

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Prof. Dr. med Ania C. Muntau

Untersuchungen zur Expression von AGAT, GAMT und Ct1 in Knockout-Mausmodellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Schabira Ahadi
aus Kabul

Hamburg 2023

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.03.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Manuel Friese

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Axel Neu

Inhaltsverzeichnis

1.	Fragestellung	5
2.	Einleitung	6
2.1.	Kreatinbiosynthese und Phosphokreatinkreislauf _____	7
2.2.	Physiologische Bedeutung von Kreatin _____	9
2.3.	Kreatindefizienz-Syndrome _____	11
	2.3.1. AGAT-Defizienz _____	11
	2.3.2. GAMT-Defizienz _____	12
	2.3.3. Ct1-Defizienz _____	13
3.	Material und Methoden _____	15
3.1.	Material _____	15
	3.1.1. Geräte _____	15
	3.1.2. Software _____	16
	3.1.3. Chemikalien _____	16
	3.1.3. Enzyme und Reagenzien _____	16
	3.1.4. Verbrauchsmaterial _____	17
3.2.	Methoden _____	18
	3.2.1. Knockout-Mäuse _____	18
	3.2.2. RNA-Isolation _____	18
	3.2.3. Qualitätskontrolle der isolierten RNA _____	19
	3.2.4. Aufreinigung der RNA _____	20
	3.2.5. cDNA-Synthese, reverse Transkription _____	20
	3.2.6. cDNA-Aufreinigung _____	21
	3.2.7. Konzentrationsbestimmung _____	21
	3.2.8. Gelelektrophorese _____	22
	3.2.9. PCR-Nachweis der Zielgene _____	22
	3.2.10. Quantitative Real-Time PCR (qPCR) _____	23
	3.2.11. Referenzgene 18S und Rpl67 _____	28
	3.2.12. Standardkurven _____	28
4.	Ergebnisse	29
4.1.	RNA-Qualitätsbestimmung _____	29
3.2.	Polymerase-Kettenreaktion, KO-Nachweis _____	31

4.2.	Polymerase Ketten Reaktion, KO-Nachweis	31
4.3.	Quantitative Real-Time PCR	32
4.3.1.	Standardkurven	33
4.3.2.	Quantitative Bestimmung des Expressionsunterschiedes der Ct1 und der GAMT in AGAT-WT- und AGAT-Knockout-Mäusen	35
4.3.3.	Quantitative Bestimmung des Expressionsunterschiedes des Ct1 und der AGAT in GAMT-WT und GAMT-Knockout-Mäusen	37
4.3.4.	Quantitative Bestimmung des Expressionsunterschiedes der AGAT und GAMT in Ct1-WT- und -Knockout-Mäusen	39
5.	Diskussion	42
6.	Zusammenfassung	51
7.	Abkürzungsverzeichnis	53
8.	Literaturverzeichnis	55
9.	Danksagung	68
10.	Lebenslauf	69
11.	Eidesstattliche Versicherung	70

1. Fragestellung

Kreatindefizienzsyndrome resultieren in schweren neurometabolischen Erkrankungen, deren gemeinsames Therapieprinzip in der Korrektur des zerebralen Kreatinmangels besteht. Bei den beiden autosomal-rezessiv vererbten L-Arginin:Glycin-Amidino transferase (AGAT) - und Guanidinoacetat-Methyltransferase (GAMT) - Defekten führt die hochdosierte orale Substitution von Kreatin (Cr) innerhalb kurzer Zeit zu einem deutlichen Anstieg des zerebralen Cr. Beim deutlich häufigeren X-chromosomal vererbten Kreatintransporter (Ct1) - Defekt ist die orale Kreatinsupplementation meist nicht effizient, da der für die Aufnahme von Cr notwendige Transporter fehlt (Schulze 2004, Fernandes-Pirez et al. 2022). Die Steigerung der endogenen Kreatinsynthese in den relevanten Organen wie Muskel, Herz und Gehirn ist daher ein möglicher Therapieansatz.

Wo und in welchem Umfang die Kreatinsynthese im menschlichen Organismus stattfindet, ist nicht abschließend geklärt. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Frage nach der Änderung der Expression der Gene AGAT, GAMT und Ct1 bei Defizienz der einzelnen Komponenten des Kreatinstoffwechsels.

Es wurde anhand von quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) die Expression der AGAT, GAMT sowie des Ct1 auf RNA-Ebene in den expressionsstarken Geweben Hirn, Skelettmuskulatur, Niere, Leber und Herzmuskulatur untersucht. Zur Durchführung der Untersuchungen standen Knockoutmäuse für AGAT, GAMT und Ct1 zur Verfügung.

2. Einleitung

Für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen im menschlichen Organismus ist die Energieversorgung mit Adenosintriphosphat (ATP) notwendig. Während jede Zelle Energie in Form von ATP benötigt, reicht der ATP-Vorrat bei maximaler Arbeit der Muskelzellen nur für wenige Sekunden (Wallimann 2008). Folglich muss ATP kontinuierlich resynthetisiert werden. ATP wird einerseits im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien und zum anderen über den Abbau von Glukose im Zytosol der Zellen gewonnen (Rui 2014). Die Mitochondrien sind zytoplasmatische Organellen, in denen unter anderem ATP synthetisiert wird. Je nachdem, ob für die Energiebereitstellung Sauerstoff zur Verfügung steht, finden die Stoffwechselfvorgänge im Zytosol der Zellen anaerob oder in den Mitochondrien der Zellen aerob statt. Dies geschieht anaerob über die Glykolyse, wobei 2 ATP-Moleküle entstehen (Rui 2014). In den Mitochondrien entstehen unter aeroben Bedingungen pro Glukosemolekül über den Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA insgesamt 32 ATP-Moleküle (Roach et al. 2012, Rabinowitz und Enerbäck 2020).

Veränderte zelluläre ATP-Spiegel werden bei vielen Erkrankungen wie Karzinomen, Immunschwäche und neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet (Deng et al. 2021). Mitochondriale Fehlfunktionen wiederum können Kardiomyopathien, dementielle Erkrankungen und Ataxien verursachen (Pathak et al. 2013). Eine Dysfunktion der Mitochondrien betrifft vor allem Organe mit hohem Energieumsatz wie Skelettmuskel (349,7 kcal/Tag), Hirn (316,8 kcal/Tag), Leber (278 kcal/Tag), Herz (136,4 kcal/Tag) und Niere (129 kcal/Tag) (Wang et al. 2010). Aber auch Organe, in denen im Verhältnis zu ihrer Größe bzw. ihrem Gewicht ein hoher Energieverbrauch besteht, können von mitochondrialen Pathologien betroffen sein. Dies sind beispielsweise Strukturen am Auge wie Retina oder Nervus opticus (Barot et al. 2011).

Phosphokreatin (PCr), das durch Phosphorylierung von Cr entsteht, dient im Körper als intermediärer Energiespeicher und ist essentiell für die Bereitstellung von ATP für das zentrale Nervensystem (ZNS) und andere Organe mit hohem Energieumsatz. Das hochenergetische Phosphat-Molekül des PCr wird bei

Bedarf an Adenosinribonukleosid-5'-diphosphat (ADP) abgegeben, so dass der universelle Energieträger ATP regeneriert werden kann (Wallimann 2007, Rossi et al. 2021).

2.1. Kreatinbiosynthese und Phosphokreatinkreislauf

Kreatin (von griechisch *kreas* „Fleisch“) oder α -Methylguanidinoessigsäure spielt eine essentielle Rolle bei der ATP-Synthese und -Regeneration. Über das Kreatinkinase (CK) – System ist es wesentlich an der Versorgung peripherer Organe und des Hirns mit ATP beteiligt (Wallimann et al. 2011). Hohe Kreatinspiegel finden sich in Organen mit hohem Energieverbrauch wie Herz, Skelettmuskulatur und Hirn (Fernandes-Pirez et al. 2022).

Der Körper eines 70 kg schweren Erwachsenen enthält etwa 120 g Cr. Cr und PCr zerfallen nicht-enzymatisch mit einer Rate von etwa 2 Prozent täglich zu Kreatinin, sodass etwa 1 bis 2 g pro Tag erneuert werden müssen (Brosnan und Brosnan 2007, Wyss et al. 2000). Neben der exogenen Zufuhr durch fleischhaltige Nahrung wird Cr auch im menschlichen Körper von Leber, Nieren und Bauchspeicheldrüse synthetisiert (Wallimann 2008). Etwa die Hälfte der täglich benötigten Menge an Cr für Erwachsene wird endogen hergestellt. Abbildung 1.1 zeigt die Kreatinsynthese und den -stoffwechsel. Durch die AGAT wird in einer reversiblen Reaktion aus den Aminosäuren Arginin und Glycin vorwiegend im proximalen Tubulus der Niere Guanidinoacetat (GAA) synthetisiert (Klein 2006). GAA wird durch die GAMT vorwiegend in der Leber in einer irreversiblen Reaktion mit Hilfe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) methyliert, wobei Cr als Endprodukt entsteht und SAM in S-Adenosyl-Homocystein (SAH) umgewandelt wird. Cr verlässt über den Blutweg die Leber und wird über den Kreatintransporter (Ct1) in die Zellen aufgenommen. Ct1 ist ein Transmembranprotein aus der Gruppe der SLC-Transporter (solute carrier 6 family of transporters) und wird durch das SLC6A8-Gen kodiert.

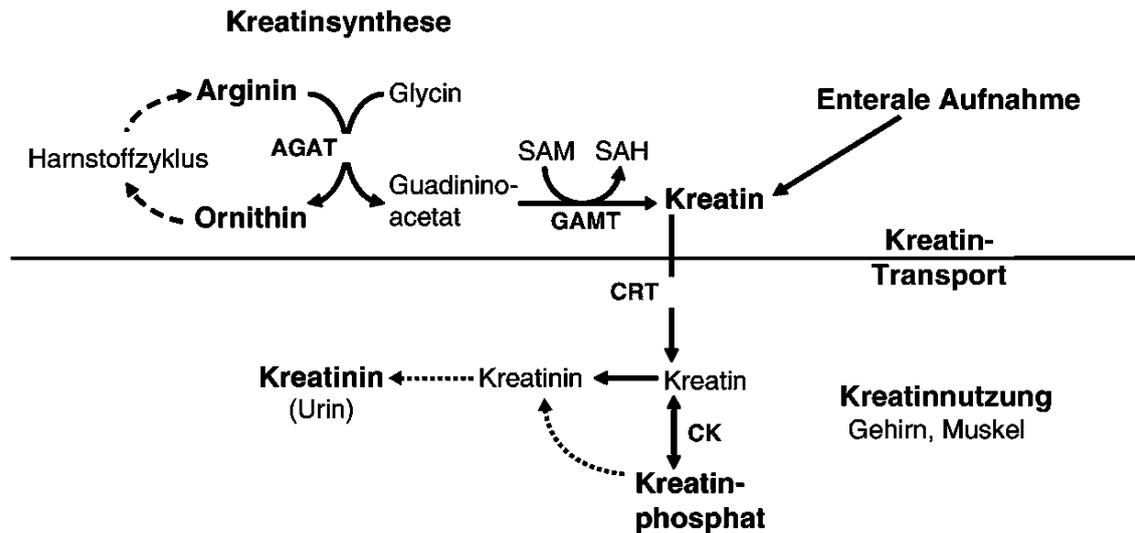


Abb. 1.1: Kreatinsynthese und -stoffwechsel

AGAT = Arginin:Glycin-Amidotransferase, GAMT = S- Adenosyl-L-Methionin:Guanidinoacetat N-Methyltransferase, SAM = S-Adenosylmethionin, SAH = S-Adenosylhomocystein, CK = Kreatinkinase, CRT = Kreatintransporter (Hoffmann 2019).

Durch die AGAT wird in einer reversiblen Reaktion aus Arginin und Glycin GAA synthetisiert. GAA wird durch die GAMT mit Hilfe von SAM methyliert, wobei Cr als Endprodukt entsteht und SAM in SAH umgewandelt wird. Kreatin wird über den CRT in die Zellen aufgenommen.

AGAT, GAMT und Ct1 sind im Körper des Menschen unterschiedlich stark exprimiert. Die höchste AGAT-Aktivität lässt sich in Leber, Niere und Pankreas nachweisen, während die GAMT nahezu ubiquitär exprimiert wird und die höchste Aktivität in der Leber zeigt. Die höchste Expression des Ct1 zeigt sich in den Nieren, im Herzen und in der Skelettmuskulatur (Wyss und Kaddurah-Daouk 2000, van Pilsom et al. 1972).

In den Zellen wird Cr durch die CK zu PCr phosphoryliert. Diese Reaktion ist reversibel und kann ebenso in die andere Richtung ablaufen, indem die CK PCr dephosphoryliert und in Cr umwandelt, wobei aus einem ADP ein ATP wird:



Die Richtung der Reaktion hängt vom Arbeitszustand und damit vom Energiebedarf des Muskels ab. Das freiwerdende Cr diffundiert zurück in die Mitochondrien und wird durch eine membranständige mitochondriale CK zu PCr rephosphoryliert (Lowe et al. 2015). Es sind verschiedene CK-Isoformen

bekannt. Die zytosolischen CK-Isoformen kommen jeweils vorwiegend in der Skelettmuskulatur (CK-MM), in der Herzmuskulatur (CK-MB) sowie im Hirn (CK-BB) vor. Weiterhin sind zwei mitochondriale Isoformen bekannt, von denen eine ubiquitär (uMtCK) und die andere vorwiegend im Sarkomer (sMtCK) vertreten ist (Wallimann et al. 1992, Schlattner et al. 2006).

2.2. Physiologische Bedeutung von Kreatin

Cr steigert nicht nur die Muskelkraft und fördert das Muskelwachstum, sodass es im Bereich Sport und Ausdauer von großer Bedeutung ist, sondern erhöht gleichzeitig die körperliche Leistungsfähigkeit (Buford et al. 2007, Klein und Ferrante 2007). Dabei führt die orale Kreatinsupplementation zu einer Erhöhung des PCr/ATP-Verhältnisses und damit zu einem verbesserten Energiestatus (Wallimann, 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Gabe von Cr den klinischen Verlauf von Patienten nach Immobilisierung z.B. durch Gips und Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma deutlich verbessert und damit eine wichtige Rolle in der Rehabilitation spielt (Sakellaris et al. 2006).

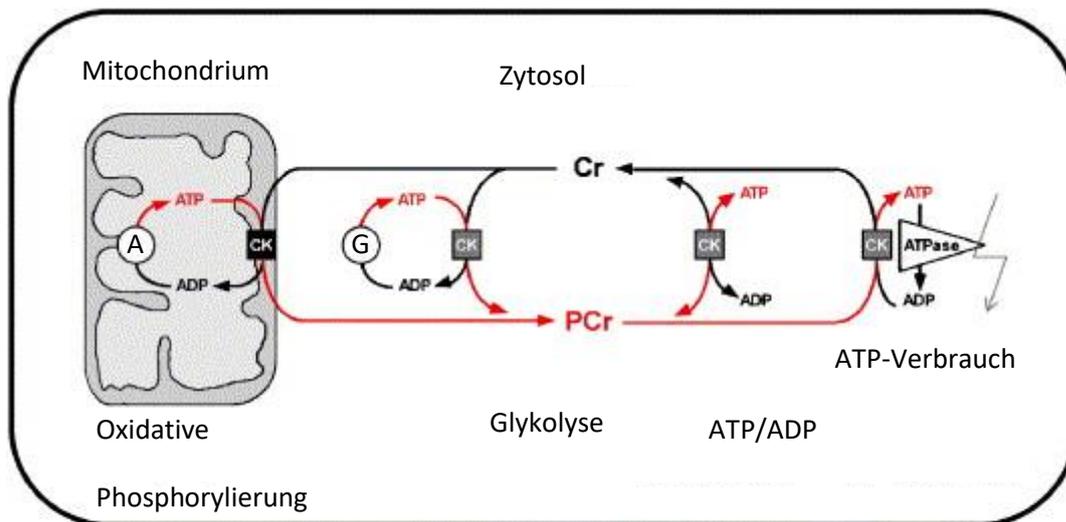


Abbildung 1.2: Das Kreatinkinase- / Phosphokreatin-System

ATP=Adenosintriphosphat, ADP=Adenosindiphosphat, Cr=Kreatin, PCr=Phosphokreatin, CK=Kreatinkinase, A=Atmungskette, G=Glykolyse (Wallimann 2008).

In den Zellen wird das Cr durch die CK zu PCr phosphoryliert und bei Bedarf dephosphoryliert und in Cr umwandelt, wobei aus einem ADP ein ATP wird. Das freiwerdende Cr diffundiert zurück in die Mitochondrien und wird durch eine membranständige mitochondriale CK zu PCr rephosphoryliert.

In Form von PCr dient Cr primär als intermediärer Energiespeicher (Abbildung 1.2). Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung und Pufferung des zellulären ATP/ADP-Verhältnisses. Wenn eine Zelle, beispielsweise aufgrund von sportlicher Aktivität, viel Energie in Form von ATP verbraucht, wird das entstandene ADP mit Hilfe des PCr-Speichers und der CK zu ATP rephosphoryliert und somit die zelluläre ATP-Konzentration konstant gehalten (Wallimann 1992).

In zahlreichen Studien konnte der positive Einfluss einer Kreatineinnahme in älteren Patientengruppen gezeigt werden. Cr hat einen präventiven Effekt auf die Abnahme der Muskelmasse im Alter (Sarkopenie) und fördert die Muskelkraft (Chrusch et al. 2001, Gualano et al. 2014). Durch Kreatinsupplementation verbessert sich bei älteren Patienten die kognitive Leistungsfähigkeit und wirkt sich günstig auf Gedächtnis und Konzentration aus (Watanabe et al. 2002, Rae et al. 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cr einen positiven Effekt auf den Glukose- und Insulinhaushalt hat und sich damit unterstützend auf das Management bei Typ 2-Diabetikern auswirkt (Gualano et al. 2010, Alves et al. 2012). Patienten mit koronarer Herzerkrankung profitieren ebenso von einer Cr/PCr-Supplementation. Die Einnahme von Cr und PCr reduziert Arrhythmien und Schäden nach ischämischen Ereignissen und hat einen Einfluss auf die Herzfunktion bei chronischen Herzerkrankungen (Perasso et al. 2013, Levin et al. 2021). Weiterhin zeigte sich, dass Cr eine Schlüsselrolle in der Makrophagen-induzierten Immunantwort einnimmt und als eine „molekulare Batterie“ fungiert, die die T-Zell-Aktivität antreibt. Gleichzeitig scheint es antikanzerogene Eigenschaften zu haben und das Tumorwachstum zu hemmen (Ji et al. 2019, Di Base et al. 2019). Daneben zeigten Galbraith und Furukawa (2006) eine mögliche Rolle des Cr bei der Regulation von Appetit und Gewicht auf.

In Mausmodellen konnte ein verbesserter Verlauf nach Kreatinsupplementation bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington, Morbus Parkinson und Amyotropher Lateralsklerose gezeigt werden. Dies ließ sich bisher jedoch nicht bei Patienten bestätigen (Bender und Klopstock 2016). Im ZNS von GAA-defizienten Mäusen zeigte sich, dass GAA die Rolle eines GABA-Agonisten und damit eines Neurotransmitters einnimmt (Schulze et al. 2016, Neu

et al. 2002). Eine erhöhte Aktivität des Ct1 konnte in Versuchen mit Ratten unter hyperosmotischen Bedingungen verzeichnet werden, während sich eine Abnahme der Ct1-Aktivität unter hypoosmotischen Bedingungen zeigte. Cr scheint eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der korrekten osmotischen Verhältnisse im ZNS zu spielen (Alfieri et al. 2006).

2.3. Kreatindefizienz-Syndrome

Es sind drei genetisch bedingte Störungen bekannt, die den Kreatinstoffwechsel betreffen. Davon betreffen zwei Störungen die endogene Kreatinsynthese (autosomal rezessiver GAMT-Defekt (OMIM 612736) und autosomal rezessiver AGAT-Defekt (OMIM 612718)) und eine Störung betrifft den Kreatintransport (X-chromosomaler Ct1-Defekt (OMIM 300352)).

Alle drei Kreatindefizienz-Syndrome sind gekennzeichnet durch das Fehlen von Cr bzw. stark verringerte Kreatinkonzentrationen in Hirn und Muskel, was sich z.B. durch die ¹H-Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS) nachweisen lässt (Stöckler-Ipsiroglu et al. 2014, Rackayova et al. 2017).

2.3.1. AGAT-Defizienz

Die AGAT-Defizienz wurde 2001 zum ersten Mal beschrieben und ist gekennzeichnet durch sehr geringe GAA-Konzentrationen in Plasma, Urin und Liquor (Item et al. 2001, Stöckler-Ipsiroglu 2009). Diese genetische Störung ist sehr selten. Bisher wurden weniger als 20 Patienten mit einem AGAT-Defekt beschrieben (Fernandes-Pirez et al. 2022). Klinisch auffällig werden die Patienten durch mentale Retardierung, Myopathien und Sprachentwicklungsverzögerungen (Carducci et al. 2002).

AGAT-defiziente Patienten zeigen eine deutliche Besserung der Symptomatik nach oraler Kreatinsubstitution. Dabei müssen Kreatindosen von 200-400 mg Cr/kg/Tag verabreicht werden, was etwa dem 50- bis 100-fachen der normalen Ernährung entspricht (Stöckler et al. 1996, Stöckler-Ipsiroglu et al. 2015). Die hochdosierte Kreatingabe führt zu einem Anstieg des Kreatinspiegels in Hirn und

damit einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome (Stöckler-Ipsiroglu und van Karnebeek 2014, Stöckler-Ipsiroglu et al. 2015).

Das Knockout-Mausmodell für den AGAT-Defekt zeigt ein reduziertes Körpergewicht mit reduziertem Fettgehalt, eine erhöhte Glukosetoleranz und einen Schutz vor metabolischem Syndrom bei Adipositas, was auf eine Cr-abhängige Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) zurückzuführen ist (Choe et al. 2013a). Außerdem zeigen die Tiere ausgeprägtere neurologische Defizite und zerebrale Schäden nach ischämischen Schlaganfällen, was allerdings nicht auf den Kreatinmangel, sondern auf die fehlende Homoargininproduktion zurückzuführen ist (Choe et al. 2013b).

2.3.2. GAMT-Defizienz

Die GAMT-Defizienz wurde 1994 zum ersten Mal beschrieben und seither über 120-mal dokumentiert (Stöckler et al. 1994, Fernandes-Pirez et al. 2022). Während die Konzentration des GAA in Plasma, Urin und Liquor deutlich erhöht ist, lässt sich eine Erniedrigung von Kreatin und Kreatinin nachweisen. Die GAMT-Defizienz äußert sich durch ein komplexes Krankheitsbild, das oftmals gekennzeichnet ist durch eine therapieresistente Epilepsie und autistisches Verhalten. Dies liegt nicht nur an den niedrigen Kreatinspiegeln, sondern auch an der erhöhten Konzentration von GAA. GAA ist neurotoxisch und wirkt epileptogen (Sykut-Cegielska et al. 2004, Mercimek-Mahmotoglu et al. 2006). Patienten mit schwerer GAMT-Defizienz entwickeln häufig schon in den ersten Lebensmonaten eine progressive Enzephalomyopathie, die einhergeht mit Bewegungsstörung, fehlender Sprachentwicklung, Schluckstörung, mentaler Retardierung, Entwicklungsverzögerung, Epilepsie und autoaggressivem Verhalten (Stöckler et al. 1994).

Die orale Kreatinsubstitution führt bei GAMT-defizienten Patienten zu einer Abnahme der GAA-Konzentration, was auf die negative Rückkopplung der AGAT-Aktivität zurückzuführen ist (Edison et al. 2007). Klinisch zeigt sich eine deutliche Besserung in den Bereichen Verhalten, Sprache und Bewegung sowie eine Abnahme epileptischer Anfälle. Eine Abnahme der GAA-Konzentration kann

auch durch Ornithingabe und/oder Argininrestriktion erreicht werden, da auch dies die AGAT-Aktivität hemmt. In einigen Ländern wurde ein Neugeborenencreening der GAMT-Defizienz etabliert (z.Z. in Australien, New York, Canada und Teilen der USA), sodass Betroffene schon früh durch erhöhte GAA-Spiegel diagnostiziert und therapiert werden können (Schulze et al. 2001, Pasquali et al. 2014).

Im KO-Mausmodell zeigen die GAMT-defizienten Tiere eine erhöhte GAA-Konzentration, niedrige Kreatin- und Kreatininspiegel und reduziertes Körpergewicht. Die Tiere haben Bewegungsstörungen und muskuläre Hypotonie. Interessanterweise zeigen GAMT-KO-Tiere keine Epilepsien und keine kognitiven Beeinträchtigungen (Schmidt et al. 2004, Torremans et al. 2005, Rossi et al. 2021).

2.3.3. Ct1-Defizienz

Die X-chromosomal vererbte Ct1-Defizienz ist seit 2001 bekannt (Salomons et al. 2001) und kann bei etwa 1-2 Prozent der mentalen Entwicklungsverzögerungen bei männlichen Patienten nachgewiesen werden (Fernandez-Pires et al. 2022). Sie manifestiert sich klinisch bei männlichen Betroffenen durch mentale Retardierung, Autismus und verlangsamte Sprachentwicklung, während heterozygote Frauen meist asymptomatisch sind oder nur Lernschwierigkeiten und leichte geistige Behinderungen aufweisen (Braissant et al. 2011). Einige Patienten zeigen Epilepsien, Verhaltensstörungen, reduzierte Muskelmasse oder gastrointestinale Begleitsymptome wie Diarrhoen (Stöckler-Ipsiroglu und van Karnebeek 2014). In der Echokardiographie zeigen sich abnormale Befunde in Form von reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion sowie verlängerte QT-Intervalle im Elektrokardiogramm, einhergehend mit einem erhöhten Risiko für plötzlichen Herztod (Levin et al. 2021).

Im Plasma von Ct1-defizienten Patienten finden sich normale Cr- und GAA-Konzentrationen. Da weniger Kreatinin aus der Muskulatur anfällt und zugleich Cr nicht in der Niere rückresorbiert werden kann, lässt sich die Diagnose über eine erhöhte Ratio von Kreatin zu Kreatinin im Urin stellen. In der ¹H-Magnetresonanz-Spektroskopie lässt sich ein erniedrigter Kreatinspiegel im Hirn

verzeichnen, während sich im Liquor ein normaler Kreatinspiegel zeigt (Braissant et al. 2010). Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass im Hirn ein Teil des benötigten Cr mit Hilfe von AGAT und GAMT selbst synthetisiert wird. Zwar werden sowohl AGAT als auch GAMT im Hirn exprimiert, allerdings findet in den meisten Zellen keine Koexpression der beiden Synthesepoteine in denselben Zellen des Hirns statt, sodass das GAA von AGAT- zu GAMT-exprimierenden Zellen transportiert werden müsste. Dieser Transport erfolgt vermutlich durch denselben Transporter wie für Cr, nämlich dem SLC6A8, was bei Ct1-Defizienz in einem erniedrigten Kreatinspiegel im Hirn resultiert. Nur im Kortex und in den Basalganglien finden sich Zellen, die AGAT und GAMT koexprimieren, was im Liquor normale Kreatinspiegel erklären könnte (Braissant et al. 2008, Braissant 2012).

Bisher wurde keine effektive Therapie für die Ct1-Defizienz entwickelt. Während die orale Kreatingabe bei Patienten mit AGAT- und GAMT-Defizienz zu einer Normalisierung der Kreatinspiegel im Hirn und damit zu einer Verbesserung der Symptomatik führt, hat dieser Therapieansatz meist nur geringe Erfolge bei Patienten mit Ct1-Defizienz (Stöckler-Ipsiroglu und van Karnebeek 2014). Der Ct1 scheint der einzige Weg zu sein, Cr über die Membran in die Zellen zu transportieren und die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu passieren, um das Gehirn mit Cr zu versorgen (Braissant et al. 2012).

Im KO-Modell weisen die Ct1-defizienten Tiere reduziertes Körpergewicht und einen geringeren Body Mass Index auf. Sie zeigen muskuläre Schwäche, Atrophie und Hypotonie. Analog zu den AGAT-defizienten Tieren weisen die Ct1-defizienten Mäuse eine erhöhte Glukosetoleranz und einen Schutz vor metabolischem Syndrom auf (Choe et al. 2013b, Stockebrand et al. 2018).

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Abi Prism 7900 HT	Life Technologies, Carlsbad, USA
Autoklav	Integra Biosciences, Konstanz
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
Eismaschine AF-20	Kälte Kurz Shopping GmbH & Co. KG, Filderstadt
Elektrophorese Gelkammer	Peqlab, Erlangen
Kühlgeräte	4 °C Privileg, Frankfurt am Main -20 °C Liebherr, Ochsenhausen -80 °C Colora, Württ
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mischgerät	Heidolph, Schwabach
Photometer	BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	MembraPure, Berlin
RNA-Kit (5067-151)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Trockenschrank Heraeus	Kendro Laboratory Products, Hanau
Zentrifugen	Laborzentrifuge 5424/5430R Kühlzentrifuge 5415C 96-Well-Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg

3.1.2. Software

Adobe Acrobat	Adobe Systems, Delaware, USA
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems, Delaware, USA
DNASTAR Lasergene 8	Madison, WI 53705 USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Redmont, USA
Relative Expression Software Tool	QIAGEN, Venlo, Niederlande
SDS 2.4	Thermo Scientific, Waltham, MA USA 02451

3.1.3. Chemikalien

Agarose	Life Technologies, Carlsbad, USA
Chloroform (3313.4)	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma, Perth, Australien
TRIzol [®] Reagenz	Life Technologies, Carlsbad, USA
EGTA	3054.1, Roth, Karlsruhe
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
HEPES	6763.1, Roth, Karlsruhe
Isopropanol (7343.2)	Roth, Karlsruhe
KCl	6781.3, Roth, Karlsruhe
KOH	Sigma, Perth, Australien
MgCl ₂	KK36.1, Roth, Karlsruhe
Midori Green	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
RNase freies Wasser	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.1.3. Enzyme und Reagenzien

dNTP	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
------	--

DreamTaq Polymerase	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DTT	Life Technologies, Carlsbad, USA
First Strand Buffer	Life Technologies, Carlsbad, USA
High Pure PCR Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Random Primer	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNAse ZAP 250 ml	AM9780, Life Technologies, Carlsbad, USA
RNAsin	Promega, Mannheim
Super Script	Life Technologies, Carlsbad, USA
Turbo DNA-free Kit	AM1907, Life Technologies, Carlsbad, USA
2x Taqman mastermix	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
10x PCR Puffer	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
20x Target Primers and Probe	Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.4. Verbrauchsmaterial

10 µl, 100 µl, 1000 µl Pipetten	Eppendorf, Hamburg
96 Well Platte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
15 ml, 50 ml Röhren	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
0,2, 1,5, 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.2. Methoden

3.2.1. Knockout-Mäuse

Unter dem Tierversuchsantrag TVA 86/12 (Choe/Neu: Charakterisierung Kreatintransporter-defizienter Mäuse) wurden die Organe für die Versuche in dieser Arbeit entnommen. Die Mäuse entstammen dem C57/BL6-Stamm. AGAT- und GAMT- defiziente Mäuse wurden durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert (Choe et al. 2013, Schmidt et al. 2004). Ct1-defiziente Mäuse wurden mit Hilfe von Stammzellen des National Institute of Health Knockout Mouse Programms generiert (Stockebrand et al. 2018).

3.2.2. RNA-Isolation

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurden Organe folgender Maus-Genotypen entnommen: AGAT-KO, GAMT-KO, Ct1-KO und AGAT-WT, GAMT-WT, Ct1-WT. Es wurden drei Tiere der jeweiligen KO-Genotypen präpariert und jeweils ein WT-Geschwistertier als Kontrolle, sodass mit Organen von 12 Tieren gearbeitet werden konnte.

Es wurden von PD Dr. Axel Neu nach Isofluran-Anästhesie und Dekapitation die Organe Hirn, Herz, Leber, Niere und Skelettmuskulatur aus den Oberschenkeln (M. quadriceps femoris) entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Organe bei -80 °C bis zur RNA-Isolation gelagert.

Vor der RNA-Isolation wurden die Organe mit einem Dispergiergerät (ULTRA-TURRAX®) homogenisiert. Für die Isolation der RNA wurde nach dem TRIzol Reagent® - Protokoll der Firma Invitrogen gearbeitet (lifetechnologies 2010).

TRIzol® enthält Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert und gleichzeitig RNAsen und andere Enzyme inaktiviert. In dem enthaltenen Phenol löst sich die RNA. Die Phasentrennung erfolgt durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation. Danach sind drei Phasen zu erkennen: die obere wässrige Phase enthält RNA, die Interphase DNA und die untere Chloroformphase enthält Proteine. Die RNA wird anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Nach zwei Waschschritten mit Ethanol wird die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst und für die weitere Qualitätskontrolle (3.2.3.) auf Eis gelagert.

Benötigte Materialien für die RNA-Isolierung, die nicht im TRIzol®-Kit enthalten sind, finden sich in Tab. 3.1; eine ausführliche Beschreibung des Protokolls findet sich im TRIzol® Reagent Manual (lifetechnologies).

Tabelle 3.1: Benötigte Materialien für die RNA-Isolierung

RNA-Isolierung
Ultra-Turrax
Chloroform
Isopropyl Alkohol
75 % Ethanol (DEPC- behandeltes Wasser)
RNase freies Wasser
Zentrifuge
Mikrozentrifugen Reaktionsgefäße
Wasserbad oder Hitzeblock (58 °C)

3.2.3. Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Die Qualitätskontrolle (Integrität) der isolierten Gesamt-RNA aus den einzelnen Organen wurde mit dem Bioanalyzer 2100 der Firma Agilent durchgeführt. Sie beruht auf der Kapillar-Elektrophorese per Lab-on-Chip-Technologie, bei der die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA sowie fragmentierte RNAs der Größe nach aufgetrennt und visualisiert werden (Mueller und Lightfoot, 2016). Als Kriterien der Integrität und Intaktheit dienen der berechnete 28S/18S-rRNA-Quotient (maximaler Quotient von 2,0) sowie die RNA Integrity Number (RIN, maximal 10,0). In einem Elektropherogramm und als virtuelles Gelbild werden die Ergebnisse dargestellt, wobei sowohl der 28S/18S-rRNA-Quotient als auch die RIN bei der Analyse der RNA-Qualität berücksichtigt werden (Abb. 3.1). Eine RIN von 10 repräsentiert eine RNA von hoher Qualität, die intakt und nicht fragmentiert ist, während 1 eine komplett degradierte und fragmentierte RNA darstellt. Als Grenzwert für qualitativ hochwertige RNA wurde in dieser Arbeit eine RIN von 7,5 gesetzt. RNA, deren RIN-Wert unter 7,5 lag, wurde für die weiteren Experimente nicht verwendet. Nach den *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines* (Becker et al. 2009)

wird bei der Durchführung von qPCR-Experimenten eine Sicherstellung von RIN-Werten über 5 empfohlen, da ansonsten die Gefahr von unzuverlässigen Ergebnissen besteht (Becker et al. 2009). Eine genaue Beschreibung des Protokolls findet sich im Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide von Agilent Technologies.

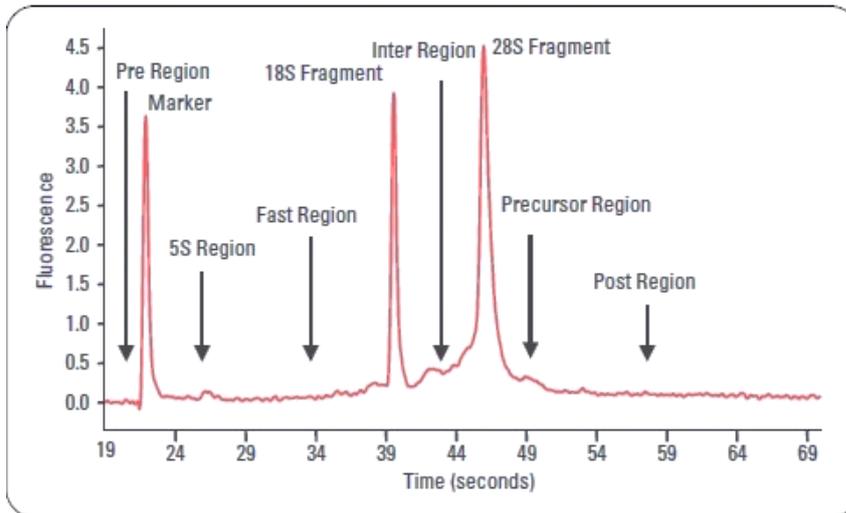


Abbildung 3.1: Bestimmung der RNA-Qualität (aus: Agilent Technologies, RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control)
 Aufgetragen ist die Fluoreszenz gegen die Zeit. Zu sehen ist die Markerbande, die 5S rRNA Bande sowie die 18S- und 28S-rRNA Bande.

3.2.4. Aufreinigung der RNA

Bevor die mRNA revers transkribiert wurde, wurde mit dem TURBO DNA-free Kit der Firma life technologies nach Protokoll eine Aufreinigung der RNA durchgeführt, um die RNA von genomischer DNA zu befreien. Die gereinigte RNA konnte direkt für die nachfolgende reverse Transkription verwendet werden.

3.2.5. cDNA-Synthese, reverse Transkription

Nachdem die Qualität der hergestellten Gesamt-RNA anhand des Bioanalyzers bestimmt und die RNA per DNase-Verdau aufgereinigt wurde, wurde aus der mRNA die komplementäre DNA synthetisiert. Für die Reverse Transkription wurden folgende Reagenzien in dünnwandige 0,5 ml Mikrozentrifugen Reagenzgefäße pipettiert:

Tabelle 3.2: Reagenzien für die reverse Transkription (1)

Komponente	Konzentration	Volumen
RNA	5 µg/µl	X µl
Random Primer	250 ng	1 µl
dNTP	10 nM	1 µl
Nuklease freies Wasser		Bis Volumen von 13 µl erreicht ist

Dieser Ansatz wurde zentrifugiert, für 5 min bei 65 °C im Thermocycler behandelt und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

Tabelle 3.3: Reagenzien für die reverse Transkription (2)

Komponente	Konzentration	Volumen
5x First Strand Buffer	5x konzentriert	4 µl
DTT	0,1 M	2 µl
Super Script III	200 U/µl	1 µl

Nachdem der Ansatz wieder zentrifugiert wurde, wurde er für 2 min bei 25 °C behandelt, für 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C und die fertige cDNA bei -20 °C eingefroren.

3.2.6. cDNA-Aufreinigung

Um für die qPCR nur qualitativ hochwertige cDNA zu verwenden, wurde eine DNA-Aufreinigung nach Protokoll des High Pure PCR Product Purification Kit der Firma Roche durchgeführt. Die Reinigung der DNA erfolgte über Anionen-Austauscher-Säulen, bei denen die negativ geladene DNA an positiv geladene Gruppen des Säulenmaterials bindet und erst ab einer bestimmten Salzkonzentration im verwendeten Puffer gelöst wird. Abschließend wurde die DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers gelöst.

3.2.7. Konzentrationsbestimmung

Vor der Durchführung der qPCR wurde die Konzentration der DNA bestimmt, um in der qPCR dieselben Reaktionsbedingungen für alle genetischen Hintergründe zu schaffen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Eppendorf

BioPhotometer Plus, das die Absorption (A) der DNA bei 260, 230 und 280 nm bestimmt. Dabei gilt für eine reine DNA:

$$\left| \begin{array}{l} A_{260/280} = 1,8-2,0; A_{260/230} \geq 2,0 \\ (Arnemann, 2019) \end{array} \right|$$

Anhand der ermittelten Konzentration der DNA wurde diese für die anschließende qPCR auf 20 ng/µl verdünnt.

3.2.8. Gelelektrophorese

Für die Detektion der PCR-Produkte wurden Agarosegel-Elektrophoresen nach Standardprotokoll durchgeführt.

Es wurde TAE-Puffer in folgender Zusammensetzung verwendet: 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA.

3.2.9. PCR-Nachweis der Zielgene

Es wurden im Rahmen der Untersuchung der Expression von AGAT, GAMT und des Ct1 Primer nach Ireland et al. (2009, Tab. 3.4) ausgewählt, die der Detektion des entsprechenden Gens in der Wildtyp-cDNA dienten und deren Annealingtemperatur bei 55,2 – 65,1 °C lag. Der Nachweis erfolgte nach PCR-Standardprotokoll. Die Banden mit berechneter DNA-Größe (100-150 µg/nl DNA) in der Wildtyp-Kontrolle bzw. das Fehlen der Banden bei entsprechender KO-cDNA wurden auf einem zweiprozentigen Agarosegel mittels Gelelektrophorese dargestellt.

Tabelle 3.4: Sequenzen für Vorwärts- und Rückwärtsprimer der untersuchten Gene (modifiziert nach Ireland et al. 2009)

Gen	Vorwärtsprimer-Sequenz	Rückwärtsprimer-Sequenz
Ct1	5'-tgacacgcacctgcaaat-3'	5'-tgtgatcatctgaggaagg-3'
AGAT	5'-aagaaggctgttgctgaggt-3'	5'-acgttcatggaaagccattt-3'
GAMT	5'-acagccctaggcagctacaat-3'	5'-caaaggatgagctggtgatgt-3'

3.2.10. Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Veränderung der Expression der Zielgene AGAT, GAMT und Ct1 in den KO-Mäusen wurde mit quantitativer PCR (qPCR) untersucht und mit Hilfe des Programms Relative Expression Software Tool (REST) ausgewertet. Die qPCR erlaubt es, die PCR mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während ihres Ablaufs in Echtzeit zu überwachen. Das Signal der Fluoreszenzfarbstoffe korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und wird in Echtzeit dargestellt (Gibson et al. 1996). Dabei wird die Expression des Zielgens mit der eines Referenzgens normalisiert (Pfaffl 2004, 3.2.11.). Es wurden für die Durchführung der Versuche fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische TaqMan-Sonden eingesetzt, die die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase nutzen. Die TaqMan-Sonden waren zu einem Abschnitt der zu analysierenden cDNA komplementär und stammen aus dem Invitrogen-Labor (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: *Primer und Accession Numbers* (ThermoFischer scientific)

Gen	Accession Number	Exon	Ampliconlänge
AGAT	Mm00491882_m1	7-8	97
GAMT	Mm00487476_g1	4-5	89
Ct1	Mm00506029_g1	7-8	65
18 S rRNA	X03205-1	1-1	187
RPL27	Mm01245874_g1	2-3	57

Die TaqMan-Sonden sind am 3'-Ende mit dem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff FAM bzw. VIC markiert und enthalten den Referenz-Farbstoff ROX sowie am 5'-Ende einen Quencher („Löcher“, 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA)), der die vom Farbstoff abgestrahlte Fluoreszenz supprimiert (Kanmogne, 2014). Der passive Referenzfarbstoff ROX wurde zu allen Reaktionsansätzen in gleicher Menge gegeben, um die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs zu normalisieren.

Abbildung 3.2 zeigt das Prinzip der qPCR. Wenn die Taq-Polymerase, die eine 5'-3'-Nukleaseaktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Quencher und Reporter voneinander und eine Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden, da die Unterdrückung durch den Quencher wegfällt. Dabei ist die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz proportional zur Entstehung der PCR-Produkte (Kanmogne 2014).

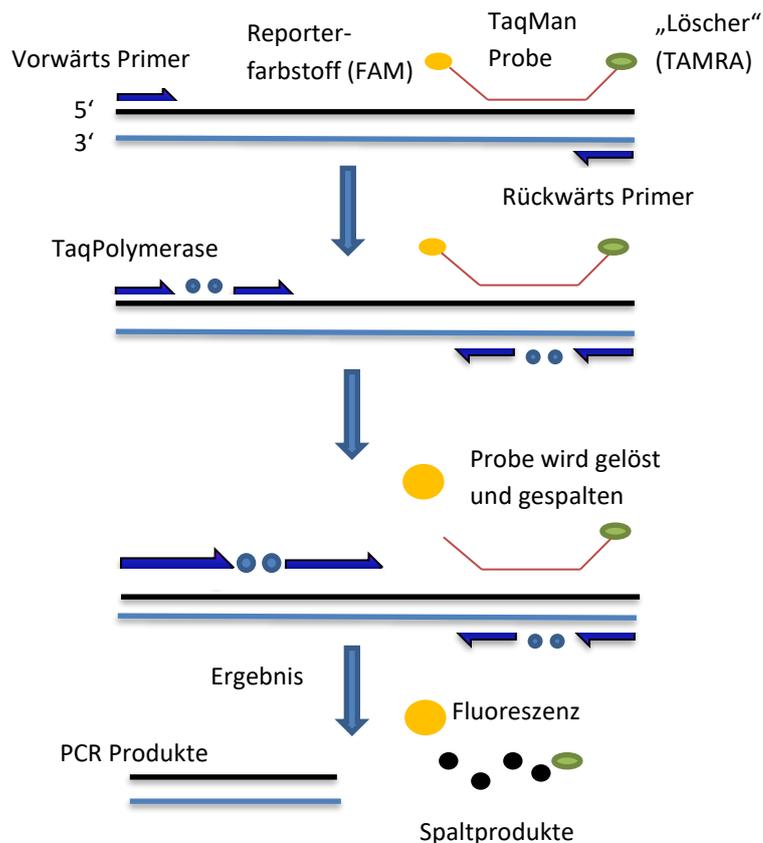


Abbildung 3.2: Prinzip der Real-Time PCR

Der Abbau der Sonde durch die Taq-Polymerase die Sonde führt dazu, dass sich Quencher und Reporter voneinander entfernen und eine Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann.

Mit Hilfe des ABI Prism Detektionssystems (Applied Biosystems) und der Software *Sequence Detection System* (SDS) wird aus den ermittelten Fluoreszenzwerten eine Amplifikationsgrafik erstellt.

Die eigentliche qPCR erfolgte auf einer 96-Well-Platte, in die die untersuchte DNA-Probe und die Zielgene mit den Referenzgenen pipettiert wurden (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Materialien und Volumen für die PCR

Reagenzien	Volumen/Tube (µl)
2x TaqMan mastermix	12,5
20x Target Primer und Probe	1,25
RNAse freies Wasser	10,25
cDNA	1
Gesamtvolumen	25

Auf einer 96-Well Platte konnte die cDNA jeweils eines Organs auf allen zu untersuchenden genetischen Hintergründen mit beiden Referenzgenen untersucht werden, sodass $5 \times 96 = 480$ Wells für die Untersuchung aller Organe beladen wurden. Es wurden repräsentative Mischproben (Pool) erstellt, die sich aus der cDNA der Knockout-Tiere zusammensetzten (3x AGAT-KO, 3x GAMT-KO und 3x Ct1-KO zu jeweils einer Probe gepoolt) und auf eine Konzentration von jeweils $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt.

Vor der Beladung der 96-Well-Platte wurde ein Mastermix aus 2xTaqMan mastermix, 20x Primer und dem RNAse freien Wasser für diejenigen Proben hergestellt, die mit demselben Primer untersucht werden sollten. Bei Beladung eines Wells mit sowohl Ziel- als auch Referenzgen (3.2.11.) wurden je $1,25 \mu\text{l}$ Probe und $9 \mu\text{l}$ RNAse freies Wasser verwendet. Die PCR-Amplifikationsschritte sind in Abbildung 3.3 dargestellt.



Abbildung 3.3: qPCR-Amplifikationsschritte

Der Thermocycler wurde für 40 Zyklen zu den angegebenen Temperaturen und Zeiten programmiert

Eine zentrale Größe der qPCR ist der Threshold Cycle (Ct). Er ist der Punkt im Amplifikationszyklus, an dem die PCR in die exponentielle Phase übergeht und proportional zur Konzentration des Zielgens im Reaktionsansatz (Bustin et al. 2005). Dabei entspricht ein um eine Einheit geringerer Ct-Wert der doppelten Menge an eingesetzter cDNA bzw. überschreitet der Ct-Wert in einem Amplification Plot den Ct einen Zyklus später als in einem anderen Well, so ist davon auszugehen, dass die Startkopienzahl in diesem Well um die Hälfte niedriger war. Wenn der Ct zweimal größer ist, so war die Startkopienzahl vierfach niedriger (Pfaffl 2001). Für die Positiv-Kontrollen (Wildtyp) wurde ein Ct-Wert unter 30 als Grenze gesetzt. Es wurden *non template controls* als Negativ-Kontrollen durchgeführt.

Die Basislinie wurde automatisch von REST gesetzt. Die Basislinie nimmt Werte zwischen dem dritten Zyklus (Baseline Start) und dem Punkt an, an dem der erste Anstieg über das Basissignal hinaus sichtbar wird (Baseline Stop). Wenn man die gemessene Fluoreszenz mit der Basislinie und dem Referenzfarbstoff korrigiert, so entsteht das normalisierte Reportersignal ΔR_n . Der Verlauf des ΔR_n -Wertes über die Zeit wird als Amplification Plot bezeichnet (Real Time PCR Handbuch 2014).

Es wurde ein Schwellenwert von 0,2 gesetzt, um einen Wert zu erhalten, ab dem die Hintergrundfluoreszenz einer Probe gut von der eigentlich gemessenen Fluoreszenz zu unterscheiden ist.

Die Ergebnisse der qPCR wurden mit der Software REST ausgewertet und die Ct-Werte zur weiteren Analyse der Expressionsunterschiede verwendet. Die Software REST fasst die untersuchten Gene als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus den mittleren Expressionsunterschied der Gene unter Verwendung einer Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis of Variance*), normalisiert über Referenzgene (Pfaffl et al. 2002). Ebenso ermittelt die Software anhand des p-Wertes, mit welcher Signifikanz ein Unterschied vorliegt. Der Unterschied zwischen den Ct-Werten des Zielgens und des Referenzgens ergibt den ΔCt , mit dem anschließend der $\Delta\Delta Ct$ Wert berechnet wurde, der den Expressionsunterschied in KO- und WT-Gewebe angibt (Kozera und Rapacz, 2013). Dabei gilt

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{KO}) - \Delta Ct (\text{WT})$$

,wenn die Ergebnisse mit einem einzelnen Referenzgen normalisiert werden. Da in der vorliegenden Arbeit zwei Referenzgene zur Normalisierung herangezogen wurden, wurde die relative Expression durch Ermittlung des Mittelwertes der Konzentrationen der Referenzgene berechnet:

$$\text{Relative Expression} = \frac{\text{Konzentration des Zielgens}}{\text{Mittlere Konzentration der Referenzgene}}$$

(Qiagen REST 2009 Software User Guide)

REST berechnet die qPCR-Effizienzen für jedes Gen (3.2.12.), sodass die Ergebnisse bereits Effizienz-korrigiert dargestellt werden. Außerdem berechnet die Software das Signifikanzniveau und erstellt Boxplots zur Visualisierung der Ergebnisse.

Der relative Expressionsunterschied wurde anhand der Ct-Werte zusätzlich zu den Berechnungen durch REST nach folgender Formel berechnet:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

In Bezug auf die Effizienz wird in dieser Formel angenommen, dass das PCR-Produkt in jedem Zyklus verdoppelt wird und dass Zielgen und Referenzgen ähnliche Effizienzen zeigen. Daher wurden die Taqman-Sonden auf cDNA einer WT-Maus in den unterschiedlichen Organen getestet und die Effizienzen (E) berechnet, sodass folgende Formel zur Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) zwischen WT und KO unter Berücksichtigung der Referenzgene herangezogen wurde:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}} (\text{WT-KO})}}{E_{\text{Referenzgen}}^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen}} (\text{WT-KO})}}$$

3.2.11. Referenzgene 18S und Rpl67

Im Gegensatz zur PCR zur absoluten Quantifizierung werden bei der relativen qPCR nicht die absoluten Startkonzentrationen bestimmt, sondern das Zielgen wird auf ein zweites Gen bezogen. Dieses zweite Gen ist ein homogen exprimiertes Gen, das auch Referenzgen genannt wird und möglichst keinen internen oder externen regulatorischen Einflüssen unterliegt (Wiedemann et al. 2004). Diese Normalisierung dient der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da äußere Einflüsse das Zielgen und das Referenzgen gleichermaßen betreffen (Pfaffl 2004). Bei der Durchführung der Experimente für die vorliegende Arbeit wurde nach den MIQE Guidelines für qPCR vorgegangen, in denen mindestens zwei Referenzgene für qPCRs verlangt werden (Bustin et al. 2009). Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden mit den ribosomalen Proteinen 18S (Ampliconlänge 187) sowie Rpl27 (Ampliconlänge 57) als Referenzgene durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ribosomale Proteine unter verschiedenen äußeren Einflüssen in qPCR-Experimenten weitestgehend stabil exprimiert werden und sich sehr gut zur Normalisierung von qPCR-Ergebnissen eignen (Boda et al. 2009, Kuchipudi et al. 2012, Thomas et al. 2014).

3.2.12. Standardkurven

Vor der Durchführung der eigentlichen Experimente wurden die verwendeten Taqman-Sonden (Zielgene und Referenzgene) auf cDNA mit WT-Hintergrund getestet. Es wurden Standardkurven erstellt, um die Effizienz der PCR-Reaktionen zu ermitteln. Eine Effizienz von 100 % würde eine Verdoppelung der DNA Produktmenge mit jedem Zyklus bedeuten (Pfaffl 2004). Die errechnete Effizienz gibt Auskunft über die Präzision der qPCR.

Es wurden Verdünnungsreihen der cDNA jedes Organs von WT-Tieren erstellt und der Ct-Wert jeder cDNA-Konzentration in Triplikaten in einer qPCR-Reaktion ermittelt. Die Ct-Werte wurden gegen die Konzentration der cDNA aufgetragen und die errechnete Steigung der Standardkurve genutzt, um die Effizienz der Reaktion zu berechnen. Neben der Steigung erhält man außerdem den Korrelationskoeffizienten R, der einen Wert von maximal 1 annehmen kann und

angibt, wie adäquat sich die gemessenen Ct-Werte zur Standardkurve verhalten. Dabei erfüllen Werte über 0,99 die Kriterien für adäquate Ct-Werte (qPCR handbook, life technologies).

Aus den angegebenen Werten lässt sich die Effizienz der Reaktion nach folgender Formel berechnen:

$$\left| \begin{array}{c} \text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung}) - 1} \\ \text{(Pfaffl 2001)} \end{array} \right|$$

In den durchgeführten qPCR-Experimenten wurde eine Effizienz von 95-115 % erreicht, was einer Geradensteigung von -3 bis -3,45 entspricht.

Die Software REST berechnet die Effizienz nach obiger Formel und berechnet anschließend die Konzentrationen der Gene:

$$\left| \text{Konzentration} = \text{Effizienz}^{(\text{mittlerer WT-Ct} - \text{mittlerer KO-Ct})} \right|$$

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der drei an Kreatinsynthese und -transport beteiligten Gene AGAT, GAMT und Ct1 (SLC6A8) in Wildtyp-, AGAT-Knockout-, GAMT-Knockout- und Ct1-Knockout-Mauslinien (jeweils n=3) untersucht. Es wurde eine relative Quantifizierung der Zielgene mit Hilfe der Referenzgene 18S und Rpl27 vorgenommen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes in KO- und WT-Gewebe erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms REST. Für die Untersuchung wurden die Organe ausgewählt, in denen die Zielgene besonders stark exprimiert werden: Hirn, Herzmuskulatur, Leber, Niere und Skelettmuskulatur.

4.1. RNA-Qualitätsbestimmung

Vor der RNA-Qualitätsbestimmung wurden Organe folgender Maus-Genotypen entnommen und die Gesamt-RNA isoliert: AGAT-KO, GAMT-KO, Ct1-KO und

AGAT-WT, GAMT-WT, Ct1-WT. Es wurden drei Tiere der jeweiligen KO-Genotypen präpariert und jeweils ein WT-Geschwistertier der entsprechenden KO-Mauslinie, sodass mit Organen von 12 Tieren gearbeitet werden konnte.

Die Ergebnisse der RNA-Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyser wurden in einem Elektropherogramm und als virtuelles Gelbild dargestellt, wobei sowohl der 28S/18S-rRNA- Quotient als auch der RNA-Integritätswert (RIN) bei der Analyse der RNA-Qualität berücksichtigt werden (Abb. 4.1).

In Anlehnung an die Empfehlungen der MIQE-Guidelines (Becker et al. 2009) wurde nur RNA für die weitere Arbeit verwendet, die einen RIN-Wert höher als 7,5 aufwies (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: RIN-Werte der RNA aus präparierten Organen

	Hirn	Herz	Leber	Niere	Muskel
Ct1-KO 1	7,7	8,4	8,7	8,3	8,3
Ct1-KO 2	8,0	8,5	8,5	8,0	8,9
Ct1-KO 3	8,3	8,6	8,9	8,4	7,8
AGAT-KO 1	8,0	8,7	8,5	8,2	8,0
AGAT-KO 2	8,1	8,8	8,5	8,2	8,4
AGAT-KO 3	8,6	8,5	8,5	8,2	7,9
GAMT-KO 1	7,7	8,3	7,8	8,3	7,7
GAMT-KO 2	7,5	8,5	8,6	7,6	8,9
GAMT-KO 3	8,6	9,0	8,9	8,8	8,9
Ct1-WT	8,8	8,7	8,4	8,8	8,6
AGAT-WT	8,3	8,2	8,4	8,3	8,4
GAMT-WT	8,4	8,6	8,4	8,0	8,3

In Abbildung 4.1 ist ein repräsentatives Elektropherogramm einer verwendeten RNA-Probe dargestellt. Aufgetragen ist die Fluoreszenz Einheit (FU) gegen die Zeit. Die RNA stammt aus dem Hirngewebe einer WT-Maus und zeigt einen RIN-Wert von 8,6 und einen 28S/18S – rRNA-Quotienten von 1,8.

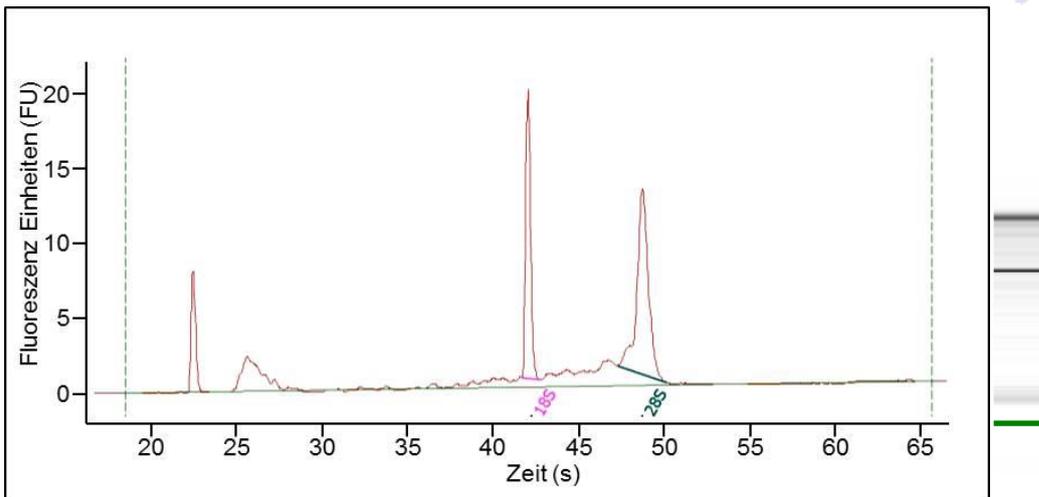


Abbildung 4.1: Links Elektropherogramm von isolierter Wildtyp-Hirn-RNA; RIN=8,6, Rechts entsprechendes virtuelles Agarosegel mit einem 28S/18S-rRNA-Quotienten von 1,8. Zu Beginn ist die Markerbande zu sehen, gefolgt von der 5S Bande und der 18S- und 28S-rRNA Bande.

4.2. Polymerase Ketten Reaktion, KO-Nachweis

Zur Überprüfung des Genotyps von Wildtyp- und KO-Tieren wurden exemplarisch Standard-PCRs mit genspezifischen Primern durchgeführt (Ireland et al. 2009, Tab. 3.4). Diese wurden in Geweben mit hoher Expression durchgeführt: im Fall von Ct1 auf der cDNA aus WT- und Ct1-KO-cDNA aus Hirngewebe, im Fall von AGAT auf der WT- und AGAT-KO-cDNA aus Niere und im Fall von GAMT auf der WT- und GAMT-KO-cDNA von Lebergewebe. In Abbildung 4.2 ist das Gel mit Größenstandard und PCR-Produkten auf den jeweiligen genetischen Hintergründen dargestellt. Die erwarteten Bandengrößen (Basenpaar, bp) waren Ct1: 988 bp, AGAT: 725 bp und GAMT: 601 bp.

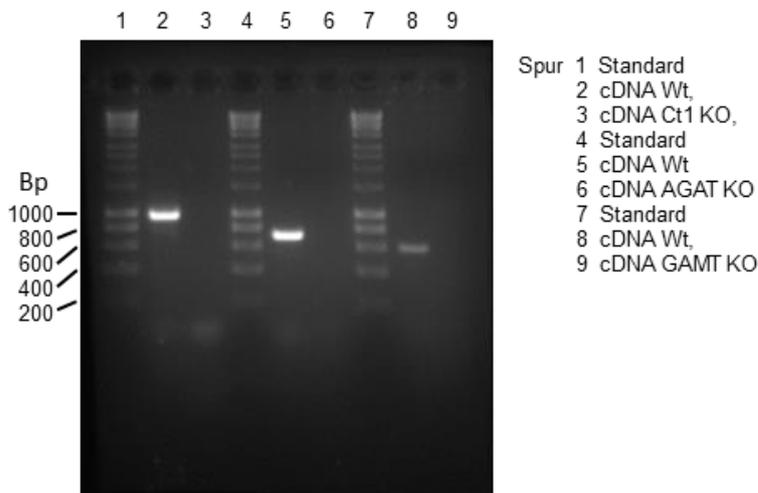


Abb. 4.2: Repräsentative PCR-Produkte auf cDNA aus den Organen Hirn, Niere und Leber von Wildtyp- und Knockout-Tieren mit genspezifischen Primer-Paaren nach Ireland et al. 2009. Erwartete Bandengrößen (bp): Ct1: 988 bp, AGAT: 725 bp und GAMT: 601 bp, Standard: Bioline 1 KB ladder.

Alle PCR-Produkte auf dem WT-Hintergrund entsprachen der erwarteten Größe, während auf der entsprechenden KO-cDNA keine Banden nachweisbar waren.

4.3. Quantitative Real-Time PCR

Die durchgeführten qPCRs wurden mit der Software REST 2009 ausgewertet. Mit Hilfe der Software wurden die Werte der untersuchten Gene AGAT, GAMT und Ct1 jeweils als Mittelwerte zusammengefasst und daraus der mittlere Expressionsunterschied der Gene berechnet, normalisiert über die Referenzgene 18S und Rpl27 (Pfaffl et al. 2002). REST ist auf die Auswertung von qPCR Daten spezialisiert und bedient sich den vom SDS angegebenen Ct-Werten und den errechneten Effizienzen, um den Expressionsunterschied der angegebenen Gene zu analysieren. Die relative Expression wird berechnet, indem die Konzentration des Zielgens ins Verhältnis zur mittleren Konzentration der Referenzgene gesetzt wird. Das angegebene Konfidenzintervall und der Standardfehler werden dann in einer Grafik visualisiert. Jedem untersuchten KO-Hintergrund wurde ein WT-Tier zugeordnet, mit dem die Veränderungen der Expression direkt verglichen wurden. Abbildung 4.3 zeigt beispielhaft ein durch REST erstelltes Amplification Plot. Zu sehen ist das normalisierte Reportersignal ΔR_n aufgetragen gegen die Zyklenzahl. Die eingesetzte Hirn-cDNA aus WT-

Mäusen (n=3) hatte eine Konzentration von 100-125 µg/nl und wurde in 1:5-Schritten fünfmal verdünnt. ΔRn stellt die Intensität des während des PCR-Laufs generierten, normalisierten Fluoreszenz-Signals dar. Der Schwellenwert wurde manuell in die exponentielle Phase gelegt (0,2) und dient der Bestimmung des Ct-Wertes bzw. der Zyklenzahl. Die Negativ-Kontrolle (*non template control*, ohne DNA) ist jenseits des messbaren Bereichs und wird nicht dargestellt.

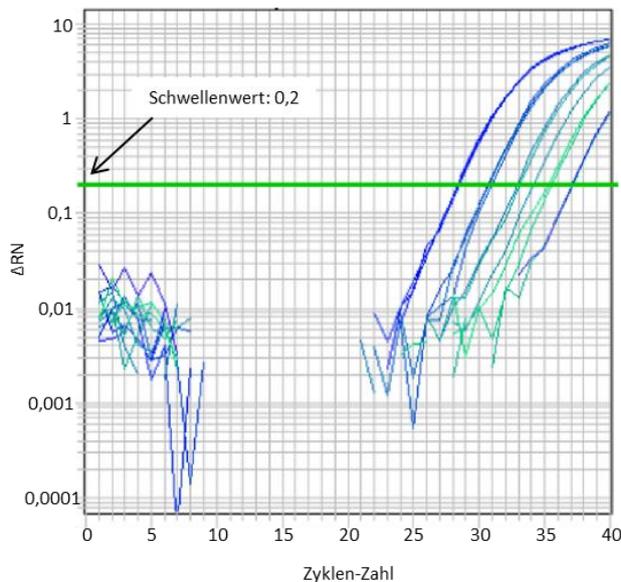


Abb. 4.3: Exemplarische Darstellung eines Amplification Plot mit Hirn-cDNA aus WT-Mäusen (n=3) mit ΔRn y-Achse und der Zyklus-Zahl auf der x-Achse. Die cDNA wurde in 1:5 Schritten verdünnt. Der Schwellenwert wurde manuell in bei 0,2 gesetzt. Die Basislinie wurde von REST automatisch gesetzt.

Vor der Durchführung der eigentlichen qPCR-Experimente wurden die verwendeten Taqman-Sonden (Zielgene und Referenzgene) auf gepoolter cDNA von WT-Mäusen (n=3) getestet. Es wurden Standardkurven erstellt, um die Effizienz der PCR-Reaktionen zu ermitteln. Abbildung 4.4 zeigt die Standardkurve aus gepoolter Herz-cDNA von WT-Mäusen.

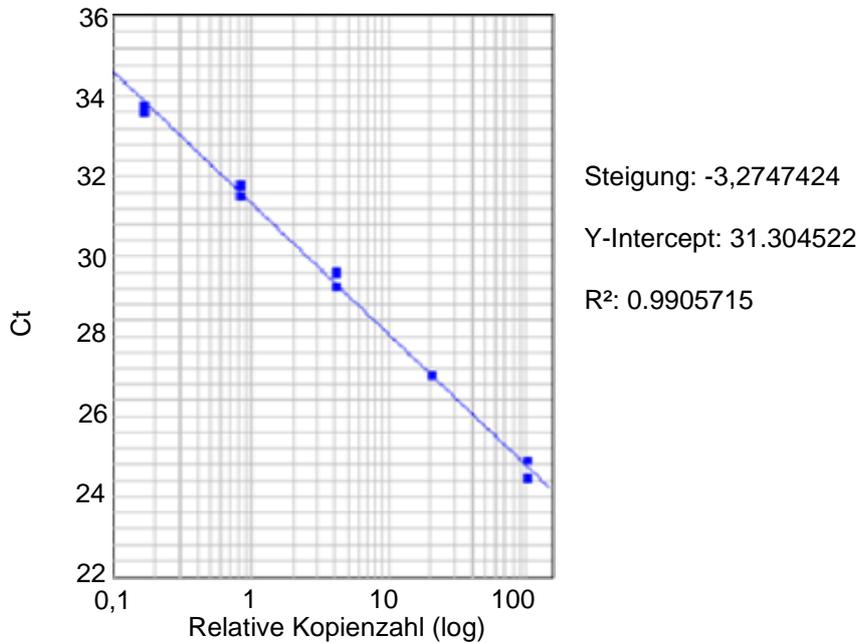


Abbildung 4.4: exemplarische Standardkurve aus gepoolter Herz-cDNA von WT-Mäusen (n=3) im Ct1-Assay; aufgetragen sind die Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Startkopienzahl.

Für die in Abbildung 4.4 dargestellte Reaktion gilt:

$$\left| \begin{array}{l} \text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung}) - 1} \\ \text{Effizienz} = 10^{(-1/3,27) - 1} = 1.022136170293009 \end{array} \right|$$

Dies entspricht einer Effizienz von 102 %.

Tabelle 4.2 zeigt die ermittelten Steigungen der Standardkurven und die berechneten Effizienzen mit gepoolter cDNA für die jeweiligen Organe der WT-Mäuse (n=3).

Tabelle 4.2: Steigungen (S) und Effizienzen (E) der untersuchten Gene AGAT, GAMT und Ct1 sowie der Referenzgene 18S und Rpl27 in gepoolter cDNA von WT-Mäusen (n=3)

	18S		Rpl 27		AGAT		GAMT		Ct1	
	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
Hirn	-3,38	0,99	-3,38	0,99	-3,1	1,10	-3,1	1,10	-3,34	0,99
Herz	-3,38	0,97	-3,3	1,01	-3	1,15	-3,4	0,97	-3,2	1,05
Leber	-3,3	1,00	-3,32	1,00	-3,18	1,06	-3,28	1,02	-3,1	1,10
Niere	-3,4	0,97	-3,45	0,95	-3,4	0,97	-3,1	1,10	-3,17	1,07
Muskel	-3,3	1,00	-3,32	1,00	-3,2	1,05	-3,28	1,02	-3,1	1,10

Für alle durchgeführten qPCR-Experimente wurde eine Effizienz von 95-115 % erreicht, was einer Geradensteigung von -3 bis -3,45 entspricht.

4.3.2. Quantitative Bestimmung des Expressionsunterschiedes der Ct1 und der GAMT in AGAT-WT- und AGAT-Knockout-Mäusen

Im Skelettmuskel- und Lebergewebe der AGAT-KO Mäuse (n=3) zeigt sich in den REST-Analysen eine stärkere Expression der GAMT. Im Skelettmuskelgewebe ist die GAMT-Expression 3,6-fach stärker als im WT, während sich im Lebergewebe eine 2-fach stärkere Expression zeigt. In Hirn, in der Herzmuskulatur und in der Niere ließ sich keine signifikante Änderung der Expression im Vergleich zum WT finden. In allen Organen bis auf die Niere konnte eine stärkere Expression der Ct1 in AGAT-KO Mäusen festgestellt werden. In Hirn zeigt sich eine 2,5-fach höhere Expression, in Herz eine 1,9-fach höhere Expression, in Leber eine 2-fach höhere Expression und im Skelettmuskel ist die Ct1-Expression 3,6-fach stärker im Vergleich zum WT. In Niere ließ sich keine signifikante Änderung der Expression des Ct1 im Vergleich zum WT feststellen ($p=0,193$).

Tabelle 4.4 zeigt eine Übersicht der Expressionsunterschiede der GAMT und des Ct1 in AGAT-KO-Mäusen. Der Expressionsunterschied ergibt sich aus den Ct-Werten der jeweiligen Organe in AGAT-KO-Mäusen, aus denen mit Hilfe des

Programms REST der mittlere Expressionsunterschied der Gene berechnet wurde, normalisiert über die Referenzgene 18S und Rpl27.

In Abbildung 4.5 ist die relative Expression der untersuchten Gene in Form von Boxplots dargestellt, die mit dem Programm REST erstellt wurden.

Tabelle 4.3: Expressionsunterschied der GAMT und des Ct1 in den Organen Hirn, Herz, Leber, Niere und Skelettmuskel in WT- und KO-Mäusen im AGAT-KO (n=3).

Der Expressionsunterschied ergibt sich aus dem mittleren Verhältnis von 18S/Rpl27, das mit den zuvor ermittelten Effizienzen berechnet wurde.

AGAT-Knockout	Hirn	Herz	Leber	Niere	Muskel
Gene	n-fache Expression				
GAMT	1,2 <i>p</i> =0,076	0,8 <i>p</i> =0,176	1,7 <i>p</i> =0,002	1,1 <i>p</i> =0,513	1,3 <i>p</i> =0,004
Ct1	2,5 <i>p</i> =0,001	1,9 <i>p</i> <0,001	2,0 <i>p</i> =0,001	1,2 <i>p</i> =0,193	3,6 <i>p</i> =0,08

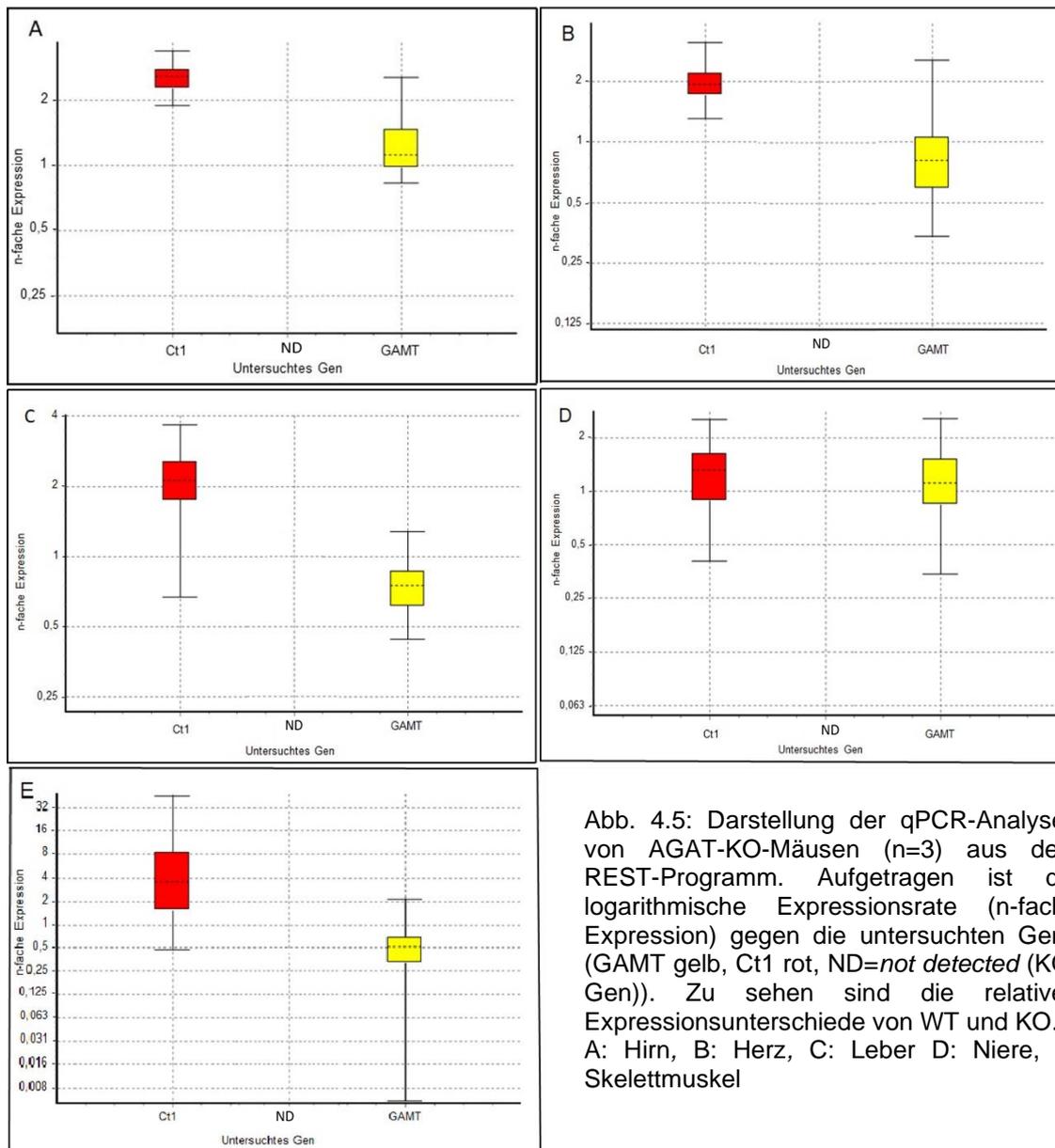


Abb. 4.5: Darstellung der qPCR-Analysen von AGAT-KO-Mäusen (n=3) aus dem REST-Programm. Aufgetragen ist die logarithmische Expressionsrate (n-fache Expression) gegen die untersuchten Gene (GAMT gelb, Ct1 rot, ND=not detected (KO-Gen)). Zu sehen sind die relativen Expressionsunterschiede von WT und KO. A: Hirn, B: Herz, C: Leber D: Niere, E: Skelettmuskel

4.3.3. Quantitative Bestimmung des Expressionsunterschiedes des Ct1 und der AGAT in GAMT-WT und GAMT-Knockout-Mäusen

In allen GAMT-KO-Tieren (n=3) wurde der Ct1 im Vergleich zum WT signifikant stärker exprimiert. In Hirn ist die Ct1-Expression 1,9-fach stärker als im WT, in Herz 1,3-fach. In der Leber zeigt sich die Ct1-Expression 1,8-fach stärker, in der Niere 2-fach und im Skelettmuskel 5,9-fach. In Hirn- und Muskelgewebe zeigt sich die Expression der AGAT im Vergleich zum WT 1,8- und 93-fach stärker exprimiert, im Herzmuskel, Leber und Niere hingegen nicht signifikant verändert. Tabelle 4.5 zeigt eine Übersicht der Expressionsunterschiede der AGAT und des

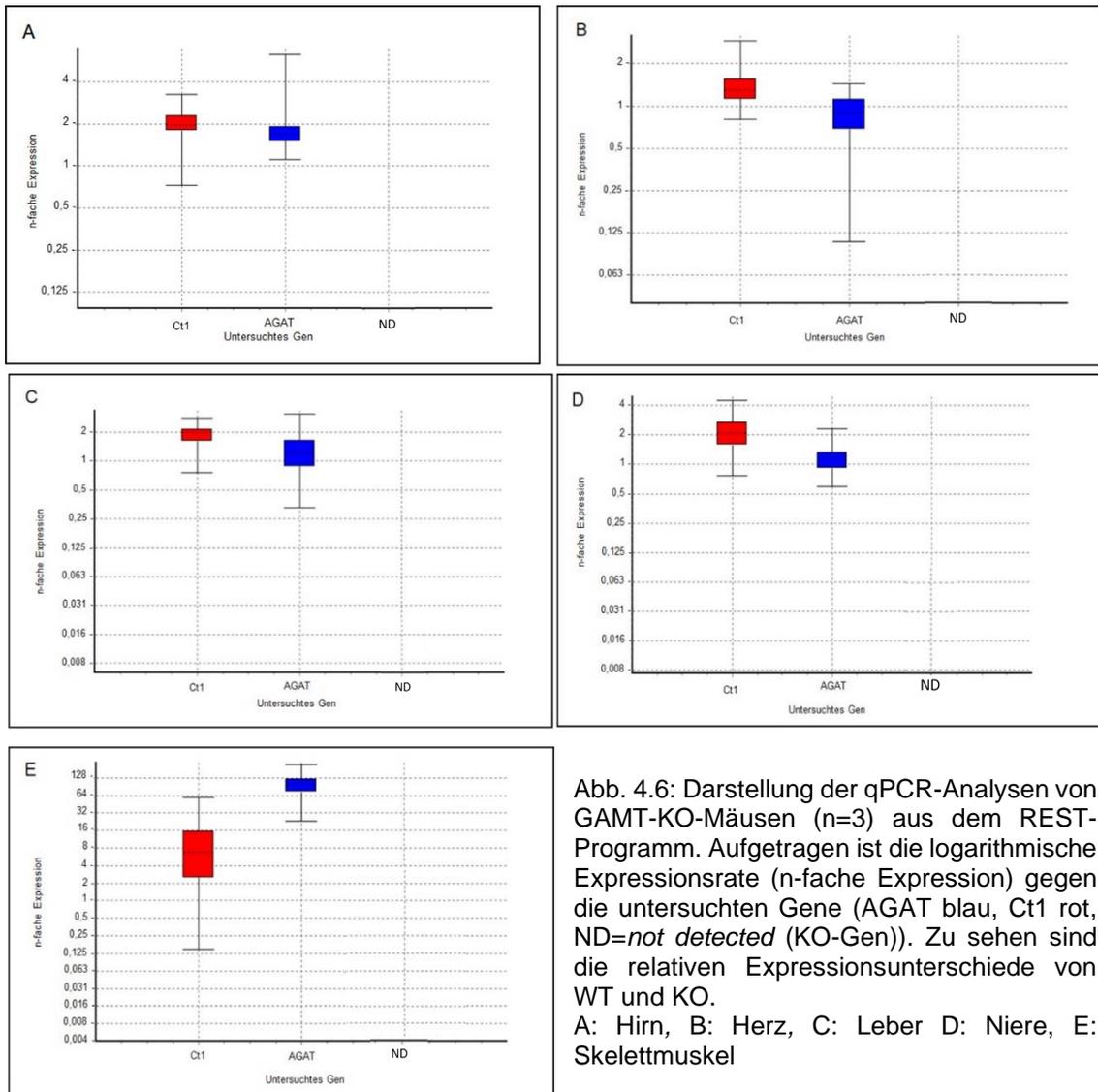
Ct1 in GAMT-KO-Mäusen. Der Expressionsunterschied ergibt sich aus den Ct-Werten der jeweiligen Organe in GAMT-KO-Mäusen, aus denen mit Hilfe des Programms REST der mittlere Expressionsunterschied der Gene berechnet wurde, normalisiert über die Referenzgene 18S und Rpl27.

In Abbildung 4.6 ist die relative Expression der untersuchten Gene in Form von Boxplots dargestellt, die mit dem Programm REST erstellt wurden.

Tabelle 4.4: Expressionsunterschied der AGAT und des Ct1 in den Organen Hirn, Herz, Leber, Niere und Skelettmuskel in WT- und KO-Mäusen im GAMT-KO (n=3).

Der Expressionsunterschied ergibt sich aus dem mittleren Verhältnis von 18S/Rpl27, das mit den zuvor ermittelten Effizienzen berechnet wurde.

GAMT-Knockout	Hirn	Herz	Leber	Niere	Muskel
Gene	n-fache Expression				
AGAT	1,8 <i>p</i> =0,001	0,7 <i>p</i> =0,206	1,1 <i>p</i> =0,298	1,1 <i>p</i> =0,347	93 <i>p</i> <0,001
Ct1	1,9 <i>p</i> =0,001	1,3 <i>p</i> =0,005	1,8 <i>p</i> <0,001	2,0 <i>p</i> <0,001	5,9 <i>p</i> =0,03



4.3.4. Quantitative Bestimmung des Expressionsunterschiedes der AGAT und GAMT in Ct1-WT- und -Knockout-Mäusen

In den Ct1-KO-Mäusen (n=3) zeigte sich bis auf Herz in allen Geweben eine stärkere Expression des AGAT-Gens im Vergleich zum WT. In Hirn und Skelettmuskel liegt die AGAT-Expression in Ct1-KO-Mäusen jeweils 1,2-fach höher als im WT, in der Leber 1,4-fach und in der Niere 24-fach. Im Herzmuskel zeigt sich eine 0,7-fach schwächere AGAT-Expression. Die GAMT-Expression zeigt sich in Hirn, Leber und Skelettmuskel nicht signifikant verändert. In der Niere ließ sich eine 1,4-fach stärkere Expression verzeichnen, während die Expression in Herz 0,6-fach schwächer war als im WT. Tabelle 4.6 zeigt eine

Übersicht der Expressionsunterschiede der AGAT und der GAMT in Ct1-KO-Mäusen. Der Expressionsunterschied ergibt sich aus den Ct-Werten der jeweiligen Organe in Ct1-KO-Mäusen, aus denen mit Hilfe des Programms REST der mittlere Expressionsunterschied der Gene berechnet wurde, normalisiert über die Referenzgene 18S und Rpl27.

In Abbildung 4.7 ist die relative Expression der untersuchten Gene in Form von Boxplots dargestellt, die mit dem Programm REST erstellt wurden.

Tabelle 4.5: Expressionsunterschied der AGAT und der GAMT in den Organen Hirn, Herz, Leber, Niere und Skelettmuskel in WT- und KO-Mäusen im Ct1-KO (n=3).

Der Expressionsunterschied ergibt sich aus dem mittleren Verhältnis von 18S/Rpl27, das mit den zuvor ermittelten Effizienzen berechnet wurde.

Ct1-Knockout	Hirn	Herz	Leber	Niere	Muskel
Gene	n-fache Expression				
AGAT	1,2 <i>p</i> =0,001	0,7 <i>p</i> =0,007	1,4 <i>p</i> =0,023	24 <i>p</i> <0,001	1,2 <i>p</i> <0,001
GAMT	0,9 <i>p</i> =0,654	0,6 <i>p</i> =0,003	0,7 <i>p</i> =0,813	1,4 <i>p</i> =0,018	0,5 <i>p</i> =0,174

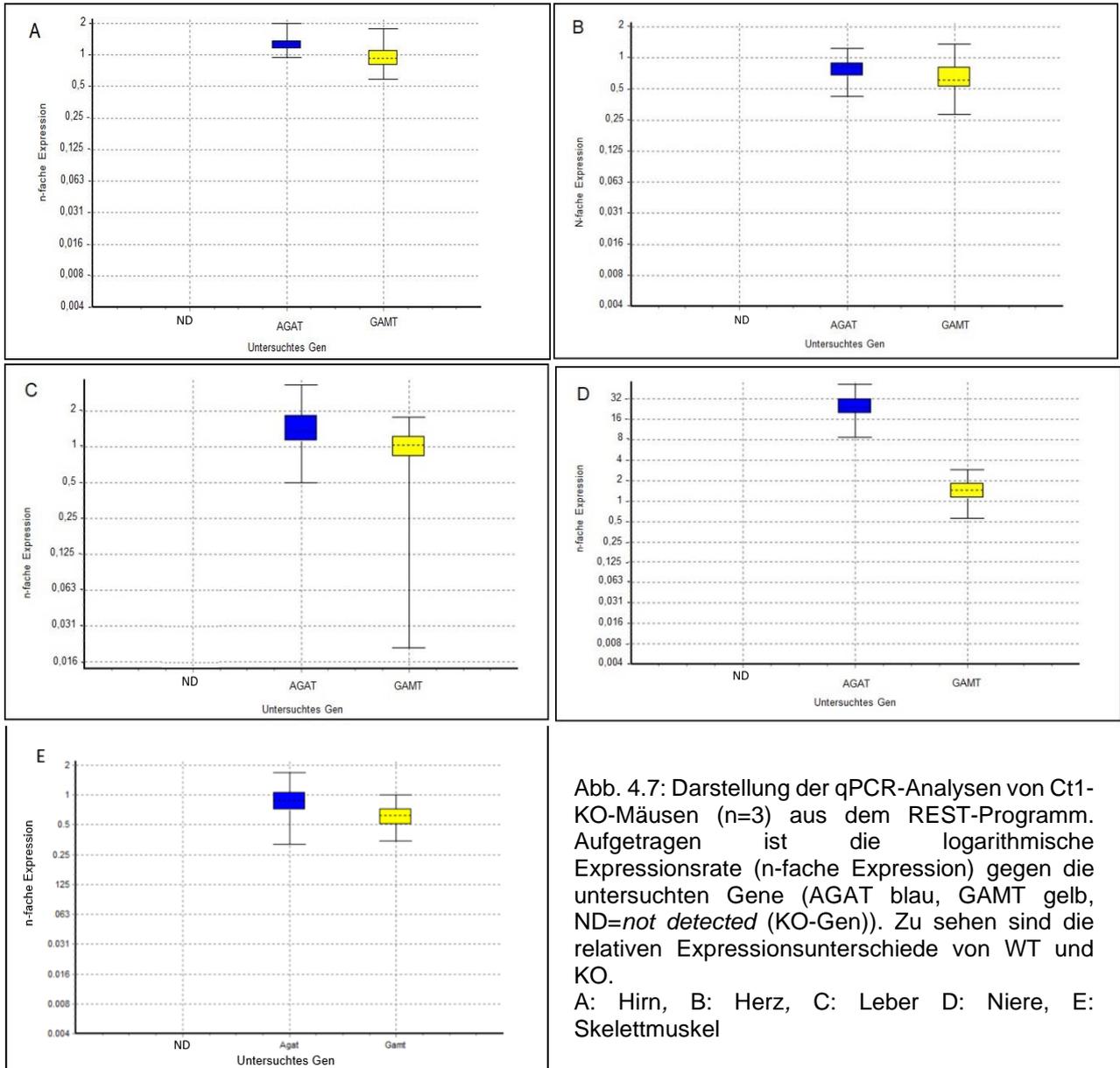


Abb. 4.7: Darstellung der qPCR-Analysen von Ct1-KO-Mäusen (n=3) aus dem REST-Programm. Aufgetragen ist die logarithmische Expressionsrate (n-fache Expression) gegen die untersuchten Gene (AGAT blau, GAMT gelb, ND=*not detected* (KO-Gen)). Zu sehen sind die relativen Expressionsunterschiede von WT und KO.
A: Hirn, B: Herz, C: Leber D: Niere, E: Skelettmuskel

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels qPCR die Expression der an der Kreatinsynthese und -transport beteiligten Gene AGAT, GAMT sowie Ct1 in verschiedenen Mauslinien auf RNA-Ebene in den expressionstarken Geweben Hirn, Skelettmuskulatur, Niere, Leber und Herzmuskulatur untersucht. Zur Durchführung der Untersuchungen standen KO-Mäuse (AGAT^{-/-}, GAMT^{-/-}, Ct1^{-/-}) zur Verfügung. Ziel war die Analyse der Regulation der Expression dieser Gene durch Defizienz der einzelnen Komponenten des Kreatinstoffwechsels in Mausmodellen.

Diskussion der Methoden

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden Organe folgender Genotypen präpariert: AGAT-KO, GAMT-KO, Ct1-KO und die entsprechenden Geschwistertiere AGAT-WT, GAMT-WT, Ct1-WT. Die Analyse der Expression der AGAT, GAMT und des Ct1 erfolgte in der vorliegenden Arbeit auf RNA-Ebene. Eine RNA-basierte Genexpressionsanalyse kann nach Aufreinigung der RNA mit verschiedenen Methoden erfolgen. Eine Möglichkeit stellt das *Northern Blotting* dar, bei der die RNA zunächst ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen wird (*Blotting*). Die gesuchte RNA wird durch markierte Sonden über komplementäre Bindung nachgewiesen (Murphy 1993). Aus der Intensität der Färbung kann auf die Konzentration der RNA geschlossen werden. Diese Methode ist zeit- und arbeitsintensiv und ermöglicht die Quantifizierung von lediglich einer bestimmten mRNA. Um mehrere Gene zu untersuchen, müssen mehrere Northern Blots simultan durchgeführt werden. Mit Einführung der *Differential Display* Methode war es möglich, ebendiese simultane Untersuchung mehrere Gene zu tätigen. Es handelt sich um eine PCR-basierte Methode, bei der eine Vielzahl von mRNA unter Verwendung von unspezifischen Primer amplifiziert werden (Liang und Pardee 1992). Auch diese Methode ist sehr zeit- und arbeitsintensiv und birgt die Gefahr von falsch negativen Ergebnissen, da zufällig gewählte Fragmente von cDNA-Molekülen vervielfältigt werden.

Eine weitere Methode stellt die halbquantitative real-time PCR dar, bei der nach reverser Transkription und Auswahl spezifischer Primer eine cDNA quantifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese dargestellt werden kann. Die Intensität der Bande des untersuchten Gens wird anschließend zur Bandenintensität eines Bezugsgens ins Verhältnis gesetzt (Kleppe et al. 1972, Mullis et al. 1986). Die Bandenintensität steigt jedoch nicht exponentiell mit der Templatekonzentration, sodass keine sehr genaue Quantifizierung möglich ist (halbquantitativ). Für eine exakte Quantifizierung müssen sich die Amplifizierungsraten des Kontrollgens und des untersuchten Gens im exponentiellen Bereich bewegen und sich kinetisch verfolgen lassen. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen real-time PCR ist ebendies möglich.

Um die Gene auch auf Proteinebene zu analysieren, müssen immunhistochemische Nachweise mit entsprechenden AGAT-, GAMT- und Ct1-Antikörpern erfolgen (beispielweise nach Braissant et al. 2005). Jedoch sind bisher keine Antikörper etabliert, die eine zuverlässige Untersuchung der Proteine ermöglichen. Daher wurden alle Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit auf RNA-Ebene getätigt.

Die Organe für die vorliegende Arbeit wurden bis zur RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C gelagert. Für die Isolation der RNA wurde nach dem TRIzol Reagent® - Protokoll der Firma Invitrogen gearbeitet (lifetechnologies 2010). Die Qualität der Gesamt-RNA hat bei jeglichen Genexpressionsexperimenten einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der qPCR. Durch ubiquitär vorkommende RNAsen ist die RNA der Gefahr einer Degradierung unterworfen, die wiederum Einfluss auf die Ergebnisse der qPCR hat (Fleige und Pfaffl 2006). RNAsen sind omniprésente Enzyme, die einen wichtigen Bestandteil des zellulären Stoffwechsels bilden, deren Einfluss aber die Qualität der RNA und damit die RIN beeinträchtigt (Beintema et al. 1988). Die Aktivität der RNAsen ist je nach Gewebetyp unterschiedlich; die RNase 1 wird im Pankreas synthetisiert, während der Syntheseort der RNase 2 und RNase 5 Milz und Leber sind (Yang et al. 2004, Garnett und Raines 2022). Je nach Gewebeprobe ist der Einfluss der RNAsen auf die Qualität und damit auf die RIN also unterschiedlich und muss bei der Handhabung und Analyse berücksichtigt

werden. Eine RIN höher als 5 wird für Gesamt-RNA empfohlen (Fleige und Pfaffl 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Proben verwendet, die einen RIN-Wert $\geq 7,5$ aufwiesen, sodass die Kriterien für das Arbeiten mit RNA von hoher Qualität und Integrität erfüllt wurden. Proben mit niedrigerer RIN als 7,5 wurden verworfen.

Vor der Durchführung der eigentlichen qPCR-Experimente wurden die verwendeten Taqman-Sonden (Zielgene und Referenzgene) auf cDNA von WT-Mäusen getestet und Standardkurven erstellt, um die Effizienz der PCR-Reaktionen zu ermitteln. Dabei kann die Berechnung der Effizienz mit verschiedenen Methoden erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung der Formel $\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ (Pfaffl 2001). Diese Methode weist Mängel auf, da sie probenindividuelle Unterschiede nicht berücksichtigt. Des Weiteren ergeben sich häufig Effizienzen von über 200 %, was nicht plausibel ist, da eine Effizienz von 100 % eine Verdoppelung der Startmenge mit jeder Reaktion bedeutet und eine Vervielfachung der Startmenge nicht möglich ist (Pfaffl 2004). Daher wird nach den *MIQE-Guidelines* das Ergebnis mit 1 subtrahiert, sodass sich Effizienzen nahe 100 % ergeben (Bustin et al. 2009). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, sodass sich Effizienzen nahe 100 % ergeben haben. Während für die Auswertung der qPCR mit REST die Berechnung der Effizienz nur fakultativ und nicht obligatorisch ist, da das Programm auch eigens berechnete Effizienzen erstellt, lassen sich in der Literatur verschiedene Empfehlungen für oder gegen eine effizienzkorrigierte Auswertung der qPCR-Ergebnisse finden (Pfaffl 2002, Rujter et al. 2009, Rujter et al. 2021). Die Effizienz einer einzelnen PCR unterliegt aufgrund der Heterogenität der Proben einer hohen Variabilität (Rujter et al., 2009). Gleichzeitig wird an die Autoren der *MIQE-Guidelines* appelliert, dass nur effizienzkorrigierte Arbeiten publiziert werden sollen (Rujter et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse mit dem Programm REST ausgewertet, das sich den zuvor ermittelten Effizienzen bedient und effizienzkorrigierte qPCR-Ergebnisse darstellt.

Eine weitere Möglichkeit, die PCR-Effizienz zu erfassen, stellt die Berechnung aus dem Fluoreszenzanstieg dar, bei der die Effizienz Werte zwischen 1,3 und

1,6 annimmt. Dabei entscheidet der Wissenschaftler selbst, welche Punkte er in die Berechnung der Effizienz mit einbezieht, sodass diese Methode großen Schwankungen unterliegt (Pfaffl 2004). Die PCR-Effizienz lässt sich auch anhand mathematischer Algorithmen berechnen. Hierbei werden zwar alle 40 Zyklen der PCR oder mehr berücksichtigt, allerdings erhält man auch bei dieser Methode ähnlich niedrige Effizienzen zwischen 1,3 und 1,7 (Tichopad et al. 2003). Aus den genannten Gründen wurde daher nach der von den *MIQE-Guidelines* empfohlenen Methode zur Berechnung der Effizienz gearbeitet.

Die anschließende qPCR wurde mit der Software REST ausgewertet. Die Expression der Zielgene wird mit der Expression eines Referenzgens normalisiert, um die Varianz der Expressionsergebnisse zu reduzieren, da Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen (Pfaffl 2004). Für die relative Quantifizierung der qPCR Ergebnisse wurden die ribosomalen Proteine 18S und Rpl27 als Referenzgene herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass ribosomale Proteine unter verschiedenen äußeren Einflüssen in qPCR-Experimenten weitestgehend stabil exprimiert werden und sich sehr gut zur Normalisierung von qPCR-Ergebnissen eignen (Boda et al. 2009, Kuchipudi et al. 2012, Thomas et al. 2014). Referenzgene sollen homogen exprimiert sein und möglichst keinen internen oder externen regulatorischen Einflüssen unterliegen (Wiedemann et al. 2004). Es wird empfohlen, mindestens zwei Referenzgene zur Normalisierung heranzuziehen (Nicot et al. 2005, Bustin et al. 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei den Referenzgenen zwischen einzelnen Geweben signifikante Expressionsunterschiede bestehen. Für unterschiedliche Gewebetypen können einzelne Referenzgene unterschiedlich gut zur Normalisierung geeignet sein (Wiedemann et al. 2004). Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden mit den ribosomalen Proteinen 18S sowie Rpl27 als Referenzgene durchgeführt. Denn ribosomale Proteine werden unter verschiedenen äußeren Einflüssen in qPCR-Experimenten weitestgehend stabil exprimiert und eignen sich daher sehr gut zur Normalisierung von qPCR-Ergebnissen (Boda et al. 2009, Kuchipudi et al. 2012, Thomas et al. 2014).

Diskussion der Ergebnisse

Die Regulation der Genexpression erfolgt unter anderem über positive oder negative Rückkopplungsmechanismen. Wird an einem Punkt eines Syntheseweges ein Enzym ausgeschaltet, wird das vorgeschaltete Enzym vermehrt synthetisiert, da die Produkthemmung entfällt (Talafant et al. 1977). Beispiele hierfür sind die Abnahme der AGAT-Synthese bei Zunahme von Cr oder die Abnahme der AGAT-Aktivität bei Zunahme von Ornithin (Stöckler-Ipsiroglu 2010). Im AGAT-KO ließ sich in Hirn, Herz, Leber und Skelettmuskulatur eine stärkere Expression des Ct1-Gens im Vergleich zum WT feststellen. In Hirn zeigte sich eine 2,5-fach stärkere Expression ($p=0,001$), in Herz eine 1,9-fach stärkere Expression ($p<0,001$) und in Leber eine 2-fach stärkere Expression ($p=0,001$) der Ct1 im Vergleich zum WT. Im Muskel war die Ct1-Expression 3,6-fach ($p=0,08$) stärker. Lediglich in der Niere war die Veränderung nicht signifikant ($p=0,19$). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Cr als Substrat für die Endprodukthemmung fehlt. Die GAMT zeigte in den AGAT-KO-Tieren im Vergleich zum WT keine Veränderung in Hirn, Herz und Niere bzw. zeigte eine stärkere Expression in Leber (1,7-fach, $p=0,002$) und Skelettmuskel (1,3-fach, $p=0,004$).

In den GAMT-KO-Tieren ließ sich in Hirn und Skelettmuskel eine stärkere Expression der AGAT feststellen (1,8-fach, $p=0,001$ und 93-fach, $p<0,001$). In Herz, Leber und Niere zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression im Vergleich zum WT. Eine stärkere Expression der AGAT in den GAMT-KO-Tieren war zu erwarten und deckt sich mit der bisherigen Literatur, da auch hier aufgrund der fehlenden Endprodukthemmung in den umsatzstarken Organen Hirn und Skelettmuskel das Endprodukt GAMT fehlt, sodass die AGAT als vorgeschaltetes Enzym vermehrt GAA synthetisiert (Sasani et al. 2019). Der Ct1 zeigte in allen Organen eine stärkere Expression im Vergleich zum WT.

In den Ct1-KO-Mäusen zeigte sich in Hirn, Niere und Skelettmuskel eine stärkere Expression der AGAT im Vergleich zum WT. In Hirn war die Expression 1,2-fach stärker ($p=0,001$), in Niere 24-fach ($p<0,001$) und in Skelettmuskel (1,2-fach $p<0,001$). Die GAMT zeigte sich in Hirn, Leber und Skelettmuskel unverändert

und zeigte eine schwächere Expression in Herz (0,6-fach, $p=0,003$) und in der Niere eine stärkere Expression (1,4-fach, $p=0,018$).

Die Ergebnisse dieser Arbeit können genutzt werden, um die Pathophysiologie der Kreatindefizienz-Syndrome weiter zu klären. Im Rahmen von weiteren qPCR Untersuchungen könnten die einzelnen Komponenten der Kreatinbiosynthese nicht nur organspezifisch, sondern zelltypspezifisch untersucht werden. Die Rolle von Kreatin in definierten neuronalen Zellpopulationen beispielsweise ist noch nicht ausreichend erforscht. Denn interessanterweise weisen unterschiedliche Zelltypen im Gehirn verschiedene Expressionsmuster für den Ct1 auf (Braissant et al. 2001). AGAT und GAMT sind nachweisbar in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten, während der Ct1 nur in Neuronen und Oligodendrozyten nachweisbar ist, jedoch nicht in Astrozyten (Ohtsuki et al. 2002, Braissant et al. 2010). Durch Zelltypspezifische Deletion des Ct1 können diese Befunde weiter analysiert und genutzt werden, um die pathophysiologischen Zusammenhänge der Kreatindefizienz-Syndrome besser zu verstehen.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit können anhand von WT-, AGAT-KO-, GAMT-KO- und Ct1-KO-Tieren in akuten Hirnschnitten Einzellzell-q-PCR-Experimente durchgeführt werden, die die Kompartimentierung des Kreatinstoffwechsels im ZNS klären sollen. Ziel sollte dabei sein, die Expression der Enzyme von Kreatintransport und -synthese in selektiven neuronalen Subpopulationen zu bestimmen. Es sind also weitere tierexperimentelle Untersuchungen notwendig, um geeignete Behandlungen gegen Kreatinmangelsyndrome zu entwickeln.

Klinische Relevanz der Arbeit

Kreatindefizienz-Syndrome beim Menschen äußern sich durch neurometabolische Symptome mit Auswirkungen auf alle wesentlichen Organsysteme. Die einzelnen Kreatindefizienz-Syndrome sind komplexe Erkrankungen, deren Pathomechanismen nicht in allen Aspekten geklärt sind. Interessanterweise konnte durch Untersuchungen an AGAT-defizienten Mäusen nach ischämischem Schlaganfall ein direkter Zusammenhang zwischen der Homoarginin (HA)- und AGAT-Expression gezeigt werden. AGAT-defiziente

Mäuse zeigten eine Abwesenheit von HA, einer nicht-essentiellen Aminosäure, und deutlich größere Infarktareale als WT-Tiere, wohingegen zerebrale Schäden und neurologische Defekte nach Schlaganfall bei WT-Mäusen durch HA-Substitution reduziert werden konnten (Bretscher et al. 2003, Choe et al. 2013). Eine GAMT-Defizienz geht mit einer Akkumulation des neurotoxischen GAA einher, sodass dieses als zusätzlicher pathogenetischer Faktor therapiert werden muss, z.B. durch eine Arginin-restriktive Diät, um damit die Ausgangssubstanz für die Synthese des GAA zu blockieren oder durch eine hochdosierte Supplementation von Ornithin, um die Synthese von GAA zu reduzieren (Stöckler-Ipsiroglu et al. 2005). Bei GAMT- und AGAT-Defizienz führt die hochdosierte orale Substitution von Kreatin innerhalb mehrerer Monate zu einem deutlichen Anstieg des zerebralen Kreatins und somit häufig zu einer Verbesserung der Symptome (Stöckler-Ipsiroglu 2010).

Trotz intensiver Forschung gibt es bisher keine effiziente Therapiemöglichkeit für die Ct1-Defizienz. Der Ct1 scheint der einzige Weg zu sein, die BHS zu passieren und das Gehirn mit Cr zu versorgen. Es existieren verschiedene therapeutische Ansätze, die allerdings noch keine relevanten Effekte an Ct1-defizienten Patienten verzeichnen konnten. Lipophile Derivate des Cr wie PCr und Magnesium (Mg) oder Kreatinbenzylester können zwar per transmembraner Diffusion die BHS Ct1-unabhängig passieren, allerdings führte eine Therapie mit PCr-Mg-Komplexen oder Kreatinbenzylester zu keiner Verbesserung des neurologischen Status der Patienten (Lunardi et al. 2006). Eine kombinierte Therapie mit oraler Gabe von Cr, Arginin (Arg) und Glycin (Gly) führte bei 10 von 28 Patienten mit Ct1-Defekt zu einer Besserung der Klinik (Dunbar et al. 2014). Bei diesen Patienten konnte ein Anstieg des cerebralen Kreatinspiegels verzeichnet werden (n=5), es besserten sich kognitive Funktionen (n=7), epileptische Anfälle (n=4) und Dystrophie (n=3). In einer weiteren retrospektiven Kohortenstudie führte die kombinierte Gly- und Arg-Therapie bei zwei weiblichen Patientinnen zu einer Verbesserung des „clinical severity score“ (CSS, klinische Klassifizierung des Schweregrades), während bei männlichen Patienten nur eine subjektive Verbesserung erreicht wurde (Bruun et al. 2018). Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass weibliche Patientinnen durch ihr

heterozygotes SLC6A8 Gen eine Restfunktion des Ct1 an der BHS aufweisen. Allerdings wurde bei Patienten nach Arg- (400 mg/kg/Tag) und Gly- (200 mg/kg/Tag) Substitution eine Hyper-Homocysteinämie festgestellt, sodass strenges Monitoring der behandelten Patienten geboten ist (Villar et al., 2012). Die orale Gabe von Betain, einem Gly-Derivat, führte bei zwei erwachsenen Patienten mit Ct1-Defizienz zu einer Verbesserung der Symptomatik in den Bereichen Motorik und Sprache (Schjelderup et al. 2021). Die intranasale Verabreichung von Dodecyl-Cr-Ester (DCE), einem weiteren Cr-Derivat, führte nach 10-tägiger Therapie bei Ct1-defizienten Mäusen zu einer Steigerung des cerebralen Kreatinspiegels und zu einer Verbesserung im *novel object recognition test* (Ullio-Gambia et al. 2019). DCE stellt damit eine potentielle Therapiemöglichkeit der Ct1-Defizienz dar.

Einen weiteren Therapieansatz stellen Pharmacochaperone dar. Chaperone sind Proteine, die in den Zellen die korrekte Faltung anderer komplexer Proteine sicherstellen. Pharmacochaperone erlauben die Korrektur fehlgefalteter Proteine, beispielsweise nach einer Missense-Mutation und die Platzierung von Proteinen an der korrekten Lokalisation (Leidenheimer und Rymer 2014). 2019 konnten El-Kasaby et al. mit dem chemischen Chaperon 4-phenylbutyrat (4-PBA) bei über einem Drittel fehlgefalteter SLC6A8-Varianten einen therapeutischen Erfolg sicherstellen. Es zeigte sich nach 4-PBA Therapie ein Anstieg Ct1-Aktivität, nachdem der Ct1 wieder an der Plasmamembran lokalisiert war (El-Kasaby et al. 2019). Virale Vektoren wurden bereits mehrfach zur Behandlung anderer Erkrankungen des ZNS eingesetzt. Sie schleusen genetisches Material in eine Zielzelle. Adeno-assoziierte Viren (AAV) haben sich in der Vergangenheit besonders etabliert, da sie in den transduzierten Zellen nur selten Immun- oder inflammatorische Antworten hervorrufen (Lentz et al. 2012). Das AAV9 konnte dabei im Jahre 2009 als erstes AAV identifiziert werden, das in neugeborenen und erwachsenen Mäusen die BHS passieren kann (Foust et al. 2009). Allerdings stellt die Translation tierischer AAV9 in Menschen die Forschung vor eine besondere Herausforderung, da der Mensch anti-AAV9-Antikörper bildet und das transduzierte genetische Material damit neutralisiert. Außerdem zeigte sich eine dosisabhängige Hepatotoxizität bei der Therapie mit AAV beispielsweise der

Muskeldystrophie Typ Duchenne und der X-chromosomalen Myotubulären Myopathie (Huang et al. 2021, Nature Biotechnology 2020). Nichtsdestotrotz ist die Gentherapie mit Vektoren ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS und damit auch der Ct1-Defizienz. Weitere Forschung ist notwendig, um ein sicheres Verfahren zu etablieren.

Um einerseits den Pathomechanismus dieser Erkrankungen besser zu verstehen und andererseits neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, ist das Wissen um die Expression des Kreatintransporters sowie der Kreatinsyntheseproteine wichtig. Die pathophysiologischen Prozesse, die zum klinischen Bild der Kreatindefizienzsyndrome führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Kreatinsupplementation wird andererseits als mögliche Therapieoption bei neurodegenerativen Erkrankungen betrachtet. Cr-Monohydrat ist als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen. Bei Kreatinmangelsyndromen wird Cr jedoch nicht verabreicht, um einen physiologischen Effekt zu erreichen. Vielmehr wird es in supraphysiologischen Dosen verabreicht, um einen Krankheitszustand zu behandeln. In diesem Sinne ist Cr als Medikament zu sehen (Stöckler 2010).

6. Zusammenfassung

Bei der endogenen Synthese von Cr und beim Transport von Cr aus der Zelle heraus bzw. in die Zelle hinein sind die zwei Enzyme L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT) und Guanidinoacetat-Methyltransferase (GAMT) sowie der Kreatintransporter (Ct1) beteiligt, die bei Störungen ihrer Funktion zu Kreatindefizienzsyndromen führen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von quantitativer PCR (qPCR) die Expression der murinen AGAT, GAMT sowie des Ct1 auf RNA-Ebene in den expressionsstarken Geweben Hirn, Skelettmuskulatur, Niere, Leber und Herzmuskulatur untersucht. Zur Durchführung der Untersuchungen standen Knockout-Mäuse (AGAT^{-/-}, GAMT^{-/-}, Ct1^{-/-}) sowie WT-Geschwistertiere zur Verfügung. Es wurde die Änderung der Expression dieser Gene durch Defizienz der einzelnen Komponenten des Kreatinstoffwechsels untersucht. Als Referenzgene zur Normalisierung der qPCR-Ergebnisse wurden die ribosomalen Proteine 18S und Rpl27 verwendet. Nach Etablierung von Standardkurven wurde die Veränderung der Expression der Zielgene AGAT, GAMT und Ct1 in WT- und KO-Tieren unter Verwendung von Taqman-Sonden mittels qPCRs untersucht.

Im AGAT-KO ließ sich mit Ausnahme der Niere in allen Organen eine stärkere Expression des Ct1-Gens im Vergleich zum WT feststellen. Die GAMT zeigte in den AGAT-KO-Tieren im Vergleich zum WT keine Veränderung in Hirn, Herz und Niere, zeigte aber eine stärkere Expression in Leber und Skelettmuskel. In GAMT-KO-Tieren ließ sich in Hirn und Skelettmuskel eine stärkere Expression der AGAT feststellen. In Herz, Leber und Niere zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression im Vergleich zum WT. Der Ct1 zeigte in allen Organen eine stärkere Expression im Vergleich zum WT. In Ct1-KO-Mäusen zeigte sich in Hirn, Niere und Skelettmuskel eine stärkere Expression der AGAT im Vergleich zum WT. Die GAMT zeigte eine schwächere Expression im Herzen und in der Niere eine stärkere Expression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die komplexen Interaktionen der einzelnen Schritte des Cr-Metabolismus auf RNA-Ebene. Als nächster Schritt ist die Analyse dieser Stoffwechselwege auf Einzelzell-Ebene im Gehirn sinnvoll.

Summary

Creatine is being synthesized endogenously by a two-step enzymatic pathway involving L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT) and Guanidinoacetat-Methyltransferase (GAMT) and transported into the cells via the Creatine transporter (SLC6A8, Ct1). Creatine deficiency syndromes are metabolic disorders caused by mutations in AGAT, GAMT and SLC6A8 and mainly affect the central nervous system.

In the present study, quantitative PCR (qPCR) was used to investigate the expression of murine AGAT, GAMT, and Ct1 at the RNA level in the high-expression tissues of brain, skeletal muscle, kidney, liver, and cardiac muscle. Knockout mice (AGAT^{-/-}, GAMT^{-/-}, Ct1^{-/-}) and WT littermates were available to perform the studies. Ribosomal proteins 18S and Rpl27 were used as reference genes to normalize qPCR results. After standard curves were established, the change in expression of the target genes AGAT, GAMT, and Ct1 in WT and KO animals was examined in qPCRs using Taqman probes.

In AGAT-KO, stronger expression of the Ct1 gene could be detected in all organs compared to WT except for the kidney. GAMT showed no change in brain, heart and kidney but showed stronger expression in liver and skeletal muscle in AGAT-KO animals compared to the WT. In GAMT-KO animals, stronger expression of AGAT could be detected in brain and skeletal muscle. In heart, liver, and kidney, there was no significant change in expression compared with WT. Ct1 showed stronger expression in all organs compared with WT. In Ct1-KO mice, AGAT showed stronger expression in brain, kidney, and skeletal muscle compared with WT. GAMT was unchanged in brain, liver, and skeletal muscle but showed weaker expression in heart and stronger expression in kidney.

The results of this study confirm the complex interactions of Cr metabolism and transport on RNA level. In the future, further analyses are necessary on the single cell level in brain.

7. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AGAT	L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
BHS	Blut-Hirn-Schranke
cDNA	Komplementäre DNA
CK	Kreatinkinase
Cr	Kreatin
CSS	clinical severity score
Ct1	Kreatintransporter
Ct	Threshold Cycle
DCE	Dodecyl Creatine Ester
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acetat)
GAA	Guanidinoacetat
GAMT	Guanidinoacetat-Methyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	Homoarginin
KO	Knockout

MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
Mg	Magnesium
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRS	Magnetresonanz-Spektroskopie
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
PCr	Phosphokreatin
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
REST	Relative expression software tool
Rn	Normalisiertes Reportersignal
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-hemmendes Protein
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SLC6A8	Solute carrier 6 family of transporters, member 8 (Ct1)
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

1. Agilent Technologies: TRIzol Reagent Manual
2. Alfieri R.R., Bonelli M.A., Cavazzoni A., Briggotti M., Fumarola C., Sestili P., Mozzoni P., De Palma G., Mutti A., Carnicelli D., Vacondio F., Silva C., Borghetti A.F., Wheeler K.P., Petronini P.G. Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress, *J. Physiol.* 576, 2006, 391-401
3. Alves C.R.R., Ferreira J.C., de Siqueira-Filho M.A., Carvalho C.R., Lancha Jr. A.H., Gualano B. Creatine-induced glucose uptake in type 2 diabetes: a role for AMPK- α ?, *Amino Acids* 43, 2012, 1803-1807
4. Arneemann J. *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer 2019
5. Barot, M., Gokulgandhi M.R., Mitra A.K. Mitochondrial Dysfunction in Retinal Diseases, *Curr Eye Res.*, 2011, 1069-1077
6. Becker C., Riedmaier I., Pfaffl M.W. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik, *BIOspektrum*, 2009, 512-515
7. Beintema J.J., Schüller C., Irie M., Carsana A. Molecular Evolution of the Ribonuclease Superfamily, *Prog. Biophys. molec. Biol.* Vol. 51, 1988, 165-192
8. Bender A., Klopstock T. Creatine for neuroprotection in neurodegenerative disease: end of story?, *Amino Acids* 48, 2016, 1929-1940
9. Boda E., Pini A., Hoxha E., Parolisi R., Tempia F. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Studies in Mouse Brain, *J.Mol.Neurosci.*, 2009, 238-253
10. Braissant, O., Henry H., Villard A.-M., Speer O., Wallimann T., Bachman C. Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: Spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1, *BMC Developmental Biology*, 2005
11. Braissant O., Béard E., Torrent C., Henry H. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes, *Neurobiol. Dis.* 37, 2010, 423-433

12. Braissant O., Henry H., Béard E., Uldry J. Creatine deficiency syndroms and the importance of creatine synthesis in the brain, Springer 2011, 1317-1318
13. Braissant O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 2012, 655-664
14. Braissant O., Henry H. AGAT, GAMT and SL6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review, *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31, 2008, 230-239
15. Bretscher L.E., Li H., Poulos T.L., Griffith O.W. Structural Characterization and Kinetics of Nitric-oxide Synthase Inhibition by Novel *N*⁵-(Iminoalkyl)- and *N*⁵-(Iminoalkenyl)-ornithines, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 278, No. 47, 2003, 46789-46797
16. Brosnan J.T., Brosnan M.E. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement, *Annu. Rev. Nutr.* 27, 2007, 241-261
17. Bruun T.U.J., Sidky S., Bandeira A.O., Debray F.G., Ficicioglu C., Goldstein J., Joost K., Koeberl D.D., Luisa D., Nassogne M.C., O'Sullivan S., Ounap K., Schulze A., van Maldegrem L., Salomons G.S., Mercimek-Andrews S. Treatment outcome of creatine transporter deficiency: international retrospective cohort study, *Metab. Brain Dis.* 33, 2018, 875-884
18. Buford T.W., Kreider R.B., Stout J.R., Greenwood M., Campbell B., Spano M., Ziegenfuss T., Lopez H., Landis J., Antonio J. International Society of Sports Nutrition position stand: creatine supplementation and exercise, *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2007
19. Bustin S.A. Absolute Quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology* 2000, 169-193
20. Bustin S.A. Quantitative real-time RT-PCR- a perspective, *Journal of Molecular Endocrinology* 2005, 597-601
21. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of

- Quantitative Real-Time PCR Experiments, *Clinical Chemistry* 55:4, 2009, 611-622
22. Carducci C., Birarelli M., Leuzzi V., Carducci C., Battini R., Cioni G., Antonozzi I. Guanidinoacetate and creatine plus creatinine assessment in physiologic fluids: an effective diagnostic tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies, *Clinical Chemistry* 48, 2002, 1772-1778
 23. Choe C., Nabuurs C., Stockebrand M.C., Neu A., Nunes P., Morellini F., Sauter K., Schillemeit S., Hermans-Borgmeyer I., Marescau B., Heerschap A., Isbrandt D. L-Arginine:Glycin-Amidinotransferase protects from metabolic syndrome. *Human molecular genetics* Vol. 22/1, 2013, 121-122
 24. Choe C., Atzler D., Wild P.S., Carter A.M., Böger R.H., Ojeda F., Simova O., Stocjebrand M., Lackner K., Nabuurs C., Marescau B., Streichert T., Müller C., Lüneburg N., De Deyn P.P., Benndorf R.A., Baldus S., Gerloff C., Blankenberg S., Heershap A., Grant P.J., Magnus T., Zeller T., Isbrandt D., Schwedhelm E. Homoarginine Levels Are Regulated by L-Arginine:Glycine Amidinotransferase and Affect Stroke Outcome, *Circulation*, 2013, 1451-1461
 25. Chrusch M.J., Chilibeck P.D., Chad K.E., Shawn Davidson K., Burke D.G. Creatine supplementation combined with resistance training in older men, *Med. Sci. Sports Exerc.* Vol. 33, No. 12, 2001, 2111-2117
 26. Di Base, S., Ma X., Wang X., Yu J., Wang, Y.-C., Smith D.J., Zhou Y., Li Z., Kim Y.J., Clarke N., To A., Yang L. Creatine uptake regulates CD8 T cell antitumor immunity, *J. Exp. Med.* 216, 2019, 2869-2882
 27. Dunbar M., Jaggumantri S., Sargent M., Stöckler-Ipsiroglu S., van Karnebeek C.D. Treatment of X-linked creatine transporter (SLC6A8) deficiency: systematic review of the literature and three new cases, *Molecular Genetic Metabolism* 112, 2014, 259-274
 28. Edison E.E., Brosnan M.E., Meyer C., Brosnan J.T. Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293: F1799-F1804, 2007

29. El-Kasaby A., Kasture A., Koban F., Hotka M., Asjad H.M.M., Kubista H., Freissmuth M., Sucic S. Rescue by 4-phenylbutyrate of several creatine transporter-1 variants linked to the creatine transporter deficiency syndrome, *Neuropharmacology* 161, 2019, 107572
30. Fleige S., M. W. Pfaffl RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Mol Aspects Med* 2-3, 2006, 126-139
31. Foust K.D., Nurre E., Montgomery C.L., Hernandez A., Chan C.M., Kaspar B.K. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes, *Nature Biotechnology* 2009, 59-65
32. Galbraith, R.A., Furukawa M., Li M. Possible role of creatine concentrations in the brain regulating appetite and weight, *Brain Res.* 1101, 2006, 85-91
33. Garnett E.R., Raines R.T. Emerging biological functions of ribonuclease 1 and angiogenin, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 57 (3), 2022, 244-260
34. Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR, *Genome Research*, 1996, 995-100
35. Gualano B., Artioli G.G., Poortmans J.R., Lancha Jr. A.H. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation, *Amino Acids* 38, 2010, 31-44
36. Gualano B., Macedo A.R., Alves C.R.R., Roschel H., Benatti F.B., Takayama L., de Sá Pinto A.L., Lima F.R., Pereira R.M.R. Creatine supplementation and resistance training in vulnerable older women: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial, *Experimental Gerontology* Vol. 53, 2014, 7-15
37. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions *Bio/Technology* 1993
38. Hoffmann G. *Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie*, Thieme 2004, 102-104

39. Hoffmann, G.F. Kreatinmangelsyndrome. In: Hoffmann, G., Lentze, M., Spranger, J., Zepp, F., Berner, R. (eds) Pädiatrie. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg., 2019
40. Ireland Z., Russell A.P., Wallimann T., Walker D.W., Snow R. Developmental changes in the expression of creatine synthesizing enzymes and creatine transporter in a precocial rodent, the spiny mouse, BMC Developmental Biology, 2009, 1-12
41. Item C.B., Stöckler-Ipsiroglu, S., Stromberger C., Mühl A., Alessandri M.G., Bianchi M.C., Tosetti M., Fornai F., Cioni G. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans, Am. J. Hum. Genet. 69, 2001, 1127-1133
42. Ji L., Zhao X., Zhang B., Kang L., Song W., Zhao B., Xie W., Chen L., Hu X. Slc6a8-mediated creatine uptake and accumulation reprogram macrophage polarization via regulating cytokine responses, Immunity 51, 2019, 272-284
43. Kanmogne G.D. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR, Springer 2014, 201-209
44. Ke R., Xu C., Li C., Luo L. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance in the maintenance of energy metabolism Cell biology int. 2018, 382-392
45. Klein G. „Der geheime Kraftstoff der Muskelzellen“ Universtitätszeitschrift Köln 2006, 1-3
46. Klein A.M., Ferrante R.J. The neuroprotective role of creatine, Subcell Biochem. 46, 2007, 205-243
47. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J Mol Biol. 1971, 56(2):341-61.
48. Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR, J Appl Genetics, 2013, 54:391-406
49. Kuchipudi S.V., Tellabati M., Nelli R.K., White G.A., Perez B.B., Sebastian S., Slomka M.J., Brookes S.M., Brown I.H., Dunham S.P., Chang K.-C.

- 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells, *Virology Journal* 2012
50. Leidenheimer, N., Ryder K.G. Pharmacological Chaperoning: A Primer on Mechanism and Pharmacology, *Pharmacol Res.* 2014, 10-19
51. Lentz T.B., Gray S.J., Samulski R.J. Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System, *Neurobiol Dis.*, 2012, 179-188
52. Levin, M.D., Bianconi, S., Smith, A., Cawley N.X., Do, A.D., Hammond, D., Grafstein, J.F., Thurm A., Miller J., Perreault J., Noguchi A., Springer D., Kozel B.A., Spurney C.F., Wassif C.A., Schulze, A., Porter F.D., Hannah-Shmouni F. X-linked creatine transporter deficiency results in prolonged QTc and increased sudden death risk in human and disease model, *Genetics in Medicine* 2021, 23:1864-1872
53. Liang P., Pardee A.B. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction, *Science* 1992, Vol 257 Issue 5072, 967-971
54. Lowe M.T.J., Faull R.L.M., Christie D.L., Waldvogel H.J. Distribution of the Creatine Transporter Throughout the Human Brain Reveals a Spectrum of Creatine Transporter Immunoreactivity, *The Journal of Comparative Neurology* 2015, 523:699
55. Lunardi G., Parodi A., Perasso L., Pohvozcheva A.V., Scarrone S., Adriano E., Florio T., Gandolfo C., Cupello A., Burov S.V., Balestrino M. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds, *Neuroscience* Vol. 142, 2006, 991-997
56. Maughan R., Greenhaff P., Hespel P. "Dietary supplements for athletes: emerging trends and recurring themes" *Journal Sports Science* 2011, 57-66
57. Mercimek-Mahmutoglu S., Stöckler-Ipsiroglu S., Adami A., Appleton R., Caldeira Araùio H., Duran M., Ensenauer R., Fernandes-Alvarez E., Garcia P., Grolík C., Item C.B., Leuzzi V., Marquardt I., Mühl A., Saelke-Kellermann R.A., Salomons G.S., Schulze A., Surtees R., van der Knaap M.S., Vasconcelos R., Verhoeven N.M., Vilarinho L., Wilichowsky E.,

- Jakobs C. GAMT deficiency: features, treatment and outcome in an inborn error of creatine synthesis , Neurology 2006
58. Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control, Agilent Technologies, 2016
59. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 1986;51, Pt 1:263-73
60. Murphy D. Northern blotting. Methods Mol Biol. 1993, 18:337-40.
61. Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, Rochelle HM, Suter ST, Gregor P, Seldin MF, Caron MG Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter, Receptor Channels, 1994, 165-174
62. Nature Biotechnology 38, High-dose AAV gene therapy deaths, 2020, 910-910
63. Neu A., Neuhoff H., Trube G., Fehr S., Ullrich K., Roeper J., Isbrandt D. Activation of GABA(A) receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism, Neurobiol. Dis. 11, 2002, 298-307
64. Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress, Journal of Experimental Botany, Vol. 56, No. 421, 2005, 2907-2914
65. Ohtsuki S., Tachikawa M., Takanaga H., Shimizu H., Watanabe M., Hosoya K., Terasaki T. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, Volume 22, 2002, 1327-1335
66. Odilo M., Samar L., Andreas S. “RNA Integrity Number (RIN)- Standardization of RNA Quality Control” Agilent Technologies, 1-7
67. Paquali M., Schwarz E., Jensen M., Yuzyuk T., DeBiase I., Randall H., Longo N. Feasibility of newborn screening of guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency, J. Inherit. Metab. Dis. 37, 2014, 231-236

68. Perasso L., Spallarossa P., Gandolfo C., Ruggeri P., Balestrino M. Therapeutic Use of Creatine in Brain or Heart Ischemia: Available Data and Future Perspectives, *Medical Research Reviews* Vol. 33, 2013, 336-363
69. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research* Vol. 29, 2001, 2002-2007
70. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Research* Vol. 30, 2002, 1-10
71. Pfaffl M.W. Real-time PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung, *BIOSpektrum* 1/04, 2004, 92-95
72. Rabinowitz, J.D., Enerbäck, S. Lactat: The ugly ducking of energy metabolism 2020 *Nat Metab.* 2020, 566-571
73. Rackayova V., Cudalbu C., Pouwels P.J.W., Braissant O. Creatine in the central nervous system: from magnetic resonance spectroscopy to creatine deficiencies, *Anal. Biochem.* 529, 2017, 144-157
74. Rae C., Digney A.L., McEwan S.R., Bates T.C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial, *The Royal Society*, 2003
75. Roach P.J., Dapoli-Roach A.A., Hurley T.D., Tagliabracchi V.S. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes *Biochem Journal* 2012, 14-18
76. Rossi L., Nardecchia F., Perigè F., Ventura R., Carducci C., Leuzzi V., Magnani M., Cabib S., Pascucci T. Intellectual Disability and Brain Creatine Deficit: Phenotyping of the Genetic Mouse Model for GAMT Deficiency *Genes* 2021, 12, 1201
77. Rui L. Energy metabolism in the liver *Department of molecular and integrative Physiology Compr Physiol.* 2014, 177-197
78. Ruiz-Vilalba A., van Pelt-Verkuil E., Gunst Q. D., Ruijter J.M., van den Hoff M. JB. Amplification of nonspecific products in quantitative

- polymerase chain reactions (qPCR) *Biomolecular Detection and Quantification* 14 (2017) 7-18
79. Rujter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M.H., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J.B., Moorman A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data, *Nucleic Acids Research* Vol. 37 No. 6, 2009, doi:10.1093
 80. Rujter J.M., Barnewall R.J., Marsh I.B., Szentirmay A.N., Quinn J.C., van Houdt R., Gunst Q.D., van den Hoff M.J.B. Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting, *Clinical Chemistry* 67:6, 2021, 829-842
 81. Sakellaris G., Kotsiou M., Tamiolaki M., Kalostos G., Tsapaki E., Spanaki M., Spilioti M., Charissis G., Evangeliou A. Prevention of Complications Related to Traumatic Brain Injury in Children and Adolescents With Creatine Administration: An Open Label Randomized Pilot Study, *The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care*, Vol. 61, 2006, 322-329
 82. Salomons G.S., von Dooren S.J., Verhoeven N.M., Cecil K.M., Ball W.S., DeGrauw T.J., Jakobs C. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 68, 2001, 1497-1500
 83. Sasani A., Hornig S., Grzybowski R., Cordts K., Hanff E., Tsikas D., Böger R., Gerloff C., Isbrandt D., Neu A., Schwedhelm E., Choe C. Muscle phenotype of AGAT- and GAMT-deficient mice after simvastatin exposure, *Amino Acids* 52, 2019, 73-85
 84. Schenkel J. *Transgene Tiere*, Springer, 2006, 16-25
 85. Schjelderup J., Hope S., Vatshelle C., van Karnebeek C.D.M. Treatment experience in two adults with creatine transporter deficiency, *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 27, 2021, 100731
 86. Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease, *Biochem. Biophys. Acta* 1762, 2006, 164-180

87. Schmidt A., Marescau B., Boehm E.A., Renema W.K.J., Peco R., Das A., Steinfeld R., Chan S., Wallis J., Davidoff M., Ullrich K., Waldschütz R., Heerschap A., De Deyn P.P., Neubauer S., Isbrandt D. Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency, *Human molecular genetics* Vol.13/9, 2004, 905-921
88. Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements *BMC molecular biology* 2006
89. Schulze A., Ebinger F., Rating D., Mayatepek E. Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetate acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation, *Molecular Genetics Metabolism* 74, 2001, 413-419
90. Schulze A. Angeborene Störungen des Kreatinstoffwechsels (Kreatinmangelsyndrome), *Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie*, Thieme 2004, 102-128
91. Schulze, A., Tran C., Levandovskiy, V., Patel, V., Cortez M.A. Systemic availability of guanidinoacetate affects GABAA receptor function and seizure threshold in GAMT deficient mice, *Amino Acids* 48, 2016, 2041-2047
92. Steinfeld, R. Expression der humanen und murinen Guanidinoacetatmethyltransferase *Institut für neurale Signalverarbeitung* 2006, 32-33
93. Stockebrand M., Sasani A., Das D., Hornig S., Hermans-Borgmeyer I., Lake H.A., Isbrandt D., Lygate C.A., Heerschap A., Neu A., Choe C.-U. A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism, *Front Physiol.*, 2018
94. Stöckler S., Holzbach U., Hanefeld F., Marquardt I., Helms G., Requart M., Hänicke W., Frahm J. Creatine Deficiency in the Brain: A New, Treatable Inborn Error of Metabolism, *Pediatric Research* Vol. 36, No. 3, 1994

95. Stöckler S., Hanefeld F., Frahm J. Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism, *Lancet* 348, 1996, 789-790
96. Stöckler-Ipsiroglu S. *Kreatinstoffwechselstörungen*, Thieme 2009, 23.16
97. Stöckler-Ipsiroglu S., van Karnebeek C. Cerebral creatine deficiencies: a group of treatable intellectual development disorders, *Semin. Neurol.* 34, 2014, 350-356
98. Stöckler-Ipsiroglu S., van Karnebeek C., Longo N., Korenke G.C., Mercimek-Mahmutoglu S., Marquart I., Barshop B., Grolik C., Schlune A., Angle B., Araujo H.C., Coskun T., Diogo I., Geraghty M., Haliloglu G., Konstantopoulou V., Leuzzi V., Levtova A., Mackenzie J., Maranda B., Mhanni A.A., Mitchell G., Morris A., Newlove T., Renaud D., Scaglia F., Valayannopoulos V., van Spronsen F.J., Verbruggen K.T., Yuskiv N., Nyhan W. Schulze A. Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: outcomes in 48 individuals and recommendations for diagnosis, treatment and monitoring, *Molecular Genetics and Metabolism* 111, 2014, 16-25
99. Stöckler-Ipsiroglu S., Apatean D., Battini R., DeBrosse S., Dessoffy K., Edvardson S., Eichler F., Johnston K., Koeller D.M., Nouioua S., Tazir M., Verma A., Dowling M.D., Wierenga K.J., Wierenga A.M., Zhang V., Wong, L.-J. C. Arginine:glycine Amidinotransferase (AGAT) deficiency: Clinical features and long term outcomes in 16 patients diagnosed worldwide, *Molecular Genetics and Metabolism* 116, 2015, 252-259
100. Sykut-Cegielska J., Gradowska W., Mercimek-Mahmutoglu S., Stöckler-Ipsiroglu S. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes, *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 51, No. 4, 2004, 875-882
101. Talafant E., Hoskova A., Pojerova A. Negative Feedback Control of Neonatal Serum Creatine and Increased Urinary Creatinine Excretion after Enzyme-inducing Drugs, *Pediatric Researches* 11, 1977, 880-883

102. Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M.W. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency, *Biotechnology letters* 24, 2002, 2053-2056
103. Thomas K.C., Zheng X.F., Suarez F.G., Raftery J.M., Quinlan K.G.R., Yang N., North K.N., Houweling P.J. Evidence Based Selection of Commonly Used RT-qPCR Reference Genes for the Analysis of Mouse Skeletal Muscle, *PLOS ONE* Volume 9, 2014
104. Tong Z., Gao Z., Wang F., Zhou J., Zheng Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR, *BMC Molecular Biology* 10:71, 1471-2199
105. Torremans A., Marescau B., Possemiers I., D'Hooge R., Isbrandt D., De Deyn P.P. Biochemical and behavioural phenotyping of a mouse model for GAMT deficiency, *J. Neurol. Sci.* Volume 231, 2005, 49-55
106. Ullio-Gamboa G., Udobi K.C., Dezard S., Perna M.K., Miles K.N., Costa N., Taran F., Pruvost A., Benoit J.-P., Skelton M.R., de Lonlay P., Mabondzo A. Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as a promising therapy for creatine transport deficiency, *Nanomedicine*, 2019, 1579-1593
107. Van Pilsum, J.F., Stephens G.C., Taylor D. Distribution of Creatine, Guanidinoacetat and the Enzymes for their Biosynthesis in the Animal Kingdom, *Biochem. J.* 1972, 325-345
108. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *genome biology* 3(7), 2002
109. Villar C., Campistol J., Fons C., Armstrong J., Mas A., Ormazabal A., Artuch R. Glycine and L-arginine treatment causes homocysteinemia in cerebral creatine transporter deficiency patients, *JIMD* 4, 2012, 13-16
110. Wallimann, T. Introduction – Creatine: Cheap ergogenic supplement with great potential for health and disease, *Institute of Cell biology Zurich* 2007, 3-4
111. Wallimann, T. Kreatin – warum, wann und für wen? *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin* 2008 Mai, 29-31

112. Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine, *Amino Acids* 40, 2011, 1271-1296
113. Wallimann, T. Positive Wirkungen auf den Organismus: mögliche Hilfstherapie für Patienten mit verschiedenen neuro-muskulären, neurodegenerativen, altersbedingten und anderen Erkrankungen, Institut für Zellbiologie ETH-Hönggerberg 2000, 1-4
114. Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nikolay K., Eppenberger H. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis, *Biochem J* 1992, 281:21-40
115. Watanabe A., Kato N., Kato T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation, *Neuroscience Research* Vol. 42, 2002, 279-285
116. Wiedemann C., Schulz H.L., Weber B.H.F. Quantitative Real-time PCR - eine Frage der Normalisierung, *Biospektrum* 1/4 10. Jahrgang 2004, 99-102
117. Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism, *Physiol. Rev.* 80, 2000, 1107-1213
118. Yang D., Chen Q., Rosenberg H.F., Rybak S.M., Newton D.L., Wang Z.Y., Fu Q., Tchernev V.T., Wang M., Schweitzer B., Kingsmore S.F., Patel D.D., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. Human Ribonuclease A Superfamily Members, Eosinophil-Derived Neurotoxin and Pancreatic Ribonuclease, Induce Dendritic Cell Maturation and Activation, *J Immunol.* 173(10), 2004, 6134-6142

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, ohne deren Unterstützung und Motivation die Fertigstellung meiner Doktorarbeit ohne Zweifel nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater PD Dr. Axel Neu für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Sönke Hornig für die gute Zusammenarbeit, den produktiven Austausch und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Meinem Ehemann Tawab kommt besonderer Dank zu. Er hat mich auf dem Weg durch das Medizinstudium und durch die Doktorarbeit begleitet und mir immer wieder Zuversicht gegeben, auch mit zwei kleinen Kindern mein Ziel konsequent zu verfolgen und in schwierigen Phasen nicht aufzugeben.

Zuletzt danke ich meiner Familie. Für die Geduld, die Ermutigungen und die Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

Diese Arbeit widme ich meinen beiden Töchtern Aria Sophie und Mira Helin.

10. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. 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: