinical outcomes. *Semin Cell Dev Biol*, 54: 2-10.

- Keller K & Engelhardt M (2013) Strength and muscle mass loss with aging process. Age and strength loss. *Muscles Ligaments Tendons J,* 3: 346-50.
- Krasikova Y, Rechkunova N & Lavrik O (2021) Nucleotide Excision Repair: From Molecular Defects to Neurological Abnormalities. *Int J Mol Sci*, 22: 6220.
- Kunz JB, Lobitz S, Grosse R, Oevermann L, Hakimeh D, Jarisch A, Cario H, Beier R, Schenk D, Schneider D, Groß-Wieltsch U, Prokop A, Heine S, Khurana C, Erlacher M, Dürken M, Linke C, Frühwald M, Corbacioglu S, Claviez A, Metzler M, Ebinger M, Full H, Wiesel T, Eberl W, Reinhard H, Tagliaferri L, Allard P, Karapanagiotou-Schenkel I, Rother LM, Beck D, Le Cornet L & Kulozik AE (2020) Sickle cell disease in Germany: Results from a national registry. *Pediatr Blood Cancer*, 67: e28130.
- Latres E, Mastaitis J, Fury W, Miloscio L, Trejos J, Pangilinan J, Okamoto H, Cavino K, Na E, Papatheodorou A, Willer T, Bai Y, Hae Kim J, Rafique A, Jaspers S, Stitt T, Murphy AJ, Yancopoulos GD & Gromada J (2017) Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8. *Nat Commun*, 8: 15153.
- Laurent MR, Dedeyne L, Dupont J, Mellaerts B, Dejaeger M & Gielen E (2019) Age-related bone loss and sarcopenia in men. *Maturitas*, 122: 51-56.
- Lee JY, Hopkinson NS & Kemp PR (2011) Myostatin induces autophagy in skeletal muscle in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 415: 632-6.
- Lee SJ, Huynh TV, Lee YS, Sebald SM, Wilcox-Adelman SA, Iwamori N, Lepper C, Matzuk MM & Fan CM (2012) Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2353-60.
- Lee SJ & McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9306-11.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2020) S3-Leitlinie Supportive Therapie bei onkologischen Patientinnen. [Online im Internet]. URL: <u>https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/supportive-therapie/</u>[Stand: 30.06.2022, 13:40].
- Leonhard WN, Kunnen SJ, Plugge AJ, Pasternack A, Jianu SB, Veraar K, El Bouazzaoui F, Hoogaars WM, Ten Dijke P, Breuning MH, De Heer E, Ritvos O & Peters DJ (2016) Inhibition of Activin Signaling Slows Progression of Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol, 27: 3589-3599.
- Lokireddy S, Wijesoma IW, Bonala S, Wei M, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R & Sharma M (2012) Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia. *The Biochemical journal*, 446: 23-36.
- Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Serpe R, Antoni G, Massa E, Dessì M & Panzone F (2010) Phase II nonrandomized study of the efficacy and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia. *Journal of Molecular Medicine*, 88: 85-92.
- Martin L, Senesse P, Gioulbasanis I, Antoun S, Bozzetti F, Deans C, Strasser F, Thoresen L, Jagoe RT, Chasen M, Lundholm K, Bosaeus I, Fearon KH & Baracos VE (2015) Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. *J Clin Oncol*, 33: 90-9.
- Marzetti E, Lees HA, Wohlgemuth SE & Leeuwenburgh C (2009) Sarcopenia of aging: underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. *Biofactors*, 35: 28-35.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M & Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol*, 162: 1135-47.
- McPherron AC, Lawler AM & Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGFbeta superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.
- Metcalf B, Chuang C, Dufu K, Patel MP, Silva-Garcia A, Johnson C, Lu Q, Partridge JR, Patskovska L, Patskovsky Y, Almo SC, Jacobson MP, Hua L, Xu Q, Gwaltney SL, 2nd, Yee C, Harris J, Morgan BP, James J, Xu D, Hutchaleelaha A, Paulvannan K, Oksenberg D & Li Z (2017) Discovery of GBT440, an Orally Bioavailable R-State Stabilizer of Sickle Cell Hemoglobin. ACS Med Chem Lett, 8: 321-326.

- Michel CP, Bendahan D, Giannesini B, Vilmen C, Le Fur Y & Messonnier LA (2023) Effects of hydroxyurea on skeletal muscle energetics and force production in a sickle cell disease murine model. *J Appl Physiol (1985)*, 134: 415-425.
- Mikasa K, Sawaki M, Kita E, Hamada K, Teramoto S, Sakamoto M, Maeda K, Konishi M & Narita N (1997) Significant Survival Benefit to Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer from Treatment with Clarithromycin. *Chemotherapy*, 43: 288-296.
- Mithraprabhu S, Mendis S, Meachem SJ, Tubino L, Matzuk MM, Brown CW & Loveland KL (2010) Activin bioactivity affects germ cell differentiation in the postnatal mouse testis in vivo. *Biol Reprod*, 82: 980-90.

Niccoli T & Partridge L (2012) Ageing as a risk factor for disease. Curr Biol, 22: R741-52.

- Nissinen TA, Degerman J, Räsänen M, Poikonen AR, Koskinen S, Mervaala E, Pasternack A, Ritvos O, Kivelä R & Hulmi JJ (2016) Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapyinduced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes. Sci Rep, 6: 32695.
- Nissinen TA, Hentilä J, Penna F, Lampinen A, Lautaoja JH, Fachada V, Holopainen T, Ritvos O, Kivelä R & Hulmi JJ (2018) Treating cachexia using soluble ACVR2B improves survival, alters mTOR localization, and attenuates liver and spleen responses. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 9: 514-529.
- Olsen OE, Wader KF, Hella H, Mylin AK, Turesson I, Nesthus I, Waage A, Sundan A & Holien T (2015) Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Commun Signal*, 13: 27.
- Pacifico J, Geerlings MAJ, Reijnierse EM, Phassouliotis C, Lim WK & Maier AB (2020) Prevalence of sarcopenia as a comorbid disease: A systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*, 131: 110801.
- Pamoukdjian F, Bouillet T, Lévy V, Soussan M, Zelek L & Paillaud E (2018) Prevalence and predictive value of pre-therapeutic sarcopenia in cancer patients: A systematic review. *Clin Nutr*, 37: 1101-1113.
- Perše M & Večerić-Haler Ž (2018) Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *BioMed research international,* 2018: 1462802.
- Relizani K, Mouisel E, Giannesini B, Hourdé C, Patel K, Morales Gonzalez S, Jülich K, Vignaud A, Piétri-Rouxel F, Fortin D, Garcia L, Blot S, Ritvos O, Bendahan D, Ferry A, Ventura-Clapier R, Schuelke M & Amthor H (2014) Blockade of ActRIIB signaling triggers muscle fatigability and metabolic myopathy. *Mol Ther*, 22: 1423-1433.
- Ribosepharm (2018) Fachinformation Cisplatin-Lösung [Online im Internet]. URL: <u>https://www.ribosepharm.de/x/media/pdf/fach/cisplatin/fachinfo_cisplatin.pdf</u> [Stand: 08.06.2022, 15:20].
- Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK & Mendell JR (2009) Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve*, 39: 283-96.
- Sakai H, Sagara A, Arakawa K, Sugiyama R, Hirosaki A, Takase K, Jo A, Sato K, Chiba Y, Yamazaki M, Matoba M & Narita M (2014) Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy. *Toxicol Appl Pharmacol,* 278: 190-9.
- Sakamoto M, Mikasa K, Majima T, Hamada K, Konishi M, Maeda K, Kita E & Narita N (2001) Anticachectic effect of clarithromycin for patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Chemotherapy*, 47: 444-51.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF & Lee SJ (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*, 350: 2682-8.
- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG & Barnard PJ (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science (New York, N.Y.),* 244: 1578-1580.

- Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH & Wood RD (1996) Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell*, 86: 811-22.
- Solagna F, Tezze C, Lindenmeyer MT, Lu S, Wu G, Liu S, Zhao Y, Mitchell R, Meyer C, Omairi S, Kilic T, Paolini A, Ritvos O, Pasternack A, Matsakas A, Kylies D, Wiesch JSZ, Turner JE, Wanner N, Nair V, Eichinger F, Menon R, Martin IV, Klinkhammer BM, Hoxha E, Cohen CD, Tharaux PL, Boor P, Ostendorf T, Kretzler M, Sandri M, Kretz O, Puelles VG, Patel K & Huber TB (2021) Pro-cachectic factors link experimental and human chronic kidney disease to skeletal muscle wasting programs. J Clin Invest, 131: e135821.
- Souza TA, Chen X, Guo Y, Sava P, Zhang J, Hill JJ, Yaworsky PJ & Qiu Y (2008) Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. *Mol Endocrinol*, 22: 2689-702.
- Srikanthan P & Karlamangla AS (2014) Muscle mass index as a predictor of longevity in older adults. *Am J Med*, 127: 547-53.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Saunthararajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D & Terrin M (2003) Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *Jama*, 289: 1645-51.
- Suh J & Lee YS (2020) Myostatin Inhibitors: Panacea or Predicament for Musculoskeletal Disorders? *J Bone Metab*, 27: 151-165.
- Surov A, Pech M, Gessner D, Mikusko M, Fischer T, Alter M & Wienke A (2021) Low skeletal muscle mass is a predictor of treatment related toxicity in oncologic patients. A meta-analysis. *Clin Nutr*, 40: 5298-5310.
- Tang C, Livingston MJ, Safirstein R & Dong Z (2023) Cisplatin nephrotoxicity: new insights and therapeutic implications. *Nat Rev Nephrol*, 19: 53-72.
- The Jackson Laboratory (2024) B6;129-Hbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(HBG1,HBB)Tow Hbatm1(HBA)Tow/J. [Online im Internet]. URL: <u>https://www.jax.org/strain/013071</u> [Stand: 10.04.2024, 11:20].
- Toledo M, Busquets S, Penna F, Zhou X, Marmonti E, Betancourt A, Massa D, López-Soriano FJ, Han HQ & Argilés JM (2016) Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: Additive effects of activin type II receptor inhibition and β-2 agonist. *Int J Cancer*, 138: 2021-9.
- Tonin FS, Ginete C, Ferreira J, Delgadinho M, Santos B, Fernandez-Llimos F & Brito M (2023) Efficacy and safety of pharmacological interventions for managing sickle cell disease complications in children and adolescents: Systematic review with network meta-analysis. *Pediatr Blood Cancer*, 70: e30294.
- Vaughan D, Kretz O, Alqallaf A, Mitchell R, von der Heide JL, Vaiyapuri S, Matsakas A, Pasternack A, Collins-Hooper H, Ritvos O, Ballesteros R, Huber TB, Amthor H, Mukherjee A & Patel K (2020a) Diminution in sperm quantity and quality in mouse models of Duchenne Muscular Dystrophy induced by a myostatin-based muscle growth-promoting intervention. *Eur J Transl Myol*, 30: 8904.
- Vaughan D, Mitchell R, Kretz O, Chambers D, Lalowski M, Amthor H, Ritvos O, Pasternack A, Matsakas A, Vaiyapuri S, Huber TB, Denecke B, Mukherjee A, Widera D & Patel K (2021) A muscle growth-promoting treatment based on the attenuation of activin/myostatin signalling results in long-term testicular abnormalities. *Dis Model Mech*, 14: dmm047555.
- Vaughan D, Ritvos O, Mitchell R, Kretz O, Lalowski M, Amthor H, Chambers D, Matsakas A, Pasternack A, Collins-Hooper H, Ballesteros R, Huber TB, Denecke B, Widera D, Mukherjee A & Patel K (2020b) Inhibition of Activin/Myostatin signalling induces skeletal muscle hypertrophy but impairs mouse testicular development. *Eur J Transl Myol*, 30: 8737.

- Vermeij WP, Dolle ME, Reiling E, Jaarsma D, Payan-Gomez C, Bombardieri CR, Wu H, Roks AJ, Botter SM, van der Eerden BC, Youssef SA, Kuiper RV, Nagarajah B, van Oostrom CT, Brandt RM, Barnhoorn S, Imholz S, Pennings JL, de Bruin A, Gyenis A, Pothof J, Vijg J, van Steeg H & Hoeijmakers JH (2016) Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNArepair-deficient mice. *Nature*, 537: 427-431.
- Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V, El-Beshlawy A, Hassab H, Achebe MM, Alkindi S, Brown RC, Diuguid DL, Telfer P, Tsitsikas DA, Elghandour A, Gordeuk VR, Kanter J, Abboud MR, Lehrer-Graiwer J, Tonda M, Intondi A, Tong B & Howard J (2019) A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*, 381: 509-519.
- Voskaridou E, Ntanasis-Stathopoulos I, Christoulas D, Dimopoulou M, Komninaka V, Repa K, Papatheodorou A & Terpos E (2019) Activin-A is elevated in patients with thalassemia major and double heterozygous sickle cell/beta-thalassemia and correlates with markers of hemolysis and bone mineral density. *Ann Hematol*, 98: 1583-1592.
- Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, Chiechi A, Wright LE, Umanskaya A, Niewolna M, Trivedi T, Charkhzarrin S, Khatiwada P, Wronska A, Haynes A, Benassi MS, Witzmann FA, Zhen G, Wang X, Cao X, Roodman GD, Marks AR & Guise TA (2015) Excess TGF-β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat Med*, 21: 1262-1271.
- Weeda G, Donker I, de Wit J, Morreau H, Janssens R, Vissers CJ, Nigg A, van Steeg H, Bootsma D & Hoeijmakers JH (1997) Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Current biology : CB*, **7**: 427-439.
- Wiggins JE (2012) Aging in the glomerulus. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 67: 1358-64.
- Wu LC, Sun CW, Ryan TM, Pawlik KM, Ren J & Townes TM (2006) Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *Blood*, 108: 1183-8.
- Yamada Y, Kemnitz JW, Weindruch R, Anderson RM, Schoeller DA & Colman RJ (2018) Caloric Restriction and Healthy Life Span: Frail Phenotype of Nonhuman Primates in the Wisconsin National Primate Research Center Caloric Restriction Study. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 73: 273-278.
- Zhao Y, Wu Z, Chanal M, Guillaumond F, Goehrig D, Bachy S, Principe M, Ziverec A, Flaman JM, Collin G, Tomasini R, Pasternack A, Ritvos O, Vasseur S, Bernard D, Hennino A & Bertolino P (2020)
 Oncogene-Induced Senescence Limits the Progression of Pancreatic Neoplasia through Production of Activin A. *Cancer Res*, 80: 3359-3371.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL & Han HQ (2010) Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*, 142: 531-543.
- Zhu L, Bai C, Wang X, Wei Z, Gu M, Zhou X, Su G, Liu X, Yang L & Li G (2022) Myostatin Knockout Limits Exercise-Induced Reduction in Bovine Erythrocyte Oxidative Stress by Enhancing the Efficiency of the Pentose Phosphate Pathway. *Animals (Basel)*, 12: 927.

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Oliver Kretz bedanken, der mich über den gesamten Dissertationsprozess tatkräftig unterstützt hat. Ich bedanke mich für die freundliche und motivierte Einbindung in weit mehr als die für meine Dissertation zunächst geplanten Versuche und für sein offenes Ohr, wenn einmal Probleme auftraten. Bei Prof. Dr. Tobias Huber bedanke ich mich für die Betreuung meiner Dissertation als Doktorvater sowie für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Durch das Stipendium des Graduiertenkollegs "Mechanisms of Immune-Mediated Tissue Injury" war es mir möglich, ein volles Jahr für meine Versuche das Studium zu pausieren und so einen etwas tieferen Einblick in die Forschung zu erhalten. Für diese Möglichkeit und auch für die im Rahmen des Graduiertenkollegs durchgeführten sehr lehrreichen Workshops möchte ich mich bedanken.

Bei Valerie Oberüber möchte ich mich für die Einführung in die notwendigen Techniken sowie die tagtägliche Unterstützung bei meinen Versuchen bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Barbara, Brigitte und Nina, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen ich immer eine schöne Zeit im Labor hatte.

Im Privaten möchte ich mich bei meinen Freundinnen Celine und Maraike bedanken, die mit mir zusammen den Prozess einer Dissertation durchgemacht haben. Zum Glück konnten wir uns gegenseitig immer wieder motivieren und sind gemeinsam am Ball geblieben. Für die allgemeine Unterstützung während meines Studiums danke ich außerdem meinen Eltern und Großeltern, meiner Mutter zudem für das motivierte Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Partner Philipp bedanken, der mir über die kompletten 5 Jahre dieser Arbeit und meines Studiums stets zur Seite gestanden hat und all meine Hochs und Tiefs ertragen hat. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft!

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: