

# **Mechanismen und Bedeutung der L-Dopa-induzierten Hyperhomocysteinämie: Versuche an PC12-Zellen und kultivierten Fibroblasten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Christina Maria Julia Custodis  
aus Bonn

2013

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ullrich Wüllner
2. Gutachter: Herr PD Dr. Michael Neubrand

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.02.2013

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Bonn  
Direktor: Herr Prof. Dr. Thomas Klockgether

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1. Homocysteinestoffwechsel.....	11
2.1.1. Homocystein.....	12
2.1.2. Transmethylierung.....	13
2.1.3. Verstoffwechslung des Homocysteins.....	15
2.1.3.1. Remethylierung.....	15
2.1.3.2. Vitamin B <sub>12</sub> .....	16
2.1.3.3. Folsäure.....	17
2.1.3.4. Transsulfurierung.....	18
2.1.3.5. Vitamin B <sub>6</sub> .....	19
2.1.4. Glutathion.....	20
2.1.4.1. Glutathionsynthese.....	20
2.1.4.2. Glutathion als Antioxidans.....	21
2.1.5. Verhältnis der Homocysteinabbauwege.....	22
2.1.5.1. Verhältnis der Homocysteinabbauwege unter normalen Bedingungen.....	22
2.1.5.2. Verhältnis der Homocysteinabbauwege unter oxidativem Stress.....	23
2.2. Hyperhomocysteinämie.....	23
2.2.1. Allgemeines.....	23
2.2.2. Ursachen der Hyperhomocysteinämie.....	24
2.2.2.1. Vitaminmangelerscheinungen.....	24
2.2.2.2. Enzymdefekte.....	24
2.2.2.3. Weitere Ursachen der Hyperhomocysteinämie.....	26
2.2.3. Folgen der Hyperhomocysteinämie.....	26
2.2.3.1. Kardiovaskuläre Folgen.....	26
2.2.3.2. Neurologische Folgen.....	28
2.2.3.3. Andere Folgen.....	29
2.2.4. Vitamingabe bei Hyperhomocysteinämie.....	30
2.3. M. Parkinson.....	32
2.3.1. Allgemeines.....	32
2.3.2. Nebenwirkungen der L-Dopa Medikation bei M. Parkinson.....	33
2.3.3. Wirkung von L-Dopa auf den Homocysteinestoffwechsel.....	34
2.3.4. Folsäuregabe bei M. Parkinson.....	35
2.3.5. Oxidativer Stress bei M. Parkinson.....	36
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1. Zellkultur.....	37
3.1.1. Allgemeines.....	37
3.1.2. PC12-Zellen.....	37

3.1.2.1.	Allgemeines.....	37
3.1.2.2.	Zellmedium.....	38
3.1.2.3.	Wachstumsbedingungen.....	38
3.1.2.4.	Auftauen und Einfrieren.....	38
3.1.2.5.	Passagierung.....	39
3.1.2.6.	Zellzahlbestimmung.....	41
3.1.2.7.	Kollagenbeschichtung der 96-Well-Platten.....	42
3.1.2.8.	Aussähen in 96-Well-Platten.....	42
3.1.3.	Chemikalien.....	43
3.1.3.1.	Homocystein.....	43
3.1.3.1.1.	Allgemeines.....	43
3.1.3.1.2.	Herstellung der Stocklösung.....	43
3.1.3.1.3.	Bestimmung der LD-50 von Homocystein.....	44
3.1.3.2.	L-Dopa.....	45
3.1.3.2.1.	Allgemeines.....	45
3.1.3.2.2.	Herstellung der Stocklösung.....	45
3.1.3.2.3.	Bestimmung der LD-50 von L-Dopa.....	45
3.1.3.2.4.	Wirkung von Homocystein auf die L-Dopatoxizität.....	46
3.1.3.3.	Vitamin B <sub>6</sub> .....	47
3.1.3.3.1.	Allgemeines.....	47
3.1.3.3.2.	Herstellung der Stocklösung.....	47
3.1.3.3.3.	Wirkung von Vitamin B <sub>6</sub> auf PC12-Zellen.....	47
3.1.3.3.4.	Wirkung von Vitamin B <sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität.....	48
3.1.3.4.	Vitamin B <sub>12</sub> .....	48
3.1.3.4.1.	Allgemeines.....	48
3.1.3.4.2.	Herstellung der Stocklösung.....	48
3.1.3.4.3.	Wirkung von Vitamin B <sub>12</sub> auf PC12-Zellen.....	49
3.1.3.4.4.	Wirkung von Vitamin B <sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität.....	49
3.1.3.5.	Folsäure.....	49
3.1.3.5.1.	Allgemeines.....	49
3.1.3.5.2.	Herstellung der Stocklösung.....	50
3.1.3.5.3.	Herstellung der NaOH-Lösung.....	50
3.1.3.5.4.	Wirkung von Folsäure auf PC12-Zellen.....	50
3.1.3.5.5.	Wirkung der Folsäure auf die Homocysteintoxizität.....	51
3.1.4.	Fibroblasten.....	52
3.1.4.1.	Fibroblastenzelllinien.....	52
3.1.4.2.	Zellmedium.....	52
3.1.4.3.	Wachstumsbedingungen.....	53
3.1.4.4.	Auftauen und Einfrieren.....	53
3.1.4.5.	Passagierung.....	53
3.1.4.6.	Zellzahlbestimmung.....	53
3.1.4.7.	Aussähen in 96-Well-Platten.....	53
3.1.5.	Substanzzugabe bei den Fibroblastenlinien.....	54
3.1.5.1.	Homocysteinwirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien.....	54
3.1.5.2.	L-Dopawirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien.....	54

3.2.	Vitalitätsmessung.....	54
3.2.1.	Allgemeines.....	54
3.2.2.	Alamar-Blue-Behandlung.....	54
3.2.3.	Alamar-Blue-Messung.....	55
3.2.4.	PBS-Reaktion.....	56
3.3.	Statistik.....	56
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1.	PC12-Versuche.....	60
4.1.1.	PC12-Versuche mit Homocystein und L-Dopa.....	60
4.1.1.1.	Bestimmung der LD-50 von Homocystein.....	60
4.1.1.2.	Bestimmung der LD-50 von L-Dopa.....	61
4.1.1.3.	Gleichzeitige Gabe von Homocystein und L-Dopa.....	63
4.1.1.4.	Wirkung von Homocystein auf die L-Dopatoxizität.....	64
4.1.2.	PC12-Versuche mit Homocystein und mit an dessen Verstoffwechselung beteiligten Vitaminen.....	65
4.1.2.1.	Wirkung von Vitamin B <sub>6</sub> auf PC12-Zellen.....	65
4.1.2.2.	Wirkung von Vitamin B <sub>12</sub> auf PC12-Zellen.....	66
4.1.2.3.	Wirkung von Folsäure auf PC12-Zellen.....	67
4.1.2.4.	Wirkung von Vitamin B <sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität.....	68
4.1.2.5.	Wirkung von Vitamin B <sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität.....	70
4.1.2.6.	Wirkung von Folsäure auf die Homocysteintoxizität.....	71
4.2.	Fibroblastenversuche.....	73
4.2.1.	Vergleich der Homocysteinwirkung bei den unterschiedlichen Fibroblastenlinien.....	73
4.2.2.	Zusammenfassung der Homocysteinwirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien.....	75
4.2.3.	Vergleich der L-Dopawirkung bei den unterschiedlichen Fibroblastenlinien.....	76
4.2.4.	Zusammenfassung der L-Dopawirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien.....	78
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
5.1.	Material- und Methodenkritik.....	79
5.1.1.	Unterschiedliche Wirkung der Homocystein-Stereoisomere.....	79
5.1.2.	Unterschiedliche biologisch aktive Formen der Vitamine.....	79
5.1.3.	Fibroblastenzelllinien.....	79
5.1.4.	Alamar-Blue-Assay.....	80
5.1.5.	LD-50 von Homocystein und L-Dopa für Zellen liegt über dem Serum- spiegel.....	80
5.2.	Vitalitätsbeeinflussung durch Substanzzugabe bei den PC12-Zellen.....	81

5.2.1.	Homocystein- und L-Dopawirkung bei den PC12-Zellen.....	81
5.2.1.1.	Additive Wirkung der Homocystein- und der L-Dopatoxizität.....	81
5.2.2.	Vitaminwirkung an PC12-Zellen.....	82
5.2.2.1.	Allgemeines.....	82
5.2.2.2.	Toxizität der Vitamine.....	82
5.2.2.3.	Folsäuresubstitution.....	84
5.3.	Homocystein- und L-Dopawirkung bei den Fibroblasten.....	85
5.3.1.	Allgemeines.....	85
5.3.2.	Homocysteinwirkung bei den Fibroblasten.....	85
5.3.2.1.	Abwehrmechanismen der Mutanten.....	85
5.3.2.2.	Chemische Konditionierung der Homocysteingabe bei MTHFR- und CBS-Defizienten.....	86
5.3.2.3.	Vergleich der Homocysteinwirkung bei den MTHFR- und CBS-Mutanten..	87
5.3.2.4.	Höherer Gesamtglutathionspiegel bei den MTHFR-Mutanten im Vergleich zu den CBS-Mutanten.....	88
5.3.3.	L-Dopawirkung bei den Fibroblasten.....	88
5.3.3.1.	Vergleich der L-Dopawirkung bei den MTHFR- und CBS-Mutanten.....	88
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>112</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

ATP =	Adenosintriphosphat
BHMT =	Betain-Homocystein-Methyltransferase
B6 =	Vitamin B <sub>6</sub>
B12 =	Vitamin B <sub>12</sub>
CBS =	Cystathionin-β-Synthase
CGL =	Cystathionin-γ-Lyase
COMT =	Catechol-O-Methyl-Transferase
CO <sub>2</sub> =	Kohlenstoffdioxid
DMEM =	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO =	Dimethylsulfoxid
DNA =	Desoxyribonukleinsäure
EDTA =	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD =	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCSa =	aktiviertes fetales Kälberserum
FCSi =	inaktiviertes fetales Kälberserum
FMNH =	Flavin-Mononukleotid
GCS =	γ-Glutamylcysteinsynthetase
GS =	Glutathion-Synthetase
GSH =	Glutathion (reduziertes Glutathion)
GSSG =	Glutathion-Disulfid (oxidiertes Glutathion)
Hcys =	Homocystein
HS =	Horseserum
H <sub>2</sub> O =	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =	Wasserstoffperoxid
IPS =	idiopathisches Parkinson-Syndrom
IRES =	Internal Ribosome Entry Site
KHK =	koronare Herzkrankheit
LD-50 =	letale Dosis, bei der 50 % der Zellen abgestorben sind
L-Dopa =	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Levo-Dopa)
M =	molar (mol/l)
MAT =	Methionin-Adenosyltransferase
MRT =	Magnetresonanztomographie
MS =	Methionin-Synthase
MSR =	Methionin-Synthase-Reduktase
MT =	Methyltransferase
5-MTHF =	5-Methyl-Tetrahydrofolat
5,10-MTHF =	5,10-Methylen-Tetrahydrofolat
MTHFR =	Methylentetrahydrofolatreduktase
M. Parkinson =	Morbus Parkinson
M. Alzheimer =	Morbus Alzheimer
Na =	Natrium
NaOH =	Natriumhydroxid
NADH =	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH =	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMDA-Rezeptor =	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

n.s. =	nicht signifikant
3-OMD =	3-O-Methyl-Dopa
PBS =	Phosphate buffered saline
PC12-Zellen =	Phäochromozytomzellen
P/S =	Penicillin und Streptomycin
RNA =	Ribonukleinsäure
RPMI =	Roswell Park Memorial Institute
SAH =	S-Adenosylhomocystein
SAHH =	S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase
SAM =	S-Adenosylmethionin
TIA =	transitorische ischämische Attacke
tHcys =	totales Homocystein im Plasma
THF =	Tetrahydrofolat
UVA =	ultraviolette Strahlung Typ A
$\alpha$ =	Signifikanzniveau
$\mu$ =	Mittelwert



## 2. Einleitung

Eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen ist das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) (s. 2.3.1.), in dessen Pathogenese der Dopaminstoffwechsel und der damit verbundene Homocysteinstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen. In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob es sinnvoller wäre, den erhöhten Homocysteinspiegel bei Patienten mit IPS durch eine vermehrte Transsulfurierung mittels Vitamin-B<sub>6</sub>-Gaben oder durch eine vermehrte Remethylierung mittels Folsäuregaben und Vitamin-B<sub>12</sub>-Gaben zu senken.

Die L-Dopagabe führt bei Parkinsonpatienten u.a. zu einer Hyperhomocysteinämie (s. 2.3.3.), welche einen Risikofaktor für kardiovaskuläre, neurologische sowie für andere Erkrankungen darstellt (s. 2.2.3.). Deshalb versucht man, die Homocysteinkonzentration bei Parkinsonpatienten zu senken. Dieses ist durch zwei unterschiedliche Stoffwechselwege möglich: entweder über die Transsulfurierung oder über die Remethylierung (s. 2.1.3.). Derzeit überlegt man einige Parkinsonpatienten mit Folsäure zu behandeln (s. 2.3.4.), mit dem Ziel die Remethylierung zu unterstützen. Bei der Transsulfurierung entsteht Glutathion, welches u.a. den oxidativen Stress senkt (s. 2.1.4.2.), der bei Parkinsonpatienten vermehrt entsteht (s. 2.3.5.). Deshalb wird vermutet, dass es besser wäre, die Transsulfurierung zu unterstützen, da dabei nicht nur der Hyperhomocysteinämie sondern auch dem oxidativem Stress entgegengewirkt wird. Um diesen Weg zu unterstützen könnte man den Patienten Vitamin B<sub>6</sub> geben.

In der vorliegenden Arbeit soll die Vitaminwirkung auf die beiden Stoffwechselwege genauer untersucht werden und geklärt werden, welche Vitamine man den Parkinsonpatienten am besten substituiert um der Hyperhomocysteinämie vorzubeugen.

Zunächst soll deshalb an PC12-Zellen untersucht werden, inwieweit die Vitamine B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> und Folsäure die Homocysteintoxizität beeinflussen. Würde nun festgestellt, dass ein oder mehrere dieser Vitamine die Homocysteintoxizität günstig beeinflussen, wäre es sinnvoll, den Parkinsonpatienten das bzw. diese Vitamine zu geben, um der Hyperhomocysteinämie entgegen zu wirken. Weiter soll festgestellt werden, inwieweit die Homocysteingabe die L-Dopatoxizität beeinflusst. So soll geklärt werden, ob Homocystein vor einer L-Dopatoxizität schützen kann oder ob es diese verstärkt.

Danach sollen die Homocysteinwirkung und die L-Dopawirkung auf unterschiedliche Fibroblastenlinien bestimmt werden, um zu erkennen, ob die Zellen mit MTHFR- oder CBS-Defekten eine geringere oder höhere Homocysteintoxizität aufweisen als normale Fibroblasten.

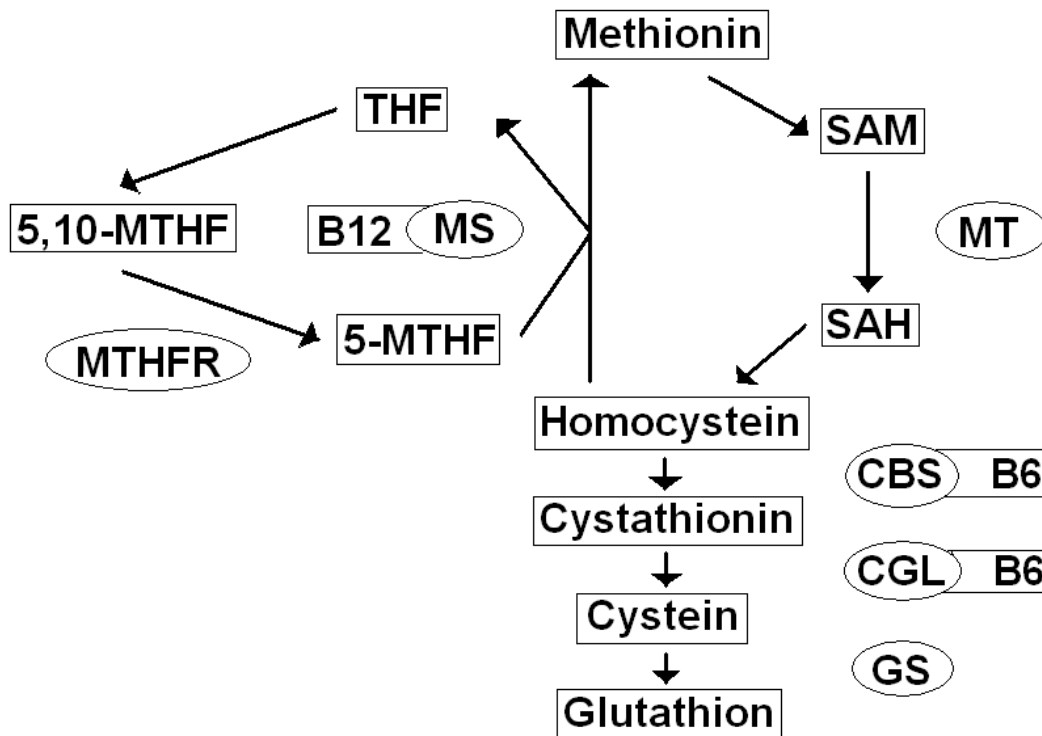
Bei den MTHFR-Mutanten muss das Homocystein fast vollständig über die Transsulfurierung verstoffwechselt werden, bei den CBS-Mutanten über die Remethylierung.

Würde nun z.B. festgestellt, dass die MTHFR-Mutanten eine geringere Homocysteintoxizität aufweisen als die CBS-Mutanten, würde das für die Transsulfurierung als effektiveren Abbauweg zur Bekämpfung der Hyperhomocysteinämie sprechen. Dann wäre eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe bei Parkinsonpatienten günstig um der durch den L-Dopaabbau entstandenen Hyperhomocysteinämie entgegen zu wirken, da durch die Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe das Homocystein dann vermehrt über die Transsulfurierung abgebaut würde. Bei diesem Abbauweg würde auch mehr Glutathion gebildet, welches den oxidativen Stress, der bei Parkinsonpatienten vermehrt entsteht, senken könnte.

Würde die CBS-Mutante eine geringere Homocysteintoxizität aufweisen, spräche das für die Remethylierung als effektiveren Abbauweg zur Bekämpfung der Hyperhomocysteinämie. In diesem Fall erscheint eine Vitamin-B<sub>12</sub>- und Folsäuregabe günstig, damit mehr Homocystein über die Remethylierung abgebaut wird. Hierbei käme es jedoch zu einer Verringerung des schützenden Glutathions.

Die hier vorliegende Arbeit soll klären, welcher Stoffwechselweg besser geeignet ist den erhöhten Homocysteinspiegel bei Patienten mit M. Parkinson zu senken. Es stellt sich die Frage, ob durch eine vermehrte Transsulfurierung mittels Vitamin-B<sub>6</sub>-Gaben oder ob durch eine vermehrte Remethylierung mittels Folsäure- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Gaben besser das schädliche Homocystein angebaut werden kann. Aufgrund der protektiven und zentralen Rolle des Glutathions wird die Hypothese aufgestellt, dass bei IPS-Patienten die Transsulfurierung der geeignetere Weg zur Reduktion des erhöhten Homocysteinspiegels ist.

## 2.1. Homocysteinestoffwechsel



**Abbildung 1: Homocysteinestoffwechsel**

B6 = Vitamin B<sub>6</sub>

B12 = Vitamin B<sub>12</sub>

CBS = Cystathionin-β-Synthase

CGL = Cystathionin-γ-Lyase

GS = Glutathion-Synthetase

MS = Methionin-Synthase

MT = Methyltransferase

5-MTHF = 5-Methyl-Tetrahydrofolat

5,10-MTHF = 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat

MTHFR = Methyltetrahydrofolatreduktase

SAH = S-Adenosylhomocystein

SAM = S-Adenosylmethionin

THF = Tetrahydrofolat

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

] = Vitamin, welches von dem Enzym benötigt wird

Beim Homocysteinestoffwechsel wird die Aminosäure Methionin über S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein in Homocystein umgewandelt. Die Methyltransferase katalysiert die Umwandlung von S-Adenosylmethionin in S-Adenosylhomocystein.

Homocystein wird zum einen durch die Transsulfurierung über Cystathionin und Cystein in Glutathion umgewandelt, die beteiligten Enzyme sind die Vitamin B<sub>6</sub> abhängige Cystathionin-β-Synthase und die ebenfalls Vitamin B<sub>6</sub> abhängige Cystathionin-γ-Lyase.

Zum anderen kann Homocystein über die Remethylierung durch die Vitamin B<sub>12</sub> abhängige Methionin-Synthase zurück in Methionin verwandelt werden, bei dieser Reaktion wird 5-Methyl-Tetrahydrofolat in Tetrahydrofolat umgewandelt. Tetrahydrofolat wird zunächst in 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat umgewandelt und danach durch die Methyltetrahydrofolatreduktase wieder zu 5-Methyl-Tetrahydrofolat verstoffwechselt.

Der Homocysteinestoffwechsel beschreibt den Kreislauf zwischen den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Homocystein. Methionin wird durch eine Transmethylierung in Homocystein umgewandelt. Homocystein kann auf unterschiedliche Weise weiter verstoffwechselt werden. Zum einen kann es durch die Remethylierung, die von Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure abhängig ist, wieder zu Methionin zurückverwandelt werden, zum anderen kann es durch die Transsulfurierung, die von Vitamin B<sub>6</sub> abhängig ist, zu Cystein abgebaut werden (Finkelstein und Martin, 2000).

Die Regulation des Homocysteinestoffwechsels ist abhängig von dem Gewebe, in dem die Reaktionen ablaufen, von der Kinetik der beteiligten Enzyme sowie von den Konzentrationen der Substrate und Cofaktoren (Finkelstein, 2007).

### 2.1.1. Homocystein

Homocystein ist ein Derivat der essentiellen, vom Menschen nicht ausreichend synthetisierbaren Aminosäure Methionin (Fowler, 2005). Homocystein selbst ist eine nicht proteinogene Aminosäure (Tchantchou, 2006), die schwefelhaltig ist (Selhub, 1999).

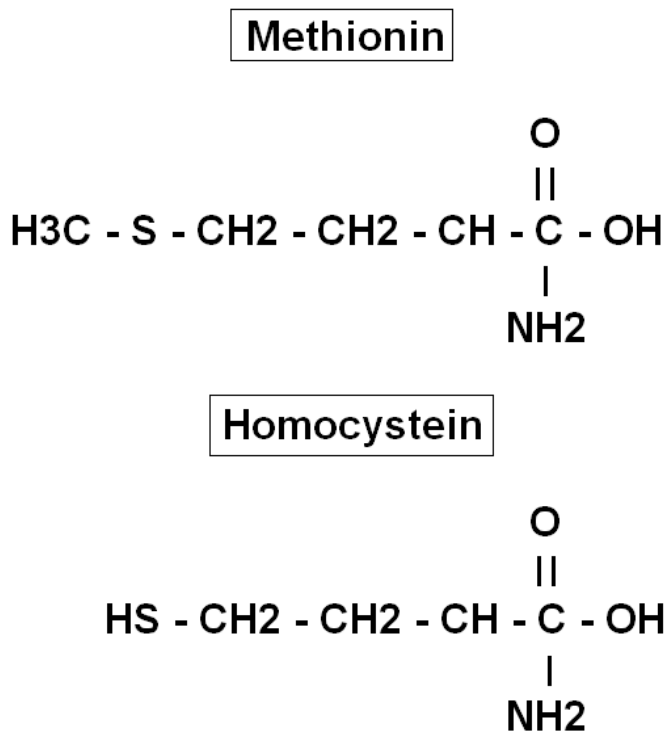
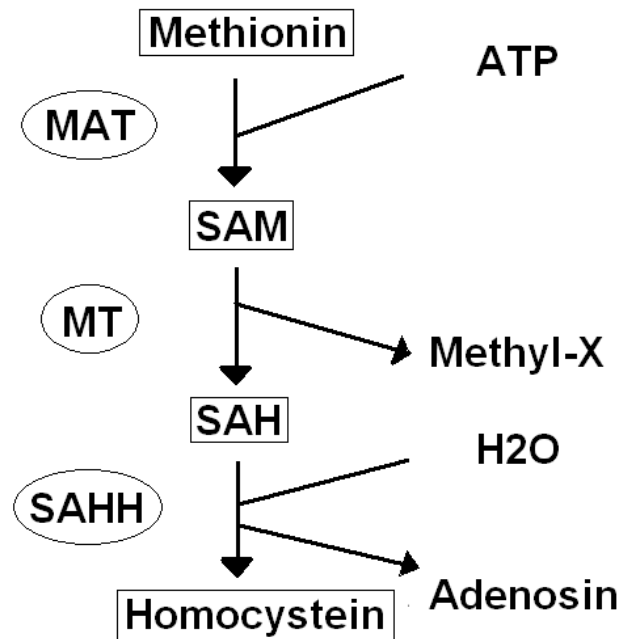


Abbildung 2: Strukturformeln von Methionin und Homocystein

### 2.1.2. Transmethylierung



**Abbildung 3: Transmethylierung**

ATP = Adenosintri-phosphat

H<sub>2</sub>O = Wasser

Methyl-X = Methyl-Gruppe

MAT = Methionin-Adenosyltransferase

MT = Methyltransferase

SAH = S-Adenosyl-Homocystein

SAHH = S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase

SAM = S-Adenosyl-Methionin

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

Bei der Transmethylierung wird Methionin durch die ATP abhängige Methionin-Adenosyltransferase zunächst in S-Adenosyl-Methionin, danach durch die Methyltransferase unter Abspaltung einer Methylgruppe in S-Adenosyl-Homocystein umgewandelt. Schließlich werden S-Adenosyl-Homocystein und Wasser über die S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase zu Homocystein und Adenosin verstoffwechselt.

Die Transmethylierung beschreibt die Umwandlung von Methionin in Homocystein. Methionin wird durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT) in S-Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt. Die MAT benötigt Adenosintri-phosphat (ATP) und kommt in zwei unterschiedlichen Isoenzymformen vor. Die MAT Ia wird vor allem in der Leber exprimiert, die MAT IIa in extra-

hepatischen Geweben (Lu und Mato, 2008). Die MAT ist das Schlüsselenzym der Transmethylierung (Ubagai et al., 1995).

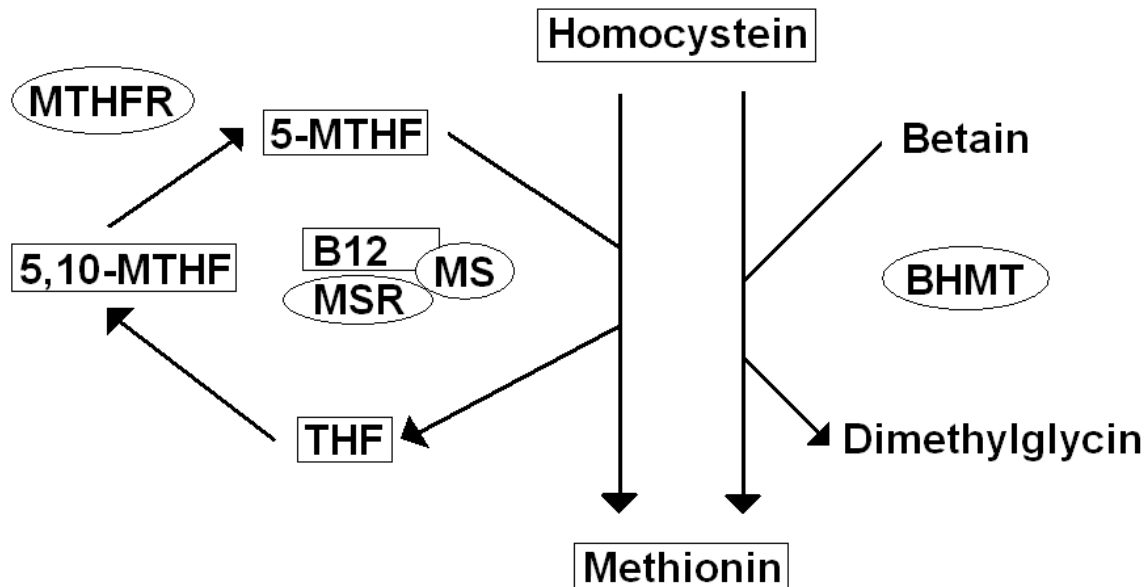
SAM ist ein wichtiges Molekül für die Zellfunktion und das Überleben der Zelle. SAM wird für die Transmethylierung, die Transsulfurierung und die Polyamidsynthese benötigt. Die Methylgruppe von SAM wird abgegeben an DNA, an Phospholipide und an Proteine und ist wichtig für die Genexpression sowie für die Membranstabilität. Bei der Transsulfurierung entsteht über Cystein das Antioxidans Glutathion. Das mit Hilfe von SAM synthetisierte Polyamid spielt eine Rolle im Zellwachstum (Lu, 2000).

SAM ist der Hauptmethylgruppendonator in der Zelle und somit ein Schlüsselregulator des Metabolismus, der Proliferation, der Differenzierung und des Zelltodes (Matinez-Lopez et al., 2008). SAM verstärkt seine eigene Synthese, die Transsulfurierung und die Reaktion der Glycinmethyltransferase, es inhibiert die Remethylierung (Finkelstein, 2007).

Eine Methyltransferase katalysiert die Reaktion von SAM zu S-Adenosylhomocystein (SAH) unter Abgabe einer Methylgruppe (Chiang, 1998). Die S-Adenosylhomocysteinhydrolase (SAHH) hydrolysiert SAH zu Adenosin und Homocystein. Hohe SAH-Konzentrationen hemmen durch einen negativen Feedbackmechanismus die Methylierung, das führt zu einem Anstieg der SAM-Konzentrationen. Das Enzym SAHH nimmt Einfluss auf die Methylierung von Phospholipiden, Proteinen, kleinen Molekülen, DNA und RNA (Chiang, 1998).

## 2.1.3. Verstoffwechslung des Homocysteins

### 2.1.3.1. Remethylierung



**Abbildung 4: Remethylierung**

B12 = Vitamin B<sub>12</sub>

BHMT = Betain-Homocystein-Methyltransferase

MS = Methionin-Synthase

MSR = Methioninsynthasereduktase

5-MTHF = 5-Methyl-Tetrahydrofolat

5,10-MTHF = 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat

MTHFR = Methyltetrahydrofolatreduktase

THF = Tetrahydrofolat

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

] = Vitamin, welches von dem Enzym benötigt wird

Bei der Remethylierung wird Homocystein wieder in Methionin umgewandelt. Zum einen ist dies durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase möglich, bei dieser Reaktion wird Betain in Dimethylglycin umgewandelt.

Zum anderen kann Homocystein durch die Vitamin B<sub>12</sub> abhängige Methionin-Synthase zurück in Methionin verwandelt werden, bei dieser Reaktion wird 5-Methyl-Tetrahydrofolat in Tetrahydrofolat umgewandelt. Tetrahydrofolat wird zunächst in 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat umgewandelt und danach durch die Methyltetrahydrofolatreduktase wieder zu 5-Methyl-Tetrahydrofolat verstoffwechselt.

Die Remethylierung ist ein Vorgang, bei dem Homocystein in Methionin zurückverwandelt wird, Methionin wird also bewahrt. Die Remethylierung benötigt entweder Betain oder Methyltetrahydrofolat (MTHF) als Methylgruppendonator (Finkelstein, 2007).

Ein Weg läuft über die Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT), dieses Enzym transferiert eine Methylgruppe von Betain auf Homocystein, dabei werden Demethylglycin und Methionin gebildet (Miller et al., 2005). Die BHMT wird durch SAM gehemmt, SAH und Homocystein machen diese Inhibition rückgängig (Finkelstein und Martin, 1984).

Der andere Weg ist komplexer und benötigt zwei Vitamine, Folat und Cobalamin sind für die Remethylierung essentiell (Hustad et al., 2007). Die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) katalysiert die Reaktion von 5-10-Methylentetrahydrofolat (5-10-MTHF) zu 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) (Goyette et al., 1994). MTHF stellt eine Methylgruppe für die Remethylierung bereit (Tchantchou, 2006). MTHF ist die häufigste Form von Folat im Körper (Chen et al., 2001). Die Methioninsynthase (MS), die Vitamin B<sub>12</sub> abhängig ist, katalysiert die Reaktion von MTHF und Homocystein zu Methionin und Tetrahydrofolat (THF). THF wird in einem weiteren Schritt zu 5-10-MTHF regeneriert (Matthews et al., 1998). Damit die MS die Reaktion von Homocystein zu Methionin katalysieren kann, muss sie in ihrer reduzierten aktiven Form vorliegen, die Methioninsynthaserduktase (MSR) ist hierzu nötig (Jacques, 2003).

### **2.1.3.2. Vitamin B<sub>12</sub>**

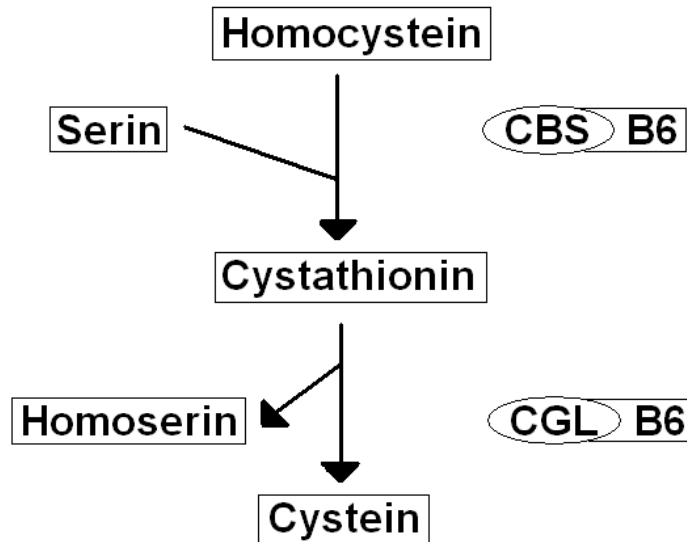
Ein Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel kann eine makrozytäre Anämie hervorrufen (Molby et al., 1992) und zu kognitiven Defiziten im Alter führen (Smith und Refsum, 2008). Der Vitamin-B<sub>12</sub>-Spiegel kann jedoch sehr niedrig sein, ohne dass Ausfälle auftreten. Die gewöhnliche Tagesdosis liegt bei 1-10 µg, jedoch kommt es bei Tagesdosen von unter 500 µg kaum zu einer Erhöhung des Vitamin-B<sub>12</sub>-Spiegels bei alten Menschen. Die Bioverfügbarkeit von Vitamin B<sub>12</sub> ist limitiert, ein Intrinsic-Faktor-Mangel kann eine Rolle spielen. Im Alter ist die Resorption jedoch auch allgemein verschlechtert und die Häufigkeit eines Mangels an Vitamin B<sub>12</sub> nimmt zu (Carmel, 2008). Von den 65-74jährigen hat jeder Zwanzigste einen Mangel, bei den über 75jährigen jeder Zehnte. Ein Vitamin-B<sub>12</sub>-Defizit liegt bei Konzentrationen von < 150 pmol/l im Serum vor (Clarke et al., 2004).



### **2.1.3.3. Folsäure**

Ein Folsäuredefizit liegt ab einer Konzentration von  $< 5$  nmol/l im Serum vor, bei den 65-74jährigen hat jeder Zwanzigste einen Mangel, bei den über 75jährigen jeder Zehnte (Clarke et al., 2004). Folsäure senkt das Auftreten von Neuralrohrdefekten, Down Syndrom, Krebs, Demenz und Gefühlsschwankungen. Die Senkung des Homocysteinspiegels ist einer der zugrunde liegenden Mechanismen. Folat wird benötigt für die Nukleotid- und Methioninbiosynthese (Lucock, 2000). Ebenfalls schützt Folsäure vor einer retrobulbären Neuropathie (De Silva et al., 2008), sowie vor einer megaloblastischen Anämie, Herzfehlern und vorgeburtlichen Missbildungen (Ifergan und Assaraf, 2008). Nicht Schwangeren wird eine Folatzufuhr von 400  $\mu\text{g}$  täglich, Schwangeren eine Zufuhr von 600  $\mu\text{g}$  täglich empfohlen (Ryan-Harshman und Aldoori, 2008).

### 2.1.3.4. Transsulfurierung



**Abbildung 5: Transsulfurierung**

B6 = Vitamin B<sub>6</sub>

CBS = Cystathionin-β-Synthase

CGL = Cystathionin-γ-Lyase

SAH = S-Adenosylhomocystein

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

] = Vitamin, welches von dem Enzym benötigt wird

Bei der Transsulfurierung katalysiert die Vitamin B<sub>6</sub> abhängige Cystathionin-β-Synthase zunächst die Reaktion von Serin und Homocystein zu Cystathionin. Danach wird Cystathionin durch die ebenfalls Vitamin B<sub>6</sub> abhängige Cystathionin-γ-Lyase in Homoserin und Cystein umgewandelt.

Die Transsulfurierung stellt die Umwandlung von Homocystein in Cystein dar. Das Cystein kann u.a. zur Glutathionsynthese verwendet werden (Tchantchou, 2006). Die Cystathionin-β-Synthase (CBS) ist das erste Enzym der Transsulfurierung, es katalysiert die Umwandlung von Serin und Homocystein zu Cystathionin und Wasser. Das Enzym, ein Hämprotein (Kery et al., 1999), ist von Pyridoxal abhängig (Jhee und Kruger, 2005). Die CBS-Reaktion ist irreversibel und findet nur in der Leber, der Niere, dem Dünndarm, dem Pankreas und dem Gehirn statt (Finkelstein, 2000). Die Cystathionin-γ-Lyase katalysiert die Reaktion von Cystathionin zu Cystein und ist ebenfalls von

Vitamin B<sub>6</sub> abhängig (Lima et al., 2006). Cystein ist der limitierende Faktor der Glutathionsynthese (Garg et al., 2006).

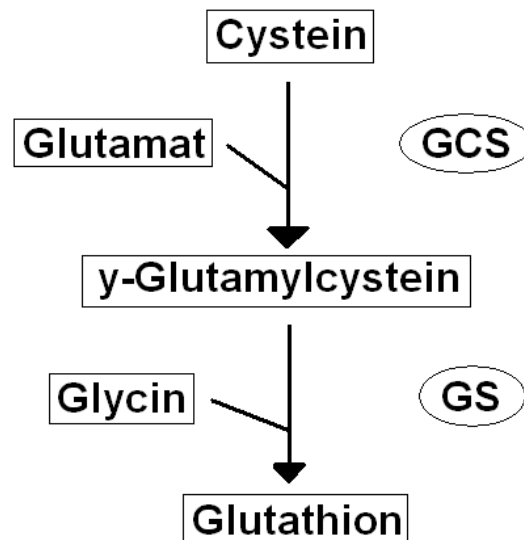
#### **2.1.3.5. Vitamin B<sub>6</sub>**

Ein Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizit kann kognitive Beeinträchtigungen und Demenz verursachen (Malouf et al., 2003). Des Weiteren setzt ein Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizit die Dopamineffizienz herab (Ebadi et al., 1982) und steigert die hepatische Glutathionkonzentration (Lima et al., 2006). Pyridoxal-5-Phosphat setzt die Wirkung von Cyaniden, Gentamin und Dopamin herab, da es Komplexe mit diesen Substanzen bildet (Keniston et al., 1987).

Die Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe ist weit verbreitet, oft in einer höheren Dosis als empfohlen (Zempleni, 1995). Nebenwirkungen der Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe sind Kopfschmerzen, Depressionen, chronische Schmerzen und periphere Neuropathien, eine Gabe von bis zu 100 mg am Tag gilt als unbedenklich (Bernstein, 1990). Eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe scheint das Risiko für Parkinson über einen Mechanismus unabhängig vom Homocysteinstoffwechsel zu senken, wahrscheinlich durch antioxidative Effekte und durch seine Rolle in der Dopaminsynthese (de Lau et al., 2006).

## 2.1.4. Glutathion

### 2.1.4.1. Glutathionsynthese



**Abbildung 6: Glutathionsynthese**

GCS =  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase

GS = Glutathionsynthetase

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

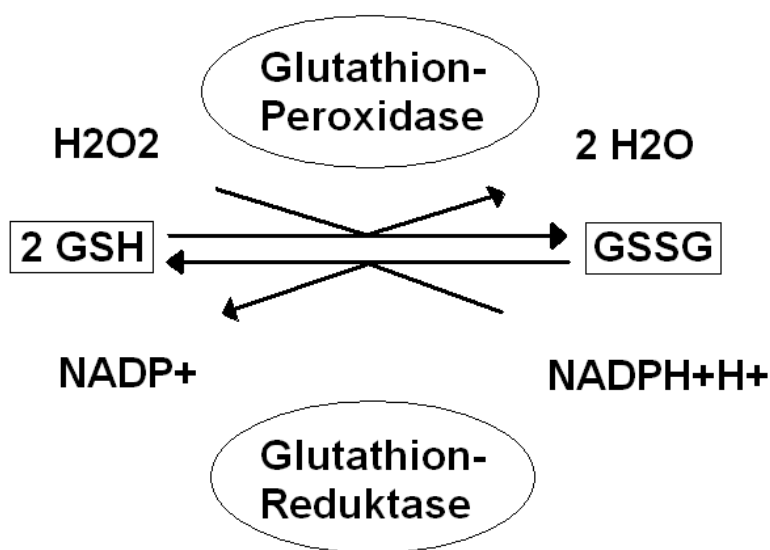
○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

Bei der Glutathionsynthese werden Cystein und Glutamat durch die  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase in  $\gamma$ -Glutamylcystein umgewandelt. Die Glutathionsynthetase katalysiert die Reaktion von  $\gamma$ -Glutamylcystein und Glycin zu Glutathion.

Glutathion wird überwiegend in der menschlichen Leber gebildet (Mosharov et al., 2000). Die Glutamylcysteinsynthetase (GCS) katalysiert die Synthese von Glutamylcystein aus den Aminosäuren Cystein, Glutamat und ATP. Dieses Enzym sowie die Verfügbarkeit von Cystein limitieren die Glutathionsynthese (Lu, 2008). Die GCS wird durch Glutathion über einen nicht allosterischen Feedback-Mechanismus gehemmt (Richman und Meister, 1975). Die Glutathionsynthetase (GS) benötigt ATP und die Aminosäure Glycin sowie Glutamylcystein zur Synthese von Glutathion (Huang et al., 1995).

Glutathion spielt eine Rolle bei der Detoxifikation, als mitochondriales Antioxidans und in der Modulation der Zellproliferation. Oxidativer Stress erhöht die Expression der Gene für die Enzyme der Glutathionsynthese. Bei Dysfunktion der Synthese kann es zu Diabetes, zur Lungenfibrose, zur cholestatischen Leberschädigung und zu Tumoren kommen (Lu, 2008).

#### 2.1.4.2. Glutathion als Antioxidans



**Abbildung 7: Entgiftungsfunktion des Glutathions**

GSH = Glutathion (reduziertes Glutathion)

GSSG = Glutathion-Disulfid (oxidiertes Glutathion)

$\text{H}_2\text{O}$  = Wasser

$\text{H}_2\text{O}_2$  = Wasserstoffperoxid

$\text{NADP}^+$  = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)

$\text{NADPH}^+\text{H}^+$  = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

Die Wirkung des Glutathions als Antioxidans kommt dadurch zustande, dass die Glutathion-Peroxidase reduziertes Glutathion und Oxidantien z.B. Wasserstoffperoxid in Wasser und oxidiertes Glutathion umwandelt. Die Glutathion-Reduktase katalysiert in einer  $\text{NADPH}^+\text{H}^+$  abhängigen Reaktion oxidiertes Glutathion wieder zu reduziertem Glutathion und  $\text{NADP}^+$ .

Glutathion liegt in zwei unterschiedlichen Formen, der reduzierten (GSH) und der oxidierten (GSSG) Form, vor (Leeuwenburgh und Ji, 1995). Glutathion ist eines der bedeuteten Antioxidantien im Körper (Ji und Fu, 1992) und beeinflusst das mitochondriale Redoxpotential (Seyfried und Wüllner, 2007), welches eine wichtige Rolle in der Kaskade des Zelltodes spielt (Hall, 1999). Das Enzym Glutathionperoxidase (GP) reduziert Oxidantien wie z.B. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ), indem es Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid oxidiert (GSSG) (Heyob et al., 2008). Die Regeneration reduzierten Glutathions erfolgt durch die Glutathionreduktase (GR) aus Glutathiondisulfid (GSSG), die Glutathionreduktase benötigt hierfür  $\text{NADP}^+\text{H}^+$ , welches sie zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert (Kussmaul et al., 1999).

Das Gehirn benötigt 20 % des Sauerstoffes ( $\text{O}_2$ ), der dem menschlichen Körper zu Verfügung steht und ist somit der Hauptsauerstoffverbraucher. Der oxidative Metabolismus ist dort sehr hoch, es fallen viele toxische  $\text{O}_2$ -Metaboliten an, die entgiftet werden müssen. Das Tripeptid Glutathion als Antioxidans ist deshalb im Gehirn besonders wichtig (Dringen, 2000). Im Alter entstehen vermehrt neuronale Defizite, induziert durch oxidativen Stress, möglicherweise durch unzureichende Glutathionspiegel (Bains und Shaw, 1997).

## **2.1.5. Verhältnis der Homocysteinabbauwege**

### **2.1.5.1. Verhältnis der Homocysteinabbauwege unter normalen Bedingungen**

Der Homocysteinzyklus kann in jedem Gewebe über die Transmethylierung ablaufen, die Transsulfurierung findet jedoch nur in der Leber, dem Pankreas, der Niere, dem Dünndarm und dem Gehirn statt (Finkelstein, 1998). In kardiovaskulären Geweben werden die CBS und die BHMT nicht exprimiert, die Verstoffwechselung von Homocystein läuft hier ausschließlich über die MS. Kardiovaskuläre Gewebe sind so bei hohen Homocysteinkonzentrationen besonders verwundbar, da der Abbau von Homocystein eingeschränkt ist (Chen et al., 1999). Die Leber besitzt ein Isoenzym von MAT, so ist sie in der Lage, besonders viel Methionin zu verstoffwechseln (Finkelstein, 1998).

SAM ist ein Inhibitor der MTHFR und ein Aktivator der CBS, so wird bei hohen SAM Konzentrationen die Remethylierung gehemmt und die Transsulfurierung gefördert. SAM wird irreversibel zu Cystein abgebaut und dadurch dem Kreislauf entzogen. Bei niedrigen SAM Konzentrationen

nen wird die Remethylierung nicht gehemmt. Methionin und somit auch SAM können vermehrt regeneriert werden (Selhub, 1999).

### **2.1.5.2. Verhältnis der Homocysteinabbauwege unter oxidativem Stress**

Oxidativer Stress, z.B. durch  $H_2O_2$ , fördert die Transsulfurierung und hemmt die Remethylierung, da die CBS aktiviert wird (Persa et al., 2004). Homocysteingabe induziert die GCL, dies ist ein Mechanismus, der dem oxidativem Stress bei einer Hyperhomocysteinämie entgegenwirkt (Bea et al., 2008). Die Transsulfurierung ist redoxsensitiv, das kann als autokorrektive Antwort angesehen werden, so wird die Glutathionsynthese bei Zellen die vermehrtem oxidativem Stress ausgesetzt sind gefördert (Mosharov et al., 2000).

Ein reduzierter Glutathionmetabolismus hingegen verhindert die Inaktivierung von Hydrogenperoxid und scheint die Formation von toxischen Hydroxylradikalen anzuregen (Jenner et al., 1992). Eine reduzierte Transsulfurierung führt zu einer verminderten Zellvitalität unter oxidativen Bedingungen (Vitvitsky et al., 2006).

## **2.2. Hyperhomocysteinämie**

### **2.2.1. Allgemeines**

Totales Homocystein (tHcys) ist definiert als die Summe aller Homocysteinarten im Plasma und im Serum inklusive der freien und der gebundenen Formen (Ueland et al., 1993). Die totale Homocysteinkonzentration im Plasma (tHcys) hängt von dem Geschlecht, dem Alter und der Herkunft ab. Die durchschnittlichen Werte in den USA betragen für weiße Männer 9,6  $\mu\text{mol/l}$ , für weiße Frauen 7,9  $\mu\text{mol/l}$ , für schwarze Männer 9,8  $\mu\text{mol/l}$  und für schwarze Frauen 8,2  $\mu\text{mol/l}$  (Jacques et al., 1999). Bei Kindern sind die tHcys Werte deutlich niedriger: bei weißen Jungen 6,2  $\mu\text{mol/l}$ , bei weißen Mädchen 5,8  $\mu\text{mol/l}$ , bei schwarzen Jungen 6,4  $\mu\text{mol/l}$  und bei schwarzen Mädchen 6,1  $\mu\text{mol/l}$  (Must et al., 2003).

Ein normaler Homocysteinspiegel liegt im Bereich zwischen 5-10  $\mu\text{mol/l}$  (Yang et al., 2005). Ab einer Konzentration von über 10  $\mu\text{mol/l}$  beginnt das Risiko für das Auftreten von kardiovaskulä-

ren Erkrankungen anzusteigen. Ab Werten von über 12  $\mu\text{mol/l}$  spricht man von einer moderaten Hyperhomocysteinämie. Diese Konzentrationen werden als zytotoxisch angesehen und treten bei 5 bis 10 % der Bevölkerung auf. Empfohlen werden Konzentrationen von kleiner als 10  $\mu\text{mol/l}$  (Stanger et al., 2003).

Folsäure-, Vitamin-B<sub>12</sub>- und Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizite und reduzierte Enzymaktivitäten inhibieren den Abbau von Homocystein, es folgt eine erhöhte Homocysteinkonzentration. Eine Hyperhomocysteinämie ist assoziiert mit einer Veränderung in der vaskulären Morphologie, dem Verlust der endothelialen antithrombotischen Funktion und der Induktion von prokaogulatorischen Prozessen (Stanger et al., 2004).

## **2.2.2. Ursachen der Hyperhomocysteinämie**

### **2.2.2.1. Vitaminmangelerscheinungen**

Mögliche Ursachen der Hyperhomocysteinämie sind Folatdefizite, Vitamin-B<sub>12</sub>-Defizite und Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizite. Durch einen Mangel dieser Vitamine kann Homocystein nicht mehr in ausreichender Menge über die Transsulfurierung und die Remethylierung verstoffwechselt werden, es resultiert eine Hyperhomocysteinämie. So führt ein selektives Folsäuredefizit zu einer zwei- bis vierfachen Erhöhung des tHcys (Lin et al., 1989). Niedrige zirkulierende Folatspiegel und Vitamin-B<sub>6</sub>-Spiegel erhöhen das Risiko für das Auftreten eines Schlaganfalls, einer KHK, einer peripheren vaskulären Erkrankung und einer Arteriosklerose (Robinson et al., 1998). Ein Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizit kann vaskuläre kognitive Schäden infolge eines erhöhten Homocysteinspiegels verursachen (Troen et al., 2008). Auch bei einem Vitamin-B<sub>12</sub>-Defizit ist das tHcys erhöht, es kann zu endothelialen Dysfunktionen (Zittan et al., 2007) und vaskulären Erkrankungen kommen (Brattström et al., 1988).

### **2.2.2.2. Enzymdefekte**

Eine weitere Ursache der Hyperhomocysteinämie sind Defekte der am Homocysteinestoffwechsel beteiligten Enzyme. Durch Genmutationen entstehen Enzymen, die entweder gar nicht mehr ihre Funktion ausüben oder die ihre Funktion nur noch eingeschränkt ausführen können.



Ein CBS-Defizit ist der Hauptgrund für die erbliche Hyperhomocysteinämie, derzeit sind über 100 unterschiedliche Mutationen im CBS-Gen bekannt (Fowler, 2005). Häufig wird der CBS-Mangel autosomal-rezessiv vererbt (Gaustadnes et al., 2002). Man unterscheidet bei den CBS-Mutationen zwischen Vitamin B<sub>6</sub> responsiven und nichtresponsiven Formen. Die Vitamin-B<sub>6</sub>-Responsiven sprechen auf eine Substitutionstherapie mit Vitamin B<sub>6</sub> an, ihre Symptome verbessern sich. Bei Nonresponsiven zeigt sich keine Veränderung nach einer Vitamin-B<sub>6</sub>-Substitution. Die beiden Hauptmutationen sind I287T, welche Vitamin B<sub>6</sub> responsiv ist, und G307S, die nicht Vitamin B<sub>6</sub> responsiv ist (Kraus, 1998). Unbehandelte Responsive haben im Durchschnitt einen höheren IQ als Nonresponsive, auch die typischen Symptome wie Dislokation der optischen Linse, thrombotische Ereignisse, Osteoporose und Tod treten bei unbehandelten Responsiven in einer geringeren Anzahl auf als bei Nonresponsiven (Mudd et al., 1985). Bei einem CBS-Defizit kann der Homocysteinspiegel auf bis zu 100-500 µmol/l ansteigen (Yang et al., 2005), und es können geistige Retardierung und epileptische Anfälle auftreten (Ramakrishnan et al., 2006).

Ein weiterer häufiger Enzymdefekt liegt im MTHFR-Gen und wird autosomal-rezessiv vererbt. Typische Merkmale dieser Mutation sind erhöhte Homocysteinlevel im Plasma, Homocystinurie, Progressive Ataxie, Dysarthrie, Tremor und geistige Veränderungen (Bishop et al., 2008). Die häufigsten Mutationen sind 677C>T und 1298A>C Polymorphismen, wobei die 677 Mutation schwerwiegender ist. Bei der 677 Mutation ist das Folat im Serum erniedrigt, das tHcys im Plasma ist erhöht. Bei der Mutation 1298 ist das auch der Fall, jedoch in einem geringeren Ausmaß (Ulvik et al., 2007). Auch eine Inhibition der an der Remethylierung beteiligten BHMT kann eine Hyperhomocysteinämie verursachen (Collinsova et al., 2006).

Ebenfalls kann einer Hyperhomocysteinämie eine Mutation der MAT zugrunde liegen (Linnebank et al., 2005). Bei diesem Defekt treten neurologische Probleme, eine Demyelinisierung sowie eine milde kognitive Beeinträchtigung auf (Chamberlin et al., 2000). Deutlicher als die Hyperhomocysteinämie ist bei einer MAT-Mutation die Hypermethioninämie, da Methionin nicht weiter verstoffwechselt werden kann (Ubagai, 1995).

Weitere Mutationen können in der MS (2756A>G) und in der MSR (66A>G) auftreten. Diese Defekte zeigen jedoch keine Veränderungen der Homocysteinkonzentration in Plasma (Jacques et al., 2003). Bei einer MSR-Mutation können Embryonen kleiner als normal sein und ein geringeres Gewicht haben, häufiger als normalerweise können Herzseptumdefekte und Neuralrohrdefekte auftreten (Deng et al., 2008). Andere Autoren berichten über das Auftreten von milden Hyperhomocysteinämien auch bei MS- und MSR-Mutationen (Rozen, 2000).

### **2.2.2.3. Weitere Ursachen der Hyperhomocysteinämie**

Auch Medikamente können eine Hyperhomocysteinämie verursachen. Eine L-Dopamedikation erhöht das tHcys, da L-Dopa u.a. über die SAM-abhängige COMT methyliert werden kann (s.2.2.3.3.) (Allain et al., 1995). Ebenfalls verursachen einige antiepileptische Medikamente eine Hyperhomocysteinämie (Obeid et al., 2007), besonders Phenytoin, Phenobarbital und Primidon (Apeland et al., 2001). Auch eine Valproat- oder Carbamazepin-Therapie erhöhen die Plasmaspiegel von Homocystein (Karabiber et al., 2003), ebenso wie die Gabe von Methotrexat und Sulfasalazin (Wei et al., 2007).

Eine Hyperhomocysteinämie kann auch als Begleiterscheinung bei anderen Krankheiten auftreten, so z.B. bei dem Marfan-Syndrom und dem Diabetes (Ramakrishnan et al., 2006).

### **2.2.3. Folgen der Hyperhomocysteinämie**

#### **2.2.3.1. Kardiovaskuläre Folgen**

Die Hälfte aller Todesfälle geht derzeit auf kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Komplikationen zurück (Stanger et al., 2004). Erhöhtes tHcys entspricht dem allgemeinen Risiko von Rauchen und Hyperlipidämie für vaskuläre Erkrankungen und gilt als ein unabhängiger Risikofaktor (Graham et al., 1997). Eine Hyperhomocysteinämie erhöht die kardiovaskuläre Mortalität und ist assoziiert mit chronischem Herzversagen (Selhub, 2008). Erhöhtes tHcys stellt einen Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit (KHK) dar (Nielsen et al., 2000). Die MTHFR-Mutation 677 erhöht das Risiko für das Auftreten einer KHK sogar um 16 % (Klerk et al., 2002). Bei diesem Mangel tritt die KHK deutlich früher auf als bei ansonsten Gesunden (Kluijtmans et al., 1996).

Ebenso ist die Hyperhomocysteinämie ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Arteriosklerose (Yang et al., 2005), 20-30 % der Patienten mit Arteriosklerose haben erhöhte Homocysteinspiegel (Tsai et al., 1994). Eine weitere Komplikation ist das Auftreten eines Hypertonus, so kann es bei einem Vitamin-B<sub>6</sub>-Defizit und der Mutation MTHFR 677 zu der Ausbildung eines Bluthochdruckes kommen (Lin et al., 2008). Hohe Homocysteinwerte stehen in einer unabhängigen Beziehung zu isolierten systolischen Hypertension bei älteren Menschen (Sutton-Tyrrell et al., 1997).

Eine weitere schwerwiegende Folge der Hyperhomocysteinämie ist die Schädigung der Gefäßwand und des Gerinnungssystems (Selhub und D'Angelo, 1998). So treten bei der Hyperhomocysteinämie vermehrt thrombotische Ereignisse auf (Sachdev, 2005), bei der CBS-Mutation 833 werden mehr Thromboembolien verzeichnet (Linnebank et al., 2003). Eine MTHFR-Mutation und das Faktor 5 Leiden erhöhen das Risiko der venösen Thromboembolie leicht (Eldibany und Caprini, 2007). Bei dem MTHFR-Defizit 677 und niedrigen Folatwerten steigt das Auftreten von arteriellen Nierenthrombosen (Queffenlou et al., 2002). Ferner ist eine Hyperhomocysteinämie assoziiert mit venösen Thrombosen und zerebralen Venenthrombosen bei Neugeborenen (Nagaraja et al., 2008). Polymorphismen des Homocysteinmetabolismus und ein vermehrtes Auftreten von intrakraniellen Aneurysmen wurden beschrieben (Semmler et al., 2008). Eine Erhöhung des tHcys sowie ein Vitamin-B<sub>6</sub>- und Folsäuremangel sind assoziiert mit Carotisstenosen bei älteren Menschen (Selhub et al., 1995).

Viele biologische Mechanismen werden derzeit in Bezug auf die kardiovaskuläre Pathologie von Homocystein diskutiert. Homocystein schädigt das vaskuläre Endothel bei defizitären MTHFR-Trägern und CBS-Trägern (Wang et al., 1992). In den dysfunktionalen Epithelien kann es bei Homocysteinämie zu toxischen schwefelhaltigen Ansammlungen in den zerstörten Zellen kommen (de Groot et al., 1983).

Die Hyperhomocysteinämie führt z.B. zur endothelialen Dysfunktion, welche durch oxidativen Stress verursacht wird (Chambers et al., 1999). Durch das Homocystein kommt es zur Produktion von Oxidantien, die Aminosäure kann außerdem mit der Schwefelgruppe von Proteinen reagieren und so Disulfide bilden. Ebenfalls kann Homocystein in ein sehr reaktionsfreudiges Thiolacton umgewandelt werden, welches mit Proteinen und Enzymen interagieren und diese verändern kann (Ramakrishnan et al., 2006).

Außerdem stimuliert Homocystein die Cholesterin- und Triglyceridsynthese (O K et al., 1998). Ebenfalls wird durch Homocystein das vaskuläre Muskelzellwachstum stimuliert und eine Hemmfunktion auf das Endothelzellwachstum ausgeübt (Tsai et al., 1994). Eine Erhöhung des tHcys verringert die Dilatation der Skelettmuskelzellen durch NO-Mangel (Ungvari et al., 1999).

### 2.2.3.2. Neurologische Folgen

Neben kardiovaskulären Folgen treten bei einer Hyperhomocysteinämie auch neurologische Folgen auf. Ein erhöhter tHcys Spiegel ist ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten eines Schlaganfalls bei älteren Personen (Boston et al., 1999). So steigt bei einer MTHFR-Mutation 677 das Risiko an, einen ischämischen Schlaganfall zu erleiden (Harmon et al., 1999). Die MTHFR-Mutation erhöht bei Kindern nicht nur das Risiko für Schlaganfälle, sondern auch für eine transitorische ischämische Attacke (TIA) und für weitere zerebrovaskuläre Erkrankungen (Prengher et al., 2001).

Erhöhte tHcys Werte sind assoziiert mit kognitiven Schäden im Frontallappen, die Hauptkomponente liegt bei kleineren oder größeren Schlaganfällen, auch ein nicht vaskulärer neurotoxischer Effekt von Homocystein scheint eine Rolle zu spielen (Sachdev et al., 2003). Ein Folatdefizit und die resultierende Hyperhomocysteinämie führen zu einem erhöhten Schlaganfallrisiko, zu einem erhöhten oxidativen DNA-Schaden und zu zerebralen ischämischen Gehirnverletzungen (Endres et al., 2005).

Auch ist eine Hyperhomocysteinämie ein unabhängiger Risikofaktor für ein Gedächtnisdefizit im Alter (Nurk et al., 2005). Es existiert eine gegensätzliche Beziehung zwischen erhöhtem tHcys und verschiedenen kognitiven Bereichen (Elias et al., 2005). Erhöhte Homocysteinwerte steigern das Risiko an einer Demenz zu erkranken (Seshadri et al., 2002). Viele alte Menschen haben ein Vitamin-B<sub>12</sub>- und ein Folatdefizit und eine höhere Wahrscheinlichkeit an M. Alzheimer zu erkranken (Joosten et al., 1997). Eine Hyperhomocysteinämie ist ebenfalls assoziiert mit einer niedrigeren geistigen Leistung bei nicht dementen älteren Menschen (Prins et al., 2002).

Eine Hyperhomocysteinämie und niedriges Folat sind Korrelate von depressiven Symptomen bei mittelalten Patienten (Sachdev et al., 2005). Es besteht eine Assoziation zwischen einem niedrigen Vitamin-B-Status und dem Auftreten einer Depression (Obeid et al., 2007).

Ebenso scheint das tHcys eine Bedeutung bei der Schizophrenie zu haben, in der Exazerbationsphase der Erkrankung ist das tHcys erhöht, in der Remissionsphase der Erkrankung ist das tHcys erniedrigt (Petronijevic et al., 2008).

Eine Erhöhung des tHcys scheint eine Rolle bei Epilepsie zu spielen (Obeid et al., 2007). Die MTHFR-Mutationen 677 und 1298 traten bei Patienten mit Epilepsie signifikant häufiger auf als bei gesunden Menschen (Caccamo et al., 2004).

Eine Verbindung zwischen Hyperhomocysteinämie und Multiple Sklerose wird diskutiert (Obeid et al., 2007).

Auch bei M. Parkinson spielt die Hyperhomocysteinämie eine Rolle, erhöhtes tHcys und niedrige Folatspiegel verursachen eine Sensitivierung der dopaminergen Neurone gegenüber Umwelteinflüssen, welche zur Dysfunktion und zum Zelltod führen (Duan et al., 2002).

Homocystein ist an der Pathogenese von mehreren neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt, wichtige Mechanismen der homocysteinbedingten Neurodegeneration sind folgende: Homocystein verursacht oxidativen Stress, DNA-Schäden, triggert die Apoptose und wirkt direkt toxisch (Sachdev, 2005). Homocystein erhöht die Vulnerabilität in den Neuronen im Hippocampus durch oxidativen Stress sowie durch direkte Toxizität, so induziert es die Apoptose in Neuronen im Hippocampus (Kruman et al., 2000). Ein weiterer Pathomechanismus der durch Homocystein verursachten Neurotoxizität kommt zustande durch eine Überstimulation der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren). Homocystein wirkt als Agonist an der Glutamatbindungsstelle des Rezeptors und als Antagonist an der Glycinbindungsstelle (Lipton et al., 1997).

### **2.2.3.3. Andere Folgen**

Die Hyperhomocysteinämie erhöht das Risiko für osteoporotische Frakturen bei älteren Menschen, es kommt zum Knochendichteverlust und zu Hüftfrakturen, so setzen niedrige Vitaminspiegel der B Gruppe die Knochengesundheit herab (McLean et al., 2008). Ein Vitamin-B<sub>12</sub>-Defizit gilt als Risikofaktor für Osteoporose und Knochendeformationen (Tucker et al., 2005).

Die Hyperhomocysteinämie steht in Verbindung mit Schwangerschaftskomplikationen und Entwicklungsstörungen. Hinzu kommt, dass durch neonatale Hypoxie die Homocysteinkonzentration ebenfalls erhöht werden kann (Blaise et al., 2005). Des Weiteren ist ein erhöhtes tHcys assoziiert mit Präeklampsie und Eklampsie, der Schweregrad nimmt mit steigendem Homocystein zu (Hoque et al., 2008). Ebenso wird Homocystein als Risikofaktor für einen Neuralrohrdefekt diskutiert (Selhub, 2008).

Auch in der Augenheilkunde spielt die Hyperhomocysteinämie eine Rolle, die MTHFR-Mutation 677 ist assoziiert mit einer Makroangiopathie (Maeda et al., 2006). Bei CBS-Mutationen kann eine Abnahme von Cystein eine Abnahme von Glutathion bedingen und zu Augenerkrankungen

führen. Es kann zu einer Dislokation der Linse, zu sekundären Glaukomen, zur Optikusatrophie und zu Ablagerungen in der Retina kommen (Ramakrishnan et al., 2006).

Eine weitere Komplikation der Hyperhomocysteinämie ist eine Zunahme der Leberverfettung und -fibrose bei chronischen Hepatitis C Patienten (Adinolfi et al., 2005). Bei Alkoholikern ist eine Hyperhomocysteinämie assoziiert mit dem Auftreten einer Gehirnatrophie, bei der Alkoholentwöhnung kommt es bei erhöhtem tHcys zu vermehrten Krämpfen (Bleich et al., 2004).

#### **2.2.4. Vitamingabe bei Hyperhomocysteinämie**

Folsäuresubstitution senkt den Homocysteinspiegel und ist somit eine sinnvolle Therapieoption bei einer Hyperhomocysteinämie (Mattson et al., 2002). Folsäuregabe senkt bei Langzeitbehandlung und normalen Vitamin-B<sub>12</sub>-Spiegeln das tHcys bei Patienten mit KHK, ebenfalls nimmt bei der Folatsubstitution die Karotiden-Intima-Media-Dicke ab (Fernandez-Miranda et al., 2007). Das Risiko von kognitiven Einschränkungen im Alter kann durch Folatgabe reduziert werden (Kado et al., 2005). Folsäuretherapie kann bei Kindern nach einem Schlaganfall und bei Kindern, die mit antiepileptischen Medikamenten behandelt werden, gegeben werden, wodurch der Plasmahomocysteinspiegel sinkt (Cardo et al., 1999). Bei der Substitutionstherapie hat 5-MTHF die gleiche Wirkung wie Folsäure (Litynsti et al., 2002). Folsäurebehandlung und Vitamin-B<sub>12</sub>-Behandlung senken das tHcys-Level bei Neugeborenen (Nagaraja et al., 2008).

Ebenfalls verändern sich durch die Vitaminsubstitution die Plasmakonzentrationen von endothelialen Markern wie Thrombomodulin, von Willebrandfaktor und Plasminogenaktivator (PTA), so ist z.B. die PTA nach einem Schlaganfall und Vitaminsubstitution niedriger als ohne Vitamingabe (Macko et al., 2002).

Niedrige Homocysteinkonzentrationen durch Folsäure-, Vitamin B<sub>12</sub>- und Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe senken das kardiovaskuläre Risiko bei CBS Patienten (Wilcken und Wilcken, 1997). Bei einem CBS-Defizit ist die erste Therapieoption die Vitamin-B<sub>6</sub>- und Cysteingabe (Ramakrishnan et al., 2006). Betaintherapie ist eine sinnvolle Behandlungsoption bei den Nonrespondern (Wilcken et al., 1983).

Bei Trägern der MTHFR-Mutation 677 senkt die Vitamin-B<sub>12</sub>- und Folsäuresubstitution das tHcys (Moriyama et al., 2002). Die Effizienz von der Vitamin-B<sub>12</sub>- und Folsäuresubstitution in

Bezug auf das Plasmahomocystein ist jedoch abhängig von dem jeweiligen MTHFR Genotyp (Nakamura et al., 2002).

Eine überwachte orale Substitution mit Vitamin B<sub>12</sub> gilt als erste Therapieoption bei neurologischen Fehlfunktionen durch ein Vitamin B<sub>12</sub>-Defizit (Wellmer et al., 2006).

Vitamin C kann gegen, durch Homocystein induzierten, oxidativen Stress gegeben werden um der endothelialen Dysfunktion entgegenzuwirken (Chambers et al., 1999). Eine SAM-Substitutionstherapie kann bei der Behandlung der Depression eingesetzt werden (Bressa, 1994), ebenso scheint die SAM-Gabe gegen Osteoarthritis zu helfen (Soeken et al., 2002).

## 2.3. M. Parkinson

### 2.3.1. Allgemeines

M. Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit altersabhängiger Prävalenz (Eggert et al., 2008). Juveniler Parkinson ist sehr rar und meist genetisch bedingt (Schrag und Schott, 2006). Die Hauptsymptome der Erkrankung sind Bradykinesie, Rigor und Tremor (Gelb et al., 1999). Häufig werden auch eine Veränderung der Sprache, ein abnormaler Gang (Mutch et al., 1986), sowie Schluck- und Kaustörungen beobachtet (Hartelius und Svensson, 1994). Im Verlauf der Krankheit kommt es zu nicht motorischen Symptomen wie Depression, Verlust der Motivation, Passivität und Demenz (Miyasaki et al., 2006). Des Weiteren wird über Angst, Müdigkeit und Schlafstörungen berichtet (Shulman et al., 2002).

Es existiert kein spezifischer Diagnosetest für M. Parkinson, man muss die klinischen Zeichen genau beachten um den M. Parkinson von den Differenzialdiagnosen, die auch als Parkinson plus Syndrome bezeichnet werden, unterscheiden zu können. Die Differenzialdiagnosen sind die Progressive Supranukleäre Lähmung (PSP), die Multisystem Atrophie (MSA), die kortikobasale Degeneration (CBD), der vaskuläre Parkinsonismus (VP) und der Parkinsonismus mit Demenz (Lewy bodies, LBD) (Bhat und Weiner, 2005).

Die Pathologie zeigt den Verlust von Neuromelanin enthaltenden Monoaminneuronen, besonders von Dopaminneuronen in der Substantia nigra pars compacta (Fahn, 2003). Über 80 % der dopaminergen nigrostriatalen Neuronen sind bei M. Parkinson Patienten bereits untergegangen wenn es zu Symptomen kommt (Spina und Cohen, 1989). In diesen Dopaminneuronen finden sich zytoplasmatische eosinophile Einschlüsse, so genannte Lewy bodies (Fahn, 2003). Lewy bodies finden sich in der Substantia nigra, dem Hypothalamus, dem Hypocampus, in autonomen Gliazellen und im olfaktorischen Trakt (Nussbaum und Polymeropoulos, 1997).

Die genaue Ätiologie des M. Parkinson ist ungeklärt (Corti et al., 2005), Umweltfaktoren und genetische Faktoren scheinen eine Rolle zu spielen (Warner und Schapira, 2003). Vier Genloci wurden bislang mit dem neuronalen Zelltod bei M. Parkinson in Verbindung gebracht, ein Genprodukt ist  $\alpha$ -Synuklein, ein Bestandteil der Lewy bodies (Riess et al., 2000). Mutationen im Synuklein-Gen führen zu einem familiären Morbus Parkinson mit hoher Penetranz (Xu et al., 2002). Eine weitere Komponente ist die autosomal-dominant erbliche Mutation für die Ubiquitin-



Hydrolase (Polymeropoulos, 2000). Entzündlich immune und autoimmune Zeichen konnten in post mortem Gehirnen festgestellt werden (Wersinger und Sidhu, 2006).

Mögliche Therapieoptionen sind die L-Dopa-Behandlung, die Dopa-Agonisten-Therapie, die Gabe von COMT- und MAO-Hemmer, die Amantadin-Behandlung sowie die tiefe Hirnstammstimulation (Weiner, 2006).

Die Krankheit ist ein fortschreitender Prozess (Fahn, 2003), die Progression von M. Parkinson ist individuell jedoch sehr unterschiedlich (Shulman et al., 2008).

### **2.3.2. Nebenwirkungen der L-Dopa Medikation bei M. Parkinson**

L-Dopa wurde 1967 in die Parkinsontherapie eingeführt (Fahn, 2006) und stellt nach wie vor die effektivste Behandlung von M. Parkinson dar (Thanvi und Lo, 2004).

Es ist bis heute nicht geklärt ob L-Dopa neurotoxisch oder neuroprotektiv wirkt (Fahn, 2006). L-Dopa erzeugt in Zellkulturen freie Radikale und hat so einen toxischen Effekt (Halkias et al., 2007). L-Dopa führt in vitro bei katecholinerger Zellen zur Apoptose und somit zu neuronalen Schäden, dies würde die Progression von M. Parkinson beschleunigen (Walkinshaw und Waters, 1995). Andererseits wird L-Dopa jedoch auch ein neuroprotektiver Effekt zugesprochen (Bhat und Weiner, 2005).

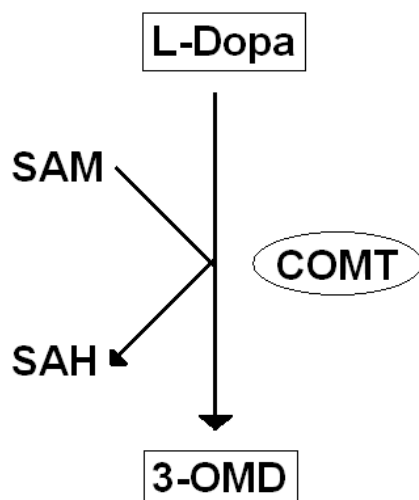
Nach einigen Jahren treten L-Dopa-resistente Phänomene auf. Infolge der Krankheit kommt es zu Versteifungen, zu Sprachschäden, zur autonomen Dysfunktion, zu Stimmungsschwankungen und kognitiven Einschränkungen (Thanvi und Lo, 2004). Ebenso kommt es zu Gang-, Balance- und Schlafproblemen (Rascol et al., 2003).

Hauptnebenwirkung der L-Dopatherapie sind Fluktuationen und Dyskinesien (Fahn, 2003). Zu den durch L-Dopa induzierten Dyskinesien gehören Chorea und Dystonien, auch Myoklonien können auftreten (Fahn, 2000). Nach Jahren tritt bei L-Dopa ein Wirkungsverlust auf und die Akinesie nimmt zu, dieses Phänomen wird als "end of dose" oder "wearing off" bezeichnet (Weiner, 2006). L-Dopa verursacht gastrointestinale und neuropsychische Nebenwirkungen (Halkias et al., 2007), so kann dieses Medikament z.B. Psychosen induzieren (Thanvi und Lo, 2004).

Erhöhte Homocysteinspiegel und erniedrigte Folatspiegel kommen bei Patienten mit Parkinson, die mit L-Dopa behandelt werden, gehäuft vor (Obeid et al., 2007). Die Hyperhomocysteinämie bei M. Parkinson ist vermutlich Folge der Methylierung von L-Dopa durch die COMT (Qureshi

et al., 2008). Bei einer L-Dopatherapie sind die Cystein- und Schwefelkonzentrationen im Plasma normal (Allain et al., 1995), auch Cysteinglycinspiegel sind nicht erhöht (Kuhn et al., 1998). Eine chronische Gabe von L-Dopa steigert das tHcys, die dann zum Fortschreiten der Erkrankung durch neuropsychische Symptome und vaskuläre Nebenwirkungen führt (Müller, 2008).

### 2.3.3. Wirkung von L-Dopa auf den Homocysteinstoffwechsel



**Abbildung 8: L-Dopaabbau**

COMT = Catechol-O-Methyl-Transferase

L-Dopa = Levo-Dopa

3-OMD = 3-O-Methyl-Dopa

SAM = S-Adenosylmethionin

SAH = S-Adenosylhomocystein

→ = wird verstoffwechselt zu

□ = Substrat oder Produkt, welches weiter verstoffwechselt wird

○ = Enzym, welches die Reaktion katalysiert

Die Catechol-O-Methyl-Transferase katalysiert die Reaktion von Levo-Dopa und S-Adenosylmethionin zu S-Adenosylhomocystein und 3-O-Methyl-Dopa.

Levo-Dopa (L-Dopa) wird im Gastrointestinaltrakt, in der Niere und in der Leber durch die Dopa-Decarboxylase, welche Vitamin B<sub>6</sub> als Cofaktor braucht, zu Dopamin metabolisiert. Die zentrale Umwandlung von L-Dopa in Dopamin geschieht an dopaminergen, an serotonergen und

an adrenergen Nervenendigungen durch die Decarboxylase. Dopamin wird über die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und über die Monoaminoxidase (MAO) metabolisiert. Die Hauptabbauprodukte von Dopamin sind Homovanillinsäure und Dihydroxyphenylelessigsäure. 70-80 % der Abbauprodukte werden über den Urin ausgeschieden (Halkias et al., 2007).

Die Verstoffwechslung von L-Dopa verbraucht SAM, die COMT katalysiert die Reaktion von L-Dopa und SAM zu SAH und 3-O-Methyl-Dopa (3-OMD) (Heider et al., 2004). Die Methylierungsrate ist bei L-Dopa 4-5 mal höher als bei Dopamin (Liu et al., 2000). L-Dopa induziert die Enzyme MAT und COMT, so beschleunigt L-Dopa seinen eigenen Abbau (Zhao et al., 2001).

Bei einem alternativen Abbauweg der Desaminierung von Dopamin entsteht durch die Monoaminoxidase (MAO) neben Dihydroxyphenylelessigsäure und Homovanillinsäure auch Wasserstoffperoxid, ein schädliches Oxidans (Spina und Cohen, 1989).

#### **2.3.4. Folsäuregabe bei M. Parkinson**

Derzeit befürworten einige Autoren eine Folsäuresubstitutionstherapie zur Behandlung der Hyperhomocysteinämie bei Patienten mit M. Parkinson (dos Santos et al., 2009). Eine Folat- und Cobalaminsubstitution kann bei einer durch eine L-Dopatherapie erzeugten Hyperhomocysteinämie den Homocysteinspiegel wieder senken (Lamberti et al., 2005). Ebenfalls wird eine Zusatzmedikation mit COMT-Hemmer befürwortet, da dadurch der L-Dopaabbau, bei dem vermehrt Homocystein entsteht, gehemmt wird (Müller, 2008). Der COMT-Inhibitor Tolcapone senkt das tHcys und SAH-Konzentrationen im Plasma. Tolcapone kann jedoch auch zur Lebertoxizität führen (Müller und Kuhn, 2006). Werden die Patienten zusätzlich zur L-Dopatherapie mit einem COMT-Inhibitor behandelt, treten jedoch noch niedrigere Folat- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Werte im Plasma auf. Deshalb ist die Folat- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Gabe besonders wichtig (Triantafyllou et al., 2007).

Vergleicht man Patienten mit einer Hyperhomocysteinämie, die mit L-Dopa therapiert werden, mit Parkinsonpatienten, welche nicht mit L-Dopa therapiert werden, fällt auf, dass man bei den Patienten mit L-Dopatherapie mehr Vitamine der B-Gruppe substituieren muss um den Homocysteinspiegel im Referenzbereich zu halten, als bei nicht mit L-Dopa therapierten Patienten (Miller et al., 2003).

### 2.3.5. Oxidativer Stress bei M. Parkinson

Oxidativer Stress wird als ein Hauptrisikofaktor in Bezug auf den Beginn und das Fortschreiten von M. Parkinson und M. Alzheimer angesehen (Kedar, 2003). So führt oxidativer Stress unter anderem zu oxidativen Produkten, zu 4-Hydroxynonenal (HNE), zu NO vermitteltem Stress, zu Entzündungsreaktionen, zu mitochondrialen Dysfunktionen und zu einer veränderten Proteolyse. Diese Mechanismen könnten zu einer dopaminergen Zelldegeneration bei M. Parkinson führen (Jenner und Olanow, 2006).

Glutathion ist bei M. Parkinson Patienten in der Substantia nigra erniedrigt, in anderen Gehirnregionen ist es jedoch unverändert (Sian et al., 1994). Die Spiegel von reduziertem Glutathion sind erniedrigt (Dexter et al., 1994), die von oxidiertem Glutathion sind erhöht (Spina und Cohen, 1988). Da reduziertem Glutathion in der Substantia nigra nicht mehr genügend vorhanden ist, kann es dort seiner Funktion als Antioxidans nicht mehr ausreichen nachkommen. So kommt es bei niedrigen Glutathionleveln zur Degeneration von dopaminergen Neuronen. (Li et al., 1997). Gamma-Glutamyltranspeptidase, ein Enzym, das Glutathion aus den Gliazellen heraus transportiert, ist bei M. Parkinson selektiv in der Substantia Nigra erhöht. Gamma-Glutamyl-Cysteinsynthetase, ein Enzym der Glutathionsynthese, ist unverändert, ebenso wie die Glutathionperoxidase und die Glutathiontransferase unverändert sind. So ist reduziertem Glutathion zum einen erniedrigt, weil es aus der Zelle vermehrt hinaus transportiert wird und zum anderen dadurch, dass es zu oxidiertem Glutathion umgewandelt wird, da bei M. Parkinson Patienten mehr Oxidantien wie Hydrogenperoxid vorhanden sind (Sian et al., 1994).

Glutathion-Gabe wäre eine Möglichkeit um den oxidativen Stress zu senken, jedoch kann Glutathion die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, deshalb muss man andere Mittel finden, die dem oxidativem Stress entgegenwirken.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

##### **3.1.1. Allgemeines**

Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank. Benutzt wurde eine Werkbank der Klasse 2 nach DIN 12950 (Heraeus Instruments, hera safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Das Arbeiten in der Zellkultur muss besonders sorgfältig und präzise erfolgen, da die Zellen sehr empfindlich und leicht in ihrem Wachstum beeinflussbar sind. Besonders gefürchtet ist die Verunreinigung der Zellkultur mit Pilzen. Deshalb wurde die Arbeitsfläche der Werkbank vor und nach jeder Benutzung mit 70 % Alkohol gereinigt. Bei der Arbeit wurden Einmalhandschuhe getragen, die vor jeder Arbeit unter der Hood desinfiziert wurden. Alle dort verwendeten Materialien waren steril und wurden erst unter der Werkbank aus ihrer Verpackung gelöst. Die Medium-Flasche, die PBS (Phosphate buffered saline)-Flasche und alle verwendeten Falcons mit den Lösungen der Chemikalien wurden vor jeder Benutzung ebenfalls mit 70 % Alkohol desinfiziert.

##### **3.1.2. PC12-Zellen**

###### **3.1.2.1. Allgemeines**

PC12-Zellen sind Phäochromozytomzellen aus dem Nebennierenmark der Ratte. 1976 wurden sie von Greene und Tischler erstmals aus einem Nebennierentumor einer bestrahlten Ratte gewonnen. Sie enthalten 40 Chromosomen und synthetisieren und speichern die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin.

### **3.1.2.2. Zellmedium**

Als Medium wurde RPMI 1640 (PPA Laboratories, Pasching, Österreich) mit einem Zusatz von 10 % Horseserum (HS), 5 % inaktiviertes fetales Kälberserum (FCSi) und 1 % Penicillin und Streptomycin (P/S) verwendet. Das Medium wurde in einem Kühlschrank bei 8 °C gelagert und vor jedem Gebrauch mindestens zehn Minuten lang in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt.

### **3.1.2.3. Wachstumsbedingungen**

Die Zellen reagieren sehr empfindlich auf Umgebungseinflüsse. Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden sie, nachdem sie in der Zellkultur bearbeitet wurden, immer im Brutschrank aufbewahrt. Dort wurden die Zellen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO<sub>2</sub> bebrütet.

PC12-Zellen wachsen semi-adhären. Gab man sie direkt nach dem Auftauen (s.u.) in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland), schwammen sie zunächst frei im Medium. Das Wachstum der Zellen in den Kulturflaschen wurde unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Firma Zeiss) kontrolliert. Schon nach wenigen Stunden hatten sich einige der Zellen an dem Boden der Kulturflasche abgesetzt.

### **3.1.2.4. Auftauen und Einfrieren**

Die hier verwendeten PC12-Zellen waren in 1 ml Kryoröhrchen bei –80 °C eingefroren. So können sie über mehrere Monate gelagert werden, ohne dass man sie ständig Passagieren muss. Längere Lagerungen sollten in –196 °C Stickstoff erfolgen.

Beim Auftauen wurden die Kryos in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten, bis der Inhalt begann aufzutauen. Jetzt war zügiges Arbeiten nötig, um die Zellen durch die Toxizität des Einfriermediums nicht zu gefährden. Der Inhalt des 1 ml Kryos wurde zu 9 ml Medium in ein 15 ml Falcon pipettiert. Danach wurde der Inhalt des Falcons bei 20 °C und 1500 Umdrehungen/min 5 min lang zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet am Boden des Falcons

mit 10 ml frischem Medium resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup>- Kulturflaschen ausgesät.

Zum Einfrieren der Zellen wurde RPMI 1640 Medium mit 50 % inaktiviertem fetalem Kälberserum und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Nach Passagierung mit Trypsin (s.u.) und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand aus dem 15 ml Falcon abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml des Einfriermediums resuspendiert und in ein 1 ml Kryo überführt. Dieser Vorgang erforderte, wie auch schon das Auftauen zügiges Arbeiten. Um die toxischen Einfluss des DMSO so gering wie möglich zu halten wurden die Kryos sofort auf Eis gestellt und danach bei –80 °C gelagert.

### **3.1.2.5. Passagierung**

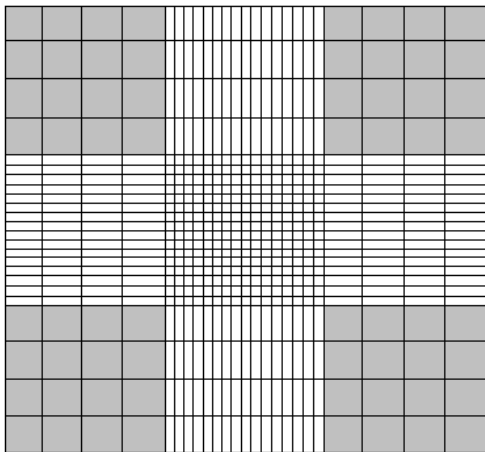
Nach ca. 3-4 Tagen waren die 75 cm<sup>2</sup>- Kulturflaschen voll, d.h. der Boden der Flasche war komplett mit einem Zellrasen übersät. Daneben fanden sich immer noch Zellen, die frei im Medium schwammen, da die PC12-Zellen ein semi-adhärentes Wachstumsverhalten zeigen. Wenn der Boden der Kulturflaschen mit einem Zellrasen bedeckt war, mussten die Zellen passagiert werden, da die Zellen sonst aus Platz- und Nährstoffmangel absterben. Hierbei wurde zunächst das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurde der Zellrasen mit 10 ml PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen, welches anschließend direkt wieder abgesaugt wurde. Das PBS wurde zunächst wie das folgende Trypsin im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Als nächstes wurde 1 ml Trypsin (Trypsin EDTA 1:250, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) dazugegeben, die Kulturflasche wurde hin- und hergeschwenkt, damit sich das Trypsin gleichmäßig verteilt und dann für 5 min in den Brutschrank gestellt, da Trypsin bei 37 °C sein Wirkungsoptimum hat. Trypsin bewirkt die Lösung von adhärennten Zellen am Boden der Kulturflasche. Unter dem Mikroskop sah man, dass sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgekugelt hatten und frei in dem Trypsin schwammen. Anschließend wurden die evtl. noch restlichen adhärennten Zellen durch Zugabe von 9 ml Medium mit der Pipette in die nach unten schräg gehaltene Flasche abgespült. Das Medium wurde so mehrmals resuspendiert, um alle Zellen mitzunehmen. Zuletzt wurden die insgesamt 10 ml in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zunächst mit nur 2 ml frischem Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette, welche zuvor durch mehrfaches Durchziehen durch eine

Bunsenbrennerflamme verengt worden war, resuspendiert. Durch die verengte Pasteurpipette können Zellklumpen beim mehrfachen Resuspendieren vereinzelt werden. Danach wurden 8 ml frisches Medium hinzugegeben. Entweder wurden die Zellen nun in einem 1:5 Split (2 ml Zellsuspension und 8 ml frisches Medium) in eine neue Kulturflasche gefüllt oder die Zellen wurden gezählt und für Versuche in 96-Well-Platten ausgesät (s.u.).



### 3.1.2.6. Zellzahlbestimmung

Um Versuche mit den PC12-Zellen durchführen zu können, mussten diese gezählt werden, damit man später eine bestimmte Menge an Zellen in die einzelnen Wells aussähen konnte. Hierbei wurden die Zellen aus den Kulturflaschen zunächst wie in 3.1.2.5. erklärt passagiert, danach hat man in einem 15 ml Flacon 10 ml Zellsuspension, in welcher man die Zellzahl bestimmen wollte. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauerzählkammer. Ein Deckglas wurde angehaucht und auf die Zellkammer gelegt, bis so genannte Newtonringe sichtbar wurden. An den Rand des Deckglases wurden 10  $\mu$ l von der Zellsuspension aus dem Falcon gegeben, diese 10  $\mu$ l wurden durch Kapillarkräfte in den Raum zwischen Kammer und Deckglas gezogen. Nun wurden die 4 äußeren Großquadrate (s. Abbildung 9, Darstellung in Grau) unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert multipliziert mit  $10^6$  ergibt die Zellzahl pro 10 ml.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Neubauerzählkammer**

Mit Hilfe der Neubauerzählkammer ist eine Zellzahlbestimmung möglich, in Grau sind die auszufählenden Quadrate dargestellt.

### 3.1.2.7. Kollagenbeschichtung der 96-Well-Platten

Um die Adhärenz der PC12-Zellen zu verbessern, wurden die 96-Well-Platten (Greiner Bio-one) zunächst mit Kollagen beschichtet. Das hierbei verwendete Kollagen (Kollagen Typ 1) stammt aus Rattenschwanzsehnen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und wurde bei 2-8 °C gelagert. Das Kollagen aus dem Gefäß wurde in 5 ml Essigsäure gelöst, so dass die Kollagenlösung eine Konzentration von 2 mg/ml hatte. Diese Stammlösung wurde mit Aqua dest. verdünnt (0,875 µl Kollagenstammlösung und 19,125 µl Aqua dest.), von der Verdünnung wurden jeweils 30 µl in ein Well pipettiert, um somit jedes Well mit einer Endkonzentration von 5 µl/cm<sup>2</sup> Kollagen zu beschichten (da die Well-Größe 0,35 cm<sup>2</sup> entspricht, ergaben sich so 1,75 µg Kollagen pro Well). Die äußersten Reihen der 96-Well-Platten wurden nicht mit Kollagen beschichtet, da dort die Messergebnisse auf Grund des Randeffektes ungenau werden. Deshalb blieben die äußersten Reihen bei den Versuchen leer. Die mit Kollagen beschichteten Platten mussten für 12 h unter der sterilen Werkbank getrocknet werden, bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

### 3.1.2.8. Aussähen in 96-Well-Platten

	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	
	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	
	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	
	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	
	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	
	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	PC12	

**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbringens der PC12-Zellen auf eine 96-Well-Platte**

PC12= PC12-Zellen

Die PC12-Zellen wurden wie in der Abbildung auf die 96-Well-Platte aufgebracht.

In die mit Kollagen vorbehandelten 96-Well-Platten wurden die ausgezählten PC12-Zellen ausgesät. Es wurden jeweils nur die inneren 60 Wells verwendet, die äußersten Wells blieben leer um dem Randeffect vorzubeugen (außen wachsen die empfindlichen Zellen meist schlechter). Pro Well wurden jeweils 10000 Zellen in 100 µl Medium ausgesät. Die Wellplatten wurden danach für 24 h in den Brutschrank gestellt, damit sich die PC12-Zellen am Boden ablagern konnten.

### **3.1.3. Chemikalien**

#### **3.1.3.1. Homocystein**

##### **3.1.3.1.1. Allgemeines**

Verwendet wurde in allen Versuchen DL-Homocystein (Sigma, St. Louis, USA, Produktnummer H4628). Das Molekulargewicht des weißlichen Pulvers beträgt 135,18. Das Pulver wird bei -20 °C aufbewahrt.

##### **3.1.3.1.2. Herstellung der Stocklösung**

Das Molekulargewicht von dem verwendeten Homocystein beträgt 135,18, d.h. einer 1 molare Lösung entsprechen 135,18 g des Pulvers in 1000 ml Flüssigkeit gelöst. Um eine Stocklösung von 100 mmol/l zu erzeugen, sind also 135,18 mg, gelöst in 10 ml nötig. Das abgewogene Pulver wurde in 10 ml Kulturmedium gelöst, die Lösung trug die Farbe des Mediums. Danach wurde die Lösung mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen sterilen Filter in ein neues Falcon überführt, dies ist notwendig um etwaige Verunreinigungen des Pulvers zu beseitigen. Von dieser Stocklösung aus konnten alle weiteren Verdünnungen hergestellt werden, z.B. ergab sich eine Konzentration von 20 mmol, wenn man 20 µml der Stocklösung mit 80 µml Medium mischte.

### 3.1.3.1.3. Bestimmung der LD-50 von Homocystein

Die LD-50 von Homocystein, d.h. die Konzentration, bei der noch 50 Prozent der PC12-Zellen leben, wurde bereits in der Arbeitsgruppe bestimmt, sie betrug 10 mM (Jarre, 2008). Diese Versuche wurden wiederholt, um zu gewährleisten, dass die ermittelte LD-50 auch auf den hier verwendeten PC12-Zell-Klon zutrifft.

Nachdem die PC12-Zellen wie in 3.1.2.8. beschrieben in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 h in den Brutschrank gestellt worden waren, wurde zunächst das Medium vorsichtig am Rand von jedem Well abgesaugt ohne den Zellrasen zu beschädigen. In den beiden Kontrollreihen wurden in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert. In den anderen Reihen wurden in jedes Well 100 µl einer Lösung mit der jeweils angegebenen Homocysteinkonzentration (s. Abbildung 11) pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well-Platte wieder für 24 h in den Brutschrank gestellt und nach diesem Zeitraum mit Alamar-Blue gemessen (s.u.).

	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	
	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	Kont.	
	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	5mM	
	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	
	15mM	15mM	15mM	15mM	15mM	15mM	15mM	15mM	15mM	15mM	
	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	

**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Versuchsreihe zur Bestimmung der LD-50 von Homocystein auf einer 96-Well-Platte**

Kont. = Kontrolle  
 5 mM = 5 mM Hcys  
 10 mM = 10 mM Hcys  
 15 mM = 15 mM Hcys  
 20 mM = 20 mM Hcys

24 h nach dem Aussähen der PC12-Zellen wurde das Medium aus den einzelnen Wells entfernt. In die Wells der Kontrollreihen wurden je 100 µl frisches Medium, in die anderen Wells wurden je 100 µl einer Lösung der angegebenen Homocysteinkonzentration pipettiert.

### **3.1.3.2. L-Dopa**

#### **3.1.3.2.1. Allgemeines**

Verwendet wurde in allen Versuchen L-3,4-Dihydroxyphenylalanin Methyl Ester Hydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA, Produktnummer D1507). Das Molekulargewicht des weißlichen Pulvers beträgt 247,68. Das Pulver wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.1.3.2.2. Herstellung der Stocklösung**

Das Molekulargewicht von dem verwendeten L-Dopa beträgt 247,68, d.h. einer 1 molaren Lösung entsprechen 247,68 g des Pulvers in 1000 ml Flüssigkeit gelöst. Um eine Stocklösung von 5 mmol/l zu erzeugen, sind also 18,5774 mg, gelöst in 15 ml, nötig. Das abgewogene Pulver wurde in 10 ml PBS gelöst, es entsteht eine klare, farblose Lösung. Danach wurde die Lösung mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen sterilen Filter in ein neues Flacon überführt. Da die L-Dopalösung lichtempfindlich ist, wurden alle verwendeten Falcons mit Alufolie umhüllt, da diese lichtundurchlässig ist kann so die Lösung vor Lichteinfluß geschützt werden. Von dieser Stocklösung aus konnten alle weiteren Verdünnungen hergestellt werden, z.B. ergab sich eine Konzentration von 500  $\mu\text{mol}$ , wenn man 10  $\mu\text{l}$  der Stocklösung mit 90  $\mu\text{l}$  Medium mischte.

#### **3.1.3.2.3. Bestimmung der LD-50 von L-Dopa**

Der Versuchsaufbau zur Bestimmung der LD-50 von L-Dopa erfolgte analog der Bestimmung von der LD-50 von Homocystein, nur das in diesem Versuch L-Dopalösungen mit Konzentrationen zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  ansteigend mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  Unterschied verwendet wurden. Beim Aufbringen der L-Dopalösung wurde das Licht unter der Hood ausgeschaltet, um die lichtempfindliche L-Dopalösung nicht zu beeinflussen.

#### 3.1.3.2.4. Wirkung von Homocystein auf die L-Dopatoxizität

Nachdem ermittelt wurde, dass die LD-50 von Homocystein bei 10 mM und die von L-Dopa zwischen 300-350  $\mu\text{M}$  lag (s. 4.1.1.1. und 4.1.1.2.), sollte bestimmt werden, inwieweit die gleichzeitige Gabe von Homocystein und L-Dopa die Zellvitalität beeinflusst. Hierzu wurden die PC12-Zellen zunächst wieder 24 h bebrütet. Danach wurde das Medium abgesaugt. In der Homocystein- und der L-Dopakontrollreihe wurde in jedes Well 100  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Lösung (10 mM Hcys oder 350  $\mu\text{M}$  L-Dopa) pipettiert, in die anderen Wells wurden 100  $\mu\text{l}$  einer Lösung pipettiert, die 10 mM Homocystein und 350  $\mu\text{M}$  L-Dopa gemeinsam enthielt. Danach wurden die Zellen weitere 24 h bebrütet und nach diesem Zeitraum mit Alamar-Blue gemessen.

Bei dem vorherigen Versuch lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass das Homocystein und das L-Dopa in der gemeinsamen Lösung miteinander extrazellulär reagieren, sodass bei den Ergebnissen nicht sicher von einer intrazellulären Reaktion der Stoffe ausgegangen werden kann. Deshalb erfolgte zusätzlich zu der gemeinsamen Gabe von Homocystein und L-Dopa eine aufeinander folgende Inkubation.

Untersucht wurde, wie eine Präinkubation der Zellen mit Homocystein die L-Dopatoxizität beeinflusst. Hierzu wurden die ausgesäten PC12-Zellen zunächst 24 h bebrütet (s. 3.1.2.8.). Danach wurde das Medium abgesaugt, in der Kontrollreihe und in der L-Dopakontrollreihe wurde in jedes Well 100  $\mu\text{l}$  frisches Medium und in alle anderen Reihen 100  $\mu\text{l}$  der Homocysteinlösung mit einer Konzentration von 10 mM (LD-50) pipettiert. Danach wurden die Platten wieder für 24 h bebrütet. Am folgenden Tag wurde das Medium wieder komplett abgesaugt und in der Kontrollreihe und in der Homocysteinkontrollreihe in jedes Well 100  $\mu\text{l}$  frisches Medium pipettiert. In alle anderen Reihen wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der L-Dopalösung mit einer Konzentration von 350  $\mu\text{M}$  pipettiert. Danach wurden die Zellen weitere 24 h bebrütet und nach diesem Zeitraum mit Alamar-Blue gemessen.

### **3.1.3.3. Vitamin B<sub>6</sub>**

#### **3.1.3.3.1. Allgemeines**

Verwendet wurde in allen Versuchen Pyridoxal Hydrochlorid (Sigma, St. Louis, USA, Produkt-nummer P6155). Das Molekulargewicht des weißlichen Pulvers beträgt 203,62. Das Pulver wird bei -20 °C gelagert.

#### **3.1.3.3.2. Herstellung der Stocklösung**

Das Molekulargewicht von dem verwendeten Vitamin B<sub>6</sub> beträgt 203,62, d.h. einer 1 molaren Lösung entsprechen 203,62 g des Pulvers in 1000 ml Flüssigkeit gelöst. Um eine Stocklösung von 100 mmol/l zu erzeugen, sind also 203,62 mg, gelöst in 10 ml, nötig. Das abgewogene Pulver wurde in 10 ml PBS gelöst, es entstand eine leicht gelbliche Lösung. Danach wurde die Lösung mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen sterilen Filter in ein neues Falcon überführt. Von dieser Stocklösung aus konnten alle weiteren Verdünnungen hergestellt werden, z.B. ergab sich eine Konzentration von 10 mmol, wenn man 10 µl der Stocklösung mit 90 µl Medium mischte.

#### **3.1.3.3.3. Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> auf PC12-Zellen**

Der Versuchsaufbau zur Bestimmung der Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> auf die PC12-Zellen erfolgte analog der Bestimmung von der LD-50 von Homocystein, nur dass in diesem Versuch Vitamin-B<sub>6</sub>-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 1 nM und 10 mM, ansteigend mit jeweils 10 µM Unterschied verwendet wurden.

#### **3.1.3.3.4. Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität**

Es sollte untersucht werden, inwieweit eine Präinkubation der Zellen mit Vitamin B<sub>6</sub> die Homocysteintoxizität beeinflusst. Hierzu wurden die ausgesäten PC12-Zellen zunächst 24 h bebrütet (s. 3.1.2.8.). Danach wurde das Medium abgesaugt und in der Kontrollreihe wurde in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert. In alle anderen Reihen wurden jeweils 100 µl pro Well von der Vitamin-B<sub>6</sub>-Lösung in unterschiedlichen Konzentration von 10 nM bis 1 mM pipettiert. In der letzten Reihe wurde in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert (Homocysteinkontrollreihe). Danach wurden die Platten wieder für 24 h bebrütet. Am folgenden Tag wurde das Medium wieder komplett abgesaugt und in der Kontrollreihe in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert. In alle anderen Reihen wurden jeweils 100 µl der Homocysteinlösung mit einer Konzentration von 10 mM pipettiert. Danach wurden die Zellen weitere 24 h bebrütet und nach diesem Zeitraum mit Alamar-Blue gemessen.

#### **3.1.3.4. Vitamin B<sub>12</sub>**

##### **3.1.3.4.1. Allgemeines**

Verwendet wurde in allen Versuchen Vitamin B<sub>12</sub> (Sigma, St. Louis, USA, Produktnummer V6629). Das Molekulargewicht des dunkelroten Pulvers beträgt 1355,37. Das Pulver wird bei 2-8 °C gelagert.

##### **3.1.3.4.2. Herstellung der Stocklösung**

Das Molekulargewicht von dem verwendeten Vitamin B<sub>12</sub> beträgt 1355,37, d.h. einer 1 molaren Lösung entsprechen 1355,37 g des Pulvers in 1000 ml Flüssigkeit gelöst. Um eine Stocklösung von 10 mmol/l zu erzeugen, sind also 13,5537 mg, gelöst in 1 ml, nötig. Das abgewogene Pulver wurde in 1 ml PBS gelöst, es entstand eine dunkelrote Lösung. Danach wurde die Lösung mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen sterilen Filter in ein neues Falcon überführt. Von



dieser Stocklösung aus konnten alle weiteren Verdünnungen hergestellt werden, z.B. ergab sich eine Konzentration von 1 mmol, wenn man 10 µl der Stocklösung mit 90 µl Medium mischte.

#### **3.1.3.4.3. Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf PC12-Zellen**

Der Versuchsaufbau zur Bestimmung der Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf die PC12-Zellen erfolgte analog der Bestimmung von der LD-50 von Homocystein, nur dass in diesem Versuch Vitamin-B<sub>12</sub>-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 1 mM, ansteigend mit jeweils 10 µM Unterschied verwendet wurden.

#### **3.1.3.4.4. Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität**

Der Versuchsaufbau erfolgte analog dem der Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität. Nur das in diesem Versuch Vitamin-B<sub>12</sub>-Lösungen anstatt der Vitamin-B<sub>6</sub>-Lösungen verwendet wurden.

#### **3.1.3.5. Folsäure**

##### **3.1.3.5.1. Allgemeines**

Verwendet wurde in allen Versuchen Folsäure (Sigma, St. Louis, USA, Produktnummer F8758). Das Molekulargewicht des gelblichen Pulvers beträgt 441,4. Das Pulver wird bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.1.3.5.2. Herstellung der Stocklösung**

Das Molekulargewicht von der verwendeten Folsäure beträgt 441,4, d.h. einer 1 molare Lösung entsprechen 441,4 g des Pulvers in 1000 ml Flüssigkeit gelöst. Um eine Stocklösung von 10 mmol/l zu erzeugen, sind also 44,14 mg, gelöst in 10 ml, nötig. Das abgewogene Pulver wurde in 10 ml Natriumhydroxid (NaOH) (1M) gelöst, es entstand eine gelbliche Lösung. Danach wurde die Lösung mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und über einen sterilen Filter in ein neues Falcon überführt. Da die Folsäurelösung lichtempfindlich ist, wurden alle verwendeten Falcons mit Alufolie umhüllt. Von dieser Stocklösung aus konnten alle weiteren Verdünnungen hergestellt werden, z.B. ergab sich eine Konzentration von 1 mmol, wenn man 10 µl der Stocklösung mit 90 µl Medium mischte.

### **3.1.3.5.3. Herstellung der NaOH-Lösung**

Das verwendete Natrium ( $\text{Na}^+$ ) lag in Form von Kugeln vor, wird bei Raumtemperatur gelagert und besitzt ein Molekulargewicht von 40, d.h. einer 1 molaren Lösung entsprechen 40 g Kugeln in 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Um eine 1 molare Stocklösung zu erzeugen, sind also 4 g, gelöst in 100 ml, notwendig.

### **3.1.3.5.4. Wirkung von Folsäure auf PC12-Zellen**

Der Versuchsaufbau zur Bestimmung der Wirkung von Folsäure auf die PC12-Zellen erfolgte analog der Bestimmung von der LD-50 von Homocystein, nur dass in diesem Versuch Folsäurelösungen mit Konzentrationen zwischen 10 nM und 10 µM, ansteigend mit jeweils 10 µM Unterschied verwendet wurden.

### **3.1.3.5.5. Wirkung der Folsäure auf die Homocysteintoxizität**

Es sollte untersucht werden, inwieweit eine Präinkubation der Zellen mit Folsäure die Homocysteintoxizität beeinflusst. Hierzu wurden die ausgesäten PC12-Zellen zunächst 24 h bebrütet (s. 3.1.2.8.), Danach wurde das Medium abgesaugt und in der Kontrollreihe und in der Homocysteinkontrollreihe in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert. In alle anderen Reihen wurden jeweils 100 µl pro Well von der Folsäure-Lösung in der Konzentration von 10 nM bzw. 100 nM pipettiert. Danach wurden die Platten wieder für 24 h bebrütet. Am folgenden Tag wurde das Medium wieder komplett abgesaugt und in die Kontrollreihe und in die Folsäurekontrollreihe wurden in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert. In alle anderen Reihen wurden jeweils 100 µl der Homocysteinlösung mit einer Konzentration von 10 mM pipettiert. Danach wurden die Zellen weitere 24 h bebrütet und nach diesem Zeitraum mit Alamar-Blue gemessen (s.u.).

### **3.1.4. Fibroblasten**

#### **3.1.4.1. Fibroblastenzelllinien**

Fibroblasten sind im Bindegewebe vorkommende Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Synthese der Interzellulärsubstanz, der extrazellulären Matrix, spielen. In dieser Arbeit wurden diese Zellen verwendet, da es von den Fibroblasten humane Zelllinien mit Mutationen im MTHFR- und CBS-Gen gibt. Bei den Fibroblastenzelllinien mit einer Mutation im MTHFR-Gen wird Homocystein fast ausschließlich über die Transsulfurierung abgebaut, bei den Fibroblastenzelllinien mit einer Mutation in CBS-Gen wird Homocystein nahezu vollständig über die Remethylierung verstoffwechselt. So konnte bei Mäusen mit einem CBS-Defizit eine erhöhte Aktivität der MTHFR nachgewiesen werden (Alberto et al., 2007).

Verwendet wurden folgende humane Fibroblastenzelllinien: Wildtyp ID 278, Zellen mit MTHFR-Defekt (Restaktivität unter 5 %) ID 928 und ID 1015 sowie Zellen mit CBS-Defekt (Restaktivität unter 5 %) ID 1069 und ID 1111. Diese Mutanten haben alle einen erhöhten basalen Homocysteinspiegel.

Fibroblasten wachsen im Unterscheid zu PC12-Zellen komplett adhärent und bilden am Boden von den Zellkulturflaschen langgestreckte Fortsätze aus, die unter dem Mikroskop gut sichtbar sind.

#### **3.1.4.2. Zellmedium**

Als Medium wurde DMEM (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) mit einem Zusatz von 20 % aktiviertem fetalen Kälberserum (FCSa) und 1 % Penicillin und Streptomycin (P/S) verwendet. Das Medium wurde in einem Kühlschrank bei 8 °C gelagert und vor jedem Gebrauch mindestens zehn Minuten lang in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt.

### **3.1.4.3. Wachstumsbedingungen**

Die Wachstumsbedingungen entsprechen denen der PC12-Zellen (s. 3.1.2.3.). Allerdings wachsen die Fibroblasten adhärent.

### **3.1.4.4. Auftauen und Einfrieren**

Das Auftauen und Einfrieren erfolgte analog der Behandlung der PC12-Zellen (s. 3.1.2.4.).

### **3.1.4.5. Passagierung**

Der Passagierungsvorgang entspricht dem der PC12-Zellen (s. 3.1.2.5.), nur dass die mit Trypsin behandelten Zellen 10 min anstatt 5 min im Brutschrank verblieben, da Fibroblasten stärker am Boden der Zellkulturflaschen haften.

### **3.1.4.6. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte analog derer bei den PC12-Zellen (s. 3.1.2.6.).

### **3.1.4.7. Aussähen in 96-Well-Platten**

Der Aussähevorgang entsprach dem der PC12-Zellen (s. 3.1.2.7.). Eine Kollagenbeschichtung der Platten war auf Grund des ausschließlich adhärenen Wachstumsverhaltens der Fibroblasten nicht notwendig. Auf einer 96-Well-Platte wurden immer Fibroblasten einer Linie ausgesät.

### **3.1.5. Substanzzugabe bei den Fibroblastenlinien**

#### **3.1.5.1. Homocysteinwirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien**

Nachdem die Fibroblasten, wie in 3.1.4.7. beschrieben, in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 h in den Brutschrank gestellt worden waren, wurde zunächst das Medium vorsichtig am Rand von jedem Well abgesaugt, ohne den Zellrasen zu beschädigen. In die Kontrollreihen wurden in jedes Well 100 µl frisches Medium pipettiert. In die anderen Reihen wurden in jedes Well 100 µl der 10 mM Homocysteinlösung pipettiert. Anschließend wurden die 96-Well-Platten wieder für 24 h in den Brutschrank gestellt und nach diesem Zeitraum mit Alamar-Blue gemessen (s.u.).

#### **3.1.5.2. L-Dopawirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien**

Die L-Dopaversuche erfolgten analog den Homocysteinversuchen, nur dass statt 10 mM Hcys 300 µM L-Dopa verwendet wurden.

### **3.2. Vitalitätsmessung**

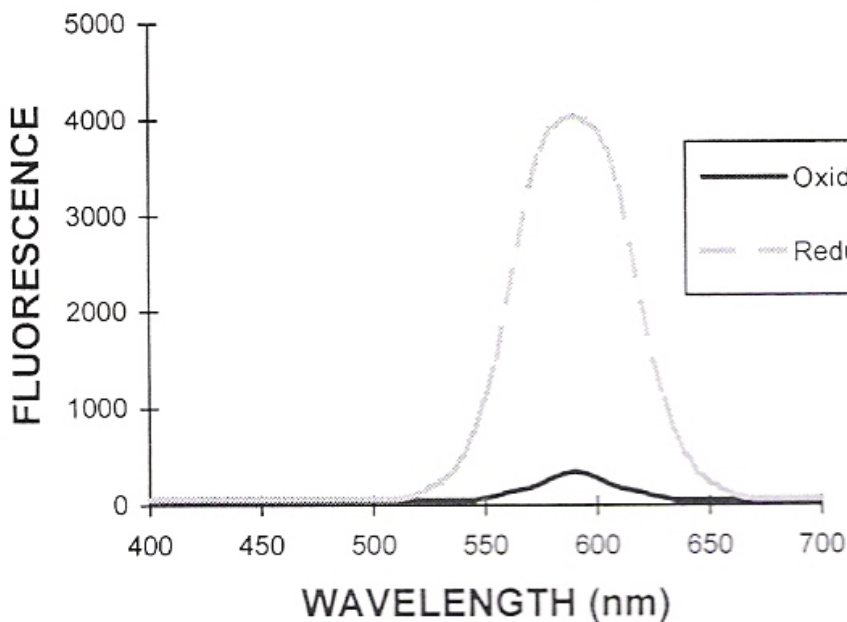
#### **3.2.1. Allgemeines**

#### **3.2.2. Alamar-Blue-Behandlung**

24 h nach ihrer letzten Behandlung wurden die Zellen auf die Alamar-Blue-Messung vorbereitet. Das Medium wurde in allen Wells vorsichtig abgesaugt. Danach wurden in jedes Well je 100 µl PBS und 10 µl Alamar-Blue™ (BioSource, Fleurus, Belgien) pipettiert. Das verwendete Alamar-Blue™ wird im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die 96-Well-Platte wurde für zwei weitere Stunden in den Brutschrank gestellt und nach diesem Zeitraum gemessen.

### 3.2.3. Alamar-Blue-Messung

Die Fluoreszenz-Messung erfolgte im SpectraMax Gemini Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA) bei einer Extinktion von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm und mit dem dazugehörigen Computerprogramm SOFTmax<sup>®</sup> pro. Das Prinzip dieses Verfahren beruht darauf, dass der in der oxidativen Form vorliegende Farbstoff Alamar-Blue<sup>™</sup> zunächst blau ist, sich in der reduzierten Form jedoch rot darstellt. Vitale Zellen sind mit Hilfe ihrer Reduktionsäquivalenten FAD, NADH, NADPH und FMNH in der Lage den Alamar-Blue-Farbstoff zu reduzieren, so dass dieser sich von blau nach rot verfärbt. So kann mit Hilfe dieser Fluoreszenzmessung (der rote reduzierte Farbstoff ist fluoreszierend, der blaue oxidierte nicht) die Vitalität der in den einzelnen Wells vorhandenen Zellen abgeschätzt werden.



**Abbildung 12: Fluoreszenz-Emissions-Spektrum von Alamar Blue**

Die Fluoreszenz ist bei einer Anregungswellenlänge von 530-650 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm dargestellt (AlamarBlue<sup>™</sup> Assay U.S. Patent No. 5, 501, 959; BioSource International, Camarillo, Ca, USA).

### 3.2.4. PBS-Reaktion

Um auszuschließen, dass die 100 µl PBS, die mit jeweils 10 µl Alamar-Blue in die Wells pipettiert werden (s. 3.2.2.), mit diesem reagieren, wurden in leere 96-Well-Platten direkt 100 µl PBS und 10 µl Alamar-Blue™ pipettiert und nach zwei Stunden im Brutschrank gemessen. Die mittlere Fluoreszenz der Reaktion des PBS mit dem Alamarblaufarbstoff lag im Mittel bei 226,688. Dieser Wert wurde immer vom Wert der gemessenen Fluoreszenz abgezogen (s.u.), da er nicht die Vitalität der Zellen, sondern die Reaktion des PBS mit dem Alamar-Blue widerspiegelt.

### 3.3. Statistik

Die statische Auswertung erfolgte mit Excel, folgende Werte (s. Tabelle 1) wurden bei allen Versuchen ermittelt und anschließend in Diagrammen dargestellt. Die einzelnen Versuche wurden mehrfach wiederholt.

Überprüft wurde bei den Phäochromozytom-Zellen jeweils, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Vitalität der Zellen der Kontrollen (unbehandelte Zellen) gegenüber der Vitalität der mit den unterschiedlichen Substanzen behandelten Zellen gibt.

Zunächst wurde aus den einzelnen Fluoreszenzwerten der Kontrollen, welche mit dem SpectraMax Gemini Reader bestimmt worden waren, ein Mittelwert bestimmt (s. Tabelle 1). Dieser Mittelwert, der die Vitalität der Kontrollzellen widerspiegelt, wurde gleich 100 % gesetzt. Nach dem gleichen Muster wurde ein Mittelwert für die behandelten Zellen erstellt. Dieser Mittelwert wurde ebenfalls in Prozent umgerechnet und im Bezug zum Kontrollwert dargestellt. Mit Hilfe dieser Werte konnten die Diagramme im Ergebnissteil angefertigt werden.

Bei den Fibroblasten-Versuchen wurde die Vitalität der unterschiedlichen Fibroblastenzelllinien (Wildtyp, MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten) nach Behandlung mit Homocystein oder L-Dopa miteinander verglichen. Für jede einzelne Fibroblastenzelllinie wurde aus der Vitalität der Kontrollzellen ein Mittelwert bestimmt. Dieser absolute Wert wurde gleich 100 % gesetzt. Für die mit Homocystein- oder L-Dopagabe behandelten Zellen wurde ebenfalls ein Mittelwert errechnet und prozentual zum Mittelwert der jeweiligen Kontrollmittelwerte gesetzt.



	<b>Kontrolle</b>	<b>5mM Hcys</b>	<b>10mM Hcys</b>	<b>15mM Hcys</b>	<b>20mM Hcys</b>
	1938,1	1587,2	1057,9	826,59	555,90
	2105,0	1772,4	985,84	1015,8	635,81
	1957,7	1571,9	1010,6	910,43	749,76
	1802,8	1618,5	976,29	886,11	830,84
	1821,8	1659,5	1052,7	930,03	808,53
	1812,4	1546,2	1032,9	890,32	751,10
	2014,7	1706,5	1089,9	1003,8	678,13
	2148,5	1667,6		803,29	550,77
	2048,0	1531,3			554,28
	2124,9				
	1945,8				
	2127,4				
	1804,7				
	1805,6				
	1952,2				
	2074,8				
<b>Mittelwert</b>	1967,78	1629,01	1029,45	908,30	679,46
<b>Mittelwert – PBS-Reaktion</b>	1741,08	1402,31	802,75	681,60	452,76
<b>Standardabweichung</b>	128,85	79,46	41,03	75,28	111,27
<b>Mittelwert [%]</b>	100	80,54	46,11	39,15	26,00
<b>Standardabweichung [%]</b>	7,40	4,56	2,36	4,32	6,39
<b>Anzahl der Werte</b>	16	9	7	8	9

**Tabelle 1: Statistische Darstellung der Fluoreszenzwerte zur Bestimmung der LD-50 von Hcys**

Aus den einzelnen Fluoreszenzwerten der unbehandelten Zellen (Kontrolle) und den Fluoreszenzwerten der Zellen nach Zugabe der unterschiedlichen Homocysteinkonzentrationen wurde jeweils der Mittelwert, der Mittelwert minus die PBS-Reaktion, die Standardabweichung, der Mittelwert in Prozent, die Standardabweichung in Prozent und die Anzahl der Werte errechnet.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte über SPSS mittels Anova. Zunächst wurde in einem Globaltest geklärt, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gibt. Anschließend wurde durch einen Post-Hoc-Test nach Bonferroni untersucht zwischen welchen Gruppen es einen signifikanten Unterschied gibt. Als Signifikanzniveau  $\alpha$  wurden bei allen Tests 0,05 gewählt.

	<b>Quadratsumme</b>	<b>df</b>	<b>Mittel der Quadrate</b>	<b>F</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Z.d.G.</b>	1,313E7	4	3281689,763	322,052	0,000
<b>I.d.G.</b>	448357,062	44	10189,933		
<b>Gesamt</b>	1,358E7	48			

**Tabelle 2: One way Anova zur Bestimmung der LD-50 von Hcys**

Z.d.G.: Zwischen den Gruppen

I.d. G.: Innerhalb der Gruppen

df = degrees of freedom, Freiheitsgrade der Anova

F = Prüfgröße der Anova

In der Tabelle 2 erkennt man, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen gibt. In diesem Fall handelte es sich um fünf verschiedene Gruppen (die Homocysteinkontrollgruppe, die Gruppe mit einer Konzentration von 5 mM Homocystein, die Gruppe mit einer Konzentration mit 10 mM Homocystein, die Gruppe mit einer Konzentration von 15 mM Homocystein und die Gruppe mit einer Konzentration von 20 mM Homocystein). Dieser Test wurde bei allen Versuchen durchgeführt. Es zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, sodass zur weiteren Differenzierung jeweils ein Post-Hoc-Test nach Bonferroni angeschlossen wurde.

		<b>Mittlere Differenz</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>95%-Konfidenzintervall Untergrenze</b>	<b>95%-Konfidenzintervall Obergrenze</b>
Kont.	5mM	338,7639	42,0605	0,000	214,453	463,075
Kont.	10mM	938,3279	45,7447	0,000	803,128	1073,528
Kont.	15mM	1059,4787	43,7106	0,000	930,291	1188,667
Kont.	20mM	1288,3172	42,0605	0,000	1164,006	1412,628
5mM	Kont.	-338,7639	42,0605	0,000	-463,075	-214,453
5mM	10mM	599,5640	50,8716	0,000	449,211	749,917
5mM	15mM	720,7149	49,0505	0,000	575,744	865,685
5mM	20mM	949,5533	47,5860	0,000	808,911	1090,195
10mM	Kont.	-938,3279	45,7447	0,000	-1073,528	-803,128
10mM	5mM	-599,5640	50,8716	0,000	-749,917	-449,211
10mM	15mM	121,1509	52,2441	0,251	-33,258	275,560
10mM	20mM	349,9894	50,8716	0,000	199,637	500,342
15mM	Kont.	-1059,4787	43,7106	0,000	-1188,667	-930,291
15mM	5mM	-720,7149	49,0505	0,000	-865,685	-575,744
15mM	10mM	-121,1509	52,2441	0,251	-275,56	33,258
15mM	20mM	228,8385	49,0505	0,000	83,868	373,809
20mM	Kont.	-1288,3172	42,0605	0,000	-1412,628	-1164,006
20mM	5mM	-949,5533	47,5860	0,000	-1090,195	-808,911
20mM	10mM	-349,9894	50,8716	0,000	-500,342	-199,637
20mM	15mM	-228,8385	49,0505	0,000	-373,809	-83,868

**Tabelle 3: Post-Hoc-Test nach Bonferroni zur Bestimmung der LD-50 von Hcys**

Kont. = Kontrolle  
 5 mM = 5 mM Hcys  
 10 mM = 10 mM Hcys  
 15 mM = 15 mM Hcys  
 20 mM = 20 mM Hcys

Der Post-Hoc-Test nach Bonferroni zeigt zwischen welchen der Gruppen es einen signifikanten Unterschied gibt. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse des Post-Hoc-Testes zur Bestimmung der LD-50 von Homocystein. Zwischen der Gruppe 10 mM Homocystein und der Gruppe 15 mM Homocystein besteht nach diesem Test kein signifikanter Unterschied. Zwischen allen anderen Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied. Der Test nach Bonferroni wurde bei allen Ergebnissen in dieser Arbeit verwendet.

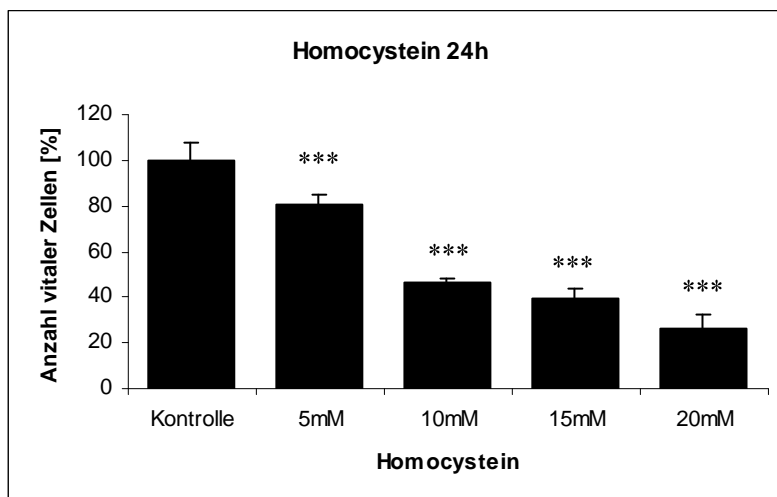
## 4. Ergebnisse

### 4.1. PC12-Versuche

#### 4.1.1. PC12-Versuche mit Homocystein und L-Dopa

##### 4.1.1.1. Bestimmung der LD-50 von Homocystein

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der jeweiligen Homocysteinkonzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Homocystein behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 13: Ergebnisse der Bestimmung der LD-50 von Homocystein**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle ( \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

5mM = 5mM Homocystein, 10mM = 10mM Homocystein

15mM = 15mM Homocystein, 20mM = 20mM Homocystein

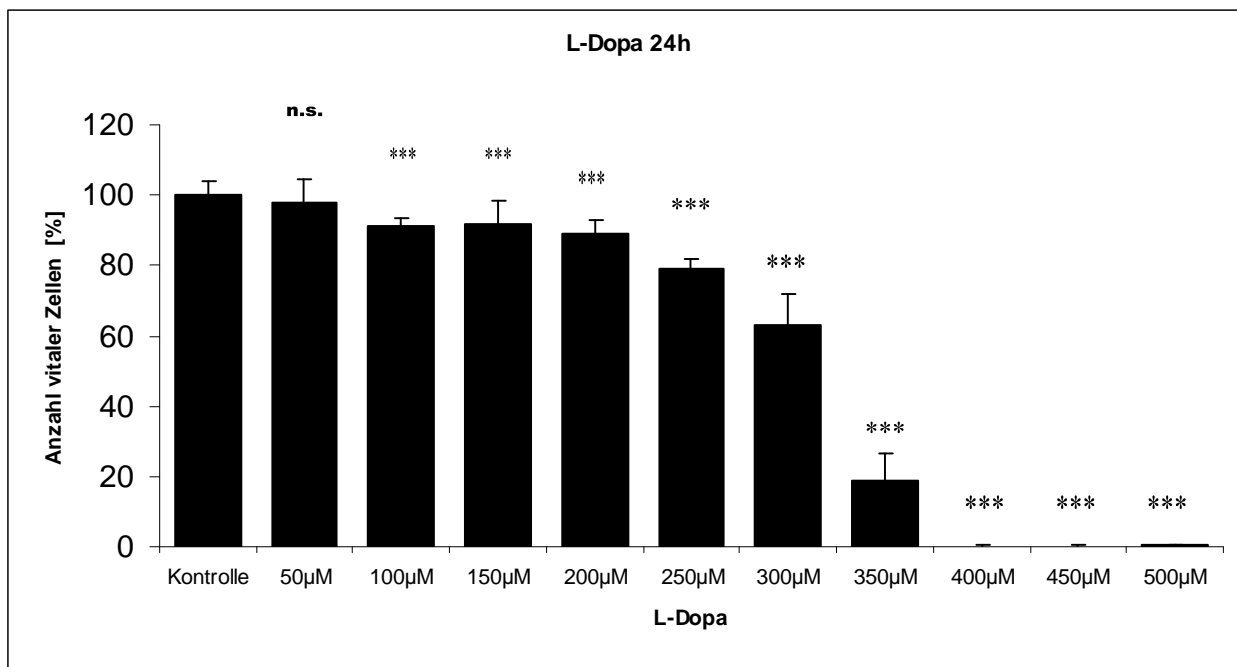
Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Homocysteinkonzentrationen [mM]. Die Kontrollzellen wurden nicht mit Homocystein behandelt. Ermittelt wird die letale Dosis von Homocystein bei der noch 50 % der Zellen leben.

Man erkennt, dass bereits ab einer Homocysteinkonzentration von 5 mM eine signifikante Toxizität gegenüber der Kontrolle vorliegt, hier liegt die Vitalität bei  $80,54 \% \pm 4,56 \%$ . Die LD-50 von Homocystein, d.h. die Konzentration, bei der noch 50 % der Zellen leben, liegt ungefähr bei

10 mM Hcys ( $46,11 \% \pm 2,36 \%$ ). Diese Konzentration wurde bei allen weiteren Versuchen verwendet, um sowohl positive wie auch negative Effekte gut beurteilen zu können.

#### 4.1.1.2. Bestimmung der LD-50 von L-Dopa

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der jeweiligen L-Dopakonzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit L-Dopa behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 14: Ergebnisse der Bestimmung der LD-50 von L-Dopa**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

50µM = 50µM L-Dopa, 100µM = 100µM L-Dopa, 150µM = 150µM L-Dopa, 200µM = 200µM L-Dopa

250µM = 250µM L-Dopa, 300µM = 300µM L-Dopa, 350µM = 350µM L-Dopa, 400µM = 400µM L-Dopa

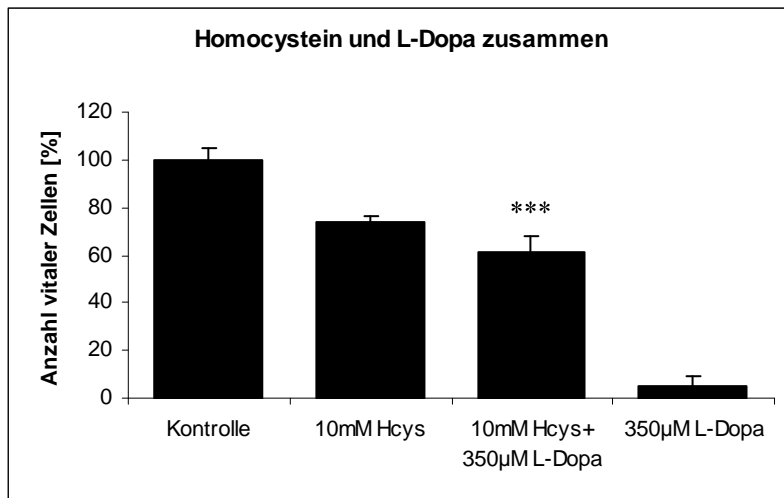
Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den unterschiedlichen L-Dopakonzentrationen [µM]. Die Kontrollzellen wurden nicht mit L-Dopa behandelt. Ermittelt wird die letale Dosis von L-Dopa bei der noch 50 % der Zellen leben.

Man erkennt, dass bei einer L-Dopakonzentration von 50 µM keine signifikante Toxizität gegenüber der Kontrolle vorliegt, hier liegt die Vitalität bei  $98,09 \% \pm 6,43 \%$ . Ab einer Konzentration von 100 µM liegt eine signifikante Toxizität gegenüber der Kontrolle vor, die Vitalität liegt hier

bei  $90,97 \% \pm 2,66 \%$ . Ab einer Konzentration von  $400 \mu\text{M}$  sind keine vitalen Zellen mehr vorhanden. Die LD-50 von L-Dopa, d.h. die Konzentration, bei der noch 50 % der Zellen leben, liegt zwischen  $300 \mu\text{M}$  ( $62,89 \% \pm 9,23 \%$ ) und  $350 \mu\text{M}$  ( $18,73 \% \pm 7,9 \%$ ). Diese Konzentrationen wurden in den folgenden Versuchen verwendet, um sowohl positive als auch negative Effekte gut beurteilen zu können.

#### 4.1.1.3. Gleichzeitige Gabe von Homocystein und L-Dopa

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von den jeweiligen Homocystein- und L-Dopakonzentrationen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Homocystein oder mit L-Dopa oder mit Homocystein und L-Dopa gleichzeitig behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 15: Ergebnisse der gleichzeitigen Homocystein- und L-Dopagabe**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die L-Dopakontrolle 350 µM ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ,

\*\*\* =  $p < 0,001$ )

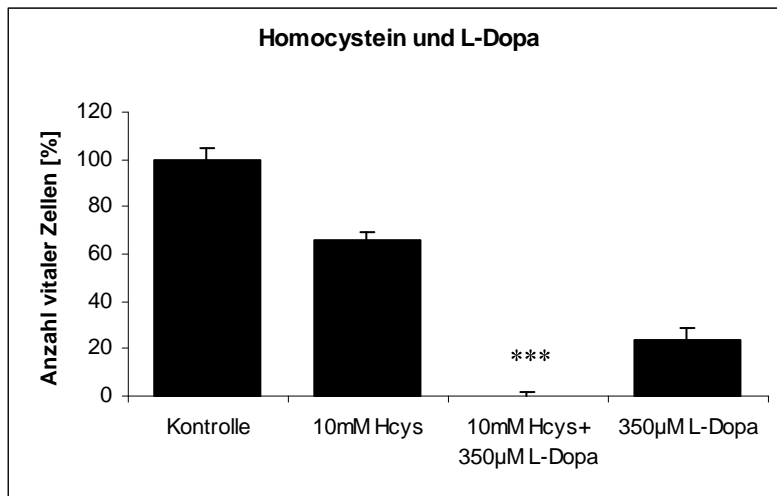
10mM Hcys = 10mM Homocystein

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] und L-Dopagaben [µM]. Die Kontrollzellen wurden weder mit Homocystein noch mit L-Dopa behandelt.

Untersucht wurde, inwieweit sich die gleichzeitige Gabe von 10 mM Homocystein und 350 µM L-Dopa auf die Zellvitalität auswirkt. In dem Diagramm erkennt man, dass die alleinige Homocysteintoxizität in diesem Versuchsansatz bei 74,23 % ± 2,45 % und die alleinige L-Dopatoxizität bei 4,81 % ± 4,4 % liegen. Gibt man den Zellen zusammen Homocystein und L-Dopa, überleben deutlich mehr Zellen als bei der alleinigen L-Dopagabe (60,91 % ± 7,11 % im Vergleich zu 4,81 % ± 4,4 %). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Zellvitalität nach 10 mM Homocysteingabe und 350 µM L-Dopagabe und der Zellvitalität nach alleiniger L-Dopagabe. Somit scheint sich die Homocysteingabe günstig auf die L-Dopatoxizität auszuwirken.

#### 4.1.1.4. Wirkung von Homocystein auf die L-Dopatoxizität

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von den jeweiligen Homocystein- und L-Dopakonzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Homocystein und weitere 24 h später mit L-Dopa behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assays gemessen.



**Abbildung 16: Ergebnisse der Präinkubation mit Hcys auf die L-Dopatoxizität bei 350 µM**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die L-Dopakontrolle 350 µM ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

10mM Hcys = 10mM Homocystein

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] und L-Dopagaben [µM]. Die Kontrollzellen wurden weder mit Homocystein noch mit L-Dopa behandelt.

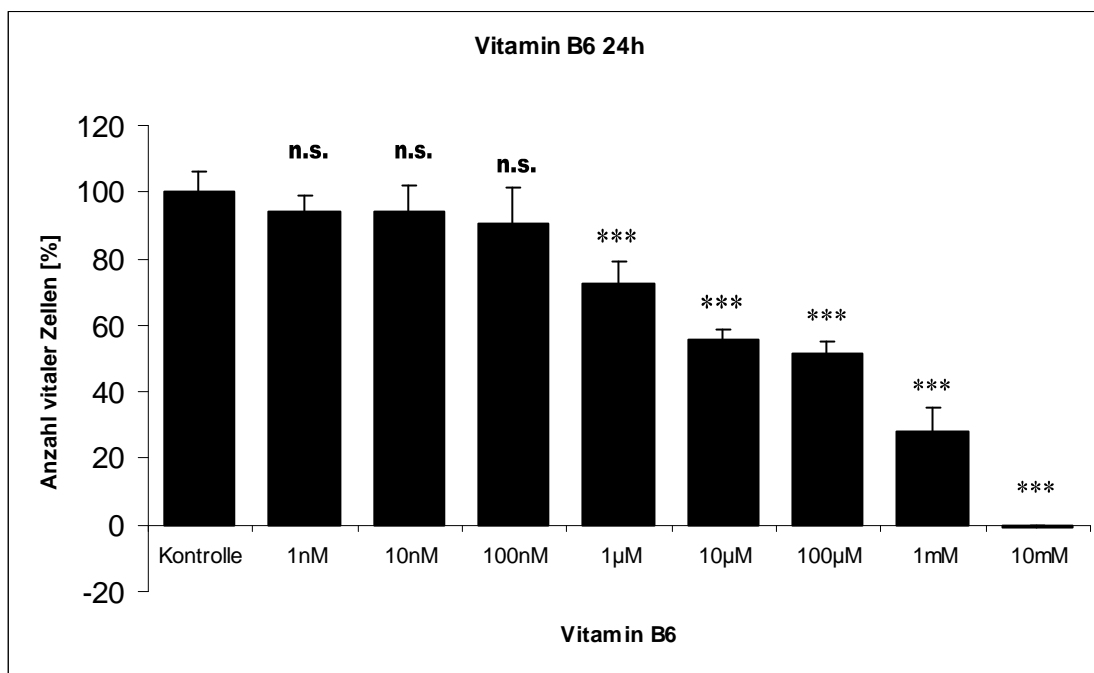
Untersucht wurde, inwieweit sich eine Präinkubation mit 10 mM Homocystein auf die L-Dopatoxizität bei 350 µM auswirkt. In dem Diagramm erkennt man, dass die alleinige Homocysteintoxizität bei 66,06 % ± 2,82 % und die alleinige L-Dopatoxizität bei 23,33 % ± 5,77 % liegen. Gibt man den Zellen nacheinander Homocystein und L-Dopa, überleben deutlich weniger Zellen als bei den alleinigen Gaben (0,25 % ± 1,2 %). Es zeigt sich bei der Gabe von Homocystein und L-Dopa nacheinander ein signifikanter Unterschied zur alleinigen L-Dopagabe (L-Dopakontrolle), somit wirkt sich eine Präinkubation von Homocystein 10 mM negativ auf die L-Dopatoxizität aus.



## 4.1.2. PC12-Versuche mit Homocystein und mit an dessen Verstoffwechslung beteiligten Vitaminen

### 4.1.2.1. Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> auf PC12-Zellen

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der jeweiligen Vitamin-B<sub>6</sub>-Konzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Vitamin B<sub>6</sub> behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 17: Ergebnisse der Vitamin-B<sub>6</sub>-Wirkung auf PC12-Zellen**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

1nM = 1nM Vitamin B<sub>6</sub>, 10nM = 10nM Vitamin B<sub>6</sub>, 100nM = 100nM Vitamin B<sub>6</sub>, 1µM = 1µM Vitamin B<sub>6</sub>

10µM = 10µM Vitamin B<sub>6</sub>, 100µM = 100µM Vitamin B<sub>6</sub>, 1mM = 1mM Vitamin B<sub>6</sub>, 10mM = 10mM Vitamin B<sub>6</sub>

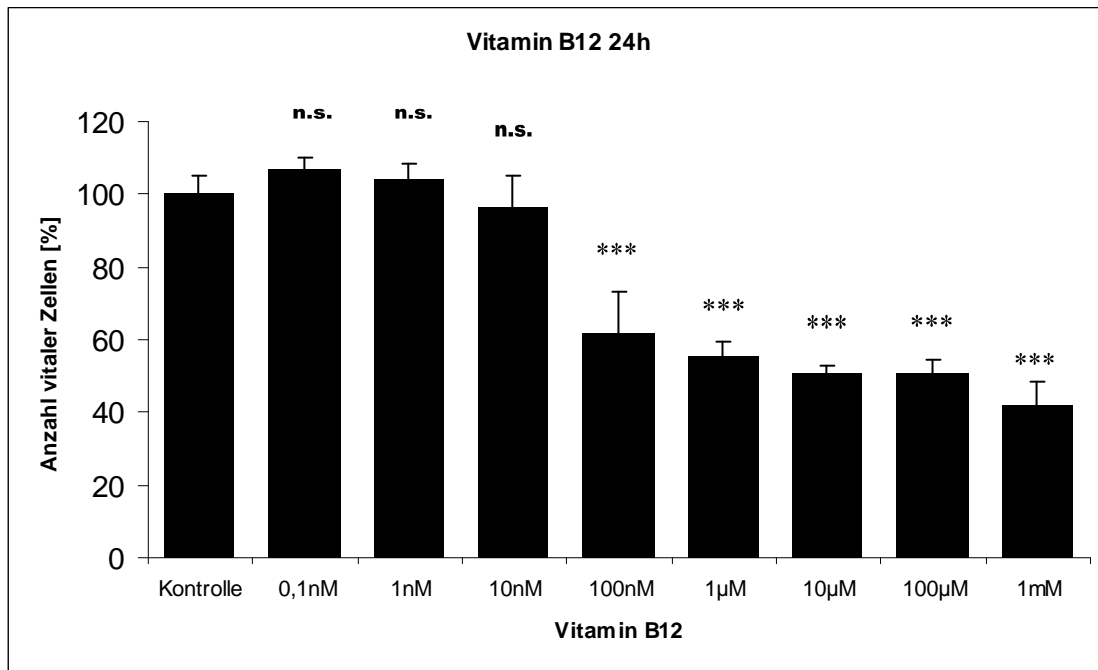
Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Vitamin-B<sub>6</sub>-Konzentrationen [nM-mM]. Die Kontrollzellen wurden nicht mit Vitamin B<sub>6</sub> behandelt.

Man erkennt, dass bei einer Vitamin-B<sub>6</sub>-Konzentration von 1 nM, 10 nM und 100 nM kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht, hier liegt die Vitalität bei 94,13 % ± 4,71 %, bei 93,87 % ± 8,04 % und bei 90,45 % ± 10,97 %.

Ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  liegt eine signifikante Toxizität vor, die Vitalität liegt hier bei  $72,77\% \pm 6,61\%$ . Ab einer Konzentration von 10 mM sind keine vitalen Zellen mehr vorhanden.

#### 4.1.2.2. Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf PC12-Zellen

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der jeweiligen Vitamin-B<sub>12</sub>-Konzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Vitamin B<sub>12</sub> behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 18: Ergebnisse der Vitamin-B<sub>12</sub>-Wirkung auf PC12-Zellen**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

0,1nM = 0,1nM Vitamin B<sub>12</sub>, 1nM = 1nM Vitamin B<sub>12</sub>, 10nM = 10nM Vitamin B<sub>12</sub>

100nM = 100nM Vitamin B<sub>12</sub>, 1 $\mu\text{M}$  = 1 $\mu\text{M}$  Vitamin B<sub>12</sub>, 10 $\mu\text{M}$  = 10 $\mu\text{M}$  Vitamin B<sub>12</sub>

100 $\mu\text{M}$  = 100 $\mu\text{M}$  Vitamin B<sub>12</sub>, 1mM = 1mM Vitamin B<sub>12</sub>

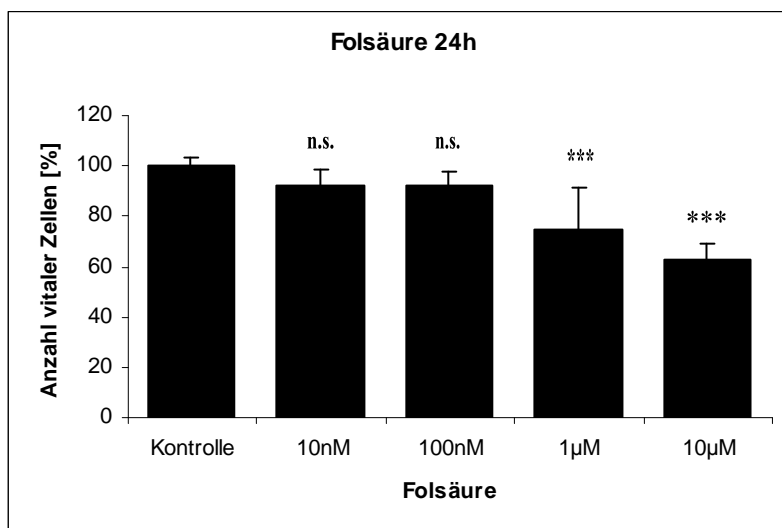
Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Vitamin-B<sub>12</sub>-Konzentrationen [nM-mM]. Die Kontrollzellen wurden nicht mit Vitamin B<sub>12</sub> behandelt.

Man erkennt, dass bei den Vitamin-B<sub>12</sub>-Konzentration von 0,1 nM bis 1 nM kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht, hier liegt die Vitalität bei 106,65 % ± 3,3 % bis 96,49 % ± 8,62 %.

Ab einer Konzentration von 100 nM liegt eine signifikante Toxizität vor, die Vitalität liegt hier bei 61,73 % ± 11,33 %.

#### 4.1.2.3. Wirkung von Folsäure auf PC12-Zellen

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von der jeweiligen Folsäurekonzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Folsäure behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 19: Ergebnisse der Folsäurewirkung auf PC12-Zellen**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle ( n. s. = nicht signifikant, \* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001)

10nM = 10nM Folsäure, 100nM = 100nM Folsäure, 1µM = 1µM Folsäure, 10µM = 10µM Folsäure

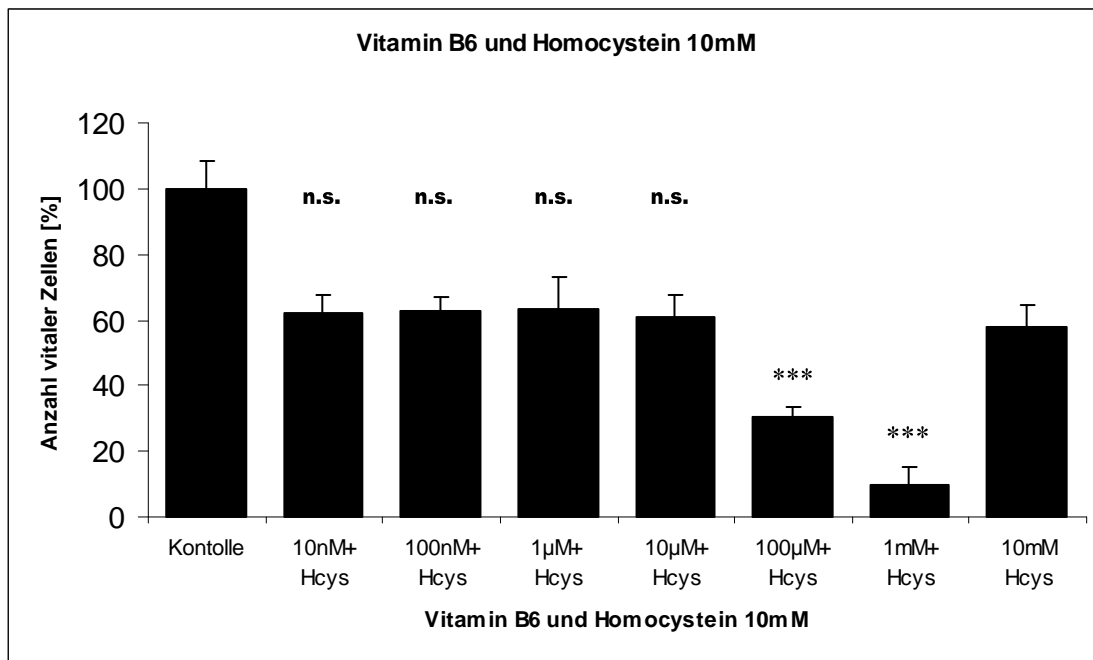
Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Folsäurekonzentrationen [nM-µM]. Die Kontrollzellen wurden nicht mit Folsäure behandelt.

Man erkennt, dass bei den Konzentration von 10nM und 100nM Folsäure kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle vorliegt. Ab einer Konzentration von 1 µM besteht eine signifikante Toxizität gegenüber der Kontrolle, die Vitalität liegt hier bei 74,99 % ± 16,67 %. Es

zeigt sich, dass die Folsäuregabe die Zellvitalität der PC12-Zellen nie günstig beeinflusst, im Gegenteil zeigt sich sogar eine toxische Wirkung.

#### 4.1.2.4. Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von den jeweiligen Vitamin-B<sub>6</sub>- und Homocysteinkonzentrationen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Vitamin B<sub>6</sub> und weitere 24 h später mit Homocystein behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assays gemessen.



**Abbildung 20: Ergebnisse der Präinkubation von Vitamin B<sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Homocysteinkontrolle 10 mM ( n. s. = nicht signifikant, \* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001)

10nM+Hcys = 10nM Vitamin B<sub>6</sub>+10mM Homocystein, 100nM+Hcys = 100nM Vitamin B<sub>6</sub>+10mM Homocystein

1µM+Hcys = 1µM Vitamin B<sub>6</sub>+10mM Homocystein, 10µM+Hcys = 10µM Vitamin B<sub>6</sub>+10mM Homocystein

100µM+Hcys = 100µM Vitamin B<sub>6</sub>+10mM Homocystein, 1mM+Hcys = 1mM Vitamin B<sub>6</sub>+10mM Homocystein

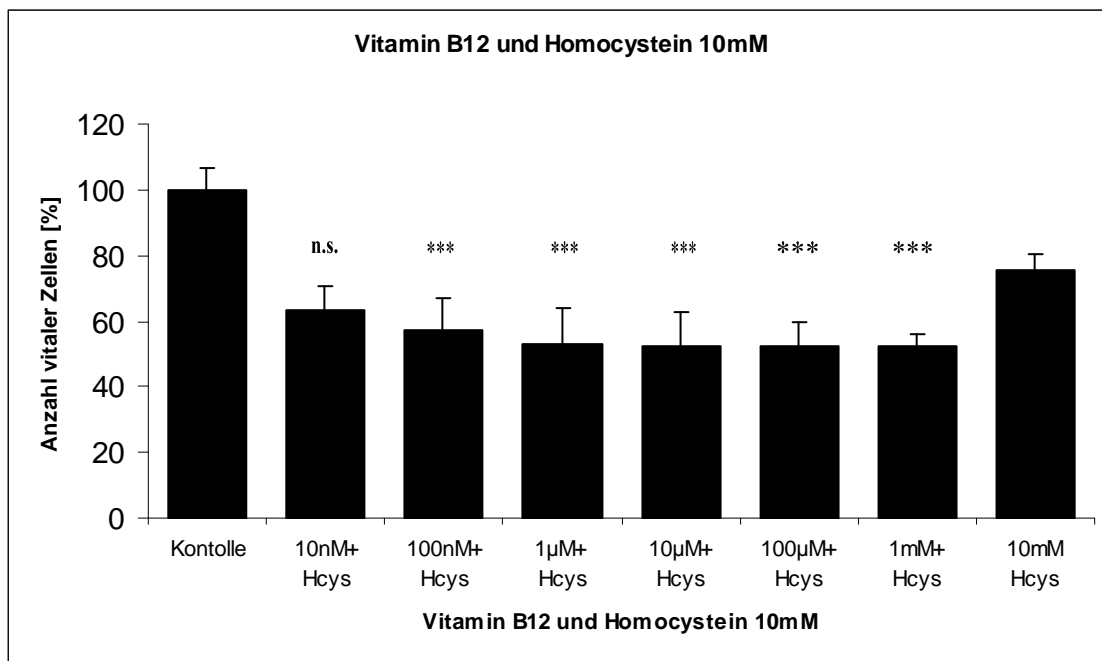
10mM Hcys = 10mM Homocystein

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] und Vitamin-B<sub>6</sub>-Gaben [nM-mM]. Die Kontrollzellen wurden weder mit Homocystein noch mit Vitamin B<sub>6</sub> behandelt.

Untersucht wurde, inwieweit sich eine Präinkubation mit Vitamin B<sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität auswirkt. Man erkennt, dass die alleinige Homocysteintoxizität bei  $58,12 \% \pm 6,52 \%$  liegt. Gibt man den Zellen Vitamin B<sub>6</sub> in Konzentrationen von 10 nM bis 10  $\mu$ M und danach Homocystein 10 mM, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Homocysteintoxizität ( $62,18 \% \pm 5,25 \%$ ). Es zeigt sich ab einer Gabe von Vitamin B<sub>6</sub> 100  $\mu$ M und danach Homocystein 10 mM eine signifikante Toxizität im Vergleich zur alleinigen Homocysteingabe ( $30,69 \% \pm 2,61 \%$ ). Somit wirkt sich die Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe nie protektiv auf die Homocysteintoxizität aus, ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M tritt sogar eine toxische Wirkung auf.

#### 4.1.2.5. Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von den jeweiligen Vitamin-B<sub>12</sub>- und Homocysteinkonzentrationen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Vitamin B<sub>12</sub> und weitere 24 h später mit Homocystein behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assays gemessen.



**Abbildung 21: Ergebnisse der Präinkubation von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Homocysteinkontrolle 10 mM ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ,

\*\*\* =  $p < 0,001$ )

10nM+Hcys = 10nM Vitamin B<sub>12</sub>+10mM Homocystein, 100nM+Hcys = 100nM Vitamin B<sub>12</sub>+10mM Homocystein

1µM+Hcys = 1µM Vitamin B<sub>12</sub>+10mM Homocystein, 10µM+Hcys = 10µM Vitamin B<sub>12</sub>+10mM Homocystein

100µM+Hcys = 100µM Vitamin B<sub>12</sub>+10mM Homocystein, 1mM+Hcys = 1mM Vitamin B<sub>12</sub>+10mM Homocystein

10mM Hcys = 10mM Homocystein

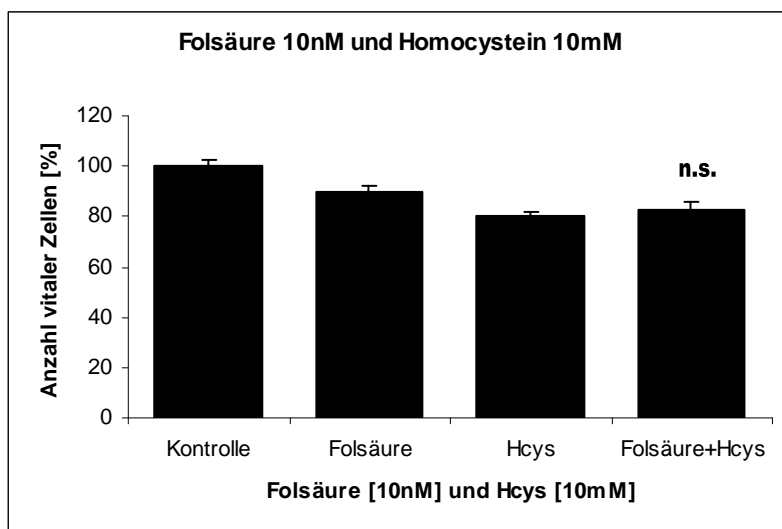
Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] und Vitamin-B<sub>12</sub>-Gaben [nM-mM]. Die Kontrollzellen wurden weder mit Homocystein noch mit Vitamin B<sub>12</sub> behandelt.

Untersucht wurde, inwieweit sich eine Präinkubation mit Vitamin B<sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität auswirkt. Man erkennt, dass die alleinige Homocysteintoxizität bei  $75,6 \pm 5,09 \%$  liegt. Zwischen der alleinigen Homocysteingabe und der Gabe von Vitamin B<sub>12</sub> 10 nM und danach Homocystein 10 mM zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Es zeigt sich ab einer Gabe von Vitamin B<sub>12</sub> 100 nM und danach Homocystein 10 mM eine signifikante Toxizität im

Vergleich zur alleinigen Homocysteingabe ( $63,36 \% \pm 7,18 \%$ ). Somit wirkt sich die Vitamin-B<sub>12</sub>-Gabe nie protektiv auf die Homocysteintoxizität aus, ab einer Konzentration von 100 nM tritt eine toxische Wirkung auf.

#### 4.1.2.6. Wirkung von Folsäure auf die Homocysteintoxizität

Die Diagramme zeigen die Anzahl vitaler PC12-Zellen in Prozent in Abhängigkeit von den jeweiligen Folsäure- und Homocysteinkonzentration. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit Folsäure und weitere 24 h später mit Homocystein behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assays gemessen.



**Abbildung 22: Ergebnisse der Präinkubation von Folsäure 10 nM auf die Homocysteintoxizität**

Balken = Zellvitalität

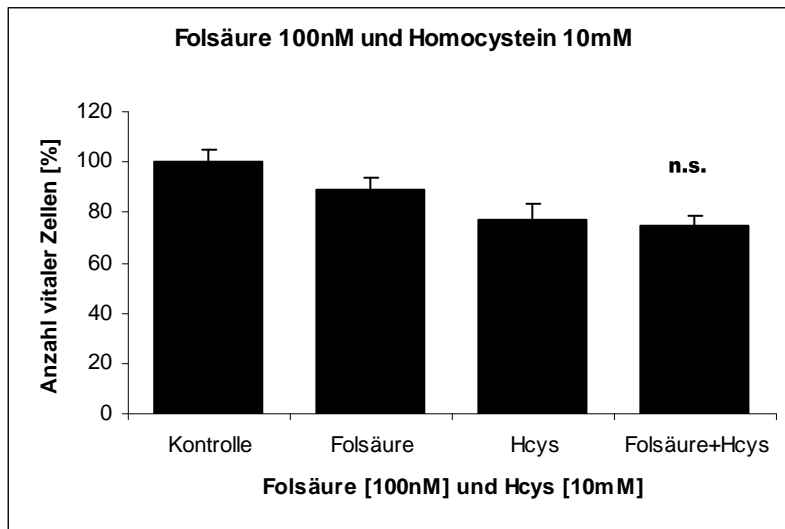
T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Homocysteinkontrolle 10 mM ( n s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ,

\*\*\* =  $p < 0,001$ )

Hcys = Homocystein

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] und Folsäuregaben [nM]. Die Kontrollzellen wurden weder mit Homocystein noch mit Folsäure behandelt.



**Abbildung 23: Ergebnisse der Präinkubation von Folsäure 100 nM auf die Homocysteintoxizität**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz in Bezug auf die Homocysteinkontrolle 10 mM ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

Hcys = Homocystein

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] und Folsäuregaben [nM]. Die Kontrollzellen wurden weder mit Homocystein noch mit Folsäure behandelt.

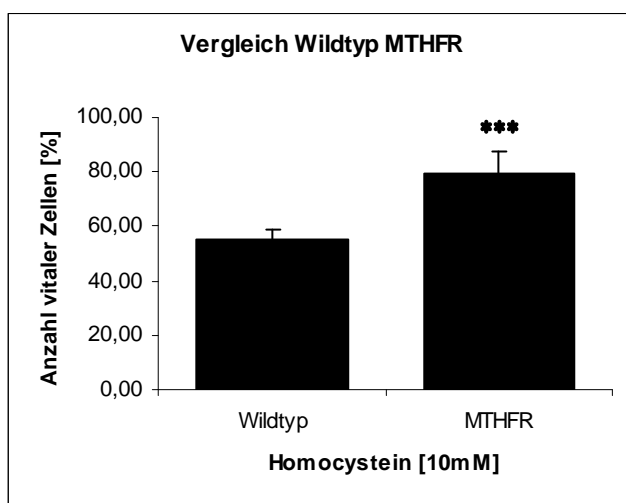
Untersucht wurde, inwieweit sich eine Präinkubation mit Folsäure auf die Homocysteintoxizität von 10 mM auswirkt. Man erkennt, dass die alleinige Homocysteintoxizität im ersten Diagramm bei  $80,25 \% \pm 1,96 \%$  und die alleinige Homocysteintoxizität im zweiten Diagramm bei  $77,03 \% \pm 6,28 \%$  liegt. Gibt man den Zellen nacheinander Folsäure und Homocystein 10 mM, zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur alleinigen Homocysteingabe ( $82,31 \% \pm 3,82 \%$  im ersten Diagramm und  $74,52 \% \pm 4,49 \%$  im zweiten Diagramm). Somit wirkt sich eine Präinkubation von Folsäure in kleinen Konzentrationen weder positiv noch negativ auf die Homocysteintoxizität aus.



## 4.2. Fibroblastenversuche

### 4.2.1. Vergleich der Homocysteinwirkung bei den unterschiedlichen Fibroblastenlinien

Die Diagramme zeigen die Anzahl vitaler Fibroblasten in prozentualer Darstellung. Als Bezugsgrößen wurden die absoluten Werte der jeweiligen Kontrollzellen der einzelnen Fibroblastenlinien gleich 100 % gesetzt. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 10 mM Homocystein behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.



**Abbildung 24: Ergebnisse des Vergleichs der Homocysteinwirkung zwischen Wildtyp und MTHFR-Mutanten**

Balken = Zellvitalität

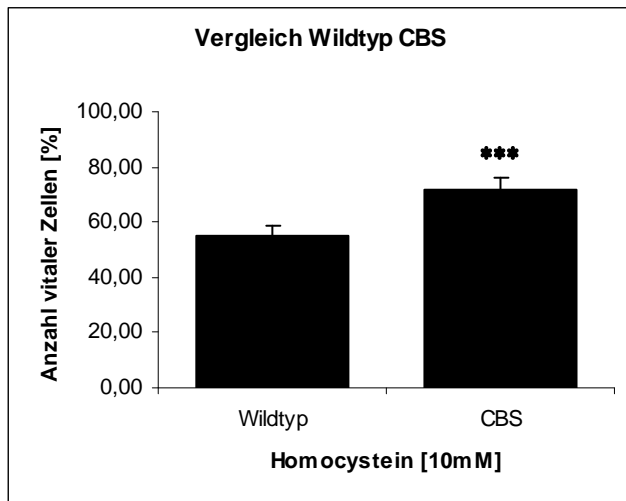
T = Standardabweichung

Signifikanz ( n .s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

MTHFT = Methylentetrahydrofolatreduktase

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] bei den Wildtypzellen und bei den MTHFR-Mutanten.

Nach Homocysteingabe von 10 mM zeigt sich zwischen Wildtypzellen und MTHFR-Mutanten ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität ( $\alpha = 0,01$ ,  $p < 0,0001$ , t-Wert = 13,08, kritischer t-Wert = 2,66). Bei den MTHFR-Mutanten liegt die Zellvitalität bei 79,57 %  $\pm$  7,7 %, bei den Wildtypzellen nur bei 55,02 %  $\pm$  3,83 %. Somit wirkt die Homocysteingabe auf die Wildtypzellen signifikant toxischer als auf die MTHFR-Mutanten.



**Abbildung 25: Ergebnisse des Vergleichs der Homocysteinwirkung zwischen Wildtyp und CBS-Mutanten**

Balken = Zellvitalität

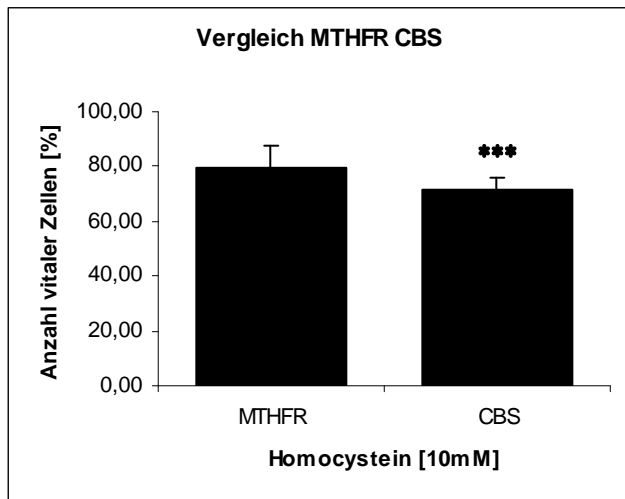
T = Standardabweichung

Signifikanz ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

CBS = Cystathionin- $\beta$ -Synthase

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] bei den Wildtypzellen und bei den CBS-Mutanten.

Nach Homocysteingabe von 10 mM zeigt sich zwischen Wildtypzellen und CBS-Mutanten ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität ( $\alpha = 0,01$ ,  $p < 0,0001$ , t-Wert = 9,84, kritischer t-Wert = 2.67). Bei den CBS-Mutanten liegt die Zellvitalität bei 71,48 %  $\pm$  4,38 %, bei den Wildtypzellen nur bei 55,02 %  $\pm$  3,83 %. Somit wirkt die Homocysteingabe auf die Wildtypzellen signifikant toxischer als auf die CBS-Mutanten.



**Abbildung 26: Ergebnisse des Vergleichs der Homocysteinwirkung zwischen MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz (n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

MTHFR = Methylentetrahydrofolatreduktase

CBS = Cystathionin- $\beta$ -Synthase

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den Homocysteingaben [mM] bei den MTHFR-Mutanten und bei den CBS-Mutanten.

Nach Homocysteingabe von 10 mM zeigt sich zwischen CBS-Mutanten und MTHFR-Mutanten ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität ( $\alpha = 0,01$ ,  $p < 0,0003$ , t-Wert = 3,77, kritischer t-Wert = 2,64). Bei den MTHFR-Mutanten liegt die Zellvitalität bei 79,57 %  $\pm$  7,7 %, bei den CBS-Mutanten nur bei 71,48 %  $\pm$  4,38 %. Somit wirkt die Homocysteingabe auf die CBS-Mutanten signifikant toxischer als auf die MTHFR-Mutanten.

#### **4.2.2. Zusammenfassung der Homocysteinwirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien**

Der Vergleich der Homocysteinwirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien ergibt, dass bei beiden Mutanten die Homocysteintoxizität signifikant geringer ist als bei dem Wildtyp.

Vergleicht man die beiden Mutanten unter sich, stellt man fest, dass die Homocysteintoxizität bei der MTHFR-Mutante signifikant geringer ist als bei der CBS-Mutanten.

#### 4.2.3. Vergleich der L-Dopawirkung bei den unterschiedlichen Fibroblastenlinien

Die Diagramme zeigen die Anzahl vitaler Fibroblasten in prozentualer Darstellung. Als Bezugsgrößen wurden die absoluten Werte der jeweiligen Kontrollzellen der einzelnen Fibroblastenlinien gleich 100 % gesetzt. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 300  $\mu\text{M}$  L-Dopa behandelt und nach weiteren 24 h mit Hilfe des Alamarblue-Assys gemessen.

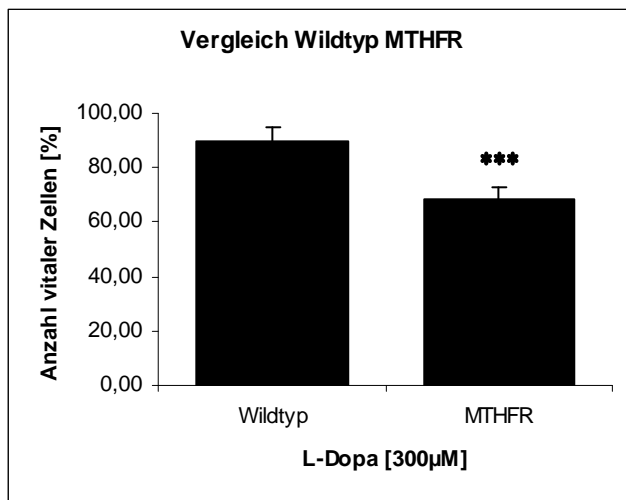


Abbildung 27: Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopawirkung zwischen Wildtyp und MTHFR-Mutanten

Balken = Zellvitalität

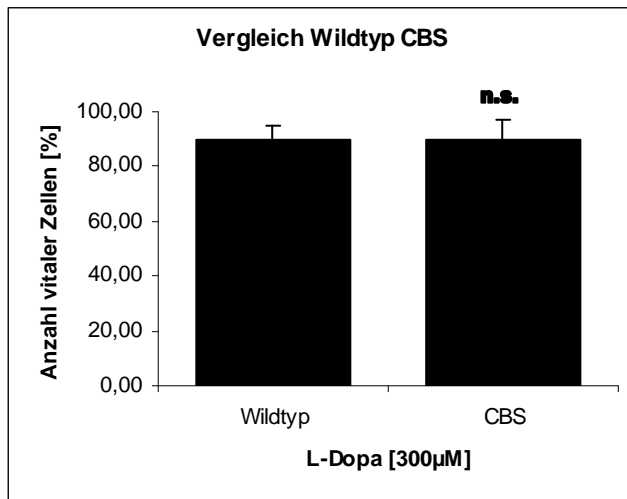
T = Standardabweichung

Signifikanz ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

MTHFR = Methylentetrahydrofolatreduktase

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den L-Dopagaben [ $\mu\text{M}$ ] bei den Wildtypzellen und bei den MTHFR-Mutanten.

Nach L-Dopagabe von 300  $\mu\text{M}$  zeigt sich zwischen Wildtypzellen und MTHFR-Mutanten ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität ( $\alpha = 0,01$ ,  $p < 0,0001$ , t-Wert = 10,47, kritischer t-Wert = 2,67). Bei den Wildtypzellen liegt die Zellvitalität bei 90,06 %  $\pm$  4,63 %, bei den MTHFR-Mutanten nur bei 68,37 %  $\pm$  4,75 %. Somit wirkt die L-Dopagabe auf die MTHFR-Mutanten signifikant toxischer als auf die Wildtypzellen.



**Abbildung 28: Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopawirkung zwischen Wildtyp und CBS-Mutanten**

Balken = Zellvitalität

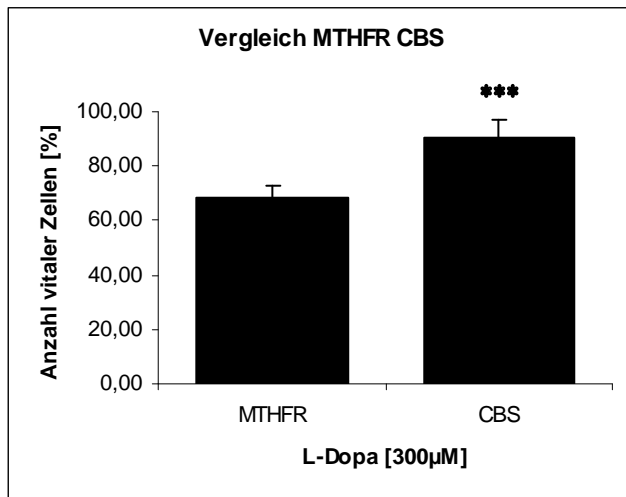
T = Standardabweichung

Signifikanz ( n s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

CBS = Cystathionin- $\beta$ -Synthase

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den L-Dopagaben [ $\mu$ M] bei den Wildtypzellen und bei den CBS-Mutanten.

Nach L-Dopagabe von 300  $\mu$ M zeigt sich zwischen Wildtypzellen und CBS-Mutanten kein signifikanter Unterschied der Zellvitalität ( $\alpha = 0,01$ ,  $p = 0,8350$ , t-Wert = 0,21, kritischer t-Wert = 2,67). Bei den Wildtypzellen liegt die Zellvitalität bei 90,06 %  $\pm$  4,63 %, bei den CBS-Mutanten bei 90,09 %  $\pm$  6,65 %.



**Abbildung 29: Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopawirkung zwischen MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten**

Balken = Zellvitalität

T = Standardabweichung

Signifikanz ( n. s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ )

MTHFR = Methylentetrahydrofolatreduktase, CBS = Cystathionin- $\beta$ -Synthase

Das Diagramm zeigt die Anzahl vitaler Zellen [%] in Abhängigkeit von den L-Dopagaben [ $\mu\text{M}$ ] bei den MTHFR-Mutanten und bei den CBS-Mutanten.

Nach L-Dopagabe von 300  $\mu\text{M}$  zeigt sich zwischen MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten ein signifikanter Unterschied der Zellvitalität ( $\alpha = 0,01$ ,  $p < 0,0001$ , t-Wert = 9,93, kritischer t-Wert = 2,66). Bei den MTHFR-Mutanten liegt die Zellvitalität bei 68,37 %  $\pm$  4,75 %, bei den CBS-Mutanten bei 90,09 %  $\pm$  6,65 %. Somit wirkt die L-Dopagabe auf die MTHFR-Mutanten signifikant toxischer als auf die CBS-Mutanten.

#### **4.2.4. Zusammenfassung der L-Dopawirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien**

Der Vergleich der L-Dopawirkung auf die unterschiedlichen Fibroblastenlinien ergibt, dass bei den MTHFR-Mutanten die L-Dopatoxizität signifikant höher ist als bei dem Wildtyp. Zwischen der Vitalität der CBS-Mutanten und dem Wildtyp besteht nach L-Dopagabe kein signifikanter Unterschied.

Vergleicht man die beiden Mutanten unter sich, stellt man fest, dass die L-Dopatoxizität bei der MTHFR-Mutante signifikant höher ist als bei der CBS-Mutante.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Material- und Methodenkritik**

#### **5.1.1. Unterschiedliche Wirkung der Homocystein-Stereoisomere**

Von der Aminosäure Homocystein existieren zwei Stereoisomere (D-Hcys und L-Hcys). In dieser Arbeit wurde ein DL-Racemat der Firma Sigma (s. 3.1.3.1.1.) verwendet.

Die Stereoisomere unterscheiden sich zum Teil in ihrer Wirkung. Nur das L-Stereoisomer ist bioaktiv. So aktiviert z. B. L-Homocystein NMDA-Rezeptoren, während bei D-Homocystein diese Wirkung nicht beobachtet wird (Turski, 1989).

#### **5.1.2. Unterschiedliche biologisch aktive Formen der Vitamine**

Bei den Vitaminversuchen ist folgendes Problem zu berücksichtigen: die jeweiligen Vitamine kommen in der Natur in vielen unterschiedlichen Formen vor. So kann z. B. Pyridoxin in Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxinsäure und Pyridoxamin-5-Phosphat umgewandelt werden (Windebank, 1985). Auch bei den anderen Vitaminen gibt es unterschiedliche Formen: Folsäure ist nicht identisch mit Folat. In dieser Arbeit wurde immer nur eine Form des jeweiligen Vitamins verwendet. So wurde z. B. für den Vitamin-B<sub>12</sub>-Komplex Cobalamin verwendet. Eventuell hätte jedoch die biologisch aktive Form, Methylcobalamin, eingesetzt werden müssen. Bislang ist nicht untersucht worden, ob PC12-Zellen Cobalamin umwandeln können.

#### **5.1.3. Fibroblastenzelllinien**

In dieser Arbeit wurden humanen Fibroblastenzelllinien mit spezifischem Genotyp und einem Defekt des Homocysteinstoffwechsels verwendet.

Prinzipiell stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse dieser Zelllinien für die Homocystein- und L-Dopatoxizität auf Nervenzellen direkt übertragbar sind.

#### **5.1.4. Alamar-Blue-Assay**

Der Alamar-Blue-Assay bietet gegenüber früher gebräuchlichen, radioaktiven Verfahren zur Zellproliferationsmessung viele Vorteile. Er ist einfacher zu handhaben, nicht radioaktiv und verursacht weniger Kosten. Ebenso ist es ein schnelles und wenig laborintensives Verfahren, welches die Kinetik des Zellwachstums genau beschreibt (Ahmed et al., 1994).

Mögliche Nachteile dieses Assays sind jedoch, dass der empfohlene Wellenbereich zwischen 530 und 560 nm recht eng ist, ferner kann der Alamar-Blue-Assay nur in Medien verwendet werden, die FCSs und Phenolrot enthalten.

#### **5.1.5. LD-50 von Homocystein und L-Dopa für Zellen liegt über dem Serumspiegel**

Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurden nach Ermittlung der LD-50 Homocysteindosierungen von 10 mM verwendet. Der normale Homocysteinspiegel im humanen Serum liegt im Bereich zwischen 5-10  $\mu\text{mol/l}$  (Yang et al., 2005). Nach L-Dopagabe kann der Homocysteinspiegel auf Werte um 15  $\mu\text{M}$  ansteigen (Müller und Muhlack, 2010). Bei homozygoten CBS-Defizienten-Trägern können Werte von 100-500  $\mu\text{mol/l}$  Homocystein im Plasma gemessen werden (Yang et al., 2005). Somit liegen die Größenordnungen der Homocysteindosierungen in der vorliegenden Arbeit bei den Zellkulturversuchen um den Faktor 1000 höher als im humanen Serum.

In der Arbeit von Müller und Muhlack wurde auch die L-Dopakonzentration im humanen Serum nach dreimaliger Gabe von 100 mg (oder 50 mg) L-Dopa bestimmt. Die Messungen ergaben Werte um die 250 ng/ml. Die ermittelte LD-50 von L-Dopa in dieser Arbeit liegt zwischen 300 und 350  $\mu\text{M}$ . Somit liegen die Größenordnungen der in dieser Doktorarbeit verwendeten L-Dopadosierungen um den Faktor 300 höher als die L-Dopawerte im humanen Serum nach therapeutischer L-Dopaapplikation.

So stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse der in der Zellkultur ermittelten Homocystein- und L-Dopadosierungen, auf den Menschen übertragbar sind.



## **5.2. Vitalitätsbeeinflussung durch Substanzzugabe bei den PC12-Zellen**

### **5.2.1. Homocystein- und L-Dopawirkung bei den PC12-Zellen**

#### **5.2.1.1. Additive Wirkung der Homocystein- und der L-Dopatoxizität**

Homocystein kann in Zellkulturen toxisch auf dopaminerge Zellen wirken (Imamura et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die LD-50 für Homocystein bei PC12-Zellen bei einer Konzentration von 10 mM erreicht (s. 4.1.1.1.).

M. Parkinson, dem ein Dopaminmangel zu Grund liegt, bedarf einer Therapie mit L-Dopa, das ebenfalls in Zellkulturen toxisch auf dopaminerge Zellen wirken kann (Olanow et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei PC12-Zellen die LD-50 bei Dosen zwischen 300  $\mu$ M- 350  $\mu$ M für L-Dopa erreicht wird (s. 4.1.1.2.).

Parkinsonpatienten leiden öfter unter einer Hyperhomocysteinämie (Religa et al., 2006), nach L-Dopagabe konnten erhöhte Homocysteinplasmawerte im humanen Serum gemessen werden (Müller et al., 2001). L-Dopa wirkt auf der einen Seite bei der Behandlung des M. Parkinson neuroprotektiv, es stellt nach wie vor die effektivste Behandlung der Erkrankung dar. Andererseits scheint es jedoch auch neurotoxisch zu wirken, da nach einigen Jahren Nebenwirkungen wie Dyskinesien und motorische Fluktuationen auftreten (Fahn, 2006). Es stellte sich die Frage, wie die Hyperhomocysteinämie die L-Dopatoxizität beeinflusst. Bei einer Arbeit mit Zellkulturversuchen konnte keine relevante dopaminerge Toxizität von Homocystein nachgewiesen werden (Heider et al., 2004). Eine andere Arbeit konnte aber zeigen, dass Homocystein in Ratten dopaminerge Neurone zur Dysfunktion und zum Zelltod sensitivieren kann (Duan et al., 2002).

Die gemeinsame Gabe von der LD-50 von Homocystein (10 mM) und der LD-50 von L-Dopa (350  $\mu$ M) führt bei den PC12-Zellen zu einer deutlichen Verringerung der alleinigen L-Dopatoxizität (s. 4.1.1.3.). Hieraus ergäbe sich eine schützende Wirkung von Homocystein vor der L-Dopatoxizität. Allerdings muss man beachten, dass die beiden Substrate zum gleichen Zeitpunkt und in der gleichen Lösung auf die Zellen aufgebracht wurden, womit eine unbekannte extrazelluläre Reaktion der Substanzen miteinander nicht ausgeschlossen werden kann

Daher wurde eine Homocysteinpräinkubation bei PC12-Zellen vor der Inkubation mit L-Dopa durchgeführt (s. 4.1.1.4.). Dann wirken die beiden Stoffe weitaus toxischer, als bei der jeweiligen alleinigen Gabe. Hieraus ergibt sich, dass Homocystein nicht, wie zunächst angenommen,

protektiv wirkt, sondern dass sogar die L-Dopatoxizität verstärkt werden kann. Diese Daten bestätigen die Versuche von Duan an Ratten aus dem Jahr 2002. Im menschlichen Blut sind beide Stoffe nebeneinander vorhanden.

Sowohl die hier beobachteten günstigen Effekte, aber auch die Verstärkung der vermuteten L-Dopatoxizität scheinen in vivo gleichzeitig eine Rolle zu spielen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich, dass M. Parkinson-Patienten, die mit L-Dopa behandelt werden, besonders sorgfältig auf das Vorliegen einer Hyperhomocysteinämie untersucht werden sollten. Auch nur eine leichte Erhöhung des Homocysteinspiegels sollte bei diesen Patienten behandelt werden, um zu verhindern, dass L-Dopa ungünstige Effekte erzeugt.

## **5.2.2. Vitaminwirkung an PC12-Zellen**

### **5.2.2.1. Allgemeines**

Es ist nicht bekannt, ob die Vitamine in die PC12-Zellen eindringen und dort wirken können. Es könnte auch eine direkte, extrazelluläre Toxizität vorliegen. Ebenfalls ist nicht geklärt, ob PC12-Zellen diese Vitamine überhaupt nutzen.

### **5.2.2.2. Toxizität der Vitamine**

Folsäure ist ein essentieller Nahrungsbestandteil und wird für viele intrazelluläre Reaktionen als Cofaktor benötigt (Donnelly, 2001). Vitamin B<sub>6</sub> spielt sowohl als ein Cofaktor als auch als Antioxidans eine wichtige Rolle im menschlichen Körper (Mooney et al., 2009). Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub> und Vitamin B<sub>6</sub> sind wichtig für den menschlichen Organismus, ein Mangel kann zu Schäden führen, deshalb ist eine ausreichende Zufuhr dieser Vitamine von Bedeutung für die Gesundheit.

Pyridoxin kann neurotoxisch wirken, ebenso wie seine aktivierten Coenzyme Pyridoxal und Pyridoxamin. Pyridoxische Säure ist nicht aktiv und somit nicht toxisch, Pyridoxamin-5-Phosphat welches nicht in die Zelle eindringen kann, wirkt ebenso nicht neurotoxisch (Windebank, 1985). Eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Substitution ist nicht immer harmlos, hohe Dosen können eine periphere Neuropathie, trotz der renalen Exkretion dieses wasserlöslichen Vitamins, auslö-

sen (Levine und Saltzman, 2002). Ab Dosen von 100-300 mg pro Tag kann Toxizität auftreten, bei Vitamin-B<sub>6</sub>-Gaben von über 1000 mg pro Tag kann eine Neuropathie entstehen (Katan, 2005). Bei der Vitamin B<sub>6</sub> induzierten Neuropathie sind besonders sensorische Fasern betroffen (Perry et al., 2004). Auch wird über eine UVA induzierte Zytotoxizität von Vitamin B<sub>6</sub> berichtet (Maeda et al., 2000). Ginkotoxin, ein Derivat der Vitamin-B<sub>6</sub>-Gruppe in höheren Pflanzen kann ebenfalls giftig wirken (Drewke und Leistner, 2001).

Ältere Menschen sprechen auf Dosen von unter 500 µg bei der Vitamin-B<sub>12</sub>-Therapie nicht an, bei normaler Absorption besteht bei dieser Dosierung jedoch die Gefahr einer Akkumulation von Cobalamin (Carmel, 2008). Folsäure- und Vitamin-B<sub>12</sub>-Gaben können das tHcys auch unter die Normwerte senken (Brättström, 1996). Durch SAM können Desoxyadenpilyradikale entstehen, die schädlich wirken (Toohey, 2006). Nach dem Einbringen eines Stents kann eine Therapie mit Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub> und Vitamin B<sub>6</sub> zu einem erhöhten Vorkommen von Restenosen führen (Lange et al., 2004).

Diese Beobachtungen zeigen, dass eine Vitamin-Substitution, insbesondere eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe, auch schädlich Folgen für den menschlichen Organismus haben kann. Bei der vorliegenden Arbeit wirkte sich die Vitaminbehandlung eher schädlich auf die PC12-Zellen aus. Folsäuregabe, Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe und Vitamin-B<sub>12</sub>-Gabe führten jeweils unabhängig voneinander zu einer geringeren Zellvitalität.

Folsäure-, Vitamin-B<sub>12</sub>- und Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe senken bei Patienten, die an einer Hyperhomocysteinämie leiden, den Plasmahomocysteinspiegel (Perry, 1999). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Vitamingabe die PC12-Zellen am besten vor der Homocysteintoxizität schützen kann. Angenommen wurde, dass die Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe die PC12-Zellen besser vor der Homocysteintoxizität schützen würde, da bei der Vitamin B<sub>6</sub> abhängigen Transsulfurierung im Gegensatz zu der Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure abhängigen Remethylierung das Antioxidans Glutathion entsteht. In dieser Arbeit konnte jedoch weder die Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe noch die Vitamin-B<sub>12</sub>- und Folsäuregabe die PC12-Zellen vor der Homocysteintoxizität schützen. Im Gegenteil führte die Vitaminsubstitution bei diesen Zellen teilweise sogar zu einer Verstärkung der toxischen Homocysteinwirkung.

Letztlich scheint das Modell der PC12-Zellen für die Fragestellung der Vitaminprotektion auf die Homocysteintoxizität nicht geeignet zu sein. Ursprünglich waren auch Versuche zur Wirkung der Vitaminprotektion auf die L-Dopatoxizität vorgesehen. L-Dopa wird u.a. zu Homocystein abgebaut (2.3.3.) und Homocystein wird dann über die vitaminabhängige Transsulfurierung oder vi-

taminabhängige Remethylierung weiter verstoffwechselt (2.1.3.1./2.1.3.4.). Da jedoch durch die Vitamingabe die Homocysteintoxizität nicht gesenkt werden konnte, wurde auf weitere Versuche mit den PC12-Zellen verzichtet.

### **5.2.2.3. Folsäuresubstitution**

Folsäure schützt den menschlichen Organismus vor zahlreichen Erkrankungen und kann bei Parkinsonpatienten, die an einer Homocysteinämie leiden, den Plasmahomocysteinspiegel senken (Lamberti et al., 2005.). Eine andere Zellkulturarbeit zeigt, dass die Zugabe von Folsäure zum Zellmedium die Homocysteinkonzentration im Medium selbst und die Effekte von Homocystein auf die verwendeten vaskulären Muskelzellen in Bezug auf Apoptose und Nekrose reduziert (Buemi et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit lässt sich durch die Folsäuregabe allerdings keine signifikante Protektion gegenüber der Homocysteintoxizität zeigen (s. 4.1.2.6.).

### **5.3. Homocystein- und L-Dopawirkung bei den Fibroblasten**

#### **5.3.1. Allgemeines**

Bei der L-Dopatherapie des Parkinsonpatienten entsteht in Folge des L-Dopaabbaus über die COMT vermehrt Homocystein (Nevrly et al., 2010). Deshalb wurde in dieser Arbeit überprüft, wie die Wildtypfibroblasten, die CBS-Mutanten und die MTHFR-Mutanten auf eine zusätzliche Homocysteingabe reagieren. Nun stellte sich die Frage, ob es besser ist, wenn das überschüssige Homocystein über die CBS abhängige Transsulfurierung oder über die MTHFR abhängige Remethylierung weiter verstoffwechselt wird. Bei den MTHFR-Defiziten besitzt das Enzym MTHFR eine Restaktivität von unter 5 %, so wird bei den Fibroblasten mit einer Mutation im MTHFR-Gen der größte Anteil des Homocysteins über die Transsulfurierung verstoffwechselt. Es wurde angenommen, dass die Transsulfurierung der bevorzugte Abbauweg sei, da dort Glutathion entsteht, welches den oxidativen Stress, der bei Parkinsonpatienten vermehrt gebildet wird, senken kann (Ji und Fu, 1992).

#### **5.3.2. Homocysteinwirkung bei den Fibroblasten**

##### **5.3.2.1. Abwehrmechanismen der Mutanten**

Eine Erklärung für die höhere Vitalität der Mutanten gegenüber den Wildtypzellen nach Homocysteinbehandlung, könnte der höhere intrazelluläre Homocysteinspiegel bei den Mutanten sein. Die MTHFR-Mutation 677C>T ist assoziiert mit hohen Homocysteinspiegeln (Summers et al., 2008). Ebenfalls existiert ein Zusammenhang einer CBS-Mutation mit hohen Homocysteinspiegeln (Dutta et al., 2009). So sind die Mutanten permanent hohen Homocysteinspiegeln ausgesetzt und haben eventuell Kompensationsmechanismen entwickelt.

### **5.3.2.2. Chemische Konditionierung der Homocysteingabe bei MTHFR- und CBS-Defizienten**

Mutationen im CBS-Gen sind die häufigste Ursache für die genetische Hyperhomocysteinämie (Kabil et al., 2006). Ebenso wie bei dieser Mutation des CBS-Gens führt auch eine Mutation in MTHFR-Gen zu erhöhten Homocysteinspiegeln im Plasma (Kluijtmans et al., 1996). Bei CBS- und MTHFR-Mutanten liegt von Anfang an eine Erhöhung des intrazellulären Homocysteinspiegels vor.

Die zusätzliche Homocysteingabe führte bei den Wildtyp Fibroblasten zu der stärksten Wirkung. Bei den MTHFR- und die CBS-Defizienten war die toxische Homocysteinwirkung geringer. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass die MTHFR- und die CBS-Defizienten durch ihre Mutationen einen erhöhten intrazellulären Homocysteinspiegel haben. Dadurch könnte es zu einem Phänomen, das sich mit dem der ischämischen und der chemischen Konditionierung vergleichen lässt, kommen.

Das Prinzip der ischämischen Konditionierung wurde in den späten 80ern bekannt, dabei lässt eine kurze subkritische Ischämie die Toleranz für eine kritische Ischämie ansteigen (Steiger und Hänggi, 2007). Bei der chemischen Präkonditionierung steigt die Hypoxietoleranz durch selektive chemische Inhibition der oxidativen Phosphorylierung (Riepe et al., 1997). Diese chemische Inhibition der oxidativen Phosphorylierung kann durch eine Hemmung des mitochondrialen Komplexes I durch Haloperidol oder durch eine Hemmung des mitochondrialen Komplexes II durch 3-Nitropropionat erfolgen (Riepe und Ludolph, 1997). 3-Nitropropionat hemmt die Succinatdehydrogenase und führt bei Mäusen, die einer Ischämie ausgesetzt wurden, zu kardioprotektiven Effekten. Bei diesen Mäusen konnten durch 3-Nitropropionat die ischämischen Verletzungen am Herzen verringert werden (Hu et al., 2005). 3-Nitropropionat vermag nicht nur die ischämischen Verletzungen am Herzen zu reduzieren, sondern auch die im Gehirn (Turan et al., 2006).

Ein ähnliches Phänomen könnte bei den Ergebnissen dieser Arbeit zugrunde liegen. Die MTHFR- und CBS-Mutanten, die einen erhöhten intrazellulären Homocysteinspiegel haben, sind bei einer zusätzlichen Homocysteingabe gegen die Homocysteintoxizität geschützt. Bei den Wildtypzellen, die keinen erhöhten Homocysteinspiegel aufweisen, wirkt die Homocysteingabe toxischer.

### 5.3.2.3. Vergleich der Homocysteinwirkung bei den MTHFR- und CBS-Mutanten

Bei dem direkten Vergleich der mit Homocystein behandelten MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten zeigt sich, dass die CBS-Defizienten weniger gut geschützt sind (s. Abbildung 26).

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die höhere Kapazität der Transsulfurierung über CBS gegenüber der Remethylierung via MTHFR sein. Die Affinität der CBS zu Homocystein ist geringer als die der MS zu Homocystein, jedoch besitzt die CBS höhere kapazitive Reserven als die MS (Finkelstein und Martin, 1984). Ist wenig Homocystein vorhanden, wird ein großer Teil über die Remethylierung zu Methionin verstoffwechselt und bleibt dem Kreislauf erhalten. Bei hohen Homocysteinkonzentrationen wird die CBS vermehrt aktiviert und Homocystein wird irreversibel zu Cystein abgebaut.

Eine weitere Rolle spielt SAM, dieser Stoff ist ein Aktivator der CBS und ein Inhibitor der MTHFR (Mudd et al., 1980). Ähnlich wie bei dem oben beschriebenen Regulationmechanismus führen niedrige SAM-Konzentrationen zu einer vermehrten Remethylierung. Somit werden Methionin, SAM und Homocystein regeneriert. Bei hoher SAM-Konzentration wird die Transsulfurierung aktiviert und somit wird die Konzentration von Methionin, SAM und Homocystein gesenkt (Selhub, 1999).

Da die Homocysteingabe bei den CBS-Mutanten toxischer als bei den MTHFR-Mutanten wirkt, könnte an der höheren Kapazität der CBS gegenüber der MTHFR liegen. Bei den CBS-Mutanten wird der Großteil des Homocystein über die MTHFR verstoffwechselt, da die Restaktivität der CBS unter 5 % liegt. Bei hohen Homocysteinkonzentrationen können bei diesen Mutanten jedoch nicht die kapazitiven Reserven der CBS genutzt werden, somit kommt es zu einer höheren Toxizität als bei den MTHFR-Mutanten. Die MTHFR-Mutanten sind hingegen in der Lage, höhere Homocysteinkonzentrationen über die CBS zu verstoffwechseln.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die CBS eine hohe Homocysteinkonzentration besser reduzieren kann als die MTHFR. Somit erscheint es sinnvoll, bei Patienten mit einer Hyperhomocysteinämie die CBS Aktivität, z.B. durch eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Gabe, zu fördern.

#### **5.3.2.4. Höherer Gesamtglutathionspiegel bei den MTHFR-Mutanten im Vergleich zu den CBS-Mutanten**

Es konnte gezeigt werden, dass die MTHFR-Mutanten einen höheren Gesamtglutathionspiegel als die CBS-Mutanten aufweisen (Miskiewicz, 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Zellen, die Homocystein fast ausschließlich über die CBS abbauen, vermehrt schützendes Glutathion gebildet wird. Diese Versuche bestätigen somit ebenfalls die Transsulfurierung als den geeigneteren Weg zur Bekämpfung der Hyperhomocysteinämie.

#### **5.3.3. L-Dopawirkung bei den Fibroblasten**

##### **5.3.3.1. Vergleich der L-Dopagabe bei den MTHFR- und CBS-Mutanten**

Bei dem direkten Vergleich der mit L-Dopa behandelten MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten zeigt sich, dass die MTHFR-Defizienten gegenüber L-Dopa empfindlicher sind (s. Abbildung 29), obwohl sie mehr Glutathion bilden können und daher gegen oxidativen und L-Dopa induzierten Stress geschützt sein sollten.

Bei Menschen mit MTHFR-Mutationen konnte eine Demyelinierung in Zusammenhang mit niedrigen SAM-Leveln im ZNS gebracht werden (Hyland et al., 1988). MTHFR-Mutanten mit dem Polymorphismus C677T produzieren weniger S-Adenosyl-Methionin (SAM) (Krumdieck et al., 2008). Bei einer niedrigen Aktivität der MTHFR wird weniger 5-MTHF, der Hauptmethyl donor für die Methioninsynthese, gebildet. Methionin wiederum ist das Hauptsubstrat der SAM-Synthese (Baethmann et al., 2000). SAM ist ein Methylgruppendonator bei der Dopamethylierung via COMT und kann so die Dopakonzentration senken und somit die L-Dopatoxizität reduzieren (Werner et al., 2001).

Eventuell sind daher die MTHFR-Mutanten, da sie weniger schützendes SAM produzieren, besonders empfindlich gegenüber einer L-Dopagabe. In einer Arbeit an Nagern wurde gezeigt, dass durch direkte Injektion von L-Dopa in das ZNS die SAM-Spiegel dramatisch reduziert wurden (Miller et al., 1997). Das könnte bedeuten, dass Träger eines MTHFR-Polymorphismus besonders anfällig für die L-Dopatoxizität sind.



Tatsächlich konnte in einer Analyse des Erkrankungsbeginns bei M. Parkinson gezeigt werden, dass ein MTHFR 1298CC Polymorphismus bei Parkinsonpatienten mit einem späteren Erkrankungsalter assoziiert war (Wüllner et al., 2005).

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Zunächst wurden in Versuchen mit PC12-Zellen die LD-50 von Homocystein bei 10 mM und die LD-50 von L-Dopa zwischen 300-350  $\mu$ M ermittelt. Dann wurde festgestellt, inwieweit die Homocysteingabe die L-Dopatoxizität beeinflusst. So sollte geklärt werden, ob Homocystein vor einer L-Dopatoxizität schützen kann oder ob es diese verstärkt. Die Versuche ergaben, dass die Toxizität von L-Dopa durch die Vorbehandlung mit Homocystein verstärkt wird (s. 5.2.1.1.). Als therapeutische Konsequenz ergibt sich daraus, dass M. Parkinson-Patienten, die mit L-Dopa behandelt werden, besonders sorgfältig auf das Vorliegen einer Hyperhomocysteinämie untersucht werden sollten und der Homocysteinspiegel gegebenenfalls gesenkt werden sollte.

Homocystein kann zum einen über die Transsulfurierung und zum anderen über die Remethylierung verstoffwechselt werden (Finkelstein und Martin, 2000). Zurzeit befürworten einige Autoren eine Folsäuresubstitution bei Parkinsonpatienten, die an einer Hyperhomocysteinämie leiden (dos Santos et al., 2009). Das hat zur Folge, dass Homocystein vermehrt über die Remethylierung abgebaut werden kann. Bei der Transsulfurierung entsteht Glutathion, welches u.a. den oxidativen Stress senkt (Ji und Fu, 1992), der bei Parkinsonpatienten vermehrt entsteht (Sian et al., 1994). Deshalb wurde vermutet, dass es besser wäre, die Transsulfurierung zu bevorzugen. Um diesen Weg zu unterstützen, müsste man den Patienten Vitamin B<sub>6</sub> geben.

Bei den Fibroblastenversuchen bewirkt die Homocysteingabe bei den CBS-Mutanten eine höhere Toxizität als bei den MTHFR-Mutanten. Das lässt sich unter anderem durch die höhere Kapazität der Transsulfurierung über CBS erklären (Finkelstein und Martin, 1984). Diese Fibroblastenversuche unterstützen die Hypothese der Transsulfurierung als geeigneteren Stoffwechselweg, um der Hyperhomocysteinämie entgegenzuwirken.

Die L-Dopagabe bewirkt, im Unterschied zur Homocysteingabe, bei den MTHFR-Mutanten eine höhere Toxizität als bei den CBS-Mutanten. Das könnte an der geringeren SAM-Produktion der MTHFR-Mutanten liegen (Krumdieck et al., 2008). Nach den in dieser Arbeit vorliegenden Versuchen scheinen die Träger eines MTHFR-Polymorphismus eine höhere L-Dopaempfindlichkeit aufzuweisen.

Obwohl die Ergebnisse der Versuche nach L-Dopagabe zunächst die Remethylierung als den geeigneteren Stoffwechselweg zur Reduzierung der Hyperhomocysteinämie erscheinen lassen, muss man berücksichtigen, dass L-Dopa nicht nur durch die COMT zu Homocystein, sondern

auch über die MAO zu anderen Produkten weiter verstoffwechselt wird (Spina und Cohen, 1989). Somit sind die Reaktionen nach L-Dopagabe nicht nur auf den Homocysteinkreislauf beschränkt. Deshalb spiegeln die Ergebnisse der Zellkulturversuche nach Homocysteingabe besser die Stoffwechselprozesse zur Senkung der Hyperhomocysteinämie wieder. Insgesamt kann man zu dem Schluss kommen, dass die Transsulfurierung bei der Reduzierung der Homocysteinkonzentration der Remethylierung überlegen sein könnte und die bislang geübte Praxis der Behandlung von Hyperhomocysteinämie bei Morbus Parkinson Patientin mit Vitamin B<sub>12</sub> und Folat um Vitamin B<sub>6</sub> ergänzt werden sollte.

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Homocysteinestoffwechsel  
Abbildung 2: Strukturformeln von Methionin und Homocystein  
Abbildung 3: Transmethylierung  
Abbildung 4: Remethylierung  
Abbildung 5: Transsulfurierung  
Abbildung 6: Glutathionsynthese  
Abbildung 7: Entgiftungsfunktion des Glutathions  
Abbildung 8: L-Dopaabbau  
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Neubauerzählkammer  
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbringens der PC12-Zellen auf eine 96-Well-Platte  
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Versuchsreihe zur Bestimmung der LD-50 von Homocystein auf einer 96-Well-Platte  
Abbildung 12: Fluoreszenz-Emissions-Spektrum von Alamar Blue  
Abbildung 13: Ergebnisse der Bestimmung der LD-50 von Homocystein  
Abbildung 14: Ergebnisse der Bestimmung der LD-50 von L-Dopa  
Abbildung 15: Ergebnisse der gleichzeitigen Homocystein- und L-Dopagabe  
Abbildung 16: Ergebnisse der Präinkubation mit Hcys auf die L-Dopatoxizität bei 350  $\mu\text{M}$   
Abbildung 17: Ergebnisse der Vitamin-B<sub>6</sub>-Wirkung auf PC12-Zellen  
Abbildung 18: Ergebnisse der Vitamin-B<sub>12</sub>-Wirkung auf PC12-Zellen  
Abbildung 19: Ergebnisse der Folsäurewirkung auf PC12-Zellen  
Abbildung 20: Ergebnisse der Präinkubation von Vitamin B<sub>6</sub> auf die Homocysteintoxizität  
Abbildung 21: Ergebnisse der Präinkubation von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Homocysteintoxizität  
Abbildung 22: Ergebnisse der Präinkubation von Folsäure 10 nM auf die Homocysteintoxizität  
Abbildung 23: Ergebnisse der Präinkubation von Folsäure 100 nM auf die Homocysteintoxizität  
Abbildung 24: Ergebnisse des Vergleichs der Homocysteinwirkung zwischen Wildtyp und MTHFR-Mutanten  
Abbildung 25: Ergebnisse des Vergleichs der Homocysteinwirkung zwischen Wildtyp und CBS-Mutanten  
Abbildung 26: Ergebnisse des Vergleichs der Homocysteinwirkung zwischen MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten  
Abbildung 27: Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopawirkung zwischen Wildtyp und MTHFR-Mutanten  
Abbildung 28: Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopawirkung zwischen Wildtyp und CBS-Mutanten  
Abbildung 29: Ergebnisse des Vergleichs der L-Dopawirkung zwischen MTHFR-Mutanten und CBS-Mutanten

## 8. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Statistische Darstellung der Fluoreszenzwerte zur Bestimmung der LD-50 von Hcys
- Tabelle 2: One way Anova zur Bestimmung der LD-50 von Hcys
- Tabelle 3: Post-Hoc-Test nach Bonferroni zur Bestimmung der LD-50 von Hcys

## 9. Literaturverzeichnis

Adinolfi LE, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Antò M, Capasso R, Zappia V, Ruggiero G. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2005; 41: 995-1003

Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*. 1994; 170: 211-224

Alberto JM, Hamelet J, Noll C, Blaise S, Bronowicki JP, Guéant JL, Delabar JM, Janel N. Mice deficient in cystathionine beta synthase display altered homocysteine remethylation pathway. *Mol Genet Metab*. 2007; 91: 396-398

Allain P, Le Bouil A, Cordillet E, Le Quay L, Bagheri H, Montastruc JL. Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 1995; 16: 527-529

Apeland T, Mansoor MA, Strandjord RE. Antiepileptic drugs as independent predictors of plasma total homocysteine levels. *Epilepsy Res*. 2001; 47: 27-35

Baethmann M, Wendel U, Hoffmann GF, Göhlich-Ratmann G, Kleinlein B, Seiffert P, Blom H, Voit T. Hydrocephalus internus in two patients with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Neuropediatrics*. 2000; 31: 314-317

Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997; 25: 335-358

Bea F, Hudson FN, Neff-Laford H, White CC, Kavanagh TJ, Kreuzer J, Preusch MR, Blessing E, Katus HA, Rosenfeld ME. Homocysteine stimulates antioxidant response element-mediated expression of glutamate-cysteine ligase in mouse macrophages. *Atherosclerosis*. 2008; 203: 105-111

Bernstein AL. Vitamin B6 in clinical neurology. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 585: 250-260

Bhat V, Weiner WJ. Parkinson's disease. Diagnosis and the initiation of therapy *Minerva Med*. 2005; 96: 145-154

Bishop L, Kanoff R, Charnas L, Krenzel C, Berry SA, Schimmenti LA. Severe methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency: a case report of nonclassical homocystinuria. *J Child Neurol*. 2008; 23: 823-828

Blaise S, Alberto JM, Nédélec E, Ayav A, Pourié G, Bronowicki JP, Guéant JL, Daval JL. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res*. 2005; 57: 777-782

Bleich S, Löffelholz K, Kornhuber J. Nervenarzt. Folate against hyperhomocysteinemia. A new approach for the prevention and therapy of alcoholism-associated disorders? 2004; 75: 425-430

Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, Jacques PF, Selhub J, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1999; 131: 352-355

Brattström L. Vitamins as homocysteine-lowering agents. *J Nutr.* 1996; 126: 1276-1280

Brattström L, Israelsson B, Lindgärde F, Hultberg B. Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Metabolism.* 1988; 37: 175-178

Bressa GM. S-adenosyl-l-methionine (SAME) as antidepressant: meta-analysis of clinical studies. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1994; 154: 7-14

Buemi M, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Ruello A, Aloisi C, Corica F, Senatore M, Romeo A, Frisina N. Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid. *Thromb Res.* 2001; 104: 207-213

Caccamo D, Condello S, Gorgone G, Crisafulli G, Belcastro V, Gennaro S, Striano P, Pisani F, Ientile R. Screening for C677T and A1298C MTHFR polymorphisms in patients with epilepsy and risk of hyperhomocysteinemia. *Neuromolecular Med.* 2004; 6: 117-126

Cardo E, Vilaseca MA, Campistol J, Artuch R, Colomé C, Pineda M. Evaluation of hyperhomocysteinemia in children with stroke. *Eur J Paediatr Neurol.* 1999; 3: 113-117

Carmel R. Efficacy and safety of fortification and supplementation with vitamin B12: biochemical and physiological effects. *Food Nutr Bull.* 2008; 29: 177-187

Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY. Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 347-355

Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J, Obeid OA, Kooner JS. Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation.* 1999; 99: 1156-1160

Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, Hunter DJ. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001; 154: 667-672

Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul.* 1999; 39: 93-109

Cheng H, Gomes-Trolin C, Aquilonius SM, Steinberg A, Löfberg C, Ekblom J, Oreland L. Levels of L-methionine S-adenosyltransferase activity in erythrocytes and concentrations of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in whole blood of patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1997; 145: 580-585

Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther*. 1998; 77: 115-134

Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing*. 2004; 33: 34-41

Collinsova M, Strakova J, Jiracek J, Garrow TA. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia in mice. *J Nutr*. 2006; 136: 1493-1497

Corti O, Hampe C, Darios F, Ibanez P, Ruberg M, Brice A. Parkinson's disease: from causes to mechanisms. *C R Biol*. 2005; 328: 131-142

Deng L, Elmore CL, Lawrance AK, Matthews RG, Rozen R. Methionine synthase reductase deficiency results in adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice. *Mol Genet Metab*. 2008; 94: 336-342

Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, et al. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol*. 1994; 35: 38-44

Donnelly JG Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2001; 38: 183-223

Drewke C, Leistner E. Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. *Vitam Horm*. 2001; 61: 121-155

Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain *Prog Neurobiol*. 2000; 62: 649-671

Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem*. 2003; 384: 505-516

Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem*. 1999; 72: 2523-2530

Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease *J Neurochem*. 2002; 80: 101-110

Dutta S, Chatterjee A, Sinha S, Chattopadhyay A, Mukhopadhyay K. Correlation between cystathionine beta synthase gene polymorphisms, plasma homocysteine and idiopathic mental retardation in Indian individuals from Kolkata. *Neurosci Lett*. 2009; 453: 214-218



- Ebadi M, Gessert CF, Al-Sayegh A. Drug-pyridoxal phosphate interactions. *Q Rev Drug Metab Drug Interact.* 1982; 4: 289-331
- Eggert KM, Reese JP, Oertel WH, Dodel R. Cost effectiveness of pharmacotherapies in early Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2008; 22: 841-860
- Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131: 872-884
- Elias MF, Sullivan LM, D'Agostino RB, Elias PK, Jacques PF, Selhub J, Seshadri S, Au R, Beiser A, Wolf PA. Homocysteine and cognitive performance in the Framingham offspring study: age is important. *Am J Epidemiol.* 2005; 162: 644-653
- Endres M, Ahmadi M, Kruman I, Biniszkiwicz D, Meisel A, Gertz K. Folate deficiency increases postischemic brain injury. *Stroke.* 2005; 36: 321-325
- Fahn S. A new look at levodopa based on the ELLDOPA study. *J Neural Transm Suppl.* 2006; 419-426
- Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun; 991: 1-14
- Fahn S. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006; 1-15
- Fahn S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol.* 2000; 47: 2-11
- Fernández-Miranda C, Yebra M, Aranda JL, Gómez P, Martínez J, Núñez V, Gómez de la Cámara A. Effect of folic acid treatment on carotid intima-media thickness of patients with coronary disease. *Int J Cardiol.* 2007; 118: 345-349
- Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 1694-1699
- Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26: 219-225
- Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998; 157: 40-44
- Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 385-389
- Finkelstein JD, Martin JJ. Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 118: 14-19
- Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem.* 1984; 259: 9508-9513

Fowler B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med.* 2005; 5: 77-86

Garg S, Vitvitsky V, Gendelman HE, Banerjee R. Monocyte differentiation, activation, and mycobacterial killing are linked to transsulfuration-dependent redox metabolism. *J Biol Chem.* 2006; 281: 38712-38720

Gaustadnes M, Wilcken B, Oliveriusova J, McGill J, Fletcher J, Kraus JP, Wilcken DE. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment. *Hum Mutat.* 2002; 20: 117-126

Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol.* 1999; 56: 33-39

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994; 7: 195-200

Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luís AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garçon D, Andria G, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA.* 1997; 277: 1775-1781

de Groot PG, Willems C, Boers GH, Gonsalves MD, van Aken WG, van Mourik JA. Endothelial cell dysfunction in homocystinuria. *Eur J Clin Invest.* 1983; 13: 405-410

Halkias IA, Haq I, Huang Z, Fernandez HH. When should levodopa therapy be initiated in patients with Parkinson's disease? *Drugs Aging.* 2007; 24: 261-273

Hall AG. Glutathione and the regulation of cell death. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 457: 199-203

Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29: 238-245

Harmon DL, Doyle RM, Meleady R, Doyle M, Shields DC, Barry R, Coakley D, Graham IM, Whitehead AS. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 208-211

Hartelius L, Svensson P. Speech and swallowing symptoms associated with Parkinson's disease and multiple sclerosis: a survey. *Folia Phoniatr Logop.* 1994; 46: 9-17

Heider I, Lehmsiek V, Lenk T, Müller T, Storch A. Dopaminergic neurotoxicity of homocysteine and its derivatives in primary mesencephalic cultures. *J Neural Transm Suppl.* 2004; 68: 1-13

- Heyob KM, Rogers LK, Welty SE. Glutathione Reductase Targeted to Type II Cells Does Not Protect Mice from Hyperoxic Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 39: 683-688
- Hoque MM, Bulbul T, Mahal M, Islam NA, Ferdausi M. Serum homocysteine in pre-eclampsia and eclampsia. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2008; 34: 16-20
- Hu Z, Yang Y, Zhang K, Sun Z. Chemical preconditioning by 3-nitropropionic acid reduces ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005; 25: 439-441
- Huang CS, He W, Meister A. Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. *Anderson ME Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 1232-1236
- Hustad S, Midttun Ø, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. *Am J Hum Genet.* 2007; 80: 846-855
- Hyland K, Smith I, Bottiglieri T, Perry J, Wendel U, Clayton PT, Leonard JV. Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology.* 1988; 38: 459-462
- Ifergan I, Assaraf YG. Chapter 4 molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. *Vitam Horm.* 2008; 79: 99-143
- Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, Nakashima K. Homocysteine is toxic for dopaminergic neurons in primary mesencephalic culture. *Neuroreport.* 2007; 18: 1319-1322
- Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH, Gravel RA, Rozen R; National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis.* 2003; 166: 49-55
- Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, Wright JD, Johnson CL. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69: 482-489
- Jarre E. Kupferionenbindung durch Homocystein als möglicher Mechanismus der Neurotoxizität von Homocystein. *Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät Universität Bonn* 2008
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003; 53: 26-38
- Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol.* 1992; 32: 82-87
- Jenner P, Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology.* 2006; 66: 24-36

- Jhee KH, Kruger WD. The role of cystathionine beta-synthase in homocysteine metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7: 813-822
- Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol*. 1992; 72: 549-554
- Joosten E, Lesaffre E, Riezler R, Ghekiere V, Dereymaeker L, Pelemans W, Dejaeger E. Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997; 52: 76-79
- Kabil O, Zhou Y, Banerjee R Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry*. 2006; 45: 13528-13536
- Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, Seeman TE. Homocysteine versus the vitamins folate, B6, and B12 as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of Successful Aging. *Am J Med*. 2005; 118: 161-167
- Karabiber H, Sonmezgoz E, Ozerol E, Yakinci C, Otlu B, Yologlu S. Effects of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12, and folic acid. *Brain Dev*. 2003; 25: 113-115
- Katan MB. How much vitamin B6 is toxic? *Ned Tijdschr Geneesk*. 2005; 149: 2545-2546
- Kedar NP. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *Postgrad Med*. 2003; 49: 236-245
- Keniston RC, Cabellon S Jr, Yarbrough KS. Pyridoxal 5'-phosphate as an antidote for cyanide, spermine, gentamicin, and dopamine toxicity: an in vivo rat study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1987; 88: 433-441
- Kery V, Poneleit L, Meyer JD, Manning MC, Kraus JP. Binding of pyridoxal 5'-phosphate to the heme protein human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry*. 1999; 38: 2716-2724
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*. 2002; 288: 2023-2031
- Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet*. 1996; 58: 35-41
- Knorrp T, Robinson SR, Crack PJ, Dringen R. Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress. *J Neural Transm*. 2006; 113: 1145-1155

- Kraus JP. Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency. *Eur J Pediatr.* 1998; 157: 50-53
- Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000; 20: 6920-6926
- Krumdieck CL, Fernandez JR, Desmond RA, Kleinstein RN, Shipp MD, Prince CW. C677T methylene-H4-folate-reductase variant decreases binocular accommodation. *Optom Vis Sci.* 2008; 85: 196-200
- Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, Büttner T, Woitalla D, Müller T. Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 1998; 40: 225-227
- Kusmaul L, Hamprecht B, Dringen R. The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *J Neurochem.* 1999; 73: 1246-1253
- Lamberti P, Zoccolella S, Armenise E, Lamberti SV, Fraddosio A, de Mari M, Iliceto G, Livrea P. Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated Parkinson's disease patients: effect of cobalamin and folate administration. *Eur J Neurol.* 2005; 12: 365-368
- Lange H, Suryapranata H, De Luca G, Börner C, Dille J, Kallmayer K, Pasalary MN, Scherer E, Dambrink JH. Folate therapy and in-stent restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2673-2681
- de Lau LM, Koudstaal PJ, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary folate, vitamin B12, and vitamin B6 and the risk of Parkinson disease *Neurology.* 2006; 67: 315-318
- Leeuwenburgh C, Ji LL. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316: 941-949
- Levine S, Saltzman A. Pyridoxine (vitamin B6) toxicity: enhancement by uremia in rats. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 1449-1451
- Li Y, Maher P, Schubert D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron.* 1997; 19: 453-463
- Lima CP, Davis SR, Mackey AD, Scheer JB, Williamson J, Gregory JF 3rd. Vitamin B-6 deficiency suppresses the hepatic transsulfuration pathway but increases glutathione concentration in rats fed AIN-76A or AIN-93G diets. *J Nutr.* 2006; 136: 2141-2147
- Lin PT, Cheng CH, Wei JC, Huang YC. Low plasma pyridoxal 5'-phosphate concentration and MTHFR 677C-->T genotypes are associated with increased risk of hypertension. *Int J Vitam Nutr Res.* 2008; 78: 33-40

- Lin JY, Kang SS, Zhou JM, Wong PW. Homocysteinemia in rats induced by folic acid deficiency. *Life Sci.* 1989; 44: 319-325
- Linnebank M, Junker R, Nabavi DG, Linnebank A, Koch HG. Isolated thrombosis due to the cystathionine beta-synthase mutation c.833T>C (1278T). *J Inherit Metab Dis.* 2003; 26: 509-511
- Linnebank M, Lagler F, Muntau AC, Röschinger W, Olgemöller B, Fowler B, Koch HG. Methionine adenosyltransferase (MAT) I/III deficiency with concurrent hyperhomocysteinaemia: two novel cases. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28: 1167-1168
- Linnebank M, Montenarh M, Kölsch H, Linnebank A, Schnez K, Schweichel D, Pohl C, Urbach H, Heun R, Harbrecht U, Klockgether T, Wüllner U. Common genetic variants of homocysteine metabolism in ischemic stroke: a case-control study. *Eur J Neurol.* 2005; 12: 614-618
- Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 5923-5928
- Litynski P, Loehrer F, Linder L, Todesco L, Fowler B. Effect of low doses of 5-methyltetrahydrofolate and folic acid on plasma homocysteine in healthy subjects with or without the 677C-->T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32: 662-668
- Liu XX, Wilson K, Charlton CG. Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life Sci.* 2000; 66: 2277-2288
- Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 391-395
- Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2008; 30: 42-59
- Lu SC, Mato JM. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23: 73-77
- Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab.* 2000; 71: 121-138
- Macko RF, Kittner SJ, Ivey FM, Epstein A, Sparks MJ, Hebel JR, Johnson CC, Wityk RJ, Ueland PM, Refsum H. Effects of vitamin therapy on plasma total homocysteine, endothelial injury markers, and fibrinolysis in stroke patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2002; 11: 1-8
- Maeda M, Fujio Y, Azuma J. MTHFR gene polymorphism and diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2006; 2: 467-476
- Maeda T, Taguchi H, Minami H, Sato K, Shiga T, Kosaka H, Yoshikawa K. Vitamin B6 phototoxicity induced by UVA radiation. *Arch Dermatol Res.* 2000; 292: 562-567

- Malouf R, Grimley Evans J. The effect of vitamin B6 on cognition. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; 4
- Martínez-López N, Varela-Rey M, Ariz U, Embade N, Vazquez-Chantada M, Fernandez-Ramos D, Gomez-Santos L, Lu SC, Mato JM, Martinez-Chantar ML. S-adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36: 848-852
- Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology *Eur J Pediatr.* 1998; 157: 54-59
- Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res Rev.* 2002; 1: 95-111
- McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86: 1563-1568
- McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Fredman L, Tucker KL, Samelson EJ, Kiel DP, Cupples LA, Hannan MT. Plasma B vitamins, homocysteine, and their relation with bone loss and hip fracture in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 2206-2212
- Miśkiewicz A. Klinisch-epidemiologische und *in-vitro*-Analysen zum Einfluss der Variante Methylentetrahydrofolat-Reduktase c.1298A>C (E429A) auf neurodegenerative Erkrankungen. Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät Universität Bonn 2010
- Miller CM, Szegedi SS, Garrow TA. Conformation-dependent inactivation of human betaine-homocysteine S-methyltransferase by hydrogen peroxide in vitro. *Biochem J.* 2005; 392: 443-448
- Miller JW, Selhub J, Nadeau MR, Thomas CA, Feldman RG, Wolf PA. Effect of L-dopa on plasma homocysteine in PD patients: relationship to B-vitamin status. *Neurology.* 2003; 60: 1125-1129
- Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-Dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol.* 1997; 20: 55-66
- Miyasaki JM, Shannon K, Voon V, Ravina B, Kleiner-Fisman G, Anderson K, Shulman LM, Gronseth G, Weiner WJ; Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2006; 66: 996-1002
- Mølby L, Rasmussen K, Jensen MK, Pedersen KO. Determination of vitamin b12 deficiency. *Ugeskr Laeger.* 1992; 154: 323-325
- Mooney S, Leuendorf JE, Hendrickson C, Hellmann H. *Molecules.* Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. 2009; 14: 329-351

- Moriyama Y, Okamura T, Kajinami K, Iso H, Inazu A, Kawashiri M, Mizuno M, Takeda Y, Sakamoto Y, Kimura H, Suzuki H, Mabuchi H. Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese. *Atherosclerosis*. 2002; 164: 321-328
- Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*. 2000; 39: 13005-13011
- Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism*. 1980; 29: 707-720
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985; 37: 1-31
- Müller T. Role of homocysteine in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 2008; 8: 957-967
- Müller T, Kuhn W. Tolcapone decreases plasma levels of S-adenosyl-L-homocysteine and homocysteine in treated Parkinson's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006; 62: 447-450
- Müller T, Muhlack S. Acute homocysteine rise after repeated levodopa application in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010; 16: 688-689
- Müller T, Voitalla D, Hauptmann B, Fowler B, Kuhn W. Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2001; 308: 54-56
- Must A, Jacques PF, Rogers G, Rosenberg IH, Selhub J. Serum total homocysteine concentrations in children and adolescents: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Nutr*. 2003 Aug; 133: 2643-2649
- Mutch WJ, Strudwick A, Roy SK, Downie AWBr. Parkinson's disease: disability, review, and management. *Med J (Clin Res Ed)*. 1986; 293: 675-677
- Nagaraja D, Noone ML, Bharatkumar VP, Christopher R. Homocysteine, folate and vitamin B(12) in puerperal cerebral venous thrombosis. *J Neurol Sci*. 2008; 272: 43-47
- Nakamura T, Saionji K, Hiejima Y, Hirayama H, Tago K, Takano H, Tajiri M, Hayashi K, Kawabata M, Funamizu M, Makita Y, Hata A. Methylenetetrahydrofolate reductase genotype, vitamin B12, and folate influence plasma homocysteine in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2002; 39: 1032-1039
- Nevrly M, Kanovsky P, Vranova H, Langova K, Hlustik P. Effect of entacapone on plasma homocysteine levels in Parkinson's disease patients. *Neurol Sci*. 2010; 31: 565-569



- Nielsen NE, Brattström L, Hultberg B, Landgren F, Swahn E. Plasma total homocysteine levels in postmenopausal women with unstable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000; 151: 423-431
- Nurk E, Refsum H, Tell GS, Engedal K, Vollset SE, Ueland PM, Nygaard HA, Smith AD. Plasma total homocysteine and memory in the elderly: the Hordaland Homocysteine Study. *Ann Neurol*. 2005; 58: 847-857
- Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease *Hum Mol Genet*. 1997; 6: 1687-1691
- O K, Lynn EG, Chung YH, Siow YL, Man RY, Choy PC. Homocysteine stimulates the production and secretion of cholesterol in hepatic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1393: 317-324
- Obeid R, McCaddon A, Herrmann W. The role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45: 1590-1606
- Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord*. 2004; 19: 997-1005
- Perry DJ Hyperhomocysteinaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999; 12: 451-477
- Perry TA, Weerasuriya A, Mouton PR, Holloway HW, Greig NH. Pyridoxine-induced toxicity in rats: a stereological quantification of the sensory neuropathy. *Exp Neurol*. 2004; 190: 133-144
- Persa C, Pierce A, Ma Z, Kabil O, Lou MF. The presence of a transsulfuration pathway in the lens: a new oxidative stress defense system. *Exp Eye Res*. 2004; 79: 875-886
- Petronijević ND, Radonjić NV, Ivković MD, Marinković D, Piperski VD, Duričić BM, Paunović VR. Plasma homocysteine levels in young male patients in the exacerbation and remission phase of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32: 1921-1926
- Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 920: 28-32
- Prengler M, Sturt N, Krywawych S, Surtees R, Liesner R, Kirkham F. Homozygous thermolabile variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a potential risk factor for hyperhomocysteinaemia, CVD, and stroke in childhood. *Dev Med Child Neurol*. 2001; 43: 220-225
- Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, Breteler MM; Rotterdam Scan Study Homocysteine and cognitive function in the elderly: the Rotterdam Scan Study *Neurology*. 2002; 59: 1375-1380

Queffeuilou G, Michel C, Vrtovsnik F, Philit JB, Dupuis E, Mignon F. Hyperhomocysteinemia, low folate status, homozygous C677T mutation of the methylene tetrahydrofolate reductase and renal arterial thrombosis. *Clin Nephrol.* 2002; 57: 158-162

Qureshi GA, Qureshi AA, Devrajani BR, Chippa MA, Syed SA. Is the deficiency of vitamin B12 related to oxidative stress and neurotoxicity in Parkinson's patients? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008; 7: 20-27

Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. *Indian J Biochem Biophys.* 2006; 43: 275-283

Rascol O, Payoux P, Ory F, Ferreira JJ, Brefel-Courbon C, Montastruc JL. Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Ann Neurol.* 2003; 53: 3-15

Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Peplonska B, Lokk J, Chodakowska-Zebrowska M, Stepien K, Winblad B, Barcikowska M. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2006; 404: 56-60

Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem.* 1975; 250: 1422-1426

Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempfski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning". *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17: 257-264

Riepe MW, Ludolph AC. Chemical preconditioning: a cytoprotective strategy. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174: 249-254

Riess O, Kuhn W, Krüger R. Genetic influence on the development of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2000; 247: 69-74

Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation.* 1998; 97: 437-443

Rozen R. Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26: 255-261

Ryan-Harshman M, Aldoori W. Folic acid and prevention of neural tube defects. *Can Fam Physician.* 2008; 54: 36-38

Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29: 1152-1161

Sachdev PS, Parslow RA, Lux O, Salonikas C, Wen W, Naidoo D, Christensen H, Jorm AF. Relationship of homocysteine, folic acid and vitamin B12 with depression in a middle-aged community sample *Psychol Med.* 2005; 35: 529-538

- Sachdev PS, Valenzuela MJ, Brodaty H, Wang XL, Looi J, Lorentz L, Howard L, Jones M, Zagami AS, Gillies D, Wilcken DE. Homocysteine as a risk factor for cognitive impairment in stroke patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003; 15: 155-162
- dos Santos EF, Busanello EN, Miglioranza A, Zanatta A, Barchak AG, Vargas CR, Saute J, Rosa C, Carrion MJ, Camargo D, Dalbem A, da Costa JC, de Sousa Miguel SR, de Mello Rieder CR, Wajner M. Evidence that folic acid deficiency is a major determinant of hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis*. 2009; 24: 257-269
- Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol*. 2006; 5: 355-363
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 2000; 267: 4904-4911
- Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19: 217-246
- Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull*. 2008; 29: 116-125
- Selhub J, D'Angelo A. Relationship between homocysteine and thrombotic disease. *Am J Med Sci*. 1998; 316: 129-141
- Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 1995; 332: 286-291
- Semmler A, Linnebank M, Krex D, Götz A, Moskau S, Ziegler A, Simon M. Polymorphisms of Homocysteine Metabolism Are Associated with Intracranial Aneurysms. *Cerebrovasc Dis*. 2008; 26: 425-429
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2002; 346: 476-483
- Seshadri S, Wolf PA, Beiser AS, Selhub J, Au R, Jacques PF, Yoshita M, Rosenberg IH, D'Agostino RB, DeCarli C. Association of plasma total homocysteine levels with subclinical brain injury: cerebral volumes, white matter hyperintensity, and silent brain infarcts at volumetric magnetic resonance imaging in the Framingham Offspring Study. *Arch Neurol*. 2008; 65: 642-649
- Seyfried J, Wüllner U. Inhibition of thioredoxin reductase induces apoptosis in neuronal cell lines: role of glutathione and the MKK4/JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359: 759-764
- Shulman LM, Gruber-Baldini AL, Anderson KE, Vaughan CG, Reich SG, Fishman PS, Weiner WJ. The evolution of disability in Parkinson disease. *Mov Disord*. 2008; 23: 790-796

Shulman LM, Taback RL, Rabinstein AA, Weiner WJ. Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002; 8: 193-197

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 1994; 36: 348-355

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1994; 36: 356-361

de Silva P, Jayamanne G, Bolton R. Folate deficient optic neuropathy. *J Med Case Reports.* 2008; 2: 299

Smith AD, Refsum H. Vitamin B-12 and cognition in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2008; 89: 707-711

Soeken KL, Lee WL, Bausell RB, Agelli M, Berman BM. Safety and efficacy of S-adenosylmethionine (SAME) for osteoarthritis. *J Fam Pract.* 2002; 51: 425-430

Spina MB, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 1398-1400

Spina MB, Cohen G. Exposure of striatal [corrected] synaptosomes to L-dopa increases levels of oxidized glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; 247: 502-507

Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. *Z Kardiol.* 2004; 93: 439-453

Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M; DACH-LIGA Homocystein e.V DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1392-1403

Steiger HJ, Hänggi D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. *Acta Neurochir (Wien).* 2007; 149: 1-10

Summers CM, Hammons AL, Mitchell LE, Woodside JV, Yarnell JW, Young IS, Evans A, Whitehead AS. Influence of the cystathionine beta-synthase 844ins68 and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphisms on folate and homocysteine concentrations. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16: 1010-1013

Sundström J, Sullivan L, Selhub J, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Jacques PF, Rosenberg IH, Levy D, Wilson PW, Vasan RS; Framingham Heart Study Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study. *Eur Heart J.* 2004; 25: 523-530

- Sutton-Tyrrell K, Bostom A, Selhub J, Zeigler-Johnson C. High homocysteine levels are independently related to isolated systolic hypertension in older adults. *Circulation*. 1997; 96: 1745-1749
- Tchantchou F. Homocysteine metabolism and various consequences of folate deficiency. *J Alzheimers Dis*. 2006; 9: 421-427
- Thanvi BR, Lo TC. Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad Med J*. 2004; 80: 452-458
- Toohey JJ. Vitamin B12 and methionine synthesis: a critical review. Is nature's most beautiful cofactor misunderstood? *Biofactors*. 2006; 26: 45-57
- Triantafyllou NI, Kararizou E, Angelopoulos E, Tsounis S, Boufidou F, Evangelopoulos ME, Nikolaou C, Vassilopoulos D. The influence of levodopa and the COMT inhibitor on serum vitamin B12 and folate levels in Parkinson's disease patients *Eur Neurol*. 2007; 58: 96-99
- Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 12474-12479
- Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 6369-6373
- Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP. Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2005; 20: 152-158
- Turan N, Csonka C, Csont T, Giricz Z, Fodor G, Bencsik P, Gyöngyösi M, Cakici I, Ferdinandy P. The role of peroxynitrite in chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2006; 70: 384-390
- Turski WA. Homocysteic acid: convulsant action of stereoisomers in mice. *Brain Res*. 1989; 479: 371-373
- Ubagai T, Lei KJ, Huang S, Mudd SH, Levy HL, Chou JY. Molecular mechanisms of an inborn error of methionine pathway. Methionine adenosyltransferase deficiency. *J Clin Invest*. 1995; 96: 1943-1947
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*. 1993; 39: 1764-1779
- Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, Schneede J. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet*. 2007; 121: 57-64

- Ungvari Z, Pacher P, Rischák K, Szollár L, Koller. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1899-1904
- Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, Levy D, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Wilson PW. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *JAMA.* 2003; 289: 1251-1257
- Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee RJ. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *Biol Chem.* 2006; 281: 35785-35793
- Walkinshaw G, Waters CM. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest.* 1995; 95: 2458-2464
- Wang J, Dudman NP, Wilcken DE, Lynch JF. Homocysteine catabolism: levels of 3 enzymes in cultured human vascular endothelium and their relevance to vascular disease. *Atherosclerosis.* 1992; 97: 97-106
- Warner TT, Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003; 53: 16-25
- Wei JC, Jan MS, Yu CT, Huang YC, Yang CC, Tsou HK, Lee HS, Chou CT, Tsay G, Chou MC. Plasma homocysteine status in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2007; 26: 739-742
- Weiner WJ. Motor fluctuations in Parkinson's disease. *Rev Neurol Dis.* 2006; 3: 101-108
- Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B12 and folate. *Br Med Bull.* 1999; 55: 669-682
- Wellmer J, Sturm KU, Herrmann W, Hoever J, Klockgether T, Linnebank M. Oral treatment of vitamin B12 deficiency in subacute combined degeneration. *Nervenarzt.* 2006; 77: 1228-1231
- Werner P, Di Rocco A, Prikhojan A, Rempel N, Bottiglieri T, Bressman S, Yahr MD. COMT-dependent protection of dopaminergic neurons by methionine, dimethionine and S-adenosylmethionine (SAM) against L-dopa toxicity in vitro. *Brain Res.* 2001; 893: 278-281
- Wersinger C, Sidhu A. An inflammatory pathomechanism for Parkinson's disease? *Curr Med Chem.* 2006; 13: 591-602
- Wilcken DE, Wilcken B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J Inher Metab Dis.* 1997; 20: 295-300
- Wilcken DE, Wilcken B, Dudman NP, Tyrrell PA. Homocystinuria--the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine. *N Engl J Med.* 1983; 309: 448-453

- Windebank AJ. Neurotoxicity of pyridoxine analogs is related to coenzyme structure. *Neurochem Pathol.* 1985; 3: 159-167
- Wüllner U, Kölsch H, Linnebank M. Methylene tetrahydrofolate reductase in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2005; 58: 972-973
- Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med.* 2002; 8: 600-606
- Yang F, Tan HM, Wang H. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Sheng Li Xue Bao.* 2005; 57: 103-114
- Zempleni J. Pharmacokinetics of vitamin B6 supplements in humans. *J Am Coll Nutr.* 1995; 14: 579-586
- Zhao WQ, Latinwo L, Liu XX, Lee ES, Lamango N, Charlton CG. L-dopa upregulates the expression and activities of methionine adenosyl transferase and catechol-O-methyltransferase. *Exp Neurol.* 2001; 171: 127-138
- Zittan E, Preis M, Asmir I, Cassel A, Lindenfeld N, Alroy S, Halon DA, Lewis BS, Shiran A, Schliamsner JE, Flugelman MY. High frequency of vitamin B12 deficiency in asymptomatic individuals homozygous to MTHFR C677T mutation is associated with endothelial dysfunction and homocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: 860-865

## **10. Danksagung**

Folgenden Personen danke ich für Ihre Unterstützung:

Herrn Prof. Dr. U. Wüllner für die Überlassung des Themas und für die fachliche Betreuung der Arbeit

Herrn Dr. M. Linnebank für das Korrekturlesen der Arbeit

Frau S. Proske-Schmitz für die Einarbeitung im Labor und die Hilfe bei den experimentellen Versuchen

Meiner Familie und D. Detiege, die immer für mich da sind.