

**Einfluss von Simvastatin auf den Muskel-Phänotyp von L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase- und Guanidinoacetat-Methyltransferase-defizienten Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ali Sasani Nejad

aus

Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Edzard Schwedhelm

Gutachter:in der Dissertation: PD Dr. Nicole Maria Muschol

Vorsitz der Prüfungskommission: PD Dr. Nicole Maria Muschol

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Monika Pötter-Nerger

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Wolfgang Hampe

Datum der mündlichen Prüfung: 25.03.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Darstellung der Publikation .....</b>	<b>5</b>
1.1 Einleitung.....	5
1.2 Methoden.....	9
1.2.1 Klinisches Studiendesign .....	9
1.2.2 Generierung und Nutzung transgener Mäuse .....	9
1.2.3 Rotarod.....	9
1.2.4 Grip Strength .....	10
1.2.5 Muskelhistologie .....	10
1.2.6 Präparation und Gewinnung von Gewebe.....	10
1.2.7 Western Blot .....	10
1.2.8 Blutuntersuchung.....	11
1.2.9 Tierexperimentelles Studiendesign.....	11
1.2.10 Massenspektrometrie .....	11
1.2.11 Statistische Auswertung.....	12
1.3 Ergebnisse .....	13
1.3.1 hArg und GAA Spiegel in Patienten mit und ohne Statin Behandlung.....	13
1.3.2 Simvastatin-induzierte Myopathie und AGAT Expression in C57BL6/J WT Mäusen ..	13
1.3.3 Simvastatin-induzierte Myopathien im Vergleich zwischen den Mausmodellen (WT, AGAT-/- und GAMT-/-) .....	16
1.3.4 AGAT Expression und GAA- und hArg-Spiegel im Vergleich zwischen den Mausmodellen (WT, AGAT-/- und GAMT-/-) .....	20
1.3.5 Einfluss der Kreatin Supplementation auf Simvastatin induzierte Myopathien in AGAT-/- Mäusen.....	21
1.3.6 Einfluss der hArg-Supplementation auf Simvastatin induzierte Myopathien in AGAT-/- Mäusen	23
1.4 Diskussion.....	26
<b>2 Publikation .....</b>	<b>28</b>
<b>3 Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>4 Summary .....</b>	<b>58</b>
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>

<b>8</b>	<b>Erklärung des Eigenanteils.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Eigene Publikationen.....</b>	<b>71</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>72</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>73</b>

# 1 Darstellung der Publikation

## 1.1 Einleitung

Ziel der Studie war es, ein Mausmodell für Simvastatin-induzierte Myopathien zu etablieren und den Einfluss der Expressionsänderung von L-Arginin:Glycin-Amidotransferase (AGAT) auf den Muskelphänotyp zu untersuchen. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit eine Supplementation mit L-Homoarginin (hArg) und Kreatin (Cr) den Phänotyp revertiert.

Statine (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme-A-Reduktase-Inhibitoren) zeigen eine ausgeprägte Low-density Lipoprotein (LDL)-Cholesterin-Senkung. Laut deutschem Arzneiverordnungsreport lag die Zahl der gesetzlich versicherten Patienten in Deutschland (ca. 73 Mio. Menschen), die mit Statinen behandelt wurden, im Jahr 2022 bei ca. 9 Mio. (Ludwig et al., 2024), das entspricht jedem 8. Patienten mit steigender Tendenz. Weltweit erhielten im Jahr 2008 etwa 100 Millionen Patienten eine Statintherapie. Schätzungen gehen aktuell von mehr als 400 Millionen Patienten aus (Ioannidis, 2014; Sathasivam und Lecky, 2008). Die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels führt zu einer Verringerung des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse, z.B. Schlaganfall und Herzinfarkt. Eine hochdosierte Statintherapie ist für viele Patienten notwendig, um die individuellen LDL-Zielwerte zu erreichen, und führt zu einer stärkeren Risikosenkung hinsichtlich der Gesamtmortalität und der kardiovaskulären Mortalität. In einer aktuellen Arbeit wurde sogar eine Reduktion vaskulärer Ereignisse bei Patienten ohne kardiovaskuläre Vorerkrankung nachgewiesen (Yusuf et al., 2016). Neben der LDL-senkenden Wirkung führt eine Statintherapie zu einer Stabilisierung der Gefäßablagerungen (Libby und Aikawa, 2003). Obwohl die Einnahme von Statinen im Allgemeinen sicher und nebenwirkungsarm ist, spielen Statin-induzierte Muskelbeschwerden (Myalgien und Myopathien bis hin zur seltenen Rhabdomyolyse) als häufigste Nebenwirkung in zweierlei Hinsicht eine wesentliche Rolle. Zum einen gelten Statin-induzierte Muskelsymptome als die Nebenwirkung, die am häufigsten zum Abbruch einer Statin-Langzeittherapie führt (Newman et al., 2019). Beobachtungsstudien gehen von einer Häufigkeit von ca. 7-33% der Statin-behandelten Patienten mit Muskelbeschwerden aus (Stroes et al., 2015). Dies entspricht bei konservativer Schätzung derzeit ca. 500.000 Patienten allein in Deutschland. In einer kürzlich durchgeführten Meta-Analyse, in die 176 Studien mit insgesamt mehr als 4 Millionen Patienten eingingen, lag die Gesamtprävalenz der Statinintoleranz bei etwa 9 % (Bytçi et al., 2022). Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein Therapieabbruch mit einer erhöhten Mortalität und kardiovaskulären Morbidität verbunden ist (Jackevicius et al., 2002; Shalev et al., 2009; Şerban et al., 2017). Andererseits kann eine sehr selten auftretende Rhabdomyolyse zu Nieren- und Multiorganversagen führen und damit potenziell tödlich verlaufen. Trotz vielfältiger Bemühungen ist es in den letzten Jahren nicht gelungen, eine wirksame Prophylaxe von Statin-induzierten Muskelbeschwerden zu etablieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die das Nebenwirkungsprofil von Statinen beeinflussen, sind bislang unvollständig geklärt. Frühere pharmakogenetische Studien haben Assoziationen mit mehreren Genen gezeigt, darunter Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1 (SLCO1B1). SLCO1B1 ist für den Transport von Statinen in die Hepatozyten verantwortlich. Allerdings konnten aus diesen Arbeiten bisher keine (gen-)modulatorischen Therapieempfehlungen abgeleitet werden, die das Risiko für Nebenwirkungen reduzieren (Patel et al., 2015).

Das Enzym AGAT katalysiert die endogene Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäure hArg und Guanidinoacetat (GAA) in der Niere. GAA wird in einem zweiten Schritt durch die Guanidinoacetat-Methyltransferase (GAMT) in der Leber zu Cr umgewandelt (Kan et al., 2004; Barsunova et al., 2020). Die anschließende Aufnahme von Cr in das Zielgewebe erfolgt über den Kreatintransporter 1 (CT1, SLC6A8, Abplanalp et al., 2013; van de Kamp et al., 2014). Die Bauchspeicheldrüse ist das einzige Organ, das relevante Mengen von AGAT und GAMT exprimiert. Allerdings exprimiert sie keinen Kreatintransporter, wodurch keine relevante Versorgung anderer Organe mit Cr stattfinden kann (Lygate et al., 2022). Als erstes Enzym der Reaktionskette stellt AGAT die regulatorische Einheit für die endogene Kreatin-Synthese im Sinne einer Endprodukt Feedback-Inhibition dar. Zusätzlich zur endogenen Produktion wird etwa die Hälfte des täglichen Kreatin Bedarfes aus der Nahrung resorbiert

(Fernandes-Pires und Braissant, 2021). Kreatin dient in seiner phosphorylierten Form, katalysiert durch die Kreatinkinase, als Energiepuffer, insbesondere in Geweben mit hohem und schwankendem Energiebedarf wie Herz, Skelettmuskulatur und Gehirn.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten AGAT- und GAMT Knockout Mäusen (AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup>) handelt es sich um Kreatin-defiziente Mausmodelle mit einem muskeldystrophischen Phänotyp und entsprechend geringerer Größe und Gewicht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Choe et al., 2013b; Schmidt et al., 2004). In einer detaillierten Charakterisierung des Muskelphänotyps von CT1-defizienten Mäusen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der Phänotyp erwartungsgemäß dem der Kreatin-defizienten Mausmodellen ähnelt (Stockebrand et al., 2018). Die Magnetresonanztomographie zeigt in den genannten Mausmodellen deutlich reduzierte Phosphokreatinspiegel in der Skelettmuskulatur. In funktionell motorischen Tests weisen Kreatin-defiziente Tiere im Vergleich zu ihren Wildtyp Geschwistern eine geringere Muskelkraft auf, zusätzlich ist das motorische Lernen und die Kraftausdauer beeinträchtigt.

Auf molekularer Ebene führt Kreatin-Defizienz zu einer gestörten mitochondrialen Funktion der Atmungskette mit eingeschränkter Energieverwertung im Skelettmuskel (Nabuurs et al., 2013; Stockebrand et al., 2016). Die reduzierte Phosphokreatinmenge führt zu niedrigeren ATP/Phosphat-Verhältnissen, trotz einer gesteigerten Umwandlung von anorganischem Phosphat zu ATP.

Hinsichtlich des Glukosestoffwechsels zeigen AGAT- und CT1-defiziente Mäuse eine erhöhte Expression des Glukosetransporters Typ 4 im Muskel und eine verbesserte Glukoseclearance. Diese metabolischen Veränderungen sind gekoppelt an die Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase, einem wichtigen Regulator der Energiehomöostase (Nabuurs et al., 2013; Stockebrand et al., 2018).

Die Effekte der Kreatin-Defizienz sind bei AGAT und GAMT-defizienten Tieren durch eine orale Kreatin Substitution hinsichtlich des Muskelphänotyps vollständig reversibel (Nabuurs et al., 2013). In CT1-defizienten Mäusen ist der Muskelphänotyp durch Kreatin Substitution nicht vollständig reversibel, da CT1 als bisher einziger effektiver Kreatin-Transporter über Zellmembranen identifiziert wurde und somit der Kreatin Transport in Zielzellen (Gehirn, Muskel) in diesen Mäusen gestört ist (Abplanalp et al., 2013; van de Kamp et al., 2014). GAMT- und CT1-defiziente Mäuse weisen aufgrund der Endprodukt-Feedback-Inhibition bei bestehendem Kreatin Mangel eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöhte AGAT-Expression auf, diese kann den Kreatin Mangel jedoch nicht kompensieren (Choe et al., 2013a; Stockebrand et al., 2018). Andererseits ist auch die Expression der AGAT in Wildtyp-Mäusen unter Cr und Homoarginin Substitution reduziert (Lygate et al. 2022).

In menschlichen Patienten ist die X-chromosomale CT1-Defizienz für über die Hälfte der genetischen Kreatin Defizienz-Syndrome verantwortlich und betrifft 0,3-3,5% der Männer mit angeborener intellektueller Behinderung (Clark et al., 2006; Rosenberg et al., 2004). Aufgrund des fehlenden CT1 kann eine hochdosierte Cr Einnahme bei diesen Patienten die muskulären Symptome lindern, nicht jedoch die im Vordergrund stehenden kognitiven Beeinträchtigungen beeinflussen, da die Aufnahme von Cr über die Blut-Hirn Schranke ins Gehirn gestört ist (Shen et al., 2022). Eine Substitution von Cyclokreatin, einem synthetischen Kreatin-Analogon, welches nicht vom CT1-Transport abhängig ist, konnte in Mäusen mit CT1-Knockout kognitive und motorische Funktionen verbessern (Kurosawa et al., 2012; Russell et al., 2014). In aktuelleren Arbeiten wurde unter hochdosierter Cyclokreatin-Substitution in Ratten jedoch unter anderem eine erhöhte Rate epileptischer Anfälle beobachtet, sodass die weitere Entwicklung aufgrund von Sicherheitsbedenken eingestellt wurde (Kale et al., 2020). Parallele Arbeiten fokussieren sich auf Kreatinester, welche als lipophile Kreatin Derivate passiv über die Zellwand diffundieren, wo sie durch Esterasen in freies Cr umgewandelt werden (La Du, 1971; Lunardi et al., 2006). Insbesondere Dodecyl-Kreatinester und Di-Acetyl-Kreatinethylester gelten als vielversprechende Kandidaten und konnten in ersten Studien Cr Spiegel in Fibroblasten von Patienten mit CT1-Defizienz steigern (Adriano et al., 2018; Ullio-Gamboa et al., 2019). Neben Substitutionstherapien sind Gentherapien und Chaperone vielversprechende Therapiealternativen, die Gegenstand der aktuellen Forschung sind.

Die Funktion und der zugrundeliegende Wirkmechanismus von hArg als zweitem AGAT-Produkt sind noch nicht vollständig geklärt. hArg ist eine nicht proteinogene Aminosäure, die aus Arginin und Lysin gebildet wird. In epidemiologischen und klinischen Studien ist eine hohe hArg-Konzentration mit einer geringeren kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert (März et al., 2010; Pilz et al., 2011; Choe et al. 2013a), die zugrunde liegenden Mechanismen werden derzeit beforscht.

hArg kann als alternatives Substrat für die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) dienen, allerdings mit geringer enzymatischer Affinität und in Konkurrenz zum deutlich affineren Hauptsubstrat L-Arginin (Alesutan et al., 2016). Stickstoffmonoxid führt als Signalmolekül im Gefäßendothel unter anderem zu einer Vasodilatation und damit zu einer Blutdrucksenkung. Daneben hemmt hArg einerseits den Abbau von Arginin durch Argininasen und andererseits die Aufnahme von Arginin in NOS-exprimierende Zellen (Atzler et al., 2015). In einer prospektiven Studie über einen Zeitraum von 10 Jahren wurde ein positiver, unabhängiger Zusammenhang zwischen Blutdruck und Homoarginin in einer Gruppe normotensiver Patienten gefunden, während in der Gruppe, die eine arterielle Hypertonie entwickelte, kein Zusammenhang bestand (Mokhaneli et al., 2022). In zwei Patientenkohorten mit hochnormalen Blutdruckwerten und Hypertonie wurden zuvor ähnliche Zusammenhänge gefunden (van der Zwan et al., 2013; Pilz et al., 2014). Experimentelle Arbeiten weisen auf einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen hArg Plasmaspiegel und dem Outcome nach kardiovaskulären Ereignissen hin. In AGAT-defizienten Mäusen mit Cr- und hArg-Mangel konnte das Volumen ischämischer Hirninfarkte nur durch hArg-Supplementation reduziert und die beeinträchtigte Kontraktilität und Relaxation des Myokards normalisiert werden (Choe et al., 2013a; Faller et al., 2018). Dagegen konnten Versuche an adipösen Ratten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion nach hArg-Supplementierung das Fortschreiten der Herzinsuffizienz nicht verhindern (Büttner et al., 2023). Auch in Cr-supplementierten AGAT-defizienten Mäusen mit ischämischer Herzinsuffizienz verschlechterten niedrige hArg Plasmaspiegel die Herzfunktion nicht (McAndrew et al., 2023). Der potenzielle Effekt eines niedrigen hArg-Spiegels auf die primäre Größe des induzierten Herzinfarktes wurde in dieser Arbeit jedoch nicht betrachtet.

Insgesamt ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar, ob es sich bei hArg lediglich um einen Risikomarker oder tatsächlich um einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen handelt. Zudem ist unklar, ob hArg nach einem kardiovaskulären Ereignis eine wesentliche kausale Rolle für das Fortschreiten dieser Erkrankungen spielt.

In einer neueren Arbeit wurde ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP, engl. single nucleotide polymorphism) des AGAT-Gens in zwei unabhängigen Populationen (Marshfield Kohorte und Study of Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol Homocystein kurz SEARCH) mit dem Risiko für das Auftreten von Statin-induzierten Muskelbeschwerden in Verbindung gebracht (Mangravite et al., 2013). Insbesondere konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SNPs im AGAT-Gen, die mit einer reduzierten Enzymaktivität assoziiert waren, ein geringeres Risiko für Statin-induzierte Myopathien aufwiesen. Die Autoren schlossen daraus, dass eine verminderte Konzentration von Cr, dem Hauptprodukt der AGAT, das Risiko für Statin-induzierte Myopathien reduzieren könnte. Zwei weitere Arbeiten (Carr et al., 2014; Floyd et al., 2014) konnten diesen Effekt nicht bestätigen. In einer Metaanalyse, die alle oben genannten Populationen einschloss, konnte dennoch eine signifikante Assoziation zwischen AGAT-Polymorphismen und Statin-induzierten Myopathien nachgewiesen werden (Mangravite et al., 2014). In einer weiteren Studie wurde ein AGAT-Genpolymorphismus mit dem Risiko für Rosuvastatin-induzierte Myopathien in Verbindung gebracht (Bai et al., 2018). Eine weitere Arbeit an japanischen Patienten zeigte keine Assoziation zwischen Statin-induzierten Myopathien und dem AGAT-Gen (Sai et al., 2016). Zusammenfassend liegen derzeit drei epidemiologische Studien vor, die eine Assoziation zwischen Statin-induzierten Myopathien und dem AGAT-Gen nahelegen (Bai et al., 2018; Mangravite et al., 2013). Aufgrund der drei Arbeiten, die diesen Zusammenhang nicht belegen konnten, bleibt jedoch insbesondere die klinische Bedeutung unklar. Eine Metaanalyse aller sechs genannten Studien mit 707 Fällen und 2321 Kontrollen zeigte eine Assoziation zwischen drei Variationen des AGAT-Gens und Statin-induzierten Myopathien, während

die Assoziation für schwere Statin-induzierte Myopathien nicht signifikant war (Liu et al., 2021). Weiterhin ungeklärt sind zudem die Mechanismen, die einer möglichen Assoziation zugrunde liegen.

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse und der klinischen Relevanz der Befunde aufgrund der großen Zahl betroffener Patienten erschien es daher sinnvoll, den Einfluss der AGAT Expression/Aktivität auf Statin-induzierte Myopathien näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Studie in einem ersten Schritt ein Mausmodell für Statin-induzierte Myopathien in Wildtyp C57Black6/J (C57BL6/J) Tieren etabliert. In einem zweiten Schritt wurden diese Mäuse mit AGAT- (AGAT<sup>-/-</sup>) und GAMT-defizienten (GAMT<sup>-/-</sup>) Mäusen verglichen. Neben funktionellen Tests zur Objektivierung der Muskelfunktion (Rotarod und Greifkraft) und Muskelhistologien mit Bestimmung des Myozytendurchmessers wurden die AGAT-Expression, die GAA- und hArg-Konzentration sowie laborchemische Parameter (Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase) untersucht. Um die Wirkung von Cr und Homoarginin genauer zu differenzieren, wurden AGAT<sup>-/-</sup>-Mäuse zuletzt mit jeder dieser Substanzen substituiert.

## 1.2 Methoden

### 1.2.1 Klinisches Studiendesign

Für die klinische Fallstudie wurden 274 Patienten aus der neurovaskulären Sprechstunde des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf im Zeitraum von Oktober 2015 bis September 2016 eingeschlossen (Votum der Hamburger Ethikkommission PV4715, Cordts et al., 2019). Zwei Patienten wurden aufgrund fehlender Daten ausgeschlossen (keine Angabe zum Stenosegrad der A. carotis interna). Von den verbleibenden 272 Patienten waren 162 männlich und 110 weiblich. Voraussetzung für die Teilnahme war eine unterschriebene Einverständniserklärung im Rahmen der Aufklärung über die Studie. Weitere Einschlusskriterien waren: Alter >18 Jahre und ein vorausgegangener Schlaganfall oder ein bestehendes erhöhtes Schlaganfallrisiko. Insgesamt hatten 226 Patienten (83%) bereits zuvor einen Schlaganfall erlitten. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug  $65 \pm 13$  Jahre und der systolische Blutdruck  $139 \pm 19$  mmHg. 204 (75%) Patienten hatten eine arterielle Hypertonie in der Vorgeschichte, 62 (23%) Patienten litten an Diabetes mellitus und 111 (41%) Patienten hatten eine Hypercholesterinämie (Cordts et al., 2019). Vorerkrankungen und Vormedikation wurden im Rahmen einer Patientenanamnese erfasst. Die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Plasma- und Serumbloodproben wurden unmittelbar nach Einschluss in die Studie entnommen und bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 1.2.2 Generierung und Nutzung transgener Mäuse

Die AGAT<sup>-/-</sup> und GAMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt und über mindestens sechs Generationen mit einem C57BL6/J Hintergrund rückgekreuzt. Bei AGAT<sup>-/-</sup> Tieren wurde Exon 3 durch eine Neomycin-Resistenzkassette, umgeben von Locus of X-over P1 (Lox-P) DNA-Sequenzen, unterbrochen, während bei GAMT<sup>-/-</sup> Tieren Exon 1 unterbrochen wurde (Choe et al., 2013b; Schmidt et al., 2004). Die resultierende mRNA war somit verkürzt und die Translation in ein funktionelles Protein konnte nicht erfolgen. Die AGAT<sup>-/-</sup> und GAMT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch heterozygote Paarungen erzeugt. Die Mäuse wurden in Käfigen mit 2-3 Tieren mit einem Tag/Nacht Zyklus von je 12 Stunden gehalten (ab 7:00 Uhr=Tag, ab 19:00 Uhr=Nacht). Die Raumtemperatur betrug  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit 50%, Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Die untersuchten Mäuse waren durchweg männlich und zwischen 15 und 25 Wochen alt. Die Versuche zum Rotarod und Grip strength wurden mindestens 2 Stunden nach Abschalten des Lichtes begonnen und mindestens 2 Stunden vor Anschalten des Lichtes beendet. Der Raum für die Verhaltensexperimente wurde mit gedimmtem Rotlicht beleuchtet und die Versuchsbedingungen wurden verblindet. Die Statin Behandlung der Kohorten erfolgte durch Zugabe von 300 mg oder 900 mg Simvastatin pro Kilogramm zu dem verabreichten Futter. Zur Cr-Supplementation wurde dem Futter 1% Cr zugesetzt (R/M-H Sniff). Unter Verwendung dieses Futters wiesen die AGAT<sup>-/-</sup> Mäuse einen normalen Muskelphänotyp auf, der mit dem der Wildtyp C57BL6/J Mäuse vergleichbar war (Choe et al., 2013b). Die hArg-Supplementation erfolgte über das Trinkwasser mit 14 mg/L (Choe et al., 2013a). Im Einzelnen setzte sich das Mäusefutter aus 34,9% Stärke, 22% Protein, 6,7% Rohasche, 5,2% Zucker, 4,5% Fett und 3,9% Ballaststoffen zusammen. Außerdem enthielt das Futter pro Kilogramm 25.000 IE Vitamin A, 1500 IE Vitamin D2, 125 mg Vitamin E, 20 mg Vitamin K, 100 mg Eisen, 50 mg Zink, 30 mg Magnesium, 5 mg Kupfer, 2 mg Jod und 0,1 mg Selen. Der Rest war Wasser. Das verwendete Futter war kreatinfrei (R/M-H, Sniff) (Choe et al., 2013b).

### 1.2.3 Rotarod

Der Rotarod Test dient zur Objektivierung der Kraftausdauer und Koordination von Mäusen. Die Tiere wurden auf eine gerippte Stange mit einem Durchmesser von 3,2 cm gesetzt (Acceler. Rotarod for mice, Jones and Roberts, TSE 308 systems, Bad Homburg, Deutschland). Fünf Sekunden nach dem Aufsetzen der Mäuse begann sich der Stab mit einer Geschwindigkeit von 4 Umdrehungen/Minute zu drehen. In den ersten beiden Durchgängen wurde diese Geschwindigkeit für maximal 3 Minuten

konstant gehalten; diese Durchgänge dienten der Gewöhnung und wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Läufe 3-5 erfolgten mit einem beschleunigenden Stab, wobei die Anfangsgeschwindigkeit 4 Umdrehungen/Minute betrug und pro Minute auf maximal 40 Umdrehungen/Minute beschleunigt wurde (maximale Dauer: 5 Minuten). Die Leistung der Tiere wurde durch die Zeit bis zum Abfallen von der Stange bewertet. Die Versuche wurden verblindet durchgeführt.

#### 1.2.4 Grip Strength

Die Greifkraft der Vorderpfoten der Mäuse wurde mit einem Grip strength Gerät (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland) gemessen. Die Tiere wurden mit den Vorderpfoten an eine Stange eingehängt und hielten sich daran fest. Durch leichtes Rückwärtsziehen des Schwanzes parallel zur Tischoberfläche ließen die Mäuse die Stange los und die maximale Greifkraft wurde in Newton gemessen. Mit jeder Maus wurden 15 gültige Durchgänge durchgeführt, aus denen der Mittelwert berechnet wurde. Die Versuche wurden verblindet durchgeführt.

#### 1.2.5 Muskelhistologie

Für die Muskel Histologien wurden die Mäuse, wie in vorausgehenden Arbeiten beschrieben (Nabuurs et al., 2013), zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Anschließend erfolgte eine transkardiale Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd in Phosphatpuffersalzlösung. Die *Musculi extensor digitorum longus* wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Querschnitte des Muskels wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) nach Standardlaborverfahren angefärbt. Die Durchmesser und Umfänge der Myozyten wurden mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ ausgemessen (pro Maus 5 Bilder à 20-30 Myozyten). Aus allen Messwerten jeder Maus wurde der Mittelwert gebildet. Die Auswertung erfolgte verblindet.

#### 1.2.6 Präparation und Gewinnung von Gewebe

Für die Probenentnahme wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Die Nieren und die *Musculi extensor digitorum longus* wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Lysate der Gewebe wurden mit einem Homogenisierungspuffer in einem Mikroreaktionsgefäß mit Einmalpistillen präpariert. Je nach Gewebegewicht wurden 300-600 µl Homogenisierungspuffer verwendet. Dieser bestand aus 50 mM Tris-Hydroxymethylaminomethan, 250 mM Mannitol, 50 mM Natriumfluorid, 5 mM Natriumpolypropylen, 1 mM EDTA, 1 mM Ethylenbis(oxyethylennitrilo)tetraessigsäure (EGTA), 1% Triton, 1 mM Benzamidin, 1 mM Dithiothreitol und einem vorgefertigten Protease Inhibitor Cocktail (#8340, Sigma). Anschließend wurde bei 10.000g über 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand entnommen. Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe einer Bicinchoninsäure Protein Analyse (#23227, Thermo Scientific) gemäß den Herstelleranweisungen bestimmt.

#### 1.2.7 Western Blot

Für das Western Blotting wurden gleiche Mengen des Proteinlysats (20-40 µg Proteingehalt) in einer vorgefertigten sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) Membran (#NW04120BOX, Thermo Scientific) separiert und auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. AGAT (#12801, Proteintech; #Sc-241785(T-16), Santa Cruz), Actin (#A2066, Sigma) und eIF4E (#2067S, Cell Signaling Technology) Antikörper wurden gemäß Herstelleranweisungen verwendet. Die verstärkten Chemilumineszenz Signale wurden mit einem Lumineszenz Analysator (LAS-4000, FujiFilm,

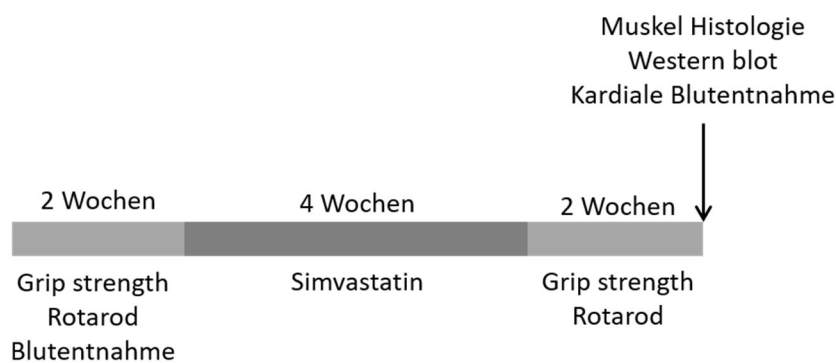
Düsseldorf, Deutschland) erfasst. Die aufgezeichneten Signale wurden mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ quantitativ ausgewertet (Stockebrand et al., 2013). Die Auswertung erfolgte verblindet.

### 1.2.8 Blutuntersuchung

Venöses EDTA Blut wurde während der Studienphase durch submandibuläre Punktion gewonnen, heparinisertes Blut durch direkte Punktion des Herzens am Ende der Studienphase vor der Organentnahme (Stockebrand et al., 2015). Die Blutproben wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Kreatinkinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH) wurden nach Standardlaborverfahren in der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit enzymbasierten Kits (Vitros Chemistry) bestimmt.

### 1.2.9 Tierexperimentelles Studiendesign

Für die Tierversuche wurden jeweils 4-6 Mäuse pro Gruppe in Käfigen von 2-3 Mäusen gehalten. In den ersten zwei Wochen wurden venöse Blutentnahmen und Verhaltensexperimente (Rotarod Test und Grip strength) vor der Statin-Supplementation durchgeführt. Es folgte eine vierwöchige Phase der Simvastatin-Supplementation in den Statin Gruppen (300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter). Es folgten erneute Verhaltensexperimente und nach insgesamt 8 Wochen die Gewebepräparation und die kardiale Blutentnahme.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des tierexperimentellen Studiendesigns.

### 1.2.10 Massenspektrometrie

Die Homoarginin Konzentrationen im Plasma wurden mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie bestimmt (LC-MS/MS, Cordts et al., 2015). Zunächst wurden 25  $\mu\text{L}$  Probe zu 100 $\mu\text{L}$  der internen Standardlösung, bestehend aus Methanol und 10  $\mu\text{mol/L}$  stabil-Isotopen-markiertem  $^{13}\text{C}_6$ -hArg, durch einen 0.22  $\mu\text{m}$  Filter (MultiScreen HTS<sup>TM</sup>, Milipore) gegeben. Die Derivatisierung des Filtrates erfolgte nach Trocknung mit 100  $\mu\text{L}$  von 1 M HCl in 1-Butanol. Die Analyse erfolgte mit LC-MS/MS (Varian 1200 MS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die hArg-Konzentration wurde anhand der bekannten Analytenkonzentrationen des hArg Standards durch Berechnung des Verhältnisses der Peakflächen zum internen Standard  $^{13}\text{C}_6$ -hArg bestimmt. Die untere und obere Bestimmungsgrenze lag bei 0,1 bzw. 50  $\mu\text{mol/L}$  (Atzler et al., 2011).

Die GAA-Plasmakonzentrationen wurden mittels Gaschromatographie Massenspektroskopie (GC-MS) bestimmt (Hanff et al., 2019). 10  $\mu\text{L}$  der Plasmaproben wurden in ein Glasgefäß mit eiskalter 2 M HCl in Methanol pipettiert, kurz gemischt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Autosampler Glasgefäß überführt und unter einem Stickstoffstrom eingedampft. In einem zweistufigen Derivatisierungsverfahren wurden die Analyten zunächst mit 100  $\mu\text{L}$  2M HCl in Methanol verestert und unter Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde mit 100  $\mu\text{L}$

Pentafluorpropionsäureanhydrid in Ethylacetat acetyliert, unter Stickstoff eingedampft und in 200 µl 400 mM Boratpuffer (pH 8,5) aufgenommen. Unmittelbar danach wurden 200 µl Toluol zugefügt, die Probe kurz gemischt und für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere organische Phase des Toluol-Überstandes wurde in ein Autosampler-Glasgefäß überführt und 1 µl in das GC-MS (ThermoFisher, Dreieich, Deutschland) injiziert. Für die gaschromatographische Trennung wurde die Quarzglas-Kapillarsäule Optima 17 (15 m lang, 0.25 mm I.D., 0.25 µm Filmdicke; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit Helium als Trägergas verwendet. Zur Berechnung wurden die Peakflächen zu denen des internen Standards ins Verhältnis gesetzt.

Die Konzentrationen von Simvastatin wurden mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie unter Nutzung von Atorvastatin als internem Standard bestimmt (LC-MS/MS, Wang et al., 2015). Das homogenisierte Gewebe (2-10 mg Feuchtgewicht) wurde mit interner Standardlösung und Acetonitril versetzt, kurz gemischt und für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (17.000xg). 20 µl des Überstandes wurden zur Analyse in das Massenspektrometer injiziert. Für die chromatografische Trennung wurde eine ACQUITY UPLC C18 Säule (2,1 × 150 mm, 1,8 µm Partikelgröße, Waters, Dublin, Irland) bei 40°C verwendet. Die mobilen Phasen, bestehend aus Methanol und Wasser (jeweils mit 0,1% Ameisensäure versetzt), wurden mit einer Flussrate von 350 µl/min gepumpt. Es wurde eine lineare Gradientenelution über 6 Minuten von 30 bis 70% Methanol durchgeführt. Der interne Standard und die Probe wurden im „Selected reaction monitoring mode“ des Gerätes detektiert, wobei für Simvastatin ein Übergang im Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 419.2 > m/z 199.1 und für Atorvastatin ein Übergang von m/z 559.2 > m/z 440.2 gewählt wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung der Peakflächenverhältnisse und Kalibrierung mit den bekannten Standardkonzentrationen. Abschließend wurden die ermittelten Werte auf das ursprünglich gemessene Gewebegewicht normiert.

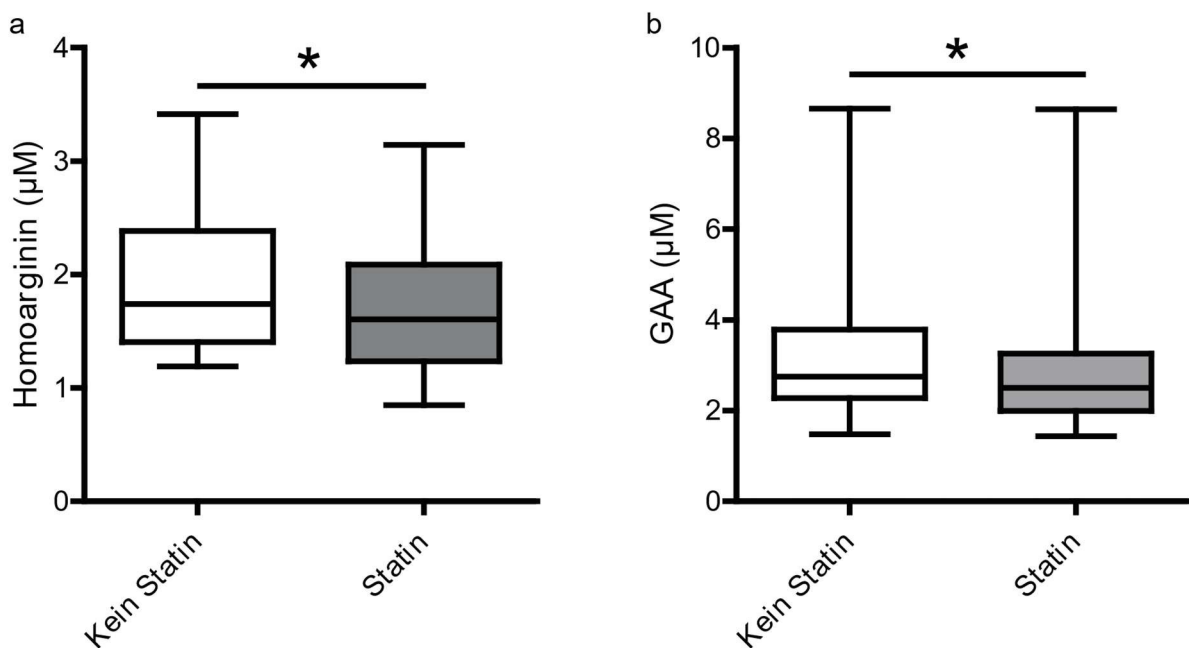
#### 1.2.11 Statistische Auswertung

Alle dargestellten Werte wurden als Mittelwert ± Standardfehler ausgedrückt. Alle verwendeten statistischen Tests waren nichtparametrische Tests. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen zu einem Zeitpunkt wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, für Vergleiche zwischen drei Gruppen zu einem Zeitpunkt der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test. Für Vergleiche zwischen vier Gruppen zu einem Zeitpunkt wurde die einfache Varianzanalyse mit einem Posttest nach Bonferroni verwendet. Für Vergleiche zwischen zwei oder drei Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine zweifache Varianzanalyse mit einem Bonferroni Posttest angewandt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism (Version 5.02, JaJolla, USA) und SPSS (Version 25, IBM, Somers, New York, USA) durchgeführt.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 hArg und GAA Spiegel in Patienten mit und ohne Statin Behandlung

In einem klinischen Studienkollektiv cerebrovaskulärer Patienten der neurovaskulären Sprechstunde der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf wurde der Plasmaspiegel von hArg und GAA bestimmt. Signifikant niedrigere hArg- und GAA-Konzentrationen wurden in Patienten gefunden, die eine Statin Behandlung erhielten. In Einzelnen betrug die hArg Plasmakonzentration der 212 eingeschlossenen Patienten mit Statin Behandlung im Mittel  $1,74 \pm 0,05 \mu\text{M}$ , während die 60 nicht mit Statinen behandelten Patienten eine hArg Plasmakonzentration von  $1,98 \pm 0,01 \mu\text{M}$  aufwiesen ( $p=0,033$ , Abb. 2a). Die Plasmakonzentration von GAA betrug in der Statin-Gruppe  $3,41 \pm 0,2 \mu\text{M}$  und in der nicht-Statin-Gruppe  $3,76 \pm 0,3 \mu\text{M}$  ( $p=0,039$ , Abb. 2b). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer geringeren AGAT-Expression oder -Aktivität unter Statin Behandlung (Mangravite et al., 2013).

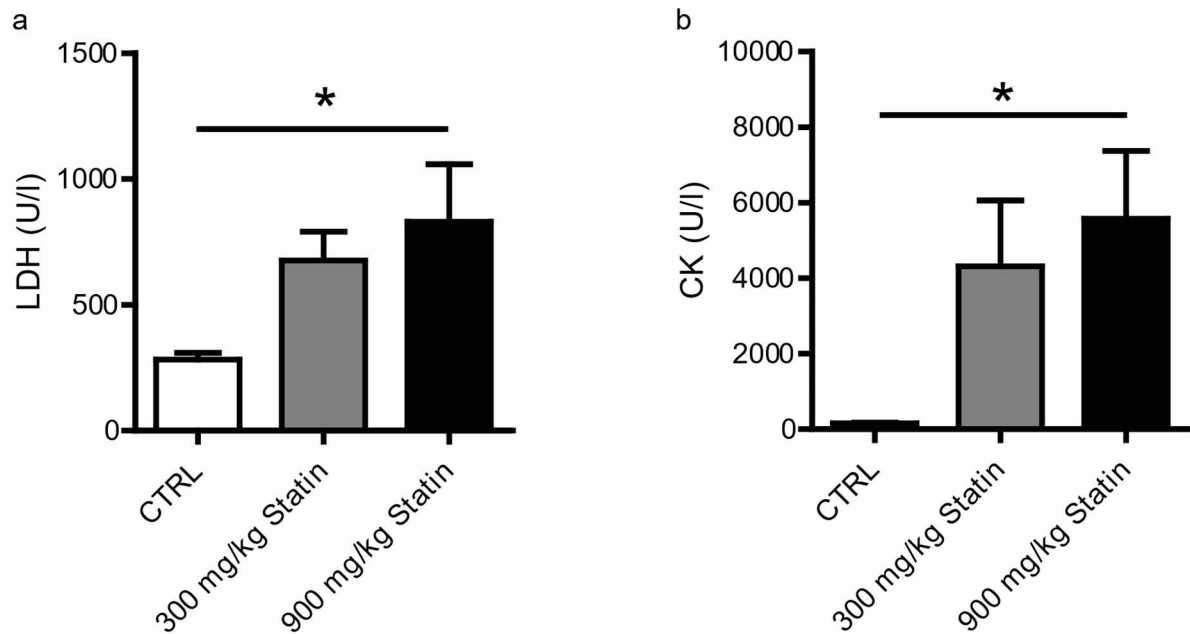


**Abbildung 2:** hArg (a) und GAA (b) Konzentration in cerebrovaskulären Patienten mit Statin Behandlung (n=212) und ohne Statin Behandlung (n=60). Die Daten sind abgebildet als Kastengrafik mit 95%-Konfidenzintervall. \*  $P < 0,05$ ; GAA, Guanidinoacetat.

### 1.3.2 Simvastatin-induzierte Myopathie und AGAT Expression in C57BL6/J WT Mäusen

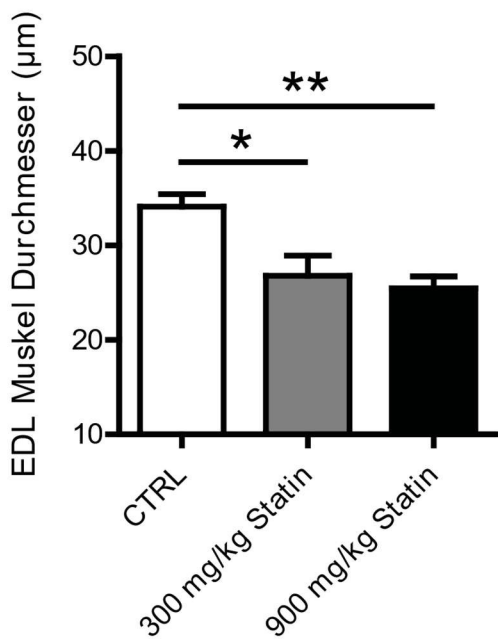
Zur Etablierung eines Mausmodells Simvastatin induzierter Myopathien wurden zunächst C57BL6/J Wildtyp (WT) Mäuse mit 0 mg/kg, 300 mg/kg und 900 mg/kg Simvastatin behandelt. Darüber hinaus sollten die Hoch- und Niedrigdosisgruppe eine geeignete Dosis für die nachfolgenden Experimente mit sicheren objektivierbaren Effekten etabliert werden.

Nach vierwöchiger Statin Behandlung wurde in der 900 mg/kg Statin Gruppe ein LDH-Spiegel von  $830 \pm 228,6 \text{ U/l}$  als Anzeichen des hepatischen Zellunterganges gemessen, wohingegen in der Kontrollgruppe  $282,5 \pm 26,3 \text{ U/l}$  nachgewiesen wurde. In der Gruppe mit 300 mg/kg Simvastatin konnte eine Konzentration von  $676,6 \pm 113,7 \text{ U/l}$  gemessen werden (Abb. 3a). Passend hierzu war auch die CK in den Statin Gruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb 3b:  $5578 \pm 1791 \text{ U/l}$  in der 900 mg/kg Gruppe,  $4317 \pm 1740 \text{ U/l}$  in der 300 mg/kg Gruppe und  $160,3 \pm 15,6 \text{ U/l}$  in der Kontrollgruppe).



**Abbildung 3:** LDH (a) und CK (b) Plasmakonzentrationen in WT Mäusen mit 0 mg/kg, 300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter. N=4-5 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \* P<0,05; LDH, Laktatdehydrogenase; CK, Kreatinkinase; WT, C57BL6/J Wildtypmäuse; CTRL, Kontrolle.

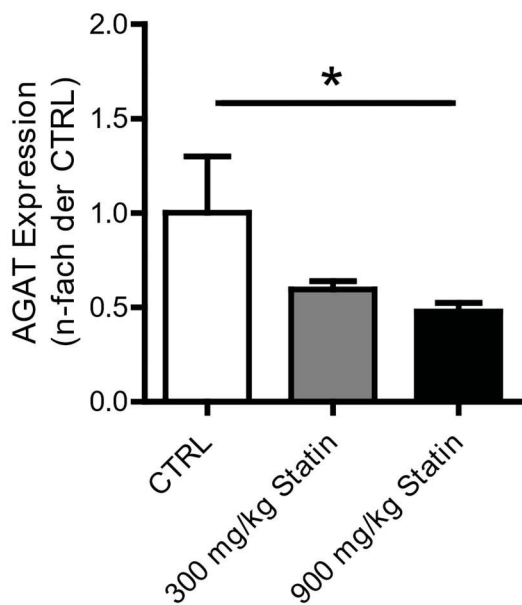
Histologisch wurde in Übereinstimmung zu den laborchemischen Daten eine Abnahme der Myozytendurchmesser als morphologischer Nachweis für eine Muskelatrophie im *Muskulus extensor digitorum longus* beobachtet (Abb 4: 25,5±1,3 µm in der 900 mg/kg Gruppe, 26,8±2,1 µm in der 300 mg/kg Gruppe und 34,1±1,3 µm in der Kontrollgruppe).



**Abbildung 4:** Myozytendurchmesser des EDL Muskel in WT Mäusen mit 0 mg/kg, 300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter. N=4-5 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \* P<0,05; \*\* P<0,01; EDL, Extensor digitorum longus; WT, C57BL6/J Wildtypmäuse; CTRL, Kontrolle.

Wie bereits in menschlichen Lymphozyten Statin behandelter Patienten gezeigt (Mangravite et al. 2013), konnte auch in der untersuchten Statin Gruppe eine verminderte AGAT-Expression in der Niere (dem Hauptexpressionsorgan der AGAT) festgestellt werden (Abb. 5: CTRL:  $1,0 \pm 0,3$ ; 300 mg/kg Statin:  $0,6 \pm 0,04$ ; 900 mg/kg Statin:  $0,48 \pm 0,05$ ).

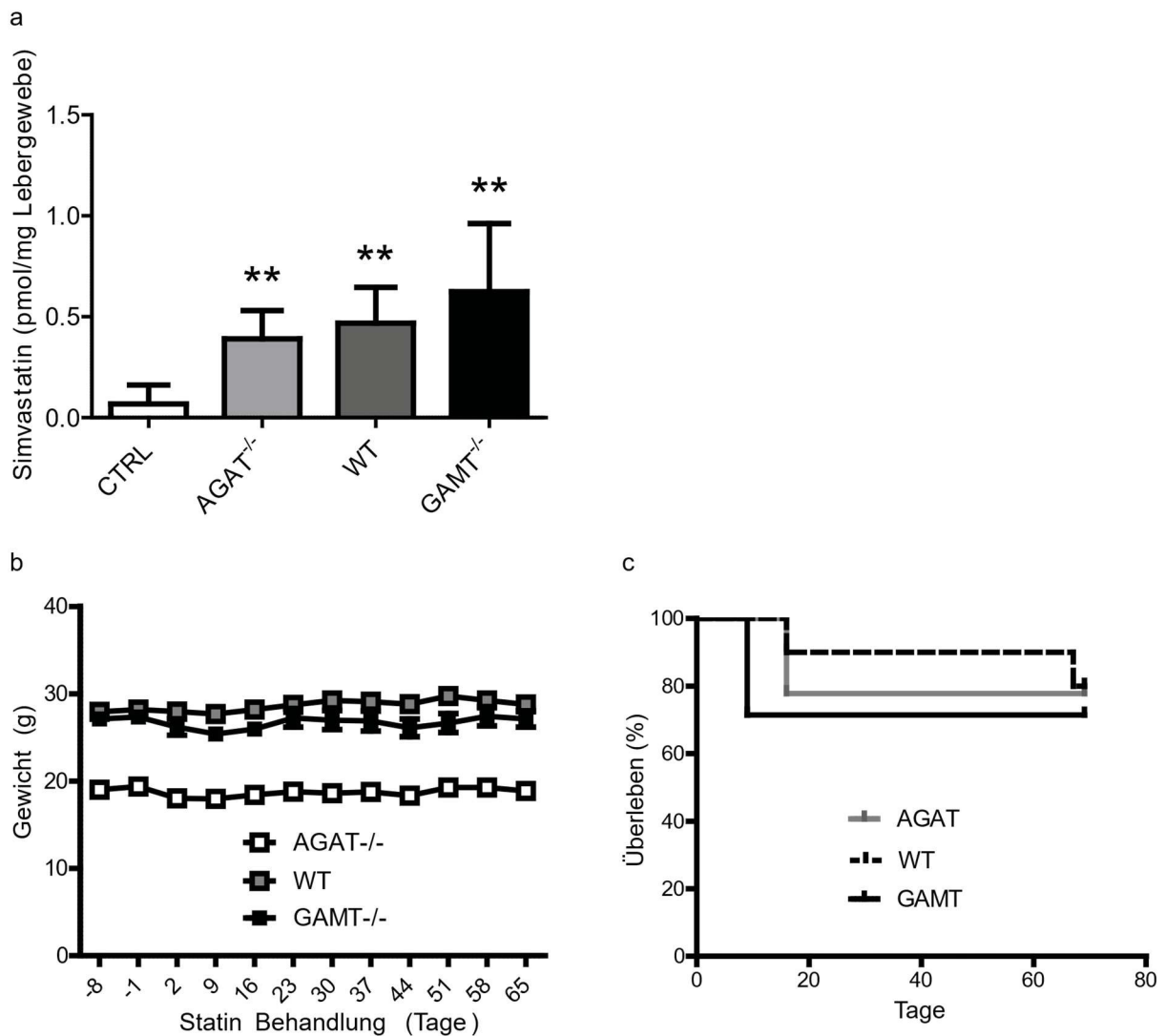
Somit konnten wir ein Mausmodell mit Simvastatin-induzierter Myopathie annehmen. Da die Effekte dosisabhängig in der höheren Statin Dosis mit 900mg/kg ausgeprägter und eindeutiger waren, entschieden wir uns, für die folgenden Experimente ausschließlich die höhere Statin Dosis zu verwenden.



**Abbildung 5:** Relative AGAT-Expression in der Niere von WT Mäusen mit 0 mg/kg, 300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter. N=4-5 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \* P<0,05; AGAT, Arginin-Gylzin-Amidino-transferase; WT, C57BL6/J Wildtypmäuse; CTRL, Kontrolle.

### 1.3.3 Simvastatin-induzierte Myopathien im Vergleich zwischen den Mausmodellen (WT, AGAT<sup>-/-</sup> und GAMT<sup>-/-</sup>)

Um die Simvastatin-induzierte Myopathie in den verschiedenen Mausmodellen zu untersuchen, erfolgte eine Statin-Supplementierung mit 900 mg/kg Futter über 4 Wochen. In den Lebern der supplementierten Mäuse wurden im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Simvastatin Konzentrationen gemessen, während die Konzentrationen sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant unterschieden (Abb. 6a: WT:  $0,47 \pm 0,07$  pmol/mg, AGAT<sup>-/-</sup>:  $0,39 \pm 0,07$  pmol/mg, GAMT<sup>-/-</sup>:  $0,62 \pm 0,15$  pmol/mg). Die Statin-Supplementation führte in keiner der Gruppen zu einer erhöhten Sterblichkeit oder einem signifikanten Gewichtsverlust (Abb. 6b und 6c).



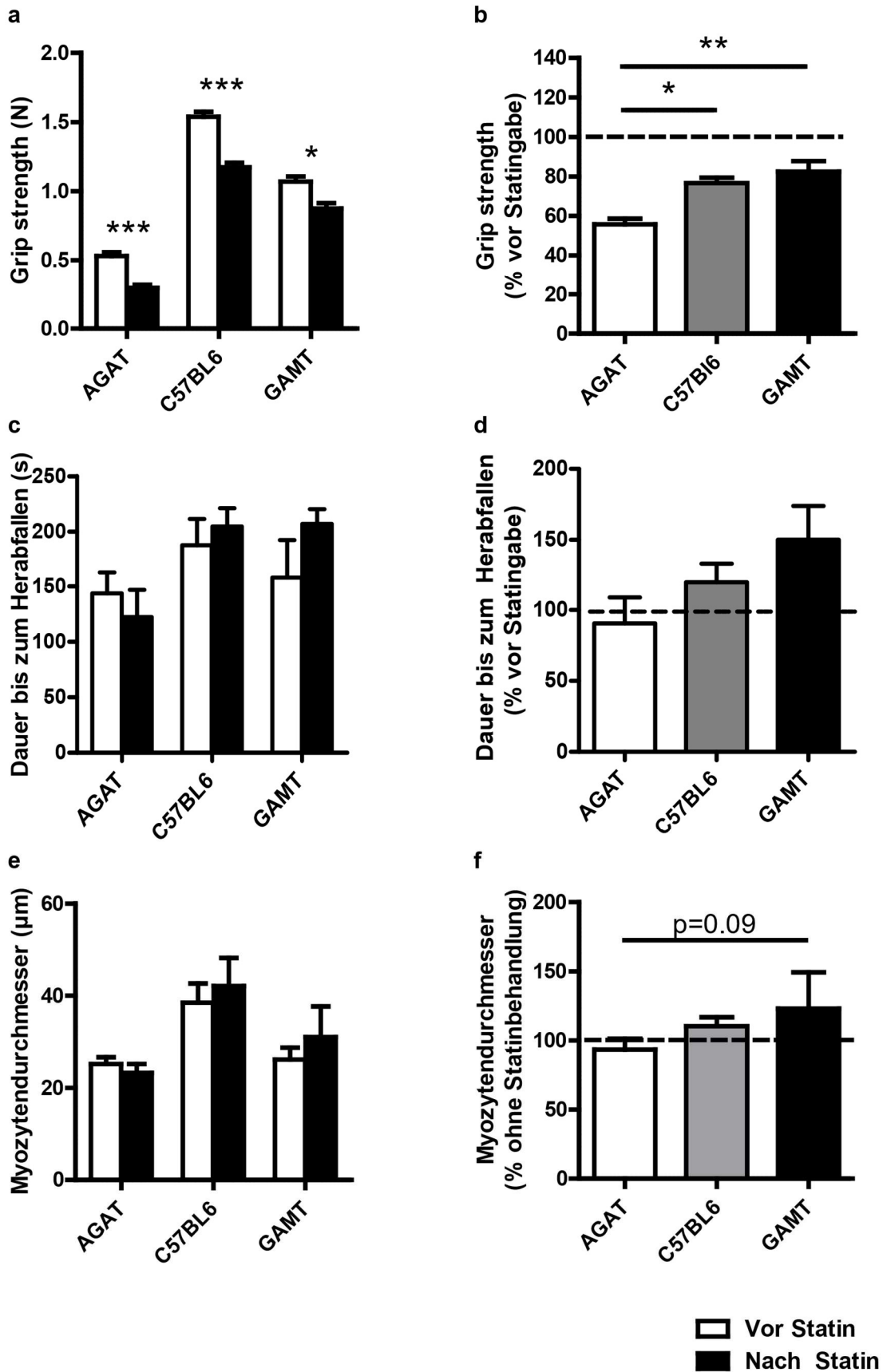
**Abbildung 6:** Simvastatin Konzentration in der Leber (a) von WT-CTRL, AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit 900 mg/kg Simvastatin im Futter. Gewicht (b) und prozentuales Überleben (c) von WT-CTRL, AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit 900 mg/kg Simvastatin im Futter über die Dauer der Studienzeit. N=5-6 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \*\* P<0,05; AGAT, Arginin:Glycin-Amidino-transferase; GAMT, Guanidinoacetat-Methyltransferase; WT, C57BL6/J Wildtypmäuse; CTRL, Kontrolle.

Um die Gruppen im Hinblick auf die motorische Funktion zu vergleichen, wurden vor und nach der Supplementation Grip strength und Rotarod Test durchgeführt. Die Kreatin-defizienten Mausmodelle wiesen bereits vor Supplementation einen muskeldystrophen Phänotyp auf, weshalb erwartungsgemäß bereits in der initialen Testung signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden. Daher erfolgte eine interne Normalisierung der Testwerte auf die Messwerte derselben Maus vor Supplementation. Insgesamt zeigten alle Gruppen nach der vierwöchigen Supplementation eine signifikante Reduktion der Vorderpfotenmuskelkraft im Grip strength Test (Abb 7a: AGAT<sup>-/-</sup> vor Statin-Supplementation: 0,53±0,03 N, AGAT<sup>-/-</sup> nach Statin-Supplementation: 0,3±0,02 N; C57BL6 WT

vor Statin-Supplementation:  $1,54 \pm 0,04$  N, C57BL6 WT nach Statin-Supplementation:  $1,17 \pm 0,03$  N;  $GAMT^{-/-}$  vor Statin-Supplementation:  $1,07 \pm 0,04$  N,  $GAMT^{-/-}$  nach Statin-Supplementation:  $0,88 \pm 0,04$  N). Im Vergleich zwischen den Gruppen war die Muskelkraft bei  $AGAT^{-/-}$  Tieren mit  $55,79 \pm 2,85\%$  der Kraft vor Statin-Supplementation signifikant stärker reduziert als in den WT und  $GAMT^{-/-}$  Gruppen (Abb 7b: WT:  $76,63 \pm 2,76\%$ ,  $GAMT^{-/-}$ :  $82,47 \pm 5,32\%$ ). Im Rotarod Test konnte nach der Statin-Supplementation eine verlängerte Dauer bis zum Herabfallen in den WT und  $GAMT^{-/-}$  Tieren als Hinweis auf einen Lernprozess gemessen werden (Abb. 7c: C57CL6 vor Statin:  $187,6 \pm 23,9$ s, C57CL6 nach Statin:  $204,6 \pm 26,5$ s;  $GAMT^{-/-}$  vor Statin:  $157,8 \pm 34,4$ s,  $GAMT^{-/-}$  nach Statin:  $207 \pm 13,3$ s). In der  $AGAT^{-/-}$  Gruppe gab es eine (nicht signifikante) Tendenz zu verminderter Leistung ( $AGAT^{-/-}$  vor Statin:  $143,6 \pm 18,9$ s,  $AGAT^{-/-}$  nach Statin:  $122,1 \pm 24,8$ s). Insgesamt zeigte die  $AGAT^{-/-}$  Gruppe erneut die schwächste Leistung, wenngleich der Unterschied statistisch nicht signifikant war.

Die Myozytendurchmesser der *Musculus extensor digitorum longus* (EDL) wurden auf nicht Statin behandelte Kontrolltiere normalisiert. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich ein Trend zu reduzierten Durchmessern in den  $AGAT^{-/-}$  Tieren ( $93,41 \pm 3,17\%$ ), obwohl auch hier der Unterschied zur WT ( $110,3 \pm 6,48\%$ ) und  $GAMT^{-/-}$  Gruppe ( $123 \pm 11,76\%$ ) keine statistische Signifikanz erreichte ( $p=0,09$ ).

In der Gesamtbetrachtung der obengenannten Ergebnisse wurde in der  $AGAT^{-/-}$  Gruppe ein stärkerer funktioneller Effekt der Simvastatin-Supplementation im Vergleich zu den WT und  $AGAT^{-/-}$  überexprimierenden  $GAMT^{-/-}$  Tieren beobachtet. Da sowohl  $AGAT^{-/-}$  wie auch  $GAMT^{-/-}$  Mäuse Cr defizient sind, deuten diese Ergebnisse auf einen Kreatin- unabhängigen Effekt hin, der entweder durch die Expression/Aktivität von AGAT oder durch deren Produkte GAA oder hArg zu erklären ist.

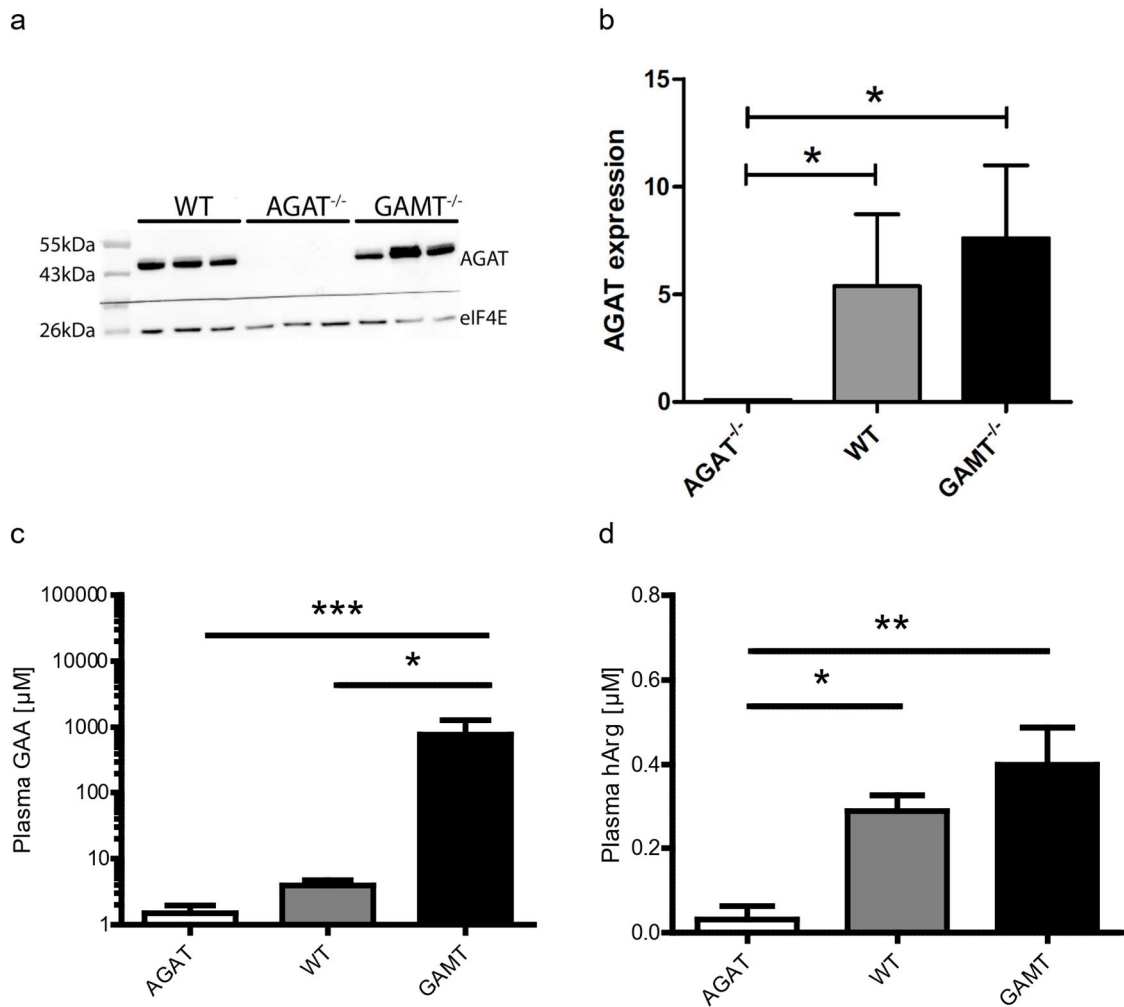


**Abbildung 7:** Absolute (a) und relative (b) Griffstärke der Vorderpfoten (Grip Strength) in AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen vor und nach Simvastatin-Supplementation. Absolute (c) und relative (d)

Dauer bis zum Herabfallen (Rotarod) in AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen vor und nach Simvastatin-Supplementation. Absolute (e) und relative (f) Myozytendurchmesser in AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen nach Simvastatin-Supplementation und in Kontroll Mäusen ohne Statingabe. N=5-6 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \* P<0,05; \*\* P<0,01;\*\*\* P<0,001; AGAT, Arginin:Glycin-Amidino-transferase; GAMT, Guanidinoacetat-Methyltransferase; WT, C57BL6/J Wildtypmäuse.

#### 1.3.4 AGAT Expression und GAA- und hArg-Spiegel im Vergleich zwischen den Mausmodellen (WT, AGAT<sup>-/-</sup> und GAMT<sup>-/-</sup>)

Wie bereits gezeigt ist die AGAT-Expression in den einzelnen Gruppen wie folgt verschieden (Choe et al., 2013b): Während die AGAT<sup>-/-</sup> Tieren keine AGAT exprimieren, ist in den GAMT<sup>-/-</sup> Mäusen sogar eine Überexpression im Vergleich zu den WT Tieren vorhanden. Passend dazu sind die höchsten GAA- und hArg-Konzentrationen in GAMT<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisbar, während in den AGAT<sup>-/-</sup> Tieren signifikant niedrigere Konzentrationen gemessen wurden (Abb. 8c und 8d: GAA-Konzentrationen in AGAT<sup>-/-</sup>: 1,50±0,45 µM, WT: 3,94±0,75 µM und GAMT<sup>-/-</sup>: 773±504,8 µM; hArg-Konzentrationen in AGAT<sup>-/-</sup>: 0,03±0,03 µM, WT: 0,29±0,04 µM und GAMT<sup>-/-</sup>: 0,4±0,09 µM).



**Abbildung 8:** Relative (a+b) AGAT Expression in der Niere von AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen ohne Simvastatin-Supplementation. Plasmakonzentrationen von GAA (c) und hArg (d) in AGAT<sup>-/-</sup>, GAMT<sup>-/-</sup> und WT Mäusen ohne Simvastatin-Supplementation. N=5-6 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; AGAT, Arginin:Glycin-Amidino-transferase; GAMT, Guanidinoacetat-Methyltransferase; WT, C57BL6/J Wildtypmäuse. GAA, Guanidinoacetat; hArg, Homoarginin.

### 1.3.5 Einfluss der Kreatin Supplementation auf Simvastatin induzierte Myopathien in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen

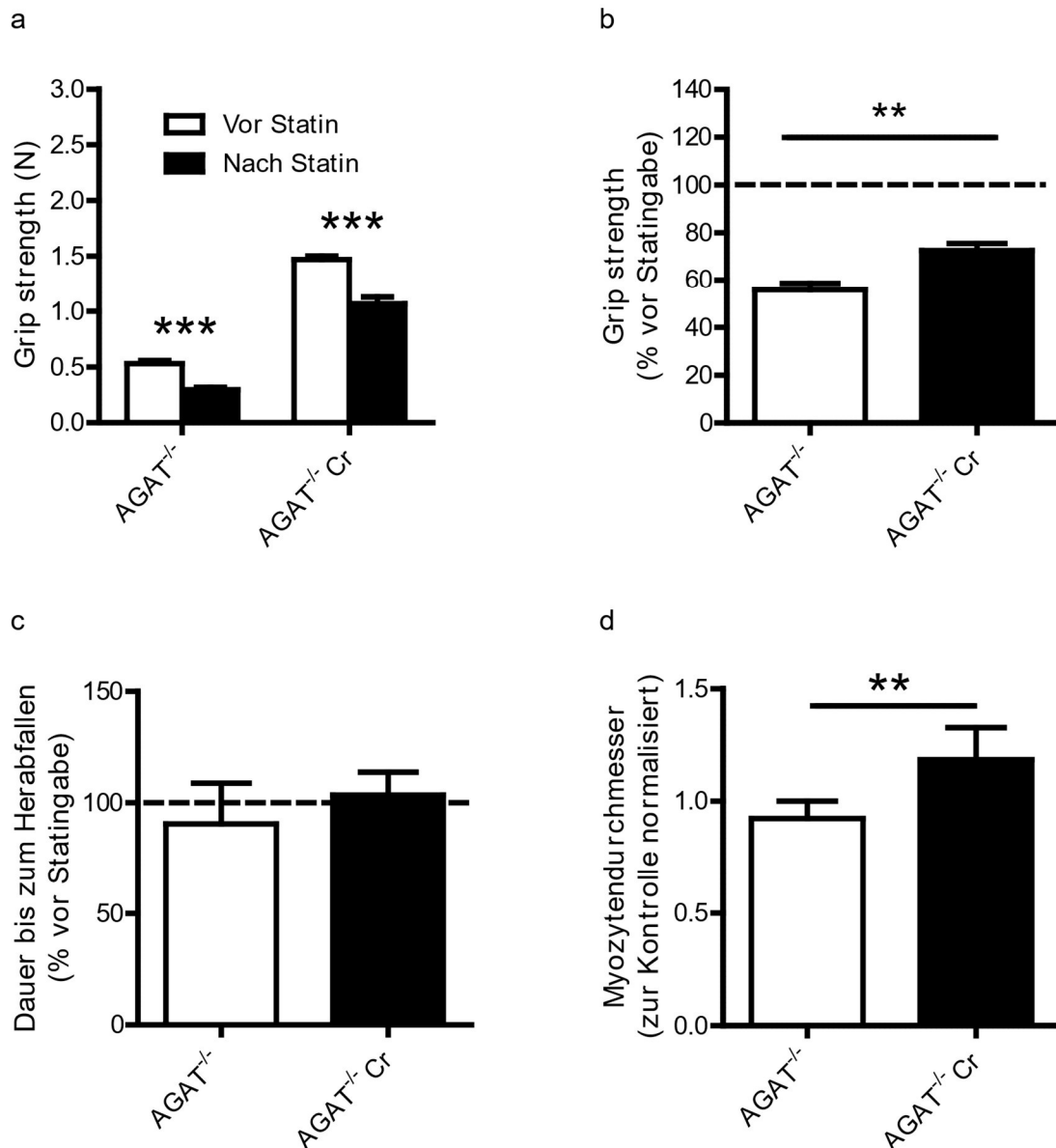
Um nun den Einfluss von Cr unabhängig von der AGAT Expression/Aktivität und hArg als Störfaktor zu untersuchen, wurden AGAT<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet. Wie bereits bekannt reduziert eine Statin-Supplementation die AGAT-Expression in Mäusen (siehe oben) und Menschen (Mangravite et al., 2013). Eine reduzierte AGAT-Expression führt zu niedrigeren hArg, GAA und Cr Spiegel (Choe et al., 2013b). Die untersuchten AGAT<sup>-/-</sup> Mäuse wurden randomisiert und die Cr Gruppe mit 1% Cr über das Futter supplementiert. Wie bereits in mehreren Arbeiten (Choe et al., 2013b) gezeigt, reichte diese

Menge aus, um die Kreatin abhängigen Effekte in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen hinsichtlich des Muskelphänotyps vollständig zu kompensieren.

In den Grip strength Tests wurde eine signifikant reduzierte Muskelkraft der Vorderpfoten im Vergleich zu vor der Statin Behandlung festgestellt (Abb 9a: AGAT<sup>-/-</sup> vor Statin: 0,53±0,03 N, AGAT<sup>-/-</sup> nach Statin: 0,3±0,02 N; AGAT<sup>-/-</sup>Cr vor Statin: 1,47±0,03 N, AGAT<sup>-/-</sup>Cr nach Statin: 1,07±0,06 N). In diesen Experimenten war die Reduktion in den nicht Kreatin-substituierten Tieren nach interner Normalisierung auf die Werte vor Statin-Supplementation signifikant größer (Abb. 9b: AGAT<sup>-/-</sup>: 55,79±2,85% der Kraft vor Statin-Supplementation, AGAT<sup>-/-</sup>Cr: 72,50±2,96% der Kraft vor Statin-Supplementation).

Beim Rotoarod Test konnten nach interner Normalisierung keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 9c: AGAT<sup>-/-</sup>: 90,43±18,3% der Dauer vor Statin-Supplementation, AGAT<sup>-/-</sup>Cr: 103,4±10,3% der Dauer vor Statin-Supplementation). Die Muskelhistologien der EDL zeigten in Übereinstimmung zu den Grip strength Daten nach Normalisierung signifikant geringere Durchmesser in den nicht Kreatin-substituierten Tieren im Vergleich zur Cr Gruppe (Abb. 9d: AGAT<sup>-/-</sup> Myozytendurchmesser normalisiert: 0,92±0,03, AGAT<sup>-/-</sup>Cr Myozytendurchmesser normalisiert: 1,19±0,06).

Zusammenfassend führte eine Kreatin-Substitution unabhängig von der AGAT Aktivität/Expression zu geringeren Simvastatin induzierten Muskelveränderungen.



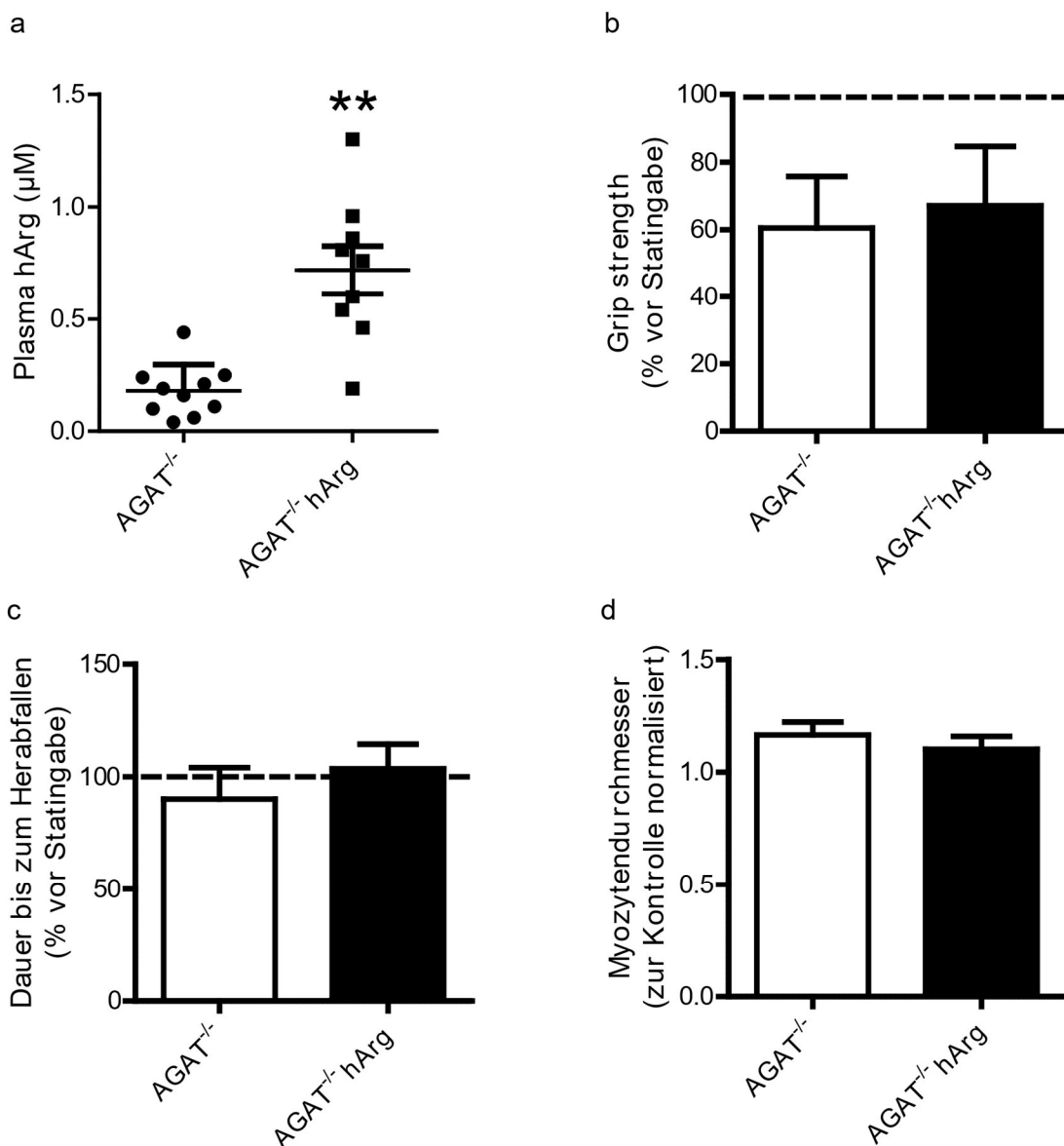
**Abbildung 9:** Absolute (a) und relative (b) Griffstärke der Vorderpfoten (Grip Strength) in AGAT<sup>-/-</sup> und AGAT<sup>-/-</sup>Cr Mäusen vor und nach Simvastatin-Supplementation. Relative (c) Dauer bis zum Herabfallen (Rotarod) in AGAT<sup>-/-</sup> und AGAT<sup>-/-</sup>Cr Mäusen nach Simvastatin-Supplementation. Auf Kontrollmäuse normalisierte relative Myozytendurchmesser (d) in AGAT<sup>-/-</sup> und AGAT<sup>-/-</sup>Cr Mäusen nach Simvastatin-Supplementation. N=5-6 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001; AGAT, Arginin:Glycin-Amidino-transferase; AGAT<sup>-/-</sup>Cr, Kreatin supplementierte AGAT Knockout.

### 1.3.6 Einfluss der hArg-Supplementation auf Simvastatin induzierte Myopathien in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen

Zur Untersuchung der hArg Wirkung wurden AGAT<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet, um einen AGAT und Cr unabhängigen Effekt nachzuweisen. Es erfolgte eine Randomisierung in eine Kontroll- und eine hArg-Gruppe, die mit 14mg/l hArg über das Trinkwasser supplementiert wurden. Erwartungsgemäß konnte

in dieser Gruppe eine erhöhte hArg Plasmakonzentration nachgewiesen werden (AGAT<sup>-/-</sup>: 0,18±0,04 µM, AGAT<sup>-/-</sup> hArg: 0,72±0,11 µM). In den motorischen Funktionstests (Grip strength und Rotarod Test) konnten in dieser Kohorte keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 10b: AGAT<sup>-/-</sup>: 60,49±4,81% der Kraft vor Statin-Supplementation, AGAT<sup>-/-</sup>hArg: 67,11±5,84% der Kraft vor Statin-Supplementation; Abb 10c: AGAT<sup>-/-</sup>: 90,17±13,9% der Dauer vor Statin-Supplementation; AGAT<sup>-/-</sup>hArg: 103,6±10,9% der Dauer vor Statin-Supplementation). Auch in den Histologien des *musculus Soleus*, die auf Kontrolltiere ohne Simvastatin Behandlung normalisiert wurden, konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 10d: AGAT<sup>-/-</sup> Myozytendurchmesser normalisiert: 1,17±0,06, AGAT<sup>-/-</sup>hArg Myozytendurchmesser normalisiert: 1,1±0,06).

Insgesamt konnte in dieser Kohorte kein Effekt der hArg Gabe auf die Simvastatin induzierte Myopathie gezeigt werden.



**Abbildung 10:** Plasma hArg (a) Spiegel in AGAT<sup>-/-</sup> und AGAT<sup>-/-</sup>hArg Mäusen vor Simvastatin-Supplementation. Relative Griffstärke (b) der Vorderpfoten (Grip Strength) und relative (c) Dauer bis

zum Herabfallen (Rotarod) in AGAT<sup>-/-</sup> und AGAT<sup>-/-</sup>hArg Mäusen nach Simvastatin-Supplementation. Auf Kontrollmäuse normalisierte relative Myozytendurchmesser (d) in AGAT<sup>-/-</sup> und AGAT<sup>-/-</sup>hArg Mäusen nach Simvastatin-Supplementation. N=5-6 pro Gruppe. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert±Standardfehler. \*\* P<0,01; AGAT, Arginin:Glycin-Amidino-transferase; AGAT<sup>-/-</sup>hArg, Homoarginin-supplementierte AGAT Knockout.

## 1.4 Diskussion

Die Haupteigenschaften der vorliegenden Arbeit waren: 1. Simvastatin führte in einer Dosis von 900 mg/kg Futter zu einer Statin-induzierten Myopathie in WT Mäusen. 2. Simvastatin führt in Mäusen zu einer Inhibition der AGAT Expression und zudem zu niedrigeren Konzentrationen der AGAT Produkte hArg und GAA (Enzymaktivität). 3. Im Vergleich der Mausmodelle war der Simvastatin-Effekt in AGAT<sup>-/-</sup> am deutlichsten und in GAMT<sup>-/-</sup> am schwächsten ausgeprägt. Dies spricht für einen Cr unabhängigen Effekt. 4. In Cr-substituierten AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen war der Statin-Effekt geringer ausgeprägt als in nicht substituierten Tieren.

Statine werden bei kardiovaskulären Patienten häufig verschrieben und das Absetzen der Statintherapie ist mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet (Jackevicius et al., 2002). Daher ist die klinische Bedeutung der häufigsten Nebenwirkung, die zu einem Therapieabbruch führt, der Statin-induzierten Muskelbeschwerden, beträchtlich. Eine wirksame Prophylaxe der Statin-assoziierten Nebenwirkungen konnte bisher nicht etabliert werden. In einer vorhergehenden Arbeit wurde eine Assoziation zwischen dem AGAT Gen und Statin-induzierten Myopathien in zwei unabhängigen Kohorten beobachtet (Mangravite et al., 2013). Darüber hinaus konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass ein AGAT Knockdown zu einer verminderten Produktion von LDL Strukturproteinen (u.a. Apolipoprotein B) führt (Mangravite et al., 2013). Zudem wurde in 480 Simvastatin-behandelten Patienten eine verminderte AGAT Expression in Lymphoblasten nachgewiesen (Mangravite et al., 2013).

In Übereinstimmung mit den letztgenannten Ergebnissen konnten wir in der vorliegenden Arbeit eine verminderte AGAT Expression in der Niere, dem Hauptexpressionsorgan der AGAT, in Simvastatin behandelten Mäusen nachweisen (Kontrollgruppe:  $1,0 \pm 0,59$ ; Statingruppe:  $0,48 \pm 0,1$ ;  $p=0,017$ ). Auch im klinischen Patientenkollektiv cerebravaskulärer Patienten wurden in der Statin Gruppe im Vergleich zu nicht Statin behandelten Patienten verminderte hArg und GAA Plasmakonzentrationen gemessen. Interessanterweise war im Vergleich der Mausmodelle die Simvastatin-induzierte Myopathie in GAMT<sup>-/-</sup> Tieren weniger stark ausgeprägt als in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen. GAMT ist das zweite Enzym der Reaktionskette in der endogenen Cr Produktion. Die GAMT<sup>-/-</sup> Mäuse sind genau wie AGAT<sup>-/-</sup> Kreatindefizient, jedoch findet in GAMT<sup>-/-</sup> Mäusen aufgrund des negativen Endprodukt Feedback Mechanismus bei fehlendem Cr eine AGAT Überexpression statt (Abb.8; Choe et al., 2013a). In den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich im Vergleich von AGAT<sup>-/-</sup> zu GAMT<sup>-/-</sup> ein geringerer Statin-induzierter Muskeleffekt in GAMT<sup>-/-</sup> Tieren. Dies deutet auf einen Cr unabhängigen Effekt hin.

Im Gegensatz dazu zeigte die Cr-Substitution in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen einen Kreatin-protectiven Effekt gegen Statin-induzierte Myopathien in dieser Kohorte. Dies erscheint vor dem Hintergrund der Funktion des Cr und der bisherigen Erkenntnisse plausibel. In Patienten mit Statinintoleranz konnten in zwei Arbeiten bereits Hinweise auf eine Reduktion muskelassoziiierter Symptome unter Cr Supplementation festgestellt werden (Balestrino und Adriano, 2018; Shewmon und Craig, 2010). Grundsätzlich dient Cr in phosphorylierter Form als Energiepuffer für Gewebe mit hohem und schwankendem Energiebedarf und kommt in hohen Konzentrationen in der Skelettmuskulatur vor (Wyss und Kaddurah, 2000). In Kreatin-defizienten Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase zwar zu einer erhöhten Glucose Aufnahme in die Zellen führt, der mitochondriale Energiestoffwechsel jedoch ineffizient ist (Nabuurs et al., 2013; Stockebrand et al., 2016; Stockebrand et al., 2018). Im Einzelnen war die Anzahl der Mitochondrien in den Zellen erhöht und die oxidative Phosphorylierung hochreguliert, dennoch zeigten sich verminderte ATP Konzentrationen (Nabuurs et al., 2013; Stockebrand et al., 2018). In ähnlicher Weise wurde kürzlich beim Menschen eine Assoziation zwischen mitochondrialer Dysfunktion mit Inhibition des Atmungskettenkomplexes III und statinassoziiierter Myalgie festgestellt (Mallinson et al., 2015; Schirris et al., 2015). Ein gemeinsamer zugrundeliegender Mechanismus wäre daher denkbar. Limitierend muss zu den Ergebnissen an Cr-supplementierten Tieren gesagt werden, dass der Effekt lediglich an AGAT<sup>-/-</sup> Tieren gezeigt wurde, inwieweit sich dies an WT oder GAMT<sup>-/-</sup> Tieren reproduzieren lässt bleibt offen und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die hArg-Supplementation in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen lieferte keinen Hinweis auf eine protektive Wirkung von hArg gegenüber Statin-induzierten Myopathien. Grundsätzlich ist hArg in relevanten Konzentrationen im Skelettmuskel nachweisbar. In einer Studie konnten doppelt so hohe Konzentrationen im Vergleich zum Fettgewebe nachgewiesen werden (May et al., 2015). In früheren epidemiologischen Studien waren niedrige hArg Konzentrationen vor allem mit erhöhter kardiovaskulärer Morbidität, einem schlechteren Outcome nach Schlaganfall und einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert (Choe et al., 2013a; März et al., 2010; Pilz et al., 2011). In Mausmodellen mit experimentellem Schlaganfall und Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt konnte ein protektiver Effekt hoher hArg Konzentrationen nachgewiesen werden (Choe et al., 2013a; Atzler et al., 2017). In Patienten mit hereditären Myopathien wurden zudem niedrigere hArg Spiegel beobachtet (Hörster et al., 2015). Auch Patienten mit unbehandelter pulmonaler Hypertonie weisen verminderte hArg Plasmakonzentrationen auf. Passend hierzu wurde in WT Mäusen unter chronischer Hypoxie eine verminderte AGAT Expression und reduzierte hArg Plasmakonzentrationen nachgewiesen (Atzler et al., 2016; Hannemann et al., 2021). Aufgrund der genannten Ergebnisse wäre eine Schutzwirkung des hArg denkbar. Einschränkend zu den Ergebnissen ist anzumerken, dass die Experimente an AGAT<sup>-/-</sup> Tieren durchgeführt wurden, um Cr als Störfaktor auszuschließen. Ein hArg-Effekt in WT-Tieren kann somit nicht ausgeschlossen werden, insbesondere vor dem Hintergrund der unter Statintherapie beobachteten Reduktion des hArg-Spiegels bei inhibierter AGAT-Expression. Im Hinblick auf die klinische Signifikanz der Gesamtergebnisse bleibt die Einschränkung des Tiermodells hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen bestehen.

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten zeigen, dass eine hArg-Supplementation mit 125 mg/Tag sowohl bei gesunden menschlichen Probanden wie auch in Ratten und Schweinen ohne relevante Nebenwirkungen möglich ist (Atzler et al., 2017; Schönhoff et al., 2018; Hou et al., 2016). Eine Supplementation von Cr wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Auch hier zeigten sich insgesamt keine relevanten Einschränkungen oder Nebenwirkungen (Kiebertz et al., 2015). Eine klinische Studie zur Erprobung von Cr und/oder hArg in Patienten mit Statin-induzierter Myopathie wäre daher denkbar. Beide Substanzen könnten bei Supplementation eine Reduktion des Plasmaspiegels durch verminderte Expression der AGAT unter Statintherapie kompensieren. Andererseits ist Cr ein Inhibitor der AGAT und könnte falls ein protektiver Effekt der AGAT Expression/Aktivität auf Statin-induzierte Myopathien besteht, diesen konterkarieren.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Behandlung mit Simvastatin in Mäusen zu einer verminderten AGAT Expression/Aktivität und in der Folge zu verminderten GAA und hArg Plasmaspiegeln in Statin behandelten Mäusen führt. Zudem waren AGAT überexprimierende GAMT<sup>-/-</sup> Mäuse weniger von Statin-induzierter Myopathie betroffen. Während hArg keine protektive Wirkung hatte, zeigte die Cr-Supplementation in AGAT<sup>-/-</sup> Mäusen eine Reduktion der Statin-assoziierten Myopathie. Insgesamt sind weitere klinische und tierexperimentelle Ansätze notwendig, um die Wirkung und die zugrundeliegenden Mechanismen der AGAT bei Statin-induzierten Myopathien aufzuklären.

Unsere Untersuchungen an CT1 Knockout (CT1<sup>-/-</sup>) Mäusen zeigen einen Phänotyp mit beeinträchtigter Muskelfunktion, ausgeprägter Muskelatrophie und thorakolumbaler Skoliose (Stockebrand et al., 2018), wie aus anderen Cr-defizienten Mausmodellen bekannt (Schmidt et al., 2004; Nabuurs et al., 2013; Baroncelli et al., 2014; Russell et al., 2014). In CT1-defizienten menschlichen Patienten stehen neurokognitive Symptome wie geistige Retardierung und Krampfanfälle im Vordergrund, wenngleich auch muskuläre Symptome beschrieben sind (deGrauw et al., 2003; Stöckler et al., 2007).

Im Skelettmuskel der CT1<sup>-/-</sup> Mäuse finden sich reduzierte Cr und Phosphokreatin (PCr) Konzentrationen (Skelton et al., 2011; Russell et al., 2014; Baroncelli et al., 2016; Stockebrand et al., 2018). Im Vergleich zwischen einzelnen Mausmodellen, welche einen vergleichbaren muskeldystrophen Phänotyp aufweisen, fallen jedoch teils deutliche Diskrepanzen im Hinblick auf die Cr-Konzentrationen auf. Interessanterweise weisen zwei Fallstudien zu menschlichen CT1-defizienten Patienten nahezu normale Cr-Konzentrationen im Muskel auf (deGrauw et al., 2003; Pyne-Geithman et al., 2004).

Ursächlich für die Unterschiede der Cr-Konzentrationen könnte eine verbliebene Aktivität des CT1 abhängig von der Mutation in menschlichen Patienten, Unterschiede in Mausstämmen oder methodisch unterschiedliche Messverfahren sein. Eine hochregulierte Expression von AGAT im Skelettmuskel, welche die endogene Cr Synthese steuert, könnte ebenfalls residuale Cr Konzentrationen erklären. Während in WT Mäusen nur eine geringe Expression der AGAT im Skelettmuskel stattfindet, ist die Expression der AGAT im Skelettmuskel der CT1<sup>-/-</sup> Mäuse hochreguliert. Dennoch bleiben die PCR- und ATP-Konzentrationen reduziert, was darauf hindeutet, dass diese Synthese keine vollständige Kompensation ermöglicht (Stockebrand et al., 2018). Insgesamt liegt es nahe, dass die verminderte ATP Produktion aufgrund der gestörten oxidativen Phosphorylierung in CT1<sup>-/-</sup> Mäusen, ähnlich wie bei Patienten mit mitochondrialen Myopathien (Andreassen et al., 2008; Comi et al., 1998), eine der Hauptursachen für die Muskelatrophie darstellt.


Funktionell motorische Tests in CT1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen eine reduzierte Griffstärke der Vorderpfoten, eine verminderte Laufleistung und Einschränkungen in der motorischen Lernfähigkeit (Stockebrand et al., 2018). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den motorischen Phänotypen anderer Cr-defizienter Mausmodelle (Nabuurs et al., 2013; Russell et al., 2014; Baroncelli et al., 2016) und finden Entsprechung in Berichten über menschliche Patienten mit Koordinations- und Gleichgewichtsstörungen (Stöckler et al., 2007). Neben der beeinträchtigten Muskelphysiologie könnten auch Störungen der kortikalen Plastizität zur verminderten motorischen Lernfähigkeit der Mäuse beitragen (Baroncelli et al., 2016; diCristo et al., 2007).

Erste Daten im Mausmodell zeigen eine Verbesserung der motorischen Leistung unter Substitution mit Cyclocreatin (Russell et al., 2014), einem synthetischen Cr-Analogon, welches nicht vom CT1-Transport abhängig ist (Stöckler et al., 1996; Loike et al., 1988). In Patienten mit CT1-Defizit führt eine hochdosierte Cr-Substitution zu einer Besserung der muskulären Symptome, nicht aber der neurokognitiven Defizite (Shen et al., 2022).

Zusammengefasst führt eine CT1-Defizienz zu einer gestörten Energiebereitstellung und in der Folge zu einer Muskelatrophie mit Kraftverlust. Die genauen Mechanismen und Auswirkungen einer CT1-Defizienz besonders im Hinblick auf menschliche Patienten bedürfen weiterer Untersuchungen.



# Muscle phenotype of AGAT- and GAMT-deficient mice after simvastatin exposure

Ali Sasani<sup>1,2,3</sup> · Sönke Hornig<sup>2</sup> · Ricarda Grzybowski<sup>1</sup> · Kathrin Cordts<sup>3,4</sup> · Erik Hanff<sup>5</sup> · Dimitris Tsikas<sup>5</sup> · Rainer Böger<sup>3,4</sup> · Christian Gerloff<sup>1</sup> · Dirk Isbrandt<sup>6,7</sup> · Axel Neu<sup>2</sup> · Edzard Schwedhelm<sup>3,4</sup> · Chi-un Choe<sup>1</sup> 

Received: 24 January 2019 / Accepted: 5 December 2019 / Published online: 18 December 2019  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Statin-induced myopathy affects more than 10 million people worldwide. But discontinuation of statin treatment increases mortality and cardiovascular events. Recently, L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) gene was associated with statin-induced myopathy in two populations, but the causal link is still unclear. AGAT is responsible for the synthesis of L-homoarginine (hArg) and guanidinoacetate (GAA). GAA is further methylated to creatine (Cr) by guanidinoacetate methyltransferase (GAMT). In cerebrovascular patients treated with statin, lower hArg and GAA plasma concentrations were found than in non-statin patients, indicating suppressed AGAT expression and/or activity ( $n=272$ ,  $P=0.033$  and  $P=0.039$ , respectively). This observation suggests that statin-induced myopathy may be associated with AGAT expression and/or activity in muscle cells. To address this, we studied simvastatin-induced myopathy in AGAT- and GAMT-deficient mice. We found that simvastatin induced muscle damage and reduced AGAT expression in wildtype mice (myocyte diameter:  $34.1 \pm 1.3 \mu\text{m}$  vs  $21.5 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ,  $P=0.026$ ; AGAT expression:  $1.0 \pm 0.3$  vs  $0.48 \pm 0.05$ ,  $P=0.017$ ). Increasing AGAT expression levels of transgenic mouse models resulted in rising plasma levels of hArg and GAA ( $P<0.01$  and  $P<0.001$ , respectively). Simvastatin-induced motor impairment was exacerbated in AGAT-deficient mice compared with AGAT-overexpressing GAMT<sup>-/-</sup> mice and therefore revealed an effect independent of Cr. But Cr supplementation itself improved muscle strength independent of AGAT expression (normalized grip strength:  $55.8 \pm 2.9\%$  vs  $72.5\% \pm 3.0\%$ ,  $P<0.01$ ). Homoarginine supplementation did not affect statin-induced myopathy in AGAT-deficient mice. Our results from clinical and animal studies suggest that AGAT expression/activity and its product Cr influence statin-induced myopathy independent of each other. The interplay between simvastatin treatment, AGAT expression and activity, and Cr seems to be complex. Further clinical pharmacological studies are needed to elucidate the underlying mechanism(s) and to evaluate whether supplementation with Cr, or possibly GAA, in patients under statin medication may reduce the risk of muscular side effects.

**Keywords** Simvastatin · Homoarginine · Muscle · Creatine

## Abbreviations

AGAT L-Arginine:glycine amidinotransferase  
CK Creatine kinase  
Cr Creatine

GAA Guanidinoacetate  
GAMT Guanidinoacetate methyltransferase  
hArg L-Homoarginine  
LDH Lactate dehydrogenase  
NO Nitric oxide  
NOS Nitric oxide synthase  
WT C57BL6/J wildtype

Handling Editor: G. Wu.

Ali Sasani and Sönke Hornig contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00726-019-02812-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Chi-un Choe  
cchoe@uke.de

Extended author information available on the last page of the article

## Introduction

Statins reduce morbidity and mortality in cardiovascular and stroke patients. Recent findings advocate statin use even in people without cardiovascular disease to prevent major vascular events (Yusuf et al. 2016). Therefore, it is

not surprising that statins belong to the most prescribed drugs with still increasing numbers. Worldwide, there were more than 100 million people taking statins in 2008 and this number is expected to reach a 400 million in 2020 (Ioannidis 2014; Sathasivam and Lecky 2008). The most common side effects of statins are muscle complaints, i.e., myalgia, myopathy and in rare cases rhabdomyolysis. In clinical practice and observational studies, the incidence of statin-associated muscle symptoms in patients was reported to affect about 7–29% of patients (Stroes et al. 2015). Therefore, more than 10 million people worldwide are expected to suffer from statin-associated muscle symptoms, and 4 million people have symptoms severe enough to interfere with daily activities leading to discontinuation of medication. But non-compliance of statin use is directly associated with increased mortality and cardiovascular events (Shalev et al. 2009), which causes a severe health burden.

The underlying causes of statin-induced muscle symptoms are still incompletely understood. Besides possible effects on cholesterol anabolism, an altered cellular energy metabolism has been discussed. Statins might disturb mitochondrial function, attenuate energy production, increase catabolism of muscle proteins and alter calcium homeostasis (Stroes et al. 2015). Further insight into understanding pathophysiological principles has been obtained from pharmacogenomic studies evaluating genes associated with statin-induced myopathy. So far, a number of genes have been identified which influence statin metabolism (e.g., hepatic influx transporter *SLCO1B1*) and ATP synthesis (CoQ2, cytochromes). Recently, the L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) gene has been associated with statin-induced myopathy in two independent populations (Mangravite et al. 2013).

AGAT catalyzes the synthesis of L-homoarginine (hArg) and guanidinoacetate (GAA). GAA is further converted to Cr by guanidinoacetate methyltransferase (GAMT). The AGAT-catalyzed synthesis of GAA is considered the rate-limiting step in Cr biosynthesis. Cr deficiency disturbs mitochondrial oxidative phosphorylation and energy utilization in skeletal muscle (Nabuurs et al. 2013; Stockebrand et al. 2016). Furthermore, skeletal muscle devoid of Cr reveals a severely altered response to hormones (e.g., leptin) and pyruvate handling (Stockebrand et al. 2013, 2016). With respect to hArg, the second AGAT reaction product, low circulating and excretory levels of hArg have been associated with all-cause mortality, cardiovascular events and worse outcome after stroke (Choe et al. 2013a; Frenay et al. 2015; Kayacelebi et al. 2017; Marz et al. 2010). The underlying mechanisms are still unclear. hArg is supposed to interfere with nitric oxide (NO) metabolism. hArg can serve as a weak substrate for NO synthase (NOS) and competes with L-arginine for NOS-catalyzed NO formation (Alesutan et al. 2016). In addition, hArg can inhibit L-arginine degradation

by arginase on one hand and L-arginine uptake into NOS-expressing cells on the other hand (Atzler et al. 2015). Interestingly, the NO-donating atorvastatin NCX 6560 attenuated statin-induced muscle dysfunction in mouse models compared with atorvastatin alone (D'Antona et al. 2016).

Even though the AGAT single-nucleotide polymorphism (SNP) rs9806699 was associated with reduced incidence of statin-induced myopathy in two independent populations, i.e., Marshfield cohort and SEARCH (Study of Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol Homocystein) (Mangravite et al. 2013), this observation could not be confirmed in other cohorts (Carr et al. 2014; Floyd et al. 2014). Yet, a fixed-effects meta-analysis still yielded a significant association between AGAT polymorphisms and statin-induced myopathy (Mangravite et al. 2014). Very recently, AGAT gene polymorphism rs9806699 was also associated with rosuvastatin-induced myopathy sparking the discussion about the clinical significance of AGAT in statin-induced myopathy (Bai et al. 2018). So far, only three epidemiological studies suggested associations of AGAT gene with statin-induced myopathy (Bai et al. 2018; Mangravite et al. 2013). But the causal relationship remains unclear at present.

In the present study, we observed lower hArg and GAA plasma concentrations in cerebrovascular patients treated with statin treatment compared to statin-free patients, indicating suppressed AGAT expression and/or activity. This observation suggests that statin-induced myopathy may be associated with AGAT expression and/or activity in muscle cells. To address this issue, we established a mouse model of statin-induced myopathy and studied the effects of AGAT expression. We also investigated the effects of Cr or hArg supplementation in transgenic mouse models. Our findings reveal for the first time a direct link between AGAT and statin-induced muscle physiology.

## Methods

### Care and use of transgenic mice

AGAT- and GAMT-deficient mice were generated by homologous recombination in mouse embryonic stem cells and were subsequently backcrossed to a C57BL/6 J genetic background for at least 6 generations, as described elsewhere (Choe et al. 2013b; Schmidt et al. 2004). Furthermore, animals used in this study were C57BL/6 J male mice aged 15–25 weeks. AGAT- and GAMT-deficient mice used in this study were obtained from heterozygous matings and were male mice aged 15–25 weeks. Average weight of groups was  $15.1 \pm 1.8$  g for AGAT-deficient mice,  $31.5 \pm 11.4$  g for AGAT-deficient mice on Cr supplementation,  $27.7 \pm 5.8$  g for GAMT-deficient mice,  $28.4 \pm 1.3$  g for C57BL6 mice and  $15.5 \pm 0.7$  for AGAT-deficient mice

on hArg supplementation. Mice were housed in an animal room with a 12 h light/dark cycle (lights off at 7:00 a.m.) and maintained in groups of two to three under standard housing conditions ( $21 \pm 1$  °C; 50% humidity; food and water ad libitum). Chow was essentially Cr free (R/M-H, Ssniff) (Choe et al. 2013b). For Cr supplementation, AGAT-deficient mice were given 1% Cr to chow (R/M-H, Ssniff) from birth and displayed normal body weight and behavior (Choe et al. 2013b). hArg supplementation was carried out using a 14 mg/L solution of hArg in drinking water as described previously (Choe et al. 2013a). Simvastatin treatment was achieved by addition of 300 mg/kg or 900 mg/kg to normal chow. Animal chow was composed of 22% crude protein, 4.5% crude fat, 3.9% crude fiber, 6.7% crude ash, 34.9% starch and 5.2% sugar. Nutritional food additives per kg were vitamin A (25,000 IU), vitamin D3 (1500 IU), vitamin E (125 mg), vitamin K (20 mg), iron (100 mg), zinc (50 mg), manganese (30 mg), copper (5 mg), selenium (0.1 mg) and iodine (2 mg). The remaining component was water. All behavioral tests were performed starting 2 h after light offset and finishing at least 2 h before light onset. The experimental room, adjacent to the animal room, was illuminated by dim red light. Experiments were performed blinded to experimental conditions.

### Rotarod test

Behavioral experiments were performed as previously described (Freitag et al. 2003; Morellini 2013). Mice had to walk on a turning, corrugated rod (3.2 cm in diameter) (Acceler. Rotarod for mice, Jones and Roberts, TSE 308 systems, Bad Homburg, Germany). The rod started to rotate 5 s after the mice were placed onto it. Trials 1 and 2 were performed at slow, constant speed (4 rpm) for a maximum duration of 3 min. Trials 3, 4 and 5 were performed with the accelerating rod, starting with 4 rpm up to 40 rpm within 4 min, with a maximum duration of 5 min. The performance of the mice was evaluated by scoring the latency to fall down.

### Grip strength

Maximal grip force was measured using a grip strength meter (TSE-Systems, Bad Homburg, Germany) as described previously (Nabuurs et al. 2013; Stockebrand et al. 2018). Within each group, the mean grip force of each mouse was calculated from 15 appropriate trials.

### Muscle histopathology

Muscle histology was performed as previously described (Nabuurs et al. 2013; Stockebrand et al. 2018). Briefly, animals were anesthetized with intraperitoneal injection

of ketamine and xylazine (120 mg/kg and 16 mg/kg body weight, respectively). Afterwards, mice were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline. For morphometry, commonly stained slides for haematoxylin and eosin (HE) were used. Myocyte diameters and cross sectional area were determined in multiple transverse sections of muscle using ImageJ and calculated by averaging data of five images by a blinded reviewer.

### Tissue collection and preparation

Animals were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (120 mg/kg and 16 mg/kg body weight, respectively). Kidneys and skeletal muscle were removed and flash frozen in liquid nitrogen. Lysates were prepared in homogenization buffer containing phosphatase inhibitors with disposable 1.5-mL pestles (VWR) and cleared by centrifugation. Protein concentrations were determined using a BCA protein assay (Thermo Scientific).

### Western blot

Western blot analysis was performed as previously described (Stockebrand et al. 2013). Briefly, equal amounts of cleared lysates (20–40 µg protein) were separated by SDS-PAGE on precast gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane. Specific antibodies against AGAT (#12801, Proteintech; #Sc-241785(T-16), Santa Cruz), actin (#A2066, Sigma) and eIF4E (#2067S, Cell Signaling Technology) were used according to the manufacturers' protocols. Enhanced chemiluminescence (Luminata Crescendo, Millipore, Molsheim, France) signals were detected with a luminescent image analyzer (LAS-4000, FujiFilm, Düsseldorf, Germany). Signal quantification was performed on non-saturated images with the use of ImageJ software.

### Blood chemistry

Venous ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood was retrieved by submandibular puncture and heparinized blood by direct cardiac puncture in ad libitum fed mice, as previously described (Stockebrand et al. 2015). Creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were determined by standard laboratory methods based on certified assays employed in the Department of Clinical Chemistry, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, using enzyme-based kits (Vitros Chemistry).

### Clinical study design

For the clinical stroke cohort 274 patients were recruited from the neurovascular outpatient clinic at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf from October 2015

until September 2016, as previously described (Cordts et al. 2018). The inclusion criteria were as follows: age > 18 years, diagnosis of prior stroke or patients at stroke risk, patient provided informed consent. Two patients were excluded due to missing data and therefore 272 patients were included in this study. Briefly, baseline characteristics were as described previously: age  $65 \pm 13$  years,  $27 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>, systolic blood pressure  $139 \pm 19$  mmHg, diastolic blood pressure  $77 \pm 11$  mmHg, 204 (75%) had hypertension, 62 (23%) had diabetes, 111 (41%) had hypercholesterolemia and 226 subjects (83%) had experienced prior stroke (Cordts et al. 2018). Blood samples were taken directly after inclusion in the post-absorptive state and plasma was stored at  $-20$  °C. Written informed consent was obtained from all participants. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. The study protocol has been approved by the Ethics Committee of the Hamburg Board of Physicians (PV4715).

### Mass spectrometry

Plasma hArg concentrations were determined by liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (tandem MS) analysis as described previously (Cordts et al. 2015). Briefly, 25  $\mu$ L aliquots of plasma were spiked with stable isotope-labelled hArg serving as internal standard. Proteins were precipitated with 100  $\mu$ L of methanol and filtered through a 0.22  $\mu$ m hydrophilic membrane (Multiscreen HTS™, Millipore). Afterwards, proteins were derivatized with butanolic 1 M HCl and analyzed by LC-tandem MS (Varian 1200 MS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Quantification was performed by calculation of peak area ratios and calibration with known concentrations of the analyte in dialyzed EDTA plasma. Lower and upper limits of quantification were 0.1 and 50  $\mu$ M for hArg, respectively (Atzler et al. 2011).

Plasma GAA, L-lysine, and L-arginine were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as previously reported (Hanff et al. 2019). In brief, 10  $\mu$ L of native plasma samples were treated with ice cold 2 M HCl in methanol for protein precipitation. After mixing and centrifuging, the supernatants were transferred into autosampler glass vials. The solvents were evaporated under a stream of nitrogen. In a two-step derivatization procedure, the residues were reconstituted in 2 M HCl/methanol solution for esterification and acetylation with pentafluoropropionic anhydride in ethyl acetate. Trideutero-methyl ester of GAA was freshly prepared, added to plasma samples after the esterification step and used as internal standard. Derivatized samples were evaporated under a stream of nitrogen and treated first with

200  $\mu$ L aliquots of 400 mM borate buffer (pH 8.5) and immediately thereafter with 200- $\mu$ L aliquots of toluene. Subsequently, the samples were mixed, centrifuged and the upper organic phases were transferred into autosampler glass vials. One  $\mu$ L-aliquots from toluene extracts of derivatized samples were injected into the GC-MS system comprised of a single quadrupole mass spectrometer model ISQ directly interfaced with a Trace 1310 series gas chromatograph equipped with an autosampler AS 1310 (ThermoFisher, Dreieich, Germany). For gas chromatographic separation a fused-silica capillary column Optima 17 (15 m, 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu$ m film thickness, Macherey-Nagel, Düren, Germany) was used.

Simvastatin tissue (2–10 mg wet weight) concentrations were determined using atorvastatin as internal standard applying LC-tandem MS as previously described (Wang et al. 2015). Briefly, tissue homogenates were spiked with internal standard and proteins were precipitated with acetonitrile, centrifuged (4 °C, 17,000 $\times$ g, 10 min), and supernatants were analyzed by LC-tandem MS. Chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC C18 column (2.1  $\times$  150 mm, 1.8  $\mu$ m particle size, Waters, Dublin, Ireland) at 40 °C. The mobile phases consisted of methanol and water, both with 0.1% formic acid, pumped at a flow rate of 350  $\mu$ L/min. A linear gradient elution was used from 30 to 70% methanol over 6 min with subsequent re-equilibration. The analyte and the internal standard were detected in the selected reaction monitoring (SRM) mode using the mass transitions at  $m/z$  419.2 > 199.1 for simvastatin and  $m/z$  559.2 > 440.2 for atorvastatin. Quantification was performed by calculation of peak area ratios and calibration with known concentrations of the analytes. Subsequently, the calculated concentrations were normalized to mg wet weight of tissue.

### Statistics

All data are given as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Non-parametric statistical tests were applied. For comparison of two groups Mann-Whitney test and for comparison of three groups Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison Test were performed. For comparison of two or three groups at different time points, two-way analysis of variance with Bonferroni post-test was performed. For comparison of four groups at one time point, one-way analysis of variance with Newman-Keuls post-test was used. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 5.02, La Jolla, USA) and SPSS (version 25, IBM, Somers, NY, USA).

## Results

### hArg and GAA plasma levels in patients with and without statin treatment

We analyzed hArg and GAA in plasma samples of cerebrovascular patients with and without simvastatin treatment. hArg and GAA plasma levels were significantly lower in patients with statin treatment compared with untreated patients (Fig. 1a, b). Specifically, hArg plasma levels in patients with statin treatment were  $1.74 \pm 0.05 \mu\text{M}$  ( $n=212$ ) compared with  $1.98 \pm 0.1 \mu\text{M}$  ( $n=60$ ) in patients without statin treatment (Mann–Whitney test,  $P=0.031$ , Fig. 1a). Similarly, GAA plasma levels were  $3.41 \pm 0.2 \mu\text{M}$  in patients with statin treatment ( $n=212$ ), whereas levels in patients without statin treatment were  $3.76 \pm 0.3 \mu\text{M}$  ( $n=60$ ) (Mann–Whitney test,  $P=0.039$ , Fig. 1b). Concentrations of the precursor amino acids L-lysine and L-arginine were not different between groups ( $184 \pm 34$  vs.  $186 \pm 32 \mu\text{M}$  and  $59 \pm 19$  vs.  $61 \pm 25 \mu\text{M}$ , statin vs. no statin, L-lysine and L-arginine, respectively). The lower GAA and hArg plasma levels observed in the patients of our study are consistent with the possibility that statins reduce AGAT expression/activity (Mangravite et al. 2013).

### Simvastatin-induced myopathy and AGAT expression in WT mice

To study the effect of simvastatin supplementation on muscle physiology and histology, C57BL6/J wildtype mice (WT) were randomized to receive either 0 mg/kg, 300 mg/kg or 900 mg/kg simvastatin to chow. After 4 weeks, LDH levels in blood were increased in mice fed 900 mg/kg simvastatin indicating cell damage (Fig. 2a). Similarly, CK levels were increased in mice treated with 900 mg/kg simvastatin

indicating muscle damage (Fig. 2b). Correspondingly, myocyte diameters of extensor digitorum longus (EDL) muscle were decreased in the 900 mg/kg simvastatin group as morphological sign of muscle atrophy (Fig. 2c). Previously, AGAT expression has been shown to be significantly suppressed by simvastatin exposure in human lymphocytes (Mangravite et al. 2013). In kidney, which is the main organ of AGAT expression, we also observed decreased AGAT expression after simvastatin exposure with 900 mg/kg (Fig. 2d).

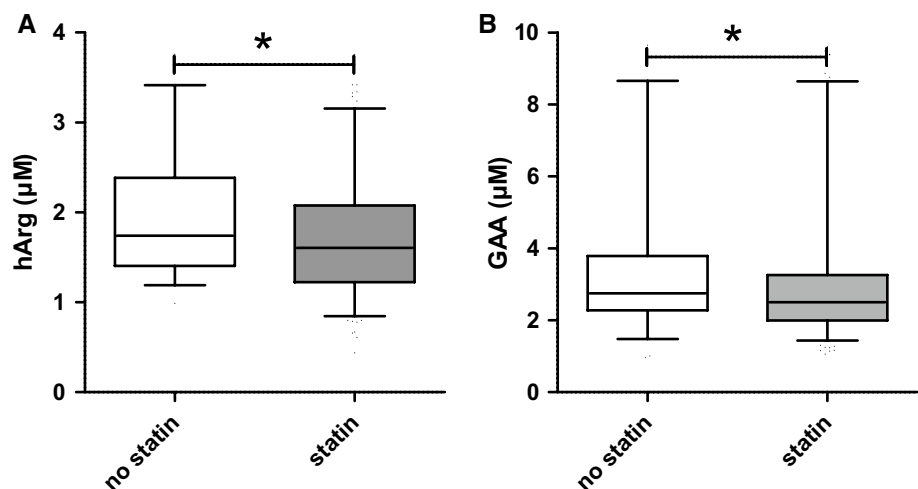
### AGAT expression, GAA and hArg levels in AGAT-deficient, WT and GAMT-deficient mice

As previously described, AGAT-deficient (AGAT<sup>-/-</sup>), WT and GAMT-deficient (GAMT<sup>-/-</sup>) mice revealed distinct AGAT expression in kidney (Fig. 3a, b) (Choe et al. 2013a). Increasing hArg and GAA plasma levels corresponded to increasing AGAT expression (Fig. 3c, d).

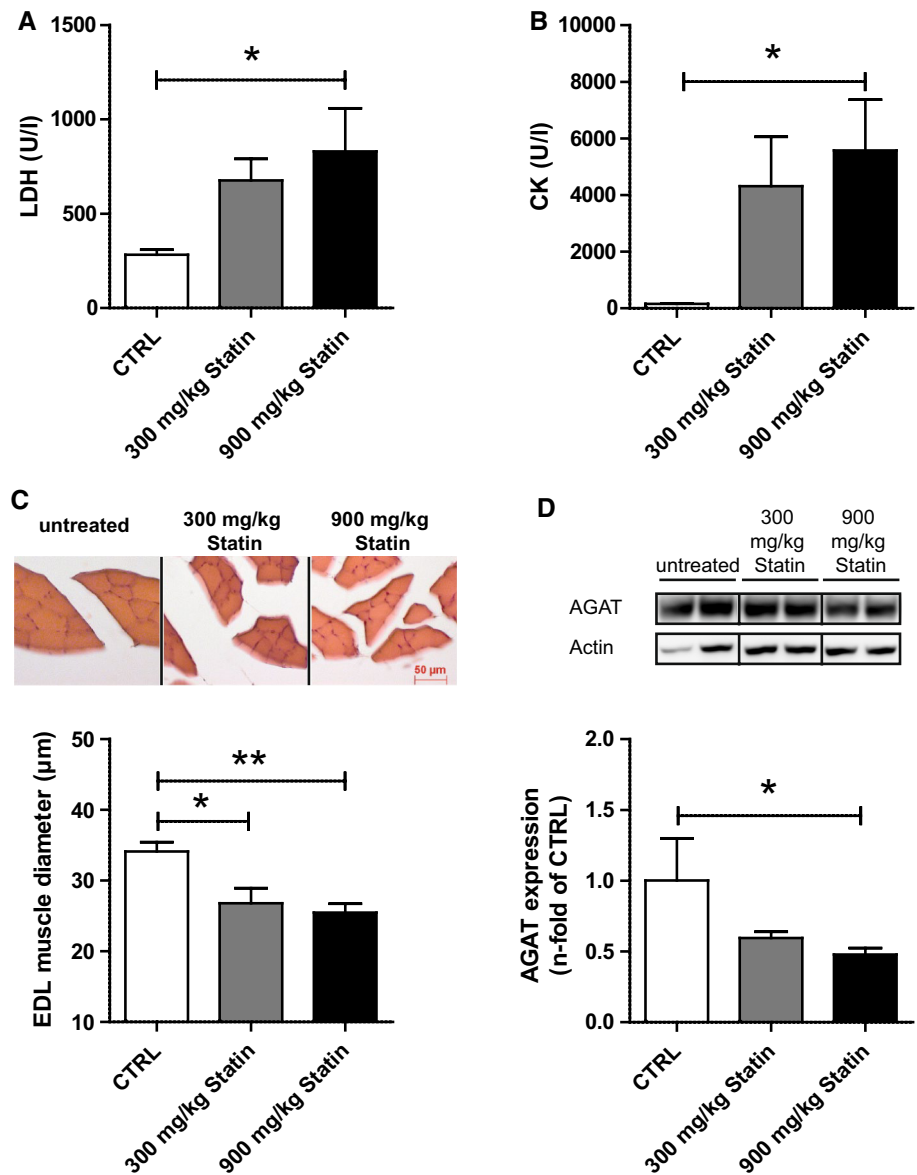
### Effects of simvastatin treatment on muscle of AGAT-deficient, GAMT-deficient and WT mice

Motor behavior was assessed with grip strength and rotarod in AGAT<sup>-/-</sup>, WT and GAMT<sup>-/-</sup> mice before and after simvastatin treatment (Fig. 4a). Simvastatin concentrations in livers of all groups were elevated compared with untreated mice and did not differ among simvastatin treated groups (Supplementary Figure 1). Furthermore, body weight did not decline during treatment, and survival after 4 weeks of simvastatin treatment did not differ between groups (Supplementary Figure 2). Grip strength analysis revealed significant reduction after simvastatin treatment in all groups (Fig. 4b). Given that muscle strength was significantly different between groups before simvastatin treatment, force was normalized to

**Fig. 1** Effect of simvastatin on hArg and GAA plasma concentrations in cerebrovascular patients. hArg (a) and GAA (b) levels in plasma of cerebrovascular patients with ( $n=212$ ) and without ( $n=60$ ) statin treatment ( $*P<0.05$ ). Data are presented as box plot with 95% confidence interval



**Fig. 2** Simvastatin-induced myopathy in WT mice. LDH plasma levels (a), CK plasma levels (b), myocyte diameters of extensor digitorum longus (EDL) muscle (c) and AGAT expression (d) in WT mice supplemented with 0 mg/kg, 300 mg/kg or 900 mg/kg simvastatin to chow (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 4-5$  per group)



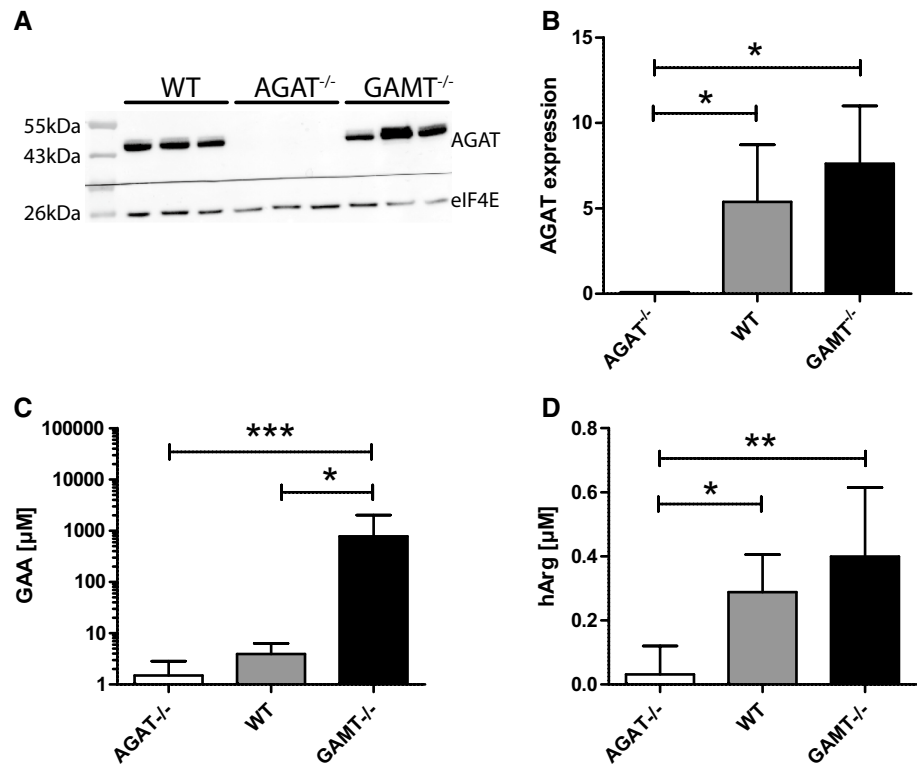
values before simvastatin treatment. After normalization, muscle strength revealed larger reduction in  $AGAT^{-/-}$  mice compared with WT and  $GAMT^{-/-}$  mice indicating increased simvastatin-induced motor impairment (Fig. 4c). In rotarod analysis, increased latency to fall suggested motor learning in WT and  $GAMT^{-/-}$  mice 4 weeks after simvastatin treatment compared with  $AGAT^{-/-}$  mice, but did not reach statistical significance (Fig. 4d, e). Myocyte diameters of EDL muscle normalized to untreated mice revealed a trend of decreased myocyte diameters in  $AGAT^{-/-}$  mice compared with  $GAMT^{-/-}$  mice (Fig. 4f, g). Taken together, simvastatin treatment revealed an increased motor impairment in  $AGAT^{-/-}$  mice compared with WT and  $AGAT$ -overexpressing  $GAMT^{-/-}$  mice. Both  $AGAT$ - and  $GAMT$ -deficient mice are devoid of Cr, but susceptibility to statin-induced myopathy is significantly

different. This finding suggests an  $AGAT$ -dependent, but Cr-independent muscle impairment after simvastatin treatment.

### Cr treatment attenuates motor impairment after simvastatin treatment

Simvastatin suppresses  $AGAT$  expression in mice and humans (Mangravite et al. 2013) and may therefore reduce  $AGAT$ -catalyzed synthesis of hArg and GAA and presumably Cr, which is produced directly from GAA. Therefore, we tried to differentiate the effect of Cr and hArg in statin-induced myopathy. Given the potential impact of  $AGAT$  expression itself, we performed Cr and hArg supplementation studies in the absence of  $AGAT$  using  $AGAT^{-/-}$  mice.

**Fig. 3** AGAT expression, plasma GAA and hArg levels in AGAT<sup>-/-</sup>, WT and GAMT<sup>-/-</sup> mice. Relative protein expression of AGAT in kidney **a**, **b**, plasma levels of GAA (**c**) and hArg (**d**) in AGAT<sup>-/-</sup>, WT and GAMT<sup>-/-</sup> mice. (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; *n* = 5–6 per group)



AGAT<sup>-/-</sup> mice were randomized to receive either placebo (i.e., no Cr) or 1% Cr added to chow (Fig. 5a). Previously, we have shown that this Cr dose is sufficient to normalize Cr-dependent effects in AGAT<sup>-/-</sup> mice (Choe et al. 2013b; Nabuurs et al. 2013; Schmidt et al. 2004). After 4 weeks of simvastatin treatment, grip strength analysis revealed significantly reduced force in both groups indicating statin-induced muscle impairment (Fig. 5b). Again, data were normalized to previously published values of AGAT<sup>-/-</sup> mice with and without Cr undergoing identical tissue processing (Nabuurs et al. 2013). After normalization, simvastatin-induced motor impairment was attenuated in Cr-supplemented mice (Fig. 5c). We did not observe a difference in motor coordination assessed with rotarod (Fig. 5d). But corresponding to grip strength results, myocyte diameters of EDL muscle were less reduced in Cr-supplemented mice after simvastatin treatment after normalization to untreated mice (Fig. 5e, Supplementary Figure 3). Therefore, Cr supplementation reduced statin-induced muscle impairment independent of AGAT expression.

### Effect of hArg supplementation on motor function and muscle atrophy after simvastatin treatment

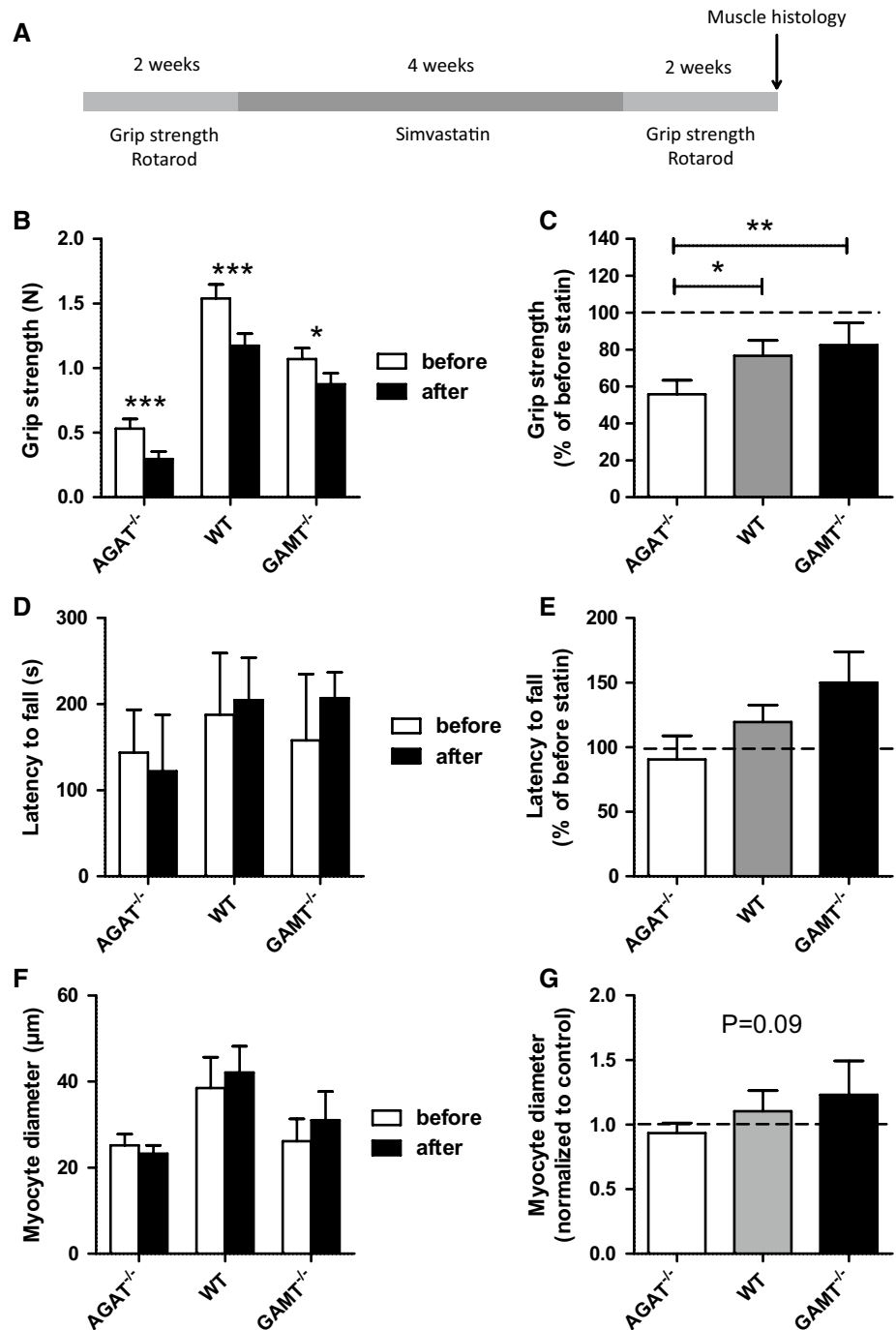
Next we studied the potential effect of hArg on simvastatin-induced muscle damage. To analyze the effect of hArg independent from AGAT expression and Cr, we used AGAT<sup>-/-</sup> mice devoid of Cr and hArg. AGAT<sup>-/-</sup> mice were

randomized to receive either 0 mg/L or 14 mg/L hArg in drinking water (Fig. 6a). hArg supplementation resulted in a significant increase of hArg levels in plasma (Fig. 6b). Grip strength analysis did not reveal a significant effect of hArg treatment after simvastatin exposure (Fig. 6c). In rotarod analysis, we also did not observe a significant difference between both groups (Fig. 6d). Analysis of myocyte diameters did not reveal a difference in soleus muscle of hArg supplemented mice compared with control (Fig. 6e). Taken together, we did not observe an effect of hArg supplementation on motor function or muscle atrophy in simvastatin-induced myopathy.

## Discussion

Statins reduce the risk of myocardial infarction, ischemic stroke and complications of cardiovascular disease. As inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, statins reduce low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, which consequently reduce the risk of cardiovascular events. More intensive LDL-lowering therapy (e.g., higher statin doses) were associated with a greater risk reduction of total and cardiovascular mortality. Therefore, statins are one of the most widely prescribed drugs worldwide. Among adverse effects, muscle symptoms are the most common reason to discontinue statin treatment (Newman et al. 2019). Therefore, statin associated

**Fig. 4** Simvastatin-induced myopathy in  $AGAT^{-/-}$ , WT and  $GAMT^{-/-}$  mice. **a** Schematic representation of study design. Absolute (**b**) and relative (**c**) grip strength of  $AGAT^{-/-}$ , WT and  $GAMT^{-/-}$  mice before and after simvastatin supplementation ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $n = 5-6$  per group). Absolute (**d**) and relative latency to fall (**e**) in rotarod analysis of  $AGAT^{-/-}$ , WT and  $GAMT^{-/-}$  mice before and after simvastatin supplementation ( $P > 0.05$ ,  $n = 5-6$  per group). Absolute (**f**) and relative myocyte diameter (**g**) of  $AGAT^{-/-}$ , WT and  $GAMT^{-/-}$  mice before and after simvastatin supplementation ( $P > 0.05$ ,  $n = 5-6$  per group)

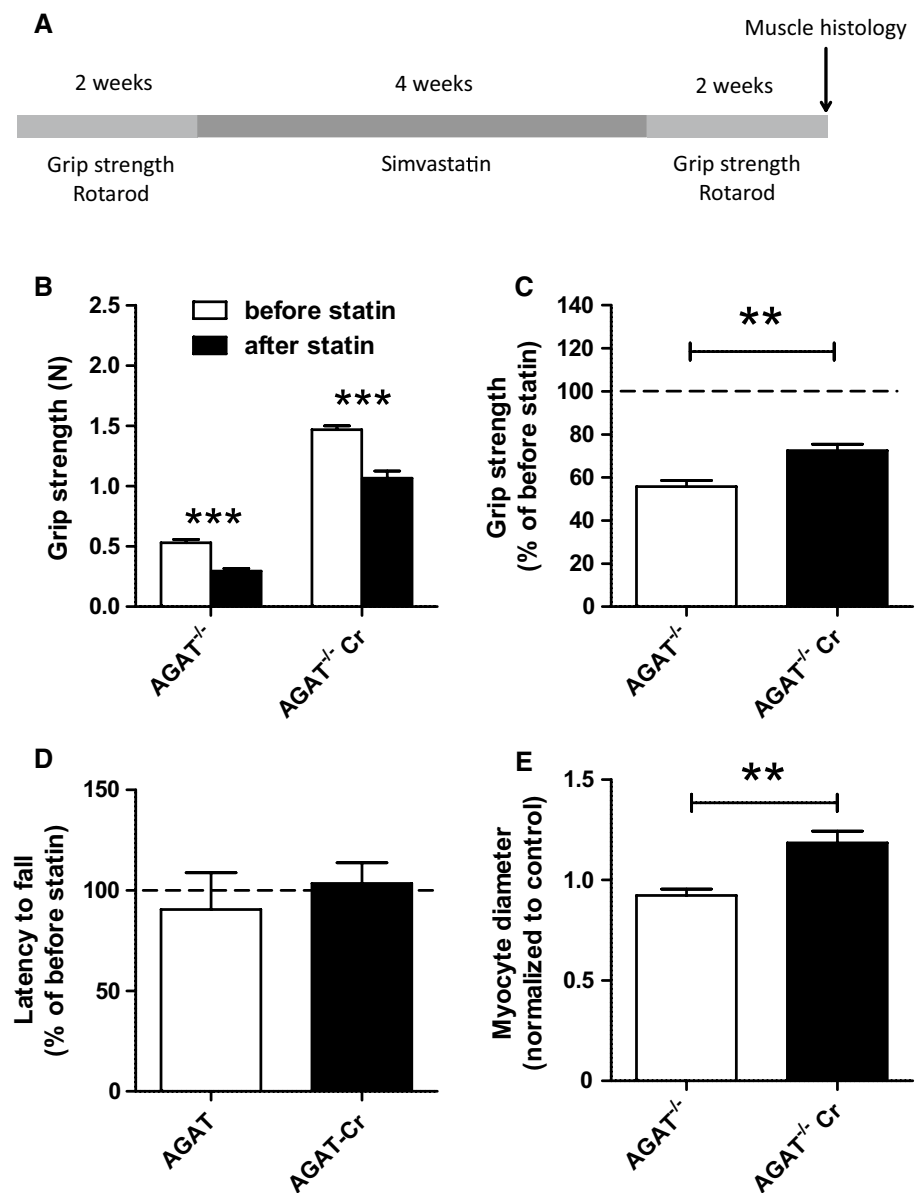


muscle symptoms are expected to affect millions of people worldwide (Sathasivam and Lecky 2008). Discontinuation of statin treatment has been proven to increase mortality (Jackevicius et al. 2002). Despite tremendous effort, an effective prophylaxis to reduce muscle complaints has not been established yet. Although pharmacogenomics has revealed genes linked with statin associated side effects (e.g. *SLCO1B1*), selective targeting and modulation has not been possible so far (Patel et al. 2015). Recent findings suggested an association of *AGAT* gene with statin-induced myopathy

in two independent cohorts (Mangravite et al. 2013). Especially *AGAT* transcript levels were associated with specific genetic variants. Furthermore, cell culture experiments also suggested that *AGAT* knockdown reduced the production of major structural proteins of LDL such as apolipoprotein B (Mangravite et al. 2013).

In cardiovascular patients, simvastatin administration significantly reduced *AGAT* gene expression levels in lymphoblastoid cell lines derived from 480 subjects (Mangravite et al. 2013). Our data show that simvastatin treatment

**Fig. 5** Simvastatin-induced myopathy in AGAT<sup>-/-</sup> mice with and without Cr supplementation. **a** Schematic representation of study design. **b** Absolute and **(c)** relative grip strength in AGAT<sup>-/-</sup> mice with and without Cr supplementation (\*\**P* < 0.01, *n* = 5–6). **d, e** Representative histological staining of extensor digitorum longus (EDL) muscle **(d)** and normalized myocyte diameter **(e)** of AGAT<sup>-/-</sup> mice with creatine (AGAT<sup>-/-</sup> Cr) and without Cr supplementation. (\*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, *n* = 5–6)

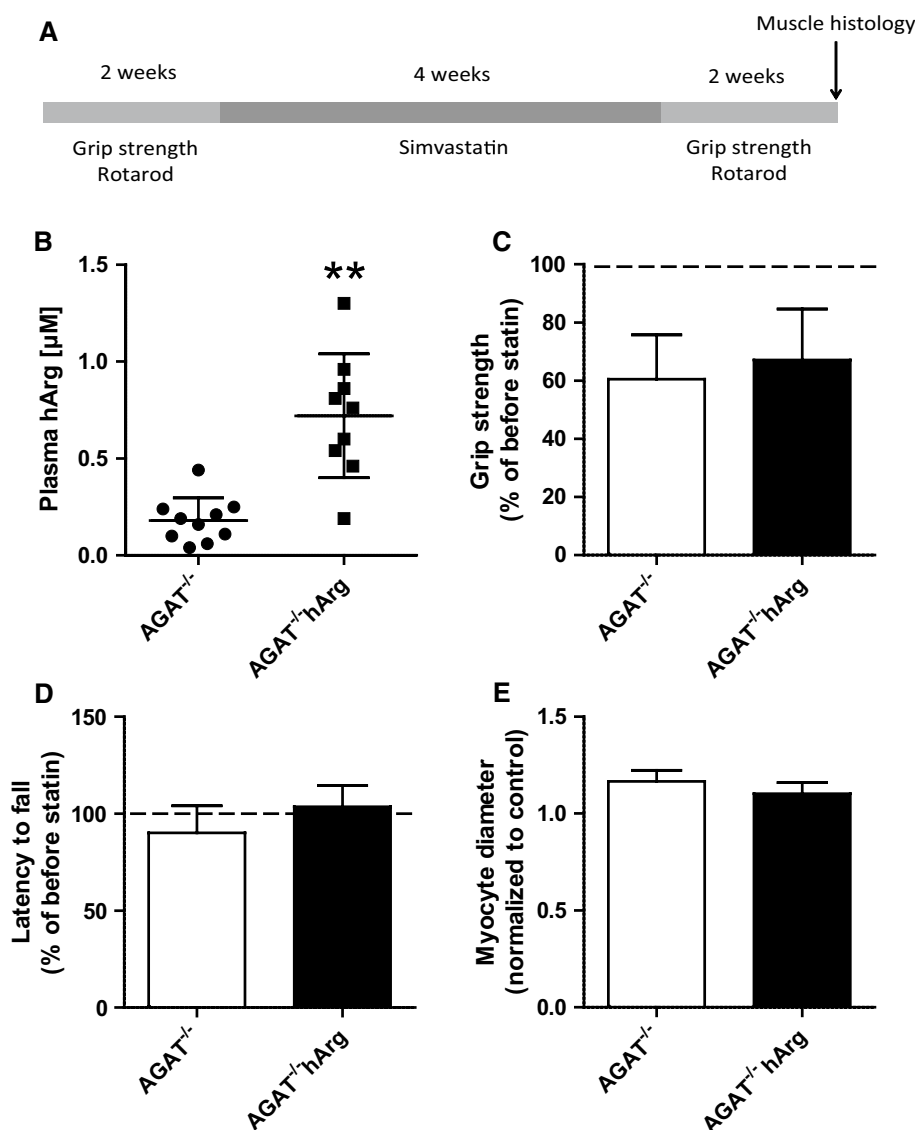


suppresses AGAT protein expression in mouse kidney, the main organ of AGAT expression and activity. Furthermore, GAA and hArg plasma concentrations in the mice of our study were also reduced potentially proving a functional suppression of AGAT expression/activity by simvastatin. Interestingly, in our cerebrovascular patients treated with statin we found lower GAA and hArg plasma levels than in statin-untreated patients suggesting reduced AGAT expression/activity in the patients under simvastatin medication. Furthermore, it is also worth mentioning that simvastatin-associated muscle weakness was significantly less in GAMT<sup>-/-</sup> compared with AGAT<sup>-/-</sup> mice. GAMT is the down-stream enzyme of AGAT and GAMT<sup>-/-</sup> mice reveal AGAT overexpression due to negative feed-back in the absence of Cr (Choe et al. 2013a). Although AGAT<sup>-/-</sup> and

GAMT<sup>-/-</sup> mice are both devoid of Cr, AGAT-deficient mice (AGAT<sup>-/-</sup>) were more prone to simvastatin-induced muscle impairment than AGAT-overexpressing (GAMT<sup>-/-</sup>) mice. This data might suggest an additional effect of AGAT expression itself or its other products, i.e. GAA or hArg.

Our data indicate that AGAT expression and Cr supplementation attenuate statin-induced muscle dysfunction in mice independent of each other. That supplemented Cr confers protection from statin-induced myopathy mitigating muscle atrophy and motor impairment is not surprising for the following reasons. First, Cr and phosphocreatine together are found at concentrations of 20–30 mM in skeletal muscle and represent an essential energy buffer (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Second, Cr-deficient mouse models revealed chronic activation of AMP-activated protein kinase,

**Fig. 6** Simvastatin-induced myopathy in Cr-supplemented  $AGAT^{-/-}$  mice with and without hArg treatment. **a** Schematic representation of study design. Comparison of hArg levels (**b**), grip strength measurements (**c**), representative histological staining of soleus muscle (**d**) and normalized myocyte diameter (**e**) of  $AGAT^{-/-}$  mice with hArg ( $AGAT^{-/-}$  hArg) and without hArg supplementation. (\*\*\*)  $P < 0.001$ ,  $n = 5-6$ )



increased glucose uptake, but ineffective mitochondrial energy metabolism in skeletal muscle (Nabuurs et al. 2013; Stockebrand et al. 2016, 2018). More specifically, ATP levels were decreased and inorganic phosphate levels were increased despite upregulated oxidative phosphorylation and increased mitochondrial volume in Cr-deficient mice (Nabuurs et al. 2013; Stockebrand et al. 2018). Recently, mitochondrial dysfunction, including inhibition of complex III was associated with statin-induced myalgia and myopathy in humans suggesting a common underlying mechanism (Mallinson et al. 2015; Schirris et al. 2015). Of note, Cr supplementation reduced muscle symptoms (myalgia, weakness, cramping) and CK elevation in patients with statin intolerance (Balestrino and Adriano 2018; Shewmon and Craig 2010).

Our data did not reveal an effect of hArg in the absence of AGAT expression in statin-induced myopathy.

Epidemiological studies have shown that low hArg plasma levels are associated with increased all-cause mortality, cardiovascular events, fatal strokes and more severe neurological deficits after stroke (Choe et al. 2013a; Marz et al. 2010; Pilz et al. 2011). Furthermore, hArg supplementation proved beneficial in mouse models of experimental stroke and post-myocardial heart failure (Atzler et al. 2017; Choe et al. 2013a). In addition to protective effects of supplemented hArg in cardiovascular disease and stroke, hArg is found in skeletal muscle at concentrations twice as high as in adipose tissue (May et al. 2015). Furthermore, lower hArg levels were observed in patients with hereditary myopathy compared to healthy controls (Horster et al. 2015). Therefore, previously published data suggested a protective effect of hArg. Given that statins reduce AGAT expression in mice and lymphoblastoid human cell lines (Mangravite et al. 2013), we cannot rule

out that hArg confers protective effects in the presence of AGAT.

Recently, we have shown that oral supplementation with 125 mg hArg in healthy subjects increased hArg levels and did not show any side effects in cardiovascular and neurophysiological measurements (Atzler et al. 2017; Schonhoff et al. 2018). In addition to human studies, oral administration of hArg in both rats and pigs was also safe (Hou et al. 2016). Numerous studies with Cr supplementation have not shown any relevant complaints or restrictions (Writing Group for the NET-PD Investigators et al. 2015). Therefore, it seems reasonable and safe to supplement statin-medicated patients with Cr and perhaps also with hArg. Cr supplementation to patients under statin therapy is likely to compensate for the loss of Cr caused by statin-induced suppression of AGAT expression/activity. Similarly, hArg supplementation to patients under statin therapy could also compensate for the loss of hArg caused by statin-induced suppression of AGAT expression/activity. Yet, Cr itself is an inhibitor of AGAT expression/activity. Given the complexity and in part the unknown effects of hArg in the renal, cardiovascular and cerebrovascular systems, additional experimental and clinical studies are required to evaluate whether or not supplementation with Cr and/or hArg is indeed beneficial to patients receiving statins.

In summary, our findings show that patients treated with simvastatin have lower plasma levels of GAA and hArg, presumably resulting from suppressed AGAT expression/activity. In mice, we did not observe an effect of hArg supplementation in simvastatin-induced myopathy, whereas Cr supplementation improved muscle phenotype. Further clinical trials and wildtype mice experiments are required to evaluate the association of AGAT expression/activity with statin-induced myopathy.

**Acknowledgements** We wish to thank H. Voss for expert animal care, S. Schillemeit for genotyping and tissue sectioning and F. Morellini for help with behavioral studies. We acknowledge the excellent technical support of M. Kastner and A. Steenpaß.

**Funding** This work was supported by the Werner-Otto-Stiftung (5/86, C.U.C.) and an Else Kröner-Exzellenz-Stipendium by the Else Kröner-Freseniusstiftung (2018\_EKES.04).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Human and animals rights** All international, national and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All experimental procedures performed in this study involving animals were in accordance with the ARRIVE guidelines and were approved by the local animal ethics committees (TVA 63/14). The clinical study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. The study protocol has been approved by the Ethics Com-

mittee of the Hamburg Board of Physicians (PV4715). All experiments reported here were approved by the local Ethics Committee.

**Informed consent** All participants gave their written informed consent prior to enrolment.

## References


- Alesutan I, Feger M, Tuffaha R, Castor T, Musculus K, Buehling SS, Heine CL, Kuro OM, Pieske B, Schmidt K, Tomaschitz A, Maerz W, Pilz S, Meinitzer A, Voelkl J, Lang F (2016) Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc Res* 110(3):408–418. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw062>
- Atzler D, Mieth M, Maas R, Boger RH, Schwedhelm E (2011) Stable isotope dilution assay for liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of L-homoarginine in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 879(23):2294–2298. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.016>
- Atzler D, Schwedhelm E, Choe CU (2015) L-homoarginine and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18(1):83–88. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000123>
- Atzler D, McAndrew DJ, Cordts K, Schneider JE, Zervou S, Schwedhelm E, Neubauer S, Lygate CA (2017) Dietary supplementation with homoarginine preserves cardiac function in a murine model of post-myocardial infarction heart failure. *Circulation* 135(4):400–402. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025673>
- Bai X, Zhang B, Wang P, Wang GL, Li JL, Wen DS, Long XZ, Sun HS, Liu YB, Huang M, Zhong SL (2018) Effects of SLCO1B1 and GATM gene variants on rosuvastatin-induced myopathy are unrelated to high plasma exposure of rosuvastatin and its metabolites. *Acta Pharmacol Sin*. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0013-y>
- Balestrino M, Adriano E (2018) Statin-induced myopathy prevented by creatine administration. *BMJ Case Rep*. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225395>
- Carr DF, Alfirevic A, Johnson R, Chinoy H, van Staa T, Pirmohamed M (2014) GATM gene variants and statin myopathy risk. *Nature* 513(7518):E1. <https://doi.org/10.1038/nature13628>
- Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Boger RH, Ojeda F, Simova O, Stockebrand M, Lackner K, Nabuurs C, Marescau B, Streichert T, Muller C, Luneburg N, De Deyn PP, Benndorf RA, Baldus S, Gerloff C, Blankenberg S, Heerschap A, Grant PJ, Magnus T, Zeller T, Isbrandt D, Schwedhelm E (2013a) Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* 128(13):1451–1461. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000580>
- Choe CU, Nabuurs C, Stockebrand MC, Neu A, Nunes P, Morellini F, Sauter K, Schillemeit S, Hermans-Borgmeyer I, Marescau B, Heerschap A, Isbrandt D (2013b) L-arginine:glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. *Hum Mol Genet* 22(1):110–123. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5407>
- Cordts K, Atzler D, Qaderi V, Sydow K, Boger RH, Choe CU, Schwedhelm E (2015) Measurement of homoarginine in human and mouse plasma by LC-MS/MS and ELISA: a comparison and a biological application. *Amino Acids* 47(9):2015–2022. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2037-7>
- Cordts K, Grzybowski R, Lezius S, Luneburg N, Atzler D, Neu A, Hornig S, Boger RH, Gerloff C, Magnus T, Thomalla G, Schwedhelm E, Grant PJ, Choe CU (2018) Guanidino compound ratios are associated with stroke etiology, internal carotid artery stenosis

- and CHA2DS2-VASc score in three cross-sectional studies. *J Neurol Sci* 397:156–161. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.12.037>
- D'Antona G, Tedesco L, Ruocco C, Corsetti G, Ragni M, Fossati A, Saba E, Fenaroli F, Montinaro M, Carruba MO, Valerio A, Nisoli E (2016) A peculiar formula of essential amino acids prevents rosuvastatin myopathy in mice. *Antioxid Redox Signal* 25(11):595–608. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6582>
- Floyd JS, Bis JC, Brody JA, Heckbert SR, Rice K, Psaty BM (2014) GATM locus does not replicate in rhabdomyolysis study. *Nature* 513(7518):E1–E3. <https://doi.org/10.1038/nature13629>
- Freitag S, Schachner M, Morellini F (2003) Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behav Brain Res* 145(1–2):189–207
- Frenay AR, Kayacelebi AA, Beckmann B, Soedamah-Muhtu SS, de Borst MH, van den Berg E, van Goor H, Bakker SJ, Tsikas D (2015) High urinary homoarginine excretion is associated with low rates of all-cause mortality and graft failure in renal transplant recipients. *Amino Acids* 47(9):1827–1836. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2038-6>
- Hanff E, Said MY, Kayacelebi AA, Post A, Minovic I, van den Berg E, de Borst MH, van Goor H, Bakker SJL, Tsikas D (2019) High plasma guanidinoacetate-to-homoarginine ratio is associated with high all-cause and cardiovascular mortality rate in adult renal transplant recipients. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02783-6>
- Horster I, Weigt-Usinger K, Carmann C, Chobanyan-Jurgens K, Kohler C, Schara U, Kayacelebi AA, Beckmann B, Tsikas D, Lucke T (2015) The L-arginine/NO pathway and homoarginine are altered in Duchenne muscular dystrophy and improved by glucocorticoids. *Amino Acids* 47(9):1853–1863. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2018-x>
- Hou Y, Hu S, Jia S, Nawaratna G, Che D, Wang F, Bazer FW, Wu G (2016) Whole-body synthesis of L-homoarginine in pigs and rats supplemented with L-arginine. *Amino Acids* 48(4):993–1001. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2145-4>
- Ioannidis JP (2014) More than a billion people taking statins?: Potential implications of the new cardiovascular guidelines. *JAMA* 311(5):463–464. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.284657>
- Jackevicius CA, Mamdani M, Tu JV (2002) Adherence with statin therapy in elderly patients with and without acute coronary syndromes. *JAMA* 288(4):462–467
- Kayacelebi AA, Minovic I, Hanff E, Frenay AS, de Borst MH, Feelisch M, van Goor H, Bakker SJL, Tsikas D (2017) Low plasma homoarginine concentration is associated with high rates of all-cause mortality in renal transplant recipients. *Amino Acids* 49(7):1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2420-7>
- Mallinson JE, Marimuthu K, Murton A, Selby A, Smith K, Constantin-Teodosiu D, Rennie MJ, Greenhaff PL (2015) Statin myalgia is not associated with reduced muscle strength, mass or protein turnover in older male volunteers, but is allied with a slowing of time to peak power output, insulin resistance and differential muscle mRNA expression. *J Physiol* 593(5):1239–1257. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.285577>
- Mangravite LM, Engelhardt BE, Medina MW, Smith JD, Brown CD, Chasman DI, Mechem BH, Howie B, Shim H, Naidoo D, Feng Q, Rieder MJ, Chen YD, Rotter JI, Ridker PM, Hopewell JC, Parish S, Armitage J, Collins R, Wilke RA, Nickerson DA, Stephens M, Krauss RM (2013) A statin-dependent QTL for GATM expression is associated with statin-induced myopathy. *Nature* 502(7471):377–380. <https://doi.org/10.1038/nature12508>
- Mangravite LM, Engelhardt BE, Stephens M, Krauss RM (2014) Mangravite et al. reply. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13630>
- Marz W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J, Winkelmann BR, Boehm BO, Ritz E, Wanner C (2010) Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation* 122(10):967–975. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.908988>
- May M, Kayacelebi AA, Batkai S, Jordan J, Tsikas D, Engeli S (2015) Plasma and tissue homoarginine concentrations in healthy and obese humans. *Amino Acids* 47(9):1847–1852. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1922-4>
- Morellini F (2013) Spatial memory tasks in rodents: what do they model? *Cell Tissue Res* 354(1):273–286. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1668-9>
- Nabuurs CI, Choe CU, Veltien A, Kan HE, van Loon LJ, Rodenburg RJ, Matschke J, Wieringa B, Kemp GJ, Isbrandt D, Heerschap A (2013) Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *J Physiol* 591(2):571–592. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.241760>
- Newman CB, Preiss D, Tobert JA, Jacobson TA, Page RL 2nd, Goldstein LB, Chin C, Tannock LR, Miller M, Raghuvver G, Duell PB, Brinton EA, Pollak A, Braun LT, Welty FK, American Heart Association Clinical Lipidology, Lipoprotein, Metabolism and Thrombosis Committee, a Joint Committee of the Council on Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology and Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Clinical Cardiology; and Stroke Council (2019) Statin safety and associated adverse events: a scientific statement from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39(2):e38–e81. <https://doi.org/10.1161/ATV.0000000000000073>
- Patel J, Superko HR, Martin SS, Blumenthal RS, Christopher-Stine L (2015) Genetic and immunologic susceptibility to statin-related myopathy. *Atherosclerosis* 240(1):260–271. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.025>
- Pilz S, Meinitzer A, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, Wanner C, Boehm BO, Marz W (2011) Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart* 97(15):1222–1227. <https://doi.org/10.1136/hrt.2010.220731>
- Sathasivam S, Lecky B (2008) Statin induced myopathy. *BMJ* 337:a2286. <https://doi.org/10.1136/bmj.a2286>
- Schirris TJ, Renkema GH, Ritschel T, Voermans NC, Bilos A, van Engelen BG, Brandt U, Koopman WJ, Beyrath JD, Rodenburg RJ, Willems PH, Smeitink JA, Russel FG (2015) Statin-induced myopathy is associated with mitochondrial complex III inhibition. *Cell Metab* 22(3):399–407. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.002>
- Schmidt A, Marescau B, Boehm EA, Renema WK, Peco R, Das A, Steinfeld R, Chan S, Wallis J, Davidoff M, Ullrich K, Waldschutz R, Heerschap A, De Deyn PP, Neubauer S, Isbrandt D (2004) Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. *Hum Mol Genet* 13(9):905–921. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh112>
- Schonhoff M, Weineck G, Hoppe J, Hornig S, Cordts K, Atzler D, Gerloff C, Boger R, Neu A, Schwedhelm E, Choe CU (2018) Cognitive performance of 20 healthy humans supplemented with L-homoarginine for 4 weeks. *J Clin Neurosci* 50:237–241. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.01.035>
- Shalev V, Chodick G, Silber H, Kokia E, Jan J, Heymann AD (2009) Continuation of statin treatment and all-cause mortality: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 169(3):260–268. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2008.552>
- Shewmon DA, Craig JM (2010) Creatine supplementation prevents statin-induced muscle toxicity. *Ann Intern Med* 153(10):690–692. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-153-10-201011160-00024>
- Stockebrand M, Sauter K, Neu A, Isbrandt D, Choe CU (2013) Differential regulation of AMPK activation in leptin- and creatine-deficient mice. *FASEB J* 27(10):4147–4156. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225136>

- Stockebrand M, Hornig S, Neu A, Atzler D, Cordts K, Boger RH, Isbrandt D, Schwedhelm E, Choe CU (2015) Homoarginine supplementation improves blood glucose in diet-induced obese mice. *Amino Acids* 47(9):1921–1929. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2022-1>
- Stockebrand M, Nejad AS, Neu A, Kharbanda KK, Sauter K, Schillemeit S, Isbrandt D, Choe CU (2016) Transcriptomic and metabolic analyses reveal salvage pathways in creatine-deficient AGAT(-/-) mice. *Amino Acids* 48(8):2025–2039. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2202-7>
- Stockebrand M, Sasani A, Das D, Hornig S, Hermans-Borgmeyer I, Lake HA, Isbrandt D, Lygate CA, Heerschap A, Neu A, Choe CU (2018) A mouse model of creatine transporter deficiency reveals impaired motor function and muscle energy metabolism. *Front Physiol* 9:773. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00773>
- Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ, Ray KK, Roden M, Stein E, Tokgozoglu L, Nordestgaard BG, Bruckert E, De Backer G, Krauss RM, Laufs U, Santos RD, Hegele RA, Hovingh GK, Leiter LA, Mach F, Marz W, Newman CB, Wiklund O, Jacobson TA, Catapano AL, Chapman MJ, Ginsberg HN, European Atherosclerosis Society Consensus P (2015) Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society consensus panel statement on assessment, aetiology and management. *Eur Heart J* 36(17):1012–1022. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv043>
- Wang J, Luzum JA, Phelps MA, Kitzmiller JP (2015) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of simvastatin, lovastatin, atorvastatin, and their major metabolites in human plasma. *J Chromatogr B* 983–984:18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.12.029>
- Writing Group for the NET-PD Investigators, Kiebertz K, Tilley BC, Elm JJ, Babcock D, Hauser R, Ross GW, Augustine AH, Augustine EU, Aminoff MJ, Bodis-Wollner IG, Boyd J, Cambi F, Chou K, Christine CW, Cines M, Dahodwala N, Derwent L, Dewey RB Jr, Hawthorne K, Houghton DJ, Kamp C, Leehey M, Lew MF, Liang GS, Luo ST, Mari Z, Morgan JC, Parashos S, Perez A, Petrovitch H, Rajan S, Reichwein S, Roth JT, Schneider JS, Shannon KM, Simon DK, Simuni T, Singer C, Sudarsky L, Tanner CM, Umeh CC, Williams K, Wills AM (2015) Effect of creatine monohydrate on clinical progression in patients with Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA* 313(6):584–593. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.120>
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80(3):1107–1213
- Yusuf S, Lonn E, Pais P, Bosch J, Lopez-Jaramillo P, Zhu J, Xavier D, Avezum A, Leiter LA, Piegas LS, Parkhomenko A, Keltai M, Keltai K, Sliwa K, Chazova I, Peters RJ, Held C, Yusuf K, Lewis BS, Jansky P, Khunti K, Toff WD, Reid CM, Varigos J, Accini JL, McKelvie R, Pogue J, Jung H, Liu L, Diaz R, Dans A, Dagenais G, Investigators H (2016) Blood-pressure and cholesterol lowering in persons without cardiovascular disease. *N Engl J Med* 374(21):2032–2043. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600177>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Ali Sasani<sup>1,2,3</sup> · Sönke Hornig<sup>2</sup> · Ricarda Grzybowski<sup>1</sup> · Kathrin Cordts<sup>3,4</sup> · Erik Hanff<sup>5</sup> · Dimitris Tsikas<sup>5</sup> · Rainer Böger<sup>3,4</sup> · Christian Gerloff<sup>1</sup> · Dirk Isbrandt<sup>6,7</sup> · Axel Neu<sup>2</sup> · Edzard Schwedhelm<sup>3,4</sup> · Chi-un Choe<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>2</sup> Experimental Neuropediatrics, Department of Pediatrics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>3</sup> Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>4</sup> German Center for Cardiovascular Research (DZHK), Partner Site Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany

<sup>5</sup> Institute of Toxicology, Core Unit Proteomics, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>6</sup> German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Germany

<sup>7</sup> University of Cologne, Cologne, Germany



# A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism

Malte Stockebrand<sup>1,2\*†</sup>, Ali Sasani<sup>3,4†</sup>, Devashish Das<sup>5†</sup>, Sönke Hornig<sup>4</sup>, Irm Hermans-Borgmeyer<sup>6</sup>, Hannah A. Lake<sup>7,8</sup>, Dirk Isbrandt<sup>1</sup>, Craig A. Lygate<sup>7,8</sup>, Arend Heerschap<sup>5</sup>, Axel Neu<sup>4†</sup> and Chi-Un Choe<sup>3†</sup>

<sup>1</sup> German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, Germany, <sup>2</sup> Institute for Molecular and Behavioral Neuroscience, University of Cologne, Cologne, Germany, <sup>3</sup> Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>4</sup> Experimental Neuropediatrics, Department of Pediatrics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>5</sup> Department of Radiology, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, Netherlands, <sup>6</sup> Transgenic Mouse Unit, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>7</sup> Division of Cardiovascular Medicine, Radcliffe Department of Medicine, BHF Centre of Research Excellence, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, <sup>8</sup> Wellcome Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

## OPEN ACCESS

### Edited by:

P. Bryant Chase,  
Florida State University, United States

### Reviewed by:

Takahiko Shimizu,  
Chiba University, Japan  
Robert W. Wiseman,  
Michigan State University,  
United States

### \*Correspondence:

Malte Stockebrand  
malte.stockebrand@dzne.de

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Striated Muscle Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 26 March 2018

**Accepted:** 04 June 2018

**Published:** 22 June 2018

### Citation:

Stockebrand M, Sasani A, Das D,  
Hornig S, Hermans-Borgmeyer I,  
Lake HA, Isbrandt D, Lygate CA,  
Heerschap A, Neu A and Choe C-U  
(2018) A Mouse Model of Creatine  
Transporter Deficiency Reveals  
Impaired Motor Function and Muscle  
Energy Metabolism.  
*Front. Physiol.* 9:773.  
doi: 10.3389/fphys.2018.00773

Creatine serves as fast energy buffer in organs of high-energy demand such as brain and skeletal muscle. L-Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) and guanidinoacetate N-methyltransferase are responsible for endogenous creatine synthesis. Subsequent uptake into target organs like skeletal muscle, heart and brain is mediated by the creatine transporter (CT1, SLC6A8). Creatine deficiency syndromes are caused by defects of endogenous creatine synthesis or transport and are mainly characterized by intellectual disability, behavioral abnormalities, poorly developed muscle mass, and in some cases also muscle weakness. CT1-deficiency is estimated to be among the most common causes of X-linked intellectual disability and therefore the brain phenotype was the main focus of recent research. Unfortunately, very limited data concerning muscle creatine levels and functions are available from patients with CT1 deficiency. Furthermore, different CT1-deficient mouse models yielded conflicting results and detailed analyses of their muscular phenotype are lacking. Here, we report the generation of a novel CT1-deficient mouse model and characterized the effects of creatine depletion in skeletal muscle. HPLC-analysis showed strongly reduced total creatine levels in skeletal muscle and heart. MR-spectroscopy revealed an almost complete absence of phosphocreatine in skeletal muscle. Increased AGAT expression in skeletal muscle was not sufficient to compensate for insufficient creatine transport. CT1-deficient mice displayed profound impairment of skeletal muscle function and morphology (i.e., reduced strength, reduced endurance, and muscle atrophy). Furthermore, severely altered energy homeostasis was evident on magnetic resonance spectroscopy. Strongly reduced phosphocreatine resulted in decreased ATP/Pi levels despite an increased inorganic phosphate to ATP flux. Concerning glucose metabolism, we show increased glucose transporter type 4 expression in muscle and improved

glucose clearance in CT1-deficient mice. These metabolic changes were associated with activation of AMP-activated protein kinase – a central regulator of energy homeostasis. In summary, creatine transporter deficiency resulted in a severe muscle weakness and atrophy despite different compensatory mechanisms.

**Keywords:** creatine transporter, skeletal muscle, energy metabolism, *in vivo* magnetic spectroscopy, L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT), guanidinoacetate *N*-methyltransferase (GAMT), glycine amidinotransferase (GATM), *Slc6a8*

## INTRODUCTION

Energy supply for muscle contraction is provided by breakdown of adenosine triphosphate (ATP), which is replenished continuously by anaerobic glycolysis or oxidative phosphorylation. The (P)Cr system serves as rapid energy buffer to maintain constant ATP levels and mediates subcellular high-energy phosphate transfer. Therefore, high (P)Cr levels are found in skeletal muscle in concentrations up to 20–40 mM (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). As non-enzymatic degradation of creatine to creatinine takes place at a daily rate of 1.7% (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000), the Cr pool has to be replenished via dietary intake or endogenous Cr synthesis. AGAT (EC 2.1.4.1) and GAMT (EC 2.1.1.2) are responsible for Cr synthesis from arginine, glycine, and *S*-adenosyl-methionine, which mainly takes place in kidney and liver. Subsequent uptake of Cr into organs such as brain, heart, and muscle is mediated by the Cr transporter (CT1, *SLC6A8*).

Defects of Cr synthesis or transport due to mutations in *AGAT*, *GAMT*, or *SLC6A8* (*CT1*) genes are associated with Cr deficiency syndromes that affect brain and muscle to various degrees (Stockler et al., 2007). Patients with CT1 deficiency are especially prone to intellectual disability, behavioral abnormalities and seizures. Mutations in *SLC6A8* are relatively frequent and were found in up to 2% of cases of X-linked intellectual disability (van de Kamp et al., 2014). Slender habitus and poorly developed muscle mass are the most striking anthropometric features of CT1 deficiency. Motor dysfunction can affect CT1-deficient patients, with muscular hypotonia in 10% and, less common, unspecific myopathic symptoms (Mancini et al., 2005; Puusepp et al., 2010; van de Kamp et al., 2014, 2015). Significant amounts of Cr were still detectable in the skeletal muscle of examined patients and studied knockout mice. However, a significant reduction of muscle Cr was only visible in mouse models. The relatively preserved Cr levels in skeletal muscle of CT1-deficient patients may possibly be due to endogenous Cr synthesis, non-specific uptake or residual activity of patients' mutant CT1 (deGrauw et al., 2003; Pyne-Geithman et al., 2004; Russell et al., 2014; Baroncelli et al., 2016).

**Abbreviations:** AGAT, L-arginine:glycine amidinotransferase; AMPK, AMP-activated protein kinase; Cr, creatine; CSA, cross-sectional area; CT1, creatine transporter; GAMT, guanidinoacetate *N*-methyltransferase; GLUT4, glucose transporter 4;  $k_f$ , (pseudo-first order unidirectional) forward rate constant (for  $P_i \rightarrow ATP$ ); MRS, magnetic resonance spectroscopy; PCr, phosphocreatine; (P)Cr, either phosphocreatine or creatine;  $P_i$ , inorganic phosphate; PMEs, phosphomonoesters.

We previously generated and characterized mouse models with AGAT and GAMT deficiency (Schmidt et al., 2004; Choe et al., 2013b). In addition to pronounced CNS and metabolic phenotypes, these mice displayed impaired muscle strength and muscle atrophy underlining the role of the (P)Cr system in skeletal muscle (Torremans et al., 2005; Nabuurs et al., 2013). Previous studies on CT1-deficient mouse models have focused on the central nervous system. The muscle phenotype has not yet been analyzed in detail and the preliminary characterization generated conflicting results from different models and methodological approaches (Skelton et al., 2011; Russell et al., 2014; Baroncelli et al., 2016). Therefore, we generated and characterized CT1-deficient mice with a focus on muscle physiology. Our novel CT1-deficient mouse model revealed (P)Cr deficiency in skeletal muscle associated with impaired motor function and muscle atrophy, which is in agreement with previous models (Russell et al., 2014; Baroncelli et al., 2016). Magnetic resonance spectroscopy experiments were performed to elucidate the high-energy phosphate metabolism in skeletal muscle of CT1-deficient mice. Furthermore, glucose metabolism, enzymes of creatine biosynthesis, and proteins of oxidative phosphorylation were studied in skeletal muscle of CT1-deficient mice to elucidate altered pathways.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

All animal procedures were conducted in accordance with institutional and national guidelines and were approved by the respective local animal ethics committees (Hamburg: 11/89 and 12/86, Nijmegen: RU-DEC2012-184). All experimental procedures conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 83-123, revised 1996) and were performed in accordance with the ARRIVE guidelines. Mice used in this study were obtained from heterozygous matings. CT1-deficient knockout ( $CT1^{-/y}$ ) mice and controls were age- and sex-matched littermates. Mice (<5 per cage) were kept in standard cages under a 12–12 h light–dark cycle, constant temperature, and humidity, and received standard food and water *ad libitum*. Chow was essentially Cr free (R/M-H, Ssniff), as previously shown (Schmidt et al., 2004).

### Generation of CT1-Deficient Mice

In brief, CT1-deficient knockout ( $CT1^{-/y}$ ) mice were generated by injection of embryonic stem cells (ESCs) containing a targeted

*CT1* (*Slc6a8*) locus obtained from the NIH Knock-out Mouse Program (KOMP, project CSD24513, *Slc6a8*<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup> allele in ES cell clone EPD0293\_6\_E05). The ESCs from the parental line JM8A1.N3 (C57BL/6N derived; Pettitt et al., 2009) had been targeted with a targeting-vector (PRPGS00081\_A\_A09) consisting of all 13 *Slc6a* exons with loxP sites flanking exons 5–8 (Skarnes et al., 2011). The targeted allele contains an insertion of a beta-galactosidase/lacZ reporter expression cassette (L1L2\_Bact\_P) with a splice acceptor site in the intron between exons 4 and 5, for the detection of *Slc6a8* gene expression. The ESC clone was expanded and microinjected into C57BL/6J mouse blastocysts, which were then transferred into pseudo-pregnant C57BL/6J females. Chimeric mice were mated and gave rise to germ-line transmission of the disrupted allele. Mice were backcrossed for several generations to C57BL/6J genetic background with negative selection for the Rd8 mutation in the F1 generation. Genomic DNA from mouse-tail or ear biopsies was screened by multiplex polymerase chain reaction (PCR) following standard protocols. Sequencing of genomic PCR-products between exons 7 and 8 revealed absence of the 3' loxP site from the conditional *Slc6a8*<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup> allele. Therefore, according to the KOMP mutagenesis scheme, the correct description of the targeted, non-conditional allele is *Slc6a8*<sup>tm1e(KOMP)Wtsi</sup> knock out first allele.

### cDNA Preparation and PCR

Disruption of the murine *CT1* gene was confirmed by touch down PCR of skeletal muscle cDNA using primers binding in exons 7 and 9 (Figure 1B). Total RNA of knock-down and wild-type mice was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. DNase I treatment was performed to remove genomic DNA. One microgram of total RNA was used for random primed reverse transcription using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to standard protocols. cDNAs were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Exon spanning primers (forward: 5'-tctggcactcatcaacag-3', reverse: 5'-atgaagcctccacacacac-3') were taken from Ireland et al. (2009) expecting a 250 bp PCR product in wild-type reaction. Touch down PCR was performed using the following protocol: annealing temperature was decreased in 12 steps from  $60^{\circ}\text{C}$  by  $0.5^{\circ}\text{C}$  to  $54^{\circ}\text{C}$  followed by 25 cycles at  $54^{\circ}\text{C}$ .

### Rotarod Test

Mice had to walk on a turning, corrugated rod (3.2 cm in diameter) (Acceler. Rotarod for mice, Jones & Roberts, TSE 308 systems, Bad Homburg, Germany). The rod was started to rotate 5 s after the mice were placed onto it. Mice underwent five trials with an inter-trial-interval (ITI) of 45 min, and performed at slow, constant speed [i.e., 4 rotations per minute (rpm)] for a maximum duration of 3 min. Trials 3–5 were performed with the accelerating rod, starting with 4 rpm up to 40 rpm within 4 min, with a maximum duration of 10 min. On the following day, a sixth trial was carried out with the accelerating rod. The performance of the mice was evaluated by scoring the latency to fall. Experiments were performed blinded.

### Pole Test

The animals were placed on top of a vertical 48.5 cm-long rod made of rough wood with a diameter of 0.8 cm. To motivate the mouse to climb down, nesting material of the home cage was placed at the bottom of the pole. The mouse was placed with its head facing upward and its four paws grasping the rod. The time required by the mouse to reach the floor (maximum duration of each trial was 80 s) was recorded. Each mouse had to perform three consecutive trials with an ITI of 30 s. The ability of a mouse to turn  $180^{\circ}$  and climb down with the head pointing downward was evaluated. When the mouse turned, we recorded whether it turned at the top (level 1, above 32 cm), at the middle (level 2, between 32 and 16 cm), or at the bottom of the rod (level 3, below 16 cm). Experiments were performed blinded.

### Grip Strength

Maximal grip force was measured using a grip strength meter (TSE-Systems, Bad Homburg, Germany) as described previously (Nabuurs et al., 2013). Within each group, the mean grip force of each mouse was calculated from 15 appropriate trials. Experiments were performed blinded.

### Voluntary Running Wheel

Mice were provided with a vertical, ridged running wheel (tierisch.de, Flensburg, Germany). The wheels were fixed in the cage using magnets. Wheel rotation was monitored using a magnetic read switch attached to a counter. Running distances were calculated based on the number of rotations within 24 h and the circumference of the running wheel (41.41 cm). Experiments were performed blinded.

### Muscle Histopathology

Muscle histology was performed as previously described (Nabuurs et al., 2013). Briefly, mice were transcardially perfused with 4% formaldehyde in PBS. For morphometry, commonly stained slides for hematoxylin and eosin (H&E) were used. Myocyte diameters and CSA were determined in multiple transverse sections of muscle using ImageJ and calculated by averaging the data of five images. Determination of myocyte diameters was performed blinded.

### In Vivo $^1\text{H}$ MRI and $^{31}\text{P}$ MRS

Male *CT1*<sup>+/y</sup> and *CT1*<sup>-/y</sup> mice, aged 120–180 days, were placed in prone position in the magnet bore under anesthesia with 1–2% isoflurane in a 2:1 air/O<sub>2</sub> mixture and maintained at  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  using warm air under control of a rectal sensor (Luxtron 712, Santa Clara, CA, United States). Breathing rate (50–70/min) was monitored by a respiratory pad attached to the chest. Measurements were performed on an 11.7T Biospec Avance III small animal MR system (Bruker, Biospin, Germany). The hind legs of mice were placed in a home-built 8 mm diameter radiofrequency (RF) probe consisting of a  $^1\text{H}$  and a  $^{31}\text{P}$  coil. Gradient-echo localizer MR images were obtained in three orthogonal directions followed by localized magnetic field shimming. Then a 2D gradient-echo image was obtained of a 2 mm thick transversal slice, positioned at the largest

CSA distal from the knee joint (FOV = 2 cm × 2 cm, matrix size = 128 × 128, resolution = 0.156 mm × 0.156 mm, TR = 100 ms, TE = 6 ms). Non-localized  $^{31}\text{P}$  MR spectra of the leg (gastrocnemius/plantaris/soleus complex) were recorded using an excitation block pulse of 100  $\mu\text{s}$  with a 45° flip angle, a 8012 Hz sweep width, 4096 data points, 256 ms acquisition time, TR 5 s, 128 averages for  $\text{CT1}^{+/y}$  and 400–512 averages for  $\text{CT1}^{-/y}$  mice.  $^{31}\text{P}$  saturation transfer (ST) MRS experiments were performed to derive the  $\text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$  (pseudo first order) forward rate constant  $k_f$  in the leg muscles (Nabuurs et al., 2010, 2013) using Gaussian frequency selective saturation pulses (1000 points, duration 100 ms, selectivity  $\sim 50$  Hz) with pulse power optimization for complete resonance saturation ( $\sim 370$  rad/sec). Saturation was applied at the  $\gamma\text{ATP}$  frequency and its mirror frequency around the  $\text{Pi}$  peak using looped incremental saturation periods of 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.5, and 3 s (Koretsky et al., 1985; Nabuurs et al., 2010). Total TR was 5 s (2 s TR + 3 s ST block) with 128 ( $\text{CT1}^{+/y}$ ) or 512 ( $\text{CT1}^{-/y}$ ) averages.

From the single slice 2D-gradient echo MR images the muscle CSA of the lower hind leg (mostly gastrocnemius-plantaris-soleus) of  $\text{CT1}^{+/y}$  ( $n = 5$ ) and  $\text{CT1}^{-/y}$  ( $n = 4$ ) was determined including a correction of the area occupied by bone (2 mm<sup>2</sup>). From this corrected CSA and the  $\beta\text{ATP}$  peak integral the ATP tissue concentration in  $\text{CT1}^{-/y}$  mice was estimated assuming similar load of the RF coil by the hind legs of both mice and a tissue [ATP] of 7.8 mM for  $\text{CT1}^{+/y}$  mice (in  $^t$  Zandt et al., 2003; Nabuurs et al., 2013). The assessment of the integrals of peaks and tissue pH from the PCr-Pi chemical shift in the  $^{31}\text{P}$  MR spectra were done as described before (Nabuurs et al., 2010, 2013). From the PCr/ATP and  $\text{Pi}/\text{ATP}$  signal ratios we estimated tissue levels of PCr and  $\text{Pi}$  after correction for T1 saturation. For  $\text{Pi}$  a T1 of 1.95 s was applied (Nabuurs et al., 2010; Tyler et al., 2010). T1 values, for PCr and  $\beta\text{ATP}$ , derived from skeletal muscle of 3  $\text{CT1}^{+/y}$  mice at 11.7T using inversion recovery, were  $2.25 \pm 0.118$  and  $0.656 \pm 0.07$  s, respectively. The muscle  $\text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$  flux was obtained as the  $k_f \times [\text{Pi}]$  product (Nabuurs et al., 2013).

## Determination of Total Creatine

Total Cr levels were measured by HPLC from homogenized samples with normalization to non-collagen protein, adapted from Teerlink et al. (1993), as described previously (Zervou et al., 2016).

## Glucose Tolerance Tests

Mice were fasted for 14–16 h and intraperitoneally injected with glucose (2 g per kg body weight). Blood glucose was measured from tail capillary blood and collected at indicated times, as previously described (Choe et al., 2013b). Experiments were performed blinded.

## Tissue Collection and Preparation

Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine or by 2–3% isoflurane in 100% oxygen. Muscles were removed and flash frozen in liquid nitrogen. Lysates were prepared in homogenization buffer containing phosphatase inhibitors with disposable 1.5-mL pestles (VWR) and cleared by

centrifugation (Choe et al., 2013b). Protein concentrations were determined using a BCA<sup>TM</sup> protein assay (Thermo Scientific).

## Western Blots

Equal amounts of cleared lysates (20–40  $\mu\text{g}$  protein) were separated by SDS-PAGE on precast gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane. Antibodies against AGAT (Santa Cruz), GAMT (Eurogentec), GLUT4 (Acris Antibodies), Actin (Sigma Aldrich), UCP3 (Abcam), COX4 (Life technologies), pAMPK, pACC, and AMPK (all Cell Signaling) were used according to the manufacturers' protocols. Enhanced chemiluminescence (Luminata Crescendo, Millipore) signals were detected with a luminescent image analyzer (LAS-4000, FujiFilm). Total protein was measured with a laser scanner (FLA-9000 with LPG filter, FujiFilm) on blot membranes stained with Lava Purple (Fluorotechnics, Gel Company) according to the manufacturer's instructions. Signal quantification was performed on non-saturated images using ImageJ software.

## Statistical Analysis

Data are given as mean  $\pm$  SEM. The following statistical tests were applied: parametric  $t$ -test, one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* comparisons (GraphPad Prism). All tests were two-tailed and the level of significance was set at  $P < 0.05$ .

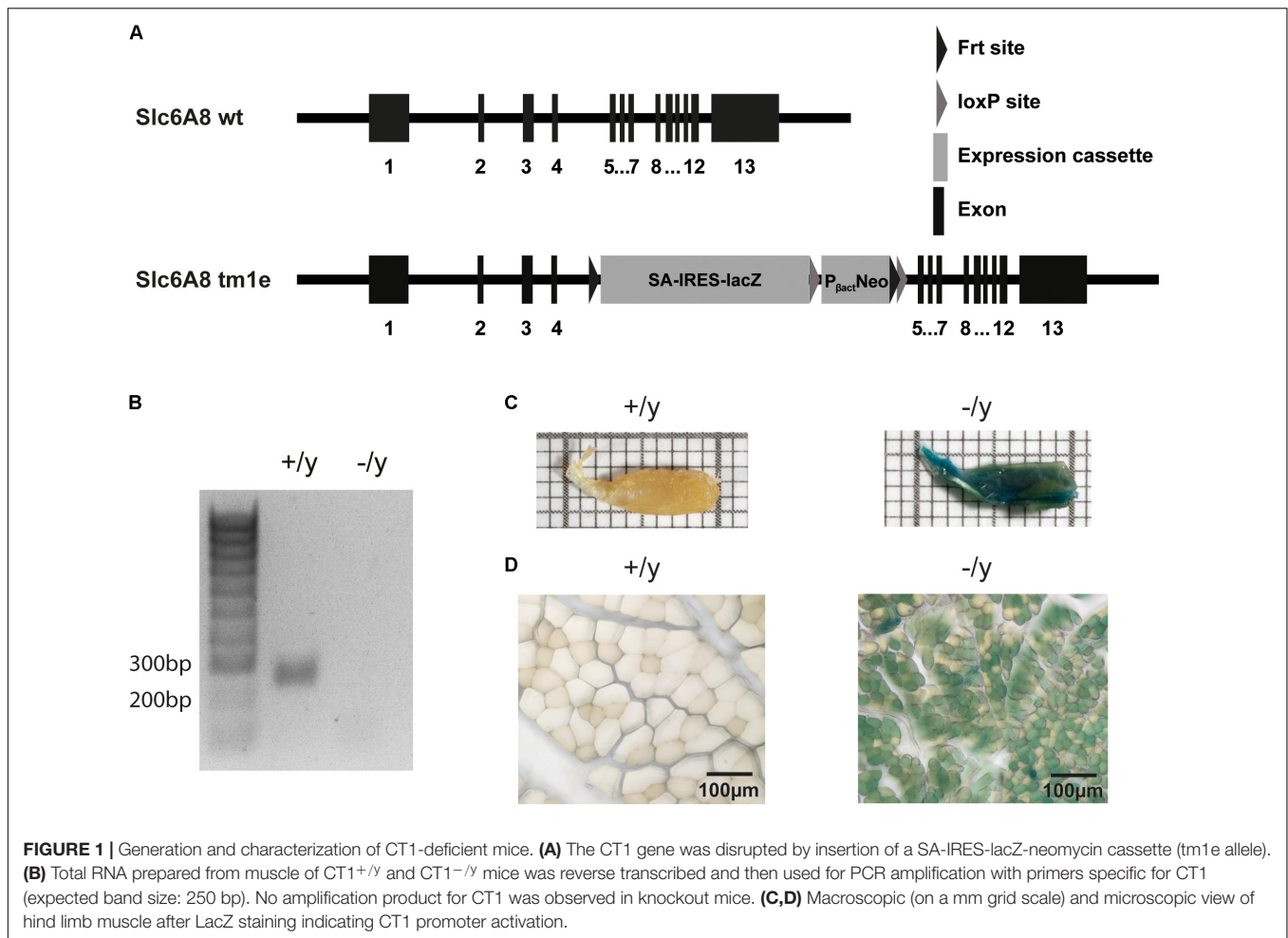
## RESULTS

### Reduced Creatine Levels in Skeletal Muscle of CT1-Deficient Mice

Targeted disruption of the *Slc6a8* gene in ESCs was employed to prevent functional expression of CT1 protein (Figure 1A).  $\text{CT1}^{-/y}$  mice were born at the expected Mendelian ratio, were viable and did not require any specific treatment for survival or growth. In cDNA prepared from total RNA of skeletal muscle no expression of the *CT1* gene could be detected in  $\text{CT1}^{-/y}$  mice with gene specific PCR whereas a PCR product was observed in  $\text{CT1}^{+/y}$  mice (Figure 1B). HPLC-analysis revealed a 10-fold reduction of Cr levels in heart and skeletal muscle, i.e., *extensor digitorum longus* and *soleus* muscle (Table 1). Cerebral Cr levels were also reduced, but only by about 70% (Table 1). No difference of Cr levels was observed in kidney, which is the main organ of endogenous Cr biosynthesis (Table 1). Expression of LacZ revealed widespread activity of *CT1* promoter in skeletal muscle (Figures 1C,D). Thus, we successfully generated a CT1-deficient mouse line for muscle phenotype analysis.

### Cr Biosynthesis in Skeletal Muscle of CT1-Deficient Mice

In rodents, only very low AGAT and GAMT activities were found in skeletal muscle (Van Pilsum and Warhol, 1963; Daly, 1985). However, Cr deficiency has been shown to alter AGAT protein expression. For example, GAMT-deficient mice display compensatory upregulation of AGAT expression in kidney (Choe et al., 2013a). Furthermore, AGAT expression in skeletal muscle



**TABLE 1 |** HPLC-analysis of total creatine concentrations (mean  $\pm$  SEM) in CT1<sup>+/y</sup> and CT1<sup>-/y</sup> mice ( $n = 4$  per tissue) ( $t$ -test, \*\*\* $P < 0.001$ ).

Tissue	Total creatine (nmol/mg protein)	
	CT1 <sup>+/y</sup>	CT1 <sup>-/y</sup>
Heart	64.3 $\pm$ 6.6	4.5 $\pm$ 0.6***
Brain	72.6 $\pm$ 9.5	22.5 $\pm$ 1.1***
Skeletal muscle ( <i>extensor digitorum longus</i> )	131.9 $\pm$ 6.7	16.1 $\pm$ 5.3***
Skeletal muscle ( <i>soleus</i> )	137.3 $\pm$ 9.9	15.7 $\pm$ 3.8***
Kidney	12.3 $\pm$ 1.9	11.9 $\pm$ 3.8

was increased in another mouse model of CT1 deficiency (Russell et al., 2014). Therefore, we studied AGAT and GAMT protein expression in CT1-deficient mice for putative adaptive changes. Quantitative western blot analysis revealed significant upregulation of AGAT expression in kidney and skeletal muscle of CT1<sup>-/y</sup> mice compared to wild-type mice (Figures 2A,B). Furthermore, well-detectable GAMT expression was unaltered in skeletal muscle of CT1<sup>-/y</sup> mice, whereas GAMT expression in liver was even reduced in CT1<sup>-/y</sup> mice compared with CT1<sup>+/y</sup> mice (Figures 2C,D). However, despite the strong

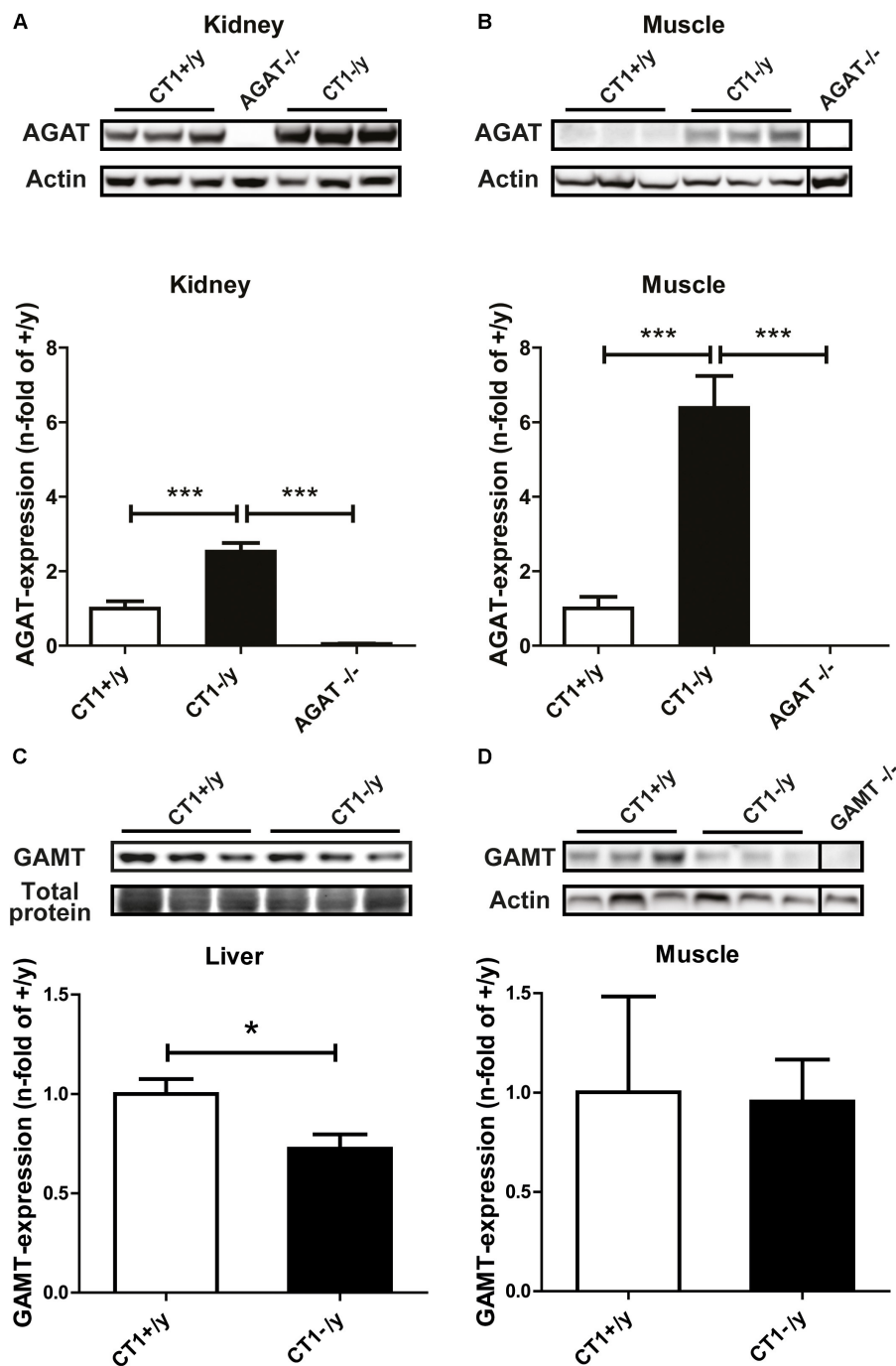
upregulation of AGAT protein expression, our data revealed pronounced reduction of Cr in skeletal muscle of CT1<sup>-/y</sup> mice. Thus, increased AGAT expression in skeletal muscle does not compensate for the deficiency in skeletal muscle in CT1<sup>-/y</sup> mice.

## CT1-Deficient Mice Reveal Reduced Weight, Length, and Body Mass Index

L-Arginine:glycine amidinotransferase and GAMT deficiency in transgenic mice leads to Cr-dependent failure to thrive with reduced body weight and length (Schmidt et al., 2004; Choe et al., 2013b). Similarly, CT1<sup>-/y</sup> mice were lean, short, and had a markedly reduced body mass index (BMI) compared with CT1<sup>+/y</sup> littermates (Figures 3A–D). CT1<sup>-/y</sup> mice showed consistently lower body weight as early as from the age of 5 weeks (Figure 3E). Overall, CT1<sup>-/y</sup> mice displayed morphometric alterations indicative of severely impaired whole-body energy homeostasis.

## Impaired Motor Behavior in CT1-Deficient Mice

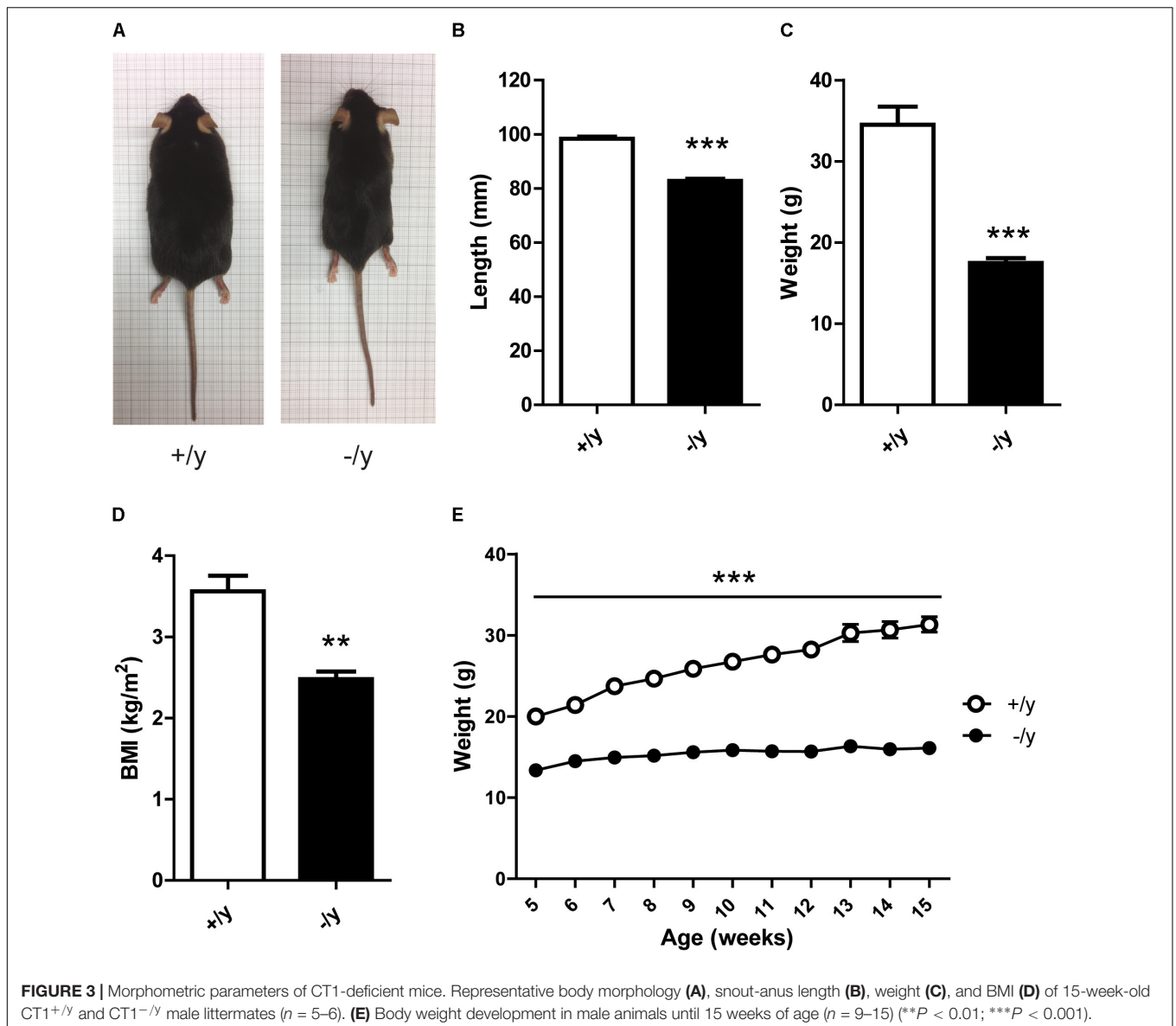
Creatine transporter-deficient mice displayed reduced body tension and severe kyphoscoliosis, suggesting pronounced



**FIGURE 2 |** L-Arginine:glycine amidinotransferase and GAMT expression. Relative quantification of AGAT protein levels in kidney (A) and muscle (B) of CT1<sup>-/y</sup> mice ( $n = 5-6$ ). Relative quantification of GAMT protein levels in liver (C) and muscle (D) of CT1<sup>-/y</sup> mice ( $n = 6$ ). Tissue samples of AGAT<sup>-/-</sup> and GAMT<sup>-/-</sup> mice to verify antibody specificity (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

muscle weakness and chronic muscular hypotonia. Therefore, we analyzed muscle function and motor behavior in detail. Grip strength of CT1<sup>-/y</sup> mice was severely reduced to about 15% of that of CT1<sup>+/y</sup> littermates (grip strength: CT1<sup>+/y</sup>  $1.63 \pm 0.05$  mN, CT1<sup>-/y</sup>  $0.25 \pm 0.01$  mN,  $n = 9-15$ , Figure 4A). In the rotarod test, latency to fall did not differ

between the two groups in the first trial. However, CT1<sup>+/y</sup> littermates showed motor learning and increased performance during subsequent trials, whereas CT1<sup>-/y</sup> mice remained at a constantly low level (Figure 4B). During the pole test, CT1<sup>-/y</sup> mice were not capable of turning upside down, whereas normal performance was observed in almost all CT1<sup>+/y</sup> littermates



(turning:  $CT1^{+/y}$ : 8/9 mice,  $CT1^{-/y}$ : 0/13 mice, **Figure 4C**). In addition to strength, motor learning, and coordination, we analyzed running endurance using an adapted voluntary wheel-running system (De Bono et al., 2006). In contrast to  $CT1^{+/y}$  mice, the running distance of  $CT1^{-/y}$  mice was dramatically reduced (running distance:  $CT1^{+/y}$   $8.41 \pm 0.85$  km/day,  $CT1^{-/y}$   $1.99 \pm 0.26$  km/day, average of days 15–29, **Figure 4D**). Taken together,  $CT1^{-/y}$  mice displayed a motor phenotype characterized by severe muscular hypotonia and kyphoscoliosis, reduced muscle strength and low running endurance.

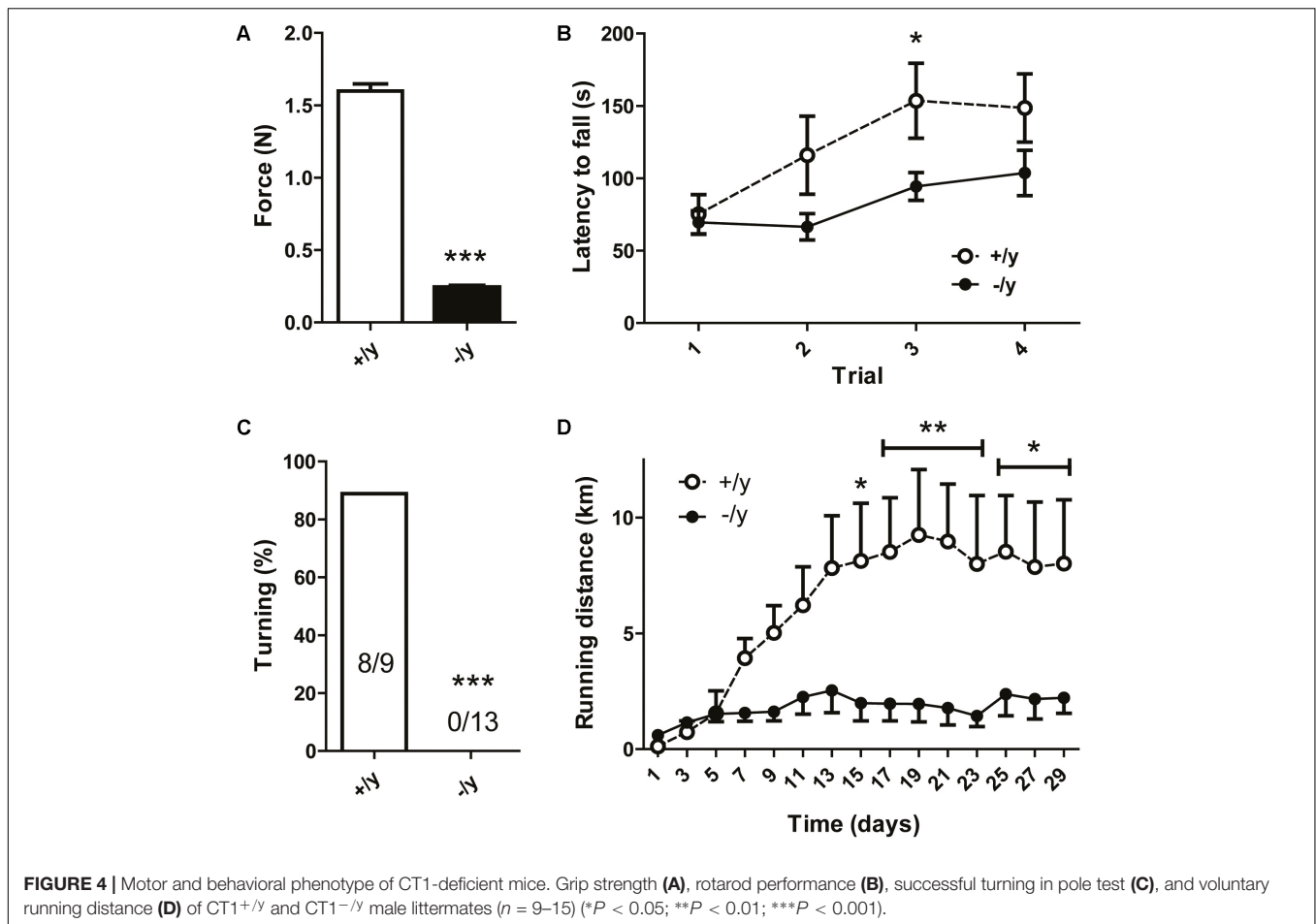
### Muscle Atrophy in CT1-Deficient Mice

We analyzed the underlying cause of impaired motor function of  $CT1^{-/y}$  mice at MRI and histological levels. MRI of the hind leg revealed reduced muscle CSAs in  $CT1^{-/y}$  mice ( $CT1^{+/y}$   $83.9 \pm 3.0$  mm<sup>2</sup>,  $CT1^{-/y}$   $51.0 \pm 3.0$  mm<sup>2</sup>,  $n = 4-5$ , **Figures 5A,B**).

We then performed muscle histology to look if potential cell loss or atrophy explains reduced muscle size. Single fiber atrophy was detected in the *extensor digitorum longus* muscle, where quantitative analysis revealed reduced myocyte CSAs in  $CT1^{-/y}$  mice compared with  $CT1^{+/y}$  mice ( $CT1^{+/y}$   $1466 \pm 171.4$  μm<sup>2</sup>,  $CT1^{-/y}$   $524.6 \pm 22.86$  μm<sup>2</sup>,  $n = 3$ , **Figures 5C,D**). Given that  $CT1^{-/y}$  mice have severe thoracolumbar kyphosis and reduced muscle force during grip strength testing, both muscle dysfunction and atrophy are likely to be present in all major muscle groups.

### CT1 Deficiency Improves Glucose Tolerance

In a previous study, we detected a pronounced metabolic phenotype in Cr-deficient  $AGAT^{-/-}$  mice that was characterized by improved glucose tolerance and resistance to diet-induced

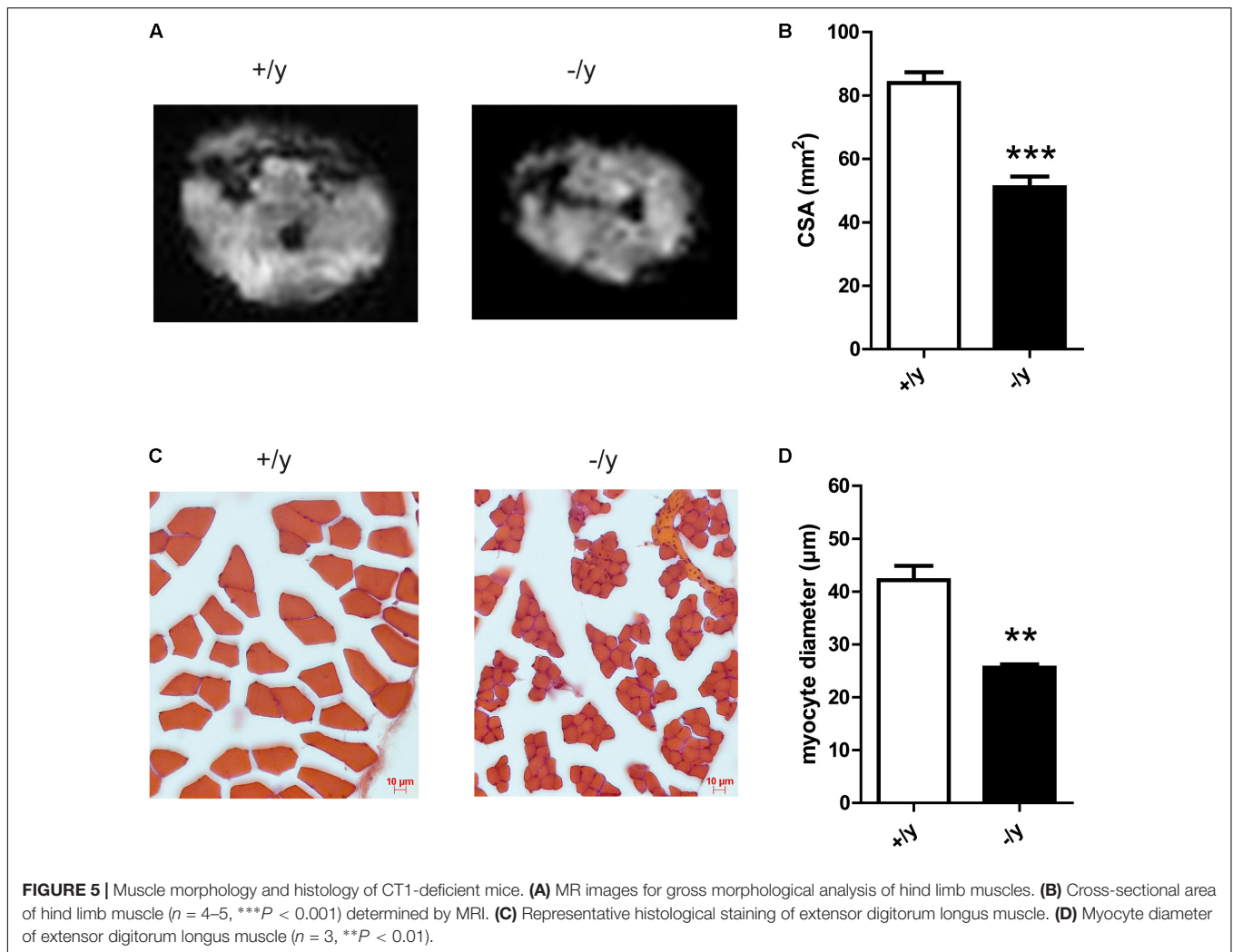


obesity (Choe et al., 2013b). Reduced body weight and altered muscle physiology suggested similar metabolic alterations in CT1<sup>-/y</sup> mice. Indeed, fasted and fed blood glucose levels in CT1<sup>-/y</sup> mice were significantly decreased (fasted: CT1<sup>+/y</sup> 128.4 ± 4.67 mg/dl, CT1<sup>-/y</sup> 71.13 ± 3.14 mg/dl, fed: CT1<sup>+/y</sup> 152.3 ± 8.11 mg/dl, CT1<sup>-/y</sup> 122.9 ± 6.08 mg/dl, **Figures 6A,B**). Furthermore, glucose tolerance tests revealed faster glucose clearance in CT1<sup>-/y</sup> mice compared to CT1<sup>+/y</sup> mice after normalization to fasted blood glucose levels (**Figure 6C**). As a large proportion of glucose is taken up into skeletal muscle, we analyzed the steady-state levels of glucose transporter protein type 4 in skeletal muscle. Quantitative western blot analysis revealed significantly increased GLUT4 levels in CT1<sup>-/y</sup> mice (**Figure 6D**), which explains faster glucose clearance. In addition, we detected reduced expression levels of UCP3 and a trend toward increased COX4 expression indicating facilitated oxidative phosphorylation (**Figure 6D**). Furthermore, citrate synthase activity – a measure of mitochondrial mass – was significantly increased in *extensor digitorum longus* and *soleus* muscle (**Figure 6E**). These findings suggest mitochondrial content is increased to accelerate energy production to meet increased energy demand. Given the imbalance between energy demand and production, we looked for the activation of AMPK, a key metabolic energy sensor and switch. Similar to GAMT

and AGAT mice, AMPK activation, as measured by phospho-AMPK (pAMPK) or phosphorylated substrate (pACC) levels, was increased in CT1<sup>-/y</sup> mice indicating a chronic catabolic state, possibly resulting from energy deficiency, in skeletal muscle (**Figure 6F**).

### Reduced Phosphocreatine Levels and Altered Muscle Energy Metabolism in CT1-Deficient Mice

Our data indicate profound metabolic changes in muscle of CT1-deficient mice. Therefore, we used muscle <sup>31</sup>P MR spectroscopy to obtain functional data on high energy phosphate turnover. CT1<sup>-/y</sup> mice demonstrated a strong reduction of PCr in skeletal muscle (**Figure 7A**). The PCr/P<sub>i</sub> ratio was significantly reduced in CT1<sup>-/y</sup> mice compared with CT1<sup>+/y</sup> mice (CT1<sup>+/y</sup>: 12.2 ± 0.7, CT1<sup>-/y</sup>: 0.09 ± 0.02,  $P < 0.001$ , **Figure 7B**). Estimation of PCr tissue concentrations in skeletal muscle revealed a 40-fold reduction in CT1<sup>-/y</sup> mice (CT1<sup>+/y</sup>: 25.4 ± 0.1 mM, CT1<sup>-/y</sup>: 0.6 ± 0.1 mM,  $P < 0.001$ ). In contrast to this decrease, the P<sub>i</sub> tissue concentration in skeletal muscle of CT1<sup>-/y</sup> mice was increased threefold (CT1<sup>+/y</sup>: 2.16 ± 0.22 mM, CT1<sup>-/y</sup>: 6.6 ± 0.3 mM,  $P < 0.001$ ). Furthermore, we determined whether ATP levels were decreased in the hind limb of CT1<sup>-/y</sup> mice by

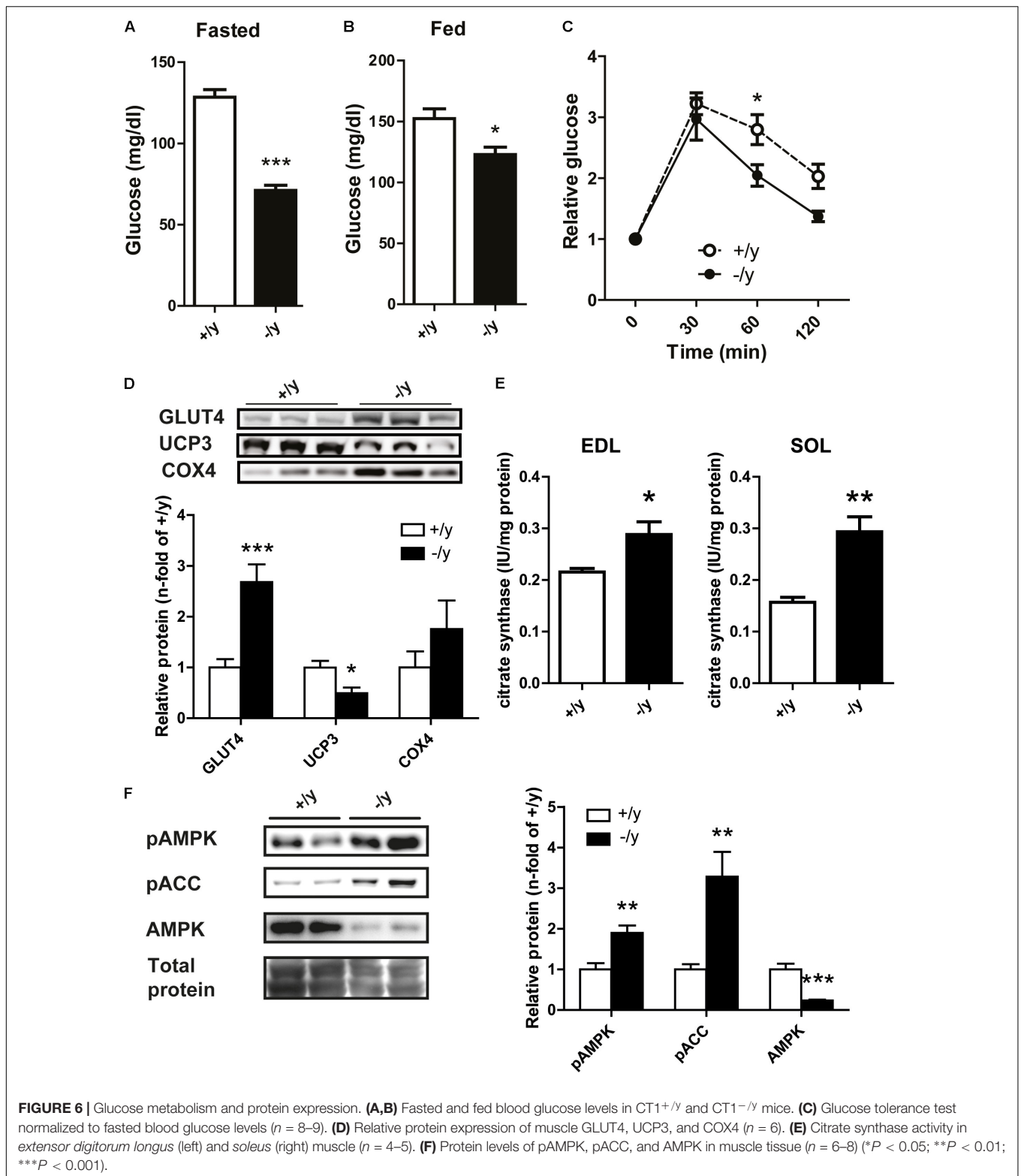


evaluating the signal intensity of ATP relative to the muscle CSA (Nabuurs et al., 2013). Assuming a tissue concentration of 7.8 mM in wild-type skeletal muscle (in 't Zandt et al., 2003), the ATP concentration in  $CT1^{-/y}$  hind limb muscle was estimated to be  $4.2 \pm 1.2$  mM and therefore decreased by more than 40%. ATP/ $P_i$  ratios were significantly reduced in  $CT1^{-/y}$  mice, indicating abnormal energy metabolism by contributing to a decreased resting state phosphorylation potential due to the depletion of PCr stores ( $CT1^{+/y}$ :  $3.87 \pm 0.16$ ,  $CT1^{-/y}$ :  $0.77 \pm 0.06$ ,  $P < 0.001$ , **Figures 7C–E**). The calculated *in vivo* tissue pH was unaltered between  $CT1^{+/y}$  and  $CT1^{-/y}$  mice. Next, we assessed kinetics of ATP synthase in resting skeletal muscle from ST experiments. The forward rate  $k_f$  of ATP synthases in skeletal muscle of  $CT1^{-/y}$  mice was increased compared with  $CT1^{+/y}$  mice, but did not reach statistical significance ( $CT1^{+/y}$ :  $0.20 \pm 0.04$  s $^{-1}$ ,  $CT1^{-/y}$ :  $0.25 \pm 0.05$  s $^{-1}$ ,  $P = 0.13$ ) (**Figure 7F**). The trend toward increased  $k_f$  of ATP synthase in  $CT1^{-/y}$  mice indicates increased total cytosolic and mitochondrial ATP synthetase activity. Given the increased  $P_i$  tissue concentration in  $CT1^{-/y}$  mice, the  $P_i \rightarrow$ ATP flux is increased in  $CT1^{-/y}$  mice compared with  $CT1^{+/y}$  mice ( $CT1^{+/y}$ :  $0.43 \pm 0.08$  mM s $^{-1}$ ,  $CT1^{-/y}$ :

$1.6 \pm 0.3$  mM s $^{-1}$ ,  $P < 0.001$ ) (**Figure 7G**). But, increased  $P_i \rightarrow$ ATP flux as a parameter of total ATP synthase activity at rest is not sufficient to compensate for reduced ATP levels in the absence of PCr. Taken together, changes in muscle function and morphology of  $CT1^{-/y}$  mice were associated with marked alterations in energy metabolism, emphasizing the critical role of CT1 in muscle physiology.

## DISCUSSION

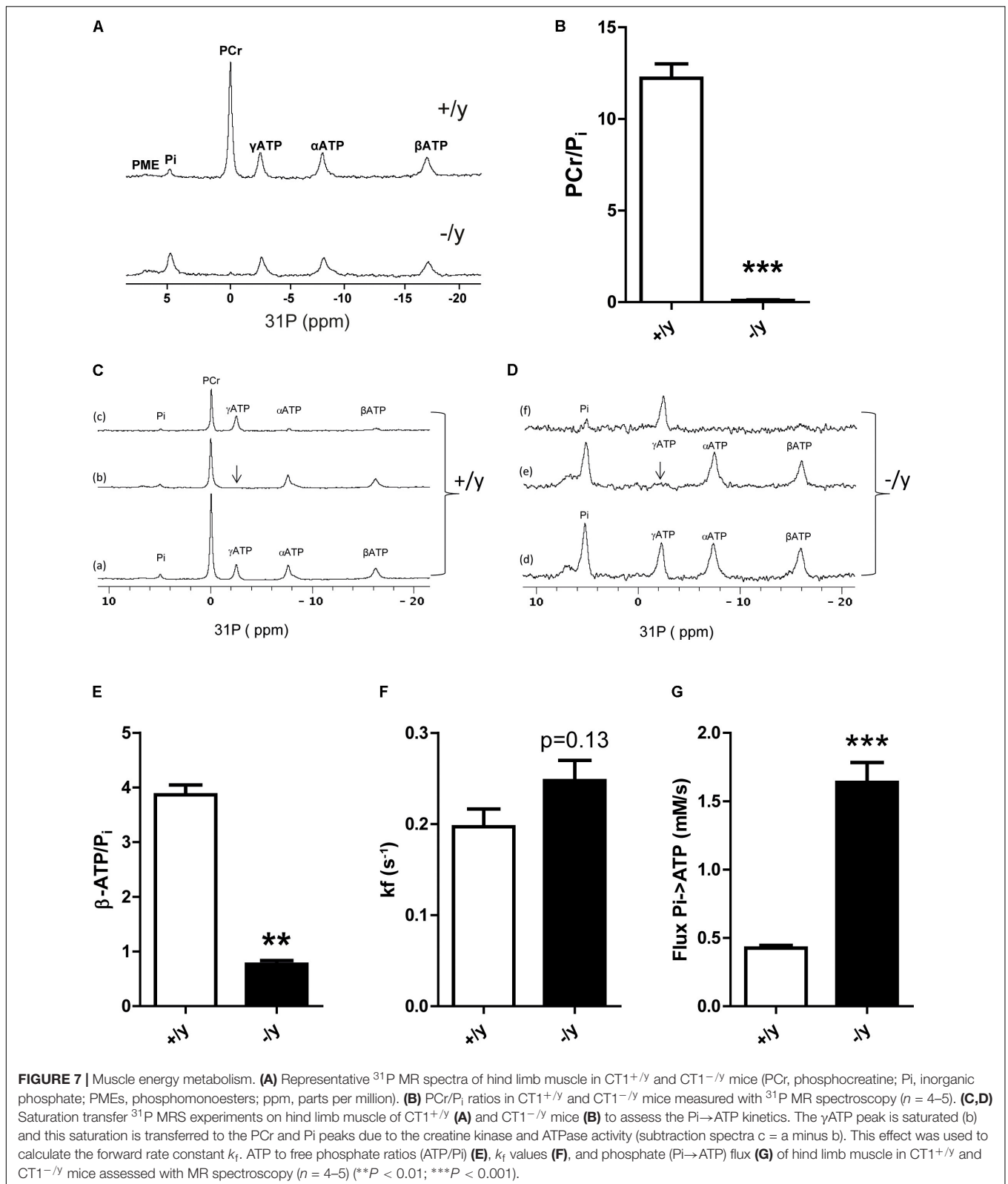
Our study revealed that CT1-deficient mice have a strongly reduced skeletal muscle (P)Cr, an impaired motor function with severe muscle atrophy, and increased glucose metabolism due to AMPK activation. Major clinical problems in CT1-deficient patients include behavioral abnormalities, seizures, and intellectual impairment (Stockler et al., 2007). Therefore, previous research was mainly focused on the effects of Cr depletion in brain. In all available Cr-deficient mouse models, however, pronounced muscular phenotypes were observed (Schmidt et al., 2004; Nabuurs et al., 2013; Baroncelli et al., 2014;



Russell et al., 2014). Here, we demonstrate strongly reduced PCR levels in skeletal muscle of CT1-deficient mice resulting in chronic energy depletion with increased resting Pi/ATP ratios. Muscle physiology, metabolism, and morphology were severely

affected in CT1-deficient mice resulting in muscular atrophy and thoracolumbar scoliosis.

Following synthesis in liver and kidney, Cr delivery to its target organs such as muscle and brain is dependent on active



transporters. To date, only CT1 encoded by *SLC6A8* has been identified as effective Cr transporter across cell membranes (Abplanalp et al., 2013; van de Kamp et al., 2014). Consequently,

impaired CT1 activity has been associated with reduced cerebral and muscular Cr levels (deGrauw et al., 2003; van de Kamp et al., 2013). Here, we show that CT1 deficiency leads to markedly

reduced Cr levels detected by HPLC-analysis and even stronger reduced PCr levels with *in vivo*  $^{31}\text{P}$  MR spectroscopy in skeletal muscle (**Figures 1, 7**). In previous studies on muscle of CT1-deficient mice, however, residual Cr was reported from below detection limit up to 23 or 36% of wild-type levels (Skelton et al., 2011; Russell et al., 2014; Baroncelli et al., 2016). In addition, two case studies on CT1-deficient patients showed almost normal levels of Cr in skeletal muscle (deGrauw et al., 2003; Pyne-Geithman et al., 2004). These discrepancies in muscular Cr content might be explained by residual CT1 activity in affected human patients (depending on the molecular nature of the mutation) or by mouse strain differences. The differences in Cr levels might also be due to specific detection techniques. Photometric assays can be unspecific and overestimate Cr values (Skelton et al., 2011; Russell et al., 2014).

An alternative explanation for residual Cr levels in muscle and brain of CT1-deficient animals as well as patients might be endogenous Cr synthesis. Under healthy or normal physiological conditions, AGAT levels are low in skeletal muscle (**Figure 2**). Cr synthesis is thought to take place almost exclusively in liver and kidney, with a minor contribution from pancreas (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000; Brosnan and Brosnan, 2010; da Silva et al., 2014). However, AGAT expression is regulated by Cr availability in a negative feedback loop (Choe et al., 2013a; Russell et al., 2014). Indeed, we detected increased AGAT expression in skeletal muscle following intracellular Cr depletion due to CT1 deficiency (**Figure 2**). As PCr levels remained low despite GAMT and increased AGAT expression, endogenous Cr synthesis in muscle was insufficient to compensate for CT1 deficiency in our mouse model. Thus, CT1 deficiency in mice induces a strong decrease in Cr in muscle, despite compensatory upregulation of enzymes involved in Cr synthesis.

Skeletal muscle contains Cr in concentrations of up to 40 mM. Accordingly, muscle physiology was severely affected in Cr-deficient CT1<sup>-/-</sup> mice. Reduced muscle force and endurance as well as pronounced kyphoscoliosis demonstrate generalized impairment of muscle function (**Figure 5**). These functional alterations were accompanied by structural changes such as a reduction in muscle and myocyte diameter, which is in line with reports describing a close correlation of muscle diameter and contractile power (Maughan et al., 1983a,b). Absolute numbers of myocytes were not quantified, but similar reductions in muscle and myocyte diameters do not suggest a reduction in the overall number of myocytes. A reduced myocyte diameter can be explained by Cr deficiency itself and by chronic energy depletion and involvement of catabolic pathways including AMPK activation. Previous studies on AGAT- and GAMT-deficient mice showed ultrastructural changes in muscle histology, including lipid droplets around mitochondria (Schmidt et al., 2004; Nabuurs et al., 2013). Also AGAT-deficient muscle displayed a transcriptomic signature resembling a transcriptional response known as the mitochondrial unfolded protein response (Stockebrand et al., 2016; Shpilka and Haynes, 2018). Neither ultrastructural analysis of skeletal muscle nor transcriptomic analyses have been performed in CT1-deficient mice yet, but similar processes are likely to be involved.

Motor behavior in CT1-deficient mice was impaired not only in terms of muscle force but also wheel running distance and motor learning (**Figure 5**). Reduced wheel running might partly be explained by low muscle force, but also by deficient energy stores and impaired oxidative phosphorylation (see below). During rotarod testing for motor learning and coordination, performance during the first trial did not differ from CT1<sup>+/-</sup> mice because low body weight might compensate for reduced muscle strength. However, unlike CT1<sup>+/-</sup> mice, the performance of CT1<sup>-/-</sup> mice did not improve during subsequent trials indicating not only peripheral muscular but also CNS contribution to the motor phenotype.

Severely altered structure and function of skeletal muscle were also observed in Cr-deficient AGAT knockout mice, whereas GAMT knockout mice displayed a milder muscular phenotype most likely due to high levels of guanidinoacetate that, although being a weak substrate for creatine kinase, can be phosphorylated and partly substitute for Cr (Schulze et al., 2003; Ensenauer et al., 2004; Kan et al., 2004). Some muscle properties derived from  $^{31}\text{P}$  MRS data show strikingly similar differences with WT between AGAT and CT1 knockouts: in both PCr was dramatically reduced with a concomitant decrease of ATP by 40%. This resulted in a metabolic remodeling including a fourfold increased Pi/ATP at an unchanged tissue pH (Nabuurs et al., 2013). The observed stronger reduction in PCr (40-fold) than in total Cr (10-fold) would be in agreement with a creatine kinase equilibrium shift due to the lower ATP level. Apparently, despite increased Pi→ATP flux the muscles of CT1<sup>-/-</sup> mice cannot maintain normal ATP levels, even in the resting state. Reduced ATP and increased Pi levels result in chronic AMPK activation indicating a catabolic state favoring energy production. Accordingly, mitochondrial volume is increased and oxidative phosphorylation is accelerated, but not sufficient to normalize ATP levels. In line with these findings, creatine-deficient muscle in AGAT<sup>-/-</sup> mice revealed increased absolute mitochondrial mass, but decreased respiratory chain enzyme activities per mitochondrial content (i.e., citrate synthase activity) (Nabuurs et al., 2013).

Both functional (reduction in grip strength: 70% for AGAT<sup>-/-</sup> vs. 85% in CT1<sup>-/-</sup>) and structural changes (reduction in myocyte diameter: 35% for AGAT<sup>-/-</sup> vs. 65% in CT1<sup>-/-</sup>) were even more pronounced in CT1<sup>-/-</sup> mice compared with AGAT<sup>-/-</sup> mice (**Figures 4A, 5D**) (Nabuurs et al., 2013). PCr levels in adult mice measured by MRS were low both in AGAT<sup>-/-</sup> and CT1<sup>-/-</sup> mice and cannot explain the differences. However, it has to be considered that mice from both lines were exposed to high maternal Cr levels during pregnancy and lactation. In AGAT<sup>-/-</sup> mice, Cr can be taken up into the target organs by CT1 and may compensate for deficient endogenous Cr synthesis to a certain extent. In CT1 deficiency, a lack of functional Cr transporters prevents normalization of Cr stores in muscle, even following high serum Cr levels throughout intrauterine and postnatal development. Hence, intracellular Cr deficiency during early development seems to play a critical role for the outcome of genetic Cr deficiency.

Cerebral creatine deficiency in mice resulted in cognitive impairment and neuropathological abnormalities, which might

also contribute to the muscle phenotype of systemic CT1-deficient mice (Kurosawa et al., 2012; Baroncelli et al., 2016). But skeletal muscle of mouse models deficient in muscle creatine kinase lacked burst activity, revealed altered intracellular calcium release and increased fatigue with tetanic stimulation (van Deursen et al., 1993; Steeghs et al., 1997, 1998; Dahlstedt et al., 2000). In the absence of PCr/Cr buffering, *in vivo* MRS studies of muscle energetics revealed that ATP levels, pH and Pi levels could not be maintained during ischemic conditions despite increased glycolytic ATP synthesis (in 't Zandt et al., 1999, 2003; Nabuurs et al., 2013). Therefore, creatine deficiency in skeletal muscle *per se* impairs energy metabolism and motor function independent of neuronal dysfunction.

Limitations of our study are that we cannot rule out that developmental alterations are also responsible for impaired motor function. Given that mice with CT1 deficiency revealed age-related progressive cognitive impairment associated with brain aging, motor behavior could also be altered due to developmental disturbances (Baroncelli et al., 2016). Furthermore, in our systemic CT1-deficient mouse models, we are unable to clearly differentiate neuronal and muscular contributions to motor function. Given that brain-specific CT1 deficiency in mice recapitulates some metabolic and cognitive characteristics, a contribution of neuronal creatine deficiency to motor function is possible (Kurosawa et al., 2012; Baroncelli et al., 2016). But other mouse models with disrupted PCr/Cr buffering (i.e., deficiency of AGAT, cytosolic or mitochondrial creatine kinase) clearly link muscle creatine deficiency with motor dysfunction.

Although cognitive impairment and developmental delay are the hallmarks of human Cr deficiency syndromes, muscular hypotonia and myopathy were also described in patients with AGAT, GAMT, and CT1 deficiency (Stockler et al., 1996; Anselm et al., 2006; Nouioua et al., 2013). The overt muscular phenotype in Cr-deficient mouse models, however, has not been observed in humans. In contrast to mice, human patients still ingest Cr via their normal diet. However, oral Cr supplementation is only feasible in AGAT and GAMT deficiency, but proved to be ineffective in CT1 deficiency (Stockler et al., 2007). Expression of AGAT is upregulated in muscle of CT1-deficient mice (Figure 2). It is possible that this compensatory mechanism is sufficient to maintain endogenous Cr synthesis in human patients. To our knowledge, AGAT and GAMT expression in patients has not yet been directly assessed, for example by muscle biopsy. Although impaired skeletal muscle function does not seem to be a

critical symptom in most CT1-deficient patients, low intracellular PCr/Cr energy stores might further compromise muscle function and increase the risk of muscle damage in situations of metabolic stress such as infections or intensified exercise in CT1-deficient patients. In summary, CT1 deficiency results in reduced levels of high energy phosphates (PCr, ATP), muscle weakness and atrophy, despite compensatory mechanisms of creatine and ATP biosynthesis.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS and C-UC conceived the concept and designed the work. MS, AS, SH, DI, HL, CL, AN, and C-UC designed, conducted and analyzed metabolic phenotyping, and molecular biology experiments. DD and AH designed, conducted, and analyzed the MRS-experiments. MS and IH-B generated CT1 knockout mice. AS and C-UC designed, conducted, and analyzed behavioral experiments. MS and C-UC drafted the work. All authors critically revised the manuscript, approved the final version of the manuscript, and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

## FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Grant No. CH872/1-1, C-UC, AN, DI) and the Werner-Otto-Stiftung (5/86, C-UC). The MR experiments were part of a proof of concept project in Euro-Bioimaging and supported by Netherlands Organization for Scientific Research (Grant No. CSBR09/013V). HPLC measurements were supported by a British Heart Foundation program (Grant No. RG/13/8/30266).

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank H. Voss for expert animal care, S. Schillemeit for genotyping and tissue sectioning and F. Morellini for help with behavioral studies. A. Veltien is acknowledged for maintaining the MR instrument. We also thank the EUCOMM consortium for providing the ES cell clone used to generate the knock out model.

## REFERENCES

- Abplanalp, J., Laczko, E., Philp, N. J., Neidhardt, J., Zuercher, J., Braun, P., et al. (2013). The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3218–3226. doi: 10.1093/hmg/ddt175
- Anselm, I. A., Alkuraya, F. S., Salomons, G. S., Jakobs, C., Fulton, A. B., Mazumdar, M., et al. (2006). X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 214–219. doi: 10.1007/s10545-006-0123-4
- Baroncelli, L., Alessandri, M. G., Tola, J., Putignano, E., Migliore, M., Amendola, E., et al. (2014). A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Res* 3:228. doi: 10.12688/f1000research.5369.1
- Baroncelli, L., Molinaro, A., Cacciante, F., Alessandri, M. G., Napoli, D., Putignano, E., et al. (2016). A mouse model for creatine transporter deficiency reveals early onset cognitive impairment and neuropathology associated with brain aging. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4186–4200. doi: 10.1093/hmg/ddw252
- Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (2010). Creatine metabolism and the urea cycle. *Mol. Genet. Metab.* 100(Suppl. 1), S49–S52. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.02.020

- Choe, C. U., Atzler, D., Wild, P. S., Carter, A. M., Boger, R. H., Ojeda, F., et al. (2013a). Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* 128, 1451–1461. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000580
- Choe, C. U., Nabuurs, C., Stockebrand, M. C., Neu, A., Nunes, P., Morellini, F., et al. (2013b). L-arginine:glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 22, 110–123. doi: 10.1093/hmg/dd5407
- da Silva, R. P., Clow, K., Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (2014). Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas. *Br. J. Nutr.* 111, 571–577. doi: 10.1017/S0007114513003012
- Dahlstedt, A. J., Katz, A., Wieringa, B., and Westerblad, H. (2000). Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of isolated skeletal muscle deficient in creatine kinase. *FASEB J.* 14, 982–990. doi: 10.1096/fasebj.14.7.982
- Daly, M. M. (1985). Guanidinoacetate methyltransferase activity in tissues and cultured cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 236, 576–584. doi: 10.1016/0003-9861(85)90661-7
- De Bono, J. P., Adlam, D., Paterson, D. J., and Channon, K. M. (2006). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R926–R934.
- deGrauw, T. J., Cecil, K. M., Byars, A. W., Salomons, G. S., Ball, W. S., and Jakobs, C. (2003). The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol. Cell Biochem.* 244, 45–48. doi: 10.1023/A:1022487218904
- Ensenauer, R., Thiel, T., Schwab, K. O., Tacke, U., Stockler-Ipsiroglu, S., Schulze, A., et al. (2004). Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: differences of creatine uptake in human brain and muscle. *Mol. Genet. Metab.* 82, 208–213. doi: 10.1016/j.ymgme.2004.04.005
- in 't Zandt, H. J., Oerlemans, F., Wieringa, B., and Heerschap, A. (1999). Effects of ischemia on skeletal muscle energy metabolism in mice lacking creatine kinase monitored by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed.* 12, 327–334. doi: 10.1002/(SICI)1099-1492(199910)12:6<327::AID-NBM570>3.0.CO;2-9
- in 't Zandt, H. J. A., De Groof, A. J. C., Renema, W. K. J., Oerlemans, F. T. J. J., Klomp, D. W. J., Wieringa, B., et al. (2003). Presence of (phospho)creatine in developing and adult skeletal muscle of mice without mitochondrial and cytosolic muscle creatine kinase isoforms. *J. Physiol.* 548, 847–858. doi: 10.1111/j.1469-7793.2003.00847.x
- Ireland, Z., Russell, A. P., Wallimann, T., Walker, D. W., and Snow, R. (2009). Developmental changes in the expression of creatine synthesizing enzymes and creatine transporter in a precocial rodent, the spiny mouse. *BMC Dev. Biol.* 9:39. doi: 10.1186/1471-213X-9-39
- Kan, H. E., Renema, W. K., Isbrandt, D., and Heerschap, A. (2004). Phosphorylated guanidinoacetate partly compensates for the lack of phosphocreatine in skeletal muscle of mice lacking guanidinoacetate methyltransferase. *J. Physiol.* 560, 219–229. doi: 10.1113/jphysiol.2004.067926
- Koretsky, A. P., Basus, V. J., James, T. L., Klein, M. P., and Weiner, M. W. (1985). Detection of exchange reactions involving small metabolite pools using NMR magnetization transfer techniques: relevance to subcellular compartmentation of creatine kinase. *Magn. Reson. Med.* 2, 586–594. doi: 10.1002/mrm.1910020610
- Kurosawa, Y., Degrauw, T. J., Lindquist, D. M., Blanco, V. M., Pyne-Geithman, G. J., Daikoku, T., et al. (2012). Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J. Clin. Invest.* 122, 2837–2846. doi: 10.1172/JCI59373
- Mancini, G. M., Catsman-Berrevoets, C. E., De Co, I. F., Aarsen, F. K., Kamphoven, J. H., Huijmans, J. G., et al. (2005). Two novel mutations in SLC6A8 cause creatine transporter defect and distinctive X-linked mental retardation in two unrelated Dutch families. *Am. J. Med. Genet. A* 132A, 288–295. doi: 10.1002/ajmg.a.30473
- Maughan, R. J., Watson, J. S., and Weir, J. (1983a). Relationships between muscle strength and muscle cross-sectional area in male sprinters and endurance runners. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 50, 309–318. doi: 10.1007/BF00423237
- Maughan, R. J., Watson, J. S., and Weir, J. (1983b). Strength and cross-sectional area of human skeletal muscle. *J. Physiol.* 338, 37–49. doi: 10.1113/jphysiol.1983.sp014658
- Nabuurs, C., Huijbregts, B., Wieringa, B., Hilbers, C. W., and Heerschap, A. (2010). <sup>31</sup>P saturation transfer spectroscopy predicts differential intracellular macromolecular association of ATP and ADP in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 285, 39588–39596. doi: 10.1074/jbc.M110.164665
- Nabuurs, C. I., Choe, C. U., Veltien, A., Kan, H. E., Van Loon, L. J., Rodenburg, R. J., et al. (2013). Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *J. Physiol.* 591, 571–592. doi: 10.1113/jphysiol.2012.241760
- Nouioua, S., Cheillan, D., Zaouidi, S., Salomons, G. S., Amedjout, N., Kessaci, F., et al. (2013). Creatine deficiency syndrome. A treatable myopathy due to arginine-glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency. *Neuromuscul. Disord.* 23, 670–674. doi: 10.1016/j.nmd.2013.04.011
- Pettitt, S. J., Liang, Q., Rairdan, X. Y., Moran, J. L., Prosser, H. M., Beier, D. R., et al. (2009). Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat. Methods* 6, 493–495. doi: 10.1038/nmeth.1342
- Puusepp, H., Kall, K., Salomons, G. S., Talvik, I., Mannamaa, M., Rein, R., et al. (2010). The screening of SLC6A8 deficiency among Estonian families with X-linked mental retardation. *J. Inher. Metab. Dis.* 33(Suppl. 3), S5–S11. doi: 10.1007/s10545-008-1063-y
- Pyne-Geithman, G. J., Degrauw, T. J., Cecil, K. M., Chuck, G., Lyons, M. A., Ishida, Y., et al. (2004). Presence of normal creatine in the muscle of a patient with a mutation in the creatine transporter: a case study. *Mol. Cell Biochem.* 262, 35–39. doi: 10.1023/B:MGBL0000038213.15646.4a
- Russell, A. P., Ghobrial, L., Wright, C. R., Lamon, S., Brown, E. L., Kon, M., et al. (2014). Creatine transporter (SLC6A8) knockout mice display an increased capacity for in vitro creatine biosynthesis in skeletal muscle. *Front. Physiol.* 5:314. doi: 10.3389/fphys.2014.00314
- Schmidt, A., Marescau, B., Boehm, E. A., Renema, W. K., Peco, R., Das, A., et al. (2004). Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 13, 905–921. doi: 10.1093/hmg/ddh112
- Schulze, A., Bachert, P., Schlemmer, H., Harting, I., Polster, T., Salomons, G. S., et al. (2003). Lack of creatine in muscle and brain in an adult with GAMT deficiency. *Ann. Neurol.* 53, 248–251. doi: 10.1002/ana.10455
- Shpilka, T., and Haynes, C. M. (2018). The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 109–120. doi: 10.1038/nrm.2017.110
- Skarnes, W. C., Rosen, B., West, A. P., Koutourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., et al. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337–342. doi: 10.1038/nature10163
- Skelton, M. R., Schaefer, T. L., Graham, D. L., Degrauw, T. J., Clark, J. F., Williams, M. T., et al. (2011). Creatine transporter (CrT; SLC6A8) knockout mice as a model of human CrT deficiency. *PLoS One* 6:e16187. doi: 10.1371/journal.pone.0016187
- Steeghs, K., Benders, A., Oerlemans, F., De Haan, A., Heerschap, A., Ruitenbeek, W., et al. (1997). Altered Ca<sup>2+</sup> responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell* 89, 93–103. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80186-5
- Steeghs, K., Oerlemans, F., De Haan, A., Heerschap, A., Verdoodt, L., De Bie, M., et al. (1998). Cytoarchitectural and metabolic adaptations in muscles with mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Mol. Cell Biochem.* 184, 183–194. doi: 10.1023/A:1006811717709
- Stockebrand, M., Nejad, A. S., Neu, A., Kharbanda, K. K., Sauter, K., Schillemeit, S., et al. (2016). Transcriptomic and metabolic analyses reveal salvage pathways in creatine-deficient AGAT(-/-) mice. *Amino Acids* 48, 2025–2039. doi: 10.1007/s00726-016-2202-7
- Stockler, S., Isbrandt, D., Hanefeld, F., Schmidt, B., and Von Figura, K. (1996). Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 914–922.
- Stockler, S., Schutz, P. W., and Salomons, G. S. (2007). Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem.* 46, 149–166. doi: 10.1007/978-1-4020-6486-9\_8
- Teerlink, T., Hennekes, M., Bussemaker, J., and Groeneveld, J. (1993). Simultaneous determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 214, 278–283. doi: 10.1006/abio.1993.1488
- Torremans, A., Marescau, B., Possemiers, I., Van Dam, D., D'hooge, R., Isbrandt, D., et al. (2005). Biochemical and behavioural phenotyping of a mouse

- model for GAMT deficiency. *J. Neurol. Sci.* 231, 49–55. doi: 10.1016/j.jns.2004.12.014
- Tyler, D. J., Lopez, O., Cole, M. A., Carr, C. A., Stuckey, D. J., Lakatta, E., et al. (2010). Ongoing dual-angle measurements for the correction of partial saturation in 31P MR spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 64, 957–966. doi: 10.1002/mrm.22511
- van de Kamp, J. M., Betsalel, O. T., Mercimek-Mahmutoglu, S., Abulhoul, L., Grunewald, S., Anselm, I., et al. (2013). Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J. Med. Genet.* 50, 463–472. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101658
- van de Kamp, J. M., Errami, A., Howidi, M., Anselm, I., Winter, S., Phalin-Roque, J., et al. (2015). Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin. Genet.* 87, 141–147. doi: 10.1111/cge.12355
- van de Kamp, J. M., Mancini, G. M., and Salomons, G. S. (2014). X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 715–733. doi: 10.1007/s10545-014-9713-8
- van Deursen, J., Heerschap, A., Oerlemans, F., Ruitenbeek, W., Jap, P., Ter Laak, H., et al. (1993). Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell* 74, 621–631. doi: 10.1016/0092-8674(93)90510-W
- Van Pilsun, J. F., and Warhol, R. M. (1963). The fate of large doses of creatine injected intraperitoneally into normal rats. *Clin. Chem.* 9, 347–350.
- Wyss, M., and Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* 80, 1107–1213. doi: 10.1152/physrev.2000.80.3.1107
- Zervou, S., Yin, X., Nabeebaccus, A. A., O'Brien, B. A., Cross, R. L., McAndrew, D. J., et al. (2016). Proteomic and metabolomic changes driven by elevating myocardial creatine suggest novel metabolic feedback mechanisms. *Amino Acids* 48, 1969–1981. doi: 10.1007/s00726-016-2236-x

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Stockebrand, Sasani, Das, Hornig, Hermans-Borgmeyer, Lake, Isbrandt, Lygate, Heerschap, Neu and Choe. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 3 Zusammenfassung

Statine hemmen die Cholesterolsynthese, reduzieren das kardiovaskuläre Risiko und sind Mittel der ersten Wahl bei koronarer Herzkrankheit. Statin-induzierte Muskelbeschwerden sind eine häufige unerwünschte Arzneimittelwirkung und können zum Abbruch Therapie führen. Vorarbeiten deuten auf einen Zusammenhang der L-Arginin:Glycin-Amidotransferase (AGAT)-Aktivität und Statin-induzierten Muskelsymptomen hin. Die AGAT katalysiert die Synthese L-Homoarginin (hArg) und Guanidinoacetat (GAA). GAA wird von der GAMT zur endogenen Cr Synthese verwendet. Ziel dieser Studie war es, ein Mausmodell für Simvastatin-induzierte Myopathien zu etablieren und den modulierenden Einfluss der AGAT und seinen Produkten hArg und Cr im Hinblick auf Myopathien zu untersuchen.

In einer Dosisfindungs-Kohorte wurden WT C57BL6/J Mäuse mit oralem Simvastatin behandelt und anschließend mit AGAT und GAMT-Knockout Tieren verglichen. Abschließend wurde der Einfluss von Cr und hArg untersucht.

In cerebrovaskulären Patienten konnten wir verminderte GAA und hArg Blutkonzentrationen als Hinweis auf eine verminderte AGAT Expression und/oder Aktivität unter Statintherapie nachgewiesen. WT Mäuse unter Simvastatin-Therapie zeigten eine Reduktion der Muskulatur (EDL Durchmesser:  $34,09 \pm 2,3 \mu\text{m}$  in der Kontrollgruppe,  $25,46 \pm 2,82 \mu\text{m}$  in der 900 mg/kg Statin-Gruppe), verminderte AGAT Expression sowie reduzierte GAA und hArg Konzentrationen. Im Vergleich zwischen AGAT KO ( $\text{AGAT}^{-/-}$ ) und AGAT überexprimierenden GAMT KO-Mäusen waren die Statin-Effekte in GAMT Tieren signifikant geringer ausgeprägt, was auf einen Cr unabhängigen Mechanismus hindeutet. Andererseits war die funktionelle Muskelleistung von  $\text{AGAT}^{-/-}$  Mäusen unter Cr im Vergleich zu nicht substituierten Tieren höher. hArg-Substitution hatte keinen Effekt auf Statin-induzierte Myopathien in  $\text{AGAT}^{-/-}$  Mäusen.

Unsere Ergebnisse deuten auf einen komplexen Mechanismus zwischen AGAT Expression/Aktivität und AGAT Produkten auf Statin-induzierte Myopathien hin. Weitere klinische und tierexperimentelle Studien sind notwendig, um den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären und den Nutzen einer Cr-, hArg- oder GAA-Supplementierung zur Prophylaxe von Statin-induzierten Myopathien zu evaluieren.

## 4 Summary

Statin induced muscle complaints are the most common side effect of statins and lead to the highest number of drug discontinuation. However, non-compliance increases cardiovascular risk, morbidity and mortality. Recent evidence suggests a link between AGAT activity and statin induced muscle complaints. AGAT catalyses the formation of L-homoarginine and GAA mainly in the kidney. GAA is subsequently used as a substrate for creatine formation, catalysed by GAMT. Our study aimed to establish a mouse model of simvastatin induced myopathy and to investigate the effect of AGAT and its products hArg and Cr on statin induced myopathy.

In a dose finding cohort, WT C57BL6/J mice were supplemented with simvastatin. Subsequently AGAT and GAMT KO mice were compared with WT mice. Eventually the effect of Cr and hArg supplementation was tested.

In our clinical cohort of cerebrovascular patients decreased GAA and hArg levels indicated reduced AGAT activity and/or expression. In WT mice, simvastatin exposure led to myopathic changes in muscle histology and function (EDL diameter:  $34,09 \pm 1,33 \mu\text{m}$  in CTRL vs  $25,46 \pm 1,26 \mu\text{m}$  in 900 mg/kg statin-group). In addition, AGAT expression as well as hArg and GAA levels were reduced. In AGAT overexpressing GAMT KO mice statin induced motor impairment was reduced, indicating a Cr independent effect. On the other hand functional muscle performance in AGAT mice was superior under Cr supplementation. hArg supplementation had no effect on statin induced myopathy in AGAT KO mice.

Our results suggest a complex mechanism between AGAT expression and/or activity and its products in statin induced myopathy. Therefore, further clinical pharmacological and animal studies are needed to investigate the underlying mechanisms and to evaluate whether Cr, hArg or GAA supplementation may be helpful as prophylaxis for statin induced myopathy.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abplanalp, J., Laczkó, E., Philp, N.J., Neidhardt, J., Zuercher, J., Braun, P., Schorderet, D.F., Munier, F.L., Verrey, F., Berger, W., Camargo, S.M.R. und Kloeckener-Gruissem, B. (2013). The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter. *Human Molecular Genetics* 22, 3218–3226. DOI: 10.1093/hmg/ddt175.
- Adriano, E., Gulino, M., Arkel, M., Salis, A., Damonte, G., Liessi, N., Millo, E., Garbati, P. und Balestrino, M. (2018). Di-acetyl creatine ethyl ester, a new creatine derivative for the possible treatment of creatine transporter deficiency. *Neuroscience Letters* 665, 217–223. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.12.020.
- Alesutan, I., Feger, M., Tuffaha, R., Castor, T., Musculus, K., Buehling, S.S., Heine, C.L., Kuro-o, M., Pieske, B., Schmidt, K., Tomaschitz, A., Maerz, W., Pilz, S., Meinitzer, A., Voelkl, J. und Läng, F. (2016). Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovascular Research* 110, 408–418. DOI: 10.1093/cvr/cvw062.
- Atzler, D., Mieth, M., Maas, R., Böger, R.H. und Schwedhelm, E. (2011). Stable isotope dilution assay for liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination of l-homoarginine in human plasma. *Journal Of Chromatography B* 879, 2294–2298. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.06.016.
- Atzler, D., Schwedhelm, E. und Choe, C. (2015). L-Homoarginine and cardiovascular disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition And Metabolic Care* 18, 83–88. DOI: 10.1097/mco.000000000000123.
- Atzler, D., Cracowski, J., Cordts, K., Böger, R.H., Humbert, M. und Schwedhelm, E. (2016). Homoarginine predicts mortality in treatment-naïve patients with pulmonary arterial hypertension. *International Journal Of Cardiology* 217, 12–15. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.04.161.
- Atzler, D., McAndrew, D.J., Cordts, K., Schneider, J., Zervou, S., Schwedhelm, E., Neubauer, S. und Lygate, C.A. (2017). Dietary Supplementation with Homoarginine Preserves Cardiac Function in a Murine Model of Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *Circulation* 135, 400–402. DOI: 10.1161/circulationaha.116.025673.
- Bai, X., Zhang, B., Wang, P., Wang, G.-L., Li, J., Wen, D., Long, X.-Z., Sun, H., Liu, Y., Huang, M. und Zhong, S. (2018). Effects of SLCO1B1 and GATM gene variants on rosuvastatin-induced myopathy are unrelated to high plasma exposure of rosuvastatin and its metabolites. *Acta Pharmacologica Sinica* 40, 492–499. DOI: 10.1038/s41401-018-0013-y.
- Balestrino, M. und Adriano, E. (2018). Statin-induced myopathy prevented by creatine administration. *Case Reports bcr-225395*. DOI: 10.1136/bcr-2018-225395.

- Baroncelli, L., Alessandri, M.G., Tola, J., Putignano, E., Migliore, M., Amendola, E., Gross, C., Leuzzi, V., Cioni, G. und Pizzorusso, T. (2014). A novel mouse model of creatine transporter deficiency. *F1000Research* 3, 228. DOI: 10.12688/f1000research.5369.1.
- Baroncelli, L., Molinaro, A., Cacciante, F., Alessandri, M.G., Napoli, D., Putignano, E., Tola, J., Leuzzi, V., Cioni, G. und Pizzorusso, T. (2016). A mouse model for creatine transporter deficiency reveals early onset cognitive impairment and neuropathology associated with brain aging. *Human Molecular Genetics* 25, 4186–4200. DOI: 10.1093/hmg/ddw252.
- Barsunova, K., Vendelin, M. und Birkedal, R. (2020). Marker enzyme activities in hindleg from creatine-deficient AGAT and GAMT KO mice – differences between models, muscles, and sexes. *Scientific Reports* 10. DOI: 10.1038/s41598-020-64740-8.
- Brosnan, J.T. und Brosnan, M.E. (2010). Creatine metabolism and the urea cycle. *Molecular Genetics And Metabolism* 100, S49–S52. DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.02.020.
- Büttner, P., Werner, S., Böttner, J., Oßmann, S., Schwedhelm, E. und Thiele, H. (2023). Systemic Effects of Homoarginine Supplementation on Arginine Metabolizing Enzymes in Rats with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *International Journal Of Molecular Sciences* 24, 14782. DOI: 10.3390/ijms241914782.
- Bytyçi, I., Penson, P.E., Mikhailidis, D.P., Wong, N.D., Hernández, A.V., Sahebkar, A., Thompson, P.D., Mazidi, M., Rysz, J., Pella, D., Reiner, Ž., Tóth, P.P. und Banach, M. (2022). Prevalence of statin intolerance: a meta-analysis. *European Heart Journal* 43, 3213–3223. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac015.
- Carr, D. F., Alfirevic, A., Johnson, R., Chinoy, H., van Staa, T., & Pirmohamed, M. (2014). GATM gene variants and statin myopathy risk. *Nature* 513, E1. DOI: 10.1038/nature13628.
- Choe, C., Atzler, D., Wild, P.S., Carter, A.M., Böger, R.H., Ojeda, F., Simova, O., Stockebrand, M., Lackner, K.J., Nabuurs, C.I.H.C., Marescau, B., Streichert, T., Müller, C., Lüneburg, N., De Deyn, P.P., Benndorf, R.A., Baldus, S., Gerloff, C., Blankenberg, S., Heerschap, A., Grant, P.J., Magnus, T., Zeller, T., Isbrandt, D. und Schwedhelm, E. (2013a). Homoarginine Levels Are Regulated by I -Arginine:Glycine Amidinotransferase and Affect Stroke Outcome. *Circulation* 128, 1451–1461. DOI: 10.1161/circulationaha.112.000580.
- Choe, C., Nabuurs, C.I.H.C., Stockebrand, M., Neu, A., Nunes, P.M., Morellini, F., Sauter, K., Schillemeit, S., Hermans-Borgmeyer, I., Marescau, B., Heerschap, A. und Isbrandt, D. (2013b). I-arginine:glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. *Human Molecular Genetics* 22, 110–123. DOI: 10.1093/hmg/dds407.
- Clark, A.J., Rosenberg, E.H., Almeida, L.S., Wood, T., Jakobs, C., Stevenson, R.E., Schwartz, C.E. und Salomons, G.S. (2006). X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males

- with mental retardation of unknown etiology. *Human Genetics* 119, 604–610. DOI: 10.1007/s00439-006-0162-9.
- Cordts, K., Atzler, D., Qaderi, V., Sydow, K., Böger, R.H., Choe, C. und Schwedhelm, E. (2015). Measurement of homoarginine in human and mouse plasma by LC–MS/MS and ELISA: a comparison and a biological application. *Amino Acids* 47, 2015–2022. DOI: 10.1007/s00726-015-2037-7.
- Cordts, K., Grzybowski, R., Lezius, S., Lüneburg, N., Atzler, D., Neu, A., Hornig, S., Böger, R.H., Gerloff, C., Magnus, T., Thomalla, G., Schwedhelm, E., Grant, P.J. und Choe, C. (2019). Guanidino compound ratios are associated with stroke etiology, internal carotid artery stenosis and CHA2DS2-VASc score in three cross-sectional studies. *Journal Of The Neurological Sciences* 397, 156–161. DOI: 10.1016/j.jns.2018.12.037.
- Da Silva, R.P., Clow, K.A., Brosnan, J.T. und Brosnan, M.E. (2014). Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas. *British Journal Of Nutrition* 111, 571–577. DOI: 10.1017/s0007114513003012.
- D’Antona, G., Tedesco, L., Ruocco, C., Corsetti, G., Ragni, M., Fossati, A., Saba, E., Fenaroli, F., Montinaro, M., Carruba, M.O., Valerio, A. und Nisoli, E. (2016). A Peculiar Formula of Essential Amino Acids Prevents Rosuvastatin Myopathy in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling* 25, 595–608. DOI: 10.1089/ars.2015.6582.
- deGrauw, T.J., Cecil, K.M., Byars, A.W., Salomons, G.S., Ball, W.S. und Jakobs, C. (2003). The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. In: Springer eBooks, S. 45–48.
- Faller, K.M.E., Atzler, D., McAndrew, D.J., Zervou, S., Whittington, H.J., Simon, J.N., Aksentijević, D., Hove, M.T., Choe, C., Isbrandt, D., Casadei, B., Schneider, J., Neubauer, S. und Lygate, C.A. (2018). Impaired cardiac contractile function in arginine:glycine amidinotransferase knockout mice devoid of creatine is rescued by homoarginine but not creatine. *Cardiovascular Research* 114, 417–430. DOI: 10.1093/cvr/cvx242.
- Fernandes-Pires, G. und Braissant, O. (2022). Current and potential new treatment strategies for creatine deficiency syndromes. *Molecular Genetics And Metabolism* 135, 15–26. DOI: 10.1016/j.ymgme.2021.12.005.
- Floyd, J.S., Bis, J.C., Brody, J.A., Heckbert, S.R., Rice, K. und Psaty, B.M. (2014). GATM locus does not replicate in rhabdomyolysis study. *Nature* 513, E1–E3. DOI: 10.1038/nature13629.
- Freitag, S., Schachner, M. und Morellini, F. (2003). Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behavioural Brain Research* 145, 189–207. DOI: 10.1016/s0166-4328(03)00109-8.
- Frenay, A.S., Kayaçelebi, A.A., Beckmann, B., Soedamah-Muhtu, S.S., De Borst, M.H., Van den Berg, E., Van Goor, H., Bakker, S.J.L. und Tsikas, D. (2015). High urinary homoarginine excretion is

- associated with low rates of all-cause mortality and graft failure in renal transplant recipients. *Amino Acids* 47, 1827–1836. DOI: 10.1007/s00726-015-2038-6.
- Hanff, E., Said, M.Y., Kayaçelebi, A.A., Post, A., Minović, I., Van den Berg, E., De Borst, M.H., Van Goor, H., Bakker, S.J.L. und Tsikas, D. (2019). High plasma guanidinoacetate-to-homoarginine ratio is associated with high all-cause and cardiovascular mortality rate in adult renal transplant recipients. *Amino Acids* 51, 1485–1499. DOI: 10.1007/s00726-019-02783-6.
- Hannemann, J., Cordts, K., Seniuk, A., Choe, C., Schmidt-Hutten, L., Escobar, J.D., Weinberger, F., Böger, R.H. und Schwedhelm, E. (2021). Arginine:Glycine Amidinotransferase Is Essential for Creatine Supply in Mice During Chronic Hypoxia. *Frontiers in Physiology* 12. DOI: 10.3389/fphys.2021.703069.
- Hörster, I., Weigt-Usinger, K., Carmann, C., Chobanyan-Jürgens, K., Köhler, C., Schara, U., Kayaçelebi, A.A., Beckmann, B., Tsikas, D. und Lücke, T. (2015). The l-arginine/NO pathway and homoarginine are altered in Duchenne muscular dystrophy and improved by glucocorticoids. *Amino Acids* 47, 1853–1863. DOI: 10.1007/s00726-015-2018-x.
- Hou, Y., Hu, S., Jia, S., Nawaratna, G., Che, D., Wang, F., Bazer, F.W. und Wu, G. (2016). Whole-body synthesis of l-homoarginine in pigs and rats supplemented with l-arginine. *Amino Acids* 48, 993–1001. DOI: 10.1007/s00726-015-2145-4.
- Ioannidis, J.P.A. (2014). More Than a Billion People Taking Statins? *JAMA* 311, 463. DOI: 10.1001/jama.2013.284657.
- Jackevicius, C.A. (2002). Adherence With Statin Therapy in Elderly Patients With and Without Acute Coronary Syndromes. *JAMA* 288, 462. DOI: 10.1001/jama.288.4.462.
- Kale, V.P., Wallery, J., Novak, J.P., Gibbs, S., Bourdi, M., Minh-Ha, T., McKew, J.C. und Terse, P. (2020). Evaluation of chronic toxicity of cyclocreatine, a creatine analog, in Sprague Dawley rat after oral gavage administration for up to 26 weeks. *Regulatory Toxicology And Pharmacology* 117, 104750. DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104750.
- Kan, H.E., Renema, W.K.J., Isbrandt, D. und Heerschap, A. (2004). Phosphorylated guanidinoacetate partly compensates for the lack of phosphocreatine in skeletal muscle of mice lacking guanidinoacetate methyltransferase. *The Journal Of Physiology* 560, 219–229. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.067926.
- Kayaçelebi, A.A., Minović, I., Hanff, E., Frenay, A.S., De Borst, M.H., Feelisch, M., Van Goor, H., Bakker, S.J.L. und Tsikas, D. (2017). Low plasma homoarginine concentration is associated with high rates of all-cause mortality in renal transplant recipients. *Amino Acids* 49, 1193–1202. DOI: 10.1007/s00726-017-2420-7.
- Kiebertz, K., Tilley, B.C., Elm, J., Babcock, D., Hauser, R.A., Ross, G.W., Augustine, A.H., Augustine, E.U., Aminoff, M.J., Bódis-Wollner, I., Boyd, J.T., Cambi, F., Chou, K.L., Christine, C.W., Cines, M.,

- Dahodwala, N., Derwent, L., Dewey, R.B., Hawthorne, K., Houghton, D., Kamp, C., Leehey, M.A., Lew, M.F., Liang, G., Luo, S., u. a. (2015). Effect of Creatine Monohydrate on Clinical Progression in Patients With Parkinson Disease. *JAMA* 313, 584. DOI: 10.1001/jama.2015.120.
- Kurosawa, Y., deGrauw, T.J., Lindquist, D.M., Blanco, V.M., Pyne-Geithman, G.J., Daikoku, T., Chambers, J.B., Benoit, S.C. und Clark, J.F. (2012). Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *Journal Of Clinical Investigation* 122, 2837–2846. DOI: 10.1172/jci59373.
- La Du, B. (1971). Plasma esterase activity an the metabolism of drugs with ester groups\*. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 179, 684–694. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1971.tb46944.x.
- Libby, P. und Aikawa, M. (2003). Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American Journal Of Cardiology* 91, 4–8. DOI: 10.1016/s0002-9149(02)03267-8.
- Liu, M., Fan, F., Zhang, Y. und Li, J. (2021). The association of GATM polymorphism with statin-induced myopathy: a systematic review and meta-analysis. *European Journal Of Clinical Pharmacology* 77, 349–357. DOI: 10.1007/s00228-020-03019-3.
- Loike, J.D., Zalutsky, D.L., Kaback, E., Miranda, A.F. und Silverstein, S.C. (1988). Extracellular creatine regulates creatine transport in rat and human muscle cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 85, 807–811. DOI: 10.1073/pnas.85.3.807.
- Ludwig, W.D., Mühlbauer, B., Seifert, R. (2024). *Arzneiverordnungs-Report 2023*. (Berlin: Springer).
- Lunardi, G., Alessandro, P., Perasso, L., Pohvozcheva, A.V., Scarrone, S., Adriano, E., Florio, T., Gandolfo, C., Cupello, A., Буров, С.В. und Balestrino, M. (2006). The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience* 142, 991–997. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.058.
- Lygate, C.A., Lake, H.A., McAndrew, D.J., Neubauer, S. und Zervou, S. (2022). Influence of homoarginine on creatine accumulation and biosynthesis in the mouse. *Frontiers in Nutrition* 9. DOI: 10.3389/fnut.2022.969702.
- Mallinson, J., Marimuthu, K., Murton, A.J., Selby, A., Smith, K., Constantin-Teodosiu, D., Rennie, M.J. und Greenhaff, P.L. (2015). Statin myalgia is not associated with reduced muscle strength, mass or protein turnover in older male volunteers, but is allied with a slowing of time to peak power output, insulin resistance and differential muscle mRNA expression. *The Journal Of Physiology* 593, 1239–1257. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.285577.
- Mangravite, L.M., Engelhardt, B.E., Medina, M.W., Smith, J.D., Brown, C.D., Chasman, D.I., Mecham, B.H., Howie, B., Shim, H., Naidoo, D., Feng, Q., Rieder, M.J., Chen, Y. der I., Rotter, J.I., Ridker, P.M., Hopewell, J.C., Parish, S., Armitage, J., Collins, R., Wilke, R.A., Nickerson, D.A., Stephens,

- M. und Krauss, R.M. (2013). A statin-dependent QTL for GATM expression is associated with statin-induced myopathy. *Nature* 502, 377–380. DOI: 10.1038/nature12508.
- Mangravite, L.M., Engelhardt, B.E., Stephens, M. und Krauss, R.M. (2014). Mangravite et al. reply. *Nature* 513, E3. DOI: 10.1038/nature13630.
- März, W., Meinitzer, A., Drechsler, C., Pilz, S., Krane, V., Kleber, M.E., Fischer, J.E., Winkelmann, B.R., Böhm, B., Ritz, E. und Wanner, C. (2010). Homoarginine, Cardiovascular Risk, and Mortality. *Circulation* 122, 967–975. DOI: 10.1161/circulationaha.109.908988.
- May, M., Kayaçelebi, A.A., Bátkai, S., Jordan, J., Tsikas, D. und Engeli, S. (2015). Plasma and tissue homoarginine concentrations in healthy and obese humans. *Amino Acids* 47, 1847–1852. DOI: 10.1007/s00726-015-1922-4.
- McAndrew, D.J., Lake, H.A., Zervou, S., Schwedhelm, E., Schneider, J., Neubauer, S. und Lygate, C.A. (2023). Homoarginine and creatine deficiency do not exacerbate murine ischaemic heart failure. *Esc Heart Failure* 10, 189–199. DOI: 10.1002/ehf2.14183.
- Mokhaneli, M.C., Roux, S.B.-L., Fourie, C.M.T., Böger, R.H., Schwedhelm, E. und Mels, C.M.C. (2022). Homoarginine and blood pressure: a 10-year prospective relationship in normotensives. *Journal Of Human Hypertension* 36, 135–143. DOI: 10.1038/s41371-020-00449-5.
- Morellini, F. (2013). Spatial memory tasks in rodents: what do they model? *Cell And Tissue Research* 354, 273–286. DOI: 10.1007/s00441-013-1668-9.
- Nabuurs, C.I.H.C., Choe, C., Veltien, A., Kan, H.E., Van Loon, L.J.C., Rodenburg, R.J., Matschke, J., Wieringa, B., Kemp, G.J., Isbrandt, D. und Heerschap, A. (2013). Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure creatine deficiency are reversible by creatine intake. *The Journal Of Physiology* 591, 571–592. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.241760.
- Newman, C.B., Preiss, D., Tobert, J.A., Jacobson, T.A., Page, R.L., Goldstein, L.B., Chin, C., Tannock, L.R., Miller, M., Raghuvier, G., Duell, P.B., Brinton, E.A., Pollak, A.W., Braun, L.T., Welty, F.K. und Biology, V. (2019). Statin Safety and Associated Adverse Events: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology* 39. DOI: 10.1161/atv.0000000000000073.
- Patel, J., Superko, H.R., Martin, S.S., Blumenthal, R.S. und Christopher-Stine, L. (2015). Genetic and immunologic susceptibility to statin-related myopathy. *Atherosclerosis* 240, 260–271. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.025.
- Pilz, S., Meinitzer, A., Tomaschitz, A., Drechsler, C., Ritz, E., Krane, V., Wanner, C., Boehm, B.O. und März, W. (2011). Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart* 97, 1222–1227. DOI: 10.1136/hrt.2010.220731.
- Pilz, S., Edelmann, F., Meinitzer, A., Gelbrich, G., Döner, U., Düngen, H., Tomaschitz, A., Kienreich, K., Gaksch, M., Duvinage, A., Stahrenberg, R., Kunde, J., Schmidt, A., März, W., Wachter, R. und

- Pieske, B. (2014). Associations of Methylarginines and Homoarginine With Diastolic Dysfunction and Cardiovascular Risk Factors in Patients With Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *Journal Of Cardiac Failure* 20, 923–930. DOI: 10.1016/j.cardfail.2014.09.004.
- Pyne-Geithman, G.J., deGrauw, T.J., Cecil, K.M., Chuck, G., Lyons, M.A., Ishida, Y. und Clark, J.F. (2004). Presence of normal creatine in the muscle of a patient with a mutation in the creatine transporter: A case study. *Molecular And Cellular Biochemistry* 262, 35–39. DOI: 10.1023/b:mcbi.0000038213.15646.4a.
- Rosenberg, E.H., Almeida, L.S., Kleefstra, T., deGrauw, R.S., Yntema, H.G., Bahi, N., Moraine, C., Ropers, H., Fryns, J., deGrauw, T.J., Jakobs, C. und Salomons, G.S. (2004). High Prevalence of SLC6A8 Deficiency in X-Linked Mental Retardation. *The American Journal Of Human Genetics* 75, 97–105. DOI: 10.1086/422102.
- Russell, A.P., Ghobrial, L., Wright, C., Lamon, S., Brown, E.L., Kon, M., Skelton, M.R. und Snow, R.J. (2014). Creatine transporter (SLC6A8) knockout mice display an increased capacity for in vitro creatine biosynthesis in skeletal muscle. *Frontiers in Physiology* 5. DOI: 10.3389/fphys.2014.00314.
- Sai, K., Kajinami, K., Akao, H., Iwadare, M., Sato-Ishida, R., Kawai, Y., Takeda, K., Tanimoto, T., Yamano, T., Akasaka, T., Ishida, T., Hirata, K., Saku, K., Yagi, S., Soeki, T., Sata, M., Ueno, M., Miyazaki, S., Shiraki, A., Oyama, J., Node, K., Sugamura, K., Ogawa, H., Kurose, K., Maekawa, K., u. a. (2016). A possible role for HLA-DRB1\*04:06 in statin-related myopathy in Japanese patients. *Drug Metabolism And Pharmacokinetics* 31, 467–470. DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.09.002.
- Sathasivam, S. und Lecky, B. (2008). Statin induced myopathy. *The BMJ* 337, a2286. DOI: 10.1136/bmj.a2286.
- Schirris, T.J.J., Renkema, G.H., Ritschel, T., Voermans, N.C., Bilos, A., Van Engelen, B.G.M., Brandt, U., Koopman, W.J.H., Beyrath, J., Rodenburg, R.J., Willems, P.H.G.M., Smeitink, J.A.M. und Rüssel, F.G.M. (2015). Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. *Cell Metabolism* 22, 399–407. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.08.002.
- Schmidt, A., Marescau, B., Boehm, E. A., Renema, W. K., Peco, R., Das, A., Steinfeld, R., Chan, S., Wallis, J., Davidoff, M., Ullrich, K., Waldschütz, R., Heerschap, A., De Deyn, P. P., Neubauer, S. und Isbrandt, D. (2004). 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* 13, 905–921. DOI: 10.1093/hmg/ddh112.
- Schönhoff, M., Weineck, G., Hoppe, J., Hornig, S., Cordts, K., Atzler, D., Gerloff, C., Böger, R.H., Neu, A., Schwedhelm, E. und Choe, C. (2018). Cognitive performance of 20 healthy humans supplemented with L-homoarginine for 4 weeks. *Journal Of Clinical Neuroscience* 50, 237–241. DOI: 10.1016/j.jocn.2018.01.035.

- Şerban, C., Colantonio, L.D., Manthripragada, A.D., Monda, K.L., Bittner, V., Banach, M., Chen, L., Huang, L., Dent, R., Kent, S.T., Muntner, P. und Rosenson, R.S. (2017). Statin Intolerance and Risk of Coronary Heart Events and All-Cause Mortality Following Myocardial Infarction. *Journal Of The American College Of Cardiology* 69, 1386–1395. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.12.036.
- Shalev, V., Chodick, G., Silber, H., Kokia, E., Jan, J. und Heymann, A. (2009). Continuation of Statin Treatment and All-Cause Mortality. *Archives Of Internal Medicine* 169, 260. DOI: 10.1001/archinternmed.2008.552.
- Shen, M., Yang, G., Chen, Z., Yang, K., Dong, H., Yin, C., Cheng, Y., Zhang, C., Gu, F., Yang, Y. und Tian, Y. (2022). Identification of novel variations in SLC6A8 and GAMT genes causing cerebral creatine deficiency syndrome. *Clinica Chimica Acta* 532, 29–36. DOI: 10.1016/j.cca.2022.05.006.
- Shewmon, D.A. und Craig, J.M. (2010). Creatine supplementation prevents Statin-Induced muscle toxicity. *Annals Of Internal Medicine* 153, 690. DOI: 10.7326/0003-4819-153-10-201011160-00024.
- Skelton, M.R., Schaefer, T.L., Graham, D.L., deGrauw, T.J., Clark, J.F., Williams, M.T. und Vorhees, C.V. (2011). Creatine Transporter (CrT; Slc6a8) Knockout Mice as a Model of Human CrT Deficiency. *PLOS ONE* 6, e16187. DOI: 10.1371/journal.pone.0016187.
- Stockebrand, M., Sauter, K., Neu, A., Isbrandt, D. und Choe, C. (2013). Differential regulation of AMPK activation in leptin-and creatine-deficient mice. *The FASEB Journal* 27, 4147–4156. DOI: 10.1096/fj.12-225136.
- Stockebrand, M., Hornig, S., Neu, A., Atzler, D., Cordts, K., Böger, R.H., Isbrandt, D., Schwedhelm, E. und Choe, C. (2015). Homoarginine supplementation improves blood glucose in diet-induced obese mice. *Amino Acids* 47, 1921–1929. DOI: 10.1007/s00726-015-2022-1.
- Stockebrand, M., Nejad, A.S., Neu, A., Kharbanda, K.K., Sauter, K., Schillemeit, S., Isbrandt, D. und Choe, C.U. (2016). Transcriptomic and metabolic analyses reveal salvage pathways in creatine-deficient AGAT<sup>-/-</sup> mice. *Amino Acids* 48, 2025–2039. DOI: 10.1007/s00726-016-2202-7.
- Stockebrand, M., Sasani, A., Das, D., Hornig, S., Hermans-Borgmeyer, I., Lake, H.A., Isbrandt, D., Lygate, C.A., Heerschap, A., Neu, A. und Choe, C. (2018). A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism. *Frontiers in Physiology* 9. DOI: 10.3389/fphys.2018.00773.
- Stöckler, S., Hanefeld, F. und Frahm, J. (1996). Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *The Lancet* 348, 789–790. DOI: 10.1016/s0140-6736(96)04116-5.
- Stöckler, S., Schütz, P.W. und Salomons, G.S. (2007). Cerebral Creatine Deficiency Syndromes: Clinical Aspects, Treatment and Pathophysiology. In: Springer eBooks, S. 149–166.

- Stroes, E.S.G., Thompson, P.D., Corsini, A., Vladutiu, G.D., Raal, F.J., Ray, K.K., Roden, M., Stein, E.A., Tokgözoğlu, L., Nordestgaard, B.G., Bruckert, É., De Backer, G., Krauss, R.M., Laufs, U., Santos, R.D., Hegele, R.A., Hovingh, G.K., Leiter, L.A., Mach, F., März, W., Newman, C.B., Wiklund, O., Jacobson, T.A., Chapman, M.J. und Ginsberg, H.N. (2015). Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy—European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *European Heart Journal* 36, 1012–1022. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv043.
- Ullio-Gamboa, G., Udobi, K.C., Dézard, S., Perna, M.K., Miles, K.N., Costa, N., Taran, F., Pruvost, A., Benoit, J., Skelton, M.R., De Lonlay, P. und Mabondzo, A. (2019). Dodecyl creatine ester-loaded nanoemulsion as a promising therapy for creatine transporter deficiency. *Nanomedicine* 14, 1579–1593. DOI: 10.2217/nnm-2019-0059.
- Van De Kamp, J.M., Mancini, G.M.S. und Salomons, G.S. (2014). X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *Journal Of Inherited Metabolic Disease* 37, 715–733. DOI: 10.1007/s10545-014-9713-8.
- Van der Zwan, L.P., Davids, M., Scheffer, P., Dekker, J., Stehouwer, C.D.A. und Teerlink, T. (2013). L-Homoarginine and L-arginine are antagonistically related to blood pressure in an elderly population. *Journal Of Hypertension* 31, 1114–1123. DOI: 10.1097/hjh.0b013e32836037fb.
- Wang, J., Luzum, J.A., Phelps, M.A. und Kitzmiller, J.P. (2015). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of simvastatin, lovastatin, atorvastatin, and their major metabolites in human plasma. *Journal Of Chromatography B* 983–984, 18–25. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.029.
- Wyss, M. und Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews* 80, 1107–1213. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.3.1107.
- Yusuf, S., Lonn, E., Пайс, П., Bosch, J., López-Jaramillo, P., Zhu, J., Xavier, D., Avezum, Á., Leiter, L.A., Piegas, L.S., Parkhomenko, A., Keltai, M., Keltai, K., Sliwa, K., Чазова, И.Е., Peters, R.J.G., Held, C., Yusoff, K., Lewis, B.S., Jánský, P., Khunti, K., Toff, W.D., Reid, C.M., Varigos, J., Accini, J., u. a. (2016). Blood-Pressure and Cholesterol Lowering in Persons without Cardiovascular Disease. *The New England Journal Of Medicine* 374, 2032–2043. DOI: 10.1056/nejmoa1600177.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AGAT	Arginin-Glycin-Amidino-transferase
AGAT <sup>-/-</sup>	AGAT Knockout
CK	Kreatinkinase
Cr	Kreatin
CT1 <sup>-/y</sup>	CT1 Knockout
EDL	Musculus extensor digitorum longus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure
et al.	et alii
GAA	Guanidinoacetat
GAMT	Guanidinoacetat Methyltransferase
GAMT <sup>-/-</sup>	GAMT Knockout
hArg	L-Homoarginin
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low-density Lipoprotein
Lox-P	Locus of X-over P1
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PCr	Phosphokreatin
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLCO1B1	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
WT	C57BL6/J Wildtyp

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b>	Schematische Darstellung des tierexperimentellen Studiendesigns	11
<b>Abbildung 2.</b>	hArg und GAA Konzentration in cerebrovaskulären Patienten mit und ohne Statin Behandlung	13
<b>Abbildung 3.</b>	LDH und CK Plasmakonzentrationen in WT Mäusen mit 0 mg/kg, 300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter	14
<b>Abbildung 4.</b>	Myozytendurchmesser des EDL Muskel in WT Mäusen mit 0 mg/kg, 300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter	15
<b>Abbildung 5.</b>	Relative AGAT-Expression in der Niere von WT Mäusen mit 0 mg/kg, 300 mg/kg oder 900 mg/kg Simvastatin im Futter	16
<b>Abbildung 6.</b>	Simvastatin Konzentration in der Leber von WT-CTRL, AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit 900 mg/kg Simvastatin im Futter  Gewicht und prozentuales Überleben von WT-CTRL, AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit 900 mg/kg Simvastatin im Futter	17
<b>Abbildung 7.</b>	Griffstärke der Vorderpfoten in AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen vor und nach Simvastatin-Supplementation  Dauer bis zum Herabfallen (Rotarod) in AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen vor und nach Simvastatin-Supplementation. Myozytendurchmesser in AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen nach Simvastatin-Supplementation und in Kontroll Mäusen ohne Statingabe	19
<b>Abbildung 8.</b>	AGAT Expression in der Niere von AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen ohne Simvastatin-Supplementation  Plasmakonzentrationen von GAA und hArg in AGAT <sup>-/-</sup> , GAMT <sup>-/-</sup> und WT Mäusen ohne Simvastatin-Supplementation	21
<b>Abbildung 9.</b>	Griffstärke der Vorderpfoten in AGAT <sup>-/-</sup> und AGAT <sup>-/-</sup> -Cr Mäusen vor und nach Simvastatin-Supplementation  Dauer bis zum Herabfallen (Rotarod) in AGAT <sup>-/-</sup> und AGAT <sup>-/-</sup> -Cr Mäusen nach Simvastatin-Supplementation  Relative Myozytendurchmesser in AGAT <sup>-/-</sup> und AGAT <sup>-/-</sup> -Cr Mäusen nach Simvastatin- Supplementation	23
<b>Abbildung 10.</b>	Plasma hArg Spiegel in AGAT <sup>-/-</sup> und AGAT <sup>-/-</sup> -hArg Mäusen vor Simvastatin-Supplementation  Relative Griffstärke der Vorderpfoten und relative Dauer bis zum Herabfallen (Rotarod) in AGAT <sup>-/-</sup> und AGAT <sup>-/-</sup> -hArg Mäusen nach Simvastatin-Supplementation  Relative Myozytendurchmesser (d) in AGAT <sup>-/-</sup> und AGAT <sup>-/-</sup> -hArg Mäusen nach Simvastatin-Supplementation	24

## **8 Erklärung des Eigenanteils**

Ich habe meine Doktorarbeit in der Klinik für Neurologie und dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf unter der Betreuung von Prof. Dr. Chi-un Choe und Prof. Dr. Edzard Schwedhelm durchgeführt. Die Vielzahl der Experimente führte ich in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neuropädiatrie im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg unter der Leitung von PD Dr. Axel Neu durch.

Die Idee zur Studie und das Studiendesign wurden von meinen Betreuern entwickelt. An der Anpassung der Studienteile im Verlauf der Arbeit habe ich mitgewirkt.

Während der Studienphase führte ich nach Anleitung von Prof. Dr. Chi-un Choe und Dr. Fabio Morellini den Rotarod und Grip strength selbständig durch. Die Blutentnahmen erfolgten durch die Tierpflegerinnen. Die Messung der LDH und CK erfolgte in der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Die Konzentrationen des hArg, GAA und Simvastatin wurden im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie durch Dr. Kathrin Cordts gemessen. Die Organentnahmen führte ich gemeinsam mit Prof. Dr. Chi-un Choe und Dr. Sönke Hornig durch. Die Muskelschnitte und histologischen Färbungen führte ich nach Anleitung durch Stefan Schillemeit selbständig durch. Auch die Lyse der Organe, die Proteinbestimmungen und die Western Blots führte ich nach Anleitung durch Dr. Malte Stockebrand selbständig durch. Die Datenerhebung und die Auswertung für den klinischen Studienteil erfolgen durch Ricarda Grzybowski. Die Erstellung der Abbildungen und die Durchführung der statistischen Analysen erfolgte mit Unterstützung von Prof. Dr. Chi-un Choe.

Beim Verfassen des Manuskriptes lag mein Schwerpunkt auf dem Methodenteil. Die Einleitung und den Hauptteil verfasste hauptsächlich Prof. Dr. Chi-un Choe, hier habe ich an der Korrektur mitgewirkt.

Diese Zusammenfassung der Publikation und die dazugehörigen Abbildungen erstellte ich selbständig.

## 9 Eigene Publikationen

### Erstautorenschaften

#### **Muscle phenotype of AGAT- and GAMT-deficient mice after simvastatin exposure**

Ali Sasani, Sönke Hornig, Ricarda Grybowski, Kathin Cordts, Erik Hanff, Dimitris Tsikas, Rainer Böger, Christian Gerloff, Dirk Isbrandt, Axel Neu, Edzard Schwedhelm, Chi-un Choe

Amino Acids, 2019 Dec 18; 52:73.

#### **A Mouse Model of Creatine Transporter Deficiency Reveals Impaired Motor Function and Muscle Energy Metabolism**

Malte Stockebrand, Ali Sasani, Devashish Das, Sönke Hornig, Irm Hermans-Borgmeyer, Hannah A Lake, Dirk Isbrandt, Craig A Lygate, Arend Heerschap, Axel Neu, Chi-un Choe

Front. Physiol. 2018 Jun 22;9:773.

### Mitautorenschaften

#### **Transcriptomic and metabolic analyses reveal salvage pathways in creatine-deficient AGAT(-/-) mice**

Malte Stockebrand, Ali Sasani Nejad, Axel Neu, Kusum K. Kharbanda, Kathrin Sauter, Stefan Schillemeit, Dirk Isbrandt, Chi-un Choe

Amino Acids 2016 Aug 3;48(8):2025-39. Epub 2016 Mar 3.

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift

## 11 Danksagung

Ich möchte nachstehenden Personen, die mir die Erstellung der vorliegenden Dissertation ermöglicht haben, danken. Zunächst möchte ich mich für die Möglichkeit meine Arbeit in der Klinik für Neurologie und am Institut für klinische Pharmakologie sowie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg durchzuführen bei Prof. Dr. Christian Gerloff, Prof. Dr. Rainer H. Böger und PD Dr. Axel Neu bedanken. Die konstruktive und herzliche Arbeitsatmosphäre hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Im Besonderen möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Chi-un Choe und meinem Doktorvater Prof. Dr. Edzard Schwedhelm danken ohne deren Anstoß zu dieser Arbeit, Unterstützung, regelmäßigen Input, den regen Diskussionen und der Anleitung zur Durchführung der Experimente diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Kathrin Sauter und Stefan Schillemeit für die technische Unterstützung, zudem möchte ich Dr. Sönke Hornig, Dr. Fabio Morellini und Dr. Malte Stockebrand für die Unterstützung, die regen Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ich möchte Ricarda Grzybowski für die Erhebung der klinischen Studiendaten danken. Dr. Kathrin Cordts möchte ich besonders für die Unterstützung und die durchgeführten Messungen danken, ebenso wie Prof. Dr. Dimitrios Tsikas und seiner Arbeitsgruppe für die Gaschromatographie Massenspektroskopie.

Zuletzt möchte ich meiner Ehefrau, meinen Eltern, meinem Bruder und meiner gesamten Familie für die moralische Unterstützung und das Verständnis während dieser Zeit danken.