

Einfluss einer in vitro Kreatin- und Guanidinoessigsäure-Behandlung auf verschiedene Genexpressionsmarker

(AZ 070306/08)

Martin Schönfelder

Technische Universität München, Lehrstuhl für Sport und Gesundheitsförderung

Problem

Einleitung

Das Nahrungsergänzungsmittel Kreatin erfreut sich in dem letzten Jahrzehnt zunehmender Popularität sowohl im Freizeit- als auch im Leistungssport. Dies liegt darin begründet, dass dieser Substanz ein potentiell „ergogener“ Effekt zugeschrieben wird. Zwar sind viele dieser Effekte in den vergangenen Jahren ansatzweise untersucht worden, aber durch die derzeit zunehmende und unübersichtliche Anzahl von Einzel- und Kombinationspräparaten sind die positiven Effekte nicht immer eindeutig zu erklären. Die chemische Darreichungsform von Kreatin ist einerseits in reiner Form, aber auch als Kreatin-Monohydrat und Kreatin-Citrat möglich. Diese Substanzen sind hinreichend erforscht und haben gezeigt, dass sie, besonders in Kraftsportarten, positive Effekte erwarten lassen. Wobei zu erwähnen ist, dass die Supplementierung teilweise mit einer unerwünschten Gewichtszunahme verbunden sein kann und somit für gewichtsrelevante Sportarten ungeeignet erscheint. Aufgrund der chemischen Instabilität von Kreatin in Lösung gehen die Bestrebungen in der Nahrungsmittelindustrie dahin, auch Vorstufen von Kreatin auf ihre potentielle Wirksamkeit zu untersuchen. Hierzu zählt auch die Substanz Guanidinoessigsäure (GAA), die in vivo als unmittelbare Vorstufe durch das Enzym GAA-Methyltransferase in Kreatin umgewandelt wird. GAA hat den Vorteil, in löslicher Form stabiler zu sein, birgt aber auch die Gefahr, dass in dem körpereigenen Syntheseprozess von GAA nach Kreatin hohe Homocystein-Mengen anfallen können. Homocystein stellt seinerseits einen kardiovaskulären Risikofaktor dar. Die natürliche Elimination von Homocystein erfolgt enzymatisch über die Bildung von Methionin oder Cystein, wobei der Umbau zu Methionin einen Methylierungsdonator wie Cholin oder Betain erfordert.

Zielstellung der Studie

Aufgrund der oralen Aufnahme von Kreatin und möglichen Vorstufen ist von einer systemischen Wirkung auszugehen. Aus diesem Grund war zunächst das Ziel der vorliegenden Studie, den Effekt von Kreatin und GAA auf das Wachstum und verschiedene Genexpressionsmarker unterschiedlicher am Kreatinmetabolismus beteiligter Zelltypen zu untersuchen. Aus physiologischer Sicht ist es angebracht, möglichst die verschiedenen Kreatin-sensitiven Zellen in die Analyse einzubeziehen. Aus diesem Grund kamen die folgenden Zelltypen in Betracht: Darmzellen (möglicher Aufnahmeort), Nierenzellen (Hauptsyntheseort der GAA-Produktion), Leberzellen (Hauptsyntheseort für Kreatin) und Muskelzellen (Hauptzielorgan mit der höchsten Kreatin-Speicherkapazität).

Methode

Zellkulturen

Für die vorliegende Studie kamen die folgenden Zellkulturen zum Einsatz: CACO-2 (humane Colonkarzinom-Zellen, DSMZ: ACC 169); HEK293 (humane embryonale Nierenzellen, DSMZ: ACC 305), WRL-68 (Leberzellkazinom, ACCT, lot: 89121403) und humane Herzmuskelzellen (Primärkultur einer 18-jährigen Kaukasierin, Promo-Cell, lot: 9012802.7). Sämtliche Zellkulturen wurden bis zur Behandlung mit Kreatin, GAA, Cholin und GAA+Cholin gemäß den Herstellerangaben kultiviert. Alle Zellkulturen wurden für 0, 6, 12 und 24 Stunden unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen (0µM, 100µM und 250µM) an Kreatin, GAA, Cholin (als Methylierungsdonor) und einem Gemisch aus GAA und Cholin im jeweiligen Standardmedium steroidhormonfrei inkubiert.

Zellproliferation und Zellvitalität

Zur Prüfung der Zellproliferation und der Zellvitalität kamen der Kristall-Violett-Assay bzw. der Tetrazoliumsalz-Assay (WST-1, Roche) zum Einsatz. Hierbei stellt der Kristall-Violett-Assay eine Quantifizierung der DNA-Menge in den Zellkulturen dar. Eine Erhöhung der DNA-Menge ist somit gleichzusetzen mit einer vermehrten Anzahl der Zellen in den Zellkulturen. Der WST-1 bestimmt die enzymatische Aktivität der Atmungskette in den Mitochondrien und ist somit ein Maß für die Vitalität bzw. den Metabolismus der Zellen dar.

Genexpressionsanalyse

Die RNA-Isolation der Zellkulturen erfolgte mittels Trifast™ (Peqlab) und anschließender photometrischer Quantifizierung (Nanodrop; Peqlab). Alle RNA-Proben (10 ng/Probe) wurden am Roto Gene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) durch real-time RT-PCR (SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qPCR Kit; Invitrogen) quantifiziert. Die genspezifischen Primer zur Erfassung der relevanten Gene im Kreatinmetabolismus und der Housekeepinggene sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1. *Genspezifische Primer der relevanten Gene des Kreatin-Metabolismus. (HK = Housekeeping Gen)*

Gen	Sequenz Forward-Primer	Sequenz Reverse-Primer
Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	AGAAAACGCCTGTGTTCCAC	TTGTGGGCTTAGGAGCTGTT
S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase	TCAATGACTCCGTCACCAAG	TCGTTGAGCCACTTGACATC
Beta Actin (HK)	CCAAGGCCAACCGTGAGAAGAT	CCACGTTCCGTGAGGATCTTCA
Beta-2-Mikrotubulin (HK)	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	GGCATCTTCAAACCTCCATG
Cystathionine-beta-Synthase	TCGTGATGCCAGAGAAGATG	GTTGTCTGCTCCGTCTGGTT
Creatine Kinase B	CATATCAAGCTGCCAACCT	TCTACCAAGGGTGACGGAAG
Creatine Kinase A	ATGTGGAACCAGCACCTGGGCTA	CAGACGCAGGCGGGTGAGGAT
Creatine Transporter	CAAAGTCTTGAGGCTGTCTGG	TGTTGAAGCGGTTGTAGCTG
Cystathione gamma-Lyase/Hydrolase	CTCTGCAATCGAGGTCTGAA	CTCAGCAAGGCTTTTCAATC
Guanidinoacetate N-methyltransferase	TTGGATCATCGAGTGCAATG	CTGTGGGAAGGCGTAGTAGC
Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (HK)	TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC
Methionin-Synthase	GATGATCCTCAAGGAAATACAACC	CCATCTCAGAGGGACCAGG
5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	CTGGGCCTGAAGAACATCAT	CTTGATCTCCTGTGGCACCT
S-Adenosyl-Methionin-(SAM)-Synthase	TGGACTTCTGGGGTAAGTGG	TCAGAGGTCCAGGCTAAGGA

Datenanalyse und statistische Auswertung

Als interner Standard für die PCR kamen drei klassische Housekeeping-Gene, beta Actin, beta-2 Mikrotubulin und Glycerinaldehyd-Dehydrogenase, zur Anwendung. Die Normalisierung der Geneexpressionsdaten erfolgte gewebespezifisch mittels der delta-delta Ct-(Threshold Cycle)Methode. Im Falle der Herzmuskelzellen wurde beta-2 Mikrotubulin herangezogen und für alle übrigen Zellkulturen Glycerinaldehyd-Dehydrogenase. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software SigmaStat 3.5 (SPSS Inc). Um gruppen- sowie zeitabhängige Effekte (PCR, Kristall-Violett- und WST1-Assay) zu untersuchen, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two way ANOVA) mit Hilfe des Holm-Sidak-Tests für multiple Vergleiche durchgeführt.

Ergebnisse

In Bezug auf die Zellproliferation als auch die Vitalität zeigte sich bei allen Zellkulturen ein deutlicher zunehmender Trend bezogen auf die Kultivierungsdauer aber auch ein möglicher Effekt der applizierten Substanzen (vgl. Leberzellen als Beispiel in Abb. 1). Ungeachtet der applizierten Mengen an Kreatin und GAA ist eine Erhöhung der Zellzahl in den Kulturen zu erkennen, was auf eine intakte Proliferation der Zellen hindeutet (Abb. 1). Es ist hierbei ein Trend zu erkennen, dass die Zellkulturen mit GAA im Wachstum leicht hinter den Behandlungen mit Kreatin, Cholin oder der Kontrolle zurückbleiben. Diese Effekte waren aber nicht signifikant. Der WST-1 Assay (Abb. 2) zeigt analog zu dem Zellwachstum ebenfalls eine deutliche Zunahme der Zellaktivität. Auch hierbei zeigte die GAA-Behandlung einen leichten repressiven Trend. Aufgrund toxischer Effekte oberhalb Konzentrationen von 250µM wurden diese im Rahmen der Studie nicht weiter verfolgt. Zudem liegen die Konzentration von 250µM oberhalb gemessener Serumwerte von Kreatin bei einer in vivo Substitution.

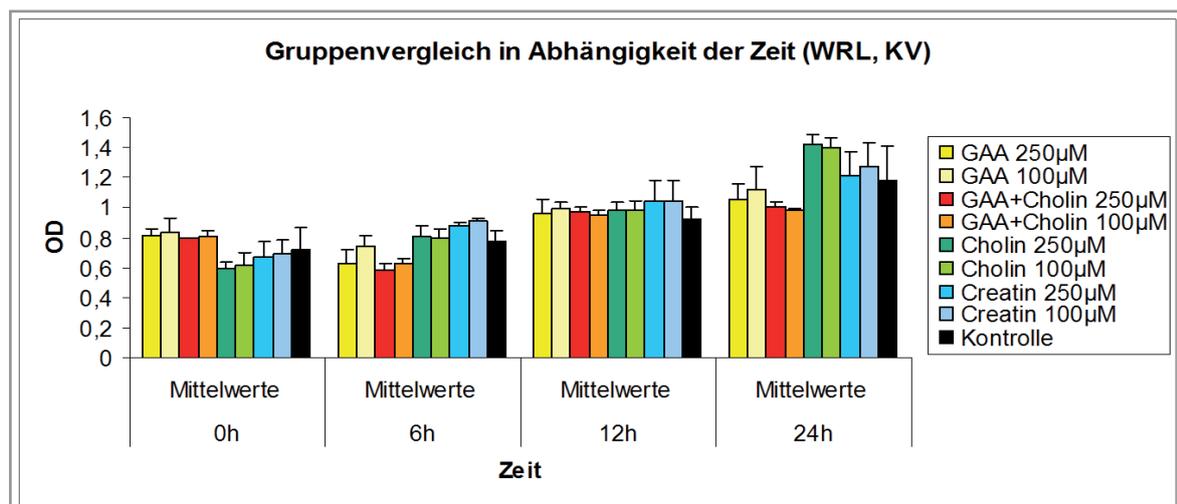


Abb. 1. Zellproliferation (Kristallviolett-Assay, KV) in Abhängigkeit von Kreatin, GAA und Cholin am Beispiel der Leberzellen (WRL)

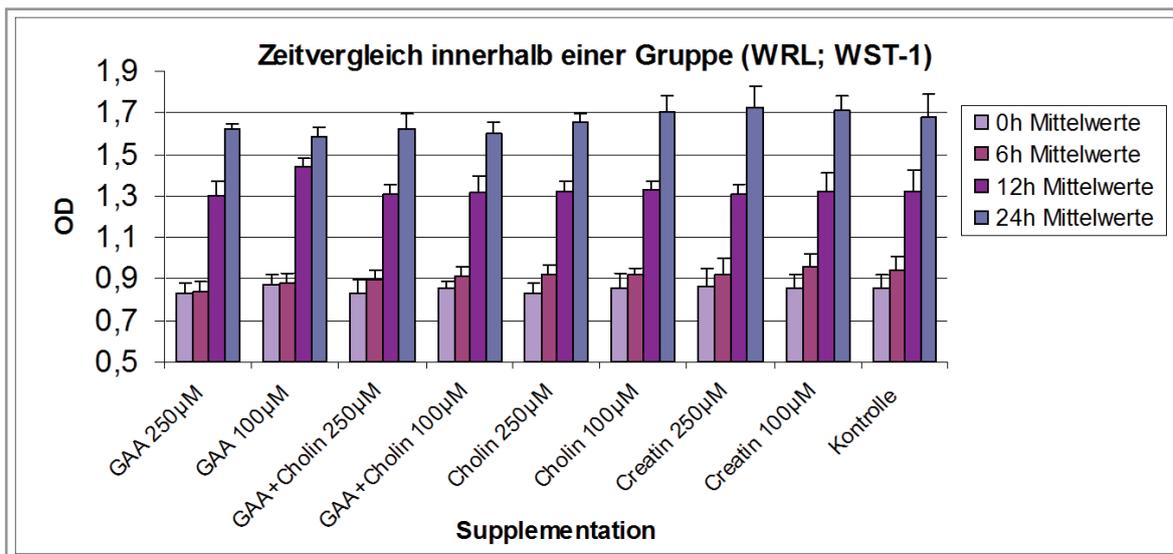


Abb. 2. Zellvitalität (Tetrazoliumsals-Assay, WST-1) in Abhängigkeit von Kreatin, GAA und Cholin am Beispiel der Leberzellen (WRL)

In allen getesteten Zelllinien spielt die Konzentration der applizierten Substanzen bzgl. der Genexpression in dem gemessenen Zeitraum keine signifikante Rolle. Hingegen lassen sich aber verschiedenen Modulationen der Genexpression in Abhängigkeit der verschiedenen Substanzen erkennen.

Tab. 2. *Haupteffekte durch Kreatin und GAA auf die Genexpression a) in Leberzellen, b) in Nierenzellen, c) in Darmzellen und d) in Herzmuskelzellen. (↑=Up-Regulation; ↓=Down-Regulation)*

a) Leberzellen (WRL-68)	Kreatin Effekt	GAA-Effekt
Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	n.e.	↑ (p<0,001)
S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase	n.e.	↓ (p<0,001)
Creatine Kinase A	n.e.	↑ (p<0,001)
Creatine Transporter	↓ (p<0,01)	↓ (p<0,001)
Cystathione gamma-Lyase/Hydrolase	↓ (p<0,001)	n.e.
Methionin-Synthase	n.e.	↓ (p<0,001)
S-Adenosyl-Methionin-(SAM)-Synthase	n.e.	↑ (p<0,001)

b) Nierenzellen (HEK293)	Kreatin Effekt	GAA-Effekt
Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	↓ (p<0,001)	n.e.
Creatine Kinase A	n.e.	↑ (p<0,001)

c) Darmzellen (CACO-2)	Kreatin Effekt	GAA-Effekt
Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	n.e.	↓ (p<0,001)
Cystathionine-beta-Synthase	↑ (p<0,001)	n.e.
Creatine Kinase B	n.e.	↓ (p<0,001)
Creatine Transporter	n.e.	↓ (p<0,001)

In den Zellkulturen der primären Herzmuskelzellen zeigt sich neben den Behandlungseffekten eine starke Überlagerung mit zeitgebundenen Effekten. Die GAMT (Glycine-Amidino-transferase) zeigt über alle Proben hinweg nach einem initialen Abfall zwischen 6 h und 12 h um das 1,8- bzw. 1,7-fache, gefolgt mit einem Anstieg nach 24 h, was nahezu dem Ausgangsniveau entspricht. Einen vergleichbaren Verlauf zeigt auch die CK-B, wenngleich die Reduktion um das 0,5-/0,6-fache zwischen 6 h/12 h gegenüber 24 h nicht so ausgeprägt ist.

Betrachtet man die Genexpression der CK-M, so erfährt diese in der Summe eine signifikante Down-Regulation innerhalb der 24 h Kulturdauer in nahezu den meisten Proben. Der CrT zeigte sowohl durch die Behandlung mit 250µM GAA (nach 6 h) als auch mit 250µM GAA+Cholin (nach 12 h) signifikant niedrigere Werte (2,1-/2,3-fach) als nach 24 h.

Diskussion und Schlussfolgerung

Die vorliegende Zellkulturstudie hat gezeigt, dass die Supplementierung mit Kreatin als auch mit seiner Vorstufe GAA mögliche Effekte auch den Kreatinmetabolismus hat. Betrachtet man die physiologischen Effekte, so kann man feststellen, dass GAA isoliert als auch in Kombination mit Cholin einen leichten repressiven Effekt auf das Zellwachstum und die Zellvitalität aufweist, welcher in der vorliegenden Studie aber noch keine Signifikanz zeigt. Tendenziell zeigt Kreatin einen leichten proliferativen Effekt, der möglicherweise bedingt ist durch eine erhöhte Energieverfügbarkeit. Das hier beschriebene erhöhte Wachstum von Krebszelllinien (vgl. Ohira et al., 1991 und 1995) ist unter anderem auch der Grund, aus welchem die France's Food Safety Agency (AFSSA) aus Sicherheitsgründen 2001 den Konsum von Kreatin aufgrund des potentiellen kanzerogenen Effektes verboten hatte. Dem gegenüber stehen aber auch unter anderem aktuellere Ergebnisse von Derave et al. (2006) und Ghosh et al. (2006), die eher einen protektiven Effekt von Kreatin gegenüber kanzerogenen Effekten postulieren. Deshalb hat die AFSSA im Jahre 2007 das Verbot revidiert (AFSSA-Reg.-Nr. 2007-SA-0231) und einen Konsum von 3 Gramm Kreatinmonohydrate pro Tag als „risikolos“ eingestuft.

Tendenziell zeigten Kreatin als auch GAA eine Tendenz den Kreatintransporter (CrT) temporär gegenüber den Kontrollkulturen zu reprimieren, was sich in den Leberzellen, den Darmzellen als auch in den Herzmuskelzellen nachweisen lies. Inwieweit sich eine Langzeitsupplementierung mit Kreatin oder GAA auf eine mögliche gestörte Genexpression des CrT auswirken kann, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden, da Langzeitversuche in Zellkulturen meist mit einer Zell(de)differenzierung einhergehen. Einen ähnlichen repressiven Effekt konnten Guerrero-Ontiveros und Wallimann (1998) bei einer in vivo Supplementierung in Ratten nachweisen. Im Humanversuch aber konnte die beschriebene Downregulation des Rezeptors durch Kreatin weder für jüngere noch ältere Menschen im Muskel gezeigt werden (Tarnopolsky et al., 2003).

Im Kontext einer erhöhten Homozysteinbelastung durch eine vermehrte Umwandlung von GAA nach Kreatin kann man im Rahmen der vorliegenden Studie nur spekulieren. Zwar zeigte die GAA Behandlung der Leberzellen eine Erhöhung der

SAMS Expression, dennoch kann man hier nur durch Messung der SAMS-Enzymaktivität oder einer Homocysteinquantifizierung eindeutige Rückschlüsse ziehen. Darüber hinaus deutet die Verminderung der Methioninsynthase (MS) eher auf eine Reduktion der Methionresynthese hin, was gegen erhöhte Homocysteineliminationsrate spricht.

In der Summe betrachtet, waren die Effekte in den verschiedenen Zellkulturen, mit Ausnahme des CrT, sehr uneinheitlich und starken Zeiteffekten überlagert. Hinzu kommt, dass die Zellkultursysteme sehr isolierte Systeme darstellen und möglicherweise auch nicht immer in ausreichendem Maße alle metabolischen Enzyme in Proteinform vorliegen, was auch auf den natürlichen Kreatinsyntheseweg zwischen Niere und Leber hinweisen könnte. Ergänzend ist zu erwähnen, dass die Zellen – bedingt durch die optimalen Kulturbedingungen – vermutlich nicht zwingend auf den Kreatinsyntheseweg angewiesen sind. Vermutlich müsste man vergleichbar zu in vivo Studien einen Energiebedarf bzw. eine mechanische Arbeit induzieren. Dangott et al. (2000) haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass neben einer Supplementierung auch die mechanische Beanspruchung der Muskulatur einen entscheidenden Faktor der Kreatinwirksamkeit darstellt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass isolierte Zellkultursysteme vermutlich nur bedingt geeignet sind, die Effektivität von Kreatin und GAA zu überprüfen. Aufgrund der komplexen Zusammenhänge zwischen Ernährung, körperlicher Aktivität und Supplementierung sind in diesem Fall in vivo Studien erforderlich. Im Falle von GAA sollte aber aufgrund einer möglichen Homocysteinerhöhung eine strenge Kontrolle der Blutplasmakonzentrationen erfolgen.

Literatur

- Dangott, B., Schultz, E. & Mozdziak, P. E. (2000). Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy. *International journal of sports medicine*, 21 (1), 13-16.
- Derave, W., Vanden Eede, E., Hespel, P., Carmella, S. G. & Hecht, S. S. (2006). Oral creatine supplementation in humans does not elevate urinary excretion of the carcinogen N-nitrososarcosine. *Nutrition*, 22 (2), 332-333.
- Ghosh, M., Talukdar, D., Ghosh, S., Bhattacharyya, N., Ray, M. & Ray, S. (2006). In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal. Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine. *Toxicology and applied pharmacology*, 212 (1), 45-58.
- Guerrero-Ontiveros, M. L. & Wallimann, T. (1998). Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry*, 184 (1-2), 427-437.
- Ohira, Y. & Inoue, N. (1995). Effects of creatine and beta-guanidinopropionic acid on the growth of Ehrlich ascites tumor cells: i.p. injection and culture study. *Biochimica et biophysica acta*, 1243 (3), 367-372.
- Ohira, Y., Ishine, S., Inoue, N. & Yunoki, K. (1991). Reduced growth of Ehrlich ascites tumor cells in creatine depleted mice fed beta-guanidinopropionic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 1097 (2), 117-122.
- Tarnopolsky, M., Parise, G., Fu, M. H., Brose, A., Parshad, A., Speer, O. & Wallimann, T. (2003). Acute and moderate-term creatine monohydrate supplementation does not affect creatine transporter mRNA or protein content in either young or elderly humans. *Molecular and cellular biochemistry*, 244 (1-2), 159-166.