

# *Alimentäres Methionin und Hyperhomocysteinämie*

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin Annette Pexa  
geboren am 1. März 1979 in München

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Henle  
Prof. Dr. Andreas Deußen  
Prof. Dr. Dr. Wolfgang Herrmann

Eingereicht am: 24.10.2006

Tag der Verteidigung: 21.12.2006

***Inhaltsverzeichnis***

Inhaltsverzeichnis .....	III
<b>1 Ziele und Themenstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Hintergrund .....</b>	<b>2</b>
2.1 Methionin: Essentielle Aminosäure und Gesundheitsrisiko .....	2
2.2 Der Methionin-Stoffwechsel .....	3
2.3 Aktivität von Transmethyhasen .....	6
2.4 Homocystein .....	9
2.5 Hyperhomocysteinämie und assoziierte Krankheitsbilder .....	11
2.6 Theorien zur pathogenen Wirkung von Homocystein .....	13
2.6.1 Theorien zur Wirkung von Homocystein auf die neuronale Funktion .....	13
2.6.2 Theorien zur Wirkung von Homocystein auf das Gefäßsystem .....	15
2.6.3 Homocystein und oxidativer Stress .....	17
2.7 Methionin- und Homocysteinhaushalt .....	18
2.7.1 Homocystein- und Methioninkonzentration im Tagesverlauf .....	18
2.7.2 Resorption von Homocystein und Methionin .....	18
2.7.3 Renale Ausscheidung von Homocystein und Methionin .....	19
<b>3 Materialien und Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1 Chemikalien und Geräte .....	21
3.1.1 Chemikalien .....	21
3.1.2 Geräte und Materialien .....	22
3.2 Zellkultur .....	24
3.2.1 Präparation und Kultivierung von HUVEC .....	24
3.2.2 Kultivierung von HepG2-Zellen .....	26
3.2.3 Aktivitätsmessung der ekto-5'-Nukleotidase .....	26
3.2.4 Freisetzung von Adenosin und S-Adenosyl-Homocystein .....	27
3.3 Isolierung und Kultivierung der Dünndarmflora .....	28
3.4 Methionin-Fütterungsstudie an Ratten (4 Wochen) .....	28
3.4.1 Organentnahme .....	29
3.4.2 Aufbereitung von Plasmaproben .....	29
3.4.3 Aufbereitung von Organproben .....	30
3.5 Methionin- bzw. Homocystin-Fütterungsstudie an Ratten (3 Monate) .....	30
3.6 Homocystin- bzw. vitaminfreie Fütterungsstudie an Ratten (3 Monate) .....	30
3.7 Isometrische Kraftmessung an Mesenterialarterien .....	31

---

3.7.1	Präparation der Mesenterialarterien .....	31
3.7.2	Datenerhebung und –auswertung .....	31
3.8	Western Blot-Analysen .....	33
3.8.1	Probenvorbereitung und Bestimmung des Proteingehaltes .....	34
3.8.2	Endotheliale NO-Synthase (eNOS) .....	34
3.8.3	Induzierbare NO-Synthase (iNOS) .....	36
3.8.4	S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAHH) .....	37
3.9	HPLC-Analytik von Adenin-Nukleotiden und SAH .....	37
3.9.1	Probenvorbereitung und Derivatisierung .....	38
3.9.2	HPLC-Bedingungen .....	38
3.10	HPLC-Analytik von SAM und SAH .....	39
3.10.1	Etablierung und Optimierung der Methode .....	39
3.10.2	Optimierte Methode .....	39
3.11	HPLC-Analytik von Homocystein .....	40
3.11.1	Analytik mittels HPLC-Kit .....	40
3.11.2	Etablierung und Optimierung der Methode .....	41
3.11.3	Probenvorbereitung Lebensmittel .....	42
3.11.4	Optimierte Methode .....	42
3.12	GC-FID-Analytik von Aminosäuren .....	43
3.13	LC-MS/MS-Analytik von Argininderivaten .....	43
3.14	Statistische Auswertung .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Einfluss von Homocystein und Methionin auf den Adenosinstoffwechsel .....	45
4.1.1	Adenosinkonzentration im Plasma .....	45
4.1.2	Extrazelluläre Adenosinkonzentration .....	47
4.1.3	Ekto-5'-Nukleotidase und Homocystein .....	49
4.1.4	Intrazelluläre S-Adenosyl-Homocystein-Konzentration .....	50
4.1.5	Extrazelluläres SAH bei HUVEC .....	52
4.1.6	Extrazelluläres SAH bei HepG2-Zellen .....	54
4.1.7	S-Adenosyl-Homocystein im Plasma .....	56
4.2	Vier Wochen methioninreiche Fütterung .....	58
4.2.1	Studienbedingungen .....	59
4.2.1.1	<i>Methioninzufuhr</i> .....	60
4.2.1.2	<i>Methionin in Plasma und Gewebe</i> .....	60

---

4.2.1.3	<i>Gesamtaminosäuregehalt</i> .....	63
4.2.2	Methioninreiche Diät und Homocystein.....	64
4.2.3	Methioninreiche Fütterung und neuronale Funktion.....	68
4.2.3.1	<i>Agonisten der Glutamatrezeptoren</i> .....	69
4.2.3.2	<i>Tyrosin als Dopaminpräcursor</i> .....	71
4.2.3.3	<i>Histidin</i> .....	72
4.2.4	Methioninreiche Diät und Gefäßfunktion.....	73
4.2.4.1	<i>Endothelabhängige und endothelunabhängige Gefäßfunktion</i> .....	74
4.2.4.2	<i>Expression der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase</i> .....	75
4.2.4.3	<i>Asymmetrisches Dimethylarginin</i> .....	76
4.2.5	Methioninreiche Diät und Transmethylierungspotential.....	78
4.2.5.1	<i>Optimierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von SAM und SAH</i> .....	78
4.2.5.2	<i>S-Adenosyl-Methionin im Gewebe</i> .....	79
4.2.5.3	<i>S-Adenosyl-Homocystein im Gewebe</i> .....	80
4.2.5.4	<i>„Transmethylierungspotential“ im Gewebe</i> .....	81
4.2.5.5	<i>Expression der SAHH in der Leber</i> .....	82
4.3	Vergleich der Fütterungsmodelle für Hyperhomocysteinämie.....	83
4.3.1	Studienbedingungen.....	84
4.3.2	Leber.....	86
4.3.3	Milz.....	92
4.3.4	Herz.....	96
4.3.5	Niere.....	96
4.4	Experimentelle Modelle und Hyperhomocysteinämie beim Menschen.....	103
4.4.1	Homocystein in Lebensmitteln.....	103
4.4.1.1	<i>Optimierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein in Lebensmitteln</i> .....	103
4.4.1.2	<i>Homocysteingehalte von Lebensmitteln</i> .....	106
4.4.1.3	<i>Abschätzung der alimentären Zufuhr von Homocystein</i> .....	107
4.4.2	Modellstudien zur Homocysteinproduktion durch Darmbakterien.....	108
4.5	Weitere Phänomene.....	110
4.5.1	Homocystein und Transmethylierungspotential im Knochen.....	110
4.5.2	Essentielle Aminosäuren im Plasma.....	112
4.5.3	Alanin im Herz.....	113
<b>5</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>114</b>

---

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>138</b>
8.1.1	Verwendete Puffer und Lösungen isometrische Kraftmessung.....	138
8.1.2	Verwendete Puffer und Lösungen Western Blot.....	138
8.1.3	Verwendete Puffer und Lösungen Zellkultur.....	139
8.1.4	Verwendete Puffer und Lösungen HPLC .....	141
8.1.5	Kalibrierung der Aminosäureanalytik mittels GC-FID .....	142
8.1.6	Ergebnisse der Aminosäureanalytik.....	143
	Abkürzungsverzeichnis.....	145
	Abbildungsverzeichnis.....	149
	Tabellenverzeichnis.....	154
	Formelverzeichnis .....	154

## 1 Ziele und Themenstellung

Eine erhöhte Konzentration von Homocystein im Plasma (Hyperhomocysteinämie) gilt als unabhängiger Risikoindikator für diverse neuronale und kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Plasma-Konzentration an Homocystein kann durch Methionin-Aufnahme erhöht werden, da Methionin ein Präcursor des Homocysteins ist. Alimentäres Methionin gilt als Hauptquelle für Homocystein im menschlichen Körper. Methionin ist eine essentielle Aminosäure, kann aber bei Fehlernährung übermäßig zugeführt werden. Daher ist es wichtig zu wissen, ob tatsächlich durch langfristige erhöhte Methioninaufnahme via Erhöhung des Homocysteinspiegels im Plasma ein reelles Gesundheitsrisiko besteht. Die Grundhypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass methioninreiche Ernährung längerfristig zu einer Hyperhomocysteinämie führen kann, die symptomatisch der klinisch beobachteten Hyperhomocysteinämie entspricht und mit den in anderen Modellen (Homocyst(e)ingabe bzw. Vitaminmangel-Modelle) gefundenen Resultaten übereinstimmt.

Die häufigsten in der Literatur beschriebenen Forschungsmodelle für Hyperhomocysteinämie sind Zellkulturmodelle oder Fütterungsstudien an Ratten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Übertragbarkeit von Zellkulturstudien auf Tiermodelle untersucht. Zur Überprüfung der Grundhypothese wurde ein Ratten-Fütterungsmodell gewählt. Dabei war es wichtig, die Methioninkonzentration in einem Rahmen zu halten, der auch bei humaner Fehlernährung möglich wäre. Neben der Auswirkungen der Diät auf den Homocystein-Plasmaspiegel sollte geprüft werden, welche der in der Literatur dargestellten potentiellen Pathomechanismen für Hyperhomocysteinämie-induzierte Schäden Anwendung in diesem Modell finden. Die mit Hyperhomocysteinämie assoziierten Krankheitsbilder werden durch eine Erhöhung der intrazellulären Homocystein-Konzentration oder Veränderungen im Transmethylierungs-stoffwechsel erklärt. Da eine Hyperhomocysteinämie experimentell auch durch Homocyst(e)in- oder Vitaminmangel-Fütterung induziert wird, sollten in weiteren Rattenstudien diese Parameter bei homocysteinreicher-, bzw. Vitaminmangel-Diät untersucht und mit den bei methioninreicher Fütterung gezeigten Veränderungen verglichen werden.

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, welches dieser drei Fütterungsmodelle am ehesten der Hyperhomocysteinämie des Menschen entspricht. Da zwar die Gehalte von Methionin, nicht aber die von Homocystein, in fast allen Lebensmitteln bekannt sind, wurde untersucht, ob und in welchen Konzentrationen Homocystein in Lebensmitteln enthalten ist. In diesem Zusammenhang wurde auch eine potentialle Beteiligung von Darmbakterien an der Homocysteinproduktion an Isolaten aus Ratten-Dünndarm untersucht.

## 2 Hintergrund

### 2.1 Methionin: Essentielle Aminosäure und Gesundheitsrisiko

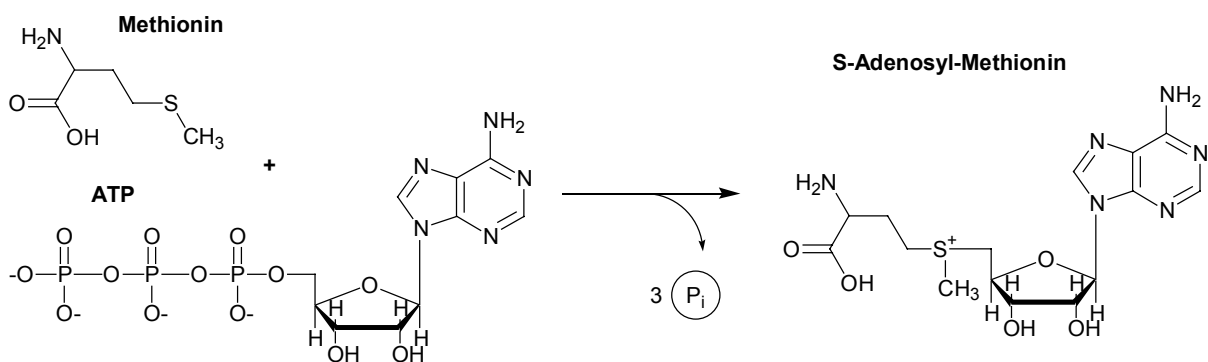
Methionin wurde erstmals 1922 von Müller aus Casein isoliert. Die besondere Bedeutung von Methionin bei Proteinmangel wurde erstmals von Williams et al. 1949 beschrieben. Diese Forscher untersuchten den Einfluss von Methionin auf die Aktivität von Xanthinoxidase und Succinatdehydrogenase in Rattenleber. Kinsell und Mitarbeiter (1949) zeigten, dass die Plasma-Methioninkonzentration wesentlich von der Ernährung abhängt. Im gleichen Jahr zeigten Liener und Mitarbeiter, dass der Nährwert von Proteinen vom Methioninanteil abhängt. Dies liegt daran, dass Methionin nicht vom menschlichen Körper selbst synthetisiert werden kann, also eine essentielle Aminosäure ist (Belitz et al., 2001). Der Tagesbedarf liegt bei 1 – 2 g (Young et al., 1991). Es zeigte sich in den folgenden Jahren, dass Methionin nicht nur als Baustein für Proteine und zur Energiegewinnung dient, sondern auch das Substrat für sehr viele enzymatische Methylierungsreaktionen im Körper ist, wie beispielsweise die Methylierung von Proteinen, RNA und DNA oder die Synthese von Lecithinen, Kreatin oder Adrenalin (Clarke et al., 2001). Diese Reaktionen werden später ausführlich dargestellt (vgl. 2.3).

Gerade durch den Transmethylierungs-Stoffwechsel kann eine übermäßige Methioninzufuhr auch ungünstige Folgen haben. Eine übermäßige Aufnahme von Methionin wurde bereits seit den 50er Jahren als toxisch erkannt (Elvehjem et al., 1955). So wurde 1954 eine Lipidakkumulation unter Methioninfütterung beschrieben (Harper et al. 1954). Frühe Studien zur Toxizität von Aminosäuren untersuchten auch die Auswirkungen einer definierten Fütterungsmenge einer Aminosäure auf das Wachstum von Ratten (Kumta et al., 1958). Es zeigte sich bei diesen Experimenten, dass nur L-Methionin das Wachstum unterdrückt, das D-Enantiomer aber nicht (Benevenga, 1974). Die schädigende Wirkung von Methionin kann teilweise durch Serin oder Glycin (Benevenga et al., 1970) aufgehoben werden. Auch die wachstumssuppressive Wirkung von Homocystein, einem Stoffwechselprodukt des L-Methionins, kann durch Glycin- oder Serin-Gabe aufgehoben werden (Benevenga et al., 1967). Alle drei Substanzen sind in den Transmethylierungsstoffwechsel von Methionin involviert. Daher ist die wachstums-suppressive Wirkung von Methionin in diesem Stoffwechselweg zu suchen. Mögliche Stoffwechselwege des Methionins im menschlichen Körper sind nachfolgend genauer dargestellt.

## 2.2 Der Methionin-Stoffwechsel

Für Säugetiere ist Methionin eine essentielle Aminosäure und kann somit nicht vom Körper synthetisiert werden. Für den Abbau von Methionin gibt es mehrere Wege: Wie alle Aminosäuren kann Methionin durch oxidative Transaminierung in  $\alpha$ -Keto-Methylthiobuttersäure umgewandelt werden. Des Weiteren kann Methionin zur Energiegewinnung in den Citratzyklus eingeschleust werden. Als glucogene Aminosäure wird es zu Propionyl-CoA umgewandelt, welches dann zu Succinyl-CoA abgebaut wird. Dieses wird direkt in den Citratzyklus eingeschleust (Stryer, 1996).

Neben diesen „klassischen“ Abbauwegen von Aminosäuren, sowie dem Einbau in Proteine, kann Methionin auch im Transmethylierungsstoffwechsel abgebaut werden. Bereits 1956 fanden Ericson und Harper heraus, dass bei Ratten bei methioninreicher Fütterung zwar der Proteingehalt der Leber und das Wachstum beeinträchtigt sind, aber die Aktivität von Transmethylasen erhöht ist (Ericson et al., 1956). Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird Methionin im Transmethylierungs-Stoffwechsel zunächst an ATP gebunden. Dabei werden Pyrophosphat und Orthophosphat abgespalten, und es entsteht S-Adenosyl-Methionin (SAM) (Stryer, 1996).

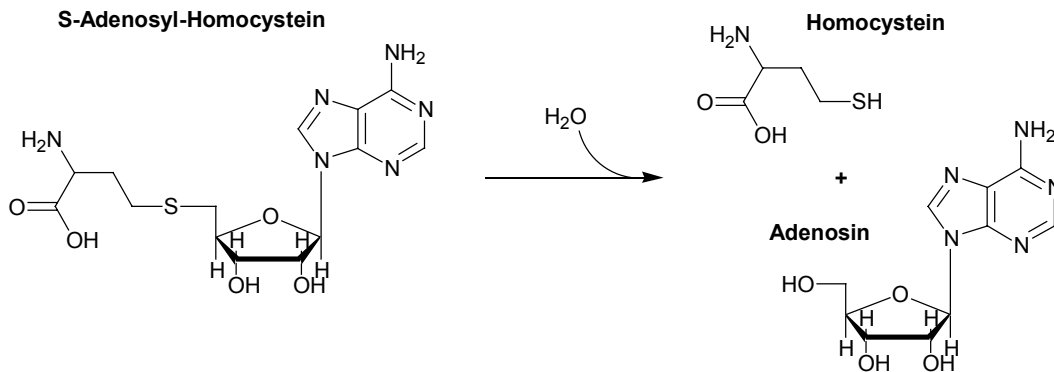


**Abbildung 1:** Enzymkatalysierte Umwandlung von Methionin und ATP zu S-Adenosyl-Methionin (SAM) unter Abspaltung von Phosphat

In der humanen Leber werden täglich 6-8 g SAM synthetisiert. Diese Menge ist nötig, da keine andere Verbindung an so vielen biochemischen Reaktionen (siehe Kapitel 2.3) beteiligt ist wie SAM (Pajares et al., 1992). Aufgrund des dreibindigen Schwefels ist SAM sehr instabil und kann leicht eine Methylgruppe abgeben (Finkelstein, 1998). Verschiedenste Transmethylasen (Einzeldarstellung folgt unter 2.3) übertragen diese Methylgruppe auf andere Stoffe (Perna et al., 2005). Hierbei entsteht S-Adenosyl-Homocystein (SAH), welches



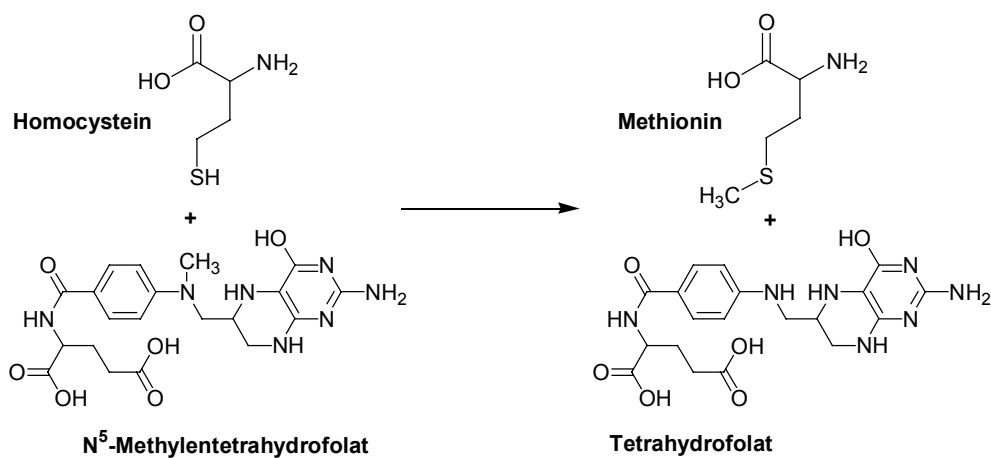
durch die S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAHH, E.C. 3.3.1.1) zu Homocystein und Adenosin gespalten werden kann (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Hydrolytische Spaltung von S-Adenosyl-Homocystein zu Homocystein und Adenosin

Die SAHH ist ein bidirektional wirksames Enzym, das SAH aus Homocystein und Adenosin synthetisieren kann, wenn sich die Konzentration einer dieser beiden Komponenten erhöht (Borst et al., 1992). Wichtig für die Aktivität dieses Enzyms ist auch der Redox-Status, da  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  als prosthetische Gruppe für die Katalyse der Reaktion verantwortlich ist (Porter, 1993).

Das von der SAHH gebildete Homocystein kann im Körper durch Remethylierung zu Methionin abgebaut werden. Für diese von der Methionin-Synthase katalysierte Reaktion werden  $\text{N}^5$ -Methyltetrahydrofolat als Methyl donor und Cobalamin (Vitamin  $\text{B}_{12}$ ) als Kofaktor benötigt (Abbildung 3) (Olteanu et al., 2001).

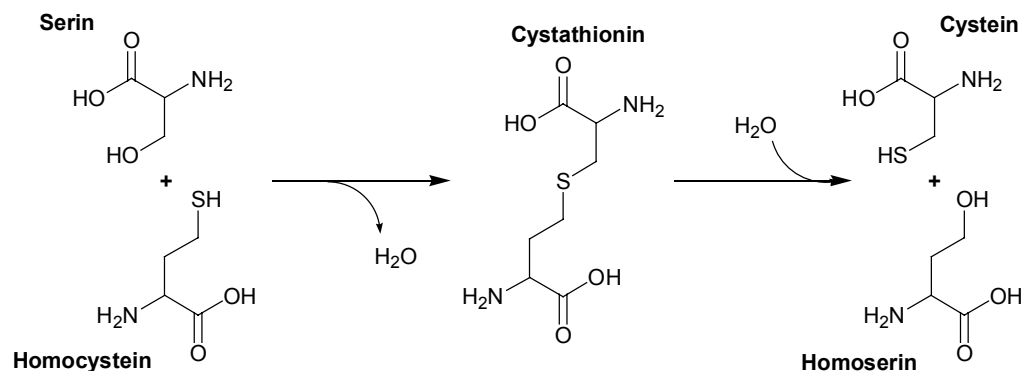


**Abbildung 3:** Remethylierung von Homocystein zu Methionin mit  $\text{N}^5$ -Methyltetrahydrofolat als Methyl donor

Die Methylgruppe des N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat wird zunächst auf Cobalamin übertragen, welches sie dann auf Homocystein überträgt. Regeneriert wird N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat aus Tetrahydrofolat durch die Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) (Matthews et al., 1998).

Eine Remethylierung mit Betain als Methylgruppendonator ist nur in der Leber bekannt. Hierbei werden zwei der Methylgruppen des Betains von Tetrahydrofolat aufgenommen und die dritte von Methionin (Garrow, 2001).

Eine andere Abbaumöglichkeit für Homocystein ist die Vitamin B<sub>12</sub>- und B<sub>6</sub>-abhängige Transsulfurierung auf Serin über Cystathionin zu Cystein und Homoserin (Abbildung 4) (Krüger, 2001).



**Abbildung 4:** Homocysteinabbau via Transsulfurierungsweg

Hierbei wird zunächst katalysiert von der Cystathionin- $\beta$ -Synthase (E.C. 4.2.1.22) Homocystein an Serin gekoppelt, wobei Wasser und Cystathionin entstehen. Cystathionin kann entweder renal ausgeschieden werden, oder hydrolytisch von der  $\gamma$ -Cystathionase zu Cystein und Homoserin abgebaut werden (Kraus, 1998). Serin ist kein limitierender Faktor für diesen Stoffwechselweg, da es im Gegensatz zu Methionin keine essentielle Aminosäure ist, sondern intrazellulär aus Glycin synthetisiert werden kann. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Serin-Hydroxymethylase (Xue et al., 1999). Glycin kann aus der essentiellen Aminosäure Threonin synthetisiert werden (Ogawa et al., 2000).

SAM wirkt als Inhibitor der MTHFR und als Aktivator der Cystathionin- $\beta$ -Synthase. Daher läuft bei vermehrter Methioninzufuhr vermehrt die Transsulfurierung zu Cystathionin ab

(Fonseca et al., 1999). Bei schwerer Hyperhomocysteinämie ist auch immer Cystathionin in Plasma und Urin erhöht (McCully, 2005).

Über die Nahrung aufgenommenes Methionin gilt als einzige bekannte Quelle für Homocystein in Säugetieren (Finkelstein, 1998). Als hauptsächliche Ursachen für die Toxizität von Methionin wird zum einen das gebildete Homocystein (Stühlinger et al., 2001), zum anderen eine übermäßige oder verminderte Methylierung diskutiert (Perna et al., 2005). Welche Substanzen hypo- oder hypermethyliert werden können ist nachfolgend dargestellt.

### 2.3 Aktivität von Transmethylasen

Homocystein wird durch Transmethylierungsreaktionen aus Methionin gebildet. Bis heute sind 39 verschiedene SAM-abhängige Methyltransferasen in Säugetieren bekannt (Clarke et al., 2001). Ist das Angebot an S-Adenosyl-Methionin zu gross, kann es zu einer übermäßigen Methylierung kommen. Das bei diesen Reaktionen gebildete SAH wirkt als Produktinhibitor für Transmethylasen. Somit kann es, sobald SAH akkumuliert, zu einer verminderten Methylierung kommen (Ingrosso et al., 2003). Die Transmethylasen werden unterschiedlich stark durch SAH inhibiert. In Tabelle 1 sind die von Clarke und Banskfield (2001) zusammengestellten Michaeliskonstanten (Km) für SAM und die Gleichgewichtskonstante der Enzyminhibierung durch SAH (Ki) bzw. die Konzentration der halbmaximalen Inhibierung (IC<sub>50</sub>) für SAH der im Säugetier nachgewiesenen Enzyme aufgeführt. Nicht für alle SAM-abhängigen Methyltransferasen sind diese Werte bekannt. Deshalb fehlen in dieser Aufstellung DNA-Cytosine-5-Methyltransferase 3 (E.C. 2.1.1.37), mRNA-guanidin-N-7-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.56), CAP I-mRNA-2'-O-Methyltransferase, CAP II-mRNA-2'-O-Methyltransferase, 2'-O-Methyladenosin-N-6-Methyltransferase, mRNA N<sup>6</sup>-Adenosin-Methyltransferase, Dihydroxynonaprenylbenzoat-O-Methyltransferase, CoQ5 C-Methyltransferase, Protein-Arginin-N-Methyltransferase 3, Coaktivator-assoziierte-Arginin-Methyltransferase 1, Protein-Histidin-N-Methyltransferase, Diphthhin-Synthase, Nikotinamid-N-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.1), Thiol-S-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.9) und Arsenit-Methyltransferase.

**Tabelle 1:** SAM-abhängige Methyltransferasen (MT):

E.C.-Nr.	Enzymname	Km SAM	Ki SAH	Ki/Km
		[ $\mu\text{mol/l}$ ]	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	
2.1.1.31	tRNA-Guanin-N-1- MT	3	0,11	0,04
2.1.1.77	Protein-D-Aspartat-O- MT	2	0,08	0,04
2.1.1.28	Phenylethanolamin N- MT	10	1,4	0,14
2.1.1.4	Hydroxyindol-O- MT	14	2,1	0,15
	Indolethylamin N- MT	54,3	8,65	0,16
	$\beta$ -Carbolin-2-N- MT	81	14,8 (IC <sub>50</sub> )	0,18
2.1.1.17	Phosphatidylethanolamin-N- MT	18,2	3,8	0,2
	Protein-Arginin-N- MT 1	8	2,3	0,3
2.1.1.2	Guanidinoacetat N- MT	49	16	0,3
2.1.1.6	Cathechol-O- MT	3,1	1	0,3
2.1.1.20	Glycin-N- MT	100	35	0,35
2.1.1.126	Myelin basic protein-Arginin-N- MT	4,4	1,8	0,4
2.1.1.43	Histon-Lysin-N- MT	12,5	5,9	0,5
	rRNA-(2'-Ribose-O-)- MT	0,24	0,17	0,71
2.1.1.37	DNA-Cytosine-5- MT 1	1,4	1,4	1,0
2.1.1.29	tRNA-Cytosin-5- MT	0,5	0,9	1,8
2.1.1.67	Thiopurin-S- MT	3	5,8 (IC <sub>50</sub> )	1,9
2.1.1.36	tRNA-(Adenosin-N-1-)- MT	0,3	0,85	2,83
2.1.1.100	Protein S-Isoprenylcystein-O- MT	2,1	9,2	4,4
2.1.1.8	Histamin-N- MT	1,7	11,8 (IC <sub>50</sub> )	6,9
2.1.1.60	Calmodulin-Lysin-N- MT	2	15,2 (IC <sub>50</sub> )	7,6
2.1.1.32	tRNA-Guanin-N-2- MT	2	23	11,5
	Thioether-S-MT	1	40 (IC <sub>50</sub> )	40

Je grösser das Verhältnis Ki/Km ist, desto stärker wird das Enzym bei einem erniedrigten (SAM/SAH)-Quotienten inhibiert. Je höher der Km-Wert ist, umso aktiver ist das Enzym bei erhöhtem Angebot von SAM. (Clarke et al., 2001). Daher gilt das Verhältnis von SAM/SAH auch als „Transmethylierungspotential“. Klinisch wird dieser Parameter oftmals in Erythrocyten bestimmt (Loehrer et al., 2001).

Die höchste Michaelis-Konstante für SAM wurde bei der Glycin-N-Methyltransferase mit 100  $\mu\text{mol/l}$  gemessen. Bei Methioninzusatz steigt die Aktivität des Enzyms in der Leber. Dies beruht allerdings anscheinend nicht nur auf einem höheren Substratumsatz, sondern auch auf einer vermehrten Expression (Rowling et al., 2002). Die Aktivität dieses Enzyms kann zwar auch durch Phosphorylierung erhöht werden, aber dieser Effekt beeinflusst die Aktivität des Enzyms bei gesteigertem SAM-Angebot nicht (Møller et al., 2003).

DNA- und RNA-Methylierung spielen bei der Genexpression und der Geschwindigkeit translationaler Vorgänge eine wesentliche Rolle. Bei einer Hypomethylierung ist die Stabilität beeinträchtigt, und es kommt zu keiner, bzw. einer fehlerhaften Genexpression. Die einzelnen  $K_m$ - und  $K_i$ -Werte sind zwar nicht für alle beteiligten Enzyme bekannt, aber eine DNA-Hypomethylierung wurde bei Cystathionin- $\beta$ -Synthase-defizienten Mäusen beschrieben (Caudill et al., 2001) und in einen direkten Zusammenhang zur intrazellulären SAH-Konzentration gebracht (James et al., 2002). Es wurde in der Literatur allerdings auch diskutiert, dass die fehlerhafte Transskription auf einer Hemmung der aktiven Demethylierung von DNA durch hohe Konzentration von SAM beruhen könnte (Detich et al., 2003).

Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase katalysiert die dreifache Methylierung von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin und wird bekanntermaßen *in vivo* bei hohen SAH-Konzentrationen gehemmt (Drouva et al., 1986). Dies ist zum einen für die Zusammensetzung der Lipidmembranen im Körper wichtig (Simons et al., 2002), zum anderen sind Phosphatidylcholine Signalmoleküle für eine Vielzahl biologischer Funktionen (Ahmed et al., 1998).

Auch eine Hemmung von mRNA- und tRNA-Methyltransferasen, von Histamin-N-MT, Histon-Lysin-N-MT, Hydroxyindol-O-MT und Cathechol-O-MT durch SAH wurde in der Literatur beschrieben (James et al., 2002). Dadurch kann die Synthese der Hormone Melatonin und Serotonin sowie die der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Histamin gestört sein (Clarke et al., 2001).

Eine herausragende Bedeutung kommt auch der Protein-D-Aspartat-O-Methyltransferase zu. Dieses Enzym repariert beschädigte Proteine. Wird die Aktivität dieses Enzyms beispielsweise durch oxidativen Stress gesenkt, kommt es zu schweren Schädigungen von Enzymen. Eine Hemmung des Enzyms bei gestörtem Transmethylierungspotential konnte

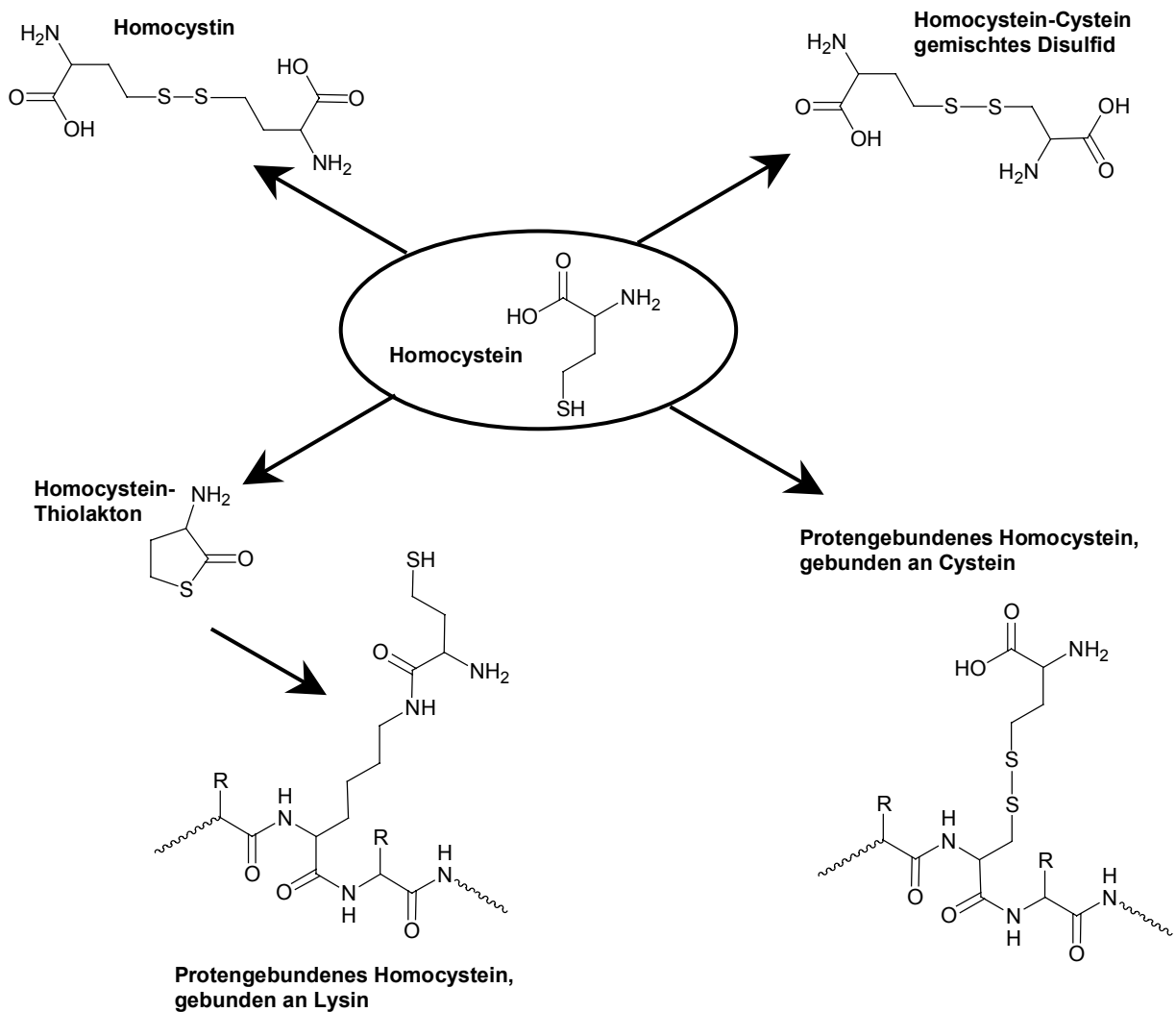
bislang nicht in vivo nachgewiesen werden (Ingrosso et al., 2000). Aufgrund des niedrigen Ki/Km-Quotienten (vgl. Tabelle 1) ist dies auch eher unwahrscheinlich.

#### 2.4 Homocystein

Wie zuvor beschrieben, ist Homocystein ein Metabolit des Methionins aus dem Transmethylierungsstoffwechsel. Erstmals wurde es 1932 von Butz und du Vigneaud als biologisch wichtige Aminosäure beschrieben. Im Plasma liegt es nur in Spuren in der reduzierten Form vor. Der Hauptanteil (bis zu 80 %) ist in Proteinen an freie Thiolgruppen von Cystein gebunden. Der größte Teil des freien Homocysteins liegt als Disulfid vor, entweder als Homocystin oder als Mischdisulfid Homocystein-Cystein (Mudd et al., 2000).

Wird einem Probanden oral Methionin gegeben, so erhöht sich zunächst das reduzierte Homocystein und erst ca. 2 Stunden später das oxidierte und proteingebundene Homocystein. In dieser von Chambers und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie wurde außerdem die flussvermittelte Dilatation am Unterarm der Probanden gemessen. Dies ist ein Parameter zur Beurteilung der Endothelfunktion, der bei Arteriosklerose gestört ist. Die flussvermittelte Dilatation vermindert sich, sobald sich die Konzentration des reduzierten Homocysteins erhöht. Dies legt die Vermutung nahe, dass vor allem reduziertes Homocystein für pathologische Effekte von Homocystein verantwortlich ist (Chambers et al., 2001). Es zeigte sich in Patientenstudien, dass sich langfristig ein Gleichgewicht zwischen den Fraktionen von Homocystein einstellt. So sind bei Patienten mit ischämischem (durch verminderte Durchblutung bedingtem) Schlaganfall alle Fraktionen von Homocystein gegenüber nichterkrankten Probanden erhöht (Williams et al., 2001).

Ca. 5 % des Homocysteins im menschlichen Körper liegen als Homocystein-Thiolakton vor (Jakubowski et al., 2000). In dieser Form kann Homocystein nicht nur mit Cystein-, sondern auch mit Lysin-Seitenketten von Proteinen reagieren (Undas et al., 2004). Die Strukturformeln aller bekannten homocysteinhaltigen Fraktionen sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Strukturformeln der homocysteinhaltigen Verbindungen im Körper

Der als Homocysteinspiegel im klinischen Alltag beurteilte Parameter ist Gesamt-Homocystein und umfasst sowohl die proteingebundenen als auch die freien Anteile, nicht aber die Thiolakton-Form (Sengupta et al., 2001).

Im klinischen Bereich wurde Homocystein erstmals 1962 im Urin (Homocysteinurie) von geistig zurückgebliebenen Kindern nachgewiesen. Weitere Symptome waren Fettleber, Gefäßläsionen und Thrombosen sowie Linsenluxation, vermindertes Wachstum, Osteoporose und Veränderungen im Skelett an Extremitäten und dem Brustbein (McCully, 2005). Auch die Plasmakonzentration von Homocystein (Hyperhomocysteinämie) und Homocystein-Cystein Disulfid sowie die Methionin-Plasmakonzentration waren bei diesen Patienten erhöht (Carson et al., 1963). 1964 wurde der zugrunde liegende Enzymdefekt von Mudd und Mitarbeitern als Cystathionin- $\beta$ -Synthase-Defizienz charakterisiert.

Wie zuvor (vgl. 2.2) beschrieben, ist nicht einzig die Cystathionin- $\beta$ -Synthase für den Abbau von Homocystein verantwortlich, da es alternativ durch Remethylierung zu Methionin abgebaut werden kann. Störungen im Remethylierungsweg können durch Enzymdefizienzen der Methioninsynthase (Pajares et al., 1992) oder im Folsäure- (Blom, 1998) oder Cobalamin-Stoffwechsel (Fowler, 1998) oder durch einen Mangel von Vitamin B<sub>12</sub> oder Folsäure (N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat-Präcursor) verursacht sein, da diese Reaktion N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat als Methylendonator und Cobalamin als primären Methylgruppenakzeptor braucht (vgl. Abbildung 3). Auch ein Mangel an Pyridoxal (Vitamin B<sub>6</sub>) kann eine Hyperhomocysteinämie auslösen, da Pyridoxal als Kofaktor der Cystathionin- $\beta$ -Synthase fungiert (Pietrzik et al., 1998).

Die Plasmakonzentrationen von Homocystein liegen im gesunden Menschen bei 5-9  $\mu\text{mol/l}$ . Bis 12  $\mu\text{mol/l}$  spricht man von einer leichten, bis 30  $\mu\text{mol/l}$  von einer moderaten, bis 100  $\mu\text{mol/l}$  von einer starken Erhöhung und ab 100  $\mu\text{mol/l}$  von einer sehr starken Erhöhung des Plasma-Homocysteinspiegels (Ubbink, 2001). Der Grad der Hyperhomocysteinämie hängt von der zugrundeliegenden Stoffwechselstörung ab. Vitaminmangel führt zu einer leichten Erhöhung, eine heterozygote Enzymdefizienz oder eine Punktmutation im Methyltetrahydrofolat-Reduktase-Gen zu einer moderaten Erhöhung und homozygote Enzymdefizienz der Cystathionin- $\beta$ -Synthase oder von Enzymen im Cobalamin- oder Folatstoffwechsel zu einer starken Erhöhung des Plasma-Homocystein-Spiegels (Blom, 2001).

Da Homocystein zu einem geringen Prozentsatz renal ausgeschieden wird (Fux et al., 2005), und weiterhin im Nierengewebe verstoffwechselt wird, kann sich bei Nierenschäden die Konzentration von Homocystein im Plasma erhöhen (Herrmann et al., 2005c; Nair et al., 2005).

## **2.5 Hyperhomocysteinämie und assoziierte Krankheitsbilder**

Bereits angesprochen wurde, dass Homocysteinämie außer durch genetische Prädisposition auch ernährungsbedingt, also durch hohe Methioninzufuhr (Bellamy et al., 1998; Tawakol et al., 2002) oder Vitamin B<sub>12</sub>-, Vitamin B<sub>6</sub>- oder Folsäuremangel (Allen et al., 1998; Herrmann et al., 2005c) erhöht sein kann. Nicht bei jeder mit Hyperhomocysteinämie assoziierten Erkrankung ist jedoch die erhöhte Plasmakonzentration an Homocystein der Grund der Erkrankung. Bei Patienten mit Nierenversagen wird Homocystein vermindert renal



ausgeschieden bzw. verstoffwechselt (Stam et al., 2004). Dadurch erhöht sich der Plasma-Homocysteinspiegel (Gupta et al., 1997; Nair et al., 2005) und es kommt zu Störungen im Transmethylierungsstoffwechsel (Loehrer et al., 1998). Beide Faktoren können zu zusätzlichen Komplikationen wie beispielsweise einer Schädigung des Herz-Kreislauf- oder des neuronalen Systems führen (Vollset et al., 2001b).

Erkrankungen, die mit einem Mangel an Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) einhergehen, können eine moderate Hyperhomocysteinämie zur Folge haben. Beispiele dafür sind Malabsorption von Cobalamin oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen (De Bree et al., 2002; Schneede et al., 2000). Steigt die Anzahl der Bakterien im Dickdarm, so verbrauchen diese mehr Vitamin B<sub>12</sub>. So kann vermehrtes Bakterienwachstum im Dickdarm eine Hyperhomocysteinämie hervorrufen (Neale et al., 1972).

Die Assoziation von Homocystein mit sogenannten "Lifestyle-Faktoren" lässt sich zumeist auf eine verminderte Vitaminversorgung der entsprechenden Gruppe (z.B. Raucher, Kaffeetrinker) zurückführen (Vollset et al., 2001a).

In klinischen Studien fand man einen Zusammenhang von Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie (Robbins et al., 2005). Allerdings scheint Hyperhomocysteinämie nicht die Erklärung für ein erhöhtes Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu sein (Hoogeveen et al., 1997). In Patienten mit Typ I Diabetes kommt es erst im Endstadium zu einer Erhöhung der Plasmahomocystein-Konzentration. Dies beruht vermutlich auf der in diesem Stadium bereits fortgeschrittenen Nierenschädigung und der daraus resultierenden schlechten Homocystein-Clearance (Schneede et al., 2000).

Patienten mit Karzinomen oder Schuppenflechte weisen häufig einen erhöhten Plasma-Homocysteinspiegel auf. Dies wird mit einer vermehrten Zellteilung erklärt, obwohl die genauen Mechanismen noch nicht erforscht sind (Refsum et al., 1990). Ebenfalls unklar sind die Ursachen für die Erhöhung des Plasma-Homocysteins bei Schilddrüsenunterfunktion, allerdings normalisieren sich die Homocysteinspiegel unter Substitutionstherapie wieder (Schneede et al., 2000).

Bei einigen Erkrankungen kann die medikamentöse Behandlung Auslöser einer Hyperhomocysteinämie sein. Patienten mit rheumatoider Arthritis weisen einen leichten bis moderaten Anstieg der Plasma-Homocysteinkonzentration auf, wenn sie mit Methotrexat behandelt werden (De Bree et al., 2002; van Ede et al., 2002).

Bei einigen Erkrankungen ist bis heute nicht vollständig geklärt, ob die Hyperhomocysteinämie kausal für die Pathogenese verantwortlich ist oder eine Folge des

bereits bestehenden Krankheitsbildes darstellt. So ist es bei Parkinson fraglich, ob die vermehrte Methylierung von therapeutisch appliziertem L-DOPA für eine stärkere Homocysteinbildung verantwortlich ist (Lamberti et al., 2005; Zoccolella et al., 2005) oder ob Homocystein die L-DOPA-Konzentration senkt (Lee et al., 2005). Auch bei Osteoporose (Herrmann et al., 2005b; Herrmann et al., 2005a) und Komplikationen in der Schwangerschaft (El Khairy et al., 2003) ist die Kausalität der Hyperhomocysteinämie bislang nicht erwiesen (Ingec et al., 2005).

Für neuronale Erkrankungen wie Epilepsie (Kubova et al., 1995; Teunissen et al., 2005); (Folbergrova et al., 2005) Alzheimer (Dwyer et al., 2004; Mattson, 2003; Souto et al., 2005) und Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wie Thrombosen, Stenosen, Gerinnungsstörungen und Plättchenfunktionsstörungen (Fonseca et al., 1999) gibt es in der Literatur Theorien zur Pathogenese durch Homocystein oder Veränderungen des Transmethylierungsstoffwechsels. Diese sind im Folgenden ausführlicher beschrieben.

## **2.6 Theorien zur pathogenen Wirkung von Homocystein**

Der Wirkmechanismus, über den Homocystein verschiedenste Organschädigungen verursacht, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Dies liegt zum einen an der Vielzahl von Erkrankungen, die mit Hyperhomocysteinämie assoziiert sind (vgl. 2.5), zum anderen aber auch an den vielfältigen Wirkungsmöglichkeiten des Homocysteins über verschiedenste Enzyminhibierungen. Eine Auswahl ist nachfolgend dargestellt.

### 2.6.1 Theorien zur Wirkung von Homocystein auf die neuronale Funktion

Hyperhomocysteinämie wird aufgrund klinischer Studien mit Morbus Parkinson (Lee et al., 2005), Demenzerkrankungen (Quadri et al., 2005), Epilepsie (Teunissen et al., 2005), sowie Alzheimer (Dwyer et al., 2004) und Histidinämie (Klee, 1974) assoziiert. Viele neuronale Defekte können nicht eindeutig diagnostiziert werden, da ihre Pathogenese nicht geklärt ist. Obwohl beispielsweise spezielle Funktionstest und bildgebende Verfahren einen Hinweis auf Morbus Alzheimer geben, kann diese Erkrankung erst post mortem durch eine hohe Anzahl von amyloiden Plaques und verzweigten Neurofibrillen im Gehirn eindeutig diagnostiziert werden (Jacobsen et al., 2005).

Bekannt ist jedoch, dass sowohl bei Morbus Alzheimer, als auch bei Epilepsie eine vermehrte Aktivierung von Glutamatrezeptoren bestehen kann. Bei Glutamatrezeptoren wird unterschieden zwischen ionotropischen Rezeptoren, die bei ihrer Aktivierung die Offenwahrscheinlichkeit bestimmter Kationenkanäle erhöhen, und metabotropischen Rezeptoren, die über heterotrimere G-Proteine biochemische Signale an die Zelle weitergeben. Ionotropische Glutamatrezeptoren werden nach dem Prototypen ihrer Agonisten benannt: NMDA (N-Methyl-D-Asparaginsäure), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure) und Kainat (Mares et al., 2004). Auch Homocystein kann die N-Methyl-D-Asparaginsäure Glutamatrezeptoren aktivieren, der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Theorien werden heute diskutiert. Homocystein könnte direkt an den Rezeptoren als Agonist wirken (Flott-Rahmel et al., 1998; Lipton et al., 1997) oder die Aktivität von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen verändern (Teunissen et al., 2005). Ein weiterer potentieller Wirkmechanismus wurde in Zellkulturexperimenten nachgewiesen: Asparaginsäure kann nach Homocysteinstimulation von Granulocyten im Cerebellum sekretiert werden (Dunlop et al., 1992). Durch das vermehrte Angebot an Asparaginsäure und erhöhte Transmethylierungsreaktionen kann die NMDA-Konzentration erhöht werden und die Rezeptoren können somit stärker aktiviert werden. Der Mechanismus, über den Homocystein Asparaginsäure freisetzt, ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Auch wurde bislang nicht gezeigt, dass dieses Phänomen auch in vivo von Bedeutung ist.

Morbus Parkinson geht mit einer verminderten Bioverfügbarkeit von Dopamin einher (Lee et al., 2005). Dopamin ist ein wichtiger Transmitter an Synapsen. Es wird aus seinem Präcursor 3,4-Dihydroxy-Phenylalanin (L-DOPA) gebildet, welches hauptsächlich durch die Tyrosinhydroxylase (E.C. 1.14.16.2) aus Tyrosin synthetisiert wird. Einen signifikanten Anteil an der L-DOPA-Bildung hat auch die Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1), die hauptsächlich die Synthese von Melanin aus L-Tyrosin katalysiert (Eisenhofer et al., 2003). In vitro Versuche zeigten, dass Homocystein die Tyrosinase inhibieren kann. Im aktiven Zentrum des Enzyms sitzt ein Kupfer-Ion, welches durch freie Thiole wie Homocystein chelatiert werden kann, wodurch die Aktivität des Enzyms sinkt (Reish et al., 1995).

Bei vielen neuronalen Erkrankungen ist nicht nur die Pathogenese sondern auch die zugrundeliegende Pathobiochemie noch ungeklärt, da ein signifikant veränderter Parameter des Stoffwechsels nicht immer einen Phänotypen zeigt. Beispielsweise zeigten viele Patienten mit Histidinämie keinerlei klinische Symptome, allerdings sind auch viele Fälle von

Histidinämikern mit beeinträchtigten geistigen Fähigkeiten und Sprachstörungen beschrieben. An Ratten wurde gezeigt, dass eine Fütterung mit Histidin oder einem Inhibitor der Histidase (EC 4.3.1.3) die Lernfähigkeit beeinträchtigt (Virmani et al., 1993). Histidase wird hauptsächlich in der Leber und im Stratum corneum der Haut exprimiert und katalysiert den Abbau von Histidin zu Urukaninsäure (Taylor et al., 1991).

In in Vitro Versuchen wurde nachgewiesen, dass Homocystein die Histidase inhibiert (Klee, 1974). Der Inhibierungsmechanismus wurde für Homocystein nicht untersucht, nur für Cystein. Für Cystein wurde eine direkte Bindung an das Enzym nachgewiesen, die direkt mit der Inaktivierung korreliert. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich als katalytische Einheit ein Dehydroalanin (Rother et al., 2001). Die Bindung von Cystein scheint nicht im aktiven Zentrum zu erfolgen, weil Lanthionin - das Produkt der Reaktion von Cystein und Dehydroalanin - nicht nachgewiesen werden konnte. Da zum Entfernen von enzymgebundenem Cystein eine Denaturierung des Proteins erfolgen muss, ist eine Einlagerung zwischen die Untereinheiten des Proteins mit einer daraus resultierenden Konformationsänderung sehr wahrscheinlich (Klee, 1974).

Es gibt weiterhin Effekte von Homocystein an Nervenzellen, deren Auswirkungen in vivo nicht eindeutig geklärt sind, wie beispielsweise eine Schädigung der Schwannzellen (Surtees, 1998). Die genauen Störungen, die zu Demenzen führen können, sind bislang ungeklärt (Quadri et al., 2005). Oftmals lassen sich Veränderungen in der ZNS-Funktion auch mit Durchblutungsstörungen im Gehirn erklären. Wie Homocystein auf die Blutversorgung von Organen wirken kann, ist im Folgenden beschrieben.

### 2.6.2 Theorien zur Wirkung von Homocystein auf das Gefäßsystem

Homocystein gilt als unabhängiger Indikator für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (McCully, 2005; Stehouwer et al., 1998). Eine wichtige Rolle bei der Gefäßfunktion übernimmt das Endothel. Bei einer endothelialen Dysfunktion werden gefäßdilatierend wirkende Substanzen vermindert oder überhaupt nicht mehr aus den Endothelzellen freigesetzt und Signalkaskaden aktiviert, die Leukozyten und Thrombocytenadhäsion fördern (Drexler et al., 2003). Beispiele für vasodilatatorische Substanzen sind Adenosin (Deussen et al., 1999) oder Stickstoffmonoxid (NO) (MacAllister et al., 1996). Die Leukozytenadhäsion wird unter anderem durch Adhäsionsproteine wie ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) und VCAM-1 (vascular adhesion molecule) und das Cytokin MCP-1 (monocyte chemoattractant

protein) gesteuert. Die Expression dieses Proteins kann durch NO geregelt werden (Drexler et al., 2003). Auch Adenosin beeinflusst die Neutrophilenanlagerung an das Endothel (Zernecke et al., 2006).

Mehrere Studien belegen, dass bereits eine leichte Erhöhung des Plasma-Homocysteinspiegels die Bioverfügbarkeit von NO senkt und sich dadurch negativ auf die Funktion der Endothelzellen auswirkt (Boers, 1998; Dimitrova et al., 2002; Zhang et al., 2000). NO wird im Endothel hauptsächlich von der endothelialen NO-Synthase (eNOS; E.C. 1.14.13.39) gebildet (Knowles et al., 1994). Es konnte allerdings kein direkter inhibierender Effekt des Homocysteins auf die eNOS nachgewiesen werden. Es wäre also durchaus möglich, dass nicht das Homocystein per se für die beschriebenen Effekte verantwortlich ist, sondern andere durch Homocystein hervorgerufene Stoffwechselveränderungen. So könnte beispielsweise eine Erhöhung von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) für den ungünstigen Einfluss von Homocystein auf die Gefäßfunktion verantwortlich sein. ADMA ist ein Inhibitor der eNOS und gilt daher als unabhängiger Risikoindikator für Herz-Kreislaufkrankungen (Ito et al., 1999). Es wird durch Methylierung von Arginin gebildet und hauptsächlich durch die Dimethylargininase (DDAH; E.C. 3.5.3.18) abgebaut (Böger et al., 2001).

Wird die DDAH gehemmt, so wird weniger NO von den Endothelzellen freigesetzt, wodurch die Relaxation von Blutgefäßen eingeschränkt ist. Stühlinger und Mitarbeiter (2001) fanden heraus, dass Homocystein dieses Enzym hemmen kann. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich ein komplexiertes Zn(II)-Ion (Knipp et al., 2001). Dieses ist zwar für die Funktionalität des Enzyms entscheidend, aber da die ADMA-Hydrolyse von Homocystein kompetitiv inhibiert wird und Dithiothreitol die Bindung von Homocystein an die DDAH verhindern kann, scheint eine Thiolgruppe in der katalytischen Domäne der Angriffsort des Homocysteins zu sein (Stühlinger et al., 2001). Am Menschen wurde ebenfalls ein korrelativer Zusammenhang zwischen Homocystein und ADMA nachgewiesen (Doshi et al., 2005).

Auch Adenosin reguliert den Gefäßdurchmesser über NO (Deussen et al., 2005). Der Effekt auf die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel wird direkt über Adenosinrezeptoren durch die extrazelluläre Adenosinkonzentration moduliert (Zernecke et al., 2006). Da die SAH-Hydrolase ein bidirektional wirksames Enzym ist, kann es bei Erhöhung der intrazellulären Homocysteinkonzentration zu einer vermehrten intrazellulären Bildung von SAH kommen (Deussen et al., 1989). Obwohl Adenosin zu einem grösseren Anteil intrazellulär gebildet

wird, wird es unter physiologischen Bedingungen netto zellulär aufgenommen (Deussen et al., 1999). Durch diese vermehrte Aufnahme könnte die extrazelluläre Adenosinkonzentration bei erhöhter Homocysteinkonzentration im Gewebe gesenkt werden (Riksen et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die adenosinvermittelte Dilatation bei Cystathionin- $\beta$ -Syntase-defizienten Patienten beeinträchtigt ist (Riksen et al., 2005a; Riksen et al., 2005b). Chen und Mitarbeiter beobachteten in einer Studie an Ratten, dass die Adenosinkonzentration im Plasma bei Infusion von Homocystein erniedrigt ist (Chen et al., 2002).

### 2.6.3 Homocystein und oxidativer Stress

Auch über oxidativen Stress kann Homocystein die Gefäßfunktion (Cavalca et al., 2001) und somit die neuronale Funktion (Dayal et al., 2004; Zhang et al., 1998) möglicherweise beeinflussen. Als oxidativer Stress wird ein erhöhter Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies bezeichnet. Die wichtigsten Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Organismus sind das Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal und Peroxynitrit. Eine vermehrte Konzentration an ROS kann die Bioverfügbarkeit von NO durch Bildung von Peroxynitrit senken (Drexler et al., 2003). Durch Radikale können auch die Fraktion des low density lipid (LDL) verändert werden, zum einen durch Oxidation der in den LDL-Partikeln gespeicherten Lipide (Heinecke et al., 1987), zum anderen durch Nitrierung der Proteine, die diese Lipide umgeben (Griffiths et al., 2006). Die Oxidation des LDL lässt sich in vitro durch Radikalfänger blockieren (Nakano et al., 2005). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass methionin-induzierte Verschlechterungen der endothelabhängigen Gefäßfunktion durch Gabe von Radikalfängern wie Ascorbinsäure (Nappo et al., 1999) oder dem antioxidativ wirksamen Hormon 17- $\beta$ -Östradiol (Dimitrova et al., 2002) reversibel sind (Mahfouz et al., 2004). Auch der Homocysteinpräcursor SAM kann die Radikalbildung vermindern, zum einen über eine vermehrte Gluthathion-Synthese, zum anderen inhibiert es Eisen(II)-induzierte Oxidationsreaktionen in vitro (Caro et al., 2004).

Freies Homocystein liegt in einem Gleichgewicht zwischen der reduzierten und der oxidierten Form vor (vgl. 2.4). Bei der Autooxidation von reduziertem Homocystein können Superoxid-Anionen entstehen, die wiederum mit NO Peroxynitrit bilden können (Koch et al., 1998). Allerdings ist das Oxidationspotential von Homocystein wesentlich geringer als dasjenige von Cystein, da die Plasmakonzentration an Cystein ca. 25-30 mal grösser ist als die Homocysteinkonzentration (Jacobsen, 2000). Ein weiterer Hinweis ist, dass sowohl

Homocystein als auch Homocystin zu vermehrter Lipidperoxidation führen. Daher kann das Oxidationspotential des Homocysteins nicht alleinig für die vermehrte Radikalproduktion verantwortlich sein (Heydrick et al., 2004).

Ein anderer potentieller Mechanismus zur Induktion von Radikalen ist die Hemmung der Transskription des Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzyms Glutathion Peroxidase durch Homocystein, wodurch die Enzymaktivität sinkt (Weiss et al., 2002) und sich die Radikalkonzentration erhöhen kann (Upchurch, Jr. et al., 1997). Dieser Effekt kann durch Überexpression der Glutathion Peroxidase aufgehoben werden (Weiss et al., 2001). Eine vermehrte Produktion von Radikalen kann auch eine vermehrte Lipid-Peroxidation zur Folge haben.

## **2.7 Methionin- und Homocysteinhaushalt**

### **2.7.1 Homocystein- und Methioninkonzentration im Tagesverlauf**

Bei gesunden Probanden ist die durchschnittliche Methioninkonzentration im Plasma mit 22,7  $\mu\text{mol/l}$  höher als die von Homocystein mit 7,6  $\mu\text{mol/l}$  (Guttormsen et al., 2004). Die Konzentration von Homocystein schwankt im Tagesverlauf unabhängig von der Nahrungsaufnahme (von 6,7 nachmittags bis 9,8  $\mu\text{mol/l}$  in der Schlafperiode), wohingegen die Methioninkonzentration weitestgehend stabil bleibt (Lavie et al., 2004). Die Methioninkonzentration im Plasma erhöht sich nach der Nahrungsaufnahme deutlich, wohingegen die Homocysteinkonzentration durch Nahrungsaufnahme nicht signifikant verändert wird (Guttormsen et al., 2004). Im Gegensatz dazu erhöht sich bei übermäßig hoher Methioninzufuhr [z. B. Methionine Load Test mit 100 mg Methionin pro kg Körpergewicht, (Fonseca et al., 1999)] die Plasmakonzentration von Homocystein deutlich, wobei zunächst das reduzierte Homocystein ansteigt und sich dann das Gleichgewicht zwischen den Fraktionen von Homocystein wieder einstellt.

### **2.7.2 Resorption von Homocystein und Methionin**

Proteine aus der Nahrung werden zunächst im Magen in Peptide und im Dünndarm in Oligopeptide und Aminosäuren gespalten, welche im Dünndarm resorbiert werden (Schmidt et al., 2006). Dabei unterscheidet sich die Transportkapazität für Methionin in den einzelnen Dünndarmsegmenten erheblich. Aminosäuretransporter der Darmmucosa sind bis heute nicht

ausreichend untersucht, bekannt ist jedoch, dass Methionin hauptsächlich im vorderen Bereich des Jejunum aufgenommen aufgenommen wird (Schedl et al., 1968). In Ratten könnte ein Transporter mit hoher Affinität zu Prolin, Glycin und Methionin einen grossen Anteil an der Resorption von Methionin haben (Newey et al., 1964). Die beteiligten Transportsysteme im Menschen sind nicht eindeutig geklärt, aber es scheinen mehrere Transporter involviert zu sein (Schedl et al., 1968). Obwohl eine Methionin-Malabsorption klinisch beschrieben ist (Oasthouse-Syndrom) ist der zugrundeliegende Transportdefekt bislang nicht geklärt, da diese Erkrankung sehr selten auftritt (Siegenthaler, 2001). Transporter für Homocystein im Darm sind bislang nicht untersucht worden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Cystein ist es wahrscheinlich, dass es über das gleiche Transportsystem wie Cystein (rBAT-Transporter) aufgenommen wird (Palacin et al., 1998). Normalerweise ist der Dünndarm nur mit ca.  $10^5$  Bakterien pro Milliliter besiedelt. Die Bakterienzahl wird durch saure Magenausscheidungen, die Darmperistaltik, Gallensäure und sekretorische Immunglobuline gering gehalten (Neale et al., 1972). Ob die Freisetzung von Methionin oder Homocystein aus Darmbakterien einen Einfluss auf die Plasma-Konzentration von Methionin oder Homocystein hat, wurde bislang nicht untersucht.

### 2.7.3 Renale Ausscheidung von Homocystein und Methionin

Die Konzentration von Homocystein, aber nicht die von Methionin ist im Plasma vom Patienten mit Nierenschädigung im Endstadium erhöht (Hong et al., 1998). Das weist darauf hin, dass die Eliminierung durch die Niere einen wichtigen Anteil an der Homocystein-clearance nicht aber an der Methionin-clearance hat.

Sowohl Homocystein (Carson et al., 1963) als auch Methionin (Kinsell et al., 1949) können beim gesunden Menschen ohne Gabe von Methionin bzw. Homocyst(e)in nicht im Urin nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer geringen Molekülgrösse und -ladung werden beide Substanzen glomerulär frei filtriert (Schmidt et al., 2006). Daher entspricht die Konzentration an Methionin bzw. Homocystein im Primärharn der Plasmakonzentration. Da die Konzentration im Endharn mindestens um Faktor 1000 niedriger ist (nicht nachweisbar), müssen Transportsysteme im Tubulussystem den grössten Teil des filtrierten Homocysteins bzw. Methionins rückresorbieren. Diese Transportsysteme sind wie auch die Transportsysteme im Dünndarm (vgl. 2.7.2) bislang nicht geklärt.



Untersuchungen zur renalen Clearance von Homocystein wurden von Fux und Mitarbeitern (2005) durchgeführt. Nach oraler Gabe von Homocystein wurde es mit einer Halbwertszeit von  $257 \pm 41$  min abgebaut. Allerdings wurden nur 2,3 % der Plasmakonzentration im Urin gefunden. Die restlichen 97,7 % wurden im Körper zu anderen Verbindungen abgebaut (Fux et al., 2005). Die Gesamtclearance von Homocystein im Körper entspricht also nur zu einem untergeordneten Teil der Eliminierung mit dem Urin.

Nach oraler Gabe von 1 g Methionin alle 4 Stunden über 4 Tage bestimmten Frimpter und Greenberg (Frimpter et al., 1967) an einem Patienten mit heterozygoter Cystathioninurie die filtrierte und ausgeschiedene Menge an Methionin, sowie die glomeruläre Filtrationsrate. Aus diesen Daten schätzten sie die Rückresorptionsrate ab. Die Plasmakonzentration des Patienten lag mit  $221 \mu\text{mol/l}$  10-fach höher als normal (vgl. 2.7.1). Es wurde bei einer glomerulären Filtrationsrate von  $108 \text{ ml/min}$  eine filtrierte Menge von  $23,9 \mu\text{mol/min}$  und eine ausgeschiedene Menge von  $0,245 \mu\text{mol/min}$  bestimmt. Daraus resultierte eine Rückresorptionsrate von 99 %. Die Eliminierung über den Urin ist folglich bei beiden Substanzen wesentlich niedriger als der endogen verstoffwechselte Anteil.

Homocystein kann also, wenn es über die Nahrung zugeführt wird, resorbiert und verstoffwechselt werden. Systematische Untersuchungen, ob und in welchen Konzentrationen Homocystein in der Nahrung enthalten ist, wurden bislang nicht durchgeführt. Vielmehr ist es ein bislang unbewiesenes Dogma, dass Homocystein im Plasma zu wesentlichen Teilen aus alimentärem Methionin gebildet wird. Bekannt ist, dass eine erhöhte alimentäre Methioninzufuhr den Plasma-Homocysteinspiegel erhöhen kann und dass Hyperhomocysteinämie mit diversen Krankheitsbildern assoziiert ist. Der Folgeschluss, dass diese Krankheitsbilder auch durch längerfristiger erhöhte alimentäre Methioninzufuhr verursacht werden können, ist bislang rein hypothetisch. Der Kausalzusammenhang soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden. Des weiteren soll untersucht werden, welches der in der Literatur beschriebenen Modelle für experimentelle Hyperhomocysteinämie der klinisch beobachteten Hyperhomocysteinämie am nächsten kommt.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Geräte

##### 3.1.1 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
1,N <sup>6</sup> -Ethenoadenosine, 99 %	Sigma
1,N <sup>6</sup> -ethenoadenosine-5'-monophosphate, 99 %	Sigma
7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid Ammonium salt, 98,5 %	Fluka
Acetonitril, HPLC grade	Merck
Acetylcholin, 99 %	Sigma
Acrylamid-Lösung, 30 %	Roth
Adenosin, 99 %	Sigma
Adenosindiphosphat, 98 %	Sigma
Adenosinmonophosphat, 99 %	Sigma
Adenosintriphosphat, 99,5 %	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat, 98 %	Roth
Amoniumacetat, p.A.	Roth
Anti-eNOS Antikörper (raised in mouse)	BD Pharmingen
Anti-iNOS Antikörper (raised in mouse)	BD Pharmingen
Anti-mouse IgG, HRP-conjugated	Dianova
Anti-rabbit IgG, HRP-conjugated	Dianova
Anti-SAHH (raised in rabbit) von Dr. D. Kloor (Uni Tübingen)	
Aprotinin	Fluka
Bromphenolblau, p. A.	Roth
Borsäure, p. A.	Merck
Calciumchlorid, p. A.	Sigma
Chloracetaldehyde, 45 %	Merck
Chloroform, purum	Sigma
Collagenase Type II für Zellkulturzwecke	PAA laboratories GmbH
D(+)-Glucose, p. A.	Merck
Detektionsreagenzien Western Blot	Amersham
di-Natriumhydrogenphosphat, p. A.	Sigma
Dithiotreitol, 99 %	Sigma
Dublencos modified eagle medium (DMEM)	Gibco
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Endothelial Cell Growth Medium	Promo Cell
Entwicklerlösung	AGFA
Essigsäure, 100 % (Eisessig)	Merck
Ethanol, 96 % (vegällt)	J.T.Baker
Fixierlösung	AGFA
Fötales Kälberserum (FCS) Gold, hitzeinaktiviert	PAA
GC-FID-Kit "Physiologische Aminosäuren"	Phenomenex
Gelatine Typ A from porcine skin	Sigma
Glycin, p. A.	Roth
Heparin, zur Injektion	Roche
HEPES für Zellkulturzwecke	Sigma
Homocystein, 99,8 %	Sigma
HPLC-Kit "Homocystein"	Immun-Diagnostik
Kaliumchlorid, p. A.	Fluka

Reagenz	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat, p. A.	Merck
Kaliumhydroxid, p. A.	Roth
Kaliumphosphat, p. A.	Sigma
Kohlendioxid, technisches Gas	Messer GmbH
Leupeptin	Fluka
M 199, lyophilisiert	Gibco
Magnesiumsulfat	Sigma
Methanol, HPLC grade	Merck
Methionin für Rattenfutter	Sigma
Methionin für Zellkultur, p. A.	Sigma
Molecular weight marker für Western Blot	Sigma
Natriumchlorid, p. A.	Merck
Natrium-Dodecylsulfat, p. A.	Sigma
Natriumhydrogencarbonat, p. A.	Sigma
Natrium-Nitroprussid, zur Injektion	Schwarz Pharma
Noradrenalin, zur Injektion	Jenapharm
Penicillin / Streptomycin (je 100 Units)	Biochrom
Pentansulfonsäure, p. A.	Sigma
Pepstatin A	Fluka
Perchlorsäure, p. A.	Merck
PMFS, 99 %	Roth
Natriumpyruvat, 99 %	Sigma
Reinstwasser, hauseigene Entsalzungsanlage (Ionentauscher)	
S-Adenosyl-Homocystein, 99 %	Sigma
S-Adenosyl-Methionin, 80 %	Sigma
Sauerstoff, technisches Gas	Messer GmbH
Stickstoff, technisches Gas	Messer GmbH
TEMED, 99 %	Roth
Tetrabutylammonium-hydrogensulfat (TBAS), 97 %	Aldrich
TRIS, 99,9 %	Roth
Trockenmilchpulver	Fluka
Trypsin-EDTA, steril, für Zellkulturzwecke	Gibco
Tween-20	Roth
Wasserstoffperoxid, 30 %	Roth
Zitronensäure, p. A.	Merck

### 3.1.2 Geräte und Materialien

Gerät	Beschreibung
Analysenwaage PG 502	Mettler Toledo
Autoklav Vakulab HP	Münchner Medizin Technik (MMM)
Bioculares Mikroskop	Olympus SZ60 Objektiv: 100AL0.SX Highlight 3100
Brutschrank	BBD 6220Heraeus instruments
Druckluftevaporator	Hereaus
Elektrophorese-System	Biorad Stromquelle, Gelgiesssystem, Elektrophorese-Kammer, Platte mit Spacern (1,5 mm), Deckplatte, Kämme

<b>Gerät</b>	<b>Beschreibung</b>
Entwicklungskammer Hypercassette	Amersham pharmacia biotech
Eppendorf Pipetten Reference	Eppendorf AG 0,1-10µl, 2-20 µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl, 5000µl
Feinwaage AG 104	Mettler Toledo
Floureszenz-Detektor	Merck-Hitachi
Flow-Bank	Clean Air
Folienschweissgerät	Severin Folio
GC-FID	Varian Instruments Software: Galaxy
Halbautomatischer Homogenisator nach Potter	Schütt Labortechnik
HPLC 1: Alliance 2695	Waters Software: Millenium <sup>32</sup>
HPLC 2: Pumpe: Waters 600	Waters
Autosampler: Waters 717	Software: Millenium <sup>32</sup>
Kohlendioxid-Box	Spezialanfertigung des UKD zur Narkotisierung von Ratten
LC-MS/MS	Varian 1200L Triple Quadrupole MS HPLC: Varian ProStar 210 Säule: Varian Polaris (50x2,0 mm; 3µm)
Lyophilisator	Christ alpha
Myograph	Vakuumpumpe von Brandt Power Lab/400 von AD-Instruments Kammer: Mitutoyo Interface: Myo-Interface Model 410A Danish Myo Technologies SoftwareCart v4.1.2 von AD Instruments
Operationsbesteck: Scheren, Klemmen, Pincetten, Knopfkanülen	Fine Science Tools
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss
Axiovert 25	Objektive: A-Plan 5x; LD-Plan 20x; A-Plan 10x
Reinstwasseranlage	Purelab Plus
Säule: µBondapak	Waters (3.9x250; 10 µm)
Säule: Novapak	Waters (3.9x150; 5 µm)
Säule: XTerra MS C18 mit Vorsäule	Waters (4,6x50; 5 µm)
Thermomixer	Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus
Ultraturax	IKA-Labortechnik Staufen
Vials für HPLC 1 mit Inlets (Glas)	Waters
Vials für HPLC 2	Waters
Wärmeschrank	Heraeus instruments
Zentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus
Multifuge 4 KS-R	Heraeus
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Beschreibung</b>
Pipettenspitzen 2-200µl	Eppendorf AG
Handschuhe Safeskin Satin Plus	Kimberly Clark powder free
Membranfilter Type FH	Millipore Porengröße 0,5µm
Membranfilter Type HVLP	Millipore Porengröße 0,45µm

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Beschreibung</b>
Pasteur-Pipetten Glas	VWR international
PP-Test-Tubes	320mm, offene Spitze Cellstar Greiner bio-one GmbH
Safe Lock Tubes	15ml und 50ml Eppendorf
Inlets für Vials der HPLC 2	0,5ml; 1,ml; 2ml Waters
Zellkulturflaschen (50ml, 25cm <sup>2</sup> )	Greiner
Zellkulturplatten (35mm, 9,6 cm <sup>2</sup> )	nunc
Monovetten (heparinisiert)	Sarstedt
Plastikbeutel (Vernichtungsbeutel)	VWR
Pipettenspitzen 0,5-10µl	Greiner
Pipettenspitzen 2-200µl	Greiner
Pipettenspitzen 100-1000µl	Greiner
Photopapier	Amersham
Nitrozellulose-Membran	Amersham Bioscience
Filterpapier	Schleicher & Schüll
Spritzenvorstzfilter 0,22µm	Roth
CA-Folie ( x cm)	Schleicher & Schüll
Spritzen, 20ml	BD Discardit II

### 3.2 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente wurden mit zwei verschiedenen Zellarten durchgeführt: an Primärkulturen von Endothelzellen (HUVEC) und an der Zelllinie HepG2. Die zur Isolation und Kultivierung dieser Zellen benötigten Puffer und Lösungen sind im Anhang unter 8.1.3 aufgeführt.

#### 3.2.1 Präparation und Kultivierung von HUVEC

Humane Nabelschnur-Venen-Endothelzellen (HUVEC) wurden innerhalb eines Zeitfensters von 24 Stunden nach einer Geburt isoliert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Nabelschnur zunächst äußerlich gereinigt und mit Ethanol (70 %) desinfiziert. Die Vena umbilicalis wurde nach gründlichem Spülen mit PBS über eine Knopfkanüle mit Kollagenase II (0,5 % in PBS) befüllt und mit Nadelhaltern verschlossen. Die benötigte Menge an Kollagenase richtete sich nach der Länge der Nabelschnur und lag zwischen 15-30 ml. Während einer 11-minütigen Inkubation bei 37 °C in PBS lockerten sich die Zellkontakte zwischen Endothelzellen und subendothelialelem Gewebe und die Endothelzellen konnten durch sorgfältiges Klopfen von der Gefäßwand abgelöst werden. Zum Abstoppen dieser Protease-Reaktion wurden 10 ml kaltes Kulturmedium M199 zur Zellsuspension aus der Nabelschnur gegeben. Zwischen dem

Befüllen der Nabelschnur mit Kollagenase und dem Abstoppen der Reaktion lagen nicht mehr als 15 Minuten, um eine Zellschädigung und ein vermehrtes Ablösen von Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten zu vermeiden. Durch Zentrifugation (4 °C, 5 min, 1200 U/min) wurden die Zellen sedimentiert. Der Kollagenasehaltige Überstand wurde vorsichtig aspiriert und das Zellpellet in Kulturmedium M199 resuspendiert. Zur Anzucht dieser Primärkultur dienten Zellkulturflaschen (Bodenfläche 25 cm<sup>2</sup>), die mit 0,5 %iger Gelatine-Lösung 15 Minuten bei 37°C beschichtet worden waren. Diese wurden mit 4 ml M199 auf 37°C vorgewärmt, bevor das resuspendierte Zellpellet zugegeben wurde.

Die entstandene Co-Kultur aus Erythrozyten, Endothelzellen und evtl. vorhandenen Fibroblasten oder glatten Muskelzellen wurde zunächst über 24 Stunden bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % im Brutschrank inkubiert. Durch eine gründliche Spülung mit PBS wurde der Hauptanteil von Erythrozyten abgetrennt. Die nachfolgende Kultivierung im Endothelial Cell Growth Medium selektierte durch den Zusatz von speziellen Wachstumsfaktoren zwischen Endothelzellen und Fibroblasten/glatten Muskelzellen. Die Primärkulturen wurden unter täglicher Kontrolle mittels Phasenkontrastmikroskop auf evtl. Kontaminationen bis zur Konfluenz vermehrt. Eine konfluente Zellschicht ist ein dichten, zusammenhängenden einschichtigen Zellrasen mit engem Zellkontakt.

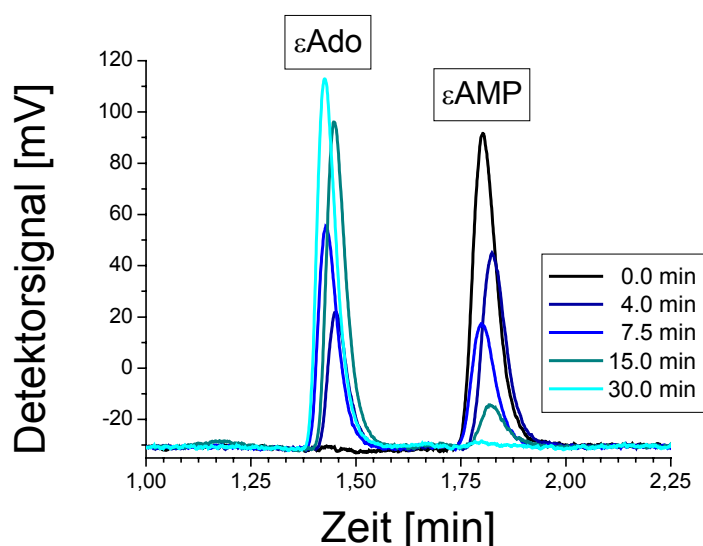
Für die Versuche wurden die Zellen auf Zellkulturplatten (Durchmesser 35 mm) ausgesät. Nach Aspirieren des Zellmediums wurde mit PBS gespült, um die im Medium enthaltenen Trypsin-Inhibitoren zu entfernen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA und Inkubation über 1 Minute bei 37 °C wurden die Zellen von der Gelatineschicht gelockert. Bevor die Zellen sich endgültig ablösten, rundeten sich die zuvor langgestreckten Zellen ab. Diese Reaktion wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt und das Trypsin sofort durch Umdrehen der Zellkulturflasche und anschließendes Aspirieren entfernt, sobald alle Zellen eine kugelige Form hatten. Dadurch konnte eine vollständige Ablösung der Zellen sowie eine Trypsin-induzierte Schädigung vermieden werden. Durch kräftiges Klopfen wurden die Zellen vollkommen von der Gelatineschicht abgelöst und anschließend in Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde gleichmäßig auf die gelatinierten Zellkulturplatten verteilt und die Platten - wie oben beschrieben - bis zur Konfluenz gezüchtet.

### 3.2.2 Kultivierung von HepG2-Zellen

Die Zelllinie HepG2 wurde 1975 von Aden und Mitarbeitern (Aden et al., 1979) aus einem Leber-Tumor eines männlichen Patienten isoliert. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen HUVEC können diese Zellen sehr oft passagiert werden, ohne ihre charakteristischen Eigenschaften zu verlieren (immortale Zellen). Auch Proteine, die unter den geschaffenen Kulturbedingungen von den Zellen nicht benötigt werden, werden weiterhin exprimiert. Da der Substratbedarf dieser Zellen anders als der von HUVEC ist - sie benötigen beispielsweise mehr Glucose - erfolgte die Kultivierung der Zellen in DMEM. Zur Durchführung der Versuche wurden die Zellen in einen speziellen auf die Zellbedürfnisse zugeschnittenen Puffer umgesetzt.

### 3.2.3 Aktivitätsmessung der ekto-5'-Nukleotidase

Die Aktivität der ekto-5'-Nukleotidase wurde an HUVEC gemessen, um den Einfluss von Homocystein und Methionin auf dieses Enzym zu untersuchen. Hierbei wurde 1,N<sup>6</sup>-etheno-AMP, ein fluoreszierendes AMP-Derivat, zum Inkubationsmedium gegeben und die Konzentration an AMP und Adenosin im Zellüberstand direkt nach der Zugabe und nach 4; 7,5; 15; und 30 Minuten mittels HPLC (vgl. 3.9) bestimmt.



**Abbildung 6:** Chromatographische Bestimmung der ekto-5'-Nukleotidase-Aktivität.

Die Konzentration von εAMP nimmt im gleichen Maße über die Zeit ab wie die von εAdenosin zunimmt.

Hierbei nahm bei aktiver ekto-5'-Nukleotidase die AMP-Konzentration über die Zeit ab und die Adenosin-Konzentration über die Zeit zu. Die Aktivität der ekto-5'-Nukleotidase wurde als Umsatz pro Minute im linearen Bereich der Bildung von 1,N<sup>6</sup>-etheno-Adenosin angegeben. Linear war der Abbau zwischen 4 und 7,5 min. Die weiteren Werte wurden aufgenommen, um Ausgangsbedingungen und Umsatzkinetik zu überprüfen.

#### 3.2.4 Freisetzung von Adenosin und S-Adenosyl-Homocystein

An HUVEC und HepG2 wurde die intra- und extrazelluläre Konzentration von extrazellulären Adeninkörpern (Adenosin, AMP, ADP, ATP und S-Adenosyl-Homocystein), sowie die Bildungsrate von S-Adenosyl-Homocystein mit und ohne Homocystein- bzw. Methioninstimulation bestimmt.

Um die intrazelluläre S-Adenosyl-Homocystein-Konzentration an Primärzellen zu untersuchen, wurden HUVEC 30 Minuten mit und ohne Zusatz von 100 µmol/l Homocystein im entsprechenden Inkubationsmedium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, lyophilisiert und anschließend SAH und die Nukleotide mit 1 mol/l Perchlorsäure extrahiert. Der Extrakt wurde neutralisiert und der SAH bzw. Nukleotidgehalt mittels HPLC-Analytik bestimmt. Ein Maß für die Funktionsfähigkeit von Zellen ist die Energy Charge, die sich - wie in Formel 1 dargestellt - aus dem Verhältnis der Adenin-Nukleotide zueinander berechnet (Atkinson et al., 1967).

#### **Formel 1:** Energy Charge

$$\text{Energy Charge} = \frac{c(ATP) \cdot \frac{c(ADP)}{2}}{c(ATP) + c(ADP) + c(AMP)}$$

Die extrazelluläre Nukleotidkonzentration wurde an HUVEC und HepG2-Zellen ermittelt. Es wurde mit HepG2-Zellen eine Dosis-Wirkungskurve von 3-1000 µmol/l Homocystein bzw. Methionin aufgenommen. Hierzu wurde direkt nach Versuchsbeginn sowie nach 30-minütiger Inkubation im entsprechenden Inkubationspuffer 143 µl Überstand zur HPLC-Messung entnommen. Zur Bestimmung der extrazellulären Nukleotidkonzentrationen und der Bildungsrate von extrazellulärem SAH an HUVEC wurden zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min 60 min und 120 min 143 µl Überstand zur HPLC-Messung entnommen.



In vitro-Ansätze zur Ermittlung der SAH-Bildung ohne Zellbeteiligung wurden in Safe-Lock-Tubes (1,5 ml) durchgeführt. Es wurden 150  $\mu\text{mol/l}$  Adenosin und 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein zu 1 ml Inkubationspuffer oder Zellüberstand (stimuliert und unstimuliert) gegeben und die SAH-Bildung nach 30-minütiger Inkubation mittels HPLC bestimmt.

Um die SAH-Bildung an der Zellmembran zu bestimmen, wurde zunächst die Membranfraktion aus HUVEC isoliert. Hierzu wurde eine konfluente Zellplatte in 1,5 ml PBS mittels eines Zellsrabbers abgeschabt, in ein 2 ml Safe Lock Tube überführt und die Zellen mittels eines Ultraschallfingers lysiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 800  $\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Membranpellet noch zweimal mit je 1,5 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Inkubationspuffer mit 150  $\mu\text{mol/l}$  Adenosin und 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein resuspendiert und die SAH-Bildung nach 30 Minuten gemessen.

### **3.3 Isolierung und Kultivierung der Dünndarmflora**

Es wurde die Dünndarmflora von Ratten untersucht. Hierzu wurde die gesamte Dünndarmflora mit 13 ml Inkubationspuffer für HUVEC (vgl. Anhang, Punkt 8.1.3) aus dem frisch entnommenen Darm gespült. Je 4 ml dieses Isolats wurden entweder nur mit Inkubationspuffer HUVEC oder mit einem Zusatz von 21 mg Methionin bzw. 21 mg Asparaginsäure bei 37 °C in Zellkulturflaschen (T25) inkubiert. Nach 0.5 h, 2 h, 4 h, und 8 h wurden ca. 100  $\mu\text{l}$  Suspension mit einer Spritze entnommen und über einen Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert, um weitere Reaktionen durch Mikroorganismen zu verhindern. Bis zur HPLC-Analyse von Homocystein wurden die bei -20 °C gelagert.

### **3.4 Methionin-Fütterungsstudie an Ratten (4 Wochen)**

Es wurde eine vierwöchige Fütterungsstudie mit methioninreicher Diät durchgeführt. 18 männliche Wistar-Ratten, im Alter von 8 Wochen mit einem Gewicht von 200-250 g, wurden in zwei Gruppen zu je 9 Tieren aufgeteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine normale Diät mit Fertig-Futter der Firma Ssniff (0,35 g/100g Methionin) und Wasser zur freien Verfügung. Tiere der Gruppe MET bekamen das gleiche Fertigfutter und zusätzlich im Trinkwasser 4 g/l Methionin ad libidum.

Die Forschungsarbeit an den Versuchstieren wurde gemäß den Richtlinien des US National Institutes of Health zur Pflege und Nutzung von Versuchstieren durchgeführt und war von dem zuständigen Regierungspräsidium genehmigt worden (AZ 24-9168.11-1-2004-16). Das Trinkwasser wurde alle 1-3 Tage gewechselt.

#### 3.4.1 Organentnahme

Nach Ablauf der Fütterungsperiode wurden die Tiere durch Kohlendioxid-Exposition getötet. Die Experimentatorin wurde durch eine Ausnahmegenehmigung (AZ 24-9168.41-1/2004-16) vom zuständigen Regierungspräsidium ermächtigt, die Tötung der Tiere durchzuführen. Das Abdomen wurde mit einer Querinzision eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und eine Metallklemme zur Stauung der Vena Cava gesetzt. Vollblut wurde durch Punktion der gestauten Vena Cava direkt an der Leber in heparinisierte Monovetten entnommen. Anschließend wurden folgende Organe zur Metabolitenanalyse entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren: Teile der Leber, Teile des Herzens (Herzspitzenregion), Milz, linke Niere und das Großhirn. Diese Organe wurden bis zur Homogenisierung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Zur Analyse der Proteinexpression wurden beide Lungenflügel und ein weiteres Stück Leber entnommen. Zum Schluss wurden die Darmschlingen mit Mesenterium und dem anhaftenden Fettgewebe entnommen und bis zur Messung der Gefäßfunktion der Mesenterialarterien in PSS (Zusammensetzung im Anhang unter Punkt 8.1.1) gelagert.

#### 3.4.2 Aufbereitung von Plasmaproben

Das Vollblut wurde in Heparin-beschichteten Monovetten entnommen. Direkt nach der Organentnahme wurde das Plasma durch 10-minütige Zentrifugation bei  $2000\text{ xg}$  von den korpuskulären Blutbestandteilen getrennt und bis zur Analyse bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Leukocyten wurden verworfen und die Erythrocyten-Fraktion des Blutes bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt.

### 3.4.3 Aufbereitung von Organproben

Die Organe wurden mit einem halb-automatischen Homogenisator nach Potter-Elvehjem in 0,1 mol/l eisgekühlter Perchlorsäure zerkleinert und homogenisiert. Herz und Niere wurden mit 1000 rpm homogenisiert, Leber, Milz und Gehirn mit 900 rpm.

### **3.5 Methionin- bzw. Homocystin-Fütterungsstudie an Ratten (3 Monate)**

Diese Fütterungsstudie wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Homburg (Saar) durchgeführt. Kontrolltiere bekamen eine auf Ratten zugeschnittene Diät auf Cerealienbasis der Firma Altromin. Zusätze von Methionin (1 %) und Homocystin (1 %) wurden mit dem Futter pelletiert verabreicht. Biopsien von Leber und Niere wurden freundlicherweise von Dr. Markus Herrmann für die Metabolitenanalyse zur Verfügung gestellt. Diese Gewebeproben wurden nach Erhalt (Transport auf Trockeneis) lyophilisiert und mit einem halb-automatischen Homogenisator nach Potter-Elvehjem in 0,5 mol/l eiskalter Perchlorsäure mit 900 rpm homogenisiert.

### **3.6 Homocystin- bzw. vitaminfreie Fütterungsstudie an Ratten (3 Monate)**

Diese Fütterungsstudie wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin in Homburg (Saar) durchgeführt. Kontrolltiere bekamen eine Diät aus synthetischem Futter, die speziell auf die Bedürfnisse von Ratten zugeschnitten ist. Zusätzliches Homocystin (2%) wurde mit dem Pellet-Futter beigemischt (Firma Altomir). Tiere in der Vitamin-Mangel-Gruppe erhielten eine Diät ohne Folsäure und Vitamin B 12. Biopsien von Leber, Niere, Herz, Milz und Knochen (unterer Oberschenkel + Knie) wurden freundlicherweise von Dr. Markus Herrmann für die Metabolitenanalyse zur Verfügung gestellt. Leber, Niere, Milz und Herz wurden nach Erhalt (Transport auf Trockeneis) lyophilisiert und mit einem halb-automatischen Homogenisator nach Potter-Elvehjem in 0,5 mol/l eiskalter Perchlorsäure homogenisiert. Herz und Niere wurden mit 1000 rpm homogenisiert, Leber und Milz mit 900 rpm.

Die Knochenbiopsien wurden bereits in Homburg homogenisiert und in einer Puffersuspension auf Trockeneis angeliefert. Diese Proben wurden gefriergetrocknet.

### **3.7 Isometrische Kraftmessung an Mesenterialarterien**

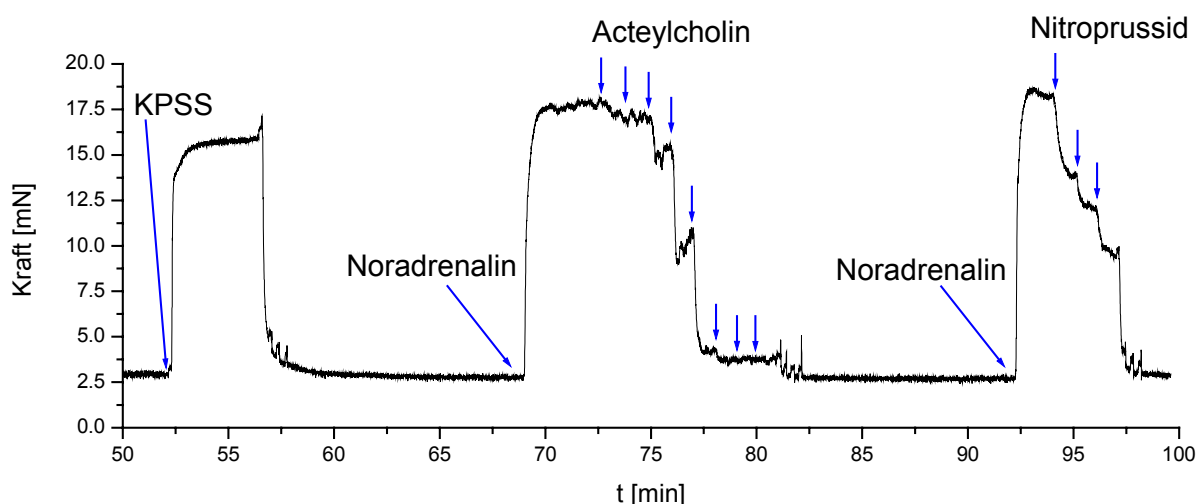
Mittels isometrischer Kraftmessung kann die kontraktile Funktion von Gefäßringen (Gefäßreaktion) beurteilt werden (Buus et al., 1994). Die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang unter 8.1.1 aufgeführt.

#### 3.7.1 Präparation der Mesenterialarterien

Für die Präparation der Arterien aus dem Mesenterium wurde eine Darmschlinge in einer mit PSS gefüllten, gelatinierten Glasschale mit Kanülen fixiert. Nun wurde die Arterie unter dem Mikroskop von anhaftendem Fettgewebe befreit. Die neben der Arterie liegende Vene wurde zur Erleichterung der Präparation durchgeschnitten. Es wurden zwei Drähte durch einen ca. 2 mm langen Arterienring gezogen, die in der Organbadkammer des Mulvany-Myographen mit zwei Schrauben am Kraftmesser fixiert wurden. In dieser Kammer befand sich auf 37 °C vorgewärmte PSS, die kontinuierlich mit Karbogen (95 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub>) begast wurde, um den pH-Wert bei 7,4 zu halten. Bevor der Versuch begonnen wurde, wurde zunächst der intraluminale Durchmesser und die Länge des eingespannten Segments ermittelt. Dies erfolgte computergestützt durch Messung der aufgewendeten Kraft zur Einstellung eines definierten Abstandes der beiden Drähte.

#### 3.7.2 Datenerhebung und –auswertung

Die Arterienringe wurden auf eine Ruhespannung gebracht, die einem intraluminalen Druck von 100 mmHg entsprach und so 10 Minuten äquibriert. Diese Ruhespannung unterschied sich von Versuch zu Versuch. In Abbildung 7 ist eine repräsentative Originalregistrierung der Messung abgebildet. Als Qualitätsmerkmal für eine gelungene Präparation wurde die Gefäßkontraktion in kalium-angereichertem Puffer (KPSS vgl. Anhang, Punkt 8.1.1) herangezogen. Anschließend wurde viermal mit PSS gespült und wiederum 10 Minuten äquibriert, um den Ausgangswert wieder zu erreichen.



**Abbildung 7:** Originalregistrierung der isometrischen Kraftmessung einer Mesenterialarterie

Um die Relaxationsfähigkeit zu überprüfen, wurden die Ringe zunächst mit  $7,5 \mu\text{mol/l}$  Noradrenalin kontrahiert. Um die endothelabhängige Gefäßfunktion zu überprüfen, wurde jeweils im Abstand von 1 min Acetylcholin in steigender Konzentration zugegeben. Es wurde eine achtstufige Dosis-Wirkungskurve von  $10^{-9}$ - $10^{-5,5}$  mol/l Acetylcholin aufgenommen. Anschließend wurde viermal mit PBS gespült und 10 Minuten in PSS äquilibriert. Dann wurde die endothelunabhängige Gefäßantwort mit Natrium-Nitroprussid überprüft. Hierzu wurde wieder mit  $7,5 \mu\text{mol/l}$  Noradrenalin kontrahiert und dann eine dreistufige Dosis-Wirkungskurve im Bereich von  $10^{-6,5}$  bis  $10^{-5,5}$  mol/l aufgenommen.

Zu Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurden die im Computer registrierten Veränderungen in mN als prozentuale Relaxation ausgedrückt.

### Formel 2: Prozentuale Relaxation

$$R [\%] = \frac{100 \cdot \Delta_i}{\Delta_{NE}} \quad \text{mit} \quad \Delta_i [mN] = \frac{F_i}{2 \cdot l} - \frac{F_{Basal}}{2 \cdot l} \quad \text{und} \quad \Delta_{NE} [mN] = \frac{F_{NE}}{2 \cdot l} - \frac{F_{Basal}}{2 \cdot l}$$

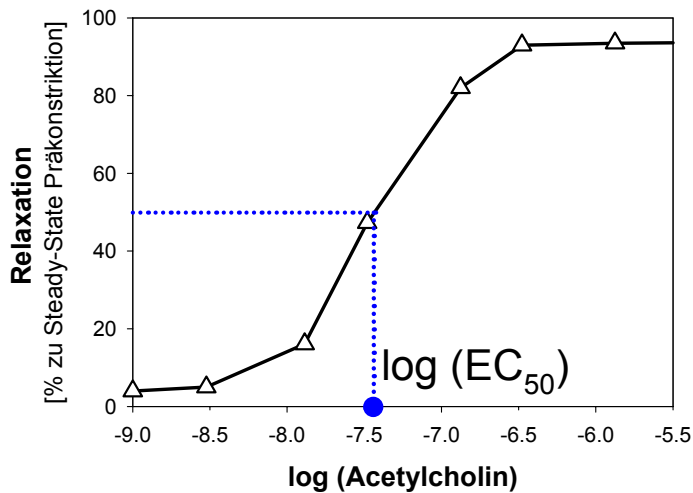
$F_i$ : Kraft in steady-State unter einer definierten Acetylcholin oder SNP-Konzentration

$F_{Basal}$ : Gemessene Kraft vor Pharmaka-Applikation

$F_{NE}$ : Gemessene Kraft in steady-State unter Norepinephrin-applikation

$l$ : Länge des Gefäßsegments

In Abbildung 8 ist die Dosis-Wirkungskurve für Acetylcholin abgebildet, welche sich aus der in Abbildung 7 gezeigten Originalregistrierung ergab.



**Abbildung 8:** Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Acetylcholin an einer Mesenterialarterie

Aus den Dosis-Wirkungskurven wurde die halbmaximale Wirkkonzentration ( $EC_{50}$ ) berechnet. Hierzu wurde eine Linearregression des negativen dekadischen Logarithmus der verwendeten Konzentration über der ermittelten prozentualen Relaxation durchgeführt und so der negative dekadische Logarithmus bei halbmaximaler Relaxation, also  $-\log(50\%)$ , berechnet.

**Formel 3:** Halbmaximale Wirkkonzentration

$$EC_{50} = -\left(10^{a \cdot 50 + b}\right)$$

a: Steigung der Regressionsgerade

b: Y-Achsenabschnitt

Zur übersichtlicheren Darstellung wurde der negative dekadische Logarithmus des  $EC_{50}$  angegeben.

### 3.8 Western Blot-Analysen

Mittels Western Blot-Analysen lässt sich die Expression eines Proteins semi-quantitativ beschreiben. Verwendete Puffer und Lösungen sind im Anhang unter 8.1.2 beschrieben.

### 3.8.1 Probenvorbereitung und Bestimmung des Proteingehaltes

Die Organe wurden mit einem Ultraturrax bei 4 °C in Homogenisations-Puffer zerkleinert. Zum Abtrennen unlöslicher Bestandteile wurde 15 Minuten bei 3400 xg und 4 °C zentrifugiert. Zur Proteinisolation wurde eine Chloroform/Methanol-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit dem vierfachen Volumen an Methanol und dem äquivalenten Volumen an Chloroform versetzt und geschüttelt. Es wurde die dreifache Menge Wasser zugesetzt und nochmals geschüttelt. Die Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 16000 xg präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch vorsichtiges Schwenken in der dreifachen Menge des ursprünglich eingesetzten Probenvolumens gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 38 °C an der Luft getrocknet. Das Proteinpellet wurde in der benötigten Menge Probenpuffer aufgenommen.

Um nun den Gehalt an Proteinen im Pellet zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung mit Amidoschwarz nach Dieckmann-Schuppert und Schnittler (Dieckmann-Schuppert et al., 1997) durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der zu testenden Lösung auf Celluloseacetat-Folie aufgetragen und mit einem Heißlufttrockner getrocknet. Die getrocknete Membran wurde nun 10 min mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt und anschließend überschüssiges Amidoschwarz durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit Entfärbelösung entfernt. Die Membran wurde durch 30 minütige Inkubation mit 1 ml Auflöselösung bei 50 °C unter ständigem Schütteln (450 rpm) lysiert. Nun wurde sofort die Extinktion bei 650 nm gemessen. Die Konzentration wurde durch externe Kalibrierung mit Albumin-Standards von 1,25 µg/10µl bis 20,00 µg/10µl berechnet.

### 3.8.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die Molekulargröße der eNOS beträgt ca. 140 kDa. Das Protokoll für die semi-quantitative Analyse von eNOS mittels Western Blot wurde vom Hersteller (BD Pharmingen) übernommen. Für die Vertikalelektrophorese wurde zunächst ein 1,5 mm dickes, 7,5 %igen SDS-PAGE-Gel in einer speziellen Gelgießvorrichtung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde Sammelgel darüber gegossen, und es wurden Kämme eingesetzt, um zehn einzelne Taschen für die Probenauftragung zu formen. Sobald das Sammelgel erstarrt war (ca. 30 min), konnten die Proben aufgetragen werden. Es wurde das Probenvolumen aufgetragen, dem 25 µg Protein entsprechen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V (ca. 2 h) im Laufpuffer nach Lämmli durchgeführt. Auf jedem Gel wurde zur

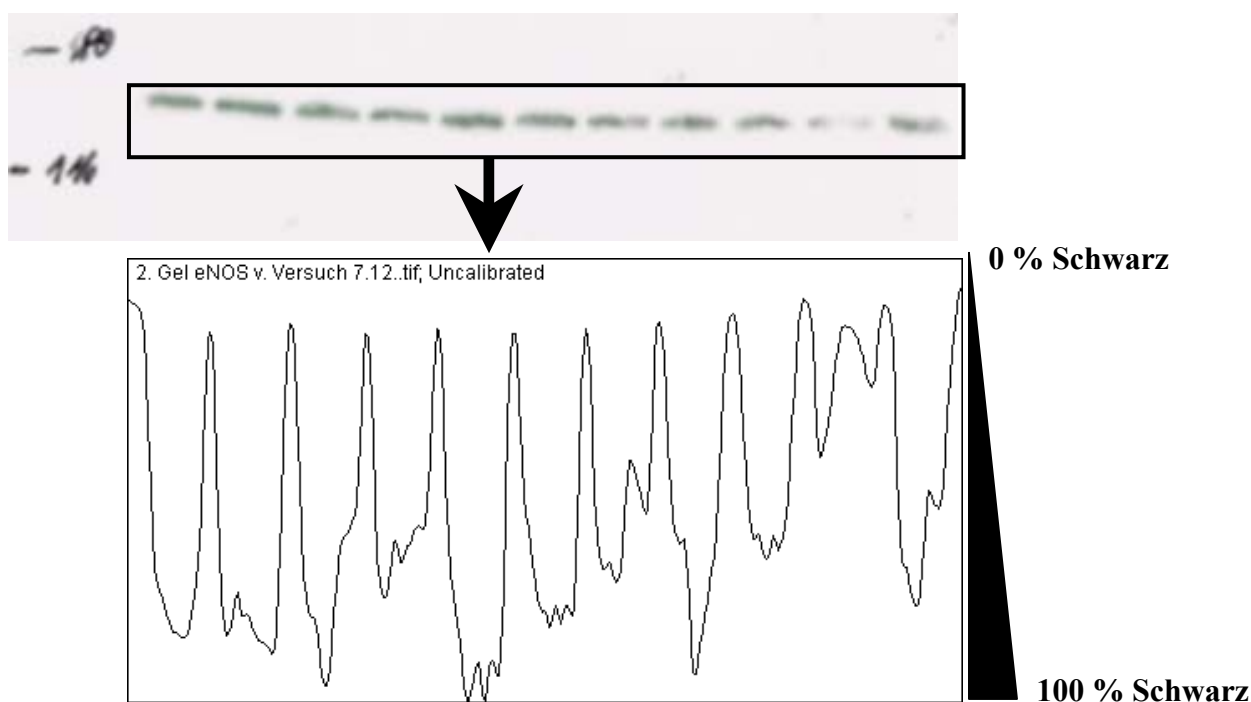
Identifikation der Proteine ein Molekülgrößenmarker mitgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierzu wurde zunächst die Membran auf drei Lagen Filterpapier in Blotpuffer eingeweicht, dann das Gel vorsichtig aus den Glasplatten der Elektrophorese genommen und luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurden nochmals drei Lagen in Blotpuffer eingeweichtes Filterpapier gelegt.

Die Proteine wurden mittels Elektroblothing (ca. 1000 mA, 20 mV) in 56 Minuten auf die Membran übertragen. Die Membran wurde mit TBS-T und 5 % Milchpulver über Nacht bei 4 °C geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde die Membran mit Serum von mit eNOS immunisierten Kaninchen in TBS mit 5 % Trockenmilchpulver (Verdünnung 1:2500) inkubiert. Die Immunglobuline gegen eNOS aus diesem Serum hefteten sich in dieser Zeit an die eNOS-Moleküle auf der Membran. Nun wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um den 1. Antikörper vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde mit dem 2. Antikörper (1:1000 in TBS-T mit 5 % Trockenmilchpulver) inkubiert. Dieser Antikörper stammte aus Ziegen, die mit Immunglobulinen von Kaninchen immunisiert worden waren. Er heftete sich also an alle Immunglobuline von Kaninchen, die sich an die Membran geheftet hatten. Der Zweitantikörper war an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, um die Proteine sichtbar zu machen, an die sich beide Antikörper angeheftet hatten.

Die Membran wurde zunächst wieder dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde mit einem kommerziell erhältlichen Detektionskit eine von Meerrettichperoxidase katalysierte Lumineszenzreaktion auf dem Blot gestartet. Hierzu wurde die Membran im Dunkeln 1 Minute mit Reagenzien A und B sowie Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend wurde ein passendes Stück Photopapier auf die Membran gelegt und 1 Minute belichtet. Dort wo die meiste Meerrettichperoxidase auf dem Blot gebunden war, war die stärkste Reaktion und somit die stärkste Belichtung des Photopapiers. In kommerziell erhältlicher Entwicklerlösung wurde der Film bis zum Sichtbarwerden von Banden entwickelt, in Wasser gespült und schließlich in kommerziell erhältlicher Fixiererlösung fixiert.

Zur Auswertung wurde der Marker vom Blot auf den getrockneten Film übertragen und dieser eingescannt. Über den Größenmarker wurde die richtige Bande (hier: 140 kDa) ausgewählt und ihre Intensität im Bildbearbeitungsprogramm ImageJ densitometrisch ausgemessen. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.





**Abbildung 9:** Densitometrische Auswertung eines Western Blots am Beispiel von eNOS (140kDa) in Lungengewebe

Da Gewebeproben oftmals verschieden hohe Anteile an Bindegewebe enthalten, wurde die erhaltene Intensität auf ein sogenanntes Housekeeping-Protein, in unserem Fall  $\beta$ -Tubulin (56 kDa), relativiert. Da eNOS mit 140 kDa wesentlich größer ist als  $\beta$ -Tubulin, wurde die Membran nach dem Blockieren zwischen den Markerbanden 70 kDa und 90 kDa durchgeschnitten und die Analyse beider Proteine parallel durchgeführt. Der Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in Blocking-Puffer TBS-T mit 5 % Trockenmilchpulver eingesetzt. Alle weiteren Schritte erfolgen wie für eNOS beschrieben.

### 3.8.3 Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Die Molekulargröße der iNOS beträgt ca. 130 kDa. Die Expression von iNOS wurde in einem 1,5 mm dicken, 5 %igen SDS-PAGE-Gel analog zum Versuchsprotokoll zur Analyse von eNOS semiquantitativ bestimmt. Es werden 100  $\mu$ g Protein/Lane eingesetzt. Der Antikörper gegen iNOS aus Maus wurde in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt.

#### 3.8.4 S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAHH)

Die Molekulargröße der S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAHH) der Ratte beträgt ca. 45 kDa. Das Protokoll für die semi-quantitative Analyse von SAHH mittels Western Blot wurde von Dr. Doris Kloor (Universität Tübingen) übernommen (Kloor et al., 2000).

Die Expression von SAHH wurde in einem 1,5 mm dicken, 12 %igen SDS-PAGE-Gel analog zum Versuchsprotokoll zur Analyse von eNOS semiquantitativ bestimmt. Es wurden 25 µg Protein/Spur eingesetzt. Die Zusammensetzungen von Blotpuffer, Blocking-Puffer und Waschpuffer unterschieden sich allerdings (vgl. 8.1.2). Für Versuche zur eNOS-Expression wurde PBS-T als Waschpuffer und als Grundlage für den Blocking-Puffer zum Blockieren freier Bindungsstellen eingesetzt.

Da SAHH (45 kDa) und das Housekeeping-Protein  $\beta$ -Tubulin (56 kDa) ungefähr gleich gross sind, mußten beide Proteine nacheinander detektiert werden. Der im Kaninchen hergestellte Antikörper gegen SAHH wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Waschprotokolle, Detektion und Datenanalyse erfolgten wie zuvor beschrieben. Um den Gehalt an  $\beta$ -Tubulin nachfolgend semi-quantitativ zu bestimmen, wurde der Blot dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um die Peroxidase-Reaktion abubrechen und eventuelle Rückstände des Detektionsreagenzes zu entfernen. Nun wurde der Blot mit Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin (Verdünnung 1:5000 in Blocking-Puffer TBS-T mit 5 % Trockenmilchpulver) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde nochmals dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper gegen Maus-Immunglobuline inkubiert. Es wurde wiederum dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und  $\beta$ -Tubulin wie zuvor beschrieben detektiert und analysiert.

### **3.9 HPLC-Analytik von Adenin-Nukleotiden und SAH**

Mit dieser Methode (Haink et al., 2003) wurden die Plasmakonzentration von Adenosin und SAH sowie die Konzentration von Adenosin, Adenosin-Monophosphat (AMP), Adenosin-Diphosphat (ADP), Adenosin-Triphosphat (ATP) und SAH im Zellüberstand und intrazellulär in HUVEC und HepG2 bestimmt. Die dazu verwendeten Chemikalien und der genaue Ablauf sind im Folgenden beschrieben.

### 3.9.1 Probenvorbereitung und Derivatisierung

Plasmaproben wurden wie auch Zell-Lyophilisate (vgl. 3.2.4) zur Präzipitation der Proteine und zur Inaktivierung von Enzymen, die Einfluss auf die Metabolitenkonzentration haben könnten, mit 1 mol/l Perchlorsäure angesäuert. Durch die Säurezugabe präzipitierte Proteine und wurden durch 15-minütige Zentrifugation in der Biofuge Fresco bei 4 °C und 20 000  $\times g$  abgetrennt. Der Überstand wurde mit 1 mol/l Kaliumphosphatlösung neutralisiert und ausgefallenes Kaliumperchlorat wiederum durch Zentrifugation abgetrennt. Zellüberstände und in-vitro-Ansätze wurden direkt eingesetzt. Der pH-Wert von 143  $\mu$ l neutralisierter Probe wurde mit 51  $\mu$ l Citrat-Phosphat-Puffer (0,1 mol/l Natrium-Citrat und 0,2 mol/l Di-Natriumhydrogenphosphat in bidestilliertem Wasser lösen) auf pH = 4 abgesenkt. Die Derivatisierungsreaktion wurde mit 6  $\mu$ l Chloracetaldehyd gestartet. Nach 40 Minuten Inkubation bei 80 °C wurde die Reaktion durch Abkühlen auf -20 °C gestoppt.

### 3.9.2 HPLC-Bedingungen

Die Bestimmung der 1,N<sup>6</sup>-etheno-Analoga der Adenin-Nukleotide wurde an der unter Punkt 3.1.2 beschriebenen HPLC I mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm und einer Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 410$  nm gemessen. Die Auftrennung der Nukleotide erfolgt auf der Waters XTerra-Säule in einem Acetonitril-Gradienten. Enzymaktivitätsmessungen der ecto-5'-Nukleotidase, Zellkulturüberstände und in vitro-Ansätze wurden mit dem folgenden Gradientenprogramm bei einem Fluss von 1,5 ml/min analysiert: Ausgehend von 6 % Acetonitril (100 % Eluent I) wurde der Anteil linear über 2,8 Minuten auf 27,8 % Acetonitril (66 % Eluent I) erhöht. Dieses Lösungsverhältnis wurde über 0,7 Minuten beibehalten. Dann wurde innerhalb von 0,1 Minuten der Ausgangszustand (100% Eluent I) wiederhergestellt und über 3,4 Minuten für den nächsten Durchgang äquilibriert. Für die Messung der ekto-5'-Nukleotidase-Aktivität wurde eine 1-Punkt-Kalibrierung mit 5  $\mu$ mol/l kommerziell erhältlichen 1,N<sup>6</sup>-etheno-Adenosin und 1,N<sup>6</sup>-etheno-AMP Standard durchgeführt. Für die Bestimmung von Adenosin und SAH in Zellkulturüberständen und in-Vitro-Ansätzen wurde eine externe Kalibrierung von 1,5 fmol/10 $\mu$ l bis 0,2 pmol/10 $\mu$ l SAH, Adenosin, AMP, ADP und ATP durchgeführt. Diese Standards wurden wie die Proben zu 1,N<sup>6</sup>-etheno-Adeninverbindungen derivatisiert.

Um eine bessere Auftrennung bei Plasma- und Zellproben zu erhalten, wurde die Fließgeschwindigkeit auf 0,75 ml/min vermindert und der Gradient wie folgt adaptiert: Ausgehend von 6 % Acetonitril (100 % Eluent I) wurde der Anteil linear über 5,6 min auf

27,8 % Acetonitril (66 % Eluent I) erhöht. Dieses Lösungsverhältnis wurde über 2,4 min beibehalten. Dann wurde innerhalb von 0,5 min der Ausgangszustand (100% Eluent I) wiederhergestellt und über 5,5 min für den nächsten Durchgang äquilibriert. Für diese Bestimmungen wurde eine externe Kalibrierung von 1,5 fmol/10 $\mu$ l bis 0,2 pmol/10 $\mu$ l SAH, und Adenosin durchgeführt. Diese Standards wurden wie die Proben zu 1,N<sup>6</sup>-etheno-Adeninverbindungen derivatisiert. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Proben 10  $\mu$ l. Die Retentionszeiten wurden durch Standardaddition bestimmt.

### 3.10 HPLC-Analytik von SAM und SAH

Die HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion nach Loehrer (Loehrer et al., 2001) wurde zu Bestimmung von S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein etabliert. Die dazu verwendeten Chemikalien und der genaue Ablauf sind im Folgenden beschrieben.

#### 3.10.1 Etablierung und Optimierung der Methode

Um eine möglichst preiswerte Analysenmethode zu etablieren, wurde statt der in der Literatur angegebenen Hexansulfonsäure Pentansulfonsäure als Ionenpaarreagenz verwendet. Des Weiteren wurde eine möglichst kostengünstige Säule gesucht, die beide Substanzen retardiert. Es wurden die Säulen  $\mu$ Bondapak, Novapak und XTerra getestet.

Die Derivatisierung wurde optimiert, um bei den teilweise sehr geringen Gehalten der Analyten in den Organen noch quantifizieren zu können. Hierzu wurden Derivatisierungszeiten von 3 bis 10 Stunden und pH-Werte von 3 bis 5 getestet. Es wurden Standards mit je 100  $\mu$ mol/l SAM und 100  $\mu$ mol/l SAH zur Optimierung dieser Parameter eingesetzt, da weniger die Matrixeffekte als vielmehr die chemische Labilität des SAM berücksichtigt werden musste.

#### 3.10.2 Optimierte Methode

Die 1,N<sup>6</sup>-etheno-Derivate von SAM und SAH wurden mittels Fluoreszenz-Detektion ( $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=410$  nm) nach chromatographischer Trennung auf der Novapak-Säule an HPLC I bestimmt. Da S-Adenosyl-Methionin hitze- und säurelabil ist, wurde die Derivatisierung bei pH = 5 in 0,6 M Ammoniumacetat-Puffer durchgeführt. Es wurden 200  $\mu$ l neutralisierte Probe

mit 50 µl Ammoniumphosphatpuffer und 50 µl Chloracetaldehyd 8 Stunden bei 39 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf -20 °C gestoppt. Es wurden 20 µl in das HPLC-System injiziert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,80 ml/min. Anfangsbedingungen waren 100 % Eluent I (2 % Acetonitril). Der Acetonitrilgehalt wurde linear über 6 min auf 3,4 % erhöht (2 % Eluent II). In diesem Teil des Gradienten eluiert SAM (Retentionszeit: 4,8 min). Zur Separation von SAH (Retentionszeit 8,9 min) wurde der Gradient abgeflacht, so dass über 2,5 min 4 % Acetonitril (3 % Eluent II) erreicht wurden. Dieses Mischverhältnis wurde für 7 min beibehalten. Dann wurde die Säule 4,5 min mit 70 % Acetonitril (100 % Eluent II) gespült. Innerhalb von 0,5 min wurden die Ausgangsbedingungen (100 % Eluent I) wieder hergestellt und die Säule 3,5 min für den nächsten Lauf äquilibriert.

### **3.11 HPLC-Analytik von Homocystein**

Mit dieser Methode wurden die Plasma- und Gewebkonzentrationen bestimmt. Plasmaproben sowie die Organproben der Fütterungsstudien wurden mit dem HPLC-Kit bestimmt, zur Quantifizierung von Homocystein in Lebensmitteln wurde eine weitere HPLC-Methode etabliert und optimiert. Die dazu verwendeten Chemikalien und der genaue Ablauf sind im Folgenden beschrieben.

#### 3.11.1 Analytik mittels HPLC-Kit

Homocystein in Plasma und Organen wurde mit einem Kit der Firma Immundiagnostik analysiert. Der Lieferumfang dieses Kits umfasste einen internen Standard, Reduktionsmittel, Derivatisierungsreagenz, Fällungsreagenz und Fließmittel. Es wurde der Gesamtgehalt, also freies und proteingebundenes Homocystein, bestimmt.

Für die Analytik von Plasmaproben wurden 100 µl Probe mit 50 µl internem Standard, 20 µl Reduktionsmittel und 50 µl Derivatisierungsreagenz gemischt und 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden 100 µl Fällungsreagenz zugegeben, die Proben 5 Minuten bei 4°C im Kühlraum stehen gelassen und bei 10000 xg zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden zur Messung in die HPLC injiziert. Die Konzentration wurde durch Relation zu einem mitgelieferten Kalibrator auf Plasma-Basis mit bekannter Konzentration ermittelt.

Zur Analytik von Homocystein in Gewebeproben wurde die Derivatisierung verändert. 155  $\mu\text{l}$  Gewebeprobe wurde mit ca. 35  $\mu\text{l}$  Kaliumhydroxid neutralisiert. Um die Analysenkosten zu reduzieren, wurden jeweils nur die Hälfte der im Kit gelieferten Substanzen zugesetzt (Loncar, Persönliche Mitteilung). Es wurden 10  $\mu\text{l}$  Reduktionsmittel und 50  $\mu\text{l}$  Derivatisierungsreagenz zugegeben und die Proben 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Fällungsreagenz und Zentrifugation bei 10000  $\times g$  abgetrennt und 20  $\mu\text{l}$  in das HPLC-System injiziert.

Plasma und Organproben der vierwöchigen Fütterungsstudie wurden an HPLC I mit der Novapak-Säule im mitgelieferten Fließmittel isokratisch bei einem Fluss von 1 ml/min und Fluoreszenzdetektor-Einstellungen von  $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$  vermessen. Die Konzentration wurde über eine externe 1-Punkt-Kalibrierung mit einem mitgelieferten Standard (20,1  $\mu\text{mol/l}$ ), der analog der Proben derivatisiert wurde, ermittelt. Die Retentionszeit von Homocystein betrug ca. 3,2 min. In den Organen der dreimonatigen Fütterungsstudien wurde Homocystein an HPLC II mit der Novapak-Säule bestimmt. Bei einem Fluss von 1 ml/min isokratisch 30 mmol/l Ammoniumacetatpuffer wurde Homocystein separiert (Retentionszeit: 2,8 min). Die Säule wurde nach jedem Lauf mit 50 % Methanol in 30 mmol/l Ammoniumacetatpuffer für 4 min gespült und vor der nächsten Injektion 7 min mit Ammoniumacetatpuffer äquillibriert. Die Konzentration wurde über eine externe Kalibrierung von 2 -22 nmol/10  $\mu\text{l}$  ermittelt.

### 3.11.2 Etablierung und Optimierung der Methode

Derivatisierung und Fließmittelsystem einer in der Literatur beschriebenen Methode zur Quantifizierung von Homocystein in Plasma und Vollblut (Imai et al., 1983) wurde optimiert, da noch keine Methode zur Quantifizierung von Homocystein in Lebensmitteln in der Literatur beschrieben war.

Zur Optimierung wurde der pH-Wert (8,5 bis 10,5), die Derivatisierungstemperatur (40 bis 80 °C) und die Derivatisierungszeit (10 bis 80 min) variiert. Des weiteren wurde die optimale Menge von Reduktionmittel (0,75 bzw. 1,5  $\mu\text{mol/l}$ ) und Derivatisierungsreagenz (2,5 bis 60  $\mu\text{mol/l}$ ) bestimmt. Es wurden Fließmittel mit einem pH-Wert von 4 bis 6 in isokratischen Läufen getestet. Des weiteren wurde der zur Trennung optimale Anteil an organischer Komponente ermittelt. Hierzu wurden Methanolgehalte von 0-2 % und Pufferkapazitäten von 20 und 30  $\mu\text{mol/l}$  bezüglich ihres Einflusses auf Auflösung und Retentionszeit getestet. Ein

Spülschritt wurde eingefügt, da bei isokratischen Läufen keine ausreichende Elution unpolarer Verbindungen von der Säule erreicht wurde.

### 3.11.3 Probenvorbereitung Lebensmittel

In Weissbrot, Thunfisch, Schwarzbier, Schweineleber, Kaffee und Roquford-Käse wurde Homocystein gemessen. Die Probenvorbereitung wurde jeweils auf die Lebensmittelmatrix zugeschnitten. 1 g Weissbrot wurde in 4 ml entionisiertem Wasser mittels eines Potter-Homogenisators bei 500 rpm homogenisiert. Von Thunfisch und Schweineleber wurden 4 g Probe zunächst lyophilisiert und anschließend bei 800 rpm in 4 ml Perchlorsäure (1 ml/l) homogenisiert. Angesäuerte Proben wurden am Tag der Analyse mit Kaliumphosphat – Lösung (1 mol/l) neutralisiert. Schwarzbier wurde mittels Vortex homogenisiert und im Ultraschallbad entgast. 5 ml des Bieres wurden lyophilisiert. Aus 3 g Kaffeepulver und 50 ml heißem Wasser gebrühter Kaffee wurde ebenfalls lyophilisiert. Lyophilisierte Proben wurden am Tag der Analyse in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst. 800 mg Roquefort Käse wurden im tiefgefrorenen Zustand mit einer Chloroform/Methanolmischung (1/1 v/v) bei 800 rpm homogenisiert. die Probe wurde quantitativ in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei 10 000 xg zentrifugiert, um eine eindeutige Phasentrennung zu erreichen. die obere Phase (Methanol) enthielt Proteine und polare Bestandteile (Aminosäuren) und wurde bis zum Tag der Analyse bei -20 °C gelagert, die untere Chloroformphase, in der Lipide enthalten waren, wurde verworfen.

Die HPLC-Analyse erfolgte wie im Folgenden beschrieben.

### 3.11.4 Optimierte Methode

Homocystein in Lebensmitteln wurde an HPLC II mit der Novapak-Säule bei Fluoreszenzeinstellungen von  $\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$  vermessen. Es wurde als der Gesamtanteil an Homocystein bestimmt („total homocysteine“). 100  $\mu\text{l}$  neutralisierte Probe wurden mit 200  $\mu\text{l}$  Boratpuffer (2,5 mol/l, pH = 10,5), 10  $\mu\text{l}$  Dithiothritol als Reduktionsmittel (7,5 mmol/l) und 100  $\mu\text{l}$  SBD-F (7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz; 20 mmol/l) 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe in 5 min auf 4-8 °C abgekühlt und die Derivatisierungsreaktion durch Zugabe von 44,2  $\mu\text{l}$  Perchlorsäure (70 %) gestoppt. Präzipitierte Proteine und Kaliumperchlorat wurden durch 5-

minütige Zentrifugation bei 12000 xg und 4 °C abgetrennt. 10 µl des Überstands wurden in das HPLC-System injiziert. Die HPLC-Analyse erfolgte wie unter 3.11.1 beschrieben.

Um die Homocysteinsekretion von Darmbakterien zu bestimmen, wurde der sterilfiltrierte Überstand ebenfalls mit dieser Methode analysiert. Dazu wurden alle eingesetzten Volumina halbiert.

### 3.12 GC-FID-Analytik von Aminosäuren

Die Probenvorbereitung und Analyse der Aminosäuren wurden mit einem Kit der Firma Phenomenex durchgeführt. Es wurden folgende Aminosäuren in Gewebe und Plasma simultan in einem Chromatogramm bestimmt: Alanin, Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Serin, Prolin, Asparaginsäure, Methionin, Hydroxyprolin, Glutaminsäure, Phenylalanin, Cystein, Ornithin, Lysin, Histidin, Tyrosin, Cystathionin und Cystin. Entsprechende Standardsubstanzen zur Kalibrierung waren dem Kit beigelegt.

Die in 100 µl Plasma oder 200 µl deproteinisiertem Gewebshomogenisat enthaltenen Aminosäuren wurden entsprechend der mitgelieferten Vorschrift über Festphasenextraktion und durch zwei Extraktionsschritte aufgereinigt und schließlich in Isopropanol gelöst. 5 µl wurden manuell in den Gaschromatograph injiziert. Retentionszeiten und Konzentrationen der Kalibrierungen der Aminosäuren sind im Anhang unter 8.1.5 aufgeführt

### 3.13 LC-MS/MS-Analytik von Argininderivaten

Die Analytik von Arginin und seinen Derivaten, symmetrisches und asymmetrisches Dimethylarginin (SDMA und ADMA), wurden im Uniklinikum Hamburg Eppendorff im Arbeitskreis von Prof. Böger von Dr. Edzard Schwedhelm und Mariola Kastner durchgeführt. Die Analysenmethode wurde von Schwedhelm et. al. (Schwedhelm et al., 2005) ausführlich beschrieben. Die Proteine aus 50 µl Plasma-Probe wurden durch Acetonpräzipitation (100µl) entfernt. Der Überstand wurde getrocknet und mit 100µl 1N Salzsäure in Butanol 20 Minuten bei 65 °C derivatisiert. Deuterisiertes ADMA (d<sub>6</sub>-ADMA) und Arginin (d<sub>7</sub>-Arginin) dienen als interner Standard. Die Quantifizierung erfolgte nach flüssigchromatographischer Auftrennung und positiver Ionisation im Elektronen-Spray-Ionisator mittels Tandem-Massenspektrometrie. Die Tochter-Ionen m/z = 70, 214, und 228 wurden für Arginin, ADMA, und SDMA gescannt, die Tochter-Ionen m/z = 77 und 220 für d<sub>7</sub>-Arginin und d<sub>6</sub>-ADMA.



### 3.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS (Version 12.0). Es wurden statistische Verfahren zur deskriptiven Statistik, zum Vergleich von Mittelwerten und zur Ermittlung von Zusammenhängen zwischen Messwerten angewendet.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche und der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Ratten, sowie die Experimente zur Homocysteinfreisetzung von Darmbakterien wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwertes dargestellt. Es wurde mittels zweiseitigem t-Test nach STUDENT geprüft, ob der Mittelwert der Konzentration in einer Gruppe verschieden voneinander sind. Um zu prüfen, ob der Mittelwert der Konzentration in der Versuchsgruppe höher (oder niedriger) ist als in der Kontrollgruppe, wurde ein einseitiger t-Test nach STUDENT durchgeführt. Da in den dreimonatigen Fütterungsstudien mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde ein ANOVA-Test herangezogen. Um herauszufinden, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede sind, wurden Post-hoc-Tests (least significant difference, LSD) durchgeführt.

Ist die mit dem jeweiligen Test ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $p < 0,05$ ), wurde der Unterschied als signifikant bezeichnet. Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 5 % und 20 %, so wurde diese Veränderung als Trend bezeichnet. Ist der Mittelwert der Konzentration einer Substanz in der behandelten Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe verändert, wurde dies als Veränderung durch die Behandlung angenommen, die bei allen gleichbehandelten Individuen in Zukunft zu erwarten ist.

Ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Metaboliten in den Organen und im Plasma besteht, wurde mittels bivariater Korrelationsanalyse nach PEARSON getestet. Der Korrelationskoeffizient  $r$  ist ein Maß der Streuung der Einzelwerte um die Regressionsgerade. Steigt die Regressionsgerade, so spricht man von einer positiven Korrelation (Clauß et al., 1995).

Für externe Kalibrierungen der HPLC-Analysen wurden durch Regressionanalyse eine Kalibriergerade ermittelt. Wiederfindungsraten für Lebensmittel berechneten sich nach Mehrpunkt-Standardaddition. Die Steigung der Regressionsgeraden durch die Messpunkte der Standardaddition multipliziert mit 100 % ergaben die Wiederfindungsrate des jeweiligen Lebensmittels.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Der essentiellen Aminosäure Methionin werden indirekt vielfältige gesundheitsschädliche Wirkungen zugeschrieben (vgl. 2.1). Eine zentrale Rolle soll dabei Homocystein, ein Metabolit des Methionins, spielen. Bei hohem Verzehr von Methionin (z. B. Methionine Load Test mit 100 mg Methionin pro kg Körpergewicht) kann sich der Plasmaspiegel von Homocystein erhöhen (Fonseca et al., 1999). Mit Hilfe der im Methodenteil beschriebenen Studien wurde die Pathogenität von Methionin in Zellkultur- und Tiermodellen näher untersucht. Hierzu wurde zunächst ein geeignetes Zellmodell gesucht, in dem eine der Hyperhomocysteinämie beim Menschen entsprechende Ernährungssituation simuliert werden kann. Dazu wurden Untersuchungen zum Einfluss von Homocystein auf den Adenosinstoffwechsel durchgeführt und mit Ergebnissen aus tierexperimentellen Studien und Literaturdaten der Hyperhomocysteinämie beim Menschen verglichen.

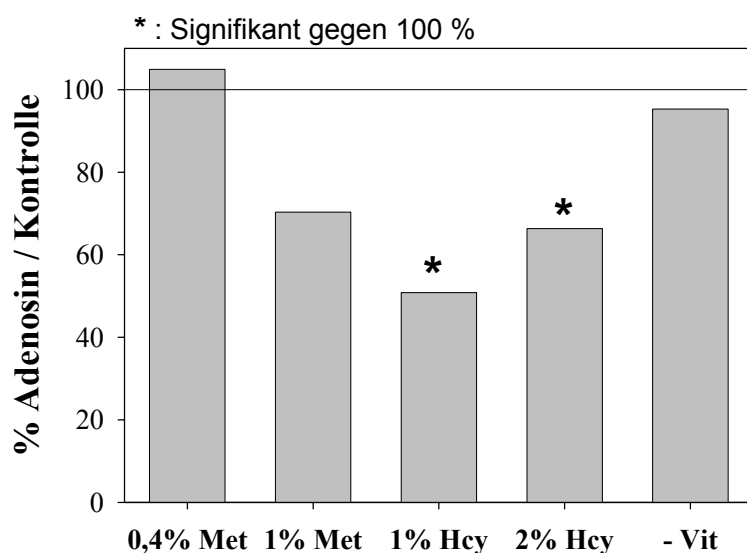
### 4.1 Einfluss von Homocystein und Methionin auf den Adenosinstoffwechsel

Wie im Theorieteil (vgl. 2.6.2) dargestellt, wird ein Einfluss von Hyperhomocysteinämie auf die extrazelluläre Adenosinkonzentration diskutiert. Dieser Theorie liegt zugrunde, dass eine intrazelluläre Erhöhung der Homocysteinkonzentration zu einer vermehrten Synthese von SAH führt, wodurch intrazellulär die Adenosinkonzentration sinkt. Durch den erhöhten intrazellulären Adenosinverbrauch könnte vermehrt Adenosin von extrazellulär in die Zelle aufgenommen werden. An diesem Beispiel sollen Zellkultur- und Rattenfütterung-Modelle verglichen werden. Die Adenosinkonzentration im Plasma von Ratten mit erhöhter Homocystein-Plasmakonzentration wurde mittels HPLC wie unter 3.9 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sollten in der Zellkultur reproduziert werden und es sollten sich weiterführende mechanistische Untersuchungen anschliessen. Hierbei sollte geklärt werden, über welchen Mechanismus die extrazelluläre Adenosinkonzentration durch Homocystein bzw. Methionin gesenkt werden kann.

#### 4.1.1 Adenosinkonzentration im Plasma

Es wurden die Plasmakonzentrationen von Adenosin in der vierwöchigen und in der dreimonatigen Fütterungsstudie von Ratten gemessen. In Abbildung 10 sind die Plasmakonzentrationen aller Tiere relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe dargestellt. Die

Adenosinkonzentration im Plasma der vier Wochen methioninreich gefütterten Ratten war mit  $0,73 \pm 0,12 \mu\text{mol/l}$  gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe mit  $0,69 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$  nicht signifikant verändert. Auch bei dreimonatiger Fütterung mit 1 % Methionin war die Konzentration mit  $1,92 \pm 0,67 \mu\text{mol/l}$  gegenüber der Kontrolle (Kontrolle 1:  $2,73 \pm 0,75 \mu\text{mol/l}$ ) nicht signifikant erniedrigt. Bei dreimonatiger homocystinreicher Fütterung hingegen zeigte sich verglichen mit dieser Kontrolle ( $2,73 \pm 0,75 \mu\text{mol/l}$ ) mit  $1,39 \pm 0,23 \mu\text{mol/l}$  ein signifikant niedrigerer Wert. Die Plasmakonzentration von Adenosin in den drei Monate mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren wurde mit  $0,61 \pm 0,10 \mu\text{mol/l}$  ebenfalls signifikant niedriger bestimmt als in der entsprechenden Kontrollgruppe (Kontrolle 2:  $0,92 \pm 0,22 \mu\text{mol/l}$ ). Bei Ratten, die eine Diät ohne Folsäure und ohne Cobalamin erhielten, war die Adenosin-Plasmakonzentration mit  $0,88 \pm 0,14 \mu\text{mol/l}$  nicht signifikant gegenüber Kontrolle 2 erniedrigt.



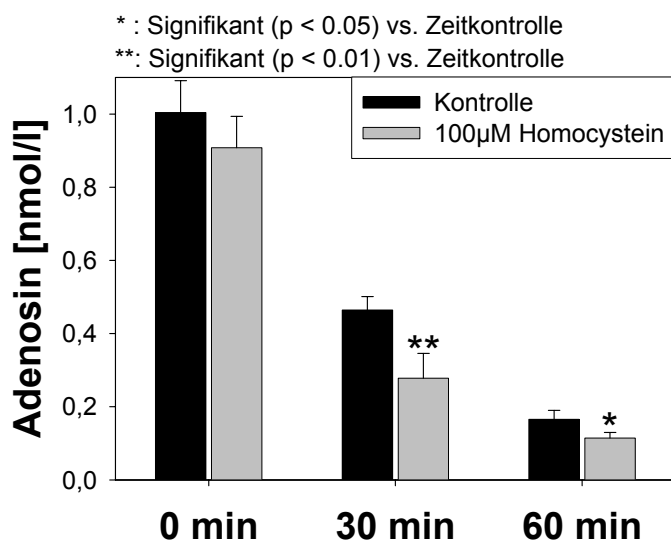
**Abbildung 10:** Adenosinkonzentration im Plasma von Ratten mit unterschiedlich induzierter Hyperhomocysteinämie relativiert auf die entsprechende Kontrollgruppe  
Gruppenbezeichnungen: 0,4 % Met: methioninreiche Fütterung (4 Wochen, 0,4 % Methionin zusätzlich); 1 % Met: methioninreiche Fütterung (3 Monate, 1 % Methioninzusätzlich); 1 % Hcy: homocystinreiche Fütterung (3 Monate, 1 % Homocystin zusätzlich); 2 % Hcy: homocystinreiche Fütterung (3 Monate, 2 % Homocystin zusätzlich); -Vit: Fütterung ohne Folsäure und ohne Vitamin B<sub>12</sub> (3 Monate)

Die Adenosinkonzentration im Plasma variiert stark zwischen den Kontrollgruppen (vierwöchige Studie:  $0,69 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$ ; Kontrolle 1 (drei Monate):  $2,73 \pm 0,75 \mu\text{mol/l}$ ; Kontrolle 2 (drei Monate):  $0,92 \pm 0,22 \mu\text{mol/l}$ ). Die starken Schwankungen zwischen den Kontrollgruppen der dreimonatigen Fütterungsstudien könnten darauf beruhen, dass diese Studien an weiblichen Tieren durchgeführt wurden. Östradiol kann die Aktivität der ecto-5'-Nukleotidase beeinflussen (Pochmann et al., 2005). Dieses Enzym katalysiert die extrazelluläre Umwandlung von Adenosin-Monophosphat (AMP) in Adenosin (Zimmermann, 1992). Eine weitere Erklärung für die Abweichung könnte eine unterschiedlich effiziente Blockade des Adenosinstoffwechsels bei der Probenbehandlung sein. Adenosin wird in Plasma durch die Adenosindeaminase sehr schnell abgebaut, wodurch die Adenosinkonzentration zu niedrig bestimmt werden kann, wenn keine Inhibitoren für das Enzym zugegeben werden (Hermes et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben nur teilweise im eigenen Labor entnommen. Aus Tierschutz- und Prozessoptimierungsgründen wurden die Proben aus analogen Versuchen von Dr. M. Herrmann (Homburg) erhalten. Um systematische Fehler der Labore zu eliminieren, wurden die Werte jeweils nur mit der gleichzeitig gefütterten Kontrollgruppe verglichen.

Dennoch zeigte sich also ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Fütterungsmodellen. Die von Riksen et al. (2005a; 2005b) an Patienten mit stark erhöhten Plasma-Homocysteinkonzentrationen beschriebenen verschlechterte Adenosin-vermittelte Dilatation läßt sich nur in Homocystin-Fütterungsmodellen eindeutig durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von extrazellulärem Adenosin erklären.

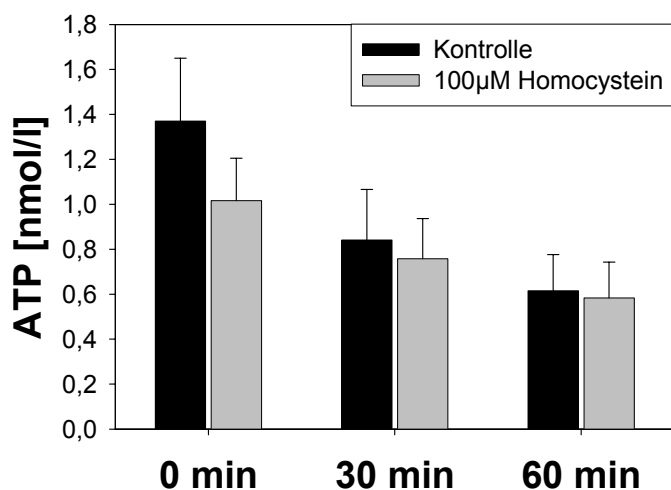
#### 4.1.2 Extrazelluläre Adenosinkonzentration

Es sollte geprüft werden, ob auch im Zellmodell Homocysteingabe die extrazelluläre Adenosinkonzentration verringert. Hierzu wurden Zellkulturversuche unter Applikation von  $100 \mu\text{mol/l}$  Homocystein an HUVEC durchgeführt. Die Adenosinkonzentration im Überstand wurde mittels HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Adenosinkonzentration ist nach 30 und 60 min in homocystein-stimulierten Zellen signifikant niedriger als in Kontrollzellen. Allerdings nimmt auch in den Kontrollzellen die Adenosinkonzentration über die Zeit ab. Daher muss ausgeschlossen werden können, dass die Abnahme von Adenosin im Zellüberstand andere Ursachen als die Homocysteinstimulation hat.



**Abbildung 11:** Extrazelluläre Adenosinkonzentration von HUVEC mit und ohne Homocysteinstimulation ( $n = 5$ )

Eine mögliche andere Ursache könnte eine initiale Zellschädigung beim Mediumwechsel von Kulturmedium auf Inkubationspuffer sein. Dadurch könnten Nukleotide freigesetzt werden, weshalb die initiale Adenosinkonzentration fälschlich zu hoch bestimmt wurde. Falls dies die Erklärung für die Abnahme der Adenosinkonzentration in der Kontrollgruppe ist, müssten auch andere Nukleotide wie beispielsweise ATP in der Kontrollgruppe initial höher bestimmt werden als nach 30 bzw. 60 min Inkubation. Die extrazelluläre ATP-Konzentration ist in Abbildung 12 dargestellt.

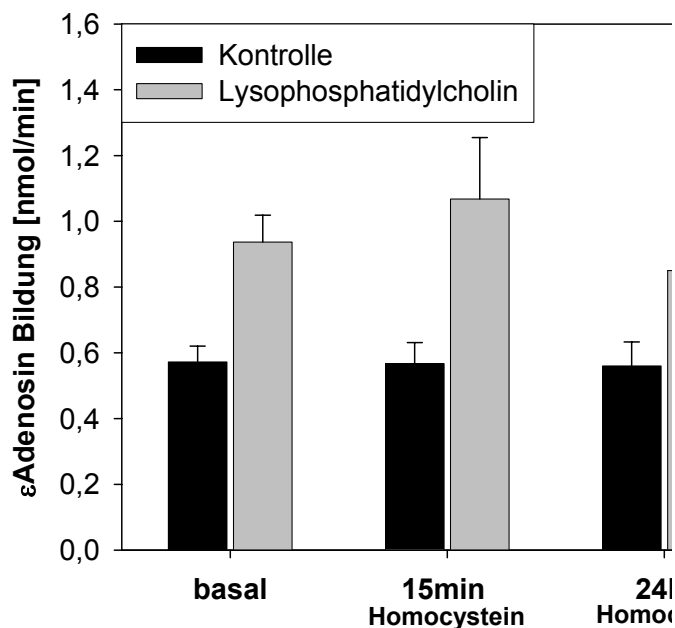


**Abbildung 12:** Extrazelluläre ATP-Konzentration in HUVEC mit und ohne Homocysteinstimulation ( $n = 5$ )

Es zeigt sich, dass auch die extrazelluläre ATP-Konzentration in der Kontrollgruppe über die Zeit abnimmt. Daher kann man nicht eindeutig sagen, ob in HUVEC die extrazelluläre Adenosinkonzentration durch Homocysteinstimulation abnimmt. Dennoch ist im direkten Zeitvergleich bei Inkubation der Zellen mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein nach 30 bzw. 60 min die extrazelluläre Adenosinkonzentration signifikant niedriger als in nicht-stimulierten Kontrollzellen. Dieses Phänomen ist bei der extrazellulären ATP-Konzentration nicht zu beobachten. HUVEC zeigen folglich grundsetzlich übereinstimmende Ergebnisse mit Fütterungsstudien an Ratten, allerdings ist die Interpretation der Daten durch Veränderung der gemessenen Parameter in der Kontrollgruppe nicht eindeutig. Daher wurde weitergehend geprüft, ob Homocystein an HUVEC entweder die extrazelluläre Adenosinbildung beeinflusst oder zu einer intrazellulären Akkumulation von SAH führt.

#### 4.1.3 Ekto-5'-Nukleotidase und Homocystein

Wie oben beschrieben kann Östradiol die extrazelluläre Adenosinkonzentration durch Modulation der ekto-5'-Nukleotidase beeinflussen. Homocystein kann in seiner reduzierten Form als reaktives Thiol mit Proteinen interagieren. Es wurde in Zellkulturversuchen getestet, ob die Aktivität der ekto-5'-Nukleotidase durch Homocystein beeinträchtigt wird. Hierzu wurden HUVEC mit und ohne 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein (Hcy) 15 Minuten bzw. 24 Stunden inkubiert und anschließend die Aktivität der ekto-5'-Nukleotidase wie unter 3.2.3 beschrieben gemessen. Zusätzlich wurde überprüft, ob Homocystein einen Einfluss auf eine Aktivierung des Enzyms durch Phospholipide haben kann. Hierzu wurden die Zellen zusätzlich mit Lysophosphatidylcholin stimuliert (Pexa et al., 2005). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Es wurde kein Einfluss von Homocystein auf die basale Aktivität der ekto-5'-Nukleotidase gefunden. Auch die Aktivierung durch Lysophosphatidylcholin war durch Homocystein nicht beeinträchtigt. Man kann also davon ausgehen, dass die extrazelluläre Adenosinbildung über ekto-5'-Nukleotidase nicht durch Homocystein beeinträchtigt wird. Daher muss die zuvor beschriebene Abnahme der Adenosinkonzentration nach Homocysteingabe andere Ursachen haben.

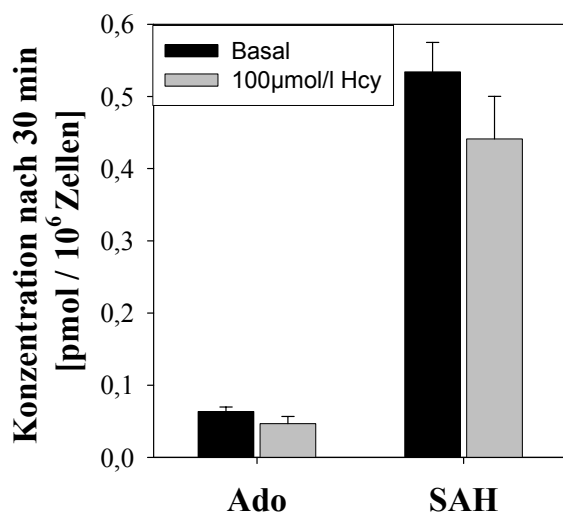


**Abbildung 13:** Einfluss von Homocystein auf die Aktivität der ekto-5'-Nucleotidase (gemessen als Bildung von 1,N<sup>6</sup>-etheno-Adenosin) unter Basalbedingungen und bei Stimulation des Enzyms mit Lysophosphatidylcholin (n = 3)

#### 4.1.4 Intrazelluläre S-Adenosyl-Homocystein-Konzentration

Um eine mögliche Verminderung der extrazellulären Adenosinkonzentration durch vermehrte intrazelluläre Bildung von SAH zu untersuchen, wurden Zellkulturversuche unter Applikation von Homocystein an HUVEC durchgeführt. Die intrazelluläre Konzentration an Adenosinkörpern wurde nach 30-minütiger Inkubation mittels HPLC quantifiziert.

Die Adenosinkonzentration unterschied sich in mit Homocystein inkubierten HUVEC nach 30 Minuten mit  $0,05 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$  nicht signifikant von denen in der Kontrollgruppe mit  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$ . Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Die intrazelluläre SAH-Konzentration war nach 30 minütiger Inkubationszeit zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant verschieden. Dies ist unerwartet, da das vermehrte Angebot an Homocystein den Nettostrom der SAHH-Reaktion in Richtung der Synthese von SAH umkehren müsste.



**Abbildung 14:** Intrazellulärer Adenosin- und SAH-Gehalt in HUVEC mit und ohne Homocysteinstimulation (n = 5)

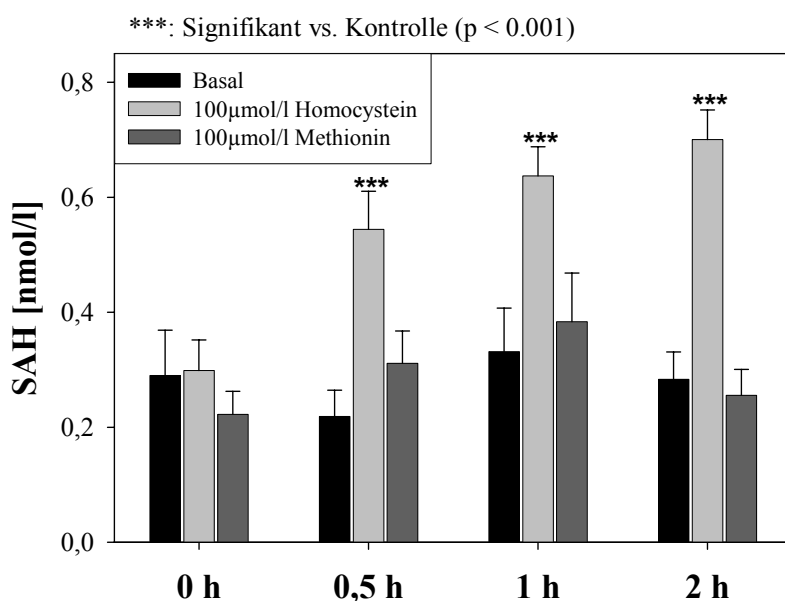
Es stellt sich die Frage, ob der experimentelle Ansatz geeignet war und alle wichtigen Faktoren berücksichtigt wurden. Die ATP-Konzentration ist entscheidend für die Bildung von SAH aus Methionin, da der SAH Präcursor SAM aus ATP und Methionin synthetisiert wird (Pajares et al., 1992). Somit könnte eine verringerte ATP-Konzentration auch eine erniedrigte SAH-Konzentration zur Folge haben. Der Inkubationspuffer liefert den Zellen nicht alle benötigten Substrate (z. B. keine Lipide und Aminosäuren, Zusammensetzung im Anhang unter 8.1.3), die die Zelle für ihre Funktionen braucht. Durch Kompensationsreaktionen für eingeschränkte Stoffwechselwege könnten die ATP-Reserven mit der Zeit aufgezehrt worden sein. Der ATP-Spiegel kann auch sinken, wenn die Versorgung der Zelle während der Probenaufbereitung zu lange unterbrochen wird, beispielsweise durch zu langsames Einfrieren der Zellen. ATP wird dabei vermindert synthetisiert, wenn die Zellen noch nicht gefroren sind, aber das Substratangebot an Glucose und Pyruvat zur ATP-Bildung durch Entfernen des Inkubationsmediums bereits eingeschränkt ist. Um Störungen im Energiehaushalt auszuschließen, wurde die sogenannte „Energy Charge“ berechnet. Die Energy Charge gibt das Verhältnis der Adeninnukleotide untereinander an und sollte zwischen 80 und 120 % liegen (Atkinson et al., 1967). In unstimulierten Zellen wurde eine Energy Charge von  $97,0 \pm 0,3$  % errechnet, in mit  $100 \mu\text{mol/l}$  Homocystein stimulierten Zellen war sie mit  $97,3 \pm 0,1$  % vergleichbar. Die Energycharge liegt also im optimalen Bereich. Ein Energiemangel scheidet als Grund für die fehlende Erhöhung von intrazellulärem SAH aus. Homocystein hat also in HUVEC entweder keinen Einfluss auf die intrazelluläre SAH-Bildung, oder bei Homocysteinstimulation zusätzlich gebildetes SAH



wird direkt in den Überstand abgegeben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Konzentration des in diesem Modell verfügbaren Adenosin zu gering ist. Da Adenosin kontinuierlich aus ATP nachgebildet werden kann und zum einen dieser Stoffwechselweg nicht beeinträchtigt ist (vgl. 4.1.3), und sich zum anderen aus der guten Energie Charge eine ausreichende ATP-Versorgung der Zellen ableiten lässt (siehe oben), und zum dritten die extrazelluläre Adenosinkonzentration nach 30 Minuten Homocysteinstimulation signifikant abgesunken war (vgl. 4.1.2) ist dies höchst unwahrscheinlich.

#### 4.1.5 Extrazelluläres SAH bei HUVEC

Da die extrazelluläre Adenosinkonzentration bei 30-minütiger Inkubation mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein signifikant niedriger war als bei unstimulierten Kontrollzellen, und ferner die extrazelluläre Bildung nicht beeinträchtigt war, stellte sich die Frage, zu was das Adenosin abgebaut wurde. Eine Möglichkeit wäre, dass sich zwar nicht die intrazelluläre SAH-Konzentration erhöht, aber die Konzentration außerhalb der Zelle. Extrazelluläres SAH wurde simultan zu den zuvor beschriebenen Versuchen bestimmt. Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigte sich, dass bei Stimulation von HUVEC mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein bereits nach 30 Minuten die SAH-Konzentration im Zellüberstand signifikant erhöht war und über die Zeit weiterhin zunahm.



**Abbildung 15:** SAH-Konzentration im Zellüberstand von HUVEC zu verschiedenen Zeitpunkten ( $n = 5$ )

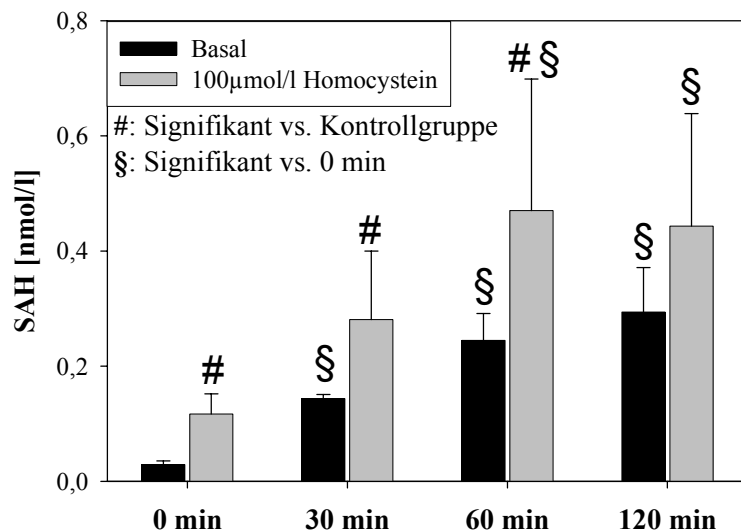
Bei Stimulation der Zellen mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Methionin war auch nach 2 Stunden keine signifikante Veränderung der extrazellulären SAH-Konzentration zu beobachten.

Um zu untersuchen, ob das SAH bei Homocysteinstimulation extrazellulär gebildet wird oder von intrazellulär sezerniert wird, wurden drei Hypothesen getestet: Zum einen wurde eine Bildung von SAH aus Adenosin und Homocystein in Abwesenheit von SAHH unter den angewendeten Inkubationsbedingungen untersucht. Als nächstes wurde geprüft, ob eine extrazellulär an die Zellmembran gebundene SAHH für die Bildung von SAH verantwortlich sein könnte. Als dritte Hypothese wurde getestet, ob SAHH aus den Zellen in den Überstand freigesetzt werden kann und dort die Synthese von SAH aus Adenosin und Homocystein katalysiert.

Um eine direkte, nicht enzymkatalysierte Reaktion ausschließen zu können, wurde Homocystein mit zwei verschiedenen Adenosinkonzentrationen in vitro im für HUVEC verwendeten Inkubationspuffer bei 37 °C 30 min inkubiert. In diesem Ansatz wurde SAH nicht in nachweisbaren Konzentrationen gebildet.

Um eine Bildung des SAH durch membrangebundene SAH-Hydrolase nachzuweisen, wurde die Membranfraktion aus HUVEC isoliert. In dieser Membranfraktion wurde die Aktivität der SAH-Hydrolase untersucht. Der Aktivitätstest wurde mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein und 150  $\mu\text{mol/l}$  Adenosin durchgeführt und die Bildungsrate von SAH kalkuliert. Intakte Zellen bildeten  $301 \pm 83$  fmol/min, das Membranpellet nur  $6 \pm 1$  fmol/min, es wies also lediglich 2 % der zellulären Aktivität auf. Die residuale SAHH-Aktivität des Membranpellets kann auf co-präzipitierter, intrazellulärer SAHH beruhen. Ein signifikanter Anteil extrazellulär gebundener SAHH auf die extrazelluläre SAH-Konzentration ist sehr unwahrscheinlich.

Als nächste Hypothese wurde getestet, ob unter Homocystein-Stimulation vermehrt SAHH in den Zellüberstand abgegeben wird. Hierzu wurden Zellen zunächst 30 min mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein stimuliert und dann der Überstand abgenommen. Zu diesem nunmehr zellfreien Überstand wurden 150  $\mu\text{mol/l}$  Adenosin gegeben. Als Kontrollgruppe diente der Überstand von Zellen, die 30 min nur mit Puffer inkubiert wurden. Diesem wurden 150  $\mu\text{mol/l}$  Adenosin und 100  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein zugesetzt. In diesen zellfreien Überständen von HUVEC wurde die SAH-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (Abbildung 16). Die initiale SAH-Konzentration (0 min) ist im Überstand von Zellen, die zuvor 30 min mit Homocystein inkubiert wurden mit  $0,12 \pm 0,04$  nmol/l höher ( $p < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe ( $0,03 \pm 0,01$  nmol/l).



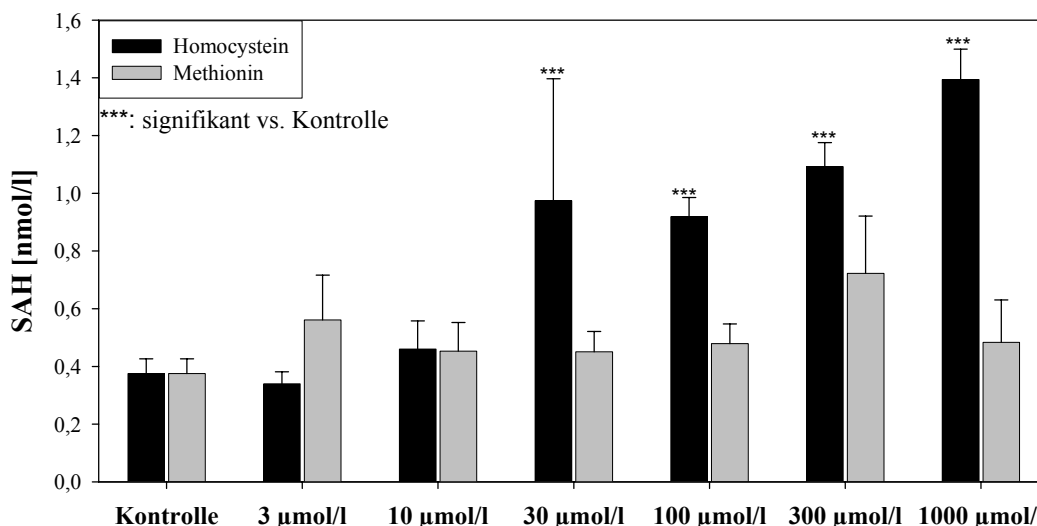
**Abbildung 16:** SAH-Konzentration im zellfreien Überstand von zuvor mit und ohne Homocystein inkubierten HUVEC (n = 3)

Über die Zeit nimmt die SAH-Konzentration in beiden Gruppen zu, daher wird auch im zellfreien Überstand von HUVEC SAH gebildet. Eine Reaktion von Adenosin und Homocystein zu SAH ohne Anwesenheit von SAHH wurde zuvor ausgeschlossen. SAHH wird demzufolge sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch unter Homocysteinstimulation ins Medium abgegeben. Dies könnte auf einer Freisetzung aus den in allen Zellkulturen vorkommenden abgestorbenen Zellen beruhen. Die starke Erhöhung des SAH in Homocystein-stimulierten Zellen könnte durch ein vermehrtes Substratangebot und die höhere Ausgangskonzentration von SAH hervorgerufen werden.

Um nun zu testen, ob die Freisetzung von SAHH auch im menschlichen Körper relevant ist, wurden Western Blot Analysen mit Humanplasma durchgeführt. In Übereinstimmung mit der Literatur (Kloor et al., 2000) wurde keine SAHH im Plasma nachgewiesen. HUVEC reagieren durch die Freisetzung von SAHH anders als der menschliche Körper und sind daher als experimentelles Modell zur Untersuchung von Hyperhomocysteinämie nicht geeignet.

#### 4.1.6 Extrazelluläres SAH bei HepG2-Zellen

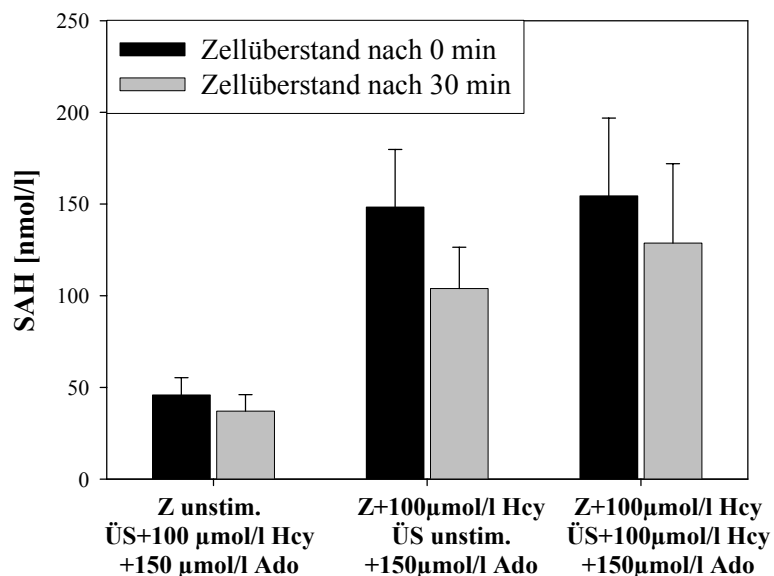
In einem weiteren Zellmodell - der Tumor-Zelllinie HepG2 - wurde geprüft, ob das Phänomen der extrazellulären SAH-Freisetzung beobachtet werden kann (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Extrazelluläre SAH-Konzentration nach Methionin bzw. Homocysteinstimulation von HepG2 (n = 4)

Es zeigte sich, daß es nach 30-minütiger Inkubation erst ab einer Konzentration von 30 µmol/l Homocystein zu einer Erhöhung des extrazellulären SAH-Konzentration kommt. Methionin löste auch in Konzentrationen bis 1000 µmol/l keine Erhöhung der extrazellulären SAH-Konzentration aus. HepG2 sind eine Tumor-Zelllinie. Diese Zellen haben eine wesentlich höhere Transmethylierungsrate als HUVEC, wodurch die gemessenen Homocysteinkonzentrationen höher sind als bei den zuvor beschriebenen Versuchen mit HUVEC. Diese Zellen sind unempfindlicher gegenüber Temperaturschwankungen und Störungen der oxidativen Energiegewinnung. Dadurch sind HepG2 robuster gegenüber Zellschädigungen, die das Ergebnis beeinflussen können.

Analog zu den zuvor für HUVEC beschriebenen Versuchen wurde an HepG2 geprüft, ob die extrazellulär gemessene SAH-Konzentration auf einer Freisetzung von SAH beruht, oder ob es sich - wie auch bei HUVEC - um eine Freisetzung des Enzyms SAHH handelt. Es wurden die Überstände von zuvor 30 min mit bzw. ohne 100 µmol/l Homocystein inkubierten Zellen gewonnen. Diese zellfreien Überstände wurden mit 150 µmol/l Adenosin und teilweise mit zusätzlich 100 µmol/l Homocystein im inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Es zeigte sich, dass der zellfreie Überstand von unstimulierten Zellen eine basale SAH-Konzentration von  $45,9 \pm 9,3$  nmol/l aufweist. Diese Konzentration erhöht sich bei 30-minütiger Inkubation bei Zugabe von 150 µmol/l Adenosin und 100 µmol/l Homocystein zum zellfreien Überstand nicht (30 min:  $37,1 \pm 9,0$  nmol/l).



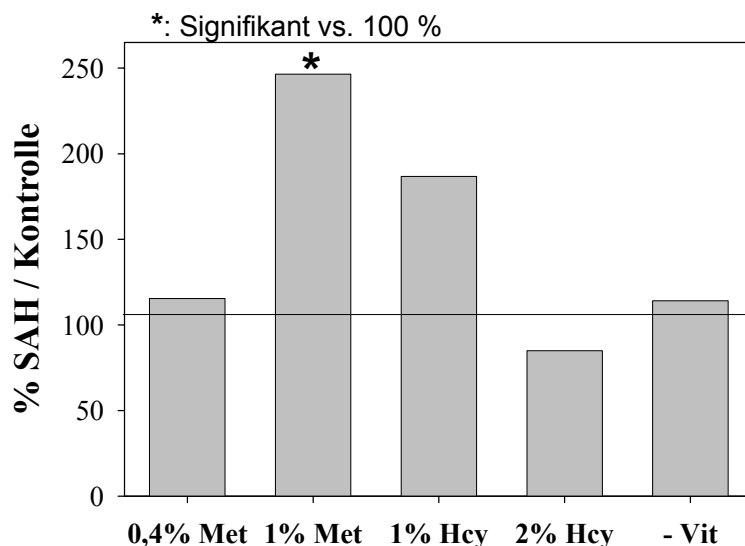
**Abbildung 18:** SAH-Konzentration im zellfreiem Überstand (ÜS) mit und ohne vorheriger Inkubation der Zellen (Z) mit Homocystein (Hcy) bei Zusatz von Adenosin (Ado) (n = 3)

Folglich weist unter Basalbedingungen der zellfreie Überstand von HepG2 im Gegensatz zu dem nach Inkubation von HUVEC Gewonnenen keine SAHH-Aktivität auf. Der Überstand von zuvor mit 100 µmol/l Homocystein inkubierten Zellen wies mit  $148,4 \pm 31,5$  nmol/l eine dreimal höhere Konzentration an SAH auf als der Überstand von unstimulierten Zellen. Diese Konzentration im zellfreien Überstand wird weder durch die Zugabe von 150 µmol/l Adenosin, noch durch die Zugabe von 150 µmol/l Adenosin und 100 µmol/l Homocystein im Laufe einer 30-minütigen Inkubation erhöht. Auch nach einer Inkubation mit Homocystein zeigt der zellfreie Überstand von HepG2 keine SAHH Aktivität. In dieser Hinsicht wären HepG2 also als experimentelles Modell für Untersuchungen zur Hyperhomocysteinämie geeignet. Da HepG2 jedoch eine Tumor-Zelllinie sind und somit anders reagieren können als „gesunde“ Zellen in vivo, werden nun noch die Resutate der Zellkulturversuche mit der Plasmasituation von Rattenmodellen mit experimentell durch Fütterung induzierter Hyperhomocysteinämie verglichen.

#### 4.1.7 S-Adenosyl-Homocystein im Plasma

SAH im Plasma wird in der Literatur als präziserer Parameter als Homocystein im Plasma für die Kalkulation des Risikos für Hyperhomocysteinämie-assoziierte Erkrankungen diskutiert, da die Korrelationskoeffizienten höher liegen (Kerins et al., 2001; Yi et al., 2000). Es wurde der SAH-Gehalt im Rattenplasma von Tieren mit unterschiedlich induzierter

Hyperhomocysteinämie simultan mit den zuvor (vgl. 4.1.1) beschriebenen Adenosingehalten mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt. SAH war im Plasma aller Ratten nachweisbar. Die Konzentrationen lagen zwischen 0,41 und 17,66  $\mu\text{mol/l}$ . In Abbildung 19 sind die Plasmakonzentrationen der Fütterungsgruppen relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe dargestellt.



**Abbildung 19:** SAH im Plasma von Ratten mit unterschiedlich induzierter Hyperhomocysteinämie relativiert auf die entsprechende Kontrollgruppe

Gruppenbezeichnungen: 0,4 % Met: methioninreiche Fütterung (4 Wochen, 0,4 % Methionin zusätzlich); 1 % Met: methioninreiche Fütterung (3 Monate, 1 % Methioninzusätzlich); 1 % Hcy: homocystinreiche Fütterung (3 Monate, 1 % Homocystin zusätzlich); 2 % Hcy: homocystinreiche Fütterung (3 Monate, 2 % Homocystin zusätzlich); -Vit: Fütterung ohne Folsäure und ohne Vitamin B<sub>12</sub> (3 Monate)

S-Adenosylhomocystein im Plasma von Ratten nach vierwöchiger Fütterung mit 0,4 % Methionin war mit  $1,09 \pm 0,25 \mu\text{mol/l}$  nicht signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe mit  $0,94 \pm 0,20 \mu\text{mol/l}$  verändert ( $p = 0,661$ ). Wurden Ratten über einen dreimal so langen Zeitraum mit einer höheren Konzentration an Methionin (1 % Met) gefüttert, erhöhte sich die Plasma-SAH-Konzentration im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe signifikant (1 % Met:  $6,47 \pm 1,59 \mu\text{mol/l}$ ; Kontrolle 1:  $2,63 \pm 0,95 \mu\text{mol/l}$ ). Bei dreimonatiger homocystinreicher Fütterung (1 % Hcy) hingegen zeigte sich gegenüber dieser Kontrolle mit  $4,90 \pm 2,00 \mu\text{mol/l}$  keine signifikante Erhöhung verglichen mit dieser Kontrollgruppe. Die Plasmakonzentration an SAH in den drei Monate mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren war mit  $4,37 \pm 0,53 \mu\text{mol/l}$  ebenfalls nicht signifikant gegenüber der

entsprechenden Kontrollgruppe (Kontrolle2:  $5,15 \pm 0,53 \mu\text{mol/l}$ ) erhöht. Bei Ratten, die eine Diät ohne Folsäure und ohne Cobalamin erhielten, war die SAH-Plasmakonzentration mit  $4,90 \pm 0,59 \mu\text{mol/l}$  nicht signifikant gegenüber Kontrolle 2 erhöht.

Ratten-Plasma zeigt also das genau entgegengesetzte Bild von HepG2: Methionin erhöht die SAH-Konzentration, Homocystein kaum. Dies könnte darauf beruhen, dass im Tiermodell Langzeiteffekte untersucht werden, das Zellmodell hingegen auf Akuteffekte begrenzt ist. Langzeit- und Akuteffekt bezüglich der Auswirkungen von Homocystein auf den Adenosinstoffwechsel entsprechen sich nicht. Langzeitstudien in Zellkulturmodellen sind schwierig umzusetzen, da Zellen bei einem gewissen Konfluenzgrad ihren Metabolismus umstellen können und daher regelmäßig gesplittet werden müssen. Sofern eine Substanz keine akut-cytotoxischen Effekte auslöst, sind zur Untersuchung von ernährungsinduzierten Veränderungen im Stoffwechsel Langzeitmodelle besser geeignet. Daher sind auch HepG2 als experimentelles Modell ungeeignet.

#### **4.2 Vier Wochen methioninreiche Fütterung**

Eine erhöhte Konzentration von Homocystein im Plasma gilt als unabhängiger Risikoindikator für neuronale und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Mit Hyperhomocysteinämie assoziierte Krankheitsbilder werden durch Erhöhung der Homocystein-Konzentration oder Veränderungen im Transmethylierungsstoffwechsel erklärt. Es wird in dieser Studie überprüft, ob die im Theorieteil (vgl. 2.6) beschriebenen Symptome auch auf eine Hyperhomocysteinämie zutreffen, die durch methioninreiche Ernährung ausgelöst wurde.

Hyperhomocysteinämie-induzierte neuronale Schäden können durch Perfusionsstörungen im Gehirn oder durch eine Veränderung der Erregungsweiterleitung entstehen. Deshalb wurden die Plasma- und Gewebkonzentrationen der in der synaptischen Erregungstransduktion involvierten Substanzen Glutaminsäure und Asparaginsäure, sowie des Melanin- und L-DOPA- Präkursors Tyrosin untersucht. Da auch Histidinämie mit einer Beeinträchtigung geistiger Fähigkeiten assoziiert ist, wurden Plasma- und Gewebkonzentrationen hinsichtlich ihrer Histidinkonzentration untersucht.

Zur Beurteilung des Einflusses von methioninreicher Ernährung auf das Herz-Kreislauf-System wurden die endothelabhängige und -unabhängige Gefäßfunktion, die Expression

zweier Stickstoffmonoxid-Synthasen und die Plasmakonzentration von asymmetrischem Dimethylarginin, einem Inhibitor der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase, untersucht. Da die in den Homocystein-Stoffwechsel involvierten Enzyme, wie z. B. die SAH-Hydrolase, intrazellulär vorkommende Enzyme sind (vgl. 2.2), muss das im Plasma gemessene erhöhte Homocystein zellulären Ursprungs sein. In der 4-wöchigen Methioninfütterungs-Studie (vgl. 3.4) wurde durch Metaboliten- und Korrelationsanalyse getestet, welche Zusammenhänge zwischen dem im Plasma gemessenen Homocystein und dem Methioninstoffwechsel verschiedener Gewebe bestehen. Es wurden die Konzentrationen von Homocystein und seinen Präkursoren Methionin, S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein in Plasma, Gehirn, Herz, Leber, Milz und Niere gemessen. Diese Arbeiten sind zur Publikation eingereicht (Pexa et al., 2006a).

#### 4.2.1 Studienbedingungen

Ziel der Studie war es, die Folgen einer durch zu hohe Methioninaufnahme ausgelöste Hyperhomocysteinämie zu untersuchen. Die Fütterungsdauer wurde vor Versuchsbeginn auf 4 Wochen festgelegt. Ratten werden normalerweise ca. 3 Jahre alt (Jung, Persönliche Mitteilung). Setzt man eine identische Verteilung der Lebensabschnitte bei Ratte und Mensch (durchschnittlich 70 Jahre) voraus, entsprächen diese 4 Wochen Fütterungszeit also ca. 1,8 Menschenjahren. Da bei einer Überernährung generell auch andere Nahrungsmittelkomponenten wie beispielsweise Lipide oder Glucose das Stoffwechselsystem beeinflussen können, wurden die Tiere nicht durch Zwangsfütterung überernährt, sondern es wurde ihnen nur vermehrt Methionin zusätzlich über das Trinkwasser gegeben. Da die Ratten ihre Futter- und Trinkwassermenge selbst bestimmten konnten, kann man also erst nachträglich die applizierte Menge an Methionin bestimmen.

Als Erfolgskriterium der Studie dient neben einer vermehrten Aufnahme von Methionin eine nachgewiesene erhöhte Methioninkonzentration im Plasma oder Gewebe der methioninreich gefütterten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Des Weiteren sollte sich die vermehrte Fütterung mit einer speziellen Aminosäure (Methionin) nicht auf die Konzentration anderer Metabolite auswirken. Dies wurde anhand der Gesamtaminosäurekonzentration untersucht.

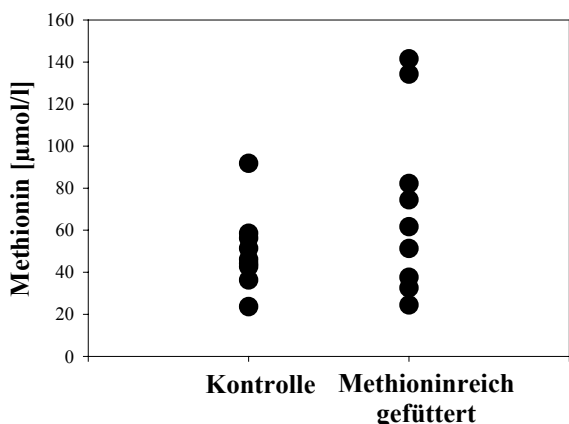


#### 4.2.1.1 *Methioninzufuhr*

Die exakte Menge an aufgenommenem Methionin pro Ratte lässt sich nur durch Versuche in sogenannten Stoffwechselkäfigen ermitteln. In diesen speziellen Käfigen kann die aufgenommene Futtermenge, Trinkwassermenge sowie Kot- und Urinmenge quantitativ bestimmt werden. Ratten sind Gruppentiere, daher ist die Einzelhaltung in diesen Stoffwechselkäfigen über 4 Wochen nicht artgerecht. Folglich liegen nur Schätzwerte aus der Gruppenhaltung für die tägliche Methioninzufuhr vor. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Trinkwasser wurde während der vierwöchigen Fütterung mit ca. 40 ml je Tier in beiden Gruppen bestimmt. Es wurden pro Tier täglich ca. 20 g Pelletfutter mit einem Methioningehalt von 0,35 g/100g laut Herstellerangabe verzehrt. Die Methioninaufnahme in der Kontrollgruppe betrug also ca. 70 mg/Tag, die in der methioninreich gefütterten Gruppe durch die zusätzliche Aufnahme von Methionin über das Trinkwasser (4 g/l) ca. 230 mg/Tag. Das Gewicht der Ratten veränderte sich während des Versuchs (Gewichtszunahme). Bei einem geschätzten durchschnittlichen Gewicht der Ratten von ca. 270 g ergäbe sich aus diesen Werten eine tägliche Aufnahme von ca. 0,85 g Methionin pro kg Körpergewicht in den methioninreich gefütterten Ratten. Ein 3-4 facher Überschuss an Methionin (Empfohlene tägliche Menge: ca. 15 bis 30 mg/kg Körpergewicht) kann durch Fehl- bzw. Überernährung auch vom Menschen aufgenommen werden (Young et al., 1991).

#### 4.2.1.2 *Methionin in Plasma und Gewebe*

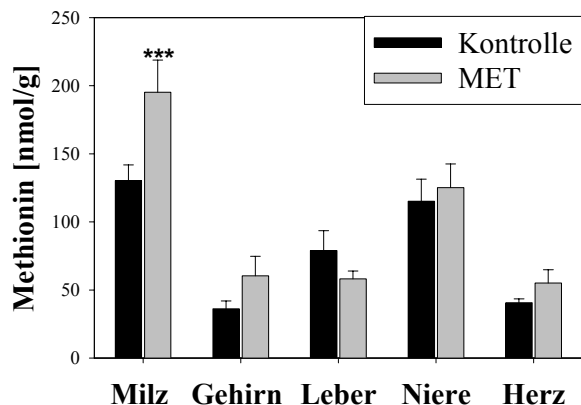
Methionin wurde im Plasma und den Organen nach Vorsäulenderivatisierung mittels GC-FID-Analytik bestimmt. Die Kontrollgruppe zeigte eine Plasmakonzentration von  $50 \pm 6$   $\mu\text{mol/l}$  Methionin. In den methioninreich gefütterten Tieren zeigte sich ein Trend zur Erhöhung auf einen Mittelwert von  $71 \pm 14$   $\mu\text{mol/l}$ . Dieser Trend war bei einer Stichprobe von 9 Tieren nicht signifikant ( $p = 0,201$ ). Die Spannweite der Einzelwerte der Methioninkonzentration im Plasma der methioninreich gefütterten Tiere ist wesentlich größer als in bei den Kontrolltieren (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Einzelwerte Methioninkonzentration im Plasma von Ratten nach 4 Wochen methioninreicher Fütterung und von Kontrolltieren (n = 9).

Die Gruppe reagiert also in Bezug auf die Methionin-Plasmakonzentration unterschiedlich auf das erhöhte Methioninangebot. Dieser Effekt könnte durch die Art der Aufnahme des zusätzlichen Methionins erklärbar sein: Ratten essen und trinken in unregelmäßig Abständen über den Tag verteilt (Jung, Persönliche Mitteilung). Da die Tiere nicht eine definierte Zeitspanne ohne Futter und Trinkwasser gehalten wurden, ehe die Plasmaproben gewonnen wurden, könnten diese unterschiedlichen Zeiten zwischen dem letztmaligen Trinken und der Probengewinnung für die Unterschiede verantwortlich sein. Der Methionin-Plasmaspiegel von Menschen wird stark durch Nahrungsaufnahme beeinflusst. In einer von Guttormsen und Mitarbeitern (2004) durchgeführten Humanstudie verdoppelte sich der Plasma-Methioninspiegel innerhalb von vier Stunden nach Nahrungsaufnahme. Die Freisetzung von Methionin aus dem Intrazellularraum scheint auch bei Ratten eine untergeordnete Rolle für die Methioninkonzentration im Plasma zu spielen. Daher müssen zur Beurteilung eines Erfolges der Fütterungsstudie auch die Gehalte an Methionin im Gewebe betrachtet werden.

Der Methioningehalt wurde in Milz, Gehirn, Leber Niere und Herz post mortem quantifiziert. Die Mittelwerte der Methioningehalte der untersuchten Organe sind in Abbildung 21 dargestellt. Im Gehirn wurde mit  $36 \pm 6$  nmol/g Feuchtgewicht der niedrigste Methioningehalt in der Kontrollgruppe gemessen. In Herzen wurde die Konzentration mit  $43 \pm 4$  nmol/g etwas höher bestimmt, die nächsthöchste Konzentration fand sich in der Leber mit  $79 \pm 15$  nmol/g und noch höher ist die Nieren-Konzentration mit  $104 \pm 11$  nmol/g. Den höchsten Methioningehalt in Ratten findet man in der Milz mit  $130 \pm 12$  nmol/g Feuchtgewicht. Bei methioninreicher Fütterung wird diese Konzentration signifikant ( $p = 0,015$ ) auf  $195 \pm 24$  nmol/g erhöht.



**Abbildung 21:** Methioningehalte [nmol/g Feuchtwicht] in verschiedenen Geweben nach 4 Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).

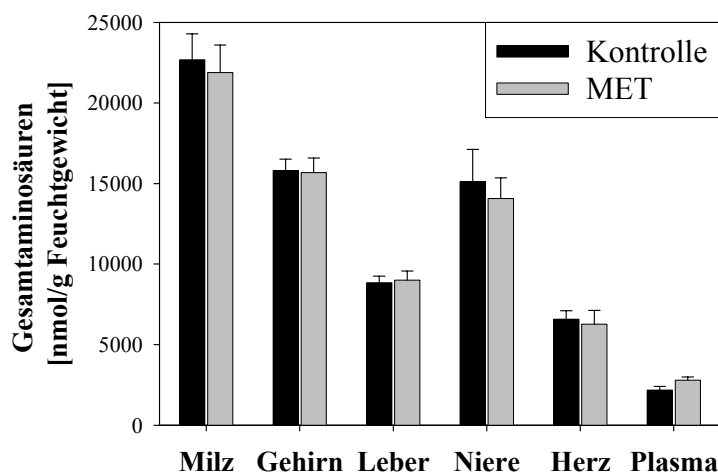
Die mittlere Konzentration von Methionin in der Niere der methioninreich gefütterten Tieren ist mit  $125 \pm 17$  nmol/g nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ( $p = 0,146$ ). Die Konzentration von Methionin in den methioninreich gefütterten Tieren war im Gehirn mit  $60 \pm 14$  nmol/g, im Herzen mit  $58 \pm 10$  nmol/g und in der Leber mit  $58 \pm 6$  nmol/g ungefähr gleich. Somit zeigte sich in Gehirn und Herz verglichen mit den in der Kontrollgruppe gefundenen Konzentrationen ein Trend ( $p = 0,073$  bzw.  $p = 0,094$ ) zur Erhöhung des Methioningehaltes bei methioninreicher Fütterung. In der Leber hingegen zeigte sich der entgegengesetzte Trend: der Methioningehalt wurde bei methioninreicher Fütterung niedriger als in den Kontrolltieren bestimmt. Der Trend ist nicht statistisch signifikant ( $p = 0,100$ ) und wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben.

Wie schon für Plasma beschrieben, ist die Spannweite der Einzelwerte der methioninreich gefütterten Tiere höher als bei den Gewebskonzentrationen der Kontrolltiere.

Da Methionin in der Milz methioninreich gefütterter Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren akkumuliert, kann man davon ausgehen, dass - obwohl der Plasmaspiegel an Methionin nicht signifikant erhöht ist - trotzdem bei methioninreich gefütterten Tieren nicht nur vermehrt Methionin verzehrt, sondern auch aufgenommen wurde. Die Studie kann also als Modell zur Untersuchung von Veränderungen dienen, die durch erhöhte Methioninaufnahme verursacht wurden.

#### 4.2.1.3 Gesamtaminosäuregehalt

In einzelnen Studien wurde eine verminderte Nahrungsaufnahme bei Methioninapplikation im Trinkwasser beschrieben (Benevenga, 1974; Kumta et al., 1958; Sugiyama et al., 1987). Unterscheidet sich die Aufnahme von Pellet-Nahrung zwischen den Gruppen, so lassen sich die erhobenen Daten nicht mehr vergleichen. Es wurde daher überprüft, ob die Gesamtkonzentration an freien Aminosäuren zwischen den Gruppen verschieden ist. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren wurden mittels GC-FID bestimmt. Die Gehalte der einzelnen Aminosäuren sind im Anhang unter 8.1.6 in den Tabellen 10 und 11 dargestellt. Die Summe dieser Aminosäuren in den untersuchten Organen ist in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22:** Gesamtaminosäuregehalt in verschiedenen Organen [nmol/g Feuchtgewicht] und im Plasma [ $\mu\text{mol/l}$ ] nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je  $n = 9$ ).

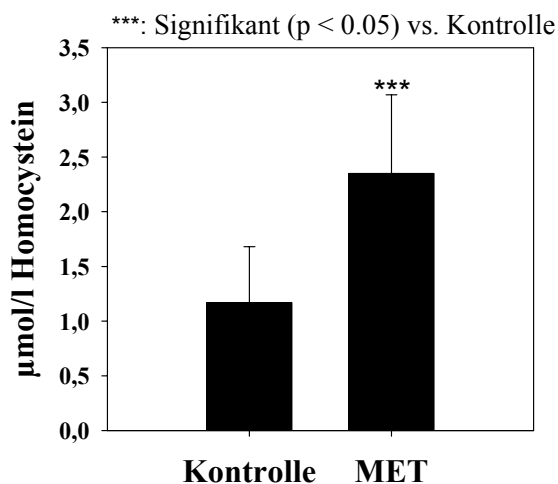
Die Summe der Aminosäuren setzt sich zusammen aus den Konzentrationen von Alanin, Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Serin, Prolin, Asparaginsäure, Methionin, Hydroxyprolin, Glutaminsäure, Phenylalanin, Cystein, Ornithin, Lysin, Histidin, Tyrosin, Cystathionin und Cystin wurden mittels GC-FID bestimmt. Die höchste Konzentration an Aminosäuren findet man in der Milz, gefolgt von Gehirn und Niere. Die Aminosäurekonzentration in der Leber ist nur etwa halb so gross wie in der Milz. Im Herz ist der Gesamtgehalt an Aminosäuren noch geringer. Der Gesamtaminosäuregehalt war weder in einem der untersuchten Gewebe noch im Plasma zwischen beiden Fütterungsgruppen

verschieden. Es ist daher mit keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse durch einen unterschiedlichen Ernährungsstatus zu rechnen.

#### 4.2.2 Methioninreiche Diät und Homocystein

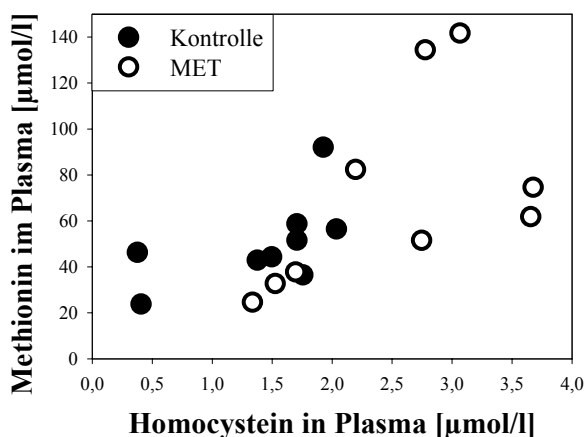
Methioninreiche Ernährung ist mit Hyperhomocysteinämie assoziiert. Viele Theorien zur Pathologie des Homocystein beruhen auf intrazellulären Wirkungen von Homocystein, z. B. durch Enzyminhibierungen. Um die Aktivität eines Enzyms beeinflussen zu können, muss die Homocysteinkonzentration nicht nur im Plasma, sondern auch intrazellulär erhöht sein. Daher wurden sowohl Plasma-, als auch Gewebkonzentrationen von Homocystein bestimmt.

Die Plasmakonzentration von Homocystein wurde mittels des HPLC-Testkits von Immun-Diagnostik (vgl. 3.11.1) bestimmt. Der Plasmaspiegel von Homocystein in der Kontrollgruppe wurde mit  $1,17 \pm 0,51 \mu\text{mol/l}$  bestimmt (Abbildung 23). In den methioninreich gefütterten Tieren war er mit einem Mittelwert von  $2,35 \pm 0,72 \mu\text{mol/l}$  auf das Doppelte erhöht.



**Abbildung 23:** Homocysteinkonzentration im Plasma von vier Wochen Methioninreich gefütterten Ratten und Kontrolltieren ( $n = 9$ )

Das Homocystein im Plasma muss folglich aus dem über die Nahrung aufgenommenen Methionin gebildet werden. Es war eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen Homocystein und Methionin im Plasma zu beobachten (Abbildung 24;  $r = 0,600$ ;  $p = 0,008$ ).

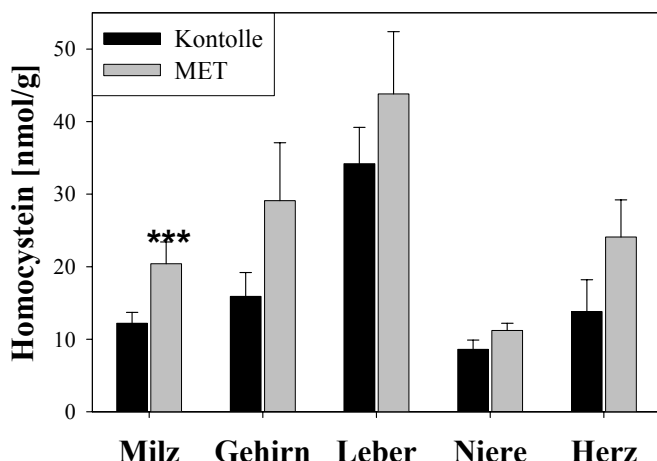


**Abbildung 24:** Korrelation von Homocystein und Methionin im Plasma von Ratten nach vierwöchiger methioninreicher Fütterung (weiss) und in Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).

Daraus läßt sich schlussfolgern, dass Homocystein im Plasma von der aufgenommenen Methioninmenge abhängt.

Als klinischer Parameter wird heutzutage die Analyse von Plasma, nicht von Vollblut herangezogen. Die Bestimmung ist besonders für Arztpraxen ohne eigenes Labor relativ schwierig, da das Plasma innerhalb eines Zeitfensters von 1 h von den korpuskulären Bestandteilen getrennt sein muss, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten (Refsum et al., 2004). Korpuskuläre Bestandteile setzen sich aus Leukozyten und Erythrocyten zusammen (Schmidt et al., 2006). Daher wurde die Homocysteinkonzentration in Erythrocyten getrennt untersucht. Die Analyse wurde analog zu der von Plasmaproben durchgeführt. In der Kontrollgruppe wurde eine mittlere Konzentration von  $1,3 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$  gefunden, in den methioninreich gefütterten Tieren eine Konzentration von  $1,4 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$ . Die Erythrocytenkonzentration unterschied sich also nicht zwischen beiden Fütterungsgruppen. Die Konzentration von Homocystein in Erythrocyten spiegelt nicht den Homocystein-Plasmaspiegel wieder. Analysen von Homocystein im Vollblut würden insofern andere Ergebnisse liefern als Plasma- oder Serumanalysen.

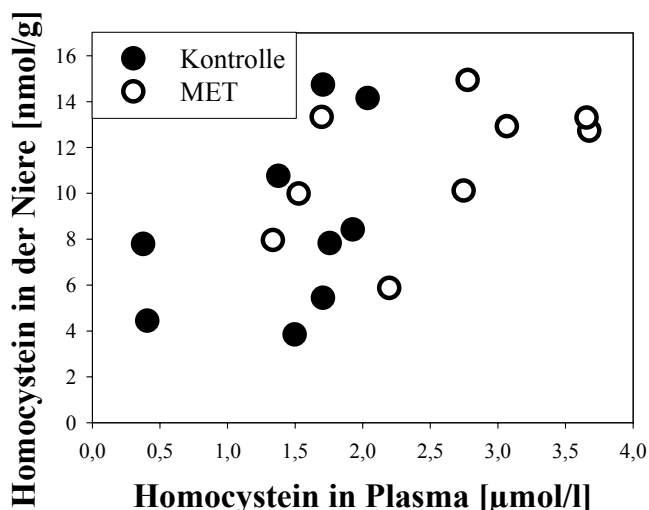
Die Homocysteinkonzentration im Gewebe der 4 Wochen methioninreich gefütterten Tieren und der entsprechenden Kontrollgruppe wurde mittels des HPLC-Testkits von Immun-Diagnostik bestimmt. Probenvorbereitung und Derivatisierung wurden an die veränderte Probenmatrix wie unter Materialien und Methoden (vgl. 3.11.1) beschrieben angepasst. Die Mittelwerte der beiden Gruppen sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25:** Homocysteingehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).

Der höchste Homocysteingehalt in der Kontrollgruppe wurde in der Leber mit  $34 \pm 5$  nmol/g bestimmt. Gehirn ( $16 \pm 3$  nmol/g), Herz ( $14 \pm 4$  nmol/g) und Milz ( $12 \pm 1$  nmol/g) haben bei normaler Fütterung der Tiere ungefähr den gleichen Gehalt an Homocystein. Der niedrigste Homocysteingehalt findet sich mit  $9 \pm 1$  nmol/g in der Niere. Eine statistisch signifikante Erhöhung von Homocystein konnte in der Milz mit  $20 \pm 3$  nmol/g ( $p = 0,018$ ) nachgewiesen werden. Der mittlere Homocysteingehalt lag auch in den anderen untersuchten Organen bei den methioninreich gefütterten Tieren höher als bei den Kontrolltieren. Aufgrund hoher Konzentrationsunterschiede innerhalb der Gruppe wurde bei Leber ( $44 \pm 9$  nmol/g;  $p = 0,183$ ), Gehirn ( $29 \pm 8$  nmol/g;  $p = 0,075$ ) und Herz ( $24 \pm 5$  nmol/g;  $p = 0,075$ ) keine Signifikanz erreicht.

In der Niere lag der mittlere Gehalt mit  $11 \pm 1$  nmol/g nur geringfügig höher als in der Kontrollgruppe. Dennoch zeigte sich eine schwach positive Korrelation zwischen Homocystein in Niere und Plasma (Abbildung 26;  $r = 0,563$ ;  $p = 0,015$ ).



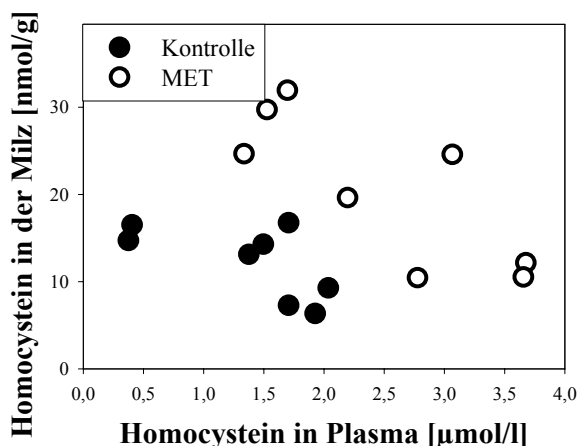
**Abbildung 26:** Korrelation von Homocystein im Plasma und in der Niere von Ratten nach vierwöchiger methioninreicher Fütterung (weiss) und in Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).

Aus dieser Korrelation lässt sich ableiten, dass eine Veränderung im Homocystein-Gehalt in der Niere zu ungefähr 30 % durch eine Veränderung der Plasmakonzentration bedingt ist, oder umgekehrt. Eine Kausalität, welcher der beiden Parameter durch den anderen beeinträchtigt wird, lässt sich aus Korrelationsanalysen jedoch nicht ableiten.

Dafür, dass die Plasmakonzentration den Gewebsgehalt beeinflusst spricht, dass Homocystein aus dem Plasma aufgrund der geringen Molekülgröße glomerulär frei filtriert wird. Es werden aber nur ca. 2,3 % des Plasma-Homocysteins mit dem Urin ausgeschieden (Fux et al., 2005). Es müssen folglich Rückresorptionsmechanismen, die Homocystein vom Primärharn zurück ins Nierengewebe transportieren, existieren. Andererseits wäre es jedoch auch möglich, dass der Transmethylierungsstoffwechsel der Niere einen wichtigen Beitrag zur Homocysteinkonzentration im Plasma liefert. Mehrere Studien beschreiben, dass sich die Homocystein-Plasmakonzentration bei beeinträchtigter Nierenfunktion erhöht (Herrmann et al., 2005c; Hong et al., 1998). Ob dies jedoch auf das verminderte Harnzeitvolumen oder auf Stoffwechselstörungen im Transmethylierungsstoffwechsel zurückzuführen ist wurde bislang nicht untersucht.

Die Milz ist ein wichtiger Blutspeicher im Körper von Säugetieren (Schmidt et al., 2006). Um zu überprüfen, ob die in der Milz beobachtete Erhöhung von Homocystein auf gespeichertes Plasma zurückzuführen ist, wurde eine Korrelationsanalyse nach PEARSON durchgeführt (Abbildung 27).





**Abbildung 27:** Korrelation von Homocystein im Plasma und in der Milz von Ratten nach vierwöchiger methioninreicher Fütterung (weiss) und in Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).

Obwohl Homocystein sowohl in der Milz als auch im Plasma der methioninreich gefütterten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht war, korrelieren die Gehalte in den einzelnen Versuchstieren nicht miteinander. Man kann aus diesem Ergebnis schlussfolgern, dass die in der Milz gemessene Erhöhung an Homocystein nicht ausschließlich durch in der Milz gespeichertes Plasma verursacht wird, sondern dass es noch weitere Faktoren geben muss.

Dennoch muss die Erhöhung von Homocystein in der Milz nicht zwangsläufig auf einem veränderten Methioninstoffwechsel dieses Organs beruhen. Es wäre auch möglich, dass im der Milz gespeicherte Erythrocyten oder Leukozyten entweder durch einen erhöhten Homocysteingehalt zu diesem Resultat beitragen, oder dass diese Korpuskeln Homocystein direkt ins Milzgewebe abgeben. In Erythrocyten wurde zwar keine Erhöhung des Homocysteinspiegels durch die Fütterung gefunden. Es wäre aber dennoch möglich, dass sie vermehrt Homocystein produzieren und dies direkt ins Milzgewebe abgeben. Eine Homocysteinfreisetzung aus Erythrocyten (Andersson et al., 1992) und Leukozyten (Schroeksnadel et al., 2003) wurde in der Literatur beschrieben.

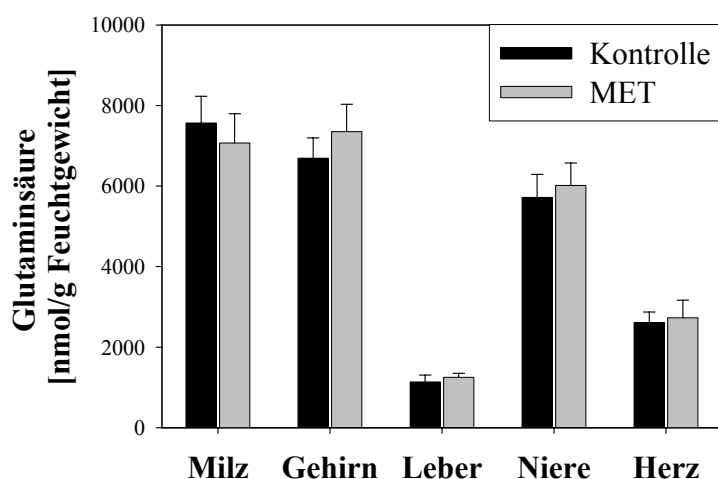
#### 4.2.3 Methioninreiche Fütterung und neuronale Funktion

Da in dieser Fütterungsstudie ein moderat erhöhter Plasmaspiegel an Homocystein durch methioninreiche Diät induziert wurde, soll nun geprüft werden, ob die Theorien zur Pathologie von Homocystein auch bei diesen Tieren Anwendung finden. Die genaue Pathogenese dieser Stoffwechsel-assoziierten neuronalen Erkrankungen ist nicht geklärt. Es

wurden daher vier verschiedene Metabolite gewählt, die in experimentellen Modellen neuronale Erkrankungen auslösen können, wenn ihre Gewebs- und Plasmakonzentration verändert sind. Dies sind Asparaginsäure und Glutaminsäure, beides Agonisten der NMDA-Typ Glutamatrezeptoren, der Dopamin-Präcursor Tyrosin, sowie Histidin.

#### 4.2.3.1 Agonisten der Glutamatrezeptoren

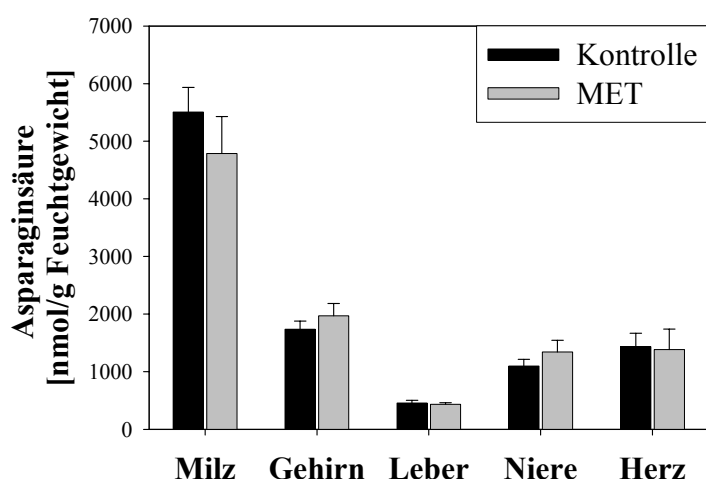
Die Asparaginsäure- und Glutaminsäurekonzentrationen sind ausschlaggebend für die Aktivierung der NMDA-Glutamatrezeptoren (Mares et al., 2004). Die Plasmakonzentration an Glutaminsäure wurde im Mittel in den methioninreich gefütterten Ratten mit  $276 \pm 36$   $\mu\text{mol/l}$  signifikant ( $p = 0,032$ ) höher bestimmt als in den Tieren der Kontrollgruppe ( $178 \pm 32 \mu\text{mol/l}$ ). Auch in Milz, Gehirn, Leber, Niere und Herz wurde die Glutaminsäurekonzentration analysiert (Abbildung 28). Die Glutaminsäure-Gehalte in Milz und Gehirn in der Kontrollgruppe sind mit  $7566 \pm 663$  nmol/g und  $6694 \pm 503$  nmol/g ungefähr gleich hoch. Besonders das Gehirn ist hier von Bedeutung, da dort ausgesprochen viele Synapsen zu finden sind, bei denen Glutamin als Neurotransmitter dient (Schmidt et al., 2006). In der Niere ist der Gehalt an Glutaminsäure mit  $5719 \pm 575$  nmol/g etwas niedriger, im Herz mit  $2754 \pm 283$  nmol/g nur etwa halb so hoch. Am niedrigsten ist der Gehalt in der Leber mit  $1135 \pm 173$  nmol/g.



**Abbildung 28:** Glutaminsäuregehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je  $n = 9$ ).

Verglichen mit der Kontrollgruppe ist der Gehalt an Glutaminsäure bei den methioninreich gefütterten Ratten in keinem der Gewebe signifikant erhöht. Die Daten sind im Anhang (8.1.6; Tabellen 10 und 11) aufgeführt.

Wie im Theorieteil dargestellt (vgl. 2.6.1), beeinflusst auch die Konzentration an Asparaginsäure die Aktivierung der NMDA-Typ Glutamatrezeptoren. Im Plasma zeigt sich eine signifikante Erhöhung von Asparaginsäure von  $37 \pm 9 \mu\text{M}$  in den methioninreich gefütterten Tieren im Vergleich zu  $28 \pm 7 \mu\text{M}$  in den Kontrolltieren ( $p = 0,018$ ). Die Gewebskonzentration von Asparaginsäure wurde ebenfalls untersucht. Die Mittelwerte sind in Abbildung 29 dargestellt. Am höchsten ist der Asparaginsäuregehalt mit  $5505 \pm 429 \text{ nmol/g}$  in der Milz. In Gehirn und Herz ist der Gehalt mit  $1738 \pm 141 \text{ nmol/g}$  bzw.  $1518 \pm 263 \text{ nmol/g}$  nur etwa ein Drittel so hoch und in der Niere mit  $1097 \pm 117 \text{ nmol/g}$  noch niedriger. Am geringsten ist der Gehalt wie auch bei der Glutaminsäure in der Leber ( $456 \pm 46 \text{ nmol/g}$ ).



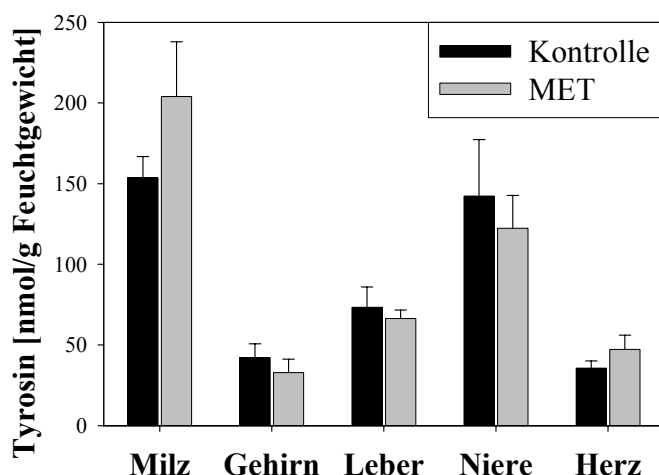
**Abbildung 29:** Asparaginsäuregehalte [nmol/g Feuchtwicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je  $n = 9$ ).

Die Konzentration war in keinem der untersuchten Organe in der Methioningruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Werte im Anhang unter 8.1.6 in den Tabellen 9 und 10). Es sollte jedoch beachtet werden, dass in jedem Organ unterschiedliche Zelltypen vorhanden sind und diese nicht getrennt voneinander betrachtet wurden, sondern ein Gesamthomogenat verwendet wurde. Veränderungen in selteneren Zelltypen (z.B. sympathische Nervterminale der Milz) könnten daher durch die sehr hohen Gesamtkonzentrationen dieser Aminosäuren in den Organen überdeckt werden.

Die Erhöhung der Konzentrationen von Asparaginsäure und Glutaminsäure im Plasma der methioninreich gefütterten Tiere gibt jedoch einen Hinweis auf methioninfütterungsinduzierte Stoffwechselveränderungen, die auch einen Einfluss auf neuronale Erkrankungen haben könnten, die durch Funktionsstörungen an Glutaminergen Synapsen entstehen.

#### 4.2.3.2 Tyrosin als Dopaminpräcursor

In-Vitro Versuche zeigten bereits eine Hemmung der Tyrosinase durch Homocystein (Reish et al., 1995). Es wurde geprüft, ob eine Inhibierung der Tyrosinase und somit ein potentieller Einfluss von methioninreicher Ernährung auf das dopaminerge System und die Melaninbildung auch im Ganztiersversuch nachgewiesen werden kann. Hierzu haben wir als Leitsubstanz die Tyrosinkonzentration in Plasma und Gewebe gemessen. Im Plasma konnte keine signifikante Veränderung des Tyrosingehaltes festgestellt werden. Im Mittel wurde die Plasmakonzentration mit  $42,3 \pm 7,5 \mu\text{mol/l}$  in der Kontrollgruppe und  $48,0 \pm 7,4 \mu\text{mol/l}$  in den methioninreich gefütterten Tieren bestimmt ( $p = 0,302$ ). Die Tyrosingehalte der untersuchten Gewebe sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Tyrosinkonzentration ist in Milz und Niere mit  $154 \pm 13 \text{ nmol/g}$  bzw.  $116 \pm 13 \text{ nmol/g}$  am höchsten. Es folgt die Leber mit  $73 \pm 13 \text{ nmol/g}$ . Am niedrigsten ist der Gehalt in Gehirn und Herz mit  $42 \pm 9 \text{ nmol/g}$  bzw.  $40 \pm 6 \text{ nmol/g}$ .



**Abbildung 30:** Tyrosingehalte [nmol/g Feuchtwicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).

Der Mittelwert des Tyrosin-Gehaltes liegt in Milz und Herz mit  $204 \pm 34$  nmol/g bzw.  $52 \pm 10$  nmol/g bei den methioninreich gefütterten Tieren höher als bei den Kontrolltieren, aber es wurde mathematisch keine Signifikanz erreicht ( $p = 0,092$  bzw.  $p = 0,147$ ). Daher lässt sich zur Auswirkung von methioninreicher Diät auf die Tyrosinase-Aktivität aus diesen Versuchen keine Aussage machen.

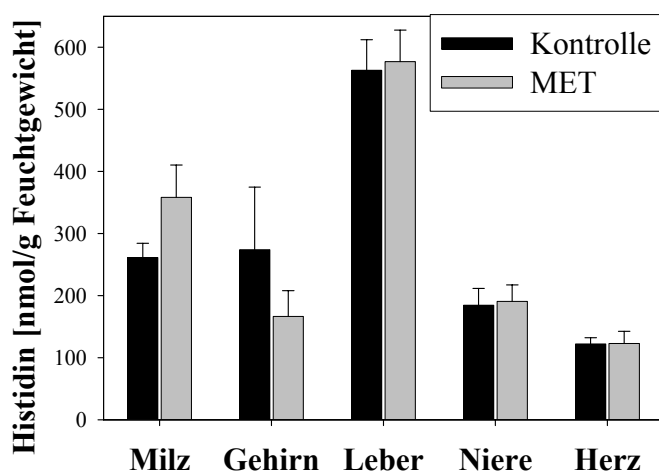
Im Gehirn wurde kein Trend zur Veränderung der Tyrosinkonzentration in den methioninreich gefütterten Ratten gefunden ( $33 \pm 8$  nmol/g,  $p = 0,224$ ). Daraus lässt sich schließen, dass methioninreiche Ernährung keinen wesentlichen Einfluss auf Erkrankungen, die mit verminderter Dopaminkonzentration einhergehen (z.B. Morbus Parkinson), hat. Eine Bedeutung der Tyrosinase in Milz und Herz ist nach derzeitigem Stand der Forschung nicht bekannt.

Besonders wichtig ist die Tyrosinase außer im Gehirn auch in der Haut, wo sie an der Bildung von Melaninen beteiligt ist (vgl. 2.6.1). Die Haut der Ratten wurde nicht untersucht, da diese sich zu stark von der menschlichen Haut unterscheidet, z. B. dadurch, dass Ratten nicht schwitzen (Jung, Persönliche Mitteilung). Bei starker Hyperhomocysteinämie durch Cystathionin- $\beta$ -Synthase ist Albinismus beschrieben, welcher durch eine Störung der Melaninsynthese verursacht wird (McCully, 2005). Daher kann eine starke Hyperhomocysteinämie definitiv die Melaninsynthese, vermutlich durch Inhibierung der Tyrosinase beeinflussen. In dieser Studie konnte nicht gezeigt werden, dass auch methionin-induzierte moderate Hyperhomocysteinämie die Tyrosinaseaktivität beeinflusst.

#### 4.2.3.3 Histidin

Histidinämie kann mit Demenz und Sprachstörungen einhergehen (vgl. 2.6.1). Studien an Ratten weisen auf einen Zusammenhang von Homocystein und Histidinämie hin (Klee, 1974). In unserer Studie war die Plasmakonzentration von Histidin in den methioninreich gefütterten Tieren mit  $36,1 \pm 3,2$   $\mu\text{mol/l}$  signifikant ( $p = 0,004$ ) höher als in den Kontrolltieren ( $20,7 \pm 4,0$   $\mu\text{mol/l}$ ). Plasma-Konzentrationen von 70-120  $\mu\text{mol/l}$  Histidin gelten beim Menschen als normal, bei einem Werte zwischen 290 und 1420  $\mu\text{mol/l}$  - also ab einer 2,5-fachen Erhöhung - liegt eine Histidinämie vor (Virmani et al., 1993). Die im Rahmen dieser Studie gemessene 1,7-fache Erhöhung lässt sich nicht eindeutig als Histidinämie einordnen, da Vergleichswerte bei Ratten hinsichtlich neuronaler Defizienzen nicht bekannt sind.

In der Haut hat der Metabolit der Histidinase-katalysierten Reaktion, die Urukaninsäure, zwei wichtige Funktionen, zum einen als UV-Schutz, zum anderen als UV-induzierter systemischer Immunsuppressor (Taylor et al., 1991). Die Haut der Ratten wurde nicht untersucht, da sie sich stark von der humanen Haut unterscheidet (vgl. 4.2.3.2). Im Gewebe wird die Histidase außer in der Haut besonders stark in Leber exprimiert. In diesem Organ ist der Histidingehalt mit  $563 \pm 49$  nmol/g am höchsten (Abbildung 31). In Milz ist der Gehalt mit  $261 \pm 23$  nmol/g nur halb so hoch. Es folgen Niere ( $185 \pm 27$  nmol/g) und Herz ( $122 \pm 10$  nmol/g). Am geringsten ist der Gehalt im Gehirn mit  $45 \pm 12$  nmol/g.



**Abbildung 31:** Histidingehalte [nmol/g Feuchtwicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).

In der Leber und den anderen Geweben ist die Konzentration an Histidin bei methioninreicher Fütterung nicht signifikant verändert. Einzig in der Milz zeigte sich mit  $358 \pm 52$  nmol/g ein Trend ( $p = 0,055$ ) zur Erhöhung zur Gewebeskonzentration von Histidin. Die Milz ist auch das einzige Organ, in dem der Homocystein-Gehalt signifikant erhöht ist (vgl. 4.2.2). Daher ist es möglich, dass zu hohe alimentäre Methioninzufuhr durch eine resultierende Erhöhung der Homocysteinkonzentration zu einer Hemmung der Histidase und dadurch zu Histidinämie führen kann.

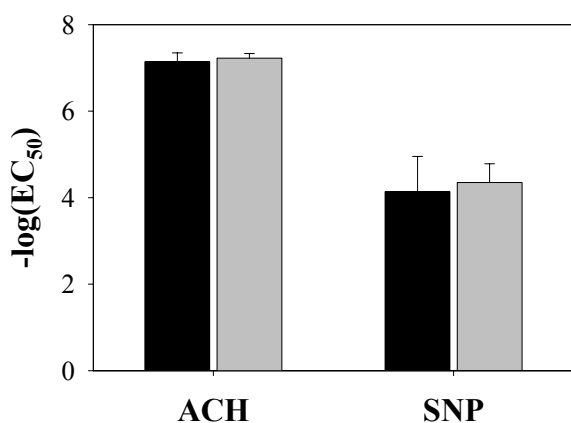
#### 4.2.4 Methioninreiche Diät und Gefäßfunktion

Bereits eine moderate Erhöhung des Homocystein-Gehaltes im Plasma kann Auswirkungen auf die Gefäßfunktion haben (vgl. 2.5). Die Verschlechterung der Gefäßfunktion kann auf einer verminderten Bioverfügbarkeit des Vasodilatators Stickstoffmonoxid beruhen. Dieser wird von NO-Synthasen produziert. Die Aktivität eines Enzyms hängt zum einen von der

Funktionalität des Enzyms und dem Vorhandensein potenzieller direkter Aktivatoren oder Inhibitoren ab, zum anderen davon, wie stark ein Enzym in einem Gewebe exprimiert ist. Neben der Gefäßfunktion von Mesenterialarterien wurden die Expression der NO-Synthasen und die Konzentration des eNOS-Inhibitors ADMA untersucht.

#### 4.2.4.1 Endothelabhängige und endothelunabhängige Gefäßfunktion

Die Gefäßfunktion von isolierten Mesenterialarterien wurde direkt nach der Organentnahme untersucht, um zu testen, ob die endothelabhängige oder -unabhängige Relaxation durch methioninreiche Fütterung beeinträchtigt wird. Mesenterialarterien mit einem Innendurchmesser von ca. 300  $\mu\text{m}$  gehören zu den mittelgroßen Arterien des muskulären Typs (*Arteria myotypica*) (Lippert, 2000). Die untersuchten Segmente der methioninreich gefütterten Ratten und der Kontrolltiere hatten eine vergleichbare Länge (Kontrolle:  $1.7 \pm 0.2$  mm, MET:  $1.7 \pm 0.2$  mm) und einen vergleichbaren Innendurchmesser (Kontrolle:  $316 \pm 64$   $\mu\text{m}$ , MET:  $308 \pm 54$   $\mu\text{m}$ ). Auch die maximale Konstriktion, gemessen als x-fache Verringerung des Gefäßdurchmessers in mit Kaliumionen angereichertem Puffer unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Kontrolle:  $5,0 \pm 1,0$  -fach, MET:  $4,8 \pm 0,8$  -fach). Die endothelabhängige Gefäßfunktion wurde als Relaxation am mit  $7,5$   $\mu\text{mol/l}$  Noradrenalin vorkontrahierten Gefäß mittels Acetylcholin (ACH) ermittelt und die endothelunabhängige Gefäßfunktion wurde mit Natrium-Nitroprussid (SNP) getestet.



**Abbildung 32:** Negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Wirkkonzentration von Acetylcholin (ACH) und Natrium-Nitroprussid (SNP) als Maß für die Gefäßfunktion von Mesenterialarterien von methioninreich gefütterten Tieren (grau) und Kontrolltieren (schwarz) (je  $n = 9$ ).

Wie in Abbildung 32 dargestellt, zeigte sich kein Unterschied in der zur halbmaximalen Relaxation benötigten Konzentration von Acetylcholin oder Natrium-Nitroprussid zwischen den Gruppen. Daraus kann man schließen, dass eine Verdoppelung des Homocysteinspiegels durch methioninreiche Ernährung keinen negativen Einfluss auf die hier getestete Gefäßfunktion hat. Bisherige Studien, die eine verminderte Acetylcholin-induzierte Relaxation an Ratten zeigten (Dimitrova et al., 2002) wurden nach 3-monatiger Homocystein-Fütterung durchgeführt. In dieser Studie waren auch die durch die Fütterung induzierten Homocystein-Spiegel im Plasma wesentlich höher als bei unseren Tieren. Allerdings wurde in der Studie von Dimitrova und Mitarbeitern keine Mesenterialarterien sondern Aortensegmente untersucht. Die Aorta ist ein sogenanntes Windkessel-Gefäß (*Arteria elastica*) (Schmidt et al., 2006). Der Durchmesser und somit das Verhältnis von Blut zu Endothelzellen ist in der Aorta anders als in *Arteria myotypica*. Auch die Gefäßdilatation wird unterschiedlich gesteuert, da unterschiedliche Rezeptorsubtypen von vasodilatierenden Substanzen wie beispielsweise Adenosin exprimiert werden (Drexler et al., 2003). Daher ist es möglich, dass auch unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen unterschiedliche Effekte an Aorta und Mesenterialarterien beobachtet werden.

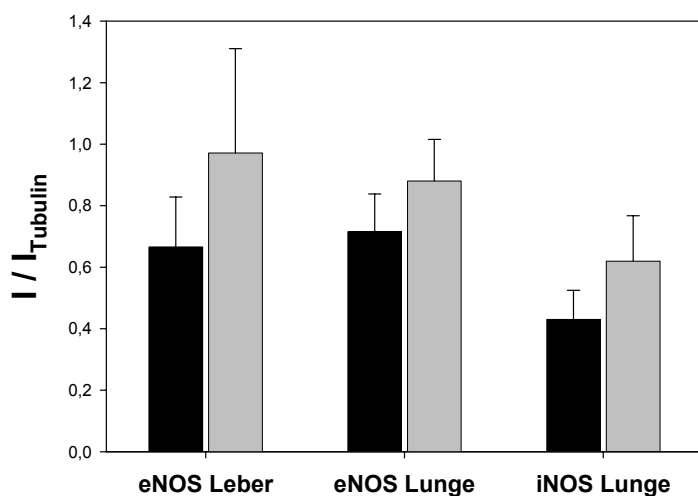
Dennoch wird ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten mit moderater Hyperhomocysteinämie assoziiert (Loncar et al., 2001). In der methionin-induzierten Hyperhomocysteinämie in Ratten wurde keine Beeinträchtigung der Gefäßfunktion gefunden. Es gibt also Unterschiede zwischen dem hier verwendeten Modell der moderaten Hyperhomocysteinämie und moderater Hyperhomocysteinämie beim Menschen.

#### 4.2.4.2 Expression der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase

Es wurde keine Beeinträchtigung der Gefäßfunktion bei den methioninreich gefütterten Tieren mit moderater Hyperhomocysteinämie gefunden. Zum einen wurde in der Literatur beschrieben, dass Homocystein eNOS über eine weitreichende Signalkaskade inhibieren kann (vgl. 2.6.2), zum Anderen wurde beschrieben, dass die Expression der induzierbaren NO-Synthase in Makrophagen durch Homocysteinstimulation erhöht werden kann (Woo et al., 2003). Obwohl die Aktivität der endothelialen NO-Synthase durch Homocystein herabgesetzt worden sein könnte, könnte die Gesamtaktivität der NOS durch eine gesteigerte Anzahl von NOS-Molekülen unverändert sein. Dies würde zu einer ausreichenden Bioverfügbarkeit von NO und somit zu einer unbeeinträchtigten endothelabhängigen Gefäßfunktion führen. Es gibt



drei bekannte Unterformen der NO-Synthasen: die neuronale NO-Synthase (nNOS), die vor allem in neuronalen Zellen zu finden ist, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die vor allem im Endothel, aber auch in Epithelzellen exprimiert ist und die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die besonders stark in Makrophagen zu finden ist (Knowles et al., 1994). Es wurden Lungen- und Leberproben auf die Expression der NO-produzierenden Enzyme untersucht. Da vor allem eNOS und iNOS in diesen Gewebearten exprimiert sind, wurden nur diese beiden Unterformen untersucht. Es wurde densitometrisch die Bandenintensität von eNOS bzw. iNOS und Tubulin ausgemessen. Die Verhältnisse von eNOS zu Tubulin und von iNOS zu Tubulin in den beiden Gruppen wurden verglichen (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** eNOS- und iNOS-Expression in Lunge und Leber von methioninreich gefütterten Tieren (grau) und Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).

Es zeigte sich zwar ein leichter Trend zur Erhöhung von eNOS und iNOS in der Lunge ( $p = 0,381$ ), aber es wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Der in Zellkulturversuchen (Gewebsmakrophagen) gefundene Effekt von Homocystein auf die iNOS (Woo et al., 2003) konnte also im hier verwendeten Modell der methionininduzierten Hyperhomocysteinämie nicht reproduziert werden.

#### 4.2.4.3 *Asymmetrisches Dimethylarginin*

Asymmetrisches Dimethylarginin gilt, wie auch Homocystein, als unabhängiger Risikoindikator für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Böger et al., 2001). Wie im Theorieteil (vgl. 2.6.2) beschrieben, gibt es eine Beziehung zwischen Homocystein und ADMA. Es gibt zwei unterschiedliche Theorien zur Interaktion von Homocystein mit dem Arginin-

Stoffwechsel. Zum einen könnte eine vermehrte Methylierung von Arginin zu ADMA durch SAM-abhängige Protein-Arginin-N-Methyltransferasen bei einem vermehrten Angebot des Methyl donors Methionin resultieren (Böger et al., 2000), zum anderen könnte eine Inhibierung der DDAH durch Homocystein eine Rolle spielen (Stühlinger et al., 2001). Asymmetrisches und symmetrisches Dimethylarginin sowie Arginin wurden im Plasma mittels LC-MS/MS im Uniklinikum Hamburg Eppendorf bestimmt. Die in der Fütterungsstudie gemessenen Plasmaspiegel sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Gehalte an asymmetrischen und symmetrischen Dimethylarginin und Arginin im Plasma nach 4 Wochen methioninreicher Fütterung [ $\mu\text{mol/l}$ ].

	Kontrolle	Methioninfütterung	p =
ADMA	0,66 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,04	0,144
SDMA	0,15 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,009
Arginin	138 $\pm$ 15	154 $\pm$ 9	0,398

In den methioninreich gefütterten Tieren zeigte sich ein Trend zur Erhöhung von ADMA. Dieser Trend war bei einer Versuchszahl von 9 Tieren nicht signifikant. Statistisch signifikant ( $p = 0,009$ ) hingegen ist der Unterschied zwischen beiden Fütterungsgruppen hinsichtlich des SDMA. Die Argininkonzentration scheint in den methioninreich gefütterten Tieren leicht höher zu sein als in der Kontrollgruppe, aber auch hier wurde bei einer Gruppenzahl von 9 Tieren keine Signifikanz erreicht. Betrachtet man jedoch die Absolutwerte, so liegt der errechnete Mittelwert um 16  $\mu\text{mol/l}$  höher als bei der Kontrollgruppe. Die gemessenen Differenzen der Mittelwerte von ADMA (0,12  $\mu\text{mol/l}$ ) und SDMA (0,07  $\mu\text{mol/l}$ ) sind wesentlich geringer.

Auch die Synthese von symmetrischem Dimethylarginin wird von Protein-Arginin-N-Methyltransferasen katalysiert. Der  $K_m$ -Wert für SAM und der  $K_i$  für SAH dieser Enzyme ist leider bislang nicht bekannt. Da SDMA nicht durch die DDAH abgebaut wird, wird die Erhöhung von SDMA folglich durch die aus vermehrtem Methioninangebot resultierende Hypermethylierung verursacht. Daher wäre es möglich, dass die leichte Veränderung in der ADMA-Konzentration nicht auf einer Inhibierung der DDAH beruht, sondern dass ebenfalls eine vermehrte Methylierung von Arginin die Ursache ist.

Es wurde also kein Einfluss von Hyperhomocysteinämie, die durch vierwöchige methioninreicher Fütterung induziert wurde, auf die Dimethylarginase gefunden.

Anscheinend führt aber eine vierwöchige methioninreiche Diät bei Ratten zu vermehrter Aktivität der Protein-Arginin-N-Transmethylasen.

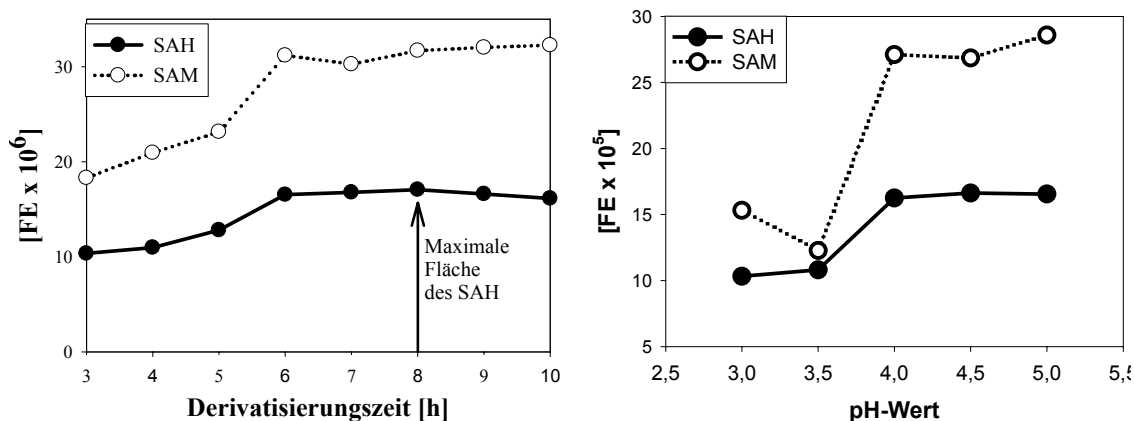
#### 4.2.5 Methioninreiche Diät und Transmethylierungspotential

Da Methionin der Precursor des SAM im menschlichen Körper ist und sowohl eine Hemmung von Transmethylierungsreaktionen als auch eine Steigerung von Transmethylierungen negative Folgen haben können (Ingrosso et al., 2003), wurden SAM, SAH und Transmethylierungspotential sowie die Expression des SAHH in der Leber untersucht.

##### 4.2.5.1 *Optimierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von SAM und SAH*

Zur Bestimmung der Stoffwechselprodukte S-Adenosyl-Methionin und S-Adenosyl-Homocystein wurde eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion etabliert. Basierend auf der für andere Adenin-Komponenten etablierten Derivatisierung zu 1,N<sup>6</sup>-etheno-Adenin-Derivaten wurde die Derivatisierungsmethode optimiert. Die Optimierung war nötig, da SAM temperatur- und säurelabil ist. Es wurden eine geeignete Säule, ein optimaler pH-Wert und Derivatisierungsdauer an Standards ermittelt.

Von drei getesteten Säulen wurden die Substanzen nur von den Säulen Novapak und XTerra retardiert. Da die Novapak-Säule kostengünstiger ist als die XTerra-Säule, wurde sie für die Analysen ausgewählt. Derivatisierungstemperatur und pH-Wert wurden gleichzeitig optimiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abbildung 34 nur die Flächen von SAM und SAH bei unterschiedlichen Derivatisierungszeiten bei pH = 5 und die Flächen bei unterschiedlichen pH-Werten nach 8-stündiger Derivatisierung dargestellt. Die Peakfläche von SAH war nach 8 Stunden bei pH = 5 maximal, bei längeren Inkubationszeiten nahm sie wieder ab. Bei pH = 5 sind die Peakflächen von SAM und SAH maximal. Die Derivatisierung wurde daher bei einem pH-Wert von 5,0 in Ammoniumacetat-Puffer für 8 Stunden durchgeführt.



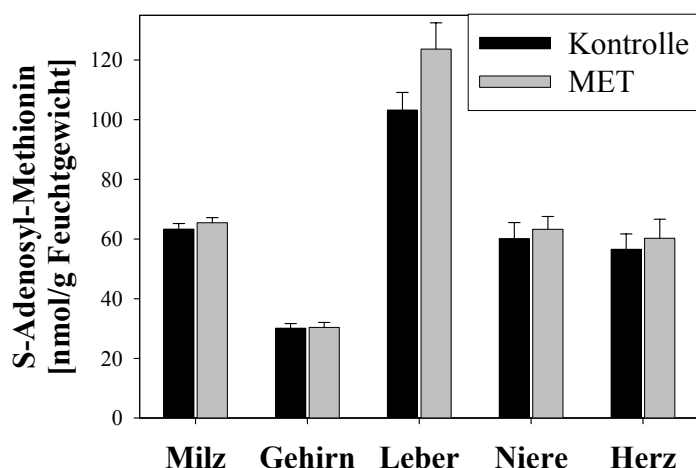
**Abbildung 34:** Optimierung der Derivatisierungszeit und des pH-Wertes für die HPLC-Analytik von SAM und SAH (je  $n = 4$ )

Mit dieser Methode war es jedoch nicht möglich SAM und SAH im Plasma zu bestimmen, da hier die Konzentrationen zu gering sind. Daher sind im Folgenden nur die Gewebskonzentrationen von SAM und SAH angegeben.

#### 4.2.5.2 *S-Adenosyl-Methionin im Gewebe*

S-Adenosyl-Methionin (SAM) wird aus Methionin unter ATP-Verbrauch gebildet und ist der wichtigste Methylgruppendonator in Säugetieren (Pajares et al., 1992). Erhöht sich der SAM-Gehalt eines Gewebes, so kann es zu einer vermehrten Methylierung kommen (Ingrosso et al., 2003). Den höchsten Gehalt an SAM findet sich in Kontrolltieren in der Leber mit  $103 \pm 6$  nmol/g, den niedrigsten im Gehirn mit  $30 \pm 2$  nmol/g (Abbildung 35). In Milz ( $63 \pm 2$  nmol/g), Niere ( $60 \pm 5$  nmol/g) und Herz ( $57 \pm 5$  nmol/g) sind die Gehalte ungefähr gleich hoch. Die Konzentration von SAM war in keinem der Organe in der methioninreich gefütterten Gruppe signifikant erhöht, allerdings zeigte sich in der Leber mit  $124 \pm 9$  nmol/g in der methioninreich gefütterten Gruppe ein starker Trend ( $p = 0,072$ ) zur Erhöhung dieses Methioninmetaboliten.

Eine Erhöhung von SAM im Gewebe bedeutet, dass den Transmethylasen mehr Substrat zur Verfügung steht. Daher beruht die im vorherigen Kapitel beschriebene Akkumulation von SDMA im Plasma anscheinend tatsächlich auf einer vermehrten Transmethylierung.

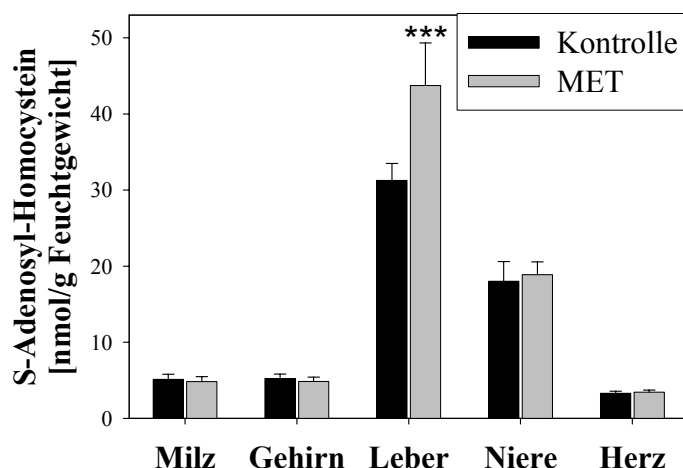


**Abbildung 35:** S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).

Es scheint mehr SAM aus Methionin und ATP synthetisiert zu werden, als von den Transmethylasen abgebaut werden kann. Dafür kann es zwei verschiedene Gründe geben, zum einen eine Substratsättigung von Transmethylasen, zum anderen eine Akkumulation von SAH, was zu einer Inhibierung von Transmethylasen führt (vgl. 2.1). Um hier differenzieren zu können, wurde auch der SAH-Gehalt der Organe untersucht.

#### 4.2.5.3 S-Adenosyl-Homocystein im Gewebe

S-Adenosyl-Homocystein ist ein Nebenprodukt SAM-abhängiger Transmethylierungsreaktionen und direkter Präcursor von Homocystein (Perna et al. 2005). Außerdem kann SAH verschiedene Methyltransferasen inhibieren, wie ausführlich im Kapitel 2.3 ausführlich dargestellt wurde. Wie aus Abbildung 36 ersichtlich ist, wurde in der Leber in der Kontrollgruppe mit  $31,3 \pm 2,2$  nmol/g der höchste Gehalt an SAH gefunden, die Nierenkonzentration ist mit  $18,0 \pm 2,6$  nmol/g ungefähr halb so groß. In Milz, Gehirn und Herz war die Konzentration nur etwa ein Siebtel so hoch wie in der Leber (Milz:  $5,1 \pm 0,7$  nmol/g; Gehirn:  $5,2 \pm 0,6$  nmol/g; Herz:  $3,3 \pm 0,3$  nmol/g).



**Abbildung 36:** S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).

In Gehirn, Herz, Milz und Niere wurde keine Veränderung des S-Adenosyl-Homocysteingehalts gefunden. In Leber der methioninreich gefütterten Tiere war mit  $43,7 \pm 5,6$  nmol/g im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Erhöhung von SAH lässt darauf schliessen, dass der Trend zur Akkumulation von SAM in diesem Gewebe auf einer Hemmung von Transmethylasen durch die erhöhte SAH-Konzentration beruhen könnte. Für eine Hemmung der Transmethylasen spielt aber nicht allein die SAH-Konzentration eine Rolle, sondern das Verhältnis von SAM/SAH gibt Auskunft über den Methylierungszustand (Clarke et al., 2001)

#### 4.2.5.4 „Transmethylierungspotential“ im Gewebe

Die SAH-Konzentrationen sind in allen Organen geringer als die SAM-Konzentrationen. Es gibt jedoch große Unterschiede im Transmethylierungspotential zwischen den verschiedenen Organen. Wie aus Tabelle ersichtlich, zeigte sich nur in der Niere ein Trend zu einem niedrigeren Transmethylierungspotential in den methioninreich gefütterten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe. Sowohl SAM als auch SAH sind jedoch in diesem Organ nur geringfügig verändert (vgl. 4.2.5.2 und 4.2.5.3). Da sowohl SAM als auch SAH in der Leber der methioninreich gefütterten Tiere erhöht sind, findet man keine signifikante Veränderung im Transmethylierungspotential gegenüber den Kontrolltieren.

**Tabelle 3:** Transmethylierungspotential in Milz, Gehirn, Leber, Niere und Herz

	Kontrolle	Methioninfütterung	p =
Milz	13,7 ± 2,2	17,0 ± 2,4	0,330
Gehirn	6,4 ± 0,8	7,1 ± 0,9	0,574
Leber	3,4 ± 0,3	3,2 ± 0,4	0,718
Niere	3,7 ± 0,2	3,3 ± 0,2	0,100
Herz	18,5 ± 2,5	17,8 ± 1,8	0,826

Bei Ratten findet man daher keinen Hinweis, dass eine Hyperhomocysteinämie, die durch vierwöchige methioninreiche Diät induziert wurde, das Transmethylierungspotential senkt. Wie bereits im Theorieteil (vgl. 2.3) vorgestellt, kann dennoch alleine aus diesem Wert keine generelle Aussage getroffen werden, da die Reaktionsgeschwindigkeiten sowie die Inhibitor konstanten für SAH zwischen den einzelnen Methyltransferasen stark variieren (vgl. Tabelle 1).

#### 4.2.5.5 Expression der SAHH in der Leber

Transmethylierungsvorgänge sind wie im Theorieteil unter 2.3 beschrieben essentiell für unseren Körper. Stoffwechselprozesse, denen besondere Bedeutung zukommt, können sehr häufig über Rückkopplungsmechanismen feinreguliert werden. Daher wurde geprüft, ob der Körper auf das vermehrte Angebot von SAH mit einer Veränderung der SAH-Hydrolase-Expression reagiert. Die Expression der SAH-Hydrolase in der Leber wurde relativ zu Tubulin, einem ubiquitär vorkommenden Protein semi-quantitativ mittels Western Blot bestimmt. Obwohl nach vier Wochen methioninreicher Fütterung der SAH-Gehalt der Leber signifikant erhöht ist, zeigten sich bei der Expression der SAHH in den methioninreich gefütterten Tieren ( $I_{SAHH}/I_{Tubulin} = 3,0 \pm 0,6$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $I_{SAHH}/I_{Tubulin} = 2,2 \pm 0,3$ ) keine signifikanten Veränderungen ( $p = 0,305$ ).

Die Aktivität der SAHH hängt nicht nur von der Expression des Enzyms ab, sondern auch vom Oxidationsstatus seiner prosthetischen Gruppen (NAD) (Hohman et al., 1985).

Der Oxidationsstatus von Proben kann sich jedoch während der Lagerung stark verändern, weshalb eine Aktivitätsmessung nur bei frischen Proben sinnvoll ist. Da die Proben zur Metabolitenanalyse sofort schockgefroren und in Säure homogenisiert wurden, war es uns

nicht mehr möglich Aktivitätsmessung der SAHH mit diesen Biopsien durchzuführen. Daher bleibt offen, ob sich die Enzymaktivität der einzelnen Organe verändert hat.

### 4.3 Vergleich der Fütterungsmodelle für Hyperhomocysteinämie

Experimentelle Modelle sollten ein klinisches Bild möglichst genau nachstellen. Im Abschnitt 4.2 zeigte sich, dass viele der in der Literatur beschriebenen Effekte in der vierwöchigen Fütterungsstudie an Ratten mit Methionin nicht reproduziert werden konnten. Die Literaturdaten wurden oftmals mit anderen Fütterungsmodellen für Ratten erhoben, wie beispielsweise der von Dimitrova et al. (2002) beschriebenen Einfluß von Homocystinfütterung auf die endothelvermittelte Gefäßantwort (vgl. 4.2.4.1). Daher wurden verschiedene Fütterungsmodelle in weiteren Fütterungsstudien verglichen. Bei diesen Studien wurde die veränderte Nahrungs-Zusammensetzung über das Pelletfutter variiert. Die genauen Studienbedingungen werden im Abschnitt 4.3.1 ausführlich dargestellt. Um die Effekte von Methionin umfassender zu untersuchen, wurden Ratten über einen längeren Zeitraum (drei Monate) mit einer 2,5-fach höheren Konzentration an Methionin gefüttert (Gruppe „1 % Met“). In vielen in der Literatur beschriebenen Studien wird die Hyperhomocysteinämie nicht durch Methioninfütterung, sondern durch Fütterung mit Homocystein bzw. Homocystin induziert. Daher wurden Veränderungen durch homocystinreiche Fütterung ebenfalls untersucht (Gruppen „1 % Hcy“ bzw. „2 % Hcy“). Da die Abbauwege von Homocystein von Enzymen katalysiert werden, die Vitamin B<sub>12</sub>- oder Folsäure-abhängig sind, wurde schliesslich der Einfluss eines Vitaminmangels (Gruppe „- Vit“), also einer Fütterung ohne Zusatz von Folsäure und Cobalamin, untersucht (Pexa et al., 2006c)

Verglichen wurden in diesen Studien die Gewebkonzentrationen von Homocystein, S-Adenosyl-Homocystein und S-Adenosyl-Methionin, da Veränderungen in der Konzentration dieser Substanzen die Grundlage für Homocystein- oder Methylierungs-induzierte Schäden sind. Es wurden zwei separate Studien durchgeführt. In jeder Studie wurde eine getrennte Kontrollgruppe mitgeführt. Die Gruppen „1 % Hcy“ und „1 % Met“ werden daher mit „Kontrolle 1“ verglichen, die Gruppen „2 % Hcy“ und „- Vit.“ mit „Kontrolle 2“. Die Gewebkonzentration von Homocystein wurden mittels des Fertigkits von Immundiagnostic bestimmt (vgl. 3.11.1). Die Gewebkonzentration von SAM und SAH wurden mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion, wie unter 3.10.2 beschrieben, untersucht. Allerdings wurden die Organe aus den beiden dreimonatigen Fütterungsstudien im Gegensatz zu denen der



vierwöchigen Fütterungsstudie (vgl. 4.2) vor der Homogenisation gefriergetrocknet. Daher unterschieden sich die Absolutwerte der dreimonatigen Fütterungsstudien (in nmol/g Trockengewicht) von denen der vierwöchigen Studie (in nmol/g Feuchtgewicht).

#### 4.3.1 Studienbedingungen

Die nachfolgend beschriebene Fütterungsstudien wurden im Institut für Klinische Chemie im Homburg (Saar) durchgeführt. Studienbedingungen und die Plasmakonzentration von Homocystein der Tiere wurden dort aufgenommen und von Dr. Markus Herrmann und cand. med. Omid Taban freundlicherweise zur Interpretation der Gewebkonzentrationen zur Verfügung gestellt. Die Studienbedingungen der Fütterungsstudie mit 1 % Methionin (täglich ca. 1,4 g Methionin pro kg Körpergewicht) bzw. 1 % Homocystin (täglich ca. 1,0 g Homocystin pro kg Körpergewicht) sowie der entsprechenden Kontrollgruppe (keine Homocystingabe, täglich ca. 0,3 g Methionin pro kg Körpergewicht) sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Studienbedingungen der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 1 % Methionin bzw. 1 % Homocystein

Gruppe	Futter- aufnahme [g/d]	Gewicht vorher [g]	Gewichts- zunahme [g]	Homocystein vorher [μmol/l]	Homocystein nachher [μmol/l]
Kontrolle 1	19,2	243 ± 11	62,8 ± 5,9	6,27 ± 0,32	4,60 ± 0,48
1 % Hcy	17,3	237 ± 7 <sup>#</sup>	85,2 ± 4,4 <sup>*#</sup>	5,88 ± 0,27 <sup>#</sup>	40,61 ± 2,22 <sup>*</sup>
1 % Met	20,7	206 ± 4 <sup>*#</sup>	53,3 ± 4,6 <sup>#</sup>	3,12 ± 0,50 <sup>*#</sup>	27,32 ± 2,80 <sup>*</sup>

\*: Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von Kontrolle

<sup>#</sup>: Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von 1 % Met bzw. 1 % Hcy

<sup>\*#</sup>: Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von Kontrolle und 1 % Met bzw. 1 % Hcy

Die Ratten der 1 % Met-Gruppe waren vor Versuchsbeginn im Mittel signifikant leichter als die der Kontrollgruppe. Dennoch war die Gewichszunahme über den Fütterungszeitraum mit dem in der Kontrollgruppe beobachteten vergleichbar. Die aufgenommene Futtermenge unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Die Homocysteingehalte im Plasma vor Versuchsbeginn unterschieden sich. Da die Studie an weiblichen Tieren durchgeführt wurde und der Homocysteinspiegel im Laufe des Menstruationszyklus schwankt (Talova et al.,

1999), könnten diese allerdings geringen Differenzen durch einen unterschiedlichen Östrogenstatus erklärbar sein.

Nach dreimonatiger Fütterung ist der Homocysteinspiegel in methionin- und homocystinreich gefütterten Tieren verglichen zur Kontrollgruppe ( $4,60 \pm 0,48 \mu\text{mol/l}$ ) signifikant erhöht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,576$ ) zwischen Ratten, die mit 1 % Homocystin gefüttert wurden ( $40,61 \pm 2,22 \mu\text{mol/l}$ ) und Ratten, die zusätzlich Methionin in der Nahrung bekamen ( $27,32 \pm 2,80 \mu\text{mol/l}$ ).

In einer zweiten Fütterungsstudie wurden Effekte von 2 % Homocystin (täglich ca. 1,2 g Homocystin pro kg Körpergewicht) mit einer entsprechenden Kontrollgruppe (keine Homocystingabe, täglich ca. 0,2 g Methionin pro kg Körpergewicht) verglichen. In dieser Studie wurden außerdem Ratten der „-Vit“-Gruppe ohne Zusatz von Folat und ohne Zusatz von Cobalamin gefüttert (keine Homocystingabe, täglich ca. 0,2 g Methionin pro kg Körpergewicht). Es zeigte sich, dass sowohl die Folsäure, als auch die Cobalaminkonzentration im Plasma der "Vitaminmangel"-Tiere erniedrigt war (Daten werden ausführlich von M. Herrmann publiziert). Die Studienbedingungen dieser zweiten Fütterungsstudie sind in Tabelle 5 zusammengestellt

**Tabelle 5:** Studienbedingungen der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 2 % Homocystein bzw. unter Vitaminmangel

Gruppe	Futter- aufnahme [mg/d]	Gewicht vorher [g]	Gewichts- zunahme [g]	Homocystein vorher [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Homocystein nachher [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Kontrolle 2	16,25	$242 \pm 3$	$95,6 \pm 7,5$	$4,86 \pm 0,56$	$8,57 \pm 0,88$
2 % Hcy	$10,30^{*\#}$	$243 \pm 3$	$10,8 \pm 8,7^{*\#}$	$3,84 \pm 0,37$	$44,51 \pm 14,22^{*\#}$
- Vit.	$15,75^{\#}$	$243 \pm 4$	$85,0 \pm 6,7^{\#}$	$3,94 \pm 0,21$	$8,56 \pm 1,31^{\#}$

\*: Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von Kontrolle

#: Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von anderer Fütterungsgruppe in dieser Studie

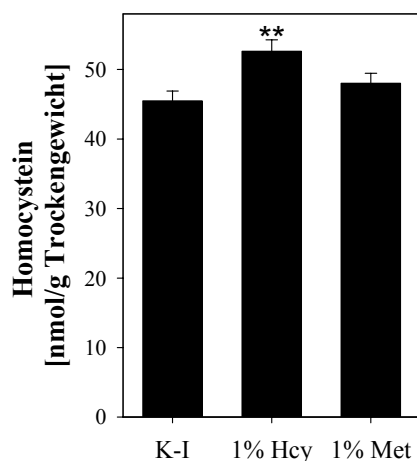
\*#: Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von Kontrolle und anderer Fütterungsgruppe

Die Tiere dieser Fütterungsstudie nahmen weniger Futter auf als in der zuvor vorgestellten Studie. Dies kann dadurch begründet sein, dass die Tiere ein rein synthetisches Futter bekamen. Die mit Homocystin gefütterten Tiere nahmen im Mittel weniger Futter auf als die

Tiere in der Kontrollgruppe. Auch die Gewichtszunahme über den Fütterungsverlauf war deutlich geringer als in der Kontrollgruppe, obwohl das mittlere Gewicht in beiden Gruppen vor Studienbeginn nicht verschieden war. Der Homocystein-Plasmaspiegel nach Ablauf der Fütterungsperiode war bei den Ratten, deren Futter 2 % Homocystin zugestzt wurden, deutlich erhöht ( $44,51 \pm 14,22 \mu\text{mol/l}$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $8,57 \pm 0,88 \mu\text{mol/l}$ ). Tiere, die ohne Folsäure und ohne Cobalamin gefüttert wurden, hatten verglichen mit der Kontrollgruppe keinen erhöhten Homocysteinspiegel im Plasma. Dieser Befund ist kontrovers zu bislang in der Literatur beschriebenen Daten (Herrmann et al., 2005c).

#### 4.3.2 Leber

Die Leber ist ein Organ mit sehr aktivem Transmethylierungsstoffwechsel (vgl. 2.2). Die Gewebsspiegel von SAM, SAH und Homocystein wurden in beiden Studien bestimmt. Wie bereits in der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Methionin (vgl. 4.2.2) lag die mittlere Gewebskonzentration von Homocystein der methioninreich gefütterten Tiere mit  $48,0 \pm 1,4 \text{ nmol/g}$  höher als in der Kontrollgruppe mit  $45,5 \pm 1,4 \text{ nmol/g}$  (Abbildung 37), es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht ( $p = 0,291$ ).

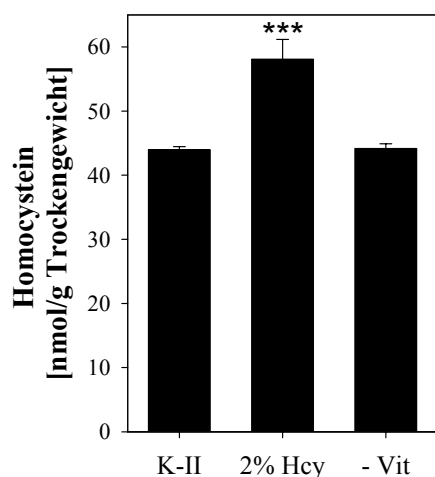


**Abbildung 37:** Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

Der Homocysteingehalt der Leber der homocystinreich gefütterten Tiere ( $52,6 \pm 1,6 \text{ nmol/g}$ ) war verglichen mit dem der Kontrolltiere ( $45,5 \pm 1,4 \text{ nmol/g}$ ) signifikant erhöht (Abbildung 37). Bei homocystinreicher Nahrung erhöht sich die intrazelluläre Homocysteinkonzentration

der Leber signifikant, bei methioninreicher Fütterung nicht. Daher sind in beiden Modellen unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten. So können Enzyminhibierungen durch Homocystein-Akkumulation in der Leber vermutlich nur bei homocystin-induzierter Hyperhomocysteinämie beobachtet werden. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da die Leber über einen zusätzlichen Remethylierungsweg von Homocystein zu Methionin verfügt (vgl. 2.2). Deshalb wäre gerade in diesem Organ zu erwarten, dass eine schnelle Remethylierung von gebildetem oder aufgenommenem Homocystein zu Methionin stattfindet und insofern kein Unterschied zwischen beiden Fütterungsgruppen zu finden ist, da die Homocysteinkonzentration im Plasma zwischen Methionin- und Homocystin-Fütterung nicht verschieden ist.

Auch der Homocysteingehalt der mit 2 % Homocystin gefütterten Tiere war mit  $58,1 \pm 3,1$  nmol/g im Vergleich zu dem der Kontrolltiere ( $44,0 \pm 0,5$  nmol/g) signifikant erhöht (Abbildung 38).

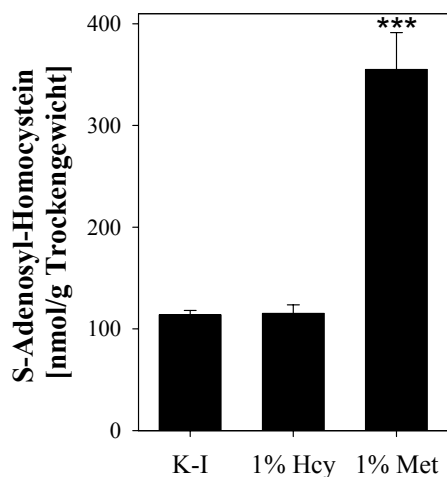


**Abbildung 38:** Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

Die Gewebskonzentration der ohne Folat und ohne Vitamin B<sub>12</sub> gefütterten Tiere unterschied sich mit  $44,2 \pm 0,7$  nmol/g nicht signifikant von der in Kontrollgruppe 2 ( $44,0 \pm 0,5$  nmol/g).

Bei einem Anstieg der intrazellulären Homocysteinkonzentration ist es möglich, dass durch reverse Wirkung der S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase SAH gebildet wird. Bei

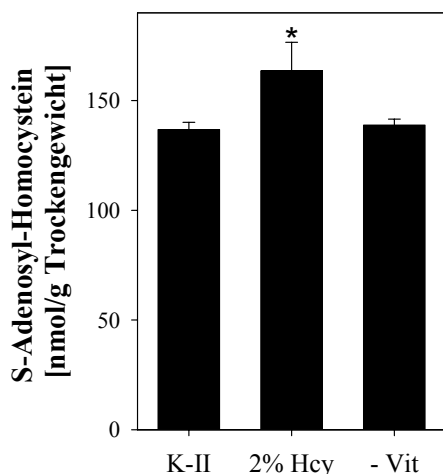
vierwöchiger Methioninfütterung akkumulierte SAH in der Leber. Die Mittelwerte der Gehalte der Lebern der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 1 % Methionin bzw. 1 % Homocystin sind in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39:** S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

In den Lebern der mit 1 % Methionin gefütterten Tiere ( $355 \pm 36$  nmol/g) ist SAH im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $113 \pm 4$  nmol/g) hochsignifikant ( $p = 0,000$ ) erhöht. In den mit 1 % Homocystin gefütterten Tieren ( $115 \pm 8$  nmol/g) unterschied sich der SAH-Leberspiegel nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe. Da der Homocysteingehalt der Leber von methioninreich-gefütterten Tieren nicht signifikant erhöht war, muss die Erhöhung von SAH in dieser Gruppe auf einem vermehrten Durchlaufen des Transmethylierungsweges beruhen und nicht auf einer reversen Reaktion der SAHH. Die 1,2-fache Erhöhung von Homocystein in der Leber der mit 1 % Homocystin gefütterten Tiere führt zu keiner Akkumulation von SAH.

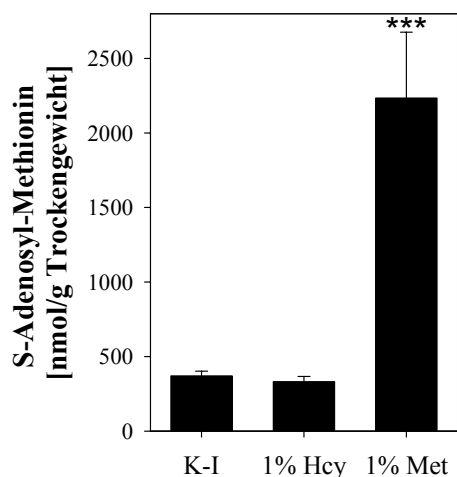
Im Gegensatz zu den Ergebnissen der ersten Studie war SAH in der Leber der mit 2 % Homocystin gefütterten Tiere ( $164 \pm 13$  nmol/g) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $137 \pm 3$  nmol/g) leicht, aber signifikant erhöht (Abbildung 40). In den Vitamin-Mangel-Tieren ( $139 \pm 3$  nmol/g) unterschied sich der SAH-Leberspiegel nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe.



**Abbildung 40:** S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

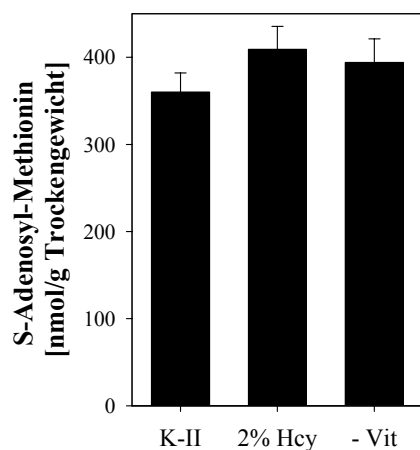
Der Homocysteingehalt in der Leber der mit 2 % Homocystin gefütterten Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe 1,3-fach erhöht. Diese Erhöhung könnte zu einer bevorzugten SAH-Synthese durch die SAHH geführt haben, wodurch Homocystein in SAH umgewandelt wurde. Eine genaue Differenzierung ist über den Gehalt des SAH-Präcursors SAM möglich.

Die mittleren Gehalte des Methyl donors SAM in der Leber der verschiedenen Fütterungsgruppen sind in Abbildung 41 dargestellt. In den methioninreich gefütterten Tieren war die SAM-Konzentration in der Leber mit  $2234 \pm 442$  nmol/g im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 ( $371 \pm 32$  nmol/g) um das 6-fache erhöht. Bei vierwöchiger Methioninfütterung (0,4 %) hatte sich ein starker Trend ( $p = 0,072$ ; vgl. 4.2.5.2) zur Erhöhung der SAM-Konzentration in der Leber gezeigt. In den mit 1 % Homocystin gefütterten Tieren ( $332 \pm 35$  nmol/g) waren die SAM-Gehalte in der Leber nicht signifikant von der Kontrollgruppe ( $371 \pm 32$  nmol/g) verschieden.



**Abbildung 41:** S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

In den Vitamin-Mangel-Tieren ( $394 \pm 27$  nmol/g) und den mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren ( $409 \pm 26$  nmol/g) waren die SAM-Gehalte in der Leber ebenfalls nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe ( $360 \pm 22$  nmol/g) verschieden (Abbildung 42).

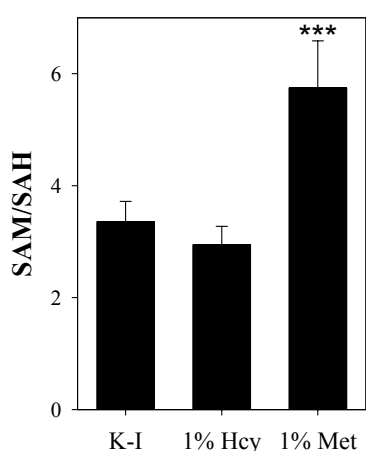


**Abbildung 42:** S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

Der SAM-Gehalt in den mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren war nicht signifikant erhöht, allerdings waren es Homocystein- und SAH-Gehalt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Erhöhung von SAH in diesem Fall nicht auf einer vermehrten Bildung über den

Transmethylierungsstoffwechsel beruht, sondern durch Synthese aus Homocystein und Adenosin durch die SAHH entstanden ist.

Verändern sich die Konzentrationen von SAM und SAH, so kann das „Transmethylierungspotential“, also das Verhältnis von SAM zu SAH, beeinflusst sein. Ist dieses Verhältnis signifikant erniedrigt, kann es zu Hypomethylierung kommen (vgl. 2.3). Das Verhältnis von SAM zu SAH der mit 1 % Homocystin bzw. Methionin gefütterten Tiere ist in Abbildung 43 dargestellt. Wie auch in der vierwöchigen Fütterungsstudie beträgt das Verhältnis von SAM zu SAH in der Kontrollgruppe ungefähr 3.

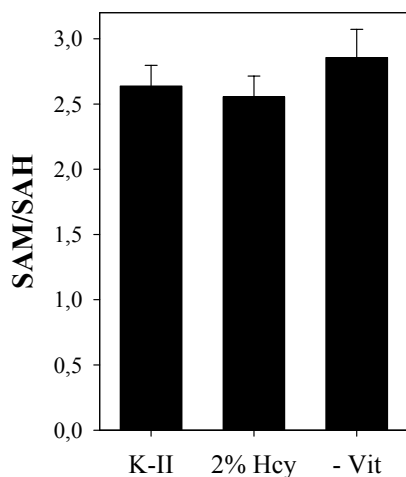


**Abbildung 43:** „Transmethylierungspotential“ in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

In den methioninreich gefütterten Tieren war das Transmethylierungspotential deutlich erhöht. Anstelle eines 3-fachen Überschusses an SAM gegenüber SAH findet sich in diesen Tieren im Mittel ein 6-facher Überschuss. In der vierwöchigen Fütterungsstudie (0,4 % Methionin) war das Transmethylierungspotential unverändert (vgl. 4.2.5.4). In den mit 1 % Homocystin gefütterten Tieren war das Transmethylierungspotential in der Leber nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe verschieden (Kontrolle 1:  $3,4 \pm 0,4$ ; 1 % Hcy:  $2,9 \pm 0,3$ ).

Auch in der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 2 % Homocystin bzw. ohne Vitaminzusatz wurde das Transmethylierungspotential berechnet (Abbildung 44).





**Abbildung 44:** „Transmethylierungspotential“ in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

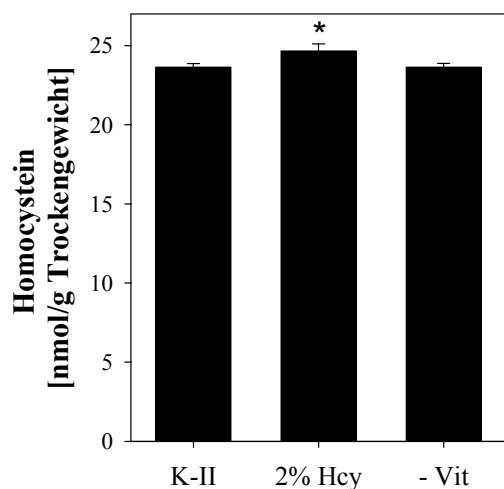
Obwohl die SAH-Konzentration in der Leber der mit 2 % Homocystin gefütterten Ratten im Mittel im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war, gab es keinen signifikanten Unterschied im Transmethylierungspotential. Wie zu erwarten war, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Vitaminmangelgruppe und der Kontrollgruppe.

Erwartet war in dieser Studie, dass die Gruppen „1 % Met“ und „1 % Hcy“ vergleichbare Ergebnisse liefern, da in beiden Gruppen ähnliche Plasmaspiegel von Homocystein bestimmt wurden (vgl. 4.3.1). Das Gegenteil ist der Fall: Es zeigte sich in der Leber ein starker Einfluss von homocystinreicher Fütterung auf die Gewebekonzentration von Homocystein und ein starker Einfluss von methioninreicher Fütterung auf das Transmethylierungspotential. Bei homocystinreicher Fütterung wird erst bei einem Zusatz von 2 % Homocystin zum Futter eine signifikante Erhöhung des Homocystingehaltes gefunden. Daraus leitet sich ab, dass in Abhängigkeit vom gewählten Fütterungsmodell unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten sind.

#### 4.3.3 Milz

Die Milz war das einzige Organ, in dem sich bei vierwöchiger methioninreicher Fütterung signifikante Veränderungen im intrazellulären Homocysteinspiegel zeigten (vgl. 4.2.2). In adulten Tieren kommt der Milz vor allem eine wichtige Funktion als Blutspeicher zu (Lippert, 2000). Da sich am Beispiel von intrazellulärer Homocysteinkonzentration und Transmethylierungspotential in der Leber deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom

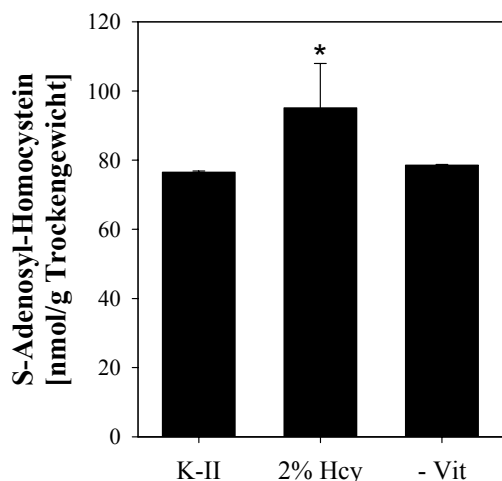
gewählten Fütterungsmodell zeigten (vgl. 4.3.2), soll dies auch in der Milz überprüft werden. Aus der Fütterungsstudie mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folate/Vitamin B<sub>12</sub>-Zusatz standen Milzbiopsien zur Verfügung. Da sich die Ergebnisse der dreimonatigen Fütterungsstudie mit Methionin in der Leber kaum von denen der vierwöchigen unterschieden, sondern lediglich die Unterschiede zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägt waren, wurde darauf verzichtet, die Fütterungsstudie zu wiederholen, um Milzbiopsien zu gewinnen. Die mittleren Gewebskonzentrationen von Homocystein in der Milz der Tiere der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folate/Vitamin B<sub>12</sub>-Zusatz sind in Abbildung 45 dargestellt.



**Abbildung 45:** Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

Die Gewebskonzentration an Homocystein der ohne Folat und ohne Vitamin B<sub>12</sub> gefütterten Tiere unterschied sich mit  $23,6 \pm 0,2$  nmol/g nicht signifikant von der in der Kontrollgruppe ( $23,6 \pm 0,2$  nmol/g) gefundenen. In der homocystinreich gefütterten Gruppe lag der Mittelwert mit  $24,7 \pm 0,5$  nmol/g signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Auch bei den vier Wochen methioninreich (0,4 %) gefütterten Tieren war die Homocystein-Konzentration in der Milz signifikant erhöht (vgl. 4.2.2).

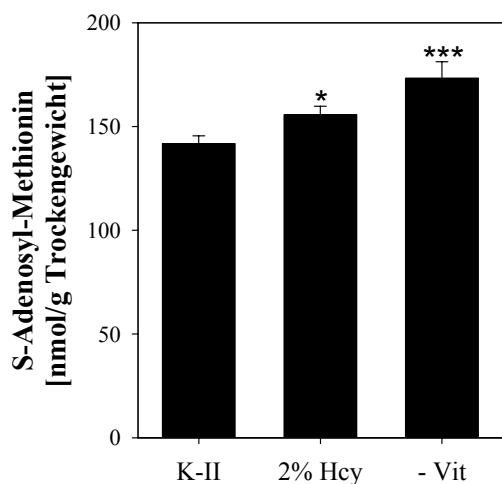
Bei einem Anstieg der intrazellulären Homocysteinkonzentration ist es möglich, dass durch bevorzugten SAH-Synthese durch die S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase SAH gebildet wird. Die mittleren Gehalte an SAH in der Milz sind in Abbildung 46 dargestellt.



**Abbildung 46:** S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

In den homocystinreich gefütterten Tieren ist die mittlere SAH-Konzentration der Milz verglichen mit  $95 \pm 13$  nmol/g zur Kontrollgruppe ( $76,5 \pm 0,3$  nmol/g) signifikant erhöht. Bei den Vitamin-Mangel-Tieren zeigte sich mit  $78,6 \pm 0,2$  nmol/g keine Veränderung gegenüber der Kontrolle. In der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Methionin (0,4 %) war SAH in der Milz nicht erhöht, obwohl Homocystein sogar vergleichsweise stärker erhöht war (vgl. 4.2.2).

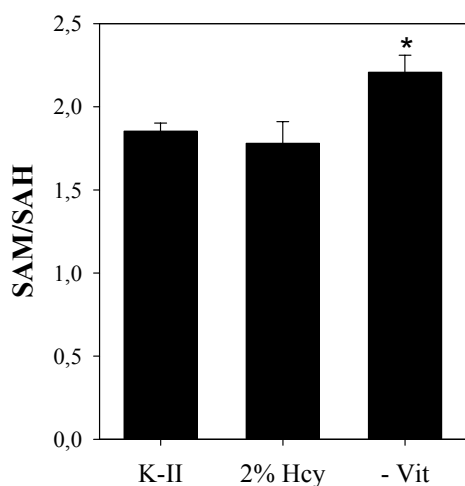
Die mittleren Gehalte des Methyl donors SAM in Lebern der verschiedenen Fütterungsgruppen sind in Abbildung 47 dargestellt.



**Abbildung 47:** S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

In den Vitamin-Mangel-Tieren ( $173 \pm 8$  nmol/g) und den mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren ( $156 \pm 4$  nmol/g) waren die SAM-Gehalte in der Milz signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $142 \pm 4$  nmol/g).

Da in den homocystinreich gefütterten Tieren sowohl SAM als auch SAH erhöht sind, kann eine Aussage darüber, ob eher mit Hyper- oder Hypomethylierung zu rechnen ist, über das „Transmethylierungspotential“, also das Verhältnis von SAM zu SAH, getroffen werden. Wie aus Abbildung 48 ersichtlich, ist das Transmethylierungspotential in den mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren unverändert. In den Vitamin-Mangel-Tieren war das Transmethylierungspotential in der Milz signifikant höher als in der Kontrollgruppe.



**Abbildung 48:** „Transmethylierungspotential“ in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

Wie auch in der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Methionin (vgl. 4.2) zeigte sich in homocystinreich gefütterten Tieren eine erhöhte intrazelluläre Homocysteinkonzentration und ein unverändertes Transmethylierungspotential in der Milz. Interessant ist, dass die Ratten, deren Futter keine Folsäure und kein Cobalamin enthielt, ein signifikant erhöhtes Transmethylierungspotential aufweisen, obwohl die täglich aufgenommene Menge an Methionin sich nicht von der in den Kontrolltieren unterschied (vgl. 4.3.1). Damit scheidet eine vermehrtes Methioninangebot als Ursache aus. Unerwartet hierbei ist, dass die Konzentration an SAM signifikant höher war als in den Kontrolltieren, obwohl zu erwarten gewesen wäre, dass die Folsäure- und Cobalamin-abhängige Remethylierung von Methionin aus Homocystein herabgesetzt wird und somit weniger Methionin zurückgewonnen wird. Möglich wäre, dass einzelne Transmethylasen eine dieser beiden Substanzen als Cofaktoren

benötigen und daher vermindert aktiv sind. Dadurch würde weniger SAM verbraucht werden, wodurch es zur Akkumulation kommen könnte. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität der einzelnen Transmethylasen von Folsäure bzw. Cobalamin ist bislang nicht im Detail geklärt (Clarke et al., 2001).

#### 4.3.4 Herz

In den Herzen der vierwöchigen Methioninreich gefütterten Ratten hatten sich keine signifikanten Veränderungen in der intrazellulären Homocysteinkonzentration bzw. im Transmethylierungspotential gezeigt. Da die Ergebnisse bezüglich der Gehalte dieser Metaboliten in Leber und Milz differierten, wurden diese Parameter auch am Herz bestimmt. Auch Herzbiopsien standen nur von der Fütterungsstudie mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folat/Vitamin B<sub>12</sub>-Zusatz zur Verfügung. Die Gewebkonzentrationen von SAM, SAH und Homocystein sowie das Transmethylierungspotential sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6:** Homocystein, SAH, SAM und "Transmethylierungspotential" im Herz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (je n = 10)

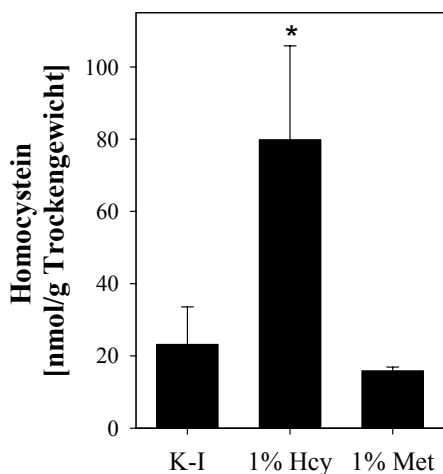
	<b>Kontrolle</b>	<b>2 % Homocystin</b>	<b>Vit-Mangel</b>
Homocystein [nmol/g]	28,8 ± 4,0	33,4 ± 5,0	25,0 ± 5,0
SAH [nmol/g]	90,4 ± 8,8	103,1 ± 19,3	81,7 ± 0,05
SAM [nmol/g]	143 ± 9	138 ± 3	135 ± 4
SAM/SAH	1,61 ± 0,06	1,52 ± 0,11	1,65 ± 0,05

Es zeigten sich keine signifikante Veränderungen in den Herzen der homocystinreich oder ohne Folat/Vitamin B<sub>12</sub>-Zusatz gefütterten Ratten gegenüber der Kontrollgruppe. Auch bei der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Methionin waren keine Unterschiede in der Konzentration von Homocystein oder seinen Präkursoren gefunden worden.

#### 4.3.5 Niere

Da die Niere zumindest anteilig an der Entfernung von Homocystein aus dem Plasma beteiligt ist und scheinbar gewisse Anteile von Homocystein aus dem Primärharn ins Nierengewebe rückresorbiert werden (vgl. 2.7), wurden die Gewebsgehalte von Homocystein aller sechs

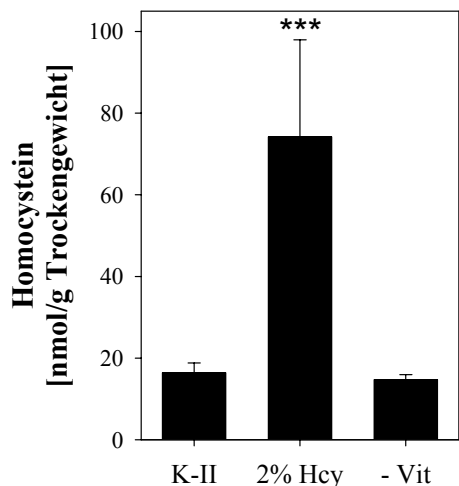
Fütterungsgruppen in der Niere gemessen. In Abbildung 49 sind die Ergebnisse der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 1 % Homocystin bzw. Methionin dargestellt.



**Abbildung 49:** Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

Wie auch in der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Methionin (vgl. 4.2.2) war die mittlere Gewebskonzentration der methioninreich gefütterten Tiere mit  $15,9 \pm 1,1$  nmol/g nicht signifikant verschieden von der Kontrollgruppe (Kontrolle 1:  $23,1 \pm 10,4$  nmol/g). In der homocystinreich gefütterten Gruppe war die Gewebskonzentration an Homocystein mit  $79,8 \pm 26,0$  nmol/g im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Plasma-Homocystein war sowohl in der methioninreich als auch in den homocystinreich gefütterten Gruppen signifikant erhöht. Daher kann die Erhöhung von Homocystein in der Niere nicht ausschliesslich durch rückresorbiertes Homocystein aus dem Primärharn begründet werden, da sonst auch die Gewebskonzentration von Homocystein in den Nieren der methioninreich gefütterten Tieren erhöht sein müsste. Auch der Homocystein-Stoffwechsel im Nierengewebe muss daher einen Einfluss auf den Gewebskonzentration an Homocystein haben.

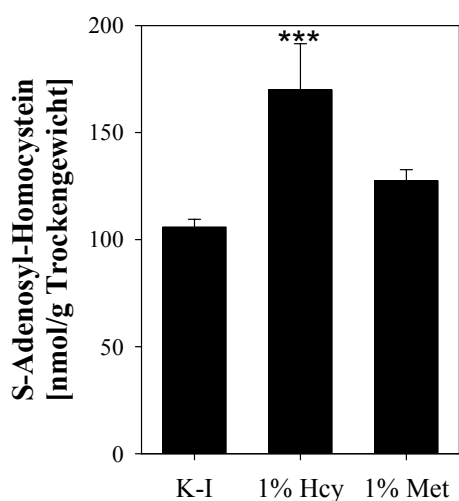
Wie zu erwarten war, zeigte sich bei den mit 2 % Homocystin mit  $74,2 \pm 23,8$  nmol/g ebenfalls eine deutliche Erhöhung des Homocysteingehaltes der Niere im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $16,4 \pm 2,4$  nmol/g (Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

Die mittlere Gewebkonzentration der ohne Folat und ohne Vitamin B<sub>12</sub> gefütterten Tiere unterschied sich mit  $14,7 \pm 1,2$  nmol/g nicht signifikant von der in Kontrollgruppe 2 gefundenen.

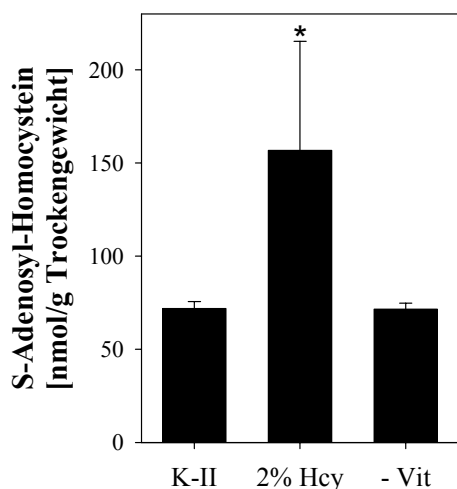
Auch der Homocysteinpräcursor SAH wurde im Nierengewebe untersucht. Die Geweb Gehalte an S-Adenosyl-Homocystein sind in Abbildung 51 dargestellt.



**Abbildung 51:** S-Adenosyl- Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

Der mittlere SAH-Gehalt in Nieren der methioninreich gefütterten Tieren lag mit  $127 \pm 5$  nmol/g geringfügig höher als in der Kontrollgruppe mit  $106 \pm 4$  nmol/g. Dieser Trend erreicht jedoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,250$ ). In der vierwöchigen Fütterungsstudie (0,4 % Methionin) war ebenfalls keine signifikante Veränderung des SAH-Gehaltes der Niere gefunden worden (vgl. 4.2.2). Signifikant erhöht war SAH in Nieren der mit 1 % Homocystin gefütterten Tiere ( $170 \pm 22$  nmol/g) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wie zu erwarten war, ist auch in den Nieren der Tiere die mit 2 % Homocystin gefüttert wurden mit  $157 \pm 58$  nmol/g der mittlere SAH-Gehalt der Niere signifikant höher bestimmt als in der Kontrollgruppe mit  $72 \pm 4$  nmol/g (Abbildung 52).

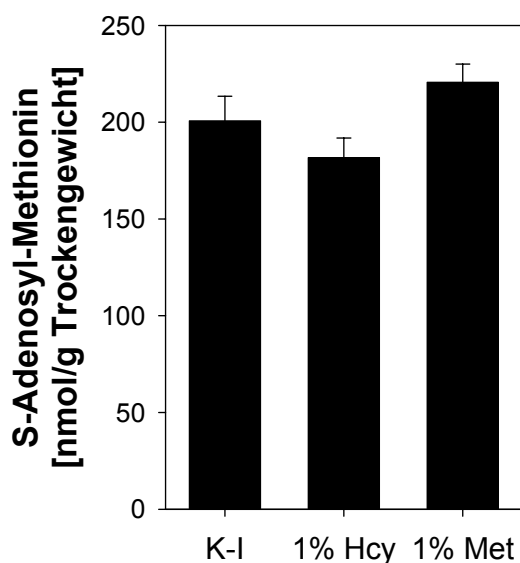


**Abbildung 52:** S-Adenosyl-Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je  $n = 10$ ).

In den Vitamin-Mangel-Tieren ( $72 \pm 3$  nmol/g) unterschied sich der mittlere SAH-Gehalt der Nieren nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe.

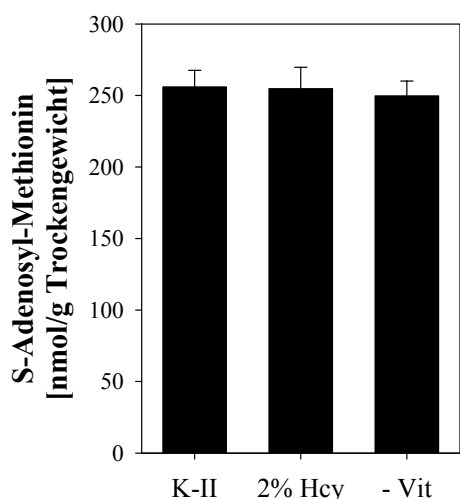
Die mittleren Gehalte des Methyl donors SAM in Nieren der Tiere der ersten Fütterungsstudie mit 1 % Methionin bzw. 1 % Homocystin sowie der entsprechenden Kontrollgruppe sind in Abbildung 53 dargestellt.





**Abbildung 53:** S-Adenosyl-Methioningehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

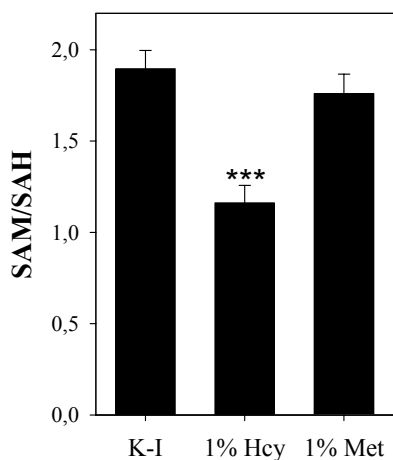
Weder in den methioninreich ( $221 \pm 9$  nmol/g) noch in den homocystinreich gefütterten Tieren ( $182 \pm 10$  nmol/g) war die mittlere SAM-Konzentration signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ( $201 \pm 13$  nmol/g) verändert. Auch bei Fütterung mit 2 % Homocystin zeigte sich mit  $255 \pm 15$  nmol/g, wie in Abbildung 54 dargestellt, keine signifikante Veränderung verglichen zur Kontrollgruppe 2 mit  $256 \pm 11$  nmol/g.



**Abbildung 54:** S-Adenosyl-Methioningehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

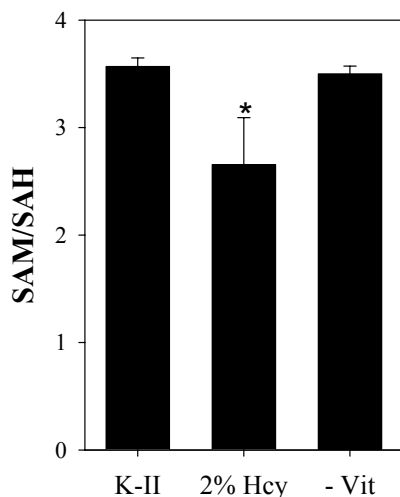
Bei den Vitamin-Mangel Tieren ( $250 \pm 10$  nmol/g) waren die SAM-Gehalte in der Niere nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe verschieden.

Da die mittlere SAM-Konzentrationen in der Niere aller Fütterungsgruppen nicht signifikant verschieden von der entsprechenden Kontrollgruppe waren, ist es wahrscheinlich, dass das „Transmethylierungspotential“ durch die signifikanten Veränderungen im SAH-Gehalt in den Nieren der Homocystinreich-gefütterten Tiere erniedrigt ist. Das Verhältnis von SAM zu SAH der ersten Fütterungsstudie mit 1 % Methionin bzw. 1 % Homocystin ist in Abbildung 55 dargestellt.



**Abbildung 55:** „Transmethylierungspotential“ in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).

Bei den für drei Monate methioninreich gefütterten Tieren war das Transmethylierungspotential wie auch in der vierwöchigen Fütterungsstudie (0,4 % Methionin, vgl. 4.2.2) unverändert. In den mit 1 % Homocystin gefütterten Tieren war das Transmethylierungspotential in der Niere signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe erniedrigt. Auch in der Fütterungsgruppe mit 2 % Homocystin war der SAH-Gehalt signifikant erhöht. Das Transmethylierungspotential ist in Abbildung 56 dargestellt. In den mit 2 % Homocystin gefütterten Tieren ist das Transmethylierungspotential in der Niere signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe erniedrigt. In den Vitamin-Mangel Tieren zeigte sich keine signifikante Veränderung gegenüber Kontrollgruppe 2.



**Abbildung 56:** „Transmethylierungspotential“ in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).

Man sieht also in der Niere einen deutlichen Unterschied zwischen einem Fütterungsmodell mit methioninfütterungs-induzierter Hyperhomocysteinämie und einem Modell, in dem die Hyperhomocysteinämie durch Homocystinfütterung induziert wurde. Homocystinfütterung beeinflusst die Gewebskonzentration an Homocystein in der Niere und das Transmethylierungspotential signifikant, wohingegen methioninreiche Fütterung keinen Einfluss auf diese beiden Faktoren hat.

In der Literatur wird beschrieben, dass Nierenschäden mit Hyperhomocysteinämie induziert sind (Herrmann et al., 2005c; Hong et al., 1998). Da jedoch alimentäres Methionin die Hauptquelle für Homocystein bildet, ist es wahrscheinlich, dass die Hyperhomocysteinämie durch den Nierenschaden ausgelöst wird. Akkumuliert Homocystein jedoch aufgrund eines Nierenschadens im Plasma, so ähnelt die Situation eher dem Modell der Homocystin-induzierten Hyperhomocysteinämie und es kann somit zu weiterführenden Schäden durch Homocysteinakkumulation und Erniedrigung des Transmethylierungspotentials der Niere kommen.

Um die Bedeutung der Methionin- und Homocysteinaufnahme besser zu verstehen, wurden weiterführende Untersuchungen zum Homocysteingehalt in Lebensmitteln und zur Bildung von Homocystein aus Methionin durch Darmbakterien durchgeführt.

#### 4.4 Experimentelle Modelle und Hyperhomocysteinämie beim Menschen

Es zeigte sich, dass die verschiedenen Modelle zur Induktion einer Hyperhomocysteinämie deutlich unterschiedliche Resultate liefern (vgl. 4.3). So zeigte sich beispielsweise nur bei homocystinreicher Fütterung eine deutliche Erhöhung von Homocystein und S-Adenosyl-Homocystein in der Niere, nicht aber bei methioninreicher Diät. Daher ist es von höchster Bedeutung zu wissen, welches dieser Modelle einer Hyperhomocysteinämie durch Überernährung am nächsten kommt. In der Literatur (Finkelstein, 1998) wird beschrieben, dass quantitativ mehr Methionin als Homocystein in Lebensmitteln enthalten ist, allerdings gibt es keine systematischen Untersuchungen zum Homocysteingehalt in Lebensmitteln. Des weiteren könnte das Methionin zwar als proteingebundenes Methionin aufgenommen werden, dann aber von Bakterien des Dünndarms in Homocystein umwandelt werden, wodurch direkt Homocystein für die Resorption zur Verfügung stehen würde.

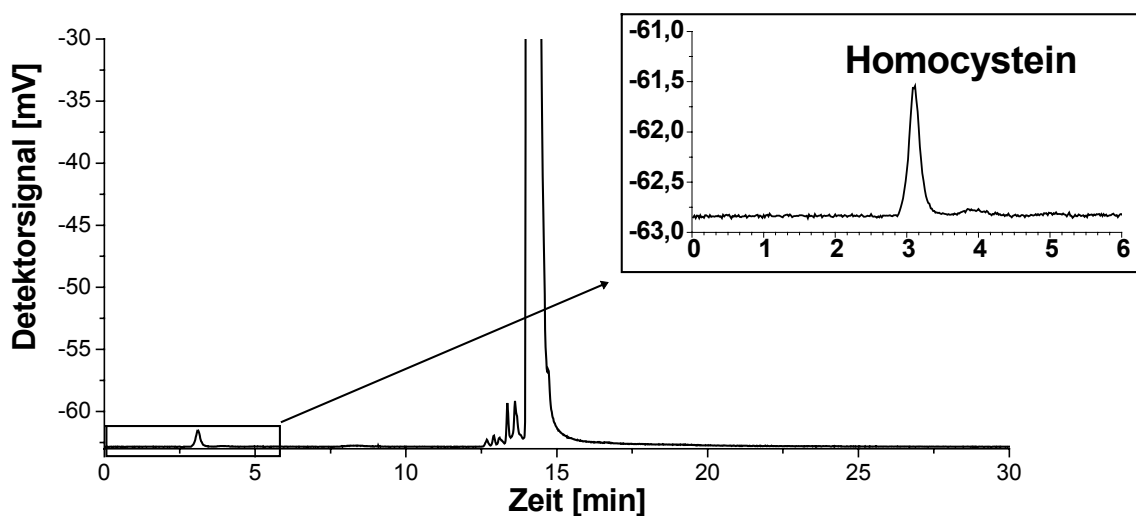
##### 4.4.1 Homocystein in Lebensmitteln

Da Methionin eine essentielle Aminosäure ist und als Präcursor für endogen gebildeten Homocysteins fungiert, gilt alimentäres Methionin als Ausgangspunkt für das Homocystein im Plasma. Dies begründet sich damit, dass der Plasma-Homocysteinspiegel bei Blockade der endogenen Homocysteinbildung (Inhibierung der SAHH durch Adenosindialdehyd) deutlich gesenkt wird (Loncar et al., 1997). Dabei war es bislang nicht möglich, die alimentär zugeführte Menge an Homocystein abzuschätzen, da die Homocystein-Konzentrationen in Lebensmitteln bislang nicht bekannt waren. Die einzige Studie (Dermikol et al., 2004), die sich mit dem Homocysteingehalt von Lebensmitteln befasste, war ein Screening verschiedener unprozessierter Obst- und Gemüsesorten. Von 22 getesteten Lebensmitteln konnte nur in Spargel und Pepperoni Homocystein nachgewiesen werden. Im Rahmen der Diplomarbeit von DLC Karin Fischer (2006) wurde eine Methode zur Quantifizierung von Homocystein in Lebensmitteln entwickelt und der Homocysteingehalt von fünf Lebensmitteln bestimmt (Pexa et al., 2006b).

##### 4.4.1.1 *Optimierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein in Lebensmitteln*

Zur Bestimmung von Homocystein in Lebensmitteln wurde eine in der Literatur (Imai et al., 1983) für die Quantifizierung von Homocystein in Plasma- und Vollblutproben beschriebene HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion etabliert und diese anschließend an die Matrix von

Lebensmitteln adaptiert. Die in der Literatur beschriebenen chromatographischen Bedingungen wurden optimiert, um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen. Eine hohe Pufferkapazität, pH = 5 und ein niedriger Anteil an organischem Lösungsmittel erwiesen sich als vorteilhaft. Als Elutionsmittel wurde 30 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat gewählt. An die chromatographische Trennung schloss sich nach 6 Minuten ein 5-minütiger Spülschritt mit 50 % Methanol im Puffer an, um unpolare Substanzen vollständig von der Säule zu eluieren. Anschließend wurde das System wieder für den nächsten Lauf mit 30 mmol/l Kaliumhydrogenphosphat ohne Methanolzusatz für den nächsten Lauf äquilibriert.

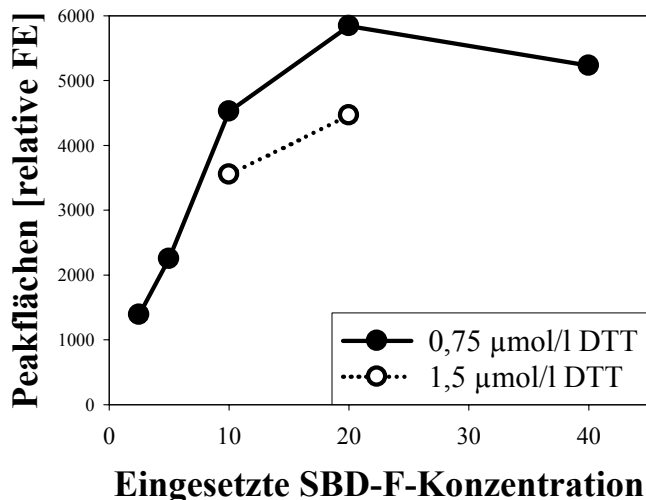


**Abbildung 57:** RP-HPLC-Chromatogramm eines Homocystein-Standards (4 µmol/l)

Diese Methode umfasst die Messung von Gesamthomocystein. Die Lebensmittel werden homogenisiert (einzelne Methoden vgl. 3.11.3) und im alkalischen bei gleichzeitiger Reduktion von Disulfidbrücken derivatisiert. Es wurden eine optimale Derivatisierungstemperatur und -dauer sowie der optimale pH-Wert mit Hilfe von Standards ermittelt. Die Peakfläche von Homocystein erhöhte sich bei einer Inkubationstemperatur von 50 °C nach 30 Minuten kaum noch. Wurden höhere Inkubationstemperaturen als 50°C gewählt, bildeten sich Nebenreaktionsprodukte. Es wurde daher eine Derivatisierung bei pH = 10,5 und 50 °C für 30 min zur Durchführung der Analysen ausgewählt.

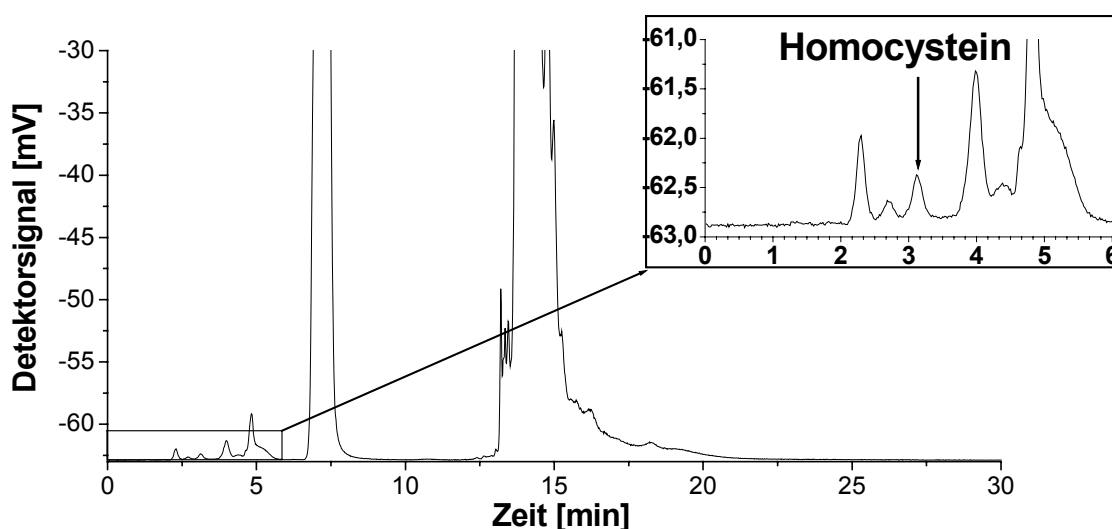
Da sich das Redox-Potential und der Thiolgehalt von Lebensmitteln von dem des Blutes unterscheiden, musste die zugesetzte Menge an Reduktionsmittel (Dithiothreitol, DTT) und Derivatisierungsreagenz (7-Fluorobenzfuran-4-sulfonsäure-ammoniumsalz, SBD-F) angepasst werden. Es wurde eine einheitliche Methode zur Probenvorbereitung von

Lebensmittelproben gesucht. Beispielhaft ist dieser Optimierungsschritt für Weißbrot in Abbildung 58 dargestellt.



**Abbildung 58:** Optimierung der Menge an Reduktionsmittel (DTT) und Derivatisierungsreagenz (SBD-F) für die HPLC-Analytik von Homocystein in Weißbrot.

Es zeigte sich, dass bei zu hohen Gehalten das Reduktionsmittels Dithiothreitol mit dem Derivatisierungsreagenz reagieren kann. Daher wurde eine Konzentration von 0,75 µmol/l Dithiothreitol gewählt. Bezüglich der Menge an zugesetztem Derivatisierungsreagenz (7-Fluorobenzofurazan-4-sulfonsäure Ammoniumsalz, SBD-F) ist die Peakfläche bei 20 µmol/l maximal. In Abbildung 59 ist beispielhaft ein Chromatogramm einer Analyse von Roquefort Käse dargestellt.



**Abbildung 59:** RP-HPLC-Chromatogramm einer Homocysteinmessung in Roquefort Käse.

In Roquefort Käse, Weissbrot, Thunfisch, Schweineleber und Schwarzbier konnte Homocystein nachgewiesen werden. Der Homocysteinpeak wurde durch Standardaddition identifiziert. Wiederfindungsraten wurden über eine Mehrpunkt-Standardaddition für jedes einzelne Lebensmittel ermittelt. Die Wiederfindungsraten für Homocystein in Lebensmitteln lagen zwischen 65 % (Blauschimmelkäse) und 103 % (Thunfisch). Somit ist die Methode zur Quantifizierung von Homocystein in Lebensmittel geeignet.

#### 4.4.1.2 Homocysteingehalte von Lebensmitteln

Da sowohl in tierischen Geweben (vgl. Punkt 4.2.2 und 4.3) als auch in Pflanzen wie Spargel oder Pepperoni (Demirkol et al., 2004) Homocystein nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass auch in prozessierten Lebensmitteln Homocystein enthalten ist. Um dies zu überprüfen, wurde beispielhaft an sechs Lebensmitteln untersucht, ob Homocystein nachweisbar ist und erste Konzentrationsabschätzungen durchgeführt. Die Nachweisgrenze der optimierten Methode lag bei 15 nmol/l. In frisch gebrühtem Kaffee war kein Homocystein nachweisbar. In Schwarzbier, Schweineleber, Thunfisch, Weissbrot und Roqueford-Käse war Homocystein nachweisbar. Die Gehalte sind in Tabelle 7 dargestellt. Zum Vergleich sind die aus der Literatur (Souci et al., 2006) entnommenen Gehalte von Methionin ebenfalls in dieser Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7:** Homocystein- und Methioningehalte ausgewählter Lebensmitteln [mg/kg] bzw. [mg/l]

	Homocystein	Methionin*
<b>Schwarzbier</b>	0,03 ± 0,01	Gesamtprotein < 5000
<b>Roqueford-Käse</b>	0,50 ± 0,04	6000
<b>Weißbrot</b>	0,95 ± 0,12	1300
<b>Thunfisch</b>	0,25 ± 0,03	6100
<b>Schweineleber</b>	0,31 ± 0,07	6300

\*: Literaturdaten, entnommen aus (Souci et al., 2006)

Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Dermikol und Mitarbeitern bestimmten Gehalten in Spargel ( $0,15 \pm 0,01$  mg/kg) und Pepperoni ( $0,07 \pm 0,01$  mg/kg). Die von Dermikol zur Analyse verwendete Methode war ebenfalls eine RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion, allerdings wurde ein anderes Derivatisierungsreagenz (N-(1-

Pyrenyl)maleimid) verwendet. Der Gehalt an Homocystein ist in allen Lebensmitteln wesentlich geringer als der Methioningehalt. Der höchste Gehalt an Homocystein wurde in Weißbrot gefunden, obwohl der Methioningehalt nur 1/5 so groß ist wie in Thunfisch, Schweineleber und Roquefort-Käse. Die Bedeutung dieser Homocysteingehalte für die täglich aufgenommene Menge an Homocystein ist im Folgenden dargestellt.

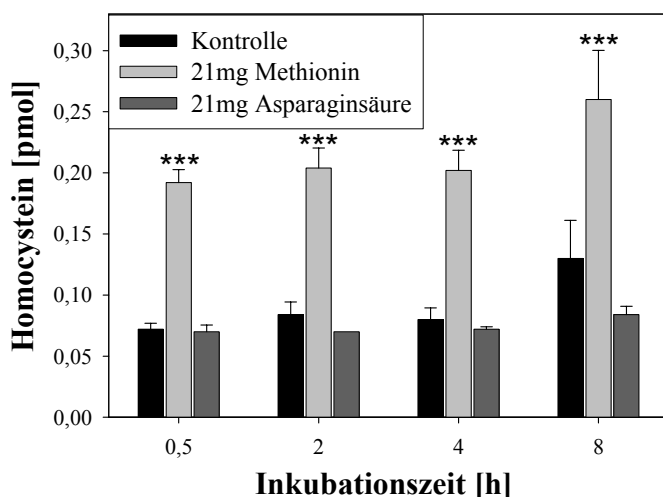
#### *4.4.1.3 Abschätzung der alimentären Zufuhr von Homocystein*

Um die alimentäre Zufuhr von Homocystein abschätzen zu können, wurde aus den analysierten Lebensmitteln eine "Beispieldiät" zusammengestellt. Aus einer täglichen Aufnahme von 100 g Roquefort Käse, 250 g Weissbrot, 200 g Schweineleber, 200 g Thunfisch und 1 l Schwarzbier resultiert eine maximale tägliche alimentäre Aufnahme von 400 µg bzw. 3 µmol Homocystein. Setzt man eine vollständige Resorption von Homocystein im Gastrointestinaltrakt voraus, so verteilen sich diese 3 µmol alimentäres Homocystein auf das Blutplasma. Menschen (durchschnittliches Körpergewicht 70 kg) haben ca. 3,5 l Plasma (Schmidt et al., 2000). Daraus errechnet sich ein maximal möglicher Beitrag von alimentärem Homocystein zur Gesamtkonzentration im Plasma von ca. 0,85 µmol/l. Die durchschnittliche Plasmakonzentration von Homocystein im Menschen beträgt 6 -9 µmol/l (De Bree et al., 2002). Ein geringfügiger Einfluss wäre von alimentärem Homocystein auf die Plasmahomocystein-Konzentration wäre also denkbar. Allerdings ist die gleichzeitig aufgenommen Menge an Methionin ungefähr um Faktor 10000 grösser. Dieses Methionin muss jedoch zunächst in Homocystein umgewandelt werden. Loncar und Mitarbeiter (1997) führten Studien am Hund durch, in denen der Einfluss der intrazellulären Homocysteinbildung auf den Plasmaspiegel von Homocystein abgeschätzt wurde. Unter Blockade der intrazellulären Homocysteinsynthese (SAHH-Inhibierung) im Herzen wurde der Homocystein-Plasmaspiegel gemessen. Aus der Kinetik des Absinkens der Homocysteinkonzentration errechneten die Autoren eine intrazelluläre Homocysteinproduktionsrate von ca. 1 µmol/min. Da intrazellulär laut diesen Untersuchungen pro Minute mehr Homocystein ins Plasma freigesetzt wird, als pro Tag über die Nahrung aufgenommen wird, ist es unwahrscheinlich, dass Homocystein aus der Nahrung die Plasmakonzentration von Homocystein signifikant beeinflusst.



#### 4.4.2 Modellstudien zur Homocysteinproduktion durch Darmbakterien

Nicht nur in Zellen des menschlichen Körpers kann Methionin zu Homocystein umgewandelt werden. Auch Mikroorganismen verfügen über einen Transmethylierungsstoffwechsel und könnten somit Methionin in Homocystein umwandeln (Stryer, 1996), welches dann wieder in den Darm abgegeben werden könnte und zur Resorption zur Verfügung stehen würde. Da Aminosäure-Transporter nur in in der Mucosa des Dünndarms exprimiert werden (Schmidt et al., 2000) und somit nur dort Aminosäuren resorbiert werden (vgl. 2.7.2), spielen nur Mikroorganismen im Dünndarm für eine potentielle Homocystein-Produktion eine Rolle. Dort leben vorwiegend fakultativ anaerobe Bakterien, wobei sich die Flora nahrungsabhängig ändert und dadurch nicht eindeutig charakterisierbar ist (Neale et al., 1972). Um den optimalen Kulturbedingungen von fakultativen anaerobiern gerecht zu werden, wurde eine Kultivierung im geschlossenen Wärmeschrank für die Versuche gewählt. Der Dünndarminhalt von Ratten wurde post mortem mit Puffer in Kulturflaschen überspült. Aus diesem Gesamtvolumen von ca. 14 ml Dünndarmisolat wurden dreimal jeweils 4 ml in Kulturflaschen abgefüllt. Eine Kulturflasche diente als Kontrolle. Aus den Studienbedingungen der vierwöchigen Fütterungsstudie von Ratten (vgl. 4.2.1.1) leitet sich ab, dass Ratten täglich ca. 70 mg Methionin aufnehmen. Diese Dosis wurde prozentual auf die eingesetzten 4 ml Dünndarmisolat umgerechnet, woraus sich ein Zusatz von 21 mg zum Kulturansatz ergab. Diese 21 mg entsprechen also in etwa der unter ad libitum-Fütterung täglich aufgenommenen Menge an Methionin. Als weitere Kontrollgruppe wurde dem Dünndarmisolat eine Aminosäure zugesetzt, die nicht in den Transmethylierungsstoffwechsel involviert ist, nämlich Asparaginsäure (21 mg). Die nach Ablauf einer bestimmten Inkubationszeit gebildete Menge an Homocystein ist in Abbildung 60 dargestellt.



**Abbildung 60:** Homocysteinproduktion von Dünndarmbakterien aus Ratten, die mit und ohne Methionin bzw. Asparaginsäure [21 mg/4 ml Dünndarmisolat] gefüttert wurden.

Bereits nach 30 min ist die Homocysteinkonzentration im Kulturmedium in den methioningefütterten Bakterienkulturen mit  $0,192 \pm 0,011$  pmol/Kulturansatz signifikant höher als in den Kontrollgruppen, die ohne Aminosäurezusatz ( $0,072 \pm 0,005$  pmol/Kulturansatz) bzw. mit Asparaginsäurezusatz ( $0,070 \pm 0,005$  pmol/Kulturansatz) inkubiert wurden. Daraus läßt sich eine initiale Produktionsrate von 14 fmol/min aus 70 mg Methionin auf ein Gesamtisolat aus Dünndarm errechnen. Wie bereits für die alimentäre Homocysteinzufuhr diskutiert, ist auch hier die intrazelluläre Produktionsrate von Homocystein aus Methionin mit  $1 \mu\text{mol}/\text{min}$  (Loncar et al., 1997) wesentlich höher als die initiale Produktionsrate von Homocystein von Dünndarmbakterien.

Nahrung gelangt nach 0,5 bis 4 Stunden in den Dünndarm (Schmidt et al., 2000). Nach Methioningabe beim Menschen steigt die Konzentration an reduziertem Homocystein im Plasma bereits 2 Stunden nach Nahrungsaufnahme an, die Gesamtkonzentration erreicht nach 8 Stunden ihr Maximum (vgl. 2.7.1). Da bereits innerhalb von 30 Minuten Homocystein von Darmbakterien aus Methionin produziert wird, könnte also die Homocysteinproduktion der Dünndarmbakterien einen geringen Beitrag zur Plasmakonzentration liefern. Allerdings wurden für diese Versuche Gesamtisolate aus dem Rattendarm verwendet, deren mikrobielle Zusammensetzung nicht bekannt ist. Die gemessene Homocysteinbildung könnte also auch teilweise von mitotisierten Darmepithelien produziert worden sein. Um hier genauer zu differenzieren, müssten Reinkulturen der Dünndarmbakterien isoliert werden und diese analog zu den hier durchgeführten Versuchen mit Methionin inkubiert werden. Leider sind bis dato weder die genauen Subtypen der Bakterien im Dünndarm bekannt, noch die genaue

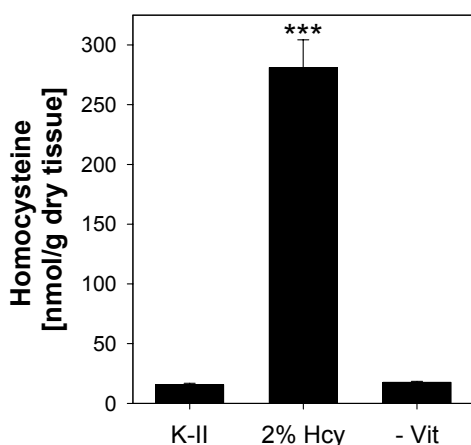
Bakterienanzahl, da diese stark fluktuiert. Da jedoch große Unterschiede bei Ratten zwischen methioninreicher Fütterung und der Fütterung mit Homocystin gefunden wurden (vgl. 4.3), ist es sehr wahrscheinlich, dass die mikrobielle Homocysteinproduktion bei erhöhter Methioninaufnahmen nicht ausschließlich für den gemessenen Plasma-Homocysteinspiegel verantwortlich ist. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des mit der Nahrung aufgenommenen Methionins bereits im Dünndarm zu Homocystein umgewandelt wird. Dennoch könnte die Differenzierung der Homocysteinquellen für Patienten mit Aminosäure-Resorptionsstörungen oder veränderten Homocysteinstoffwechsel von großer Bedeutung sein.

#### **4.5 Weitere Phänomene**

Bei den Experimenten zur Erstellung dieser Promotion fielen weitere Ergebnisse auf, die mit dem derzeitigen Stand der Forschung nicht eindeutig erklärbar sind. Da sie inhaltlich den Zielrichtungen nicht stringent zuzuordnen waren, werden sie im Folgenden cursorisch zusammengestellt.

##### 4.5.1 Homocystein und Transmethylierungspotential im Knochen

Es ist nicht eindeutig geklärt, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Osteoporose und Hyperhomocysteinämie besteht (Herrmann et al., 2005a). In der Literatur gibt es bislang keine Daten zur Gewebkonzentration von Homocystein und seinen Präkursoren im Knochen. In ausgehöhlten (markfreien) Knochen der Tiere der Fütterungsstudie mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folate und Vitamin B12 wurden die Gehalte von Homocystein, SAH und SAM bestimmt. Die mittlere Gewebkonzentration der einzelnen Fütterungsgruppen sind in Abbildung 61 dargestellt.



**Abbildung 61:** Mittlere Homocysteingehalte im markfreien Rattenknochen nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (je n = 10)

Die Gewebkonzentration der ohne Folat und ohne Vitamin B12 gefütterten Tiere unterschied sich mit  $17,7 \pm 0,8$  nmol/g nicht signifikant von der in der Kontrollgruppe ( $15,7 \pm 1,1$  nmol/g) gefundenen. In den homocystinreich gefütterten Gruppen war die mittlere Gewebkonzentration an Homocystein mit  $281,2 \pm 23,2$  nmol/g im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant erhöht. Dieser Unterschied ist wesentlich deutlicher als in allen anderen untersuchten Geweben. Bei einer derartigen Erhöhung an freiem Homocystein ist zu erwarten, dass durch reverse Wirkung der S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase SAH gebildet wird. Die Gewebkonzentrationen von SAH und seinem Präcursor SAM sowie das Transmethylierungspotential sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8:** SAH, SAM und "Transmethylierungspotential" im Knochen nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (je n = 10)

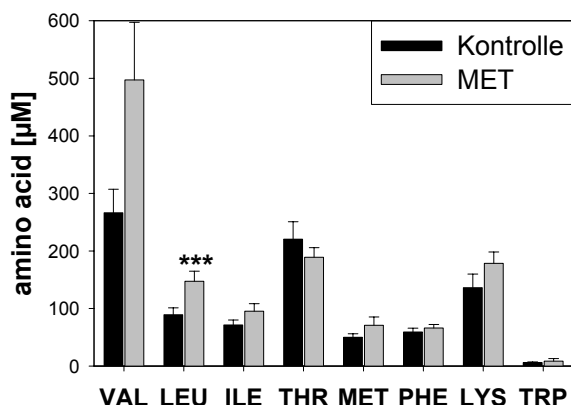
	Kontrolle	2 % Homocystin	Vit-Mangel
SAH [nmol/g]	$7,1 \pm 0,9$	$8,1 \pm 0,9$	$6,9 \pm 0,6$
SAM [nmol/g]	$6,2 \pm 0,7$	$10,9 \pm 3,6$	$5,8 \pm 0,5$
SAM/SAH	$0,87 \pm 0,02$	$1,39 \pm 0,51$	$0,85 \pm 0,03$

Es zeigten sich allerdings keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen, weder in der SAH-Konzentration, noch in der SAM-Konzentration oder dem Transmethylierungspotential. Diese Ergebnisse wurden in einer Doppelbestimmung überprüft, da das Resultat höchst unerwartet war. In einem auch für den Knochen zunächst angenommenen Modell, in dem die Homocysteinkonzentration in einem Gleichgewicht zwischen

den einzelnen Homocysteinfraktionen (freies oxidiertes und reduziertes Homocystein sowie proteingebundenes Homocystein; vgl. 2.4) vorliegt, müssten entsprechend dieses Gleichgewichtes im Laufe der dreimonatigen Fütterungsperiode alle homocysteinhaltigen Fraktionen zugenommen haben. Falls auch das freie reduzierte Homocystein akkumuliert, so sollte durch die SAH-Hydrolase vermehrt SAH gebildet werden. Dies ist nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich nicht wie z. B. im Plasma (vgl. 2.7.1) ein steady-state erreicht wird, in dem die Verhältnisse der einzelnen Homocysteinfraktionen untereinander immer gleich ist. Nur freies, reduziertes Homocystein steht für eine Reaktion mit Adenosin zu S-Adenosyl-Homocystein durch die SAH-Hydrolase zur Verfügung. Ist nur das proteingebundene Homocystein (z. B. am Kollagen) erhöht, so ist dies eine Erklärung für die unveränderten SAH-Konzentrationen.

#### 4.5.2 Essentielle Aminosäuren im Plasma

Essentiellen Aminosäuren kommt bei Stoffwechselbeobachtungen eine besondere Bedeutung zu, da diese im Körper nur abgebaut, aber nicht synthetisiert werden. In der vierwöchigen Fütterungsstudie mit 0,4 % Methionin (vgl. 3.4) wurde die Konzentration an essentiellen Aminosäuren im Plasma mittels GC-FID (vgl. 3.12) bestimmt. In Abbildung 62 sind die Plasmakonzentrationen der essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Lysin und Tryptophan aufgeschlüsselt.



**Abbildung 62:** Essentielle Aminosäuren im Plasma von vier Wochen methioninreich gefütterten Tieren:

VAL: Valin, LEU: Leucin, ILE: Isoleucin, THR: Threonin, MET: Methionin, LYS: Lysin, TRP: Tryptophan

Eine signifikante Erhöhung findet sich bei Leucin in den methioninreich gefütterten Tieren von  $147 \pm 17$  nmol/g im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $89 \pm 12$  nmol/g ( $p = 0,014$ ). Valin, Isoleucin und Lysin zeigen einen Trend zur Erhöhung bei methioninreicher Fütterung. In den untersuchten Geweben war die Konzentration dieser Aminosäuren nicht gegenüber den Kontrolltieren erhöht (Werte siehe Anhang unter 8.1.6; Tabellen 10 und 11). Daher beruht die erhöhte Plasmakonzentration vermutlich auf einer erhöhten Transportkapazität für diese Aminosäuren. Die Aminosäuren könnten entweder im Dünndarm vermehrt aufgenommen werden oder im Nierentubulus-System vermehrt rückresorbiert werden. Eine allgemeine Veränderung der glomeruläre Filtration scheidet als Mechanismus aus, da ansonsten die Konzentrationen aller Aminosäuren im Plasma erhöht sein müssten. Verzweigt-kettige Aminosäuren werden hauptsächlich durch den unspezifische Transporter (L-Typ) intestinal aufgenommen und renal rückresorbiert (Palacin et al., 1998). Effekte von Homocystein und/oder Methionin auf diese Transportsysteme sind bislang nicht bekannt.

#### 4.5.3 Alanin im Herz

Eine weitere Veränderung in der vierwöchigen Fütterungsstudie mit Methionin, die bislang noch nicht diskutiert wurde, ist eine Verminderung des Alanin-Gehaltes im Herzen. In den methioninreich gefütterten Tieren wurde der mittlere Alaningehalt im Herz mit  $834 \pm 68$  nmol/g signifikant ( $p = 0,005$ ) niedriger bestimmt als in den Kontrolltieren mit  $1129 \pm 60$  nmol/g. Da Alanin keine essentielle Aminosäure ist, könnte entweder die Biosynthese von Alanin im Herzen durch Homocystein und / oder Methionin gehemmt oder der Abbau beschleunigt werden. Weder das eine noch das andere Phänomen wurde bisher in der Literatur beschrieben. Es gibt im Gegenteil dazu eine Studie (Wejksza et al., 2005), die eine potentielle Hemmung des Alaninabbaus durch Homocystein über eine Inhibierung der Kyruruninase nahelegt.

## 5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine methioninreiche Ernährung bei Ratten nicht zu vielen der in der Literatur beschriebenen Symptome führt. Eine Erhöhung des Plasmaspiegels an Homocystein liefert kein einheitliches klinisches Bild, sondern die Ergebnisse variieren in Abhängigkeit vom gewählten Modell stark. Obwohl alimentäres Methionin im Dünndarm teilweise in Homocystein umgewandelt werden kann, gibt es doch deutliche Unterschiede der Pathophysiologie methioninreich- und homocystinreich gefütterter Ratten. Des Weiteren zeigte sich, dass aufgrund der sehr geringen Gehalte von Homocystein in Lebensmitteln verglichen zum Methioningehalt eine Hyperhomocysteinämie, welche durch methioninreiche Fütterung induziert wurde, eher einer Hyperhomocysteinämie durch übermäßige Proteinaufnahme entspricht als einer, die durch Homocystinfütterung induziert wurde.

Aus dieser Arbeit ergaben sich weitere interessante Aspekte. Aus den Ergebnissen der Versuche mit Darmbakterien (vgl. 4.4.2) leitet sich eine mögliche Erklärung für die (verglichen mit anderen Lebensmitteln mit höherem Methioningehalt) hohen Homocysteingehalte in Weißbrot, Schwarzbier und Käse ab: Diese drei Lebensmittel wurden während ihrer Prozesierung fermentiert. Eventuell wurde das in diesen Lebensmitteln bestimmte Homocystein während der Fermentierung gebildet. Dies würde eine ganz neue Perspektive für Homocystein aufzeigen, nämlich als Qualitätsparameter für Fermentierungsprozesse oder als Indikator für mikrobielle Belastung von Lebensmitteln. Zur Etablierung von Homocystein als Qualitätsparameter für Fermentierungsprozesse müsste zunächst Homocystein in Lebensmittel in unterschiedlichen Prozessierungsstufen untersucht werden, wobei sich ein Zusammenhang zwischen der Qualität des Lebensmittels und dem Homocysteingehalt zeigen müsste. Zur Etablierung von Homocystein als Indikator für mikrobielle Verunreinigungen müsste zunächst geklärt werden, ob alle Mikroorganismen Homocystein produzieren können oder nur pathogene Spezies. Des Weiteren müssten die genauen Kulturbedingungen (aerob oder anaerob) spezifiziert werden, unter denen diese Mikroorganismen Homocystein freisetzen.

Im Bezug auf den Zusammenhang von methioninreicher Ernährung und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sollte dem Phänomen der verminderten Alaninkonzentration bei methioninreicher Diät (vgl. 4.5.3) nachgegangen werden, da Alanin mit 20 % die häufigste Aminosäuren im Herz ist. Um diesen Effekt isoliert betrachten zu können, müssen Enzyme

bezüglich ihrer Homocystein und Methioninsensitivität untersucht werden, die im Herzen von Ratten exprimiert werden und hauptsächlich Alanin synthetisieren bzw. abbauen. Hierzu müssten zunächst die entsprechenden Enzyme im Rattenherz nachgewiesen werden. In-Vitro-Versuche mit isolierten Enzymen und an Zellkulturmodellen könnten Aufschluss darüber geben, welches dieser Enzyme durch Homocystein bzw. Methionin oder durch Transmethylierungsprozessen moduliert werden kann.

Die Erhöhung der verzweigtkettigen Aminosäuren im Plasma unter methioninreicher Diät (vgl. 4.5.2) könnte auf eine Beteiligung von methioninreicher Ernährung an der Entstehung des Metabolischen Syndroms hinweisen. Wie eine bislang unpublizierte Studie von Prof. Dr. C. Newgard an übergewichtigen Probanden, die mit verschiedensten Methoden ihr Gewicht reduzierten, zeigte, vermindert sich während einer Gewichtsreduktion unter anderem die (zuvor erhöhte) Konzentration an Leucin, Isoleucin und Valin im Plasma. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang ungeklärt, ebenso wie die Mechanismen, die zur Erhöhung dieser Aminosäuren bei Übergewicht beitragen.

Der Zusammenhang von Hyperhomocysteinämie und Osteoporose wurde in dieser Arbeit nur kurz diskutiert (vgl. 4.5.1). Die im Knochen gefundene extreme Erhöhung des Homocystein-Gehaltes bei unverändertem SAH-Gehalt sollte eingehender untersucht werden. Falls dieses Phänomen dadurch begründet ist, dass sich lediglich das Proteingebundene, nicht aber das freie Homocystein erhöht, sollte das Bindungsprotein identifiziert werden. Dies wäre beispielsweise durch Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Homocystein mit anschließender Proteinisolierung möglich. Anschließend wären die funktionellen Veränderungen interessant, die sich aus dieser Modifikation ergeben, da dies Aufschluss über die bislang nicht eindeutig geklärte Rolle von Homocystein bei der Pathogenese der Osteoporose geben würde. Funktionelle Veränderungen im Knochen der hier vorgestellten Tiere werden von Dr. M. Herrmann (Universitätskliniken der Saar, Homburg/Saar) untersucht.



## 6 Zusammenfassung

Eine erhöhte Konzentration von Homocystein im Plasma (Hyperhomocysteinämie) gilt als unabhängiger Risikoindikator für diverse neuronale und kardiovaskuläre Erkrankungen. Methionin ist eine essentielle Aminosäure, wird aber bei Fehlernährung oftmals übermäßig verzehrt. Daher ist es wichtig zu wissen, ob tatsächlich durch langfristigen erhöhten Methioninverzehr via Erhöhung des Homocysteinspiegels im Plasma ein reales Gesundheitsrisiko besteht. Die Grundhypothese der vorliegenden Arbeit war, dass methioninreiche Ernährung längerfristig zu Hyperhomocysteinämie führt. Diese sollte symptomatisch der klinisch beobachteten Hyperhomocysteinämie entsprechen und die beobachteten Symptome mit den in anderen Modellen (Homocyt(e)ingabe bzw. Vitaminmangel-Modelle) gefundenen übereinstimmen. Die häufigsten in der Literatur beschriebenen Forschungsmodelle für Hyperhomocysteinämie sind Zellkulturmodelle oder Fütterungsstudien an Ratten.

Es zeigte sich, dass sich weder primäre Zellkulturen (HUVEC) noch eine Zelllinie (HepG2) als experimentelles Modell eigneten, da die Effekte von Homocystein auf den Adenosinstoffwechsel der Zellkulturversuche denen von in vivo-Experimenten widersprachen.

Als Modell wurde daher eine Fütterungsstudie an Ratten gewählt, deren Bedingungen bezüglich Fütterungsdauer und Methioningehalt der Diät (0,4 % Methionin für 4 Wochen) an eine mögliche Fehlernährung des Menschen angepasst waren. Ratten, die im gleichen Zeitraum eine "normale" Diät mit einem 3-4-fach niedrigeren Methioningehalt bekamen, hatten im Mittel eine Plasmahomocystein-Konzentration von  $1,17 \pm 0,51 \mu\text{mol/l}$ . Bei den methioninreich gefütterten Tieren war die Konzentration im Plasma mit  $2,35 \pm 0,72 \mu\text{mol/l}$  ca. 2-fach höher.

Die mit Hyperhomocysteinämie assoziierten Krankheitsbilder werden durch eine Erhöhung der intrazellulären Homocystein-Konzentration oder Veränderungen im Transmethylierungsstoffwechsel erklärt. Es wurden in Milz (Methionin und Homocystein) und Leber (SAH) signifikante Veränderungen in den Gewebkonzentrationen von Metaboliten des Methionins gefunden. Der Methioninstoffwechsel dieser Organe wird also bereits bei der im Rahmen dieser Studie gewählten moderaten Erhöhung der Methioninzufuhr beeinflusst. In der Niere wurden keine signifikanten metabolischen Veränderungen durch die Diät beobachtet, obwohl der Homocysteingehalt in der Niere durch den Homocystein-Plasmaspiegel beeinflusst zu sein scheint.

Neben der Auswirkung der Diät auf den Homocystein-Plasmaspiegel wurde geprüft, welche der in der Literatur dargestellten potentiellen Pathomechanismen für Hyperhomocysteinämie-induzierte Schäden Anwendung in diesem Modell finden. Im Gehirn der methioninreich gefütterten Ratten fanden sich ausser einer signifikanten Erhöhung der Aminosäure Threonin (ein Serin-Präcursor) keine signifikanten Veränderungen der Metabolitenkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe. Dennoch weisen eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Histidin darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen alimentärem Methionin und neuronalen Erkrankungen geben könnte.

Obwohl der Transmethylierungsstoffwechsel in Leber und Milz von Ratten durch die methioninreiche Fütterung beeinflusst wurde und die Konzentration diverser Aminosäuren inclusive Homocystein im Plasma verändert war, wurde keine Beeinträchtigung der Gefäßfunktion gefunden. Auch die Plasmakonzentration von ADMA, einem weiteren Risikoindikator für Herz-Kreislauf-Erkrankungen blieb unverändert, obwohl dieser Parameter bei Hyperhomocysteinämie oftmals erhöht ist. Eine Konzentrationsverdoppelung von Homocystein durch erhöhte alimentäre Methioninzufuhr ohne gleichzeitige Erhöhung von ADMA scheint also keine Verschlechterung der Gefäßfunktion bei Ratten zu bewirken. In diesem Punkt kann man von allgemein bei Hyperhomocysteinämie gefundenen Resultaten keine Rückschlüsse auf die durch alimentäres Methionin verursachte Hyperhomocysteinämie ziehen.

Um die Ursachen für die Unterschiede zwischen den in der Literatur beschriebenen Effekten einer Hyperhomocysteinämie und den in der zuvor beschriebenen Studie gefundenen Resultaten herauszufinden, wurden unterschiedliche Fütterungsmodelle zur Induktion einer Hyperhomocysteinämie an Ratten verglichen. Da eine Hyperhomocysteinämie experimentell auch oftmals durch Homocyst(e)in- oder Vitaminmangel-Fütterung induziert wird, wurden in weiteren Rattenstudien diese Parameter bei homocystinreicher-, bzw. Vitaminmangel-Diät untersucht und mit den bei methioninreicher Fütterung gezeigten Veränderungen verglichen. Es wurde eine dreimonatige Fütterungsstudie an weiblichen Tieren durchgeführt. Da die Fütterungsdauer, das Alter und das Geschlecht der Tiere sich von den zuvor beschriebenen Tieren der vierwöchigen Studie unterschieden, wurde eine separate Kontrollgruppe mitgeführt (Homocysteinspiegel im Plasma:  $4,60 \pm 0,48 \mu\text{mol/l}$ ). In diesen Studien zeigte sich, dass bei ähnlichen applizierten Dosen (tägliche Aufnahme ca. 1,0 bzw. 1,4 g/kg Körpergewicht) methionin- und homocystinreiche Diät bei Ratten zu vergleichbaren Plasma-

Homocysteinspiegeln führen (methioninreich:  $27,32 \pm 2,80 \mu\text{mol/l}$ ; homocystinreich:  $40,61 \pm 2,22 \mu\text{mol/l}$ ).

Als Vergleichsparameter zur Beurteilung pathophysiologischer Veränderungen diene zum einen der Gewebsgehalt an Homocystein, da durch eine Erhöhung der intrazellulären Homocysteinkonzentration Enzyme inhibiert und somit biochemische Prozesse moduliert werden können. Des weiteren wurden die intrazellulären Konzentrationen von S-Adenosyl-Methionin (SAM) und S-Adenosyl-Homocystein (SAH) betrachtet, da sich aus dem Konzentrationsverhältnis dieser beiden Methionin-Metabolite zueinander eine potentielle Beeinflussung von methioninabhängigen Transmethylierungsreaktionen ableiten lässt. Es zeigten sich besonders in Leber und Niere signifikante Unterschiede zwischen einer methioninreichen, einer homocystinreichen und einer Vitamin-Mangel-Diät bei Ratten. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass die bei vierwöchiger methioninreicher Diät gefundenen Ergebnisse nicht mit Literaturdaten übereinstimmen.

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, welches dieser Fütterungsmodelle der Hyperhomocysteinämie des Menschen am ehesten entspricht. Da zwar die Gehalte von Methionin, nicht aber die von Homocystein, in fast allen Lebensmitteln bekannt sind, wurde untersucht, ob und in welchen Konzentrationen Homocystein in Lebensmitteln enthalten ist. In Schwarzbier ( $0,03 \text{ mg/l}$ ), Weißbrot ( $0,95 \text{ mg/kg}$ ), Roquefort-Käse ( $0,50 \text{ mg/kg}$ ), Thunfisch ( $0,25 \text{ mg/kg}$ ) und Schweineleber ( $0,31 \text{ mg/kg}$ ) konnte Homocystein bestimmt werden. Durch Quantifizierung von Homocystein in fünf ausgewählten Lebensmitteln wurde abgeschätzt, ob alimentäres Homocystein einen Einfluss auf den Plasma-Homocysteinspiegel haben könnte. Da die Homocysteinkonzentrationen in diesen Beispiellebensmitteln mindestens um den Faktor  $10^5$  geringer waren als die Methioninkonzentrationen ist ein Einfluss von alimentärem Homocystein auf den Plasmaspiegel sehr unwahrscheinlich.

Es wurde weiterhin geprüft, ob durch Darmbakterien ein Teil des alimentär aufgenommenen Methionins bereits im Dünndarm in Homocyt(e)in umgewandelt werden könnte. Dabei wurde eine vermehrte Homocysteinproduktion nach Methionin-Zugabe zu Dünndarmisolaten gefunden. Allerdings können keine Aussagen darüber gemacht werden, welche Bakterienspezies das Homocystein produzierte. Quantitativ kommt dieser Homocysteinquelle eine untergeordnete Bedeutung zu.

## 7 Literatur

1. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B.B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*; **282**: 615-616.
2. Ahmed, A., Dearn, S., Shams, M., Li, X.F., Sangha, R.K., Rola-Pleszczynski, M., and Jiang, J. (1998) Localization, quantification, and activation of platelet-activating factor receptor in human endometrium during the menstrual cycle: PAF stimulates NO, VEGF, and FAKpp125. *FASEB J.*; **12**: 831-843.
3. Allen, R.H., Stabler, S.P., and Lindenbaum, J. (1998) Relevance of vitamins, homocysteine and other metabolites in neuropsychiatric disorders. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S122-S126.
4. Andersson, A., Isaksson, A., and Hultberg, B. (1992) Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin. Chem.*; **38**: 1311-1315.
5. Atkinson, D.E. and Walton, G.M. (1967) Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.*; **242**: 3239-3241.
6. Belitz, H.-D., Grosch, W., und Schieberle, P. (1-1-2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 5. Auflage
7. Bellamy, M.F., McDowell, I.F., Ramsey, M.W., Brownlee, M., Bones, C., Newcombe, R.G., and Lewis, M.J. (1998) Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation*; **98**: 1848-1852.
8. Benevenga, N.J. (1974) Toxicities of methionine and other amino acids. *J. Agric. Food Chem.*; **22**: 2-9.
9. Benevenga, N.J. and Harper, A.E. (1967) Alleviation of methionine and homocystine toxicity in the rat. *J. Nutr.* ; **93**: 44-52.

10. Benevenga, N.J. and Harper, A.E. (1970) Effect of glycine and serine on methionine metabolism in rats fed diets high in methionine. *J. Nutr.*; **100**: 1205-1214.
11. Blom, H.J. (1998) Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S131-S134.
12. Blom, H.J. (2001) Diseases and drugs associated with hyperhomocysteinemia Carmel, R. und Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge
13. Boers, G. (1998) Moderate hyperhomocysteinaemia and vascular disease: evidence, relevance and the effect of treatment. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S127-S130.
14. Borst, M.M., Deussen, A., and Schrader, J. (1992) S-adenosylhomocysteine hydrolase activity in human myocardium. *Cardiovasc. Res.*; **26**: 143-147.
15. Böger, R.H., Lentz, S.R., Bode-Böger, S.M., Knapp, H.R., and Haynes, W.G. (2001) Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin. Sci. (Lond)*; **100**: 161-167.
16. Böger, R.H., Sydow, K., Borlak, J., Thum, T., Lenzen, H., Schubert, B., Tsikas, D., and Bode-Böger, S.M. (2000) LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res.*; **87**: 99-105.
17. Butz, L.W. und duVigneaud, V. (1932) The formation of a homologue of cysteine by decomposition of methionine with sulfuric acid. *J. Biol. Chem.*; **99**: 135-142.
18. Buus N.H., VanBavel E. und Mulvany M.J. (1994) Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations. *Br. J. Pharmacol.* **112**:579-587.
19. Caro, A.A. and Cederbaum, A.I. (2004) Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine in Fe(2+)-initiated oxidations. *Free Radic. Biol. Med.*; **36**: 1303-1316.

20. Carson, N.A., Cusworth, D.C., Dent, C.E., Field, C.M., Neill, D.W., and Westall, R.G. (1963) Homocysteinuria: A new inborn error of metabolism associated with mental deficiency. *Arch. Dis. Child*; **38**: 425-436.
21. Caudill, M.A., Wang, J.C., Melnyk, S., Pogribny, I.P., Jernigan, S., Collins, M.D., Santos-Guzman, J., Swendseid, M.E., Cogger, E.A., and James, S.J. (2001) Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J. Nutr.*; **131**: 2811-2818.
22. Cavalca, V., Cighetti, G., Bamonti, F., Loaldi, A., Bortone, L., Novembrino, C., De Franceschi, M., Belardinelli, R., and Guazzi, M.D. (2001) Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin. Chem.*; **47**: 887-892.
23. Chambers, J.C., Ueland, P.M., Wright, M., Dore, C.J., Refsum, H., and Kooner, J.S. (2001) Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. *Circ. Res.*; **89**: 187-192.
24. Chen, Y.F., Li, P.L., and Zou, A.P. (2002) Effect of hyperhomocysteinemia on plasma or tissue adenosine levels and renal function. *Circulation*; **106**: 1275-1281.
25. Clarke, S. und Banfield, K. (2001) S-Adenosylmethioine-dependent Methyltransferases. in: Carmel, R. und Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge,
26. Clauß, G., Finze, F.-R. und Partsch, L. (1995) Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner. 2. Auflage
27. Dayal, S., Arning, E., Bottiglieri, T., Boger, R.H., Sigmund, C.D., Faraci, F.M., and Lentz, S.R. (2004) Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke*; **35**: 1957-1962.
28. De Bree, A., Verschuren, W.M., Kromhout, D., Kluijtmans, L.A., and Blom, H.J. (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol. Rev.*; **54**: 599-618.

29. Demirkol, O., Adams, C., and Ercal, N. (2004) Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*; **52**: 8151-8154.
30. Detich, N., Hamm, S., Just, G., Knox, J.D., and Szyf, M. (2003) The methyl donor S-Adenosylmethionine inhibits active demethylation of DNA: a candidate novel mechanism for the pharmacological effects of S-Adenosylmethionine. *J. Biol. Chem.*; **278** : 20812-20820.
31. Deussen, A., Lloyd, H.G., and Schrader, J. (1989) Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation. *J. Mol. Cell Cardiol.*; **21**: 773-782.
32. Deussen, A., Pexa, A., Loncar, R., and Stehr, S.N. (2005) Effects of homocysteine on vascular and tissue adenosine: a stake in homocysteine pathogenicity? *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1007-1010.
33. Deussen, A., Stappert, M., Schafer, S., and Kelm, M. (1999) Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation*; **99**: 2041-2047.
34. Dieckmann-Schuppert, A. and Schnittler, H.J. (1997) A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res.*; **288**: 119-126.
35. Dimitrova, K.R., DeGroot, K.W., Pacquing, A.M., Suyderhoud, J.P., Pirovic, E.A., Munro, T.J., Wieneke, J.A., Myers, A.K., and Kim, Y.D. (2002) Estradiol prevents homocysteine-induced endothelial injury in male rats. *Cardiovasc. Res.*; **53**: 589-596.
36. Doshi, S., McDowell, I., Goodfellow, J., Stabler, S., Boger, R., Allen, R., Newcombe, R., Lewis, M., and Moat, S. (2005) Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. *Metabolism*; **54**: 351-360.
37. Drexler, H. und Landmesser, U. (2003) Endothelfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen. UNI-MED Verlag AG, Bremen; London; Boston, 2. Auflage

38. Drouva, S.V., LaPlante, E., Leblanc, P., Bechet, J.J., Clauser, H., and Kordon, C. (1986) Estradiol activates methylating enzyme(s) involved in the conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in rat pituitary membranes. *Endocrinology*; **119**: 2611-2622.
39. Dunlop, J., Grieve, A., Damgaard, I., Schousboe, A., and Griffiths, R. (1992) Sulphur-containing excitatory amino acid-evoked Ca(2+)-independent release of D-[3H]aspartate from cultured cerebellar granule cells: the role of glutamate receptor activation coupled to reversal of the acidic amino acid plasma membrane carrier. *Neuroscience*; **50**: 107-115.
40. Dwyer, B.E., Raina, A.K., Perry, G., and Smith, M.A. (2004) Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk? *Free Radic. Biol. Med.*; **36**: 1471-1475.
41. Eisenhofer, G., Tian, H., Holmes, C., Matsunaga, J., Roffler-Tarlov, S., and Hearing, V.J. (2003) Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. *FASEB J.*; **17**: 1248-1255.
42. El Khairy, L., Vollset, S.E., Refsum, H., and Ueland, P.M. (2003) Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.*; **77**: 467-472.
43. Elvehjem, C.A. and Harper, A.E. (1955) Importance of amino acid balance in nutrition. *J. Am. Med. Assoc.*; **158**: 655-656
44. Ericson, L.E. and Harper, A.E. (1956) Effect of diet on the betaine-homocysteine transmethylase activity of rat liver. I. Amino acids and protein. *J. Biol. Chem.*; **219**: 49-58.
45. Finkelstein, J.D. (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S40-S44.
46. Fischer, K. (2006) Homocystein in Lebensmitteln. *Diplomarbeit, TU Dresden*
47. Flott-Rahmel, B., Schurmann, M., Schluff, P., Fingerhut, R., Musshoff, U., Fowler, B., and Ullrich, K. (1998) Homocysteic and homocysteine sulphinic acid exhibit



- excitotoxicity in organotypic cultures from rat brain. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S112-S117.
48. Folbergrova, J., Druga, R., Otahal, J., Haugvicova, R., Mares, P., and Kubova, H. (2005) Seizures induced in immature rats by homocysteic acid and the associated brain damage are prevented by group II metabotropic glutamate receptor agonist (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate. *Exp. Neurol.*; **192**: 420-436.
49. Fonseca, V., Guba, S.C., and Fink, L.M. (1999) Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr. Rev.*; **20**: 738-759.
50. Fowler, B. (1998) Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S60-S66.
51. Frimpter, G.W. and Greenberg, A.J. (1967) Renal clearance of cystathionine in homozygous and heterozygous cystathioninuria, cystinuria, and the normal state. *J. Clin. Invest.*; **46**: 975-982.
52. Fux, R., Kloor, D., Hermes, M., Rock, T., Proksch, B., Grenz, A., Delabar, U., Bucheler, R., Igel, S., Morike, K., Gleiter, C.H., and Osswald, H. (2005) Artikel nicht da! Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation potential of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy male volunteers. *Am. J. Physiol Renal Physiol*; **289**: F786-F792.
53. Garrow, T.A. (2001) Betaine-Dependent Remethylation. in: Carmel, R. und Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge
54. Griffiths, H.R., Aldred, S., Dale, C., Nakano, E., Kitas, G.D., Grant, M.G., Nugent, D., Taiwo, F.A., Li, L., and Powers, H.J. (2006) Homocysteine from endothelial cells promotes LDL nitration and scavenger receptor uptake. *Free Radic. Biol. Med.*; **40**: 488-500.
55. Gupta, A. and Robinson, K. (1997) Hyperhomocysteinaemia and end stage renal disease. *J. Nephrol.*; **10**: 77-84.

56. Guttormsen, A.B., Solheim, E., and Refsum, H. (2004) Variation in plasma cystathionine and its relation to changes in plasma concentrations of homocysteine and methionine in healthy subjects during a 24-h observation period. *Am. J. Clin. Nutr.*; **79**: 76-79.
57. Haink, G. and Deussen, A. (2003) Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*; **784**: 189-193.
58. Harper, A.E., Benton, D.A., Winje, M.E., and Elvehjem, C.A. (1954) Antilipotropic effect of methionine in rats fed threonine-deficient diets containing choline. *J. Biol. Chem.*; **209**: 159-163.
59. Heinecke, J.W., Rosen, H., Suzuki, L.A., and Chait, A. (1987) The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*; **262**: 10098-10103.
60. Hermes, M., von Hippel, S., Osswald, H., and Kloor, D. (2005) S-adenosylhomocysteine metabolism in different cell lines: effect of hypoxia and cell density. *Cell Physiol Biochem.*; **15**: 233-244.
61. Herrmann, M., Kraenzlin, M., Pape, G., Sand-Hill, M., and Herrmann, W. (2005a) Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and post-menopausal women. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1118-1123.
62. Herrmann, M., Widmann, T., and Herrmann, W. (2005b) Homocysteine--a newly recognised risk factor for osteoporosis. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1111-1117.
63. Herrmann, W. and Obeid, R. (2005c) Hyperhomocysteinemia and response of methionine cycle intermediates to vitamin treatment in renal patients. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1039-1047.
64. Heydrick, S.J., Weiss, N., Thomas, S.R., Cap, A.P., Pimentel, D.R., Loscalzo, J., and Keaney, J.F., Jr. (2004) L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*; **36**: 632-640.

65. Hohman, R.J., Guitton, M.C., and Veron, M. (1985) Inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase by cAMP results from dissociation of enzyme-bound NAD<sup>+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **82**: 4578-4581.
66. Hong, S.Y., Yang, D.H., and Chang, S.K. (1998) The relationship between plasma homocysteine and amino acid concentrations in patients with end-stage renal disease. *J. Ren Nutr.*; **8**: 34-39.
67. Hoogeveen, E.K., Kostense, P.J., Jakobs, C., Bouter, L.M., Heine, R.J., and Stehouwer, C.D. (1997) Does metformin increase the serum total homocysteine level in non-insulin-dependent diabetes mellitus? *J. Intern. Med.*; **242**: 389-394.
68. Imai, K., Toyo'oka, T., and Watanabe, Y. (1983) A novel fluorogenic reagent for thiols: ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate. *Anal. Biochem.*; **128**: 471-473.
69. Ingec, M., Borekci, B., and Kadanali, S. (2005) Elevated plasma homocysteine concentrations in severe preeclampsia and eclampsia. *Tohoku J. Exp. Med.*; **206**: 225-231.
70. Ingrosso, D., Cimmino, A., Perna, A.F., Masella, L., De Santo, N.G., De Bonis, M.L., Vacca, M., D'Esposito, M., D'Urso, M., Galletti, P., and Zappia, V. (2003) Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet*; **361**: 1693-1699.
71. Ingrosso, D., D'angelo, S., di Carlo, E., Perna, A.F., Zappia, V., and Galletti, P. (2000) Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur. J. Biochem.*; **267**: 4397-4405.
72. Ito, A., Tsao, P.S., Adimoolam, S., Kimoto, M., Ogawa, T., and Cooke, J.P. (1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*; **99**: 3092-3095.
73. Jacobsen, D.W. (2000) Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **20**: 1182-1184.

74. Jacobsen, J.S., Reinhart, P., and Pangalos, M.N. (2005) Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx*; **2**: 612-626.
75. Jakubowski, H., Zhang, L., Bardeguet, A., and Aviv, A. (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ. Res.* ; **87**: 45-51.
76. James, S.J., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I.P., and Caudill, M.A. (2002) Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J. Nutr.*; **132**: 2361S-2366S.
77. Jung, R., Persönliche Mitteilung
78. Kerins, D.M., Koury, M.J., Capdevila, A., Rana, S., and Wagner, C. (2001) Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.*; **74**: 723-729.
79. Kinsell L.W. and Harper, H.A. (1949) Studies in methionine metabolism; fasting plasma methionine levels in normal and hepatopathic individuals in response to daily methionine ingestion. *J. Clin. Invest*; **28**: 1439-1450.
80. Klee, C.B. (1974) Stereospecific irreversible inhibition of histidine ammonia-lyase by L-cysteine. *Biochemistry*; **13**: 4501-4507.
81. Kloor, D., Stumvoll, W., Schmid, H., Kompf, J., Mack, A., and Osswald, H. (2000) Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.*; **48**: 211-218.
82. Knipp, M., Charnock, J.M., Garner, C.D., and Vasak, M. (2001) Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. *J. Biol. Chem.*; **276**: 40449-40456.
83. Knowles, R.G. and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*; **298 ( Pt 2)**: 249-258.

84. Koch, H.G., Goebeler, M., Marquardt, T., Roth, J., and Harms, E. (1998) The redox status of aminothiols as a clue to homocysteine-induced vascular damage? *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S102-S106.
85. Kraus, J.P. (1998) Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S50-S53.
86. Krüger, W.D. (2001) The Transsulfuration Pathway. in: Carmel, R. and Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge
87. Kubova, H., Folbergrova, J., and Mares, P. (1995) Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. *Epilepsia*; **36**: 750-756.
88. Kumta, U.S., Harper, A.E., and Elvehjem, C.A. (1958) Amino acid imbalance and nitrogen retention in adult rats. *J. Biol. Chem.*; **233**: 1505-1508.
89. Lamberti, P., Zoccolella, S., Iliceto, G., Armenise, E., Fraddosio, A., de Mari, M., and Livrea, P. (2005) Effects of levodopa and COMT inhibitors on plasma homocysteine in Parkinson's disease patients. *Mov Disord.*; **20**: 69-72.
90. Lavie, L. and Lavie, P. (2004) Daily rhythms in plasma levels of homocysteine. *J. Circadian. Rhythms*; **2**: 5-11
91. Lee, E.S., Chen, H., Soliman, K.F., and Charlton, C.G. (2005) Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents. *Neurotoxicology*; **26**: 361-371.
92. Liener, I.E., Deuel, H.J., Jr., and Fevold, H.L. (1949) The effect of supplemental methionine on the nutritive value of diets containing concentrates of the soybean trypsin inhibitor. *J. Nutr.*; **39**: 325-339.
93. Lippert, H. (2000) Lehrbuch Anatomie. Urban & Fischer Verlag, München Jena, 5. Auflage
94. Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Rayudu, P.V., Arnelle, D.R., and Stamler, J.S. (1997) Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; **94**: 5923-5928.

95. Loehrer, F.M., Angst, C.P., Brunner, F.P., Haefeli, W.E., and Fowler, B. (1998) Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol. Dial. Transplant.*; **13**: 656-661.
96. Loehrer, F.M., Tschopl, M., Angst, C.P., Litynski, P., Jager, K., Fowler, B., and Haefeli, W.E. (2001) Disturbed ratio of erythrocyte and plasma S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*; **154**: 147-154.
97. Loncar, R., Persönliche Mitteilung
98. Loncar, R., Flesche, C.W., and Deussen, A. (1997) Determinants of the S-adenosylhomocysteine (SAH) technique for the local assessment of cardiac free cytosolic adenosine. *J. Mol. Cell Cardiol.*; **29**: 1289-1305.
99. Loncar, R., Hrboka, V., Tabakovic-Loncar, V., Ostojic, Z., and Deussen, A. (2001) Screening of plasma homocysteine in peripheral arterial disease. *Ann. Med.*; **33**: 48-54.
100. MacAllister, R.J., Parry, H., Kimoto, M., Ogawa, T., Russell, R.J., Hodson, H., Whitley, G.S., and Vallance, P. (1996) Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br. J. Pharmacol.*; **119**: 1533-1540.
101. Mahfouz, M.M. and Kummerow, F.A. (2004) Vitamin C or Vitamin B6 supplementation prevent the oxidative stress and decrease of prostacyclin generation in homocysteinemic rats. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; **36**: 1919-1932.
102. Mares, P., Folbergrova, J., and Kubova, H. (2004) Excitatory aminoacids and epileptic seizures in immature brain. *Physiol Res.*; **53 Suppl 1**: S115-S124.
103. Matthews, R.G., Sheppard, C., and Goulding, C. (1998) Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S54-S59.
104. Mattson, M.P. (2003) Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann. Intern. Med.* ; **139**: 441-444.

105. McCully, K.S. (2005) Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin. Chem. Lab Med.* ; **43**: 980-986.
106. Moller, M.T., Samari, H.R., Fengsrud, M., Stromhaug, P.E., Stovold, A.C., and Seglen, P.O. (2003) Okadaic acid-induced, naringin-sensitive phosphorylation of glycine N-methyltransferase in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.*; **373**: 505-513.
107. Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., and Laster, L. (1964) Homocysteinuria: An enzymatic defect. *Science*; **143**: 1443-1445.
108. Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Refsum, H., Ueland, P.M., Malinow, M.R., Lentz, S.R., Jacobsen, D.W., Brattstrom, L., Wilcken, B., Wilcken, D.E., Blom, H.J., Stabler, S.P., Allen, R.H., Selhub, J., and Rosenberg, I.H. (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **20**: 1704-1706.
109. Müller J H (1922) A new sulfur containing Amino acid isolated from Casein. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*; **19**: 161-163.
110. Nair, A.P., Nemirovsky, D., Kim, M., Geer, E.B., Farkouh, M.E., Winston, J., Halperin, J.L., and Robbins, M.J. (2005) Elevated homocysteine levels in patients with end-stage renal disease. *Mt. Sinai J. Med.*; **72**: 365-373.
111. Nakano, E., Taiwo, F.A., Nugent, D., Griffiths, H.R., Aldred, S., Paisi, M., Kwok, M., Bhatt, P., Hill, M.H., Moat, S., and Powers, H.J. (2005) Downstream effects on human low density lipoprotein of homocysteine exported from endothelial cells in an in vitro system. *J. Lipid Res.*; **46**: 484-493.
112. Nappo, F., De Rosa, N., Marfella, R., De Lucia, D., Ingrosso, D., Perna, A.F., Farzati, B., and Giugliano, D. (1999) Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*; **281**: 2113-2118.
113. Neale, G., Gompertz, D., Schonsby, H., Tabaqchali, S., and Booth, C.C. (1972) The metabolic and nutritional consequences of bacterial overgrowth in the small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*; **25**: 1409-1417.

114. Newey, H. and Smyth, D.H. (1964) The Transfer System for Neutral Amino Acids in the Rat Small Intestine. *J. Physiol.*; **170**: 328-343.
115. Ogawa, H., Gomi, T., and Fujioka, M. (2000) Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; **32**: 289-301.
116. Olteanu, H. und Banerjee, R. (2001) Cobalamain-Dependent Remethylation. in: Carmel, R. und Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge
117. Pajares, M.A., Corrales, F., Duran, C., Mato, J.M., and Alvarez, L. (1992) How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated? *FEBS Lett.*; **309**: 1-4.
118. Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., and Zorzano, A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.*; **78**: 969-1054.
119. Perna, A.F., Capasso, R., Lombardi, C., Acanfora, F., Satta, E., and Ingrosso, D. (2005) Hyperhomocysteinemia and macromolecule modifications in uremic patients. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1032-1038.
120. Pexa, A. and Deussen, A. (2005) Modulation of ecto-5'-nucleotidase by phospholipids in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*; **372**: 131-138.
121. Pexa, A., Böger, R.H., Henle, T., Schwedhelm, E. and Deussen, A. (2006a) Moderate hyperhomocysteinemia induced by methionine enriched diet does not alter vessel function in rats. *Eingereicht bei Nutrition Metabol. Cardiovasc.*
122. Pexa, A., Fischer, K., Deussen, A. and Henle, T. (2006b) Homocysteine in food. *Eingereicht bei Eur Food Res Technol.*
123. Pexa, A., Herrmann, M., Taban, O., Henle, T., and Deussen, A (2006c) Comparison of experimental Models for Hyperhomocysteinemia. *In Vorbereitung*
124. Pietrzik, K. and Bronstrup, A. (1998) Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S135-S138.



125. Pochmann, D., Bohmer, A.E., Nejar, B.A., and Sarkis, J.J. (2005) Ecto-hydrolysis of adenine nucleotides in rat blood platelets are altered by ovariectomy. *Platelets.*; **16**: 334-339.
126. Porter, D.J. (1993) S-adenosylhomocysteine hydrolase. Stereochemistry and kinetics of hydrogen transfer. *J. Biol. Chem.*; **268**: 66-73.
127. Quadri, P., Fragiaco, C., Pezzati, R., Zanda, E., Tettamanti, M., and Lucca, U. (2005) Homocysteine and B vitamins in mild cognitive impairment and dementia. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1096-1100.
128. Refsum, H., Smith, A.D., Ueland, P.M., Nexø, E., Clarke, R., McPartlin, J., Johnston, C., Engbaek, F., Schneede, J., McPartlin, C., and Scott, J.M. (2004) Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin. Chem.*; **50**: 3-32.
129. Refsum, H. and Ueland, P.M. (1990) Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.*; **11**: 411-416.
130. Reish, O., Townsend, D., Berry, S.A., Tsai, M.Y., and King, R.A. (1995) Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*; **57**: 127-132.
131. Riksen, N.P., Rongen, G.A., Blom, H.J., Boers, G.H., and Smits, P. (2005a) Reduced adenosine receptor stimulation as a pathogenic factor in hyperhomocysteinemia. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1001-1006.
132. Riksen, N.P., Rongen, G.A., Blom, H.J., Russel, F.G., Boers, G.H., and Smits, P. (2003) Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia. *Cardiovasc. Res.*; **59**: 271-276.
133. Riksen, N.P., Rongen, G.A., Boers, G.H., Blom, H.J., van den Broek, P.H., and Smits, P. (2005b) Enhanced cellular adenosine uptake limits adenosine receptor stimulation in patients with hyperhomocysteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **25**: 109-114.

134. Robbins, M.A., Elias, M.F., Budge, M.M., Brennan, S.L., and Elias, P.K. (2005) Homocysteine, type 2 diabetes mellitus, and cognitive performance: The Maine-Syracuse Study. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1101-1106.
135. Rother, D., Poppe, L., Viergutz, S., Langer, B., and Retey, J. (2001) Characterization of the active site of histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.*; **268**: 6011-6019.
136. Rowling, M.J., McMullen, M.H., Chipman, D.C., and Schalinske, K.L. (2002) Hepatic glycine N-methyltransferase is up-regulated by excess dietary methionine in rats. *J. Nutr.*; **132**: 2545-2550.
137. Schedl, H.P., Pierce, C.E., Rider, A., and Clifton, J.A. (1968) Absorption of L-methionine from the human small intestine. *J. Clin. Invest.*; **47**: 417-425.
138. Schmidt, R., Thews, G., Lang, F. (2000) *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag; Berlin Heidelberg New York; 28. Auflage
139. Schneede, J., Refsum, H., and Ueland, P.M. (2000) Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin. Thromb. Hemost.*; **26**: 263-279.
140. Schroecksadel, K., Frick, B., Wirleitner, B., Schennach, H., and Fuchs, D. (2003) Homocysteine accumulates in supernatants of stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*; **134**: 53-56.
141. Schwedhelm, E., Tan-Andresen, J., Maas, R., Riederer, U., Schulze, F., and Boger, R.H. (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma. *Clin. Chem.*; **51**: 1268-1271.
142. Sengupta, S., Wehbe, C., Majors, A.K., Ketterer, M.E., DiBello, P.M., and Jacobsen, D.W. (2001) Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J. Biol. Chem.*; **276**: 46896-46904.
143. Siegenthaler, W. (2001) *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 8. Auflage

144. Simons, K. and Eehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*; **110**: 597-603.
145. Souci, S.W., Fachmann, W. und Kraut, H. (Hrsg) (2006) Die Zusammensetzung der Lebensmittel: Nährwert-Tabellen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 3. Auflage
146. Souto, J.C., Blanco-Vaca, F., Soria, J.M., Buil, A., Almasy, L., Ordonez-Llanos, J., Martin-Campos, J.M., Lathrop, M., Stone, W., Blangero, J., and Fontcuberta, J. (2005) A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am. J. Hum. Genet.*; **76**: 925-933.
147. Stam, F., van Guldener, C., ter Wee, P.M., Kulik, W., Smith, D.E., Jakobs, C., Stehouwer, C.D., and de Meer, K. (2004) Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine. *Am. J. Physiol Renal Physiol*; **287**: F215-F223.
148. Stehouwer, C.D. and Jakobs, C. (1998) Abnormalities of vascular function in hyperhomocysteinaemia: relationship to atherothrombotic disease. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S107-S111.
149. Stryer, L. (1996) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 4. Auflage
150. Stühlinger, M.C., Tsao, P.S., Her, J.H., Kimoto, M., Balint, R.F., and Cooke, J.P. (2001) Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*; **104**: 2569-2575.
151. Sugiyama, K., Kushima, Y., and Muramatsu, K. (1987) Effect of dietary glycine on methionine metabolism in rats fed a high-methionine diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*; **33**: 195-205.
152. Surtees, R. (1998) Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. *Eur. J. Pediatr.*; **157 Suppl 2**: S118-S121.

153. Tallova, J., Tomandl, J., Bicikova, M., and Hill, M. (1999) Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle. *Eur. J. Clin. Invest*; **29**: 1041-1044.
154. Tawakol, A., Forgione, M.A., Stuehlinger, M., Alpert, N.M., Cooke, J.P., Loscalzo, J., Fischman, A.J., Creager, M.A., and Gewirtz, H. (2002) Homocysteine impairs coronary microvascular dilator function in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.*; **40**: 1051-1058.
155. Taylor, R.G., Levy, H.L., and McInnes, R.R. (1991) Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations. *Mol. Biol. Med.*; **8**: 101-116.
156. Teunissen, C.E., van Boxtel, M.P., Jolles, J., de Vente, J., Vreeling, F., Verhey, F., Polman, C.H., Dijkstra, C.D., and Blom, H.J. (2005) Homocysteine in relation to cognitive performance in pathological and non-pathological conditions. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1089-1095.
157. Ubbink (2001) What is a desirable homocysteine level? Carmel, R. und Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge
158. Undas, A., Perla, J., Lacinski, M., Trzeciak, W., Kazmierski, R., and Jakubowski, H. (2004) Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke*; **35**: 1299-1304.
159. Upchurch, G.R., Jr., Welch, G.N., Fabian, A.J., Freedman, J.E., Johnson, J.L., Keaney, J.F., Jr., and Loscalzo, J. (1997) Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*; **272**: 17012-17017.
160. van Ede, A.E., Laan, R.F., Blom, H.J., Boers, G.H., Haagsma, C.J., Thomas, C.M., De Boo, T.M., and van de Putte, L.B. (2002) Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology. (Oxford)*; **41**: 658-665.
161. Virmani, K. and Widhalm, K. (1993) Histidinemia: a biochemical variant or a disease? *J. Am. Coll. Nutr.*; **12**: 115-124.

162. Vollset, S.E., Refsum, H., Nygard, O. und Ueland, P.M. (2001a) Lifestyle Factors Associated with Hyperhomocysteinemia. in: Carmel, R. und Jacobsen, D.W. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, Cambridge
163. Vollset, S.E., Refsum, H., Tverdal, A., Nygard, O., Nordrehaug, J.E., Tell, G.S., and Ueland, P.M. (2001b) Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.*; **74**: 130-136.
164. Weiss, N., Heydrick, S., Zhang, Y.Y., Bierl, C., Cap, A., and Loscalzo, J. (2002) Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **22**: 34-41.
165. Weiss, N., Zhang, Y.Y., Heydrick, S., Bierl, C., and Loscalzo, J. (2001) Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **98**: 12503-12508.
166. Wejksza, K., Rzeski, W., Okuno, E., Kandefer-Szerszen, M., Albrecht, J., and Turski, W.A. (2005) Demonstration of kynurenine aminotransferases I and II and characterization of kynurenic acid synthesis in oligodendrocyte cell line (OLN-93). *Neurochem. Res.*; **30**: 963-968.
167. Williams, J.N., Jr., Denton, A.E., and Elvehjem, C.A. (1949) Effect of methionine deficiency upon enzyme activity in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; **72**: 386-388.
168. Williams, R.H., Maggiore, J.A., Reynolds, R.D., and Helgason, C.M. (2001) Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other aminothiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. *Clin. Chem.*; **47**: 1031-1039.
169. Woo, C.W., Cheung, F., Chan, V.W., Siow, Y.L., and O K (2003) Homocysteine stimulates inducible nitric oxide synthase expression in macrophages: antagonizing effect of ginkgolides and bilobalide. *Mol. Cell Biochem.*; **243**: 37-47.
170. Xue, H.H., Sakaguchi, T., Fujie, M., Ogawa, H., and Ichiyama, A. (1999) Flux of the L-serine metabolism in rabbit, human, and dog livers. Substantial contributions of

- both mitochondrial and peroxisomal serine:pyruvate/alanine:glyoxylate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* ; **274**: 16028-16033.
171. Yi, P., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I.P., Hine, R.J., and James, S.J. (2000) Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J. Biol. Chem.*; **275**: 29318-29323.
172. Young, V.R., Wagner, D.A., Burini, R., and Storch, K.J. (1991) Methionine kinetics and balance at the 1985 FAO/WHO/UNU intake requirement in adult men studied with L-[2H3-methyl-1-13C]methionine as a tracer. *Am J Clin Nutr*; **54**: 377-385.
173. Zernecke, A., Bidzhekov, K., Ozuyaman, B., Fraemohs, L., Liehn, E.A., Luscher-Firzlaff, J.M., Luscher, B., Schrader, J., and Weber, C. (2006) CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation*; **113**: 2120-2127.
174. Zhang, F., Slungaard, A., Vercellotti, G.M., and Iadecola, C. (1998) Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am. J. Physiol*; **274**: R1704-R1711.
175. Zhang, X., Li, H., Jin, H., Ebin, Z., Brodsky, S., and Goligorsky, M.S. (2000) Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am. J. Physiol Renal Physiol*; **279**: F671-F678.
176. Zimmermann, H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.*; **285 ( Pt 2)**: 345-365.
177. Zoccolella, S., Lamberti, P., Iliceto, G., Diroma, C., Armenise, E., Defazio, G., Lamberti, S.V., Fraddosio, A., de Mari, M., and Livrea, P. (2005) Plasma homocysteine levels in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with cognitive dysfunctions. *Clin. Chem. Lab Med.*; **43**: 1107-1110.

## 8 Anhang

### 8.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen isometrische Kraftmessung

#### *PSS (Phosphate Saline Solution)*

119 mmol/l NaCl; 4,7 mmol/l KCl; 1,17 mmol/l MgSO<sub>4</sub>; 1,18 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>; 5,5 mmol/l Glucose und 0,027 mmol/l EDTA in entionisiertem Wasser lösen, undnach 20-minütiger Begasung mit Karbogen 2,5 mmol/l CaCl<sub>2</sub> zugeben.

#### *KPSS (Kaliumangereicherte PSS)*

119 mmol/l NaCl; 123,7 mmol/l KCl; 1,17 mmol/l MgSO<sub>4</sub>; 1,18 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>; 5,5 mmol/l Glucose und 0,027 mmol/l EDTA in entionisiertem Wasser lösen, undnach 20-minütiger Begasung mit Karbogen 2,5 mmol/l CaCl<sub>2</sub> zugeben.

### 8.1.2 Verwendete Puffer und Lösungen Western Blot

Alle Lösungen werden in entionisiertem Wasser angesetzt.

#### *Homogenisations-Puffer*

50 mmol/l TRIS und 1 mmol/l EGTA auf pH = 7,4 einstellen. 1 mmol/l Benzamidin, 1 mmol/l PMSF, 2,5 µg/ml Leupeptin, 4,0 µg/ml Aprotinin, 2,5 µg/ml Pepstatin A zur Inhibierung von Protease-Reaktionen zugeben. Vor Gebrauch auf 4 °C Kühlen.

Für zwei 1,5 mm dickes Gel werden ca. 15 ml Lösung benötigt.

Gelgiesslösung für Trenngele

	12 %	7,5 %	5 %
Wasser	4,9	7,6	8,4
Acrylamid-Lösung	6,0	3,7	2,5
TRIS (1,5M, pH = 8,8)	3,90	3,80	3,80
Natriumdodecylsulfat (10 %ig)	0,15	0,15	0,15
Ammoniumperoxid (10 %)	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,006	0,011	0,015

Die Polymerisierung wird durch die Zugabe von TEMED gestartet

*Gelgiesslösung Sammelgel SDS-PAGE*

Für zwei 1,5 mm dickes Gel werden ca. 5 ml Lösung benötigt. Hierzu werden 3,4 ml Wasser, 830 µl Acrylamid-Lösung, 630 µl TRIS (1,0 mol/l, pH = 6,8), 50 µl Natrium-Dodecylsulfat (10 %ig), 50 µl Ammoniumperoxodisulfat (10 %ig) gemischt und 5 µl TEMED zum Start der Polymerisierung zugegeben.

*Probenpuffer*

62,5 mmol/l TRIS, 5 % Glycin, 5 % SDS und eine Spatelspitze Bromphenolblau

*Laufpuffer nach Lämmli*

25 mmol/l TRIS, 190 mmol/l Glycin, 0,1 % SDS.

*Blottingpuffer SAHH*

25 mmol/l TRIS, 190 mmol/l Glycin und 10 % Methanol auf pH = 8,2 bringen.

*Blottingpuffer eNOS/iNOS*

25 mmol/l TRIS, 190 mmol/l Glycin und 20 % Methanol auf pH = 8,2 bringen.

*PBS-T*

150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 20 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mit KOH pH-Wert auf 7,2 titrieren, dann 0,05 % Tween 20 zugeben.

*TBS-T*

10 mmol/l TRIS und 100 mmol/l NaCl, mit 25%iger HCl pH-Wert auf 7,2 titrieren, dann 0,1 % Tween 20 zugeben.

### 8.1.3 Verwendete Puffer und Lösungen Zellkultur

Alle für Zellkultur verwendeten Lösungen wurden entweder bei 121°C autoklaviert oder, falls thermolabile Substanzen enthalten sind, sterilfiltriert

*PBS (Phosphate Buffered Saline)*

137,1 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 12,1mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 1,5 mol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in entionisiertem Wasser lösen. Die hergestellte Lösung wird autoklaviert.



*PBS<sup>++</sup> (Phosphate Buffered Saline + Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)*

Zunächst wird PBS aus 137,1 mmol/l NaCl; 2,7 mmol/l KCl; 8 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in entionisiertem Wasser hergestellt und autoklaviert. Wässrige Lösungen von 9 mmol/l CaCl<sub>2</sub> und 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> werden ebenfalls autoklaviert und die PBS im Verhältnis von 8 + 1 + 1 unter sterilen Bedingungen damit versetzt.

*RWF (Wachstumsfaktor aus Rinderaugen)*

Dieser Wachstumsfaktor wird aus Rinderaugen isoliert. Hierfür wird die Cornea aus dem Glaskörper herauspräpariert. Die Cornea werden in PBS<sup>++</sup> (1 Cornea pro ml) über Nacht gerührt, um lösliche Faktoren zu extrahieren. anschließend wird die Lösung zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zunächst bei 4°C und 3000 xg 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei 4°C und 15000 xg 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird nun Sterilfiltriert (0,45 und 0,2 µm) und aliquotiert bei -20°C gelagert.

*Kulturmedium M 199*

Das in lyophilisierter Form erhältliche Fertigmedium (Zusammensetzung laut Hersteller siehe Anhang) wird in entionisiertem Wasser gelöst (9,5 g/l) und mit 2,2g NaHCO<sub>3</sub>/l versetzt. Die Lösung wird sterilfiltriert und mit 10 % FCS, 1 % Rinderaugenwachstumsfaktor und 1 % Penicillin Streptomycin (100 Units) versetzt. Die hergestellte Lösung wird sterilfiltriert.

*Kulturmedium Vascular Endothelial Cell Growth Medium*

Das Fertigmedium wird flüssig und steril angeliefert. Zusätze wie Serum und Wachstumsfaktoren werden separat geliefert und vor Gebrauch zugegeben. Des Weiteren werden dem Medium vor Gebauch unter sterilen Bedingungen je 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin (je 100 Units) zugesetzt.

*Kulturmedium DMEM*

Das Fertigmedium wird flüssig und steril angeliefert. 10 % FCS, und 1 % Penicillin/Streptomycin (100 Units) werden kurz vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen zugegeben.

*Inkubationspuffer HUVEC*

140 mmol/l NaCl; 4 mmol/l KCl; 1,8 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 2,2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>; 0,48 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mmol/l Pyruvat; 5,5 mmol/l D(+)-Glucose und 10 mmol/l Hepes in

entionisiertem Wasser lösen und mit 8 mol/l NaOH auf pH = 7,4 einstellen. Die hergestellte Lösung wird autoklaviert.

#### *Inkubationspuffer HepG2*

110 mmol/l NaCl; 5,4 mmol/l KCl; 1,4 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 1,7 mmol/l MgSO<sub>4</sub>; 0,5 µmol/l FeCl<sub>3</sub>; 15 mmol/l HEPES; 25 mmol/l Glucose; 1,0 mmol/l Natriumpyruvat und 1,0 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und mit 8N NaOH auf pH = 7,4 einstellen. Die hergestellte Lösung wird autoklaviert.

### 8.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen HPLC

#### *HPLC-Fließmittel Adenin-Nukleotide I*

6 % Acetonitril; 5,7 mmol/l TBAS und 30,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mischen und mit 2 mol/l KOH auf pH = 5,8 einstellen. Lösung über Membranfilter (Type HVLP) filtrieren.

#### *HPLC-Fließmittel Adenin-Nukleotide II*

65 % Acetonitril; 5,7 mmol/l und TBAS, 30,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mischen und mit 2 mol/l KOH auf pH= 5,8 einstellen. Lösung über Membranfilter (Type FH) filtrieren.

#### *HPLC-Fließmittel SAM/SAH I*

2 % Acetonitril; 5 mmol/l Pentansulfonsäure (Natriumsalz) und 30 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mischen und mit 2 mol/l KOH auf pH = 5,8 einstellen. Lösung über Membranfilter (Type HVLP) filtrieren.

#### *HPLC-Fließmittel SAM/SAH II*

70 % Acetonitril mit entionisiertem Wasser mischen. Lösung im Ultraschallbad 15 min entgasen

#### *HPLC-Fließmittel Homocystein I*

30 mmol/l Ammoniumacetat mit 96 %iger Essigsäure auf pH = 5,0 einstellen. Lösung über Membranfilter (Type HVLP) filtrieren.

#### *HPLC-Fließmittel Homocystein II*

50 % Acetonitril und 30 mmol/l Ammoniumacetat mischen und mit 96 %iger Essigsäure auf pH = 5,0 einstellen. Lösung über Membranfilter (Type FH) filtrieren.

8.1.5 Kalibrierung der Aminosäureanalytik mittels GC-FID**Tabelle 9:** Retentionszeiten und Kalibrationsbereiche der Aminosäureanalytik

<b>Aminosäure</b>	<b>Retentionszeit</b>	<b>Kalibration von</b>	<b>Kalibration bis</b>
		<b>[nmol]</b>	<b>[nmol]</b>
<b>ALA</b>	1,304	1,0	30,0
<b>GLY</b>	1,414	1,0	50,0
<b>VAL</b>	1,617	1,0	30,0
<b>LEU</b>	1,834	1,0	30,0
<b>ILE</b>	1,894	1,0	50,0
<b>THR</b>	2,114	1,0	30,0
<b>SER</b>	2,158	1,0	30,0
<b>PRO</b>	2,239	1,0	50,0
<b>ASP</b>	2,894	1,0	30,0
<b>MET</b>	2,934	1,0	50,0
<b>OH-PRO</b>	3,078	1,0	30,0
<b>GLU</b>	3,263	1,0	30,0
<b>PHE</b>	3,306	1,0	30,0
<b>CYS</b>	3,678	2,5	75,0
<b>ORN</b>	4,326	1,0	30,0
<b>LYS</b>	4,593	1,0	30,0
<b>HIS</b>	4,794	1,0	30,0
<b>TYR</b>	5,081	1,0	30,0
<b>TRP</b>	5,327	1,0	50,0
<b>CTH</b>	5,867	1,0	50,0
<b>C-C</b>	6,102	1,0	30,0

ALA: Alanin; GLY: Glycin; VAL: Valin; LEU: Leucin; ILE: Isoleucin; THR: Threonin; SER: Serin; PRO: Prolin; ASP: Asparaginsäure; MET: Methionin; OH-PRO: Hydpxyprolin; GLU: Glutaminsäure; PHE: Phenylalanin; CYS: Cystein; ORN: Ornithin; LYS: Lysin; TRP: Tryptphan; CTH: Cystathionin; C-C: Cystin;

8.1.6 Ergebnisse der Aminosäureanalytik**Tabelle 10:** Aminosäuregehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in Gehirn, Herz und Leber von vier Wochen methioninreich gefütterten Tieren und Kontrolltieren

	Gehirn		Herz		Leber	
	Kontrolle	Methionine	Kontrolle	Methionine	Kontrolle	Methionine
<b>ALA</b>	371 ± 25	354 ± 39	<b>1294 ± 55</b>	<b>980 ± 53*</b>	1996 ± 155	2045 ± 146
<b>GLY</b>	607 ± 104	466 ± 77	356 ± 25	448 ± 206	1485 ± 93	1323 ± 89
<b>VAL</b>	54 ± 7	67 ± 19	82 ± 8	108 ± 20	331 ± 98	228 ± 35
<b>LEU</b>	39 ± 3	39 ± 7	66 ± 5	79 ± 17	148 ± 17	151 ± 12
<b>ILE</b>	46 ± 13	36 ± 6	38 ± 4	38 ± 6	96 ± 10	81 ± 10
<b>THR</b>	<b>250 ± 22</b>	<b>196 ± 14*</b>	159 ± 15	146 ± 23	228 ± 37	173 ± 14
<b>SER</b>	5117 ± 613	4649 ± 446	249 ± 32	184 ± 36	393 ± 33	339 ± 26
<b>PRO</b>	54 ± 4	52 ± 4	94 ± 13	118 ± 30	147 ± 12	147 ± 11
<b>ASP</b>	1738 ± 141	1971 ± 214	1518 ± 263	1393 ± 272	458 ± 46	434 ± 30
<b>MET</b>	36 ± 6	60 ± 14	43 ± 4	58 ± 10	79 ± 15	58 ± 6
<b>OH-PRO</b>	34 ± 8	46 ± 8	72 ± 14	63 ± 13	44 ± 9	50 ± 6
<b>GLU</b>	6694 ± 503	7355 ± 676	2754 ± 283	2782 ± 356	1135 ± 173	1251 ± 103
<b>PHE</b>	79 ± 8	83 ± 7	56 ± 4	60 ± 8	103 ± 11	111 ± 10
<b>CYS</b>	7 ± 1	6 ± 1	12 ± 2	18 ± 3	55 ± 23	40 ± 9
<b>ORN</b>	27 ± 10	18 ± 4	23 ± 3	25 ± 4	318 ± 40	376 ± 45
<b>LYS</b>	274 ± 101	167 ± 41	259 ± 26	247 ± 26	421 ± 39	524 ± 66
<b>HIS</b>	45 ± 12	50 ± 16	122 ± 10	123 ± 19	563 ± 49	577 ± 51
<b>TYR</b>	42 ± 9	33 ± 8	40 ± 6	52 ± 10	73 ± 13	66 ± 5
<b>TRP</b>	9 ± 2	8 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	10 ± 6	16 ± 3
<b>CTH</b>	70 ± 28	41 ± 13	10 ± 1	15 ± 3	555 ± 273	500,2 ± 196
<b>C-C</b>	5 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	8 ± 2	13 ± 2	10 ± 2
<b>EAA</b>	2707 ± 229	2923 ± 229	772 ± 134	649 ± 70	1511 ± 207	1414 ± 122

\*: signifikant erhöht oder erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe

ALA: Alanin; GLY: Glycin; VAL: Valin; LEU: Leucin; ILE: Isoleucin; THR: Threonin; SER: Serin; PRO: Prolin; ASP: Asparaginsäure; MET: Methionin; OH-PRO: Hydroxyprolin; GLU: Glutaminsäure; PHE: Phenylalanin; CYS: Cystein; ORN: Ornithin; LYS: Lysin; TRP: Tryptophan; CTH: Cystathionin; C-C: Cystin; EAA: Summe der essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Lysin und Tryptophan

**Tabelle 11:** Aminosäuregehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in Milz und Niere, sowie im Plasma [ $\mu\text{mol/l}$ ] von vier Wochen methioninreich gefütterten Tieren und Kontrolltieren

	Milz		Niere		Plasma	
	Kontrolle	Methionine	Kontrolle	Methionine	Kontrolle	Methionine
<b>ALA</b>	1901 $\pm$ 194	1759 $\pm$ 178	929 $\pm$ 124	962 $\pm$ 141	314 $\pm$ 51	396 $\pm$ 34
<b>GLY</b>	2878 $\pm$ 284	3021 $\pm$ 471	3118 $\pm$ 507	2475 $\pm$ 384	225 $\pm$ 25	247 $\pm$ 26
<b>VAL</b>	469 $\pm$ 54	458 $\pm$ 55	314 $\pm$ 45	273 $\pm$ 39	266 $\pm$ 41	497 $\pm$ 100
<b>LEU</b>	381 $\pm$ 37	441 $\pm$ 44	180 $\pm$ 23	178 $\pm$ 21	<b>89 <math>\pm</math> 12</b>	<b>148 <math>\pm</math> 18*</b>
<b>ILE</b>	272 $\pm$ 27	246 $\pm$ 22	134 $\pm$ 17	136 $\pm$ 17	71 $\pm$ 9	95 $\pm$ 13
<b>THR</b>	702 $\pm$ 65	642 $\pm$ 48	513 $\pm$ 75	416 $\pm$ 54	221 $\pm$ 30	189 $\pm$ 17
<b>SER</b>	846 $\pm$ 56	841 $\pm$ 70	867 $\pm$ 111	762 $\pm$ 106	196 $\pm$ 28	167 $\pm$ 12
<b>PRO</b>	645 $\pm$ 49	638 $\pm$ 47	342 $\pm$ 41	333 $\pm$ 50	187 $\pm$ 17	200 $\pm$ 25
<b>ASP</b>	5505 $\pm$ 429	4786 $\pm$ 642	1097 $\pm$ 117	1342 $\pm$ 203	<b>28 <math>\pm</math> 3</b>	<b>38 <math>\pm</math> 3*</b>
<b>MET</b>	<b>130 <math>\pm</math> 11</b>	<b>195 <math>\pm</math> 24*</b>	104 $\pm$ 11	125 $\pm$ 17	50 $\pm$ 6	71 $\pm$ 14
<b>OH-PRO</b>	94 $\pm$ 10	108 $\pm$ 18	92,8 $\pm$ 12,8	91,6 $\pm$ 10,8	18 $\pm$ 3	24 $\pm$ 2
<b>GLU</b>	7566 $\pm$ 663	7069 $\pm$ 728	5719 $\pm$ 575	6017 $\pm$ 554	179 $\pm$ 33	276 $\pm$ 37
<b>PHE</b>	253 $\pm$ 30	296 $\pm$ 38	139 $\pm$ 13	144 $\pm$ 15	59 $\pm$ 7	66 $\pm$ 6
<b>CYS</b>	45 $\pm$ 5	40 $\pm$ 6	28 $\pm$ 6	25 $\pm$ 3	7 $\pm$ 21	10 $\pm$ 4
<b>ORN</b>	57 $\pm$ 7	74 $\pm$ 13	75 $\pm$ 10	81 $\pm$ 11	31 $\pm$ 6	43,7 $\pm$ 5
<b>LYS</b>	488 $\pm$ 43	651 $\pm$ 96	323 $\pm$ 35	382 $\pm$ 44	136 $\pm$ 24	178 $\pm$ 20
<b>HIS</b>	261 $\pm$ 23	358 $\pm$ 52	185 $\pm$ 27	191 $\pm$ 26	<b>21 <math>\pm</math> 4</b>	<b>36 <math>\pm</math> 3*</b>
<b>TYR</b>	154 $\pm$ 13	204 $\pm$ 34	116 $\pm$ 13	122 $\pm$ 20	42,3 $\pm$ 8	48 $\pm$ 7
<b>TRP</b>	13 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	8 $\pm$ 2	8 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	9 $\pm$ 4
<b>CTH</b>	25 $\pm$ 5	43 $\pm$ 8	5 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	21 $\pm$ 5	47 $\pm$ 13
<b>C-C</b>	11 $\pm$ 3	31 $\pm$ 16	22 $\pm$ 9	3 $\pm$ 1	14 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4
<b>EAA</b>	1811 $\pm$ 255	1661 $\pm$ 175	642 $\pm$ 39	673 $\pm$ 79	<b>899 <math>\pm</math> 104</b>	<b>1253 <math>\pm</math> 123*</b>

\*: signifikant erhöht oder erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe

ALA: Alanin; GLY: Glycin; VAL: Valin; LEU: Leucin; ILE: Isoleucin; THR: Threonin; SER: Serin; PRO: Prolin; ASP: Asparaginsäure; MET: Methionin; OH-PRO: Hydroxyprolin; GLU: Glutaminsäure; PHE: Phenylalanin; CYS: Cystein; ORN: Ornithin; LYS: Lysin; TRP: Tryptophan; CTH: Cystathionin; C-C: Cystin; EAA: Summe der essentiellen Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Lysin und Tryptophan

*Abkürzungsverzeichnis*

ACH	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Ado	Adenosin
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
AZ	Aktenzeichen
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CA	Celluloseacetat
ca.	circa
CAP	Cyclase-associated Proteine
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CoA	Coenzym A
CoQ5	Coenzym Q5
DDAH	Dimethylargininase
DMEM	Dublencos modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotrinitol
E.C.	Enzymklasse
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale Wirkkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
et al.	et alii
$\epsilon$ ADO	1,N <sup>6</sup> -etheno-Adenosin
$\epsilon$ AMP	1,N <sup>6</sup> -etheno-Adenosin
fmol	Femtomol
g	Gramm
GC-FID	Gaschromatograph mit Flammen-Ionisations-Detektor

h	Stunde
HCY	Gruppe der homocystinreich gefütterten Ratten
Hcy	Homocystein
HepG2	Tumorzelllinie aus Leberkarzinom
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	humane Nabelschnur-Venen-Endothelzellen
IC <sub>50</sub> -Werte	Halbmaximale Inhibitorwirkung
ICAM-1	intracellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K	Kontrollgruppe
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ki-Werte	Gleichgewichtskonstante der Enzyminhibierung
K <sub>m</sub> -Werte	Michaelis-Konstante
KPSS	Kaliumangereicherte Phosphat-Salz-Lösung
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-gekoppeltes Tandemmassenspektrometer
LDL	Low density Lipidproteine
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
-log	negativer dekadischer Logarithmus
LPC	Lysophosphatidylcholin
LSD	Least significant difference
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Excitationswellenlänge
m/z	Masse pro Ladungen
M199	Zellkulturmedium
mA	Milliampère
MCP-1	monocyte chemoattractant protein
MET	Gruppe der methioninreich gefütterten Ratten
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule (Torr)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT	Methyltransferase
MTHFR	Methyltetrahydrofolat-Reduktase
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
N	Stickstoff
n	Versuchszahl
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasen	ATP-abhängige Ionenpumpe
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenosindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenosindinukleotid (reduzierte Form)
NDMA	N-Methyl-D-Asparaginsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
O	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS mit Tween20
PMSF	Phenylmethansulonylfluorid
pmol	pikomol
PSS	Phosphate Saline Solution
r	Korrelationskoeffizient nach PEARSON
rBAT	Transporter für Cystein



RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S	Schwefel
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAHH	S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SBD-F	7-Fluorobenzfurazan-4-Sulfonsäure-Ammoniumsalz
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Natrium-Nitroprussid
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
US	United States
V	Volt
VCAM-1	vascular adhesion molecule
vgl.	vergleiche
-Vit	Fütterungsgruppe mit Vitaminmangel
vs.	versus
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Z	Zellen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

*Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Enzymkatalysierte Umwandlung von Methionin und ATP zu S-Adenosyl-Methionin (SAM) unter Abspaltung von Phosphat .....	3
Abbildung 2: Hydrolytische Spaltung von S-Adenosyl-Homocystein zu Homocystein und Adenosin .....	4
Abbildung 3: Remethylierung von Homocystein zu Methionin mit N <sup>5</sup> -Methyltetrahydrofolat als Methylendonator .....	4
Abbildung 4: Homocysteinabbau via Transsulfurierungsweg .....	5
Abbildung 5: Strukturformeln der homocysteinhaltigen Verbindungen im Körper .....	10
Abbildung 6: Chromatographische Bestimmung der ekto-5'-Nukleotidase-Aktivität. ....	26
Abbildung 7: Originalregistrierung der isometrischen Kraftmessung einer Mesenterialartrie	32
Abbildung 8: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve von Acetylcholin an einer Mesenterialarterie .....	33
Abbildung 9: Densitometrische Auswertung eines Western Blots am Beispiel von eNOS (140kDa) in Lungengewebe .....	36
Abbildung 10: Adenosinkonzentration im Plasma von Ratten mit unterschiedlich induzierter Hyperhomocysteinämie relativiert auf die entsprechende Kontrollgruppe .....	46
Abbildung 11: Extrazelluläre Adenosinkonzentration von HUVEC mit und ohne Homocysteinstimulation (n = 5) .....	48
Abbildung 12: Extrazelluläre ATP-Konzentration in HUVEC mit und ohne Homocysteinstimulation (n = 5) .....	48
Abbildung 13: Einfluss von Homocystein auf die Aktivität der ekto-5'-Nukleotidase (gemessen als Bildung von 1,N <sup>6</sup> -etheno-Adenosin) unter Basalbedingungen und bei Stimulation des Enzyms mit Lysophosphatidylcholin (n = 3) .....	50
Abbildung 14: Intrazellulärer Adenosin- und SAH-Gehalt in HUVEC mit und ohne Homocysteinstimulation (n = 5) .....	51
Abbildung 15: SAH-Konzentration im Zellüberstand von HUVEC zu verschiedenen Zeitpunkten (n = 5) .....	52
Abbildung 16: SAH-Konzentration im zellfreien Überstand von zuvor mit und ohne Homocystein inkubierten HUVEC (n = 3) .....	54
Abbildung 17: Extrazelluläre SAH-Konzentration nach Methionin bzw. Homocysteinstimulation von HepG2 (n = 4) .....	55
Abbildung 18: SAH-Konzentration im zellfreiem Überstand (ÜS) mit und ohne vorheriger Inkubation der Zellen (Z) mit Homocystein (Hcy) bei Zusatz von Adenosin (Ado) (n = 3) ...	56

---

Abbildung 19: SAH im Plasma von Ratten mit unterschiedlich induzierter Hyperhomocysteinämie relativiert auf die entsprechende Kontrollgruppe .....	57
Abbildung 20: Einzelwerte Methioninkonzentration im Plasma von Ratten nach 4 Wochen methioninreicher Fütterung und von Kontrolltieren (n = 9).....	61
Abbildung 21: Methioningehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach 4 Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	62
Abbildung 22: Gesamtaminosäuregehalt in verschiedenen Organen [nmol/g Feuchtgewicht] und im Plasma [ $\mu$ mol/l] nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	63
Abbildung 23: Homocysteinkonzentration im Plasma von vier Wochen Methioninreich gefütterten Ratten und Kontrolltieren (n = 9).....	64
Abbildung 24: Korrelation von Homocystein und Methionin im Plasma von Ratten nach vierwöchiger methioninreicher Fütterung (weiss) und in Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).	65
Abbildung 25: Homocysteingehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	66
Abbildung 26: Korrelation von Homocystein im Plasma und in der Niere von Ratten nach vierwöchiger methioninreicher Fütterung (weiss) und in Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).	67
Abbildung 27: Korrelation von Homocystein im Plasma und in der Milz von Ratten nach vierwöchiger methioninreicher Fütterung (weiss) und in Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).	68
Abbildung 28: Glutaminsäuregehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	69
Abbildung 29: Asparaginsäuregehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	70
Abbildung 30: Tyrosingehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	71
Abbildung 31: Histidingehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	73
Abbildung 32: Negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Wirkkonzentration von Acetylcholin (ACH) und Natrium-Nitroprussid (SNP) als Maß für die Gefäßfunktion von Mesenterialarterien von methioninreich gefütterten Tieren (grau) und Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).....	74
Abbildung 33: eNOS- und iNOS-Expression in Lunge und Leber von methioninreich gefütterten Tieren (grau) und Kontrolltieren (schwarz) (je n = 9).....	76

---

Abbildung 34: Optimierung der Derivatisierungszeit und des pH-Wertes für die HPLC-Analytik von SAM und SAH (je n = 4).....	79
Abbildung 35: S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	80
Abbildung 36: S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Feuchtgewicht] in verschiedenen Geweben nach vier Wochen methioninreicher Fütterung (MET) und in Kontrolltieren (je n = 9).....	81
Abbildung 37: Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).....	86
Abbildung 38: Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). ....	87
Abbildung 39: S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).....	88
Abbildung 40: S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). ....	89
Abbildung 41: S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10).....	90
Abbildung 42: S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). ....	90
Abbildung 43: „Transmethylierungspotential“ in der Leber nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10). ....	91
Abbildung 44: „Transmethylierungspotential“ in der Leber nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2 % Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). ....	92
Abbildung 45: Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10).....	93

Abbildung 46: S-Adenosyl-Homocysteingehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	94
Abbildung 47: S-Adenosyl-Methioningehalte [nmol/g Trockengewicht] in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	94
Abbildung 48: „Transmethylierungspotential“ in der Milz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	95
Abbildung 49: Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10). .....	97
Abbildung 50: Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	98
Abbildung 51: S-Adenosyl- Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10). .....	98
Abbildung 52: S-Adenosyl-Homocysteingehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	99
Abbildung 53: S-Adenosyl-Methioningehalt [nmol/g Trockengewicht] in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10). .....	100
Abbildung 54: S-Adenosyl-Methioningehalt [nmol/g Trockengesicht] in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	100
Abbildung 55: „Transmethylierungspotential“ in der Niere nach dreimonatiger Methionin- (1% Met) bzw. Homocystinfütterung (1% Hcy) und von Kontrolltieren (K I) (je n = 10). ...	101
Abbildung 56: „Transmethylierungspotential“ in der Niere nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin (2% Hcy) bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (-Vit) und von Kontrolltieren (K II) (je n = 10). .....	102
Abbildung 57: RP-HPLC-Chromatogramm eines Homocystein-Standards (4 µmol/l) .....	104

---

Abbildung 58: Optimierung der Menge an Reduktionsmittel (DTT) und Derivatisierungsreagenz (SBD-F) für die HPLC-Analytik von Homocystein in Weißbrot...	105
Abbildung 59: RP-HPLC-Chromatogramm einer Homocysteinmessung in Roquefort Käse. .....	105
Abbildung 60: Homocysteinproduktion von Dünndarmbakterien aus Ratten, die mit und ohne Methionin bzw. Asparaginsäure [21 mg/4 ml Dünndarmisolat] gefüttert wurden.....	109
Abbildung 61: Mittlere Homocysteingehalte im markfreien Rattenknochen nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (je n = 10) .....	111
Abbildung 62: Essentielle Aminosäuren im Plasma von vier Wochen methioninreich gefütterten Tieren: .....	112

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: SAM-abhängige Methyltransferasen (MT):.....	7
Tabelle 2: Gehalte an asymmetrischen und symmetrischen Dimethylarginin und Arginin im Plasma nach 4 Wochen methioninreicher Fütterung [ $\mu\text{mol/l}$ ]. .....	77
Tabelle 3: Transmethylierungspotential in Milz, Gehirn, Leber, Niere und Herz.....	82
Tabelle 4: Studienbedingungen der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 1 % Methionin bzw. 1 % Homocystein.....	84
Tabelle 5: Studienbedingungen der dreimonatigen Fütterungsstudie mit 2 % Homocystein bzw. unter Vitaminmangel .....	85
Tabelle 6: Homocystein, SAH, SAM und "Transmethylierungspotential" im Herz nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (je n = 10).....	96
Tabelle 7: Homocystein- und Methioningehalte ausgewählter Lebensmitteln [ $\text{mg/kg}$ ] bzw. [ $\text{mg/l}$ ].....	106
Tabelle 8: SAH, SAM und "Transmethylierungspotential" im Knochen nach dreimonatiger Fütterung mit 2 % Homocystin bzw. ohne Folsäure und Cobalamin (je n = 10) .....	111
Tabelle 9: Retentionszeiten und Kalibrationsbereiche der Aminosäureanalytik .....	142
Tabelle 10: Aminosäuregehalte [ $\text{nmol/g}$ Feuchtgewicht] in Gehirn, Herz und Leber von vier Wochen methioninreich gefütterten Tieren und Kontrolltieren .....	143
Tabelle 11: Aminosäuregehalte [ $\text{nmol/g}$ Feuchtgewicht] in Milz und Niere, sowie im Plasma [ $\mu\text{mol/l}$ ] von vier Wochen methioninreich gefütterten Tieren und Kontrolltieren.....	144

**Formelverzeichnis**

Formel 1: Energy Charge .....	27
Formel 2: Prozentuale Relaxation .....	32
Formel 3: Halbmaximale Wirkkonzentration .....	33