

Aus dem Institut für Neurale Signalverarbeitung  
des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg  
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. Olaf Pongs

EXPRESSION DER HUMANEN UND MURINEN  
GUANIDINOACETATMETHYLTRANSFERASE

Dissertation

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

Robert Steinfeld

aus Mainz

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 28. Februar 2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. Olaf Pongs

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Frau PD Dr. Irm Herrmans-Borgmeyer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. Andreas Guse

## VORWORT

Sicherlich ist es verwunderlich, dass ich zehn Jahre nach meiner ersten Doktorarbeit über das Thema “Modulation of the interaction between fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 by cell surface heparan sulfate proteoglycans”, die ich an der Universität Leuven in Belgien vollbracht hatte, jetzt wieder eine weitere Dissertation vorlege. Steckt dahinter eine Sammelleidenschaft von Titeln oder eine besondere Strategie, sich von anderen Promovierten abzuheben? Die folgenden Zeilen dienen dazu die Hintergründe und Motive für diesen zweiten Kraftakt zu beleuchten und zu verdeutlichen. Alles begann mit meiner Rückkehr nach Deutschland am 1. Januar 1997. Im Vorfeld hatte ich schon eine Anerkennung und Umwandlung meiner belgischen Doktorarbeit zu einem Deutschen „Dr. med.“ beantragt. Nach einer ersten Ablehnung habe ich schließlich am 14. Januar 1997 Widerspruch eingelegt und insbesondere damit argumentiert, dass ein ausländischer Hochschulgrad der außerhalb der Europäischen Union, z.B. in den USA, erworben worden wäre, sehr wohl in einen Deutschen „Dr. med.“ umgewandelt werden könne. Während ich regelmäßig nachhakte und nachfragte vergingen so die Jahre und ich hatte mich schon daran gewöhnt, keinen ordentlichen Titel zu tragen. Endlich kam am 18. Juni 2002 die Antwort:

„Sehr geehrter Herr Steinfeld,

die Behörde für Wissenschaft und Forschung kommt zurück auf Ihren o.g. Widerspruch [vom 14.1.1997] und teilt Ihnen mit, dass der von Ihnen an der Katholieke Universiteit Leuven, Belgien, erworbene Hochschulgrad „Doctor in de Medische Wetenschappen“ nicht in einen deutschen Grad umgewandelt werden kann. ...

... Gemäß Nr. I Abs. 1 der Allgemeingenehmigung können die in der Anlage erfassten ausländischen Hochschulgrade der dort bezeichneten Hochschulen in der jeweils genannten Originalform (verliehene Form) geführt werden.

Nach Nr. III ist die Genehmigung im Einzelfall in anderer ausländischer oder deutscher Form bei allgemein erteilten Genehmigungen ausgeschlossen, und zwar unabhängig von der Frage, ob materielle Gleichwertigkeit mit dem entsprechenden deutschen Hochschulabschluss besteht oder nicht. ....“

Soll heißen, demzufolge müsste auf meinem Türschild und am Ende meiner Arztbriefe „Doctor in de Medische Wetenschappen“ stehen. Da war ich ziemlich verzweifelt! Ein guter Freund bot mir Rechtsbeistand an, ein anderer guter Freund empfahl mir in der Schweiz einen entsprechenden Titel zu kaufen und ein dritter Freund schenkte mir den Roman „Der Prozess“ von Franz Kafka. Nach einiger Zeit wurde mir klar, dass mir durch die Ablehnung der Führungsgenehmigung meines belgischen Grades in der deutschen (umgewandelten) Form „Dr. med.“ nahe gelegt wurde, einen zweiten Original „Dr. med.“-Titel zu erarbeiten. Eine großartige Idee, deren Ausführung mit den Realitäten des ärztlichen Alltages und den privaten Verpflichtungen häufig kollidiert hat. Nach dem Motto „Gut Ding braucht Weil“ habe ich im Verlaufe einiger Jahre an dieser Dissertation immer mal wieder arbeiten können, zwischendurch einige andere wissenschaftliche Projekte durchgeführt und schließlich doch ein homogenes Werk vollbracht. Ende gut alles gut!

## INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Kreatinstoffwechsel	1
1.2 Kreatinbiosynthese	3
1.3 Zerebrale Kreatin-Defizienz (auch „primary creatine deficiency syndromes“)	4
1.4 GAMT-Defizienz beim Menschen	5
2 Ziel der Arbeit	9
3 Material und Methoden	10
3.1 Standardprotokolle	10
3.2 Medien, Puffer und Lösungen	10
3.3 GAMT-cDNA, Primer und PCR-Reaktionen	12
3.4 Sequenzierung	13
3.5 Klonierung der humanen und murinen GAMT-cDNAs	13
3.6 Messung der enzymatischen Aktivität der rekombinant exprimierten GAMT	14
3.7 Affinitätsreinigung von polyklonalem anti-GAMT-Antikörper	15
4 Durchführung und Ergebnisse	17
4.1 Modifikation und Klonierung der humanen und murinen GAMT-cDNA	17
4.2 Expression der humanen und murinen GAMT in E.coli	18
4.3 Messung der enzymatischen Aktivität rekombinanter hGAMT	19
4.4 Expression der hGAMT mRNA in unterschiedlichen Geweben	26
4.5 Expression des hGAMT-Proteins in unterschiedlichen Geweben	28
4.6 Expression der mGAMT mRNA in Mausgewebe	29
4.7 Expression des mGAMT-Proteins in unterschiedlichen Geweben	29
5 Diskussion	31
6 Zusammenfassung	35
7 Literaturverzeichnis	36

## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
Abbildung 1 Kreatinsynthese und Kreatinstoffwechsel	2
Abbildung 2 Spezifität des anti-mGAMT-Antikörper im Western Blot	16
Abbildung 3 Klonierung der mGAMT- und hGAMT-cDNA	17
Abbildung 4 Expression der hGAMT in <i>E.coli</i>	18
Abbildung 5 Aufreinigung der mGAMT und hGAMT	18
Abbildung 6 Schematische Darstellung der gekoppelten Reaktion zur Messung der GAMT-Aktivität	20
Abbildung 7 Kurvenanpassung der luminometrischen Daten zur Messung der GAMT-Aktivität	24
Abbildung 8 Expression der hGAMT mRNA	27
Abbildung 9 Expression des hGAMT-Proteins	28
Abbildung 10 Expression der mGAMT mRNA	29
Abbildung 11 Expression des mGAMT-Proteins	29
Tabelle 1 Klinische und biochemische Kennzeichen der Kreatin-Defizienz-Erkrankungen	5
Tabelle 2 Testvariante der GAMT-Aktivitätsmessung	25
Tabelle 3 Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten $v$	26

## DANKSAGUNGEN

Mein herzlichster Dank gilt Dirk Isbrandt. Er ist nicht nur geistiger Mentor dieser Arbeit sondern hat mich bei zahlreichen meiner Projekte wissenschaftlich wie technologisch unterstützt. Besonders wichtig waren hierbei die unzähligen Gespräche, aus denen ich neue motivierende Energie schöpfen konnte. Meinem Doktorvater Professor Pongs möchte ich für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung wissenschaftlich arbeiten zu können. Weiterhin möchte ich noch meiner Lebensgefährtin Katharina danken, dass sie mir ohne Groll die Zeit zum Schreiben gegeben hat.

## WIDMUNG

FÜR ELSE

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Abkürzung

$A_{600}$	Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm
AGAT	Arginin:Glycin Amidinotransferase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosinribonukleosidtriphosphat
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Kreatinkinase
CRT1 (= SLC6A8)	Kreatin-Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAMT	S-Adenosyl-L-Methionin:Guanidinoacetat N-Methyltransferase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside
NTA	Nitrilotriacetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 1 EINLEITUNG

Die Energie-Versorgung des menschlichen Organismus erfolgt über den Abbau von Glukose im Zytosol (Glykolyse) und den Abbau von Acetyl-CoA in den Mitochondrien (Zitratzyklus und oxidative Phosphorylierung). Aus beiden Abbauvorgängen resultiert Adenosinribonnukleosid-5'-triphosphat (ATP), die Substanz, die die wesentlichste Energiequelle für biologische Prozesse darstellt. ATP gehört zu den energiereichen Phosphaten, d.h. zu Substanzen die unter Abspaltung einer Phosphatgruppe Energie (11-13 kcal/mol im Falle von ATP) auf andere Moleküle übertragen können. Weitere Beispiele für energiereiche Phosphate sind andere Nukleosid-5'-triphosphate, wie Guanosinribonukleosid-5'-triphosphat (GTP) und Kreatinphosphat, das durch Phosphorylierung von Kreatin entsteht.

### 1.1 Kreatinstoffwechsel

Kreatin wird hauptsächlich in Leber, Pankreas und Niere gebildet und nach Abgabe in den Blutkreislauf von der Muskulatur und anderen Geweben aufgenommen. Ein 70 kg schwerer Mann hat einen GesamtKreatinpool von etwa 120 g, davon befinden sich 98% in der Muskulatur, 20-30% als Kreatin, 70-80% als Kreatinphosphat. Etwa 1,1% des Kreatin und 2,6% des Kreatinphosphat werden täglich durch nichtenzymatische Dehydratation in Kreatinin umgewandelt. Die renale Ausscheidung von Kreatinin, täglich etwa 1,5 - 2 g für einen 70 kg schweren Mann, wird durch die Muskelmasse, durch die enterale Aufnahme von Kreatinin/Kreatin/Kreatinphosphat und durch die Nierenfunktion bestimmt. Unter Konstanz der ersten beiden Einflussgrößen dient die Serumkonzentration des Kreatinin als Parameter zur Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate der Niere.

Der zelluläre Energiestoffwechsel zielt auf die Bereitstellung von ATP (s.o.). Über die Gleichgewichtsreaktion  $\text{Kreatin} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{Kreatinphosphat} + \text{ADP}$  wird ein Teil des ATP in Kreatinphosphat umgesetzt. Kreatinphosphat wiederum dient bei erhöhtem ATP-Verbrauch zur raschen Rephosphorylierung von ADP und fungiert somit als kurzfristiger Energiepuffer. Das Reaktionsgleichgewicht der Kreatinkinase-reaktion hängt vom pH, und der Konzentration von divalenten Kationen (insbesondere Mg) ab; die Gleichgewichtskonstante  $K_{CK} = \frac{[\text{Kreatin}][\text{ATP}]}{[\text{Kreatinphosphat}][\text{ADP}]}$  beträgt 38-166 (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Damit die Energiepufferung funktioniert, sollte die Kreatinphosphatkonzentration deutlich höher als die ATP-Konzentration sein. Dies trifft vor allem für die Skelettmuskulatur zu, die eine Kreatinphosphatkonzentration von 30 mM aufweist und damit etwa zehnfach höher liegt, als die

der Adenosinnukleotide. In der Herzmuskulatur, der glatten Muskulatur und anderen Geweben (Niere, Gehirn) beträgt die Kreatinphosphatkonzentration nur etwa 1-10 mM. Hier dient das Kreatinkinase-System wahrscheinlich als Shuttle energiereicher Phosphate zwischen Cytosol und Mitochondrium, d.h. Kreatinphosphat und Kreatin werden zwischen dem Ort des ATP-Verbrauchs und dem Ort der ATP-Bildung transferiert. Zusätzlich kann es aufgrund der intrazellulären Mikrokompartimentierung zur lokalen Konzentrationsanreicherung von Kreatinphosphat kommen, die die Gesamtkonzentration im Zell- bzw. Organell-spezifischen Homogenat deutlich übersteigt. In diesen Mikrokompartimenten kann Kreatinphosphat als lokaler Energiepuffer fungieren. Drei der insgesamt fünf Kreatinkinase-Isoenzyme sind cytosolisch lokalisiert, zwei befinden sich auf der Außenseite der inneren mitochondrialen Membran. Während sich die mitochondrialen Kreatinkinase-Isoenzyme in unmittelbarer Nähe der ATP/ADP Translokase befinden und dort die Bildung von Kreatinphosphat im Vordergrund steht, lokalisieren sich die cytosolischen Isoenzyme in Nachbarschaft zu den ATPasen der Myofibrillen, des sarkoplasmatischen Retikulums, der Plasmamembran und der glykolytischen Enzymkomplexe.

Die Plasma-Konzentration von Kreatin liegt bei 10 - 100  $\mu\text{M}$  und Kreatin wird durch einen Na-abhängigen Transporter in die Zellen aufgenommen. Die Expression des humanen Kreatintransporter (CRT1, SLC6A8) ist besonders hoch im Skelett- und Herzmuskel und in den Nieren; mäßig hoch in Gehirn, Plazenta, Lungen, Milz, Thymus, Prostata, Keimdrüsen, Dünndarm und Dickdarm; und unterhalb der Nachweisgrenze in Leber, Pankreas und Leukozyten (Nash et al. 1994; Sora et al. 1994).

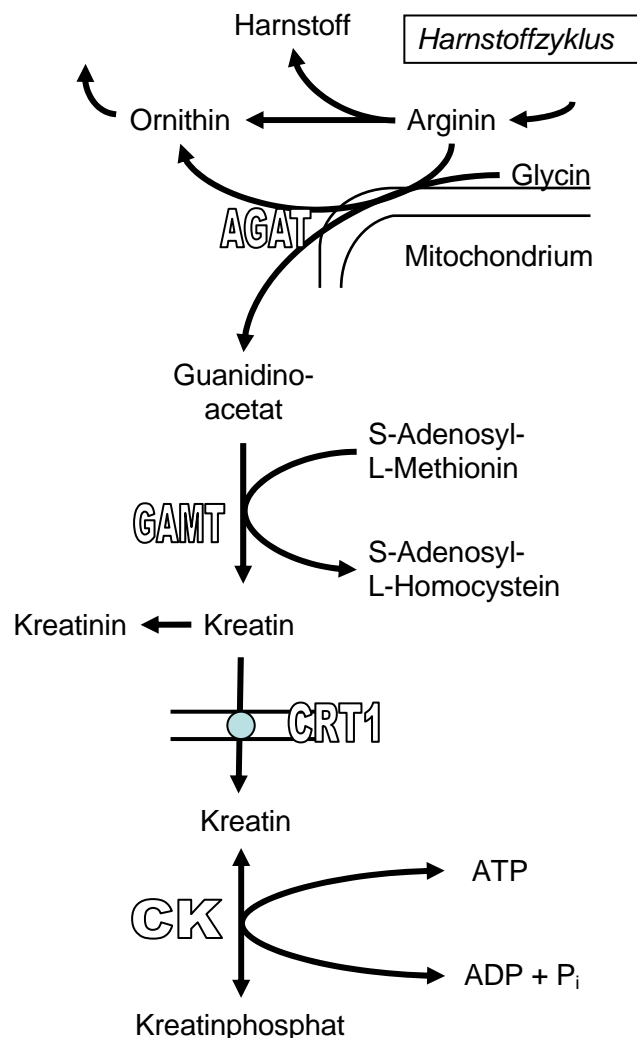


Abbildung 1: Kreatinsynthese und Kreatinstoffwechsel. AGAT = Arginin:Glycin-Amidino-transferase, GAMT = S-Adenosyl-L-Methionin:Guanidinoacetat N-Methyltransferase, CRT1 = Kreatin-transporter, CK = Kreatinkinase. Weitere Erklärung s. Text 1.2.

Intrazelluläres Kreatin kann durch die Kreatinkinase (CK, EC 2.7.3.2) unter Verbrauch von ATP zu Kreatinphosphat umgesetzt werden. Die zwei mitochondrialen Isoenzyme finden sich praktisch ubiquitär und spielen quantitativ für die Synthese von Kreatinphosphat nur eine untergeordnete Rolle. Der wesentliche Teil von Kreatin wird durch drei zytosolische Isoenzyme umgesetzt, die gewebespezifisch exprimiert werden: MM in Skelett- und Herzmuskel; BB im Gehirn, geringer auch glatter Muskulatur (Blase, Venenwand), Nierenepithel, Darm, Uterus, Prostata, Spermatozyten und retinalen Photorezeptorzellen; MB vorwiegend im adulten Herzmuskel.

### Kreatintransport im Gehirn

Die für die Kreatinsynthese notwendigen Gene AGAT und GAMT und der Kreatintransporter CRT1 werden in Hirnzellen mit hohem und fluktuierendem Energieverbrauch exprimiert (Braissant et al. 2001). AGAT lässt sich in Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten und kapillären Endothelzellen nachweisen, GAMT-Expression zeigt sich in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten und CRT1 wird in Neuronen, Oligodendrozyten und kapillären Endothelzellen exprimiert. Hieraus lässt sich ableiten, dass die zerebrale Kreatin-Aufnahme bezüglich ihrer Kapazität beschränkt ist und dass es möglicherweise innerhalb des ZNS zu einem Transport von Kreatin und/oder Guanidinoacetat von Astrozyten und Oligodendrozyten zu Neuronen kommt (Ohtsuki et al. 2002).

### 1.2 Kreatinbiosynthese

Kreatin wird in zwei enzymatischen Reaktionen aus den Aminosäuren Arginin und Glycin synthetisiert (s. Abb. 1). Das Enzym Arginin:Glycin-Amidino-transferase (AGAT, EC 2.1.4.1) katalysiert die Übertragung der Amidino-Gruppe vom Arginin auf Glycin. Diese Reaktion ist der geschwindigkeits-bestimmende Schritt der Kreatinbiosynthese. Beim Menschen zeigen Pankreas, Niere und Leber die höchsten Aktivitäten von AGAT. Allerdings ist AGAT auch in Herz, Lunge, Milz, Muskel, Gehirn, Hoden und Thymus nachweisbar. Intrazellulär ist AGAT im intermembranösen Raum der Mitochondrien lokalisiert. AGAT ist das Schlüsselenzym der Kreatinbiosynthese und wird inhibiert durch Ornithin, einem Reaktionsprodukt. Die Expression von AGAT wird induziert durch Thyroxin und Wachstumshormon und gehemmt durch Kreatin. Der zweite Schritt der Kreatinbiosynthese wird durch das Enzym S-Adenosyl-L-Methionin:Guanidinoacetat N-Methyltransferase (GAMT, EC 2.1.1.2) katalysiert. GAMT überträgt

die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Guanidinoacetat. GAMT wird nahezu ubiquitär exprimiert und zeigt die höchste Aktivität in Leber und Pankreas, geringere in der Niere. Auch andere Zelltypen exprimieren nennenswerte Mengen an GAMT, wie Nervenzellen, Eizellen, Sertolizellen und epididymale Epithelzellen. GAMT ist intrazellulär im Zytosol lokalisiert.

### Regulation

Guanidinoacetat liegt in einer Konzentration von 0,8 - 5,0  $\mu\text{M}$  im Plasma oder Serum vor und kann gegen einen Konzentrationsgradienten über den Kreatintransporter CRT1 internalisiert werden.

Aus dem überwiegend komplementären Expressionsmuster von einerseits AGAT und GAMT und andererseits Kreatintransportern und CK-Isoenzymen ergibt sich eine räumliche Trennung zwischen dem Hauptort der Synthese und des funktionellen Gebrauchs von Kreatin. Diese räumliche Trennung von Kreatinbiosynthese und Kreatinstoffwechsel wird in einigen Geweben durchbrochen, in denen auch kleinere Mengen an Kreatin synthetisiert werden. So reduziert eine Inhibition der Kreatinaufnahme den Kreatin/Kreatinphosphat-Pool im Gehirn nur auf 50% des Normalwertes (Holtzman et al. 1989).

### 1.3 Zerebrale Kreatin-Defizienz (auch „primary creatine deficiency syndromes“)

Die zerebrale Kreatin-Defizienz ist das gemeinsame Merkmal einer Gruppe von Erkrankungen, die durch Defekte in der Biosynthese oder im Transport von Kreatin verursacht werden. Arginin:Glycin Amidinotransferase (AGAT)-Defizienz (OMIM 602360) und S-Adenosyl-L-Methionin:Guanidinoacetat N-Methyltransferase (GAMT)-Defizienz (OMIM 601240) werden durch eine Störung der Kreatin-Biosynthese verursacht. Eine Störung des Kreatin-Transporter (CRT1 = SLC6A8, OMIM 300036) führt zu einem Kreatin-Mangel im ZNS bei normaler Plasmakonzentration von Kreatin und Guanidinoacetat (s. Tab. 1).

Diagnostisch lässt sich bei diesen drei Erkrankungen eine erniedrigte Konzentration von Kreatin im ZNS durch Magnetresonanz-Spektroskopie (MRS) nachweisen. Klinisch sind mentale Retardierung und Sprachentwicklungsverzögerung der minimale gemeinsame Nenner dieser drei Erkrankungen. Patienten mit AGAT- und CRT1-Defizienz können auch zerebrale Krampfanfälle zeigen, die sich gut mit Antiepileptika behandeln lassen. Im Gegensatz hierzu weisen Patienten mit

einer GAMT-Defizienz häufig ein komplexeres Krankheitsbild auf, das eine dystone, hyperkinetische Bewegungsstörung und eine oftmals therapieresistente Epilepsie umfasst (s. Tabelle 1). Überraschenderweise zeigen Patienten aller drei Patienten keine Kardiomyopathie oder deutliche Zeichen einer Myopathie der Skelett-Muskulatur, obwohl aufgrund der teilweisen, räumlichen Trennung von Kreatinbiosynthese und Kreatinstoffwechsel (s.o. 1.2) auch die Muskulatur durch signifikanten Kreatin-Mangel in Mitleidenschaft gezogen sein könnte.

Im Unterschied zu AGAT- und GAMT-Defizienz, die beide einer autosomal rezessiven Vererbung folgen, wird die CRT1-Defizienz X-chromosomal vererbt. Unter den möglichen Ursachen von nichtsyndromaler mentaler Retardierung stellt die CRT1-Defizienz einen nicht unerheblichen Anteil und liegt mit einem Anteil von 0,1-0,3% bei einem Zehntel der Häufigkeit des fragilen X-Syndrom (Clark et al. 2006; Mandel 2004; Poo-Arguelles et al. 2006; Rosenberg et al. 2004).

<b>Defizienz</b>	<b>Klinisches Bild</b>	<b>Biochemische Marker</b>
GAMT	Mentale Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung, therapieresistente Epilepsie, extrapyramidal-motorische Symptome, autistisches Verhalten	Guanidinoacetat ↑↑ (U, P, L), Kreatin ↓ (U, P, L), Kreatinin ↓ (U, P, L)
AGAT	Mentale Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung, (Epilepsie)	Guanidinoacetat ↓ (U, P, L) Kreatin n-↓ (U, P, L) Kreatinine n-↓ (U, P, L)
CFTR	Mentale Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung, Epilepsie, autistisches Verhalten	Guanidinoacetat n (U, P, L) Kreatin ↑ (U), Kreatin n (P), Kreatin ↓ (L), Kreatinine n-↓ (U, P, L) <b>Kreatin/Kreatinine ↑ (U)</b>

Tabelle 1: Klinische und biochemische Kennzeichen der Kreatin-Defizienz-Erkrankungen, L = Liquor, P = Plasma, U = Urin

#### 1.4 GAMT-Defizienz beim Menschen

Die GAMT-Defizienz beim Menschen tritt in unterschiedlichen Schweregraden auf, die vorläufig in schwer, intermediär und mild eingeteilt werden.

Zwei bisher beschriebene Patienten mit milder GAMT-Defizienz fielen klinisch einzig durch mentale Retardierung, autistisches Verhalten und Sprachentwicklungsverzögerung auf (Caldeira Araújo et al. 2005; van der Knaap et al. 2000).

Patienten mit einem intermediären Verlaufstyp sind durch eine höhergradige mentale Retardierung, Sprachentwicklungsverzögerung und autistische, hyperkinetische Verhaltensstörung charakterisiert. Auftretende zerebrale Krampfanfälle gehen nur mit geringeren unspezifischen EEG-Veränderungen einher und lassen sich mit den üblichen Antiepileptika zufrieden stellend behandeln (Mercimek-Mahmutoglu et al. 2006).

Patienten mit schwerer GAMT-Defizienz entwickeln während der ersten Lebensmonate eine progressive Enzephalomyopathie, die durch Muskelhypotonie, dyskinetische Bewegungsstörung, Dysphagie, Entwicklungsverzögerung oder -regression, fehlende Sprachentwicklung, mentale Retardierung, therapieresistente, zerebrale Krampfanfälle und autistischem, autoaggressivem Verhalten gekennzeichnet ist (Stockler et al. 1994; Stockler et al. 1996). Das EEG von diesen GAMT-Patienten weist allgemeine Veränderungen (hypersynchrone Aktivitäten und intermittierende multifokale Spikes) im Sinne einer Enzephalopathie auf. Im kraniellen NMR zeigen sich bilaterale Signalerhöhungen im Bereich des Globus pallidus.

Erhöhte Konzentrationen von Guanidinoacetat im Urin (ca. 10-fach oberhalb der Norm, d.h. 2224-20000  $\mu\text{mol/L}$  gegenüber 63-429  $\mu\text{mol/L}$ ), im Plasma (ca. 20-fach oberhalb der Norm, d.h. 12,9-20,7  $\mu\text{mol/L}$  gegenüber 0,52-1,15  $\mu\text{mol/L}$ ) und im Liquor cerebrospinalis (ca. 200-fach oberhalb der Norm, d.h. 10,6-12,7  $\mu\text{mol/L}$  gegenüber 0,023-0,087  $\mu\text{mol/L}$ ) sind diagnostisch für die GAMT-Defizienz. Erniedrigte Konzentration von Kreatinin im 24h-Sammelurin (ca. 10% der Norm, d.h. 9-12  $\mu\text{mol/kg*d}$  gegenüber 71-177  $\mu\text{mol/kg*d}$ ), im Plasma (ca. 25% der Norm, d.h. 3,3-7  $\mu\text{mol/L}$  gegenüber 18-25  $\mu\text{mol/L}$ ) und im Liquor cerebrospinalis (< 3% der Norm, d.h. < 1,0  $\mu\text{mol/L}$  gegenüber 29-40,5  $\mu\text{mol/L}$ ) sind ebenfalls hinweisend. Es fällt auf, dass die Konzentrationsänderungen besonders ausgeprägt im Liquor cerebrospinalis sind. Weiterhin weisen einige Patienten eine milde Hyperammonämie und eine leicht erhöhte Harnsäurekonzentration im Plasma auf.

Als weiteres diagnostisches Merkmal finden sich in der kraniellen NMR-Spektroskopie ein stark erhöhter Guanidinoacetat-Peak und ein vollständiges Fehlen von Kreatin und Kreatinphosphat. Beweisend für eine GAMT-Defizienz ist der Nachweis einer stark erniedrigten Enzymaktivität in der zytosolischen Fraktion von Lebergewebe (1-5 % der Norm), in Lymphozyten und Hautfibroblasten. Alternativ kann DNA aus Leber, Leukozyten oder Hautfibroblasten gewonnen

werden und krankheitsassoziierte Allele im GAMT-Gen nachgewiesen werden (Isbrandt and von Figura 1995; Stockler et al. 1996). Das klinische Bild und die besonders ausgeprägten Konzentrationsänderungen von Guanidinoacetat und Kreatinin/Kreatin/Kreatinphosphat im Gehirn weisen auf einen vorwiegend zentralnervösen, neurometabolischen Pathomechanismus bei der GAMT-Defizienz hin.

Eine tägliche orale Zufuhr von 350 mg - 2 g Kreatinmonohydrat pro kg Körpergewicht führt zu einem Verschwinden des Guanidinoacetat in der kraniellen NMR-Spektroskopie, Kreatin/Kreatinphosphat steigen bis auf maximal 60-70% des Normalwertes an. Im Plasma und im Urin bleibt die Guanidinoacetatkonzentration deutlich erhöht und bewirkt möglicherweise eine Einschränkung der Kreatinaufnahme durch das ZNS. Klinisch zeigt sich bei vielen Patienten eine Besserung einiger Symptome, wie Beschleunigung der motorischen Entwicklung, Nachlassen der dyskinetischen Bewegungsstörungen, Verminderung der zerebralen Krampfanfälle und Normalisierung der NMR-Veränderungen im Bereich des Globus pallidus. Doch bleiben einige klinische Symptome bestehen, wie insbes. Muskelhypotonie, mentale Retardierung, selbstverletzende Verhaltensauffälligkeiten und fehlende Sprachentwicklung. Guanidinoacetat wirkt hemmend auf die Aktivität der Kreatinkinase und somit wahrscheinlich indirekt der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase und trägt hierdurch zur Neuropathologie der GAMT-Defizienz bei (Zugno et al. 2006). Die Hemmung der Kreatinkinase durch Guanidinoacetat ist kompetitiv. Durch in vivo <sup>31</sup>P-MRS (Magnetresonanzspektroskopie) konnte gezeigt werden, dass Guanidinoacetat-Phosphat in GAMT<sup>-/-</sup> Mäusen in ähnlicher Weise wie Kreatinphosphat als Energiepuffer fungieren kann (Kan et al. 2004; Renema et al. 2003). Interessanterweise fehlt bei Invertebraten das CK-System in den meisten Geweben (außer in Spermatozoen) und es dienen andere energiereiche Phosphate (Arginin-Phosphat, Guanidinoacetat-Phosphat, u.a.) als Energiepuffer zur Regeneration von ATP (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Im Vergleich zu Arginin-Phosphat und Guanidinoacetat-Phosphat puffert Kreatin-Phosphat das zytosolische Phosphorylierungspotential auf einem höheren Niveau, d.h. kann eine höhere ATP-Konzentration Aufrecht erhalten. Ohne Kreatinsupplementation zeigen GAMT<sup>-/-</sup> Mäuse eine verringerte inotropische Herzreserve und eine erhöhte Neigung zu kardialer Ischämie (ten Hove et al. 2005), sowie eine verminderte Kraft und Ausdauer bei intensiver Stimulation von Skelettmuskel (Kan et al. 2005).

Durch Untersuchungen an Neuronen und Gehirnschnitten neonataler Mäuse konnte gezeigt werden, dass Guanidinoacetat jedoch nicht Kreatin als partieller GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonist wirkt und die Spontanaktivität von kultivierten Neuronen und Neuronen des Globus pallidum einschränkt (Neu et al. 2002). Dies könnte das Persistieren einiger Symptome unter Kreatinmonohydrat-Therapie erklären. Tatsächlich führt eine abgewandelte orale Behandlung von

GAMT-Patienten mit Kreatinmonohydrat in Kombination mit einer Arginin-Restriktion und einer Ornithin-Supplementation zu einer deutlichen Senkung der Guanidinoacetat-Konzentration in Plasma, Liquor und Urin von GAMT-Patienten und gleichzeitig zu einer signifikanten klinischen Verbesserung (Schulze et al. 2001). Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um erfolgsversprechende Behandlungsstrategien entwickeln zu können.

Neben der verbesserten Puffereigenschaft von Kreatinphosphat im Vergleich zu Guanidinoacetatphosphat könnte die agonistische Wirkung von Guanidinoacetat auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine Rolle in der evolutionären Entwicklung des CK-Systems gespielt haben. Bei der Gegenüberstellung der pharmakologischen Eigenschaften der GABA-Rezeptoren von *C. elegans* mit den GABA-Rezeptoren von Säugern zeigen sich abweichende Wirkungen verschiedener Liganden (Bamber et al. 2003). Es kann spekuliert werden, dass sich beim Übergang vom Guanidino-Kinasen-System in *C. elegans* (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000) zum CK-System in Säugern das Wirkungsspektrum der GABA-Rezeptor-Liganden verändert hat. Da sich in der Evolution Creatinphosphat als Energiepuffer für ATP durchgesetzt hat und somit die extra- und intrazelluläre Konzentration von Guanidinoacetat bei Säugern deutlich niedriger ausfällt, hat sich das Ligandenspektrum der GABA-Rezeptoren so entwickeln können, dass auch Guanidinoacetat als partieller Agonist der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wirksam ist.



## 2 ZIEL DER ARBEIT

Die GAMT-Defizienz beim Menschen resultiert in eine schwere neurometabolische Erkrankung, die durch die Einnahme von Kreatinmonohydrat gemildert aber keinesfalls geheilt werden kann. Um einerseits den Pathomechanismus dieser Erkrankung besser zu verstehen und andererseits neue therapeutische Ansätze zu entwickeln, ist das Wissen um die Expression von GAMT eine Grundvoraussetzung. In der vorliegenden Arbeit wird die effiziente Biosynthese großer Mengen an rekombinanter, humaner und Maus-GAMT dargestellt. Mithilfe der rekombinanten Proteine wurden spezifische anti-GAMT-Antikörper hergestellt. Die gewonnenen Antikörper wurden dann zur Darstellung der gewebespezifischen Expression der humanen und murinen<sup>1</sup> GAMT verwendet. Schließlich wurde auch die enzymatische Aktivität der rekombinant hergestellten GAMT untersucht.

---

<sup>1</sup> Murin wird an dieser Stelle und im Folgenden im Sinne von „auf die Maus bezogen“ verwendet

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Standardprotokolle

Standardprotokolle der Molekularbiologie wurden aus "Short Protocols in Molecular Biology" Ausubel et al., 4. Aufl. 1999, verwendet.

#### 3.2 Medien, Puffer und Lösungen

LB Medium: 10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Bacto-Hefeextrakt, 5 g/L NaCl

#### ***Northern Blotting***

20x SSC 3 M NaCl  
0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat 2H<sub>2</sub>O (pH 7,0)

100x Denhardt Lösung 2% Ficoll 400  
(steril filtriert) 2% Polyvinylpyrrolidon  
2% BSA

(Prä)Hybridisierungs- 5x SSC  
Lösung (Northern) 5x Denhardt Lösung  
50% Formamid  
1% SDS  
100 µg/mL denaturierte Lachs-Spermien-DNA  
(unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen)

#### ***SDS-PAGE***

5x SDS-PAGE-  
Lade-Puffer: 60 mM Tris (pH 6,8)  
25 % Glycerol  
2 % SDS  
0,1 % Bromphenol-Blau  
14 mM β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt)

Elektrophorese-Puffer :      25 mM Tris  
   192 mM Glycin  
   0,1 % SDS

### ***Western Blotting***

Transferpuffer:                15,6 mM Tris  
   120 mM Glycin  
   20 % Methanol

PBS:                                58 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4  
   68 mM NaCl

Block-Lösung:                5 % fettfreies Milchpulver in PBS

Wasch-Lösung:                0,05% Tween-20 in PBS

### ***Proteinexpression***

Lyse-Puffer:                    50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% Glycerol  
   10 mM Imidazol  
   1 mg/ml Lysoszym  
   14 mM β-Mercaptoethanol (getrennt hinzugefügt)

Wasch-Puffer 1:                50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0  
   300 mM NaCl  
   10% Glycerol  
   10 mM Imidazol  
   5 mM β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt)

Wasch-Puffer 2:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8.0 300 mM NaCl 10% Glycerol 20 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt)
Wasch-Puffer 3:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8.0 300 mM NaCl 10% Glycerol 50 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt)
Elutions-Puffer:	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8.0 300 mM NaCl 10% Glycerol 250 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzugefügt)
Kanamycin-Lösung:	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O, steril filtriert und gelagert bei -20°C
Ampicillin-Lösung:	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O, steril filtriert und gelagert bei -20°C
IPTG-Lösung:	238,3 mg/ml (= 1M) in H <sub>2</sub> O, steril filtriert und gelagert bei -20°C

### 3.3 GAMT-cDNA, Primer und PCR-Reaktionen

Die cDNA der Maus-GAMT wurde als I.M.A.G.E. Consortium Klon im Vektor PT7T3D-Pac von Research Genetics bezogen. Die humane GAMT cDNA lag in dem Vektor pGEM-T vor (Isbrandt and von Figura 1995).

Zur Modifizierung der 5'-Enden der GAMT-cDNA wurden folgende Primerpaare eingesetzt, humane GAMT: hGAMT-3 [CGC GTC GAC GAT GAC GAT AAG AGC GCC CCC AGC GCG ACC CCC ATC] + GAT5-2 [AGG ATC CCA TCA AAG TGA C]

Maus-GAMT: mGAMT-18 [CGC GAA TTC GGA TCC TCT TCT GCA GCT AGC CCG CTC]  
+ mGAMT-2 [AAG TTG AAC TGG TGA GTG TG].

Zur Amplifikation der beiden Fragmente wurden je 100  $\mu$ L mit folgender Zusammensetzung eingesetzt: 10 mM Tris (pH 8,3), 0,05% Tween 20, 100  $\mu$ g/ml Gelatin, 50 mM KCl, 3 mM  $MgCl_2$ , 50  $\mu$ M d-NTP, 0,2  $\mu$ M von beiden Primern, 100 ng DNA, 0,05 U/ $\mu$ L Taq-Polymerase. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen ausgeführt: Initiale Denaturierung 5 min bei 95 °C, dann 30 Zyklen mit Denaturierung 1 min bei 98 °C, "Annealing" 30 s bei 52 °C, Extension 1 min bei 72 °C, Endextension 5 min bei 72 °C.

Zur Sequenzierung der modifizierten GAMT-cDNAs wurde der M13-Primer [GTA AAA CGA CGG CCA GT] verwendet.

### 3.4 Sequenzierung

Zyklus-Sequenzierung wurde mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems) auf einem Thermo-Zykler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

100-500 ng DNA in maximal 10  $\mu$ L Volumen wurden mit 8  $\mu$ L Big Dye Premix und 10 pmol / 2  $\mu$ L Primer gemischt und mit  $H_2O$  auf 20  $\mu$ L Gesamtvolumen aufgefüllt. 30 Zyklen mit den folgenden Parametern wurden gefahren: Denaturierung bei 95°C für 30s, "Annealing" bei 50°C für 30s, Extension bei 60°C für 4min. Anschließend wird das Sequenzierungsprodukt mit 2  $\mu$ L 3 M NaAc (pH 4,6) und 50 $\mu$ L Ethanol gefällt und mit 250 $\mu$ L 70% Ethanol gewaschen.

Der getrocknete "Pellet" wird in Probenauftragspuffer auf das Sequenzierungsgel aufgetragen und in einem ABI-Sequenzator 377 (Perkin Elmer) analysiert. Nach Erhalt der Sequenzierungsdaten werden die Sequenzen mit Hilfe des Programms MagAlign mit der Referenzsequenz verglichen.

### 3.5 Klonierung der humanen und murinen GAMT-cDNAs

Expressionsvektor pQE-9, E.coli K-12 abgeleitete Stämme M15 [pREP4] und TOP 10

Der Vektor pQE-9 von Quiagen dient der prokaryotischen Expression von Proteinen. Er enthält einen E.coli Phagen T5-Promotor, der durch zwei lac Operatoren reguliert wird. Durch Bindung des lac Repressor an den lac Operator wird die Transkription des 3' lokalisierten Gens unterdrückt. Durch Zugabe von IPTG wird der lac Repressor vom lac Operator entfernt und die Transkription ermöglicht. Weitere Bestandteile des Vektors pQE-9 sind eine synthetische

Ribosomenbindungsstelle, ein Transkriptionsterminator  $t_0$ , der von der Phage lambda abgeleitet ist, eine Replikationsregion und das Gen für Ampicillin-Resistenz. Unmittelbar vor der multiplen Klonierungsstelle befindet sich die Sequenz „ATG AGA GGA TCG“, die für das Start-Codon (Met) und das Tripeptid Arg-Gly-Ser kodiert. Im Anschluß folgt eine dreifache Wiederholung der Sequenz “CAC CAT”. Durch diese wird dem zu exprimierenden Protein am N-Terminus eine Sequenz von 6 Histidin-Resten (6His) angefügt. Benachbarte Histidin-Reste können an eine Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetat) Matrix als Komponenten eines Chelatkomplexes gebunden werden. Aufgrund der hohen Affinität dieser Bindung ( $K_d = 10^{-13}$  bei pH 8,0) lässt sich das gewünschte Protein selektiv an einer Ni-NTA-Säule binden und mit steigenden Konzentrationen von Imidazol, einem Struktur analogon des Histidin, eluieren.

Die modifizierte cDNA der humanen GAMT wurde über die Restriktionsstellen Sal I und Hind III in den Vektor pQE-9 kloniert; die modifizierte Maus-GAMT cDNA über BamH I und Hind III. Der E.coli Stamm M15[pREP4] (Quiagen) besitzt das Plasmid pREP4, das das lac Repressor-Gen und das Gen für Kanamycin-Resistenz trägt. Bei dem E.coli Stamm TOP 10 (Invitrogen) ist das lac Repressor-Gen in das Genom integriert.

### 3.6 Messung der enzymatischen Aktivität der rekombinant exprimierten GAMT

Folgende Reagenzien wurden für die Messung der GAMT-Aktivität verwendet:

Tris-Acetat-Puffer	100 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7,75
Guanidinoacetat	20 mM = 2,34 mg /mL (MG 117,1)
S-Adenosyl-L-Methionin	5 mM = 2,17 mg / mL (MG 434,9)
ATP-Standard	10 $\mu$ M (Labsystems 1243-201)
S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase	> 10 U / mg (Sigma A1705; BioRad-Kit 1945361)
Dithiothreitol (DTT)	500 mM
Adenosinkinase	0,2 $\mu$ g / $\mu$ L (ADK1, Moffatt et al., 2000)

S-Adenosyl-L-Homocystein	10 mM = 3,84 mg / mL (MG 384,4)
Adenosin	10 mM = 2,67 mg / mL (MG 267,2) in 50 mM Zitronensäure mit 5 mM DTT
5-Iodotubercidin	51 mM = 20 mg / mL DMSO (MG 392,2; Endkonz. 250 nM; Biomol EI-293) Inhibitor der Adenosinkinase ( $K_i = 30$ nM)
Deoxycoformicin (= Pentostatin)	15 mM = 4 mg / mL (Endkonz. 2,5 $\mu$ M; Wyeth-Lederle) Inhibitor der Adenosin Deaminase (ADA)

### 3.7 Affinitätsreinigung von polyklonalem anti-GAMT-Antikörper

Polyklonale anti-GAMT-Antikörper wurden durch Injektion von rekombinant hergestelltem hGAMT bzw. mGAMT in Kaninchen hergestellt (Eurogentec, Lüttich, Belgien). Western blots, die mit den gereinigten Kaninchenseren durchgeführt wurden, zeigten zusätzliche immunreaktive Banden. Daher wurden die anti-GAMT-Antikörper zusätzlich durch Affinitätschromatographie gereinigt.

Rekombinant hergestelltes hGAMT bzw. mGAMT wurde durch Ultrafiltration (Centicon-10) auf 2 mg / mL aufkonzentriert und auf 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Puffer pH 6,0 0,3 M NaCl eingestellt. Nach Aktivierung von NHS-Sepharose (Amersham Biosciences) mit kalter 1 mM HCl wurde 1 mL GAMT-Lösung an 1,5 mL aktivierter NHS-Sepharose über Nacht bei 4°C gekoppelt. Die Kopplungseffizienz wurde durch Messung der  $A_{280}$  der GAMT-Lösung vor und nach Kopplung abgeschätzt. Nach Inkubation mit 50 mM Tris pH 8,0 für 2h bei RT wurde die GAMT-Sepharose-Suspension durch wechselndes Waschen mit 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 mit 0,1 M NaCl (Bindepuffer) und 0,1 M Glycin/HCl pH 2,5 (Elutionspuffer) vorbereitet. Nach Equilibration mit Bindepuffer wurden die polyklonalen GAMT-Antikörper mit GAMT-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Gebundene Antikörper wurden in 1 mL Fraktionen des Elutionspuffers aufgefangen und mit 0,1 mL 1 M Tris/pH 9,0 (Auffangpuffer) neutralisiert.

Die Spezifität der anti-GAMT-Antikörper wurde mit Hilfe von Gewebe der GAMT<sup>-/-</sup> Mäuse bestätigt (Schmidt et al. 2004). Sowohl der anti-mGAMT- als auch der anti-hGAMT-Antikörper

reagieren mit der murinen mGAMT im Western blot (in Abb. 2 nur gezeigt für den anti-mGAMT-Antikörper).

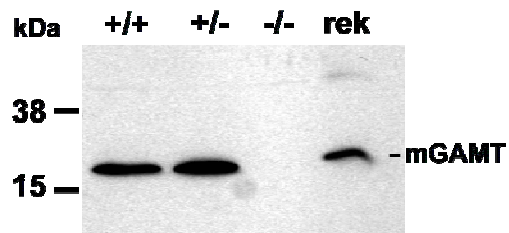


Abbildung 2: Spezifität des anti-mGAMT-Antikörper im Western Blot. Leberzellhomogenate (20 µg pro Spur) aus  $GAMT^{+/+}$ ,  $GAMT^{+/-}$  und  $GAMT^{-/-}$  Mäusen wurden durch PAGE getrennt und im Western Blot mit affinitäts-gereinigtem anti-mGAMT-Antikörper (1:1000) gefärbt. Zum Vergleich wurde zusätzlich 0,1 µg rekombinante mGAMT (rek) aufgetragen.  $GAMT^{-/-}$  Gewebe zeigt keine Immunreaktivität.

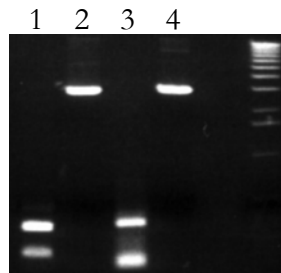


## 4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

### 4.1 Modifikation und Klonierung der humanen und murinen GAMT-cDNA

Um die humane und murine GAMT-cDNA (hGAMT und mGAMT) in den Expressionsvektor pQE-9 zu klonieren, wurden mit Hilfe von PCR-Primern am 5'-Ende geeignete Restriktionsstellen im korrekten Leserahmen eingeführt. Der 5'-Primer für die mGAMT-Amplifikation [mGAMT-18] enthielt eine BamH I Restriktionsstelle (GGATCC), der 5'-Primer für die hGAMT-Amplifikation [hGAMT-3] eine Sal I Restriktionsstelle (GTCGAC). Im Falle der humanen GAMT enthielt der 5'-Primer zusätzlich die Sequenz GACGATGACGATAAG, die translatiert die Erkennungssequenz AspAspAspAspLys der Enterokinase darstellt. Dies erlaubt eine spätere Entfernung aller N-terminalen Aminosäurereste, die nicht zum eigentlichen hGAMT-Protein gehören. Die hGAMT cDNA wurde von dem Vektor pGEM-T über die Restriktionsstellen Sal I und SphI (950 bp Fragment) in den Vektor pGEM-4Z kloniert.

Abbildung 3: Klonierung der mGAMT- und hGAMT-cDNA. Agarose-Gel der Restriktions-Verdaue der PCR-Fragmente und des Vektors pBluescript SK. 1 PCR-Fragment mGAMT-18 – mGAMT-2, 2 pBluescript SK, 1 und 2 Restriktionsverdau mit BamH I + Apa I; 3 PCR-Fragment hGAMT-3 – GAT-2, 4 pBluescript, 3 und 4 Restriktionsverdau mit Sal I und Apa I.



Mit den Primer-Paaren hGAMT-3 – GAT-2 und mGAMT-18 – mGAMT-2 wurden jeweils 500-600 bp PCR-Fragmente amplifiziert.

Nach Restriktionsverdau des humanen Fragments mit Sal I und Apa I

bzw. des murinen Fragments mit BamH I und Apa I wurden beide Fragmente in den Vektor pBluescript SK kloniert (s. Abb. 3).

Die Fragmente Sal I + Apa I aus pBluescript SK 5'hGAMT und Apa I + Hind III aus pGEM-4Z hGAMT wurden in den Vektor pQE-9 (Sal I + Hind III) kloniert; die Fragmente BamH I + Apa I aus pBluescript SK 5'mGAMT und Apa I + Hind III aus pT7T3D-Pac mGAMT wurden gleichfalls in den Vektor pQE-9 (BamH I + Hind III) kloniert. Die Korrektheit der beiden Konstrukte, pQE-9-hGAMT und pQE-9-mGAMT, wurde durch semiautomatisierte Fluoreszenzsequenzierung bestätigt.

## 4.2 Expression der humanen und murinen GAMT in *E.coli*

pQE-9 hGAMT und pQE-9 mGAMT wurden in die *E.coli* Stämme M15[pREP4] und TOP 10 (Invitrogen) transformiert und einzelne Klone auf Expression nach Induktion mit 2 mM IPTG untersucht.

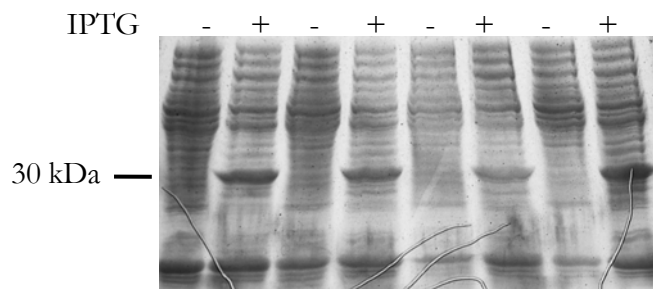


Abbildung 4: Expression der hGAMT in *E.coli*. PAGE vier verschiedener M15[pREP4]-Klone mit pQE-9 hGAMT. 4h nach Induktion mit 2 mM IPTG wurden die Zellen geerntet, direkt in SDS-Puffer gekocht und auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Blau gefärbt. – ohne IPTG, + mit IPTG.

Alle M15[pREP4]-Klone zeigten eine deutliche Steigerung der GAMT-Expression nach Induktion mit IPTG (s. Abb. 4). Bei den TOP 10-Klonen zeigten sich eine höhere Basal-Expression von GAMT und eine geringere Induktions-Expression nach IPTG. Daher wurden für die hochskalierte Expression von hGAMT und mGAMT die M15[pREP4]-Klone verwendet. Für die Expression

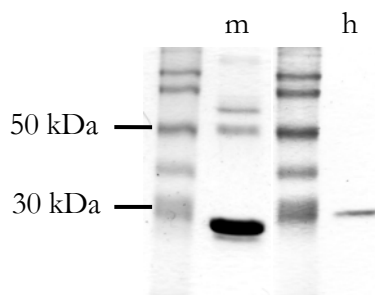


Abbildung 5: Aufreinigung der mGAMT und hGAMT. PAGE der mGAMT (m) und der hGAMT (h) nach Ni-NTA-Chromatographie, Coomassie Blau gefärbtes Gel. hGAMT besitzt aufgrund der zusätzlichen Enterokinasestelle ein etwas höheres Molekulargewicht. Die Proteinbanden um und oberhalb von 50 kDa resultieren von kontaminierenden *E.coli* Proteinen.

großer Mengen hGAMT und mGAMT wurde eine 50 mL Übernachtskultur in Selektivmedium zu 1 L LB-Medium (mit 100 µg / mL Ampicillin und 25 µg / mL Kanamycin) gegeben und bis zu einer  $A_{600} = 0,4-0,7$  wachsen gelassen. Dann wurde die Kultur mit 2 mM IPTG induziert und für weitere 4h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurde diese in 10 mL kaltem Lyse-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis gehalten und anschließend auf  $-80^{\circ}\text{C}$  schockgefroren. Nach Auftauen in Eiswasser wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt (6 x 10 sec mit je 1 min Pause auf Eis), mit Wasch-Puffer 1 auf 20 mL verdünnt und mit 10 000 g für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach Filtrieren ( $0,2\ \mu\text{m}$ ) des Überstandes wurde dieser auf eine 2 mL Ni-NTA-Säule gegeben, mit jeweils 20 mL Wasch-Puffer 1-3 gespült und schließlich in 10 mL

Elutions-Puffer aufgenommen. In Abbildung 5 ist das gereinigte mGAMT und hGAMT dargestellt.

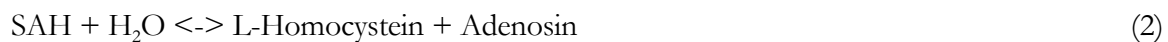
Aus 1 L LB-Medium konnten 5 – 12 mg rekombinantes mGAMT- bzw. hGAMT-Protein isoliert werden. Das erhaltene rekombinante hGAMT wurde zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern durch eine Auftragsfirma verwendet und durch Affinitätsreinigung weiter verbessert s. Abschnitt 3.7.

#### 4.3 Messung der enzymatischen Aktivität rekombinanter hGAMT

Für die Messung der enzymatischen Aktivität der rekombinant synthetisierten hGAMT wurde ein neuartiger gekoppelter Enzymtest entwickelt (s. Abb. 6). Dieser Enzymtest besteht aus folgenden Einzelreaktionen (SAM ist S-Adenosyl-L-Methionin, SAH ist S-Adenosyl-L-Homocystein):



katalysiert durch GAMT

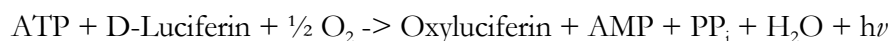


katalysiert durch SAH-Hydrolase



katalysiert durch Adenosinkinase

Die ATP-Konzentration wird über die Luciferase-Reaktion gemessen:



$h\nu$  stellt die Photonenergie dar,  $h$  ist das Plancksche Wirkungsquantum,  $\nu$  ist die Schwingungsfrequenz des Lichtes, wobei  $\nu = c/\lambda$ ,  $c$  ist die Lichtgeschwindigkeit und  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichtes (Emissionsmaximum der Luciferase-Reaktion liegt bei 562 nm).

Damit die Änderung der ATP-Konzentration in linearem Zusammenhang mit der GAMT-Aktivität steht, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

Erstens sollten die Ausgangssubstrate Guanidinoacetat und SAM soweit im Überschuss vorliegen, dass Reaktion (1) näherungsweise nach nullter Ordnung d.h. mit maximaler Geschwindigkeit verläuft. Die Konzentrationen an eingesetztem Guanidinoacetat (2 mM) und an SAM (250  $\mu\text{M}$ ) liegen etwa 100-fach über dem für GAMT (aus der Ratte) beschriebenen  $K_m$ -Werten (22,7  $\mu\text{M}$  bzw. 2,7  $\mu\text{M}$ , Takata et al., 1991). Somit lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung für beide Substrate (hier gezeigt für SAM) wie folgt vereinfachen („ $\sim$ “ bedeutet hier „näherungsweise gleich“):

$$v = V_{\max} [\text{SAM}] / (K_{\text{m}_{\text{SAM}}} + [\text{SAM}]), \text{ für } [\text{SAM}] \sim 100 * K_{\text{m}_{\text{SAM}}}$$

$$v \sim V_{\max} = k_{\text{cat}} * [\text{GAMT}]_{\text{total}}$$

$k_{\text{cat}}$  ist die katalytische Rate,  $[\text{GAMT}]_{\text{total}}$  ist die totale GAMT-Konzentration.

Damit ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  nur eine Funktion der totalen GAMT-Konzentration  $[\text{GAMT}]_{\text{total}}$ .

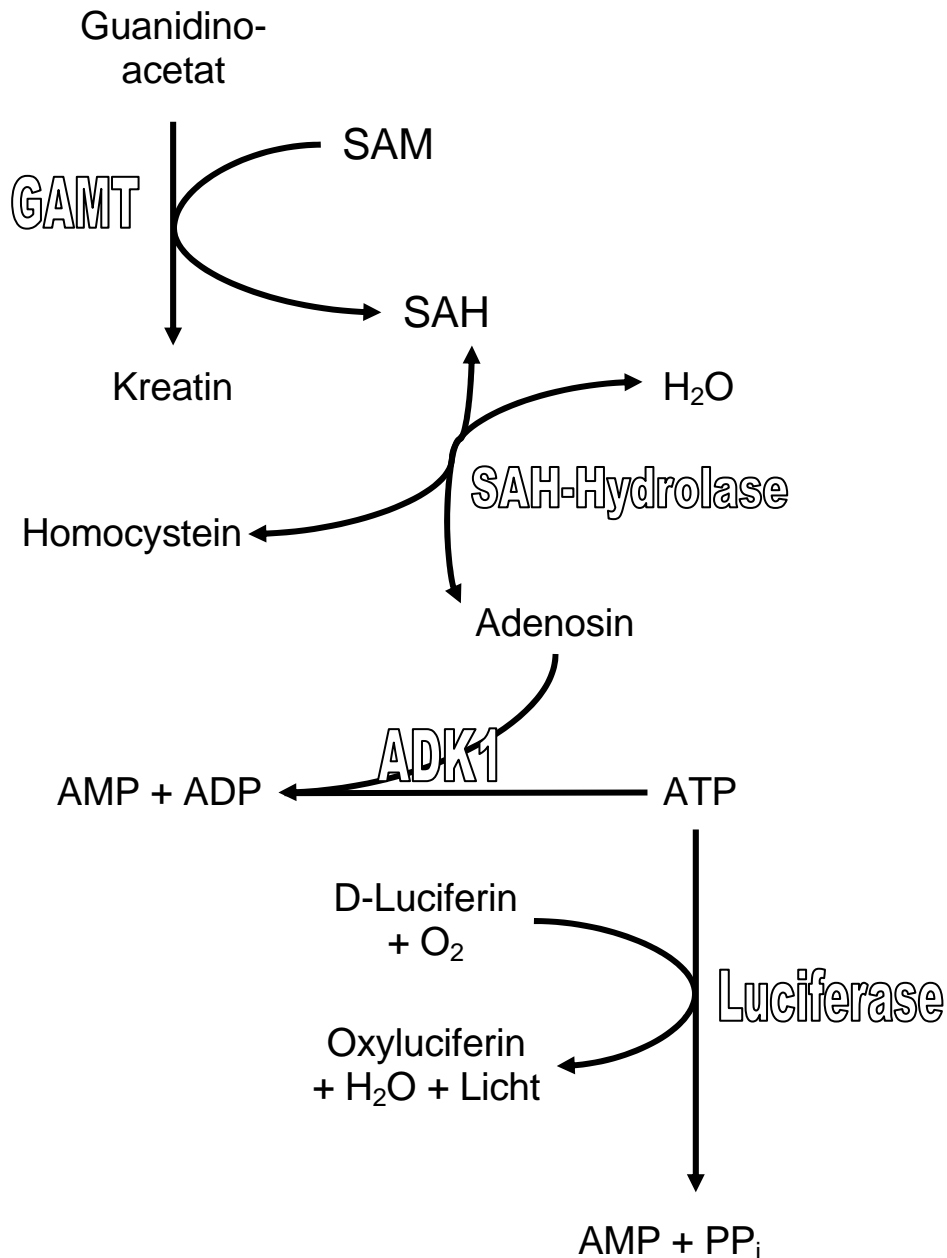


Abbildung 6: Schematische Darstellung der gekoppelten Reaktion zur Messung der GAMT-Aktivität. Guanidinoacetat und SAM (S-Adenosyl-L-Methionin) werden durch GAMT zu Kreatin und SAH (S-Adenosyl-L-Homocystein) umgesetzt. SAH wird durch die SAH-Hydrolase in Homocystein und Adenosin gespalten. Adenosin wird mit ATP durch ADK1 (Adenosinkinase 1) zu AMP und ADP umgewandelt. Die ATP-Konzentration wird luminometrisch über die Luciferase-Reaktion gemessen.

Zweitens sollte die Gesamtreaktion und daher insbesondere die letzte Reaktion (3) irreversibel verlaufen. Die Adenosinkinase (ADK1) besitzt eine hohe Affinität für Adenosin ( $K_{m_{\text{Adenosin}}} = 0,5 \mu\text{M}$ ) und katalysiert ausschließlich die Umsetzung von Adenosin und ATP zu AMP und ADP und nicht die Rückreaktion (Pallela et al., 1980, Moffatt et al., 2000). Weiterhin ist die Umsetzungsrate von Adenosin durch Adenosinkinase sehr hoch ( $V_{\text{max}}/K_{m_{\text{Adenosin}}} = 5,4 \text{ L/min*mg protein}$ ). Damit ist eine Akkumulation der Zwischenprodukte SAH und Adenosin ausgeschlossen. Insbesondere die Umsetzung von SAH ist bedeutsam, da die SAH-Hydrolase-Reaktion reversibel abläuft und damit eine konzentrations-abhängige Reaktionsrichtung zeigt. Zusätzlich wirkt SAH inhibitorisch auf die GAMT-Aktivität.

Schließlich sollten die beiden Folgereaktionen (2) und (3) nach 1. Ordnung (genauer gesagt nach Pseudo- 1. Ordnung, da mindestens zwei Substrate umgesetzt werden) ablaufen. Für Reaktion (2) trifft dies zu, solange die SAH-Konzentration  $[\text{SAH}]$  deutlich unterhalb dem  $K_{m_{\text{SAH}}}$ -Wert ( $12 \mu\text{M}$ , Porter und Boyd, 1991) für die SAH-Hydrolyse liegt. Dies gilt, wenn Adenosin kontinuierlich durch Reaktion (3) umgesetzt wird.

$$v = V_{\text{max}} * [\text{SAH}] / (K_{m_{\text{SAH}}} + [\text{SAH}]), \text{ für } [\text{SAM}] \ll K_{m_{\text{SAH}}}$$

$$v \sim V_{\text{max}} * [\text{SAH}] / K_{m_{\text{SAH}}}$$

Damit ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  nur eine Funktion der SAH-Konzentration  $[\text{SAH}]$  und die Reaktion eine 1. Ordnung.

Für eine mathematische Abschätzung der Reaktion (3) wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um eine geordnete „Bi Bi“ Reaktion handelt. D.h. es wird vorausgesetzt, dass zunächst Adenosin an ADK1 ( $K_{m_{\text{Adenosin}}} = 0,5 \mu\text{M}$ ) bindet bevor ATP ( $K_{m_{\text{ATP}}} = 350 \mu\text{M}$ ) gebunden und umgesetzt wird (Moffatt et al., 2000). Im „Steady State“ ergibt sich folgender Zusammenhang (Segal, 1993;  $K_{\text{DisAdenosin}}$  ist die Dissoziationskonstante von Adenosin mit ADK1; auf das Multiplikationszeichen „\*“ wurde zwischen den Substratkonzentrationen [...] verzichtet):

$$v / V_{\text{max}} =$$

$$[\text{Adenosin}][\text{ATP}] / K_{\text{DisAdenosin}} * K_{m_{\text{ATP}}} + K_{m_{\text{ATP}}} * [\text{Adenosin}] + K_{m_{\text{Adenosin}}} * [\text{ATP}] + [\text{Adenosin}][\text{ATP}]$$

da die eingesetzte ATP-Konzentration ( $67 \text{ nM}$  s.u. Protokoll der Messung) deutlich unterhalb der Michaelis-Menten-Konstanten liegt  $[\text{ATP}] \ll K_{m_{\text{ATP}}}$  kann die Gleichung wie folgt vereinfacht werden:

$$v / V_{\max} = [\text{Adenosin}][\text{ATP}] / K_{m_{\text{ATP}}} * (K_{\text{DisAdenosin}} + [\text{Adenosin}]) \text{ oder}$$

$$v = V_{\max} * [\text{Adenosin}][\text{ATP}] / K_{m_{\text{ATP}}} * (K_{\text{DisAdenosin}} + [\text{Adenosin}])$$

Dies bedeutet, dass die Reaktion in Bezug auf die zu messende ATP-Konzentration nach 1. Ordnung abläuft, wenn die Adenosin-Konzentration etwa konstant bleibt. Dies gilt insbesondere wenn  $[\text{Adenosin}] \gg [\text{ATP}] = 67 \text{ nM}$ .

Diese Voraussetzung könnte zu Beginn der Reaktionskette nicht erfüllt sein, wenn die davorliegende Reaktion (2) nicht mit entsprechender Geschwindigkeit Adenosin nachliefern kann. Daher wurden die Messungen in zwei unterschiedlichen Varianten durchgeführt. Eine kontinuierliche Messung, bei der die ATP-Zugabe unmittelbar nach Reaktionsstart (durch Zugabe von SAM) erfolgt oder als sog. „Endpunkt“-Messung bei der erst 5-10 min nach Reaktionsstart die ATP-Zugabe bewerkstelligt wird. Bei letzterer Variante ist die angefallene Adenosin-Konzentration mindestens im Bereich von  $K_{m_{\text{Adenosin}}}$  und somit deutlich oberhalb der ATP-Konzentration, so dass die ATP-Umsetzung nach einer Reaktion 1. Ordnung abläuft. Jedoch kann die Akkumulation von Adenosin bis zur ATP-Zugabe eine teilweise Umkehrung der Reaktion (2) bewirken und schließlich auch zur Akkumulation von SAH und damit Hemmung der GAMT führen.

Anzumerken ist, dass auch die Luciferase-Reaktion (4) mit einem, wenn auch sehr langsamen ATP-Abfall einhergeht. Dies kann insbesondere bei niedrigen Adenosin-Konzentrationen zu einer Überschätzung der ADK-Reaktion (3) führen.

#### Protokoll der Messung:

Verdünnungsreihe mit Adenosin erstellen

[60  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 0,6  $\mu\text{M}$ , 0  $\mu\text{M}$  Adenosin in je 50  $\mu\text{L}$  Tris-Acetat-Puffer, pH 7,75]

20 (- 30)  $\mu\text{L}$  Probe (GAMT) + 20  $\mu\text{L}$  Tris-Acetat-Puffer + 1  $\mu\text{L}$  DTT (0,5 M)

+ 6  $\mu\text{L}$  Guanidinoacetat (20 mM) + 1  $\mu\text{L}$  SAH-Hydrolase, Präinkubation 37°C, 5 min

+ 1  $\mu\text{L}$  Deoxycoformycin (150  $\mu\text{M}$ )

+ 3  $\mu\text{L}$  SAM (5 mM) [Starten der Reaktion]

alternativ zu SAM: + 3  $\mu\text{L}$  Tris-Acetat-Puffer [Kontroll-Reaktion, Messung des Luciferase-bedingten ATP-Abfalls]

Testvarianten: für kontinuierliche Messung direkt weiter zur ATP-Bestimmung  
für „Endpunkt“-Messung Inkubation 5-10 min bei 37°C

50 µL aus GAMT-Reaktion bzw. Adenosin für folgende Reaktion bei Raumtemperatur einsetzen:

+ 130 µL Tris-Acetat-Puffer + 6 µL Deoxycoformycin (150 µM)

+ 100 µL ATP Monitoring Reagent

+ 2 µL Adenosinkinase (ADK1 0,2 µg / mL)

Messung: Nullabgleich

+ 20 µL ATP (1µM, 1/10 Verdünnung in Tris-Acetat-Puffer) Reaktion starten

Messung: nach 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 min

Stoppen der Reaktion mit 3 µL 5-Iodotubercidin 25 µM in Tris-Acetat-Puffer [Stocklösung 25 mM = 9,8 mg/ml DMSO (MG 392,2)].

#### Datenanalyse durch Kurvenanpassung

Wie oben ausgeführt kann die gekoppelte Reaktion zur Messung der GAMT-Aktivität (s. Abb. 6) näherungsweise als Reaktion 1. Ordnung behandelt werden. Somit lässt sich die Abnahme der ATP-Konzentration über die Zeit durch eine Zerfallskurve annähern. Entsprechend wurden die luminometrisch gemessenen Daten an folgende Gleichung mit Hilfe des Programms Origin 7.0 angepasst:

$$I(t) = I_{\max} \cdot \exp(-t/t_1) + I_0,$$

wobei I die luminometrische Intensität,  $I_{\max}$  die maximale luminometrische Intensität bei Reaktionsbeginn, exp die e-Funktion,  $t_1$  die Zerfallskonstante und  $I_0$  die luminometrische Intensität bei Reaktionsende darstellen.

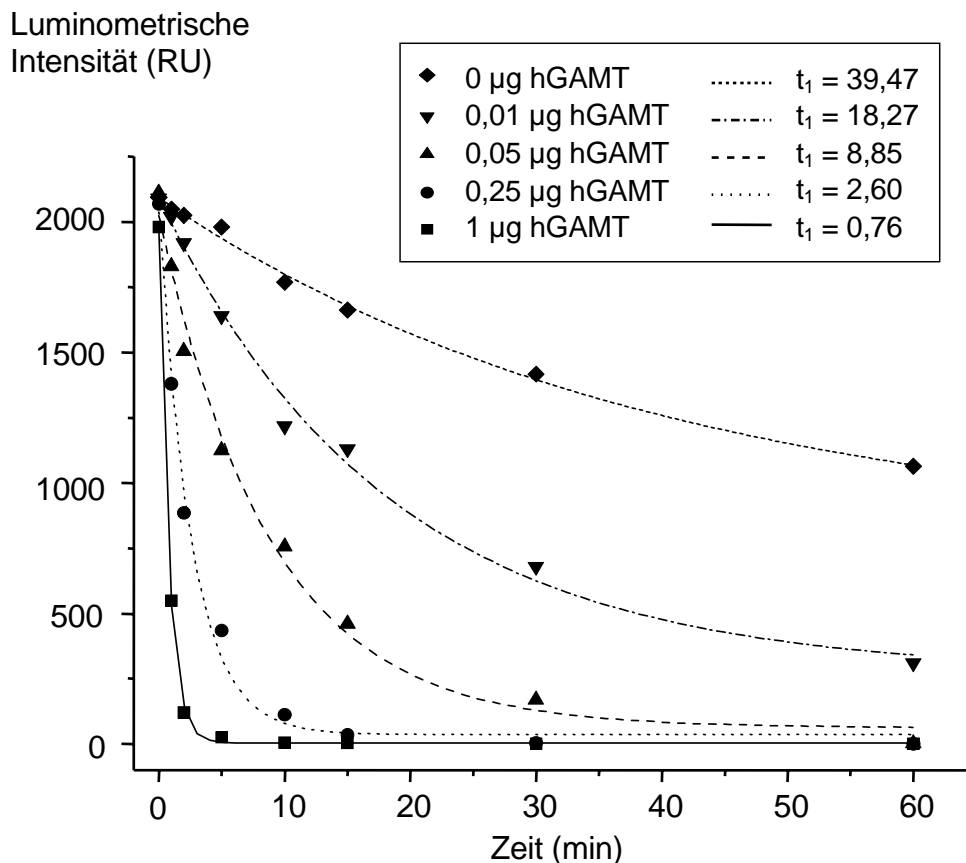


Abbildung 7: Kurvenanpassung der luminometrischen Daten zur Messung der GAMT-Aktivität. Die im Zeitverlauf gemessenen luminometrischen Intensitäten aus der gekoppelten Reaktion (s. Abb. 6) wurden für unterschiedliche Mengen humaner GAMT (0-1 µg) einer exponentiellen Zerfallskurve angepasst. Für die unterschiedlichen hGAMT-Mengen ergeben sich verschiedene Zerfallskonstanten  $t_1$ .

Den Kurvenanpassungen ist zu entnehmen, dass innerhalb der ersten 5 Minuten der ATP-Abfall aufgrund der Luciferase-Reaktion (entspricht Kurve für 0 µg hGAMT) vernachlässigbar ist, dass jedoch nach 60 Minuten die ATP-Konzentration auf 50% der Ausgangs-Konzentration abgefallen ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass bei der niedrigsten Menge an hGAMT (0,01 µg) sich die Kurve nicht der Abszisse nähert, d.h.  $I_0$  ungleich Null ist. Dies bedeutet, dass in diesem Falle die Reaktion nicht nach 1. Ordnung abläuft, da für den vorliegenden experimentellen Ansatz nur  $I_0 = 0$  plausibel ist.

Wenn die Testvariante zur Endpunktmessung verwendet wurde, d.h. wenn nach Zugabe von SAM zunächst eine Präinkubation von 10 Minuten bei 37°C erfolgte, bevor die Reagenzien der Adenosinkinase-Reaktion (3) hinzugefügt wurden, zeigte sich ein vergleichbarer Abfall der ATP-Konzentration im Verlauf (Tabelle 2).



ZEIT [min]	hGAMT [µg]				
	1	0,25	0,05	0,01	0
1	291	335	825	1218	2050
2	115	237	780	1152	2095
5	5,3	178	716	1130	1980
10	3,8	112	622	975	1769
15	2,8	36	460	874	1662
30	1,8	3,7	169	677	1418
60	1,2	1,2	2,1	310	1064

Tabelle 2: Testvariante der GAMT-Aktivitätsmessung mit 10 min Präinkubation vor dem Start der Adenosinkinase-Reaktion: Luminometrische Intensitäten im Zeitverlauf und in Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen von zugesetzter humaner GAMT.

Im Vergleich zu den Daten der kontinuierlichen Messung (Abb. 7) ist bereits nach 1 Minute ein deutlicher Intensitätsabfall zu erkennen, worauf ein GAMT-abhängiger Intensitätsabfall folgt. Dies erklärt sich durch die anfänglich rasche Umsetzung von Adenosin (Reaktion 3), das sich während der 10-minütigen Präinkubation angehäuft hat. Weiterhin lässt sich feststellen, dass der Intensitätsabfall nach 1 Minute für 1 µg hGAMT nur unwesentlich größer ist als der für 0,25 µg, dass aber im weiteren zeitlichen Verlauf die Intensität für 1 µg wesentlich schneller abfällt als für 0,25 µg und für die anderen hGAMT-Mengen. Dies lässt sich mit der Umkehrbarkeit der SAH-Hydrolase-Reaktion (2) erklären. Wie oben beschrieben kommt es bei einer Anhäufung von Adenosin zu einer Umkehrung der Reaktion bzw. es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückreaktion ein. Im Gleichgewichtszustand bleibt die Adenosinkonzentration konstant. Die Höhe der Adenosinkonzentration im Reaktionsgleichgewicht hängt von der Konzentration des Enzyms SAH-Hydrolase ab und diese ist für die unterschiedlichen Zusätze an hGAMT gleich bemessen. Nur das Zeitintervall bis zur Einstellung des Gleichgewichts der SAH-Hydrolase-Reaktion wird durch die Menge an zugesetzter hGAMT bestimmt.

#### Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Geht man von einer Reaktion 1. Ordnung aus, so lassen sich die Reaktionsgeschwindigkeiten leicht aus den Zerfallskonstanten (s. Abb. 7) errechnen, da folgendes gilt:

$$v = k_1 * [ATP]_{\max} \sim -dI(t)/dt = 1/t_1 * I_{\max}$$

wobei  $v$  die Reaktionsgeschwindigkeit,  $k_1$  die Reaktionskonstante und  $[ATP]_{\max}$  die maximale ATP-Konzentration bei Reaktionsbeginn darstellen. Das Zeichen „ $\sim$ “ bedeutet, dass die Intensitätsabnahme proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit ist, dass sich jedoch die Einheitsgrößen voneinander unterscheiden. Auch für die Testvariante (Endpunktmessung) können die Reaktionsgeschwindigkeiten über Dreisatz bei  $I_{\max} = 2073 = 20 \text{ pmol} = \text{eingesetzte ATP-Menge zu Beginn der Reaktion}$  errechnet werden. Die Reaktionsumsätze werden schließlich auf die eingesetzte Menge an hGAMT bezogen.

Reaktionsgeschwindigkeit [nmol/min*mg]	hGAMT [µg]			
	1	0,25	0,05	0,01
$v$ [kontinuierlich]	26	31	45	109
$v$ [Endpunkt 1 min]	17	84	241	825
$v$ [Endpunkt 5 min]	4	18	52	182

Tabelle 3: Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten  $v$ .  $v$  [kontinuierlich] wurde mit Hilfe der Zerfallskonstanten  $t_1$  (s. Abb. 7) errechnet.  $v$  [Endpunkt] für die Testvariante mit 10 min Präinkubation wurde nach 1-minütiger oder 5-minütiger Reaktion über Dreisatz bestimmt. (pmol/min\*µg = nmol/min\*mg)

Die hier gefundenen Reaktionsgeschwindigkeiten sind mit denen in der Literatur beschriebenen Werten für  $V_{\max}$  vergleichbar:  $V_{\max} = 130 \text{ nmol/min*mg}$  für rekombinante Ratten-GAMT und  $V_{\max} = 122 \text{ nmol/min*mg}$  für aus Rattenleber aufgereinigte GAMT (Ogawa et al. 1988).

Möglicherweise bewirkt eine verzögerte SAH-Hydrolase-Reaktion (2) eine Verlangsamung der Gesamtreaktion, so dass die in der Literatur angegebene maximale Geschwindigkeit der GAMT-Reaktion nicht erreicht werden kann. Durch die 10-minütige Präinkubation werden die scheinbaren Reaktionsgeschwindigkeiten für niedrige GAMT-Mengen überschätzt. Andererseits wird damit auch die Nachweisgrenze für GAMT herabgesetzt.

Aus dem Vergleich der beiden Testvarianten lässt sich folgende Schlussfolgerung ziehen: Für hohe hGAMT-Konzentrationen eignet sich die kontinuierliche Messung, für niedrigere hGAMT-Konzentrationen ist die Endpunktmessung zweckmäßiger.

#### 4.4 Expression der hGAMT mRNA in unterschiedlichen Geweben

„Northern blots“ und „dot blots“ mit bereits immobilisierter RNA verschiedener menschlicher Gewebe wurden von Clontech Palo Alto, CA, USA erworben [Multiple Tissue Northern (MTN™)]

Blot, PT1200-1 und Multiple Tissue Expression (MTE™) Array, PT3307-1]. Eine <sup>32</sup>P-markierte Probe der kodierenden hGAMT cDNA wurde mit dem Megaprime DNA Labelling System (Amersham Biosciences, Freiburg, RPN1606) und <sup>32</sup>P-markiertem dCTP (Amersham Biosciences, Freiburg, AA0005-250μCi) hergestellt. Nach Inkubation mit Prähybridisierungslösung (ExpressHyb™ Hybridization Solution) für 30 min wurde die Membran für 1h mit der radioaktiven Probe in Hybridisierungslösung (ExpressHyb™ Hybridization Solution) inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran mit 2xSSC/0,05%SDS und mit 0,1xSSC/0,1%SDS bei 50°C für 2x15 min gewaschen. Die Membran wurde in Plastikfolie gehüllt und durch Autoradiographie markierte Bereiche dargestellt. Abbildung 8 zeigt das Expressionsmuster der hGAMT.

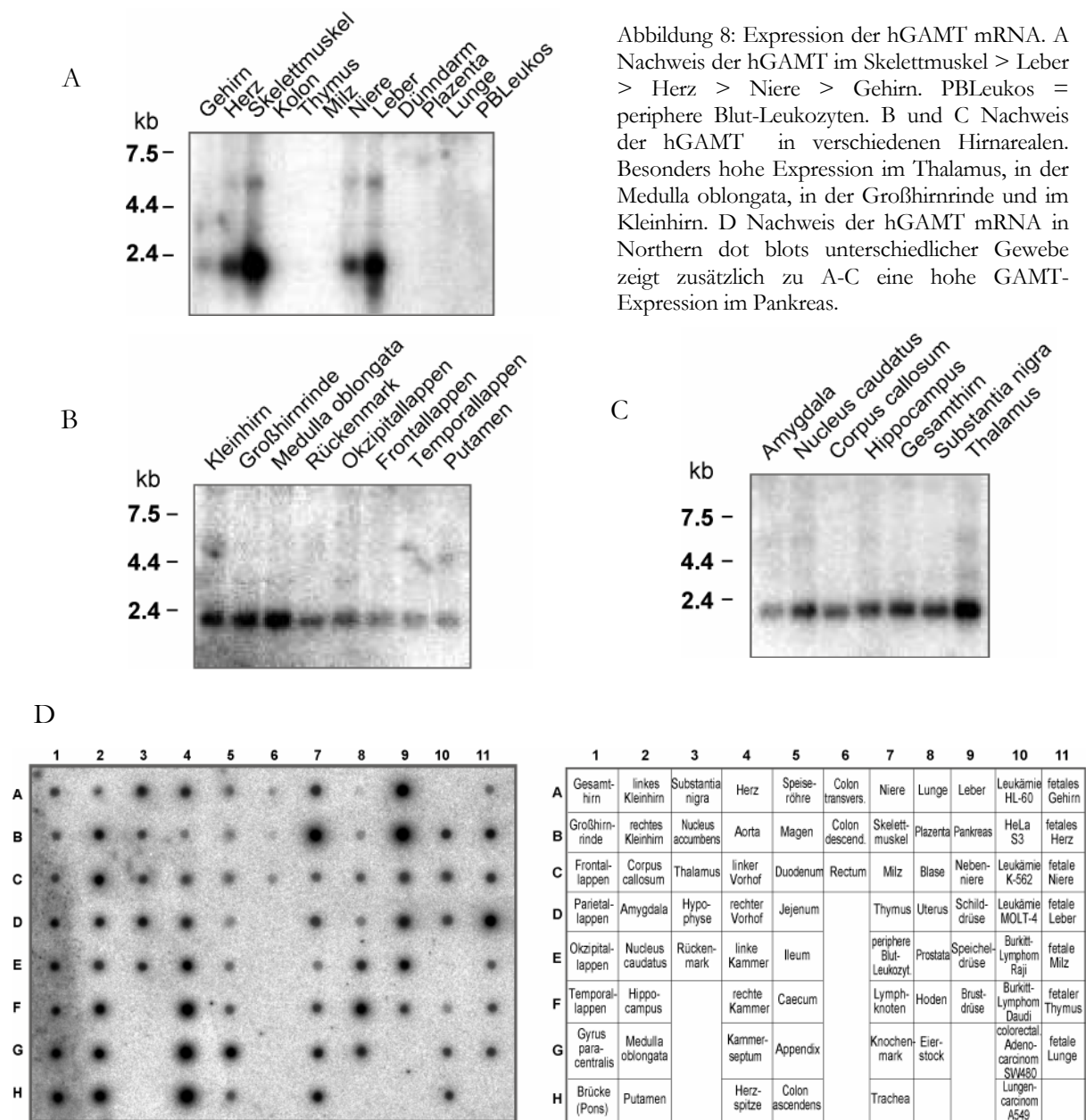


Abbildung 8: Expression der hGAMT mRNA. A Nachweis der hGAMT im Skelettmuskel > Leber > Herz > Niere > Gehirn. PBL leukos = periphere Blut-Leukozyten. B und C Nachweis der hGAMT in verschiedenen Hirnarealen. Besonders hohe Expression im Thalamus, in der Medulla oblongata, in der Großhirnrinde und im Kleinhirn. D Nachweis der hGAMT mRNA in Northern dot blots unterschiedlicher Gewebe zeigt zusätzlich zu A-C eine hohe GAMT-Expression im Pankreas.

Die Signalintensität der hGAMT spezifischen mRNA ist am stärksten in Skelettmuskel, Leber, Herz, Niere und Gehirn nachweisbar (Abb. 8A). Ein Vergleich der hGAMT-Transkription zwischen unterschiedlichen Gehirnregionen zeigt, dass die höchste mRNA-Expression in der Medulla oblongata, in der Großhirnrinde, im Kleinhirn und im Thalamus vorhanden ist (Abb. 8 B und C). Die Intensität der hGAMT spezifischen mRNA konnte mittels gewebsspezifischer „dot blots“ bestätigt und zusätzlich eine hohe Expression im Pankreas nachgewiesen werden (Abb. 8 D).

#### 4.5 Expression des hGAMT-Proteins in unterschiedlichen Geweben

Proteinlysate aus humanen Geweben [Gehirn, Skelettmuskel, Niere, Leber und Ileum] wurden von Clontech Palo Alto, CA, USA erworben. Jeweils 50 µg Proteinlysate wurde durch PAGE getrennt und auf einer Nitrocellulose-Membran (Protran, Schleicher und Schüll, Dassel/Reliehausen) immobilisiert. Der Blot wurde mit Block-Lösung für 2h bei 37°C präinkubiert. Affinitätsgereinigter Kaninchen anti-hGAMT-Antikörper wurde 1:1000 in Block-Lösung verdünnt und 4h mit der Membran inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Wasch-Lösung wurde die Membran mit Meerrettichperoxidase konjugiert an Ziege anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg) in Block-Lösung (1:10.000) für 1h inkubiert. Nach erneutem

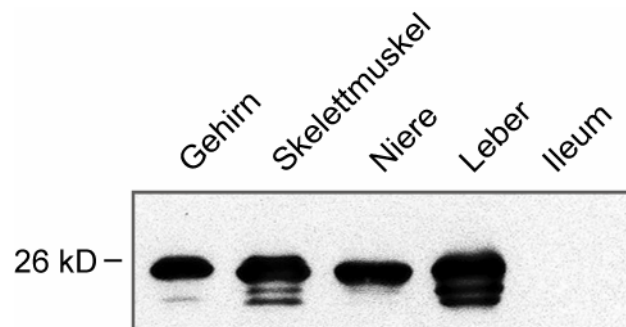


Abbildung 9: Expression des hGAMT-Proteins. Western blot mit jeweils 50 µg Protein aus humanem post-mortem Gewebe inkubiert mit anti-hGAMT-Antikörper. Höchste GAMT-Expression in Leber und Skelettmuskel. Niedermolekulare Banden stellen wahrscheinlich Degradationsartefakte dar.

Waschen wurden die Membran mit dem Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal West Pico Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert und die Chemilumineszenz-Signale auf BioMax MR Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert (s. Abb. 9). Die Expression des hGAMT-Proteins ist deutlich in Leber, Skelettmuskel, Niere und Gehirn aber nicht im Ileum nachweisbar und ist somit kompatibel mit dem Expressionsmuster der mRNA (s. Abschnitt 4.3).

#### 4.6 Expression der mGAMT mRNA in Mausgewebe

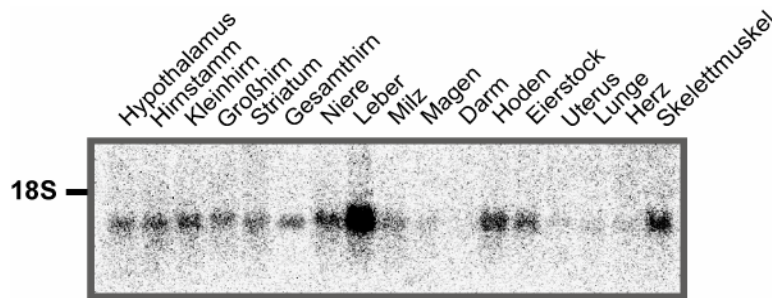


Abbildung 10: Expression der mGAMT mRNA. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA des angegebenen Gewebes wurden pro Spur gelelektrophoretisch getrennt, auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit einer <sup>32</sup>P-markierten mGAMT-Probe hybridisiert. Nachweis der mGAMT in Leber > Skelettmuskel > Hoden > Niere > Eierstock > Kleinhirn, anderen Hirnbereichen, Milz, Magen, Herz, Lunge, Uterus.

markierte Probe der kodierenden mGAMT cDNA wurde mit dem Megaprime DNA Labelling System (Amersham Biosciences, Freiburg, RPN1606) und <sup>32</sup>P-markiertem dCTP (Amersham Biosciences, Freiburg, AA0005-250µCi) hergestellt. Nach Inkubation mit Prähybridisierungslösung für 30 min wurde die Membran für 1h mit der radioaktiven Probe in Hybridisierungslösung inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran mit 2xSSC/0,1%SDS, mit 0,2xSSC/0,1%SDS und mit 0,1xSSC/0,1%SDS bei 50°C für 2x15 min gewaschen. Die Membran wurde in Plastikfolie gehüllt und durch Autoradiographie markierte Bereiche dargestellt. Abbildung 10 zeigt das Expressionsmuster der mGAMT mRNA in adultem Mausgewebe. Ähnlich dem gewebsspezifischen Expressionsmuster der hGAMT-mRNA (Abschnitt 4.3) lässt sich die mGAMT mRNA am stärksten in Leber und im Skelettmuskel detektieren. Hohe mGAMT Expression findet sich auch in den Gonaden (Hoden und Eierstöcke), in der Niere und in verschiedenen Hirnarealen.

Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben wurde mit der Guanidinium-Methode (Chomczynski and Sacchi 1987) isoliert, durch Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese getrennt und mittels Kapillartransfer auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Eine <sup>32</sup>P-

#### 4.7 Expression des mGAMT-Proteins in unterschiedlichen Geweben

Proteinlysate von verschiedenen Mausgeweben und unterschiedlichen Gehirnregionen hergestellt. Hierzu wurden Gewebestücke von bis zu 100 mg homogenisiert in Lyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1/10

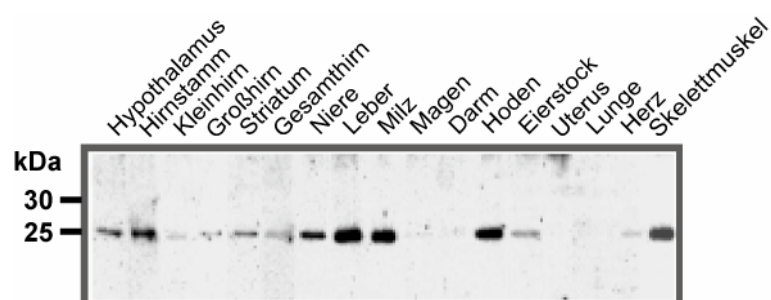


Abbildung 11: Expression des mGAMT-Proteins. Western blot mit jeweils 40 µg Protein aus verschiedenen Maus-Geweben, inkubiert mit anti-mGAMT-Antikörper. Höchste GAMT-Expression in Leber, Milz, Hoden und Skelettmuskel.

Volumen Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma, Taufkirchen, P2714 gelöst in 10 mL). Nach Inkubation für 15 min bei 4°C wurde die Suspension für 15 min mit 10.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. In den Lysaten wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und jeweils 40 µg Protein pro Spur durch SDS-PAGE über ein 12,5% Gel getrennt. Durch ElektrobloTTing wurden die getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Schleicher und Schüll, Dassel/Reliehausen) immobilisiert. Der Blot wurde mit Block-Lösung für 2h bei 37°C präinkubiert. Affinitätsgereinigter Kaninchen anti-mGAMT-Antikörper wurde 1:1000 in Block-Lösung verdünnt und 4h mit der Membran inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Wasch-Lösung wurde die Membran mit Meerrettichperoxidase konjugiert an Ziege anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg) in Block-Lösung (1:10.000) für 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Membran mit dem Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal West Pico Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert und die Chemilumineszenz-Signale auf BioMax MR Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert (s. Abb. 11). Die Expression des mGAMT-Proteins ist am stärksten in Leber, Skelettmuskel, Milz, Hoden, Niere und Gehirn und entspricht damit weitestgehend der Expressionsverteilung der mGAMT spezifischen mRNA (s. Abschnitt 4.5).

## 5 DISKUSSION

Patienten mit Störungen der Kreatinbiosynthese weisen einen systemischen Mangel an Kreatin und Kreatinphosphat auf. Im Gegensatz hierzu finden sich beim Kreatintransporter-Defekt normale extrazelluläre Kreatin und Kreatinphosphat-Konzentrationen im Plasma und Urin, jedoch erniedrigte Kreatin und Kreatinphosphat-Konzentrationen im Liquor und überwiegend intrazellulär. Die GAMT-Defizienz wurde 1994 als erste der Kreatin-Defizienz-Syndrome entdeckt und zeigt den schwersten Phänotyp. Um die pathophysiologischen Zusammenhänge besser zu verstehen, wurden Expressionsstudien zur humanen und murinen GAMT von mir durchgeführt.

Zunächst wurde die prokaryotische Expression der GAMT in *E.coli* etabliert. Für die Klonierung der cDNA der humanen und murinen GAMT wurden zunächst die N-Termini durch entsprechende PCR-Primer modifiziert, um diese in den Expressionsvektor pQE-9 zu klonieren. Da ein initialer Klonierungsversuch mit dem vollständigen cDNA nicht gelang, wurde zunächst ein N-terminales Fragment in den Klonierungsvektor pBluescript eingebracht. Im Falle der cDNA der humanen GAMT wurde zusätzlich eine Enterokinase-Schnittstelle eingefügt, um eine mögliche Beeinträchtigung der GAMT-Aktivität durch die Polyhistidin-Sequenz nachträglich auszuschalten. Da sich sowohl die rekombinante humane als auch die rekombinante murine GAMT als enzymatisch aktiv erwiesen, wurde auf die Entfernung der Polyhistidin-Sequenz verzichtet. Es ist nicht auszuschließen, dass das Einfügen der Polyhistidin-Sequenz bzw. im Falle der humanen GAMT das Einfügen der Polyhistidin- plus der Enterokinase-Erkennungs-Sequenz, zu einer geringgradigen Beeinträchtigung der GAMT-Aktivität führt.

Die prokaryotische Expression der GAMT wurde in zwei unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen, M15[pREP4] und TOP 10 getestet. Dabei zeigte sich, dass die Hintergrundexpression ohne Induktion mit IPTG in den TOP 10-Zellen deutlich höher ausfiel. Idealerweise sollte im nicht-induzierten Zustand keine GAMT-Expression erfolgen, um einen Selektionsnachteil beim Kulturwachstum zu vermeiden. Bei den TOP 10-Zellen ist der Lac-Repressor im Genom integriert, bei den M15[pREP4]-Zellen auf dem pREP4-Plasmid enthalten. Möglicherweise ist der auf dem Plasmid enthaltende Repressor wirksamer, da in jeder Bakterienzelle mehrfache Plasmidkopien vorhanden sind. Aus den o.g. Gründen wurden für die GAMT-Expression in großem Maßstab ausschließlich M15[pREP4]-Zellen verwendet. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe eines Imidazol-Gradienten, der konzentrationsabhängig Proteine von einer Nickel-Nitrilotriacetat-Säule eluiert, durchgeführt. Es ist bekannt, dass Polyhistidin-Sequenzen besonders gut an Nickel binden und

somit erst bei hohen Imidazol-Konzentrationen eluieren. Bei der Aufreinigung der murinen GAMT zeigten sich mehr kontaminierende Proteine als bei der Aufreinigung der humanen GAMT, so dass für die Immunisierung der Kaninchen die humane GAMT verwendet wurde.

Erstmals in dieser Arbeit ist es gelungen einen hochsensitiven nichtradioaktiven Aktivitätsnachweis der GAMT zu etablieren. Dabei wurde die hohe Sensitivität luminometrischer Messverfahren durch eine gekoppelte Reaktion genutzt. Für die Umsetzung von Guanidinoacetat und SAM zu Kreatin und SAH wurde die Konzentration der Reaktanten so gewählt, dass die Reaktion ausschließlich von der eingesetzten GAMT-Menge abhängt. Die Folgereaktion, d.h. die Umsetzung von SAH zu Homocystein und Adenosin wird durch das Enzym SAH-Hydrolase katalysiert. Da diese Reaktion reversibel ist, muss eine Anhäufung der Reaktionsprodukte vermieden werden. Dies wird durch die nachfolgende Reaktion, die irreversible Umsetzung von Adenosin und ATP zu AMP und ADP erreicht. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass die Gesamtreaktion näherungsweise nach einer Reaktion 1. Ordnung abläuft. Durch Kurvenanpassung der gemessenen luminometrischen Daten ließ sich zeigen, dass für GAMT-Mengen ab 50 ng eine Reaktion 1. Ordnung ein passendes approximatives Modell darstellt. Durch Präinkubation der ersten beiden Reaktionen wird die Sensitivität des GAMT-Nachweises erhöht, jedoch lässt sich somit keine exakte Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch keine genaue GAMT-Menge ermitteln. Das Reaktionsprotokoll mit Präinkubation kann jedoch zum vergleichenden Nachweis geringer GAMT-Mengen insbesondere unterhalb von 50 ng dienen.

Schließlich wurden einige Testversuche unternommen, um mit Hilfe der dargestellten gekoppelten Reaktion GAMT in Zelllysaten nachzuweisen. Hierzu wurden verschiedene Inhibitoren anderer Kinasen dem Reaktionsansatz einzeln und in Kombination zugefügt. Als Kreatinkinase-Inhibitor wurde Kreatininphosphat (Gercken and Doring 1974) und als Adenylatkinase-Inhibitor Ap5A (= Diadenosin-Pentaphosphat) in einer Konzentration von 20  $\mu$ M verwandt. Leider konnte durch Zusatz dieser Inhibitoren der ATP-Abbau im Gemisch mit den Zelllysaten nicht verhindert werden. Es erscheint schwierig die ATP-Konzentration in Zelllysaten stabil zu halten, da zahlreiche Kinasen an der ATP-Umsetzung beteiligt sind. Daher wurde alternativ an eine selektive Gewinnung von GAMT aus Zelllysaten gedacht. So könnte z.B. GAMT aus Zelllysaten durch Immunpräzipitation isoliert und dann mittels der gekoppelten Reaktion luminometrisch nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der humanen und der murinen GAMT ergaben ähnliche Resultate, sowohl in Bezug auf den Nachweis spezifischer mRNA als auch in Bezug auf der Detektion des GAMT-Proteins. Die höchsten GAMT-Expressionsraten liegen in



Leber, Pankreas, Skelettmuskel, Herz, Niere, Keimdrüsen und Gehirn. Die niedrigste Expression weisen Lunge und Darm auf. Vergleicht man das Expressionsmuster der GAMT mit derjenigen der AGAT, so besteht eine annähernde Übereinstimmung. Die höchste Expression der AGAT lässt sich in Pankreas, Niere, Leber, Skelettmuskel und Gehirn nachweisen. Daraus folgt, dass Gewebe wie Skelettmuskel und Gehirn mit hohem Kreatinphosphat-Verbrauch zur de novo Synthese von Kreatin in der Lage sind. Allerdings reicht die Eigensynthese vermutlich in Skelettmuskel und Gehirn nicht aus. Kreatin wird gegen einen etwa tausendfachen Gradienten von extrazellulär (30-50  $\mu\text{M}$  im Plasma) nach intrazellulär (20-40 mM) transportiert. Der Kreatin-Transporter wird am stärksten in Skelettmuskel, Niere, Kolon, Gehirn, Herz, Hoden und Prostata exprimiert (Nash et al, 1994, Sora et al., 1994). Ein zweiter Typ von Kreatin-Transporter ist ausschließlich in Hoden nachweisbar und spielt keine Rolle bei den systemischen Kreatin-Defizienzen. Interessanterweise bestehen innerhalb des Gehirns unterschiedliche Expressionsmuster für den Kreatin-Transporter (Braissant et al., 2001). Während AGAT und GAMT in Neuronen, Oligodendrozyten sowie Astrozyten nachweisbar ist, wird der Kreatin-Transporter nur in Neuronen, Oligodendrozyten und in geringem Maße in kapillären Endothelzellen jedoch nicht in Astrozyten exprimiert. Unklar ist, inwieweit Kreatin und Guanidinoacetat zwischen unterschiedlichen Zelltypen innerhalb des ZNS transportiert wird; dabei wird Guanidinoacetat durch den gleichen Transporter wie Kreatin aufgenommen.

Der klinische Phänotyp ist bei der GAMT-Defizienz deutlich schwerer als bei den anderen Kreatin-Mangel-Syndromen. Hierfür können verschiedene mögliche Erklärungen verantwortlich gemacht werden. Die massiv erhöhte Konzentration von Guanidinoacetat kann zum einen eine kompetitive Hemmung der intrazellulären Aufnahme von exogen zugeführtem Kreatin verursachen, da beide über den gleichen Transporter internalisiert werden. Zum anderen wirkt Guanidinoacetat als partieller Agonist auf  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren und kann somit die neuronale Entwicklung stören. In jedem Falle reichen die derzeit angewandten Behandlungsverfahren wie Kreatinzufuhr, Argininrestriktion und Ornithinsupplementation nicht aus, um den Krankheitsverlauf wesentlich zu verbessern. Daher sind andere Vorgehensweisen erforderlich, die z.B. eine gentherapeutische Korrektur oder ein pharmakologischer Ersatz der GAMT bewirken. Unter der Voraussetzung, dass die Anhäufung von Guanidinoacetat wesentlich zur Pathophysiologie der GAMT-Defizienz beiträgt, wäre eine alleinige Korrektur der Leberexpression, z.B. durch Lebertransplantation, Zufuhr von Leberstammzellen oder leberspezifische Gentherapie, ein beträchtlicher Fortschritt in der Behandlung dieser Erkrankung. Durch die Wiederherstellung der leberspezifischen GAMT-Expression könnte die Plasmakonzentration von Guanidinoacetat normalisiert werden und

möglicherweise die Wirksamkeit der exogenen Kreatin-Zufuhr verbessert werden. Weitere tierexperimentelle Studien sind erforderlich, um geeignete Behandlungsverfahren zu entwickeln.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Zu den Kreatin-Defizienz-Syndromen gehören der Kreatin-Transporter-Defekt und zwei Störungen der Kreatin-Biosynthese, die AGAT-Defizienz und die GAMT-Defizienz. Letztere beruht auf einem Funktionsausfall des Enzym Guanidinoacetat N-Methyltransferase. Klinisch weisen Patienten mit einer GAMT-Defizienz eine mentale Retardierung, eine Sprachentwicklungsverzögerung, eine dystone Bewegungsstörung und zerebrale Krampfanfälle auf.

Die humane und die murine GAMT konnten in E.coli synthetisiert werden. Durch die Einführung einer Polyhistidin-Sequenz im Bereich des N-Terminus der GAMT wurde die Aufreinigung der GAMT über eine Nickel-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Die aufgereinigte GAMT wurde zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet. Zur Messung der enzymatischen Aktivität der rekombinant synthetisierten GAMT wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt, bei der über eine gekoppelte Reaktion die Umsetzung von S-Adenosyl-L-Methionin zu Homocystein und Adenosin gemessen wird. Die Bildung von Adenosin wurde luminometrisch über eine ATP-konsumierende Reaktion bestimmt. Schließlich wurde die GAMT-Expression in humanen und murinen Geweben untersucht. Hierbei zeigte sich, dass GAMT nicht nur in den Organen stark exprimiert wird, die als Ort der Kreatin-Synthese angesehen werden, sondern auch in Geweben mit hohem Kreatinphosphat-Umsatz wie Skelettmuskulatur und Gehirn.

Unter den Kreatin-Defizienz-Syndromen weist die GAMT-Defizienz den schwersten Krankheitsverlauf auf, der durch orale Zufuhr von Kreatin nur teilweise verbessert werden kann. Somit wird für eine zukünftige Behandlung der GAMT-Defizienz ein gentherapeutischer oder pharmakologischer Ersatz der GAMT notwendig sein. Die hier dargelegten Arbeiten stellen grundlegende Voraussetzungen für die Entwicklung geeigneter Therapieansätze dar.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Bamber BA, Twyman RE, Jorgensen EM (2003) Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br J Pharmacol* 138:883-893
- Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C (2001) Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 86:193-201
- Caldeira Araújo H, Smit W, Verhoeven NM, Salomons GS, Silva S, Vasconcelos R, Tomas H, Tavares de Almeida I, Jakobs C, Duran M (2005) Guanidinoacetate methyltransferase deficiency identified in adults and a child with mental retardation. *Am J Med Genet A* 133:122-127
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE, Salomons GS (2006) X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet* 119:604-610
- Gercken G, Doring V (1974) Inhibition of creatine kinase by creatinine phosphate. *FEBS Lett* 46:87-91
- Holtzman D, McFarland E, Moerland T, Koutcher J, Kushmerick MJ, Neuringer LJ (1989) Brain creatine phosphate and creatine kinase in mice fed an analogue of creatine. *Brain Res* 483:68-77
- Isbrandt D, von Figura K (1995) Cloning and sequence analysis of human guanidinoacetate N-methyltransferase cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1264:265-267
- Kan HE, Buse-Pot TE, Peco R, Isbrandt D, Heerschap A, de Haan A (2005) Lower force and impaired performance during high-intensity electrical stimulation in skeletal muscle of GAMT-deficient knockout mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C113-119
- Kan HE, Renema WK, Isbrandt D, 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
- Mandel JL (2004) Comparative frequency of fragile-X (FMR1) and creatine transporter (SLC6A8) mutations in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:730-731; author reply 731-732
- Mercimek-Mahmutoglu S, Stoeckler-Ipsiroglu S, Adami A, Appleton R, Araujo HC, Duran M, Ensenauer R, Fernandez-Alvarez E, Garcia P, Grolik C, Item CB, Leuzzi V, Marquardt I, Muhl A, Saelke-Kellermann RA, Salomons GS, Schulze A, Surtees R, van der Knaap MS, Vasconcelos R, Verhoeven NM, Vilarinho L, Wilichowski E, Jakobs C (2006) GAMT deficiency: features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology* 67:480-484
- Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, Rochelle JM, Suter ST, Gregor P, Seldin MF, Caron MG (1994) Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels* 2:165-174
- Neu A, Neuhoff H, Trube G, Fehr S, Ullrich K, Roeper J, Isbrandt D (2002) Activation of GABA(A) receptors by guanidinoacetate: a novel pathophysiological mechanism. *Neurobiol Dis* 11:298-307

- Ogawa H, Date T, Gomi T, Konishi K, Pitot HC, Cantoni GL, Fujioka M (1988) Molecular cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for guanidinoacetate methyltransferase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:694-698
- Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H, Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K, Terasaki T (2002) The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1327-1335
- Poo-Arguelles P, Arias A, Vilaseca MA, Ribes A, Artuch R, Sans-Fito A, Moreno A, Jakobs C, Salomons G (2006) X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inher Metab Dis* 29:220-223
- Renema WK, Schmidt A, van Asten JJ, Oerlemans F, Ullrich K, Wieringa B, Isbrandt D, Heerschap A (2003) MR spectroscopy of muscle and brain in guanidinoacetate methyltransferase (GAMT)-deficient mice: validation of an animal model to study creatine deficiency. *Magn Reson Med* 50:936-943
- Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers HH, Fryns JP, deGrauw TJ, Jakobs C, Salomons GS (2004) High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:97-105
- 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* 13:905-921
- Schulze A, Ebinger F, Rating D, Mayatepek E (2001) Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetic acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation. *Mol Genet Metab* 74:413-419
- Sora I, Richman J, Santoro G, Wei H, Wang Y, Vanderah T, Horvath R, Nguyen M, Waite S, Roeske WR, et al. (1994) The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 204:419-427
- Stockler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hanicke W, Frahm J (1994) Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* 36:409-413
- Stockler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von Figura K (1996) Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet* 58:914-922
- ten Hove M, Lygate CA, Fischer A, Schneider JE, Sang AE, Hulbert K, Sebag-Montefiore L, Watkins H, Clarke K, Isbrandt D, Wallis J, Neubauer S (2005) Reduced inotropic reserve and increased susceptibility to cardiac ischemia/reperfusion injury in phosphocreatine-deficient guanidinoacetate-N-methyltransferase-knockout mice. *Circulation* 111:2477-2485
- van der Knaap MS, Verhoeven NM, Maaswinkel-Mooij P, Pouwels PJ, Onkenhout W, Peeters EA, Stockler-Ipsiroglu S, Jakobs C (2000) Mental retardation and behavioral problems as presenting signs of a creatine synthesis defect. *Ann Neurol* 47:540-543
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-1213
- Zugno AI, Scherer EB, Schuck PF, Oliveira DL, Wofchuk S, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT (2006) Intrastratial administration of guanidinoacetate inhibits Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis* 21:41-50

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

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

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

Unterschrift: