

Genetische Determinanten des Homocystein- und Folatstoffwechsels

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Stephan Wans

geb. am 17.03.1967 in Siegen-Weidenau

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold

Prof. Dr. med. habil., Dipl.-Chem. Claus Luley

Prof. Dr. Markus Missler

Eingereicht am: 25.08.2005

Verteidigung am: 28.03.2006

Inhaltsverzeichnis		Seite
I	Abkürzungsverzeichnis	VI
II	Abbildungsverzeichnis	VIII
III	Tabellenverzeichnis	IX
IV	Geräte- und Softwareliste	XI
V	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	XIII
VI	Adressen im World Wide Web (WWW)	XV
1.	Allgemeine Einleitung	1
1.1.	Homocystein	1
1.1.1.	Homocystein und kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.1.2.	Stoffwechsel von Homocystein, einer nicht proteinogenen Aminosäure	5
1.1.3.	Transmethylierung	7
1.1.4.	Transsulfurierung	7
1.1.5.	Folsäure und Folatstoffwechsel	8
1.1.6.	Determinanten der Homocysteinkonzentration	9
1.1.7.	Genetische Determinanten des Homocysteinspiegels	11
1.1.8.	Polymorphismen im Gen der Thymidylatsynthase	14
1.2.	Mutationen	17
1.2.1.	Punktmutationen	18
1.2.2.	Insertionen und Deletionen	18
1.2.3.	Polymorphismen und "Single Nucleotide Polymorphism" (SNP)	18
1.3.	Methoden zum Nachweis von Mutationen	19
1.3.1.	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	19
1.3.2.	Direkte elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	20
1.3.3.	Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)	20
1.3.4.	Vor- und Nachteile von RFLP, dAGE, DHPLC und (D)HPLC-Sizing	23
2.	Ziel der Arbeit	25
3.	Graphische Darstellung der durchgeführten Arbeiten	26

4	Kapitel 1	
	Entwicklung von DHPLC-Methoden zur Bestimmung von DNA-Sequenzvariationen in ausgewählten Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels.	
		Seite
4.1	Einleitung	27
4.2	Ziel der Arbeit	29
4.3	Probanden, Material und Methoden	30
4.3.1	Probanden und Blutentnahme	30
4.3.2	Molekularbiologische Arbeiten	30
4.3.2.1	Mutationsnachweise	30
4.3.2.2	DNA-Isolierung	30
4.3.2.3	Agarosegelelektrophorese	31
4.3.2.4	Primervorbereitung, Primeraustestung und PCR-Optimierung	32
4.3.2.5	RFLP-Methodenetablierung	34
4.3.2.6	Direkte Agarosegelelektrophorese-Methodenetablierung	34
4.3.2.7	DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Methodenentwicklung	34
4.3.2.8	(D)HPLC-Sizing-Mutationsanalysen	36
4.3.2.9	Verifizierung neu entdeckter Sequenzvariationen	36
4.3.2.10	DNA-Sequenzierung	36
4.4	Ergebnisse	38
4.4.1	RFLP-Mutationsnachweise	38
4.4.2	dAGE-Mutationsnachweise	38
4.4.3	DHPLC-Mutationsnachweise	38
4.4.4	(D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise	39
4.4.5	Abbildungen der RFLP-, dAGE-, DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise	39
4.4.5.1	Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR-C677T)	40
4.4.5.2	Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR-A1298C)	41
4.4.5.3	Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR-G1793A)	43
4.4.5.4	Methylentetrahydrofolatdehydrogenase (MTHFD-G1958A)	46
4.4.5.5	Methioninsynthase (MTR-A2756G)	48
4.4.5.6	Reduced Folate Carrier I (RFC I-G80A)	50

	Seite	
4.4.5.7	Transcobalamin II (TC II-C776G)	51
4.4.5.8	Glutamatcarboxypeptidase II (GCP II-C1561T)	52
4.4.5.9	Thymidylatsynthase (TYMS-6-Bp-Deletion)	53
4.4.5.10	Thymidylatsynthase (TYMS-28-Bp-Repeat)	54
4.4.5.11-12	Cystathionin- β -Synthase (CBS-T833C und CBS-844Ins68)	55
4.5	Diskussion	56
4.5.1	RFLP-Mutationsnachweise	56
4.5.2	dAGE-Mutationsnachweise	58
4.5.3	DHPLC-Mutationsnachweise	59
4.5.4	(D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise	62
4.5.5	Bewertung der RFLP-, dAGE-, DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Methoden	63
5	Kapitel 2	
	Epidemiologische Untersuchungen zum Einfluss der Transcobalamin II-C776G-Transversion (TC II-C776G) und der Reduced Folate Carrier I-G80A-Transition (RFC I-G80A) auf Homocystein.	
5.1	Einleitung	66
5.2	Ziel der Arbeit	71
5.3	Probanden, Material und Methoden	72
5.3.1	Probanden und Blutentnahme	72
5.3.2	Laborparameter	72
5.3.3	Molekularbiologische Arbeiten	72
5.3.3.1	DNA-Isolierung	72
5.3.3.2	Mutationsanalysen	73
5.4	Ergebnisse	74
5.5	Diskussion	78

6	Kapitel 3	
	Entwicklung und Anwendung von DHPLC-Methoden zum Screenen nach bekannten und unbekanntem DNA-Sequenzvariationen am Beispiel des Thymidylatsynthasegens.	
		Seite
6.1	Einleitung	82
6.2	Ziel der Arbeit	84
6.3	Probanden, Material und Methoden	85
6.3.1	Probanden und Blutentnahme	85
6.3.2	Laborparameter	85
6.3.3	Molekularbiologische Arbeiten	85
6.3.3.1	DNA-Isolierung	85
6.3.3.2	Mutationsanalysen von bekannten Polymorphismen	85
6.3.3.3	DHPLC-Sequenzanalysen	86
6.3.3.4	Verifizierung neu entdeckter DNA-Sequenzvariationen	87
6.4	Ergebnisse	89
6.4.1	Mutationsanalysen von bekannten Polymorphismen	89
6.4.2	DHPLC-Screening nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen	91
6.4.3	Assoziationen mit Homocystein	104
6.5	Diskussion	106
6.5.1	DNA-Sequenzanalysen, Mutationsanalysen und Assoziationen mit Homocystein	106
6.5.2	Schwierigkeiten bei den DHPLC-Sequenzanalysen	108
6.5.3	Bewertung der entwickelten DHPLC-Methoden zur Suche nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen	110
7	Allgemeine Diskussion und Ausblick	113
8	Zusammenfassung	118
9	Anhang	119
10	Literaturverzeichnis	127
11	Danksagung	145
12	Publikationen	146
13	Selbstständigkeitserklärung	147
14	Lebenslauf	148

I Abkürzungsverzeichnis

5,10-Methylen-THF	5,10-Methylen tetrahydrofolat
5,6,7,8-THF	5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (siehe auch THF)
A	Adenosin
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGE	Agarosegelelektrophorese
ALF-Sequenzier	Automated Laser Fluorescent-Sequenzier
ASO	Allelspecific Oligonucleotide Hybridisation
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CC	Cytosin-Cytosin
CG	Cytosin-Guanin
Cy5	Cyanin-Farbstoff
dAGE	Direkte Agarosegelelektrophorese
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
(D)HPLC-Sizing	Variante der DHPLC
DifE	Deutsches Institut für Ernährungswissenschaften
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (englisch)	Deoxyribonucleic acid oder Deoxyribose nucleic acid
DNS (deutsch)	Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EthBr	Ethidiumbromid
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
FBP	Folate Binding Protein
G	Guanin
GA	Guanin-Adenin
GC	Guanin-Cytosin
Holo-TC II	Holo-Transcobalamin II
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IF	Intrinsic-Faktor
IFC I	Intestinal Folate Carrier I
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry
MMS	Methylmalonsäure
mRNA	Boten-RNA, vom englischen "Messenger-RNA"
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
n	Anzahl
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
OLA	Oligonukleotid Ligations Test
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>Pfu</i>	Polymerase aus dem Bakterium <i>Pyrococcus furiosus</i>
PTT	Protein Truncation Test
<i>Pwo</i>	Polymerase aus dem Bakterium <i>Pyrococcus woesei</i>
R	Repeat (Wiederholung)
Rep	Repeat (Wiederholung)
RFC I	Reduced Folate Carrier I
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAH	Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmonophosphat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
<i>Taq</i>	Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC I, II, III	Transcobalamin I, II, III
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
tHcy	Gesamthomocystein
THF	Tetrahydrofolat
TYMS	Thymidylatsynthase
U	Enzymeinheiten
UCSC	University of California at Santa Cruz
WT	Wildtyp

II Abbildungsverzeichnis		Seite
Abb.: 1	Chemische Strukturen von Homocystein, Homocystin und dem gemischten Homocystein-Cystin-Disulfid	1
Abb.: 2	Mögliche Mechanismen der Atherogenität von Homocystein	4
Abb.: 3	Homocystein- und Folatstoffwechsel	6
Abb.: 4	Folsäure in ihrer künstlichen Form als Folsäuremonoglutamat	8
Abb.: 5	Schematische Darstellung des Thymidylatsynthasegens	14
Abb.: 6	Hybridisierung für eine DHPLC-DNA-Sequenzanalyse	21
Abb.: 7	Fließdiagramm der durchgeführten Arbeiten	26
Abb.: 8	Überprüfung der Primeraustestung und PCR-Optimierung	33
Abb.: 9	MTHFR-C677T-Transition-Mutationsnachweise	40
Abb.: 10	MTHFR-A1298C-Transversion-Mutationsnachweise	41
Abb.: 11	MTHFR-G1793A-Transition-Mutationsnachweise	43
Abb.: 12	Sequenzierung der MTHFR-C1773T-Transition	44
Abb.: 13	DHPLC-Mutationsanalyse der MTHFR-G1793A-Transition und der MTHFR-C1970T-Transition	45
Abb.: 14	MTHFR-G1958A-Transition-Mutationsnachweise	46
Abb.: 15	MTR-A2756G-Transition-Mutationsnachweise	48
Abb.: 16	RFC I-G80A-Transition-Mutationsnachweise	50
Abb.: 17	TC II-C776G-Transition-Mutationsnachweise	51
Abb.: 18	GCP II-C1561T-Transition-Mutationsnachweise	52
Abb.: 19	TYMS-6-Bp-Deletion-Mutationsnachweise	53
Abb.: 20	TYMS-28-Bp-Repeat-Mutationsnachweise	54
Abb.: 21	CBS-844Ins68 und CBS-T833C-Mutationsnachweise	55
Abb.: 22	<i>Mbo</i> II-Erkennungssequenzen und Restriktionsschnittstellen im Amplifikat für den Mutationsnachweis der MTHFR-A1298C-Transversion	57
Abb.: 23	Amplifikatsequenz für den Nachweis der MTHFR-G1793A-Transition nach der Methode von Rady <i>et al.</i> (Rady <i>et al.</i> 2002)	60
Abb.: 24	Gelelektrophoretischer Mutationsnachweis des TYMS-28-Bp-Repeats	63
Abb.: 25	Vereinfachte Darstellung der Aufnahme und des Stoffwechsels von Folsäure und Folaten	66
Abb.: 26	Vereinfachte Darstellung der Aufnahme und des Stoffwechsels von Cobalamin	67

	Seite
Abb.: 27 Mutationsnachweis der TC II-C776G-Transversion, der TC II-G810A-Transition und der TC II-C>T-Transition	75
Abb.: 28 Assoziation zwischen Holo-TC II und Serumcobalamin in Abhängigkeit von den TC II-C776G-Genotypen	76
Abb.: 29 DHPLC-Mutationsanalyse der RFC I-G80A-Transversion	77
Abb.: 30 Thymidylatsynthase und Folatstoffwechsel	82
Abb.: 31 Nukleotidsequenz der sieben Exons des Thymidylatsynthasegens	88
Abb.: 32 TYMS-28-Bp-Repeat- und TYMS-G-58C-Transversion- Mutationsnachweise	90
Abb.: 33 DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-1 des Thymidylatsynthasegens	93
Abb.: 34 DHPLC- (D)HPLC-Sizing- und dAGE-Sequenzanalysen sowie DNA-Sequenzierung am Exon-2 des Thymidylatsynthasegens	95
Abb.: 35 DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-3 des Thymidylatsynthasegens	97
Abb.: 36 DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-4 des Thymidylatsynthasegens	98
Abb.: 37 DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-5 des Thymidylatsynthasegens	99
Abb.: 38 DHPLC-Sequenzanalysen und DNA-Sequenzierung am Exon-6 des Thymidylatsynthasegens	100
Abb.: 39 Mutationsnachweis der CCG-Insertion im Intron-5 des Thymidylatsynthasegens	101
Abb.: 40 DHPLC-Sequenzanalysen und Sequenzierungen am Exon-7 des Thymidylatsynthasegens	103
 III Tabellenverzeichnis	
Tab.: 1 Polymorphismen und ihr Einfluss auf Homocystein	13
Tab.: 2 Untersuchte Polymorphismen des Homocystein- und Folatstoffwechsels	28
Tab.: 3 Polymorphismen und angewendete Methoden zum Nachweis der Genotypen	31
Tab.: 4 PCR-Reaktionsansätze zur Austestung der idealen Primerkonzentration	32
Tab.: 5 Probenansätze für den RFLP-Restriktionsverdau	34
Tab.: 6 Zusammensetzung der Puffer für die DHPLC-Analysen	35
Tab.: 7 Polymorphismen mit angewendeten und empfohlenen Methoden zum Mutationsnachweis	56

	Seite	
Tab.: 8	DNA-Fragmente nach Verdau des MTHFR-A1298C-Amplifikates mit <i>Mbo</i> II	57
Tab.: 9	Bewertung der durchgeführten Methoden	65
Tab.: 10	Alter, Body Mass Index, tHcy, Serumfolat, Serumcobalamin, Serum-Pyridoxal-5-Phosphat, Holo-TC II und Methylmalonsäure bei den drei TC II-C776G Genotypen	76
Tab.: 11	Alter, BMI, tHcy, Serumfolat, Serumcobalamin, Pyridoxal-5-Phosphat, Holo-TC II und Methylmalonsäure bei den drei RFC I-G80A-Genotypen	77
Tab.: 12	DHPLC-Laufmittelgradienten und Analysetemperaturen für die Amplifikate der sieben Exons des Thymidylatsynthasegens	87
Tab.: 13	Ergebnisse der durchgeführten Mutationsanalysen	89
Tab.: 14	TYMS-28-Bp- und TYMS-G-58C-Genotypen	89
Tab.: 15	Ergebnisse der DHPLC-Sequenzanalysen der Amplifikate der sieben Exons des Thymidylatsynthasegens	91
Tab.: 16	Plasmafolat, Erythrozytenfolat, tHcy, Vitamin B ₆ und Serumcobalamin bei den Genotypen der C>T-Transition im Exon-7-Amplifikat, der 6-Bp-Deletion im 3'-Terminus und der 8-Bp-Deletion im Exon-2-Amplifikat	105
Tab.: 17	Studien in denen Assoziationen von kombinierten Genotypen mit Homocystein untersucht wurden	114
Tab.: 18	Primerpaare und Primersequenzen für die durchgeführten Mutationsanalysen und DHPLC-Sequenzanalysen am Thymidylatsynthasegen	120
Tab.: 19	Versuchsprotokolle für die RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweise Laufmittelgradienten und DHPLC- bzw. (D)HPLC-Analysetemperaturen für die Analysen der Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel	122
Tab.: 20	Laufmittelgradienten und DHPLC- bzw. (D)HPLC-Analysetemperaturen für die Analysen der Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel	125

IV Geräte- und Softwareliste

ALF-Sequenzier	Amersham Biosciences Europe GmbH Munzinger Strasse 9 D-79111 Freiburg
DHPLC-Anlage (Wave 3500)	Transgenomic Ltd. Europe Z.A. La Clef Sain Piere 10B, Rue Blaise Pascal F-78990 Elancourt
DNA-Workstation (L-020-G)	G. Kisker GbR Produkte für die Biotechnologie Ochtruper Strasse 18 D-48565 Steinfurt
Gelelektrophoresesystem (I Mupid)	Eurogentec Deutschland GmbH Cäcilienstrasse 46 D-50667 Köln
Gelkammer (ComPhor Midi)	Biozym Diagnostik GmbH Steinbrinksweg 27 D-31840 Hess. Oldendorf
Genamics-Expression (Version 1,100 [©] 2000)	Genamics Marcel Dinger PO Box 13096 Hamilton 2034 New Zealand
Hera Save Cleanbox (HS-12)	Heraeus Instruments Kendro Laboratory Products GmbH Robert-Bosch-Strasse 1 D-63505 Langenselbold
Millipore (H ₂ O)	Millipore GmbH Am Kronberger Hang 5 D-65824 Schwalbach
Polaroid-Kamera (GelCam; 0,8x)	Polaroid GmbH Sprendlinger Landstrasse 109 D-63069 Offenbach
Polaroid-Lichtschutzkappe (GH10; 10 x 8 cm)	Polaroid GmbH Sprendlinger Landstrasse 109 D-63069 Offenbach
Thermocycler (CP2-01)	Corbett Research 1/14 Hilly ST, Mortlake 2137 N.S.W. Australien

Transiluminator
(TFX-20.M)

LTF Labortechnik GmbH & Co KG
Obere Ebenhalde 19
D-88142 Wasserburg-Bodensee

WavemakerTM Software
(Version 4.1.42)

Transgenomic Ltd. Europe
Z.A. La Clef Sain Piere
10B, Rue Blaise Pascal
F-78990 Elancourt

V Chemikalien und Verbrauchsmaterial

<i>AccI</i> (Restriktionsenzym)	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim
Agarose für DNA-Elektrophorese	Serva Electrophoresis GmbH Carl-Benz Strasse 7 D-69115 Heidelberg
Agarose für PCR	Serva Electrophoresis GmbH Carl-Benz Strasse 7 D-69115 Heidelberg
<i>BseNI</i> (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
<i>BsuRI</i> (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
<i>CfoI</i> (Restriktionsenzym)	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Eschenstrasse 5 D-82024 Taufkirchen
<i>DraI</i> (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals GmbH Thüringer Strasse 15 D-37269 Eschwege
<i>HaeIII</i> (Restriktionsenzym)	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim
<i>Hinfl</i> (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
Ladepuffer (Elektrophorese)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot

Lambda-DNA	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
<i>Mbi</i> I (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
<i>Mbo</i> II (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
Molekulargewichtsstandard (100 Bp)	Amersham Biosciences Europe GmbH Munzinger Strasse 9 D-79111 Freiburg
Molekulargewichtsstandard (50 Bp)	Amersham Biosciences Europe GmbH Munzinger Strasse 9 D-79111 Freiburg
<i>Msp</i> I (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
<i>Mva</i> I (Restriktionsenzym)	MBI Fermentas Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot
Nukleasefreies Wasser (2 x 25 ml)	Promega GmbH High-Tech-Park Schildkrötstrasse 15 D-68199 Mannheim
PCR Master Mix (100 Reaktionen)	Promega GmbH High-Tech-Park Schildkrötstrasse 15 D-68199 Mannheim
PCR Reaktionsgefäße (200 µl) (G001-F)	G. Kisker GbR) Produkte für die Biotechnologie Ochtruper Strasse 18
Primer	MWG-Biotech GmbH Anzinger Strasse 7 D-85560 Ebersberg
pUC18-DNA	MBI Fermentas GmbH Opelstrasse 9 D-68789 St. Leon-Rot

QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH Qiagen Strasse 1 D-40724 Hilden
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik Raiffeisenstrasse 25 D-34295 Edermünde
Testkit Plasma- Erythrozytenfolat	Abbott GmbH & Co. KG Geschäftsbereich Diagnostika Max-Planck-Ring 2 65205 Wiesbaden
TBE-Puffer (10 x)	Promega High-Tech-Park Schildkrötstrasse 15 D-68199 Mannheim
Vakutainer-Blutentnahmesystem	Becton Dickinson Tullastrasse 8-12 D-69126 Heidelberg

VI WWW-Adressen (Internetseiten)

European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)
<http://www.iarc.fr/epic>

Genamics (Hamilton, New Zealand)
<http://genamics.com>

Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

MutationDiscovery
<http://www.mutationdiscovery.com>

University of California at Santa Cruz Genome Bioinformatics Genome Bioinformatics
(UCSC Genome Bioinformatics)
<http://genome.ucsc.edu>

Stanford University
<http://insertion.stanford.edu/melt.html>

1. Allgemeine Einleitung

1.1. Homocystein

1.1.1. Homocystein und kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind ein großes Gesundheitsproblem in den industrialisierten Ländern der ersten Welt. In den Niederlanden, der Schweiz, Österreich und Deutschland waren in den Jahren 1999 (Niederlande) und 2001 (Schweiz, Österreich, Deutschland) zum Beispiel 36 bzw. 46% aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen (De Bree *et al.* 2002, Stanger *et al.* 2003). Diese Zahlen verdeutlichen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen eine immense Belastung für die Gesundheitssysteme dieser Länder darstellen. Durch die steigende Zahl von älteren Menschen in der Bevölkerung wird diese Belastung zunehmen. Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen können auf einen hohen Blutdruck, das Rauchen oder eine Fettstoffwechselstörung, verbunden mit einer Erhöhung der Triglyceride und des LDL-Cholesterins sowie einer Erniedrigung des HDL-Cholesterins, zurückgeführt werden (Wald *et al.* 2002, Manolio *et al.* 1996, LaRosa 1986). Neben diesen veränderlichen Risikofaktoren gibt es die unveränderlichen Risikofaktoren: Alter, Geschlecht und die Familiengeschichte (Eikelboom *et al.* 1999). Da aber nicht alle kardiovaskulären Ereignisse auf diese bekannten Risikofaktoren zurückzuführen sind, wird intensiv nach weiteren Risikofaktoren gesucht. In diesem Zusammenhang wird seit einigen Jahren die nicht proteinogene Aminosäure Homocystein (Abb.: 1) untersucht (De Bree *et al.* 2002, Mangoni und Jackson 2002).

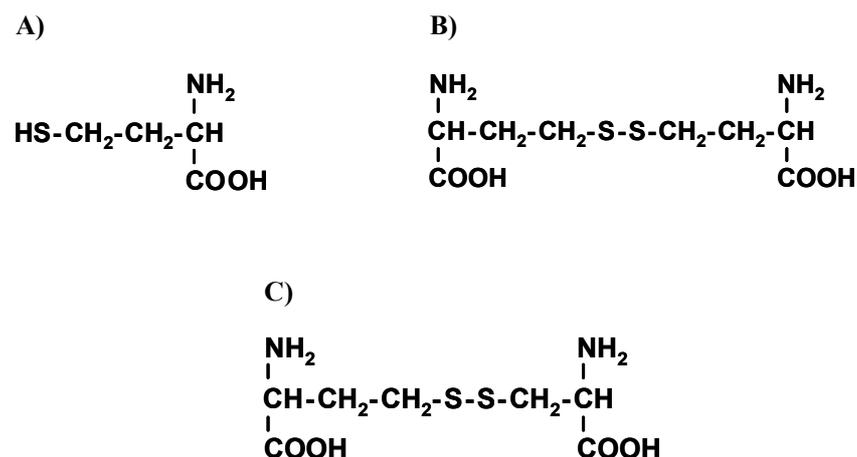


Abbildung 1: Chemische Strukturen von Homocystein, Homocystin und dem gemischten Homocystein-Cystin-Disulfid.

A) Homocystein, B) Homocystin (Homocysteindisulfid), C) Gemischtes Homocystein-Cystin-Disulfid.

Die Disulfide entstehen bei der Oxidation von zwei Homocysteinmolekülen- bzw. einem Homocystein- und einem Cysteinmolekül.

Das medizinische Interesse an Homocystein erwachte 1962, als Carson und Neill, Gerritsen *et al.* und Laster *et al.* (Carson und Neill 1962, Gerritsen *et al.* 1962, Laster *et al.* 1965) unabhängig voneinander über angeborene Stoffwechseldefekte bei mental zurückgebliebenen Patienten berichteten. Im Laufe der Untersuchungen wurde bei den Patienten Homocystin im Urin nachgewiesen (Laster *et al.* 1965, Mudd *et al.* 1964). Die Ursache für diese Homocystinurie wurde auf einen Defekt im Gen der Cystathionin- β -Synthase (CBS-Gen) zurückgeführt (Laster *et al.* 1965, Finkelstein *et al.* 1964). Die Vermutung, dass die Homocystinurie verantwortlich für die mentale Behinderung der Patienten war, konnte nicht bestätigt werden (Finkelstein 2000). 1969 beschrieb McCully (McCully 1969) zwei Patienten, die aufgrund unterschiedlicher Ursachen eine Homocystinurie hatten. Bei beiden Patienten wurden arterielle Läsionen festgestellt, die von McCully auf die Homocystinurie zurückgeführt wurden. Diese Untersuchungen waren die Grundlage für die Hypothese, dass erhöhte Homocysteinkonzentrationen ein Risikofaktor für Atherosklerose sind (McCully und Wilson 1975). Weitere Hinweise wurden als erstes von Wilcken und Wilcken im Jahr 1976 (Wilcken und Wilcken 1976) geliefert. Sie konnten zeigen, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung öfter einen pathologischen Homocysteinstoffwechsel hatten als gesunde Kontrollprobanden. In der Folgezeit wurden weltweit zahlreiche Studien zu diesem Aspekt durchgeführt. In einer von Boushey *et al.* (Boushey *et al.* 1995) durchgeführten Meta-Analyse von 1995 wurden 27 Studien, drei prospektive und 24 retrospektive, ausgewertet. Ein Anstieg des Homocysteinspiegels um 5 $\mu\text{mol/l}$ war mit einer Risikoerhöhung für koronare Herzerkrankungen bzw. cerebrovaskuläre Erkrankungen von 1,6 (95% CI: 1,4-1,7) für Männer und von 1,8 (95% CI: 1,3-1,9) für Frauen assoziiert. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese eines kausalen Zusammenhanges zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen und kardiovaskulären Erkrankungen (Boushey *et al.* 1995). Nach dieser Meta-Analyse sind weitere Studien, insbesondere auch prospektive Studien durchgeführt worden. In zwei voneinander unabhängigen Meta-Analysen wurden die Ergebnisse der bis zum Jahr 2002 zur Verfügung stehenden Studien ausgewertet (Ford *et al.* 2002, Homocysteine Studies Collaboration 2002). Beide Studien kommen zu dem Ergebnis, dass der Homocysteinspiegel mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Ein Homocysteinanstieg um 5 $\mu\text{mol/l}$ ist nach Ford *et al.* (Ford *et al.* 2002) mit einer Risikoerhöhung von 1,06-1,10 bei prospektiven Studien, 1,23-1,58 bei eingebetteten Fall-Kontroll-Studien und 1,70-2,16 bei retrospektiven Fall-Kontroll-Studien assoziiert. In der Studie der "Homocysteine Studies Collaboration" (Homocysteine Studies Collaboration

2002) wurde der Effekt einer 25% Reduzierung des Homocysteinspiegels auf kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass diese Reduzierung mit einer Risikoerniedrigung von 0,77-0,87 bei prospektiven Studien und 0,46-0,86 bei retrospektiven Studien assoziiert ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen retrospektiven und prospektiven Studien sind nach den Autoren auf einige Schwachpunkte des retrospektiven Studiendesigns, wie zum Beispiel Schwierigkeiten beim Rekrutieren von passenden Kontrollprobanden oder eine für die Untersuchung nicht ideale Blutentnahme sowie Lagerung, zurück zu führen.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Homocysteinspiegel und kardiovaskulären Erkrankungen kann aus den zur Verfügung stehenden Studien allerdings nicht abgeleitet werden (Eikelboom *et al.* 1999). Die durchgeführten Studien legen zwar nahe, beweisen aber nicht, dass moderat erhöhte Homocysteinspiegel (12-30 $\mu\text{mol/l}$, Stanger *et al.* 2003) bei Gesunden eine Gefahr für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen darstellen (De Bree *et al.* 2002).

Als Ursache für homocysteininduzierte kardiovaskuläre Erkrankungen wird die Schädigung der Endothelzellen und das mit dieser Schädigung verbundene Auslösen einer endothelialen Dysfunktion diskutiert (Sydow und Böger 2001). Die endotheliale Dysfunktion wird als ein frühes Zeichen für den Beginn von kardiovaskulären Erkrankungen angesehen (Celermajer *et al.* 1993). In *vivo* und *in vitro* Experimente lassen vermuten, dass erhöhte Homocysteinkonzentrationen über folgende Mechanismen eine Schädigung des Endothels bewirken (Abb.: 2):

1. Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezien (Blundell *et al.* 1996, Harker *et al.* 1976, Harker *et al.* 1983, Welch *et al.* 1998),
2. Reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxyd (NO) (De Bree *et al.* 2002),
3. Inhibition der Glutathion-Peroxidase-1 (Loscalzo *et al.* 1996, Upchurch *et al.* 1997),
4. Reduzierte Endothelin-1 Produktion (Drunat *et al.* 2001, Drunat *et al.* 2002).

Reaktive Sauerstoffspezien wie das Superoxid-Anion (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen durch die Autooxidation von Homocystein zu Homocystin (Starkebaum und Harlan 1986). Ihr Abbau wird durch die homocysteininduzierte Inaktivierung der endothelialen NO-Synthase und der Glutathion-Peroxidase-1 behindert. Nach einer von Harker *et al.* (Harker *et al.* 1976, Harker *et al.* 1983) formulierten Hypothese sind homocysteininduzierte Endothelschäden auf die Formation von reaktiven Sauerstoffspezien, insbesondere H_2O_2 , zurückzuführen.

NO ist ein vasodilatierendes, antiatherogenes Molekül. Die NO-Synthese der endothelialen Stickstoffmonoxydsynthase (eNOS) wird durch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) gehemmt. Stühlinger *et al.* (Stühlinger *et al.* 2001) konnten zeigen, dass experimentell erhöhte Homocysteinspiegel zu einem Anstieg von ADMA und in der Folge zu einer verminderten Endothelfunktion führten.

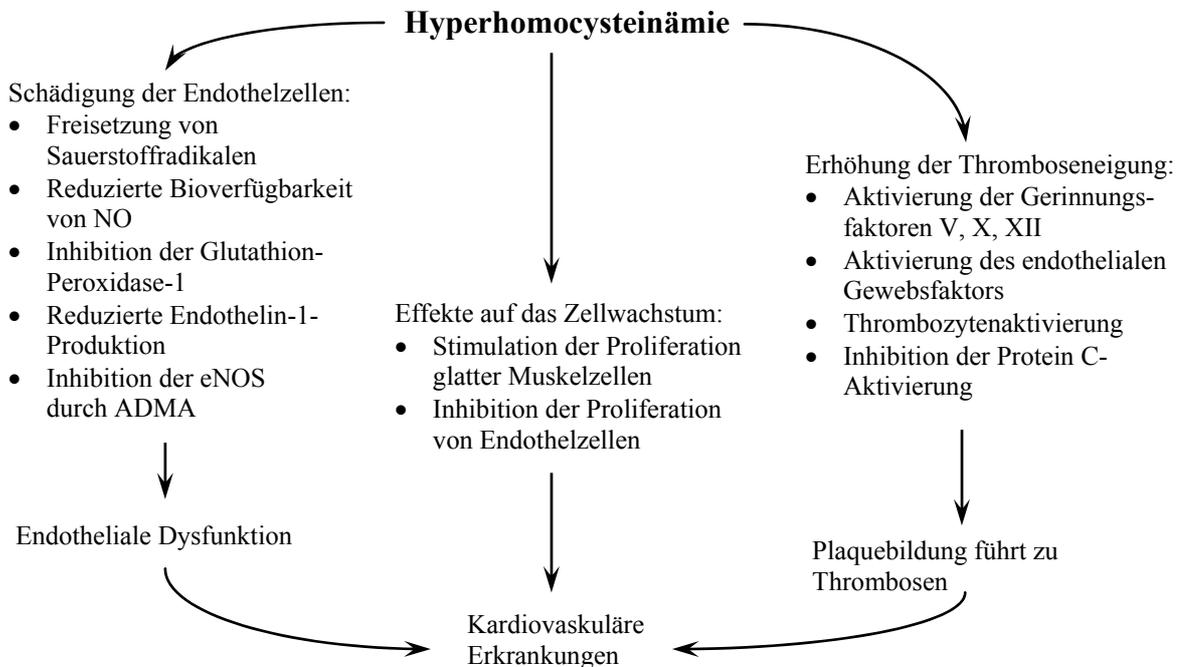


Abbildung 2: Mögliche Mechanismen der Atherogenität von Homocystein.

Endothelin setzt an der Endotheloberfläche NO frei, so dass es zur Vasodilatation kommt. Durch die homocysteininduzierte Reduktion der Endothelin-1 Produktion wird die vom Endothelin stimulierte endotheliale NO-Freisetzung verhindert, wodurch es zu einer verminderten Vasodilatation kommen kann (Drunat *et al.* 2001, Drunat *et al.* 2002, Demuth *et al.* 1999).

In vitro konnte gezeigt werden, dass Homocystein die Expression von Genen, die den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten, stimuliert (Stangl *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass es durch die Schädigung und Apoptose von Endothelzellen zu einer endothelialen Dysfunktion kommt.

Neben der endothelialen Dysfunktion reagiert das Endothel auf die Zellschädigungen mit der Aktivierung der Gerinnungsfaktoren V, X, XII, des endothelialen Gewebefaktors und der Thrombozyten sowie mit der Inhibition der Protein C-Aktivierung (Eikelboom *et al.* 1999, Lentz und Sadler 1991). Dadurch kann es zur Thrombusbildung und zur Formation von arteriellen Plaques kommen, wodurch in der Folge kardiovaskuläre Erkrankungen

entstehen können. Ein weiterer Mechanismus, der die Rolle des Homocysteins bei kardiovaskulären Erkrankungen erklären kann, ist der Effekt auf das Wachstum von glatten Muskelzellen und von endothelialen Zellen. Homocystein stimuliert das Wachstum der glatten Muskelzellen und reduziert das der Endothelzellen (Harker *et al.* 1976, Harker *et al.* 1983, Tsai *et al.* 1994, Wang *et al.* 2002).

Neben dem potentiell kausalen Zusammenhang zwischen Homocystein und kardiovaskulären Erkrankungen, gibt es auch andere Erkrankungen, deren Entstehung und Verlauf im Zusammenhang mit Homocystein diskutiert werden. Neuere Studien legen zum Beispiel die Vermutung nahe, dass Homocystein an der Entstehung und dem Verlauf der Osteoporose und Alzheimer beteiligt ist (Seshadri *et al.* 2002, van Meurs *et al.* 2004, McLean *et al.* 2004, Sato *et al.* 2005, McIlroy *et al.* 2002, Miller 2000, Miller 2003, Morris 2003). Des Weiteren wird von mehreren Autoren ein Zusammenhang zwischen Homocystein und dem Auftreten von Neuralrohrdefekten beschrieben (Bjorke-Monsen *et al.* 1997, Afman *et al.* 2002, van der Put *et al.* 1995, van der Put *et al.* 1998).

1.1.2. Stoffwechsel von Homocystein, einer nicht proteinogenen Aminosäure

Homocystein ist eine in der Nahrung nicht vorkommende, schwefelhaltige Aminosäure (Stanger *et al.* 2003, Guttormsen *et al.* 1998). Im menschlichen Organismus entsteht sie als Stoffwechselprodukt von Methylierungen bei denen S-Adenosylmethionin (SAM) zu S-Adenosylhomocystein (SAH) demethyliert und dieses anschließend zu Homocystein hydrolisiert wird (Abb.: 3) (Weiß 2003, Geisel *et al.* 2003). Homocystein befindet sich in einem Kreislauf, in dem es mit Hilfe des Enzyms Methioninsynthase (MTR) über Methionin wieder zu SAM verstoffwechselt wird (Guttormsen *et al.* 1998, Lu 2000). Dieser Kreislauf wird als Transmethylierung bezeichnet. Über die Methioninsynthase, welche für die Methylierung des Homocysteins 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF) braucht, ist der Methylierungskreislauf mit dem Folatstoffwechsel verknüpft (Abb.: 3). 5,10-Methylentetrahydrofolat (5,10-Methylen-THF) wird für die 5-Methyl-THF- und die Desoxythymidinsynthese gebraucht. Es stellt das Bindeglied zwischen dem Homocysteinstoffwechsel und der Desoxythymidin- bzw. DNA-Synthese dar. Alternativ zum Methylierungskreislauf wird Homocystein über Cystathionin und Cystein vollständig zu Sulfat und Kohlendioxid abgebaut (Mosharov *et al.* 2000). Dieser katabolische Stoffwechselweg wird als Transsulfurierung bezeichnet (Lu 2000).

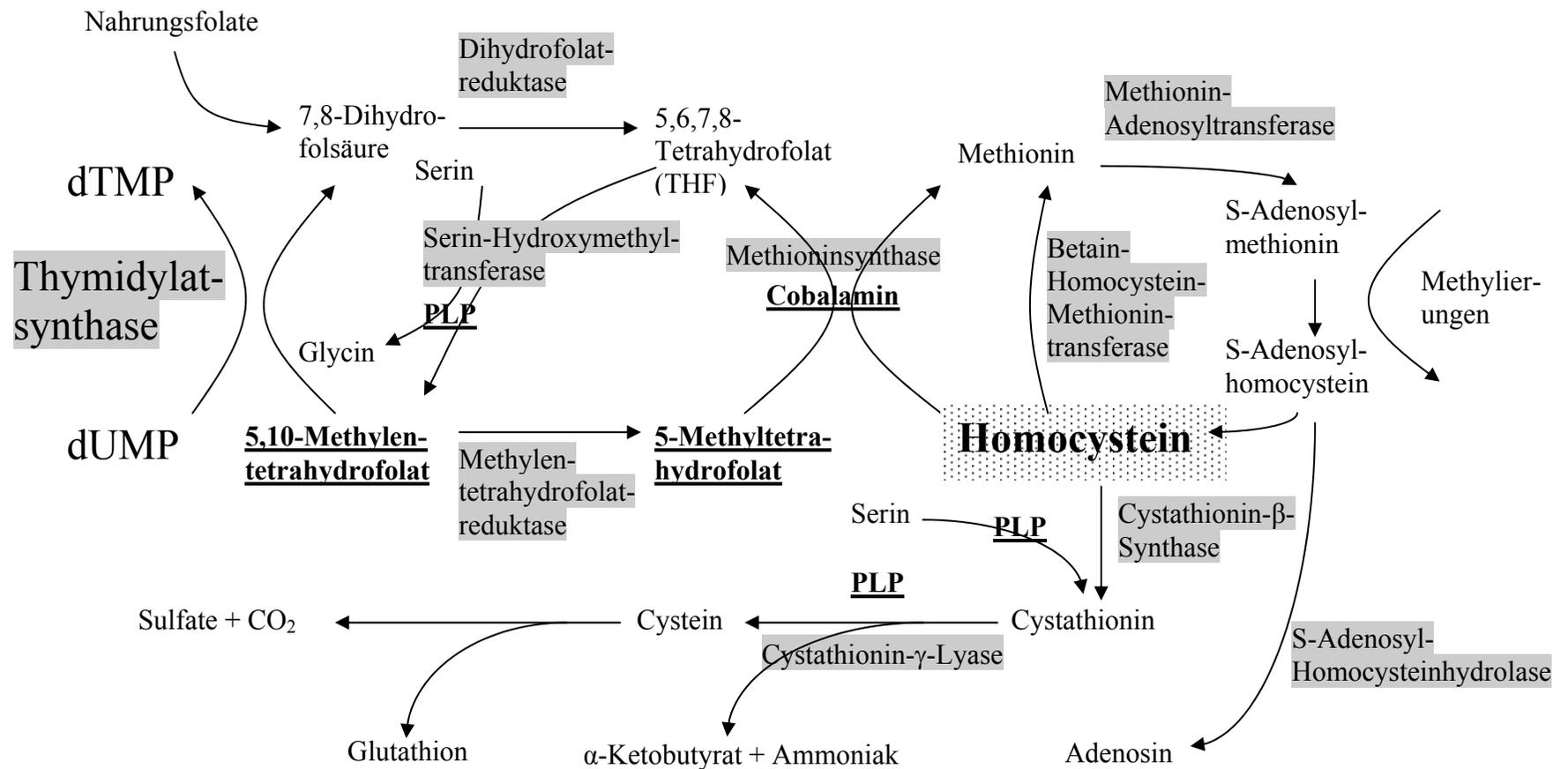


Abbildung 3: Homocystein- und Folatstoffwechsel.

Vitamine sind unterstrichen, Enzyme sind schattiert und die Aminosäure Homocystein ist punktiert. Erklärung der Abbildung im Text. PLP: Pyridoxal-5-Phosphat (Vitamin B₆). dTMP: Desoxythymidinmonosphat, dUMP: Desoxyuridinmonosphat.

1.1.3. Transmethylierung

Im ersten Schritt der dreistufigen Demethylierung von Methionin zu Homocystein werden Methionin und ATP unter der Katalyse des Magnesium-abhängigen Enzyms Methionin-Adenosyltransferase zu SAM verstoffwechselt (Abb.: 3). Im zweiten Schritt überträgt SAM eine Methylgruppe auf einen Akzeptor und wird dabei zu S-Adenosylhomocystein (SAH). Dieser Schritt wird von verschiedenen Methyltransferasen katalysiert. SAM ist der wichtigste Methylgruppendonator in den Zellen des menschlichen Organismus und der einzige in den Zellen des zentralen Nervensystems (Bolander-Gouaille 2001). Durch die SAM-abhängigen Methylierungen werden unter anderen Phospholipide, Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren methyliert (Bolander-Gouaille 2001, Lu 2000). Im dritten Schritt wird SAH hydrolytisch unter Mitwirkung der S-Adenosyl-Homocysteinhydrolase gespalten, wobei Adenosin und Homocystein entstehen. Homocystein wird anschließend entweder durch Methylierung zu Methionin verstoffwechselt oder der Transsulfurierung zugeführt.

Eine vitaminunabhängige alternative, die durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase katalysierte Methylierung des Homocysteins zu Methionin (Abb.: 3), findet nur in der Leber und in den Nieren statt (McKeever *et al.* 1991, Heil *et al.* 2000, Chadwick *et al.* 2000).

1.1.4. Transsulfurierung

Im Gegensatz zum Methylierungskreislauf des Homocysteins, bei dem aus Methionin über SAM und SAH wieder Homocystein entsteht, handelt es sich bei der Transsulfurierung um den zweistufigen, irreversiblen Abbau des Homocysteins zu Cystein (Lu 2000, Mudd und Levy 1983). Im ersten Schritt, der Transsulfurierung, kondensiert das Homocystein mit Serin unter Katalyse des Enzyms Cystathionin- β -Synthase (CBS) zu Cystathionin. Im zweiten Schritt werden unter Mitwirkung der Hydrolase Cystathionin- γ -Lyase Ammoniak und α -Ketobutyrat abgespalten, wobei Cystein entsteht. Für beide Reaktionen wird Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) benötigt (Sobczynska-Malefora *et al.* 2003, Obeid *et al.* 2005). Cystein wird zur Synthetisierung des Glutathion (Glutamat-Cystein-Glycin, Glu-Cys-Gly, Q-C-G) benutzt oder es wird im weiteren Verlauf zu Sulfat und CO₂ abgebaut. Sulfat wird mit dem Urin ausgeschieden.

1.1.5. Folsäure und Folatstoffwechsel

Folate sind die natürlichen Formen der Folsäure (Abb.: 4). Die Bezeichnung Folate umfasst chemische Verbindungen, die aus einem Pteridinring, p-Aminobenzoat und einem oder mehreren Glutamatresten bestehen.

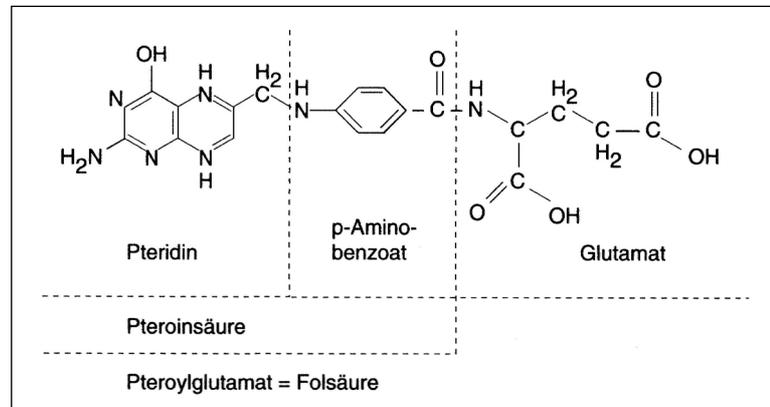


Abbildung 4: Folsäure in ihrer künstlichen Form als Folsäuremonoglutamat (Pteroylglutamat) (entnommen aus Bässler *et al.* 1997, Seite 104).

Die aus Pteridin und p-Aminobenzoat gebildete Teilstruktur wird als Pteroinsäure bezeichnet. Je nach Anzahl der an die Pteroinsäure gebundenen Glutamatreste wird zwischen Pteroylmonoglutamat oder Pteroylpolyglutamat unterschieden. Pteroylmonoglutamat wird auch als Pteroylglutamat oder Folsäuremonoglutamat, Pteroylpolyglutamat auch als Folsäurepolyglutamat bezeichnet. Weil der Mensch Folate nicht synthetisieren kann, sind die mit der Nahrung aufgenommenen Folate die einzige Folatquelle für ihn (Nguyen *et al.* 1997, Ulrich *et al.* 2002). Die Resorption der Folate erfolgt durch die Enterozyten im Dünndarm, wobei nur Folsäuremonoglutamat resorbiert wird (Stover 2004, Moat *et al.* 2004b). Sie wird vom Reduced Folate Carrier I (RFC I) und dem Folate Binding Protein (FBP) vermittelt. Neben der enzymvermittelten Aufnahme kann Folsäuremonoglutamat bis zu 30% mittels passiver Diffusion in die Enterozyten aufgenommen werden. Nach der Aufnahme in die Enterozyten wird Folsäuremonoglutamat zu 7,8-Dihydrofolat und anschließend zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (THF) reduziert. Katalysiert werden die beiden Reaktionen von der Folatreduktase und der Dihydrofolatreduktase. THF und seine Derivate sind die biochemisch aktiven Formen der Folsäure. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Methylgruppenübertragung von Serin auf Homocystein und auf Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) (Koletzko *et al.* 2004). Als erstes wird THF unter Mitwirkung der Serin-Hydroxymethyltransferase (Heil *et al.* 2001) zu 5,10-Methylen-THF methyliert (Abb.: 3). 5,10-Methylen-THF ist der Methylgruppendonator für die Methionin- und dTMP-Synthese. Bei der

Methioninsynthese wird 5,10-Methylen-THF unter Mitwirkung des Enzyms Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR) zu 5-Methyl-THF reduziert, welches dann bei der Methylierung des Homocysteins seine Methylgruppe wieder abgibt. Bei der Reaktion entstehen Methionin und THF. Neben der Methioninsynthese wird für die Übertragung der Methylgruppe auch Vitamin B₁₂ (Cobalamin) gebraucht. Die Methylgruppe wird primär auf Vitamin B₁₂ und erst sekundär auf das Homocystein übertragen. Bei der von der Thymidylatsynthase (TYMS) katalysierten Neusynthese von dTMP wird eine Methylgruppe vom 5,10-Methylen-THF auf dUMP übertragen. Es entstehen dTMP und 7,8-Dihydrofolat. 7,8-Dihydrofolat wird anschließend zu THF reduziert.

1.1.6. Determinanten der Homocysteinkonzentration

Es gibt zwei unterschiedliche Ausprägungsformen von erhöhten Homocysteinspiegeln, die Homocystinurie und die Hyperhomocysteinämie. Die Homocystinurie beschreibt Homocysteinkonzentrationen $>100\mu\text{mol/l}$ (Stanger *et al.* 2003). Sie ist eine seltene, angeborene Erbkrankheit (1 Patient auf 300.000 Geburten) und beruht auf Mutationen in den Genen der Cystathionin- β -Synthase und der Methylenetetrahydrofolatreduktase. Als Hyperhomocysteinämie werden Homocysteinkonzentrationen $>12\mu\text{mol/l}$ und $<30\mu\text{mol/l}$ bezeichnet (Stanger *et al.* 2003). Die Hyperhomocysteinämie ist mit 5-10% relativ häufig. Sie kann durch das Alter, die Nierenfunktion, den Lebensstil, die körperliche Aktivität, den Vitaminstatus, das Geschlecht und durch die genetische Ausstattung bedingt sein. Nicht selten sind mehrere dieser Ursachen verantwortlich für das Auftreten einer Hyperhomocysteinämie. Wenn die Hyperhomocysteinämie genetisch bedingt ist, wird sie durch einen Polymorphismus und nicht durch eine Mutation verursacht. Homocysteinkonzentrationen $>30\mu\text{mol/l}$ und $<100\mu\text{mol/l}$ werden als intermediäre Hyperhomocysteinämie bezeichnet (Stanger *et al.* 2003).

Das Alter, die Nierenfunktion, der Lebensstil, die körperliche Aktivität und der Vitaminstatus sind veränderliche Determinanten des Homocysteinspiegels. Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Homocysteinkonzentration zu (Andersson *et al.* 1992, De Bree *et al.* 2002). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der mit zunehmendem Alter abnehmenden Nierenfunktion (Manjunath *et al.* 2003). Kaffeekonsum (Jacques *et al.* 2001, Koehler *et al.* 2001) und Rauchen (Nygard *et al.* 1998, Rasmussen *et al.* 2000) sind bei Männern und Frauen mit erhöhten Homocysteinspiegeln assoziiert. Die Assoziation des Rauchens mit dem Homocysteinspiegel könnte darauf zurückzuführen sein, dass Raucher sich im Allgemeinen weniger bewusst ernähren (Dallongeville *et al.* 1998, Saw *et*

al. 2001). Für Tee konnte bis jetzt keine eindeutige Assoziation zu Homocystein gefunden werden (De Bree *et al.* 2002). Moderater Alkoholkonsum hat eine homocysteinsenkende Wirkung, wohingegen Alkoholmissbrauch zu erhöhten Homocysteinspiegeln führt (Cravo *et al.* 1996, Koehler *et al.* 2001, Bleich *et al.* 2000a, Bleich *et al.* 2000b, Halsted 2001). Der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Homocystein ist sehr komplex und insbesondere die Wirkung von verschiedenen alkoholischen Getränken (Bier, Wein, Spirituosen) ist noch nicht aufgeklärt (Bleich *et al.* 2000a).

Physische Belastungen, insbesondere kurze, hochintensive und konsumierende Belastungen führen zu einem Anstieg des Homocysteinspiegels (Weiß 2003, Herrmann *et al.* 2003a, Herrmann *et al.* 2003b). Ausdauerbelastungen im Zusammenhang mit einem entsprechenden Ausdauertraining senken das Homocystein dagegen leicht (Weiß 2003).

Insbesondere die biologisch aktiven Formen der Folsäure und die Vitamine B₁₂ und B₆ sind wichtige Determinanten des Homocysteinspiegels. Die homocysteinsenkende Wirkung von Folaten, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆-Applikationen ist in verschiedenen Studien nachgewiesen worden. Dies gilt sowohl für normale (<12 µmol/l) (Ward *et al.* 1997, Brouwer *et al.* 1999) als auch für erhöhte (>12 µmol/l) Homocysteinkonzentrationen (Olszewski *et al.* 1989, Ubbink *et al.* 1993). In einer von Clarke und Armitage (Clarke und Armitage 2000) durchgeführten Meta-Analyse wurde nachgewiesen, dass Homocystein durch tägliche Folsäureapplikationen zwischen 0,5 und 5 mg bis um 25% gesenkt werden kann. Durch zusätzliche Verabreichung von Vitamin B₁₂ kann Homocystein um weitere 7% gesenkt werden. Vitamin B₆ zeigte in dieser Meta-Analyse keinen homocysteinsenkenden Effekt. Vitamin B₆ entfaltet seine homocysteinsenkende Wirkung bei Patienten mit erhöhten Methioninkonzentrationen und bei Versuchen mit forcierter Methioninaufnahme (Methioninbelastungstests) (Bostom *et al.* 1995, Stanger *et al.* 2003). In der von Clarke und Armitage (Clarke und Armitage 2000) durchgeführten Meta-Analyse waren keine Studien enthalten, in denen Methioninbelastungstests durchgeführt wurden. Auch die Nahrungsaufnahme von Vitaminen wirkt sich signifikant auf den Homocysteinspiegel aus. So ist eine höhere Folataufnahme mit niedrigeren Homocysteinkonzentrationen assoziiert (Ubbink *et al.* 1993, Bates *et al.* 1997, Rasmussen *et al.* 2000, Jacques *et al.* 2001, Saw *et al.* 2001). Für Vitamin B₁₂ konnte nur bei älteren Personen und Senioren ein Zusammenhang zwischen dem mit der Nahrung aufgenommenen Vitamin B₁₂ und niedrigeren Homocysteinspiegeln gefunden werden (Ubbink *et al.* 1993, Saw *et al.* 2001).

Das Geschlecht und die genetische Ausstattung eines Menschen sind gegebene unveränderliche Determinanten des Homocysteinspiegels, die sich innerhalb eines Lebens nicht ändern. Männer haben höhere Homocysteinkonzentrationen als Frauen (De Bree *et al.* 2002). Bei Frauen steigt das Homocystein nach den Wechseljahren an (Andersson *et al.* 1992). Auf den Einfluss der genetischen Ausstattung wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

1.1.7. Genetische Determinanten des Homocysteinspiegels

Die häufigste Ursache für eine Homocystinurie sind Mutationen im CBS-Gen (Kraus *et al.* 1999). In diesem Gen sind bisher 130 krankheitsverursachende Mutationen beschrieben (Moat *et al.* 2004a). Die meisten von diesen Mutationen sind so genannte private Mutationen, die bis jetzt nur bei einer Person gefunden worden sind. (Kraus *et al.* 1999). Die zwei häufigsten nicht privaten Mutationen im CBS-Gen sind die CBS-T833C-Transition und die CBS-G919A-Transition (Kluijtmans *et al.* 1999, Gallagher *et al.* 1995). Die dritthäufigste Mutation ist die IVS-11-2. Sie befindet sich im Intron-11 und verändert die DNA-Sequenz an der 3'-Spleissstelle von Exon-12, wodurch das gesamte Exon nicht exprimiert wird (Kozich und Kraus 1992). Der am besten untersuchte Polymorphismus im CBS-Gen ist eine Insertion von 68 Basenpaaren (CBS-844Ins68) (Tsai *et al.* 1996, Tsai *et al.* 2000, De Stefano *et al.* 1998, De Franchis *et al.* 1998). Dieser Polymorphismus verändert die 3'-Spleissstelle von Exon-8, wodurch die CBS-T833C-Transition unwirksam wird (Tsai *et al.* 1996). Die CBS-844Ins68-Insertion befindet sich immer in *cis*-Formation mit der CBS-T833C-Transition in einem Allel (68-Bp-Ins/C). Die CBS-T833C-Transition kommt dagegen sehr selten (1/58.000-1.000.000) auch in einem Wildtypallel, das heißt ohne die CBS-844Ins68-Insertion vor (WT/C) (Gaustadnes *et al.* 1999). Bei diesen Personen erzeugt die Transition ein vorzeitiges Stoppcodon in der codierenden DNA-Sequenz, wodurch es zu einem funktionslosen CBS-Protein und in der Folge zu einer Homocystinurie kommt. Die CBS-C699T-Transition und die CBS-T1080C-Transition sind zwei weitere Polymorphismen im CBS-Gen, die gut untersucht sind (Kruger *et al.* 2000, Lievers *et al.* 2001). Beide Polymorphismen verändern das dritte Nukleotid des jeweiligen Codons. Sie sind stille DNA-Sequenzvariationen und haben keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des CBS-Proteins. Ein Zusammenhang der beiden Polymorphismen mit dem Homocysteinspiegel konnte bis jetzt nicht gefunden werden (Lievers *et al.* 2001). Beide Polymorphismen zeigten allerdings einen Effekt auf die homocysteinsenkende Wirkung von Folsäureapplikationen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Kruger *et*

al. 2000). Bei homozygoten CBS-C699T- (TT) und CBS-T1080C-Patienten (CC) wurde durch Folsäureapplikationen die höchste Erniedrigung des Homocysteinspiegels (13,6% gegenüber 4,8% beim CBS- C699T und 12,9% gegenüber 2,7% beim CBS-T1080C) erzielt.

Neben Mutationen und Polymorphismen im CBS-Gen sind in den letzten Jahren auch eine Reihe von Polymorphismen in anderen Genen des Homocysteinestoffwechsels untersucht worden. Der am besten untersuchte Polymorphismus ist die C677T-Transition im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR-C677T). Der Polymorphismus ist relativ häufig. In einer Meta-Analyse von Wald *et al.* (Wald *et al.* 2002) waren 47% der untersuchten Personen Wildtypen (CC), 43% heterozygote Mutanten (CT) und 10% homozygote Mutanten (TT). Der Polymorphismus verursacht eine um 34% (heterozygote Träger, CT-Genotyp) bzw. 71% (homozygote Träger, TT-Genotyp) reduzierte Aktivität der Methylentetrahydrofolatreduktase (van der Put *et al.* 1996). Dadurch kommt es bei betroffenen Personen zu einem signifikanten Anstieg des Homocysteinspiegels (Frosst *et al.* 1995). Der Polymorphismus verursacht allerdings keine Homocystinurie. Er ist mit moderat erhöhten Homocysteinspiegeln (12-30 $\mu\text{mol/l}$) (Stanger *et al.* 2003) assoziiert. Besonders deutlich wirkt sich der Polymorphismus bei Probanden mit niedrigen Folatkonzentrationen aus (Harmon *et al.* 1996, Jacques *et al.* 1996, Geisel *et al.* 2003). Eine von Klerk *et al.* (Klerk *et al.* 2002) durchgeführte Meta-Analyse kommt zu dem Ergebnis, dass der MTHFR-677TT-Genotyp signifikant mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert ist. In Tabelle 1, sind weitere Polymorphismen, die in den letzten Jahren im Zusammenhang mit dem Homocysteinspiegel untersucht worden sind, zusammengefasst. Ihr Einfluss auf den Homocysteinspiegel ist geringer als der der MTHFR-C677T-Transition, bzw. weniger gut untersucht. Assoziationen dieser Polymorphismen mit kardiovaskulären Erkrankungen konnten bis jetzt nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Polymorphismen und ihr Einfluss auf Homocystein.

Gen (Kurzbezeichnung)	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Proteinebene	Literatur	Effekt auf HCY
Methylentetrahydrofolat- reduktase (MTHFR)	C677T	A222V	Frosst <i>et al.</i> (1995)	+
	A1298G	E433A	van der Put <i>et al.</i> (1998) Geisel <i>et al.</i> (2003)	0
Cystathionin- β -Synthase (CBS)	C699T	stille Variation	Lievers <i>et al.</i> (2003b) Kruger <i>et al.</i> (2000) De Stefano <i>et al.</i> (1998)	0
	T1080C	stille Variation	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
	14037-VNTR- 31-Bp	---	Lievers <i>et al.</i> (2003a, b)	+
	844ins68		Gaustadnes <i>et al.</i> (1999, 2000)	0
Methioninsynthase (MTR)	A2756G	D919G	Leclerc <i>et al.</i> (1996) Geisel <i>et al.</i> (2003)	0
Methioninsynthase- Reduktase (MTRR)	A66G	I22M	Wilson <i>et al.</i> (1999) Geisel <i>et al.</i> (2003)	0
Reduced Folate Carrier I (RFC I)	G80A	R27H	Chango <i>et al.</i> (2000) Drogan <i>et al.</i> (2004)	+/-
Transcobalamin II (TC II)	A67G	I23V	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	+/-
	G280A	G94S	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
	C776G	P259R	Namour <i>et al.</i> (2001) Miller <i>et al.</i> (2002)	+/-
	C1043T	S348F	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
	G1196A	R399Q	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
Betain-Homocystein- Methionin-Transferase (BHMT)	G595A	G199S	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
	G716A	Q239R	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
	G1218T	Q406H	Lievers <i>et al.</i> (2003a)	0
Serin-Homocystein- Methionin-Transferase (SHMT)	C1420T	L474F	Heil <i>et al.</i> (2001)	+/-
Katechol-O-Methyl- transferase (COMT)	G1947A	V158M	DeMille <i>et al.</i> (2002)	+/-
Glutamatcarboxy- peptidase II (GCP II)	C1561T	H475Y	Devlin <i>et al.</i> (2000) Drogan <i>et al.</i> (2004)	+/-
Thymidylatsynthase (TYMS)	28-Bp-Repeat	---	Kawakami <i>et al.</i> (2001) Brown <i>et al.</i> (2004) Trinh <i>et al.</i> (2003)	+/-
	G-58C	---	Mandola <i>et al.</i> (2003) Kawakami <i>et al.</i> (2003)	#
	6-Bp-Deletion	---	Ulrich <i>et al.</i> (2000) Mandola <i>et al.</i> (2004) Kealey <i>et al.</i> (2005)	-

Der Aminosäurecode der 20 proteinogenen Aminosäuren und der Basencode der vier DNA-Basen sind im Anhang aufgeschrieben. #: noch nicht untersucht.

1.1.8. Polymorphismen im Gen der Thymidylatsynthase

Innerhalb der sieben Exons des Thymidylatsynthasegens sind in der Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) vier DNA-Sequenzvariationen beschrieben (rs11540152, rs3786362, rs596909, rs11540153) (Abb.: 5). Nur für eine der vier DNA-Sequenzvariationen (rs3786362) stehen Genotyp- und Allelfrequenzen zur Verfügung. Obwohl das Gen ein kleines Gen mit nur sieben Exons ist, gibt es nur eine publizierte Studie in der das Gen nach unbekanntem Sequenzvariationen untersucht wurde (Volcik *et al.* 2003). Genauere Untersuchungen gibt es zu drei Polymorphismen, die in nicht codierenden DNA-Bereichen des Gens lokalisiert sind: TYMS-28-Bp-Repeat (Trinh *et al.* 2002), TYMS-G-58C-Transversion (Mandola *et al.* 2003), TYMS-6-Bp-Deletion (Mandola *et al.* 2004) (Abb.: 5).

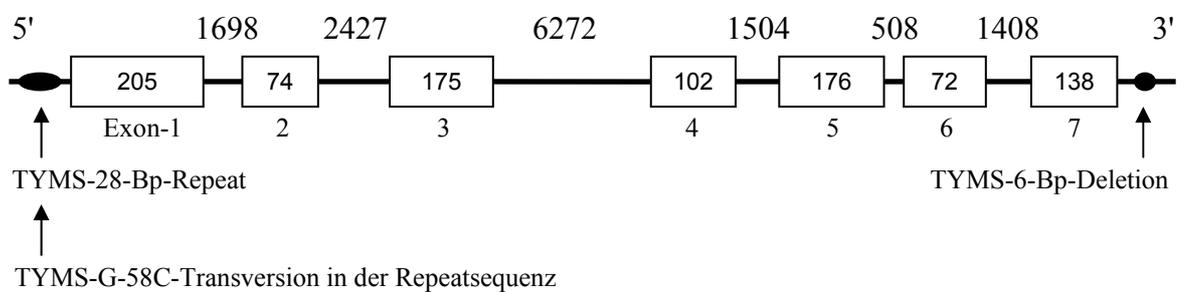


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Thymidylatsynthasegens. Die Größe der sieben Exons und der sechs Introns ist in Basenpaaren in den Rechtecken bzw. über der dicken schwarzen Linie angegeben. Die Sequenzvariationen rs11540152 und rs3786362 befinden sich im Exon-3. Die rs596909 und rs11540153 befinden sich im Exon-4 des Gens.

Der 28-Bp-Repeat liegt im Promotorbereich des Thymidylatsynthasegens. Bei diesem Polymorphismus werden 28 Nukleotide zwischen zwei und neun Mal wiederholt (Takeishi *et al.* 1989, Kaneda *et al.* 1990, Horie *et al.* 1995, Luo *et al.* 2002). Zwei und drei 28-Basenpaar-Motive (2R und 3R, R: Repeats (Wiederholungen)) sind am weitesten verbreitet (Marsh *et al.* 1999, Marsh *et al.* 2000), vier (4R), fünf (5R) und neun (9R) 28-Basenpaar-Motive werden selten, in chinesischen und afrikanischen Bevölkerungsgruppen, gefunden (Marsh *et al.* 1999, Marsh *et al.* 2000, Luo *et al.* 2002). Sechs, sieben und acht 28-Basenpaar-Motive wurden bis jetzt nicht gefunden. Die Allelfrequenz des 3R-Allels variiert zwischen ethnischen Gruppen und wird bei Chinesen mit 67%, bei Kaukasiern mit 38% und bei Afrikanern zwischen 49 (Kenia) und 56% (Ghana) angegeben (Marsh *et al.* 2000). Die Anzahl an 28-Basenpaar-Wiederholungen beeinflusst die Genexpression der Thymidylatsynthase, wobei das 3R-Allel mit einer höheren Genexpression und Thymidylatsynthaseaktivität assoziiert ist, als das 2R-Allel (Horie *et al.* 1995, Kawakami *et al.* 2001, Kawakami *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass der 5,10-Methylen-THF-Bedarf

bei homozygoten 3R/3R-Probanden größer ist als bei heterozygoten 3R/2R- und 2R/2R-Probanden. Dieser erhöhte Bedarf beeinflusst theoretisch die verfügbare Menge an 5,10-Methylen-THF. Da die Thymidylatsynthase und die Methylentetrahydrofolat-reduktase beide das 5,10-Methylen-THF als Methylgruppendonator benutzen, führt eine Reduzierung an verfügbaren 5,10-Methylen-THF zu einem erhöhten Konkurrenzdruck unter den beiden Enzymen (Brown *et al.* 2004). Diese Hypothese wird durch eine Studie von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002), in der 505 chinesische Probanden untersucht wurden, unterstützt. Homozygote 3R/3R-Probanden hatten in dieser Studie niedrigere Folatkonzentration und höhere Homocysteinspiegel als 2R/2R Probanden. Von Brown *et al.* (Brown *et al.* 2004) wurden 400 nordirische Probanden im Alter von 20-26 Jahren (\bar{x} 22,4) untersucht. Assoziationen des 28-Bp-Repeats mit dem Homocysteinspiegel wurden in dieser Studie nicht gefunden.

Die G-58C-Transversion liegt 58 Basenpaare vor dem Startcodon des Thymidylatsynthasegens und wird deswegen in dieser Studie als TYMS-G-58C-Transversion bezeichnet. Sie befindet sich in der zweiten 28-Basenpaar-Wiederholung des 3R-Allels. In der dritten 28-Basenpaar-Wiederholung ist immer ein Cytosin vorhanden. Im 2R-Allel scheint diese Base ebenfalls nicht polymorph zu sein. In Probandenstudien wurden bis jetzt keine 2RC-Allele (zwei 28-Bp-Repeats mit Cytidin) gefunden (Mandola *et al.* 2003, Kawakami *et al.* 2003). Die Allelfrequenz des 3RC-Allels (drei 28-Bp-Repeats mit Cytosin) variiert zwischen ethnischen Gruppen (Mandola *et al.* 2004). Sie beträgt zwischen 28 (Chinesen) und 56% (Kaukasiern). Es ist bekannt, dass das 3RG-Allel (drei 28-Bp-Repeats mit Guanodin) *in vitro* eine vier mal effektivere Genexpression hat als 3RC-, 2RC- und 2RG-Allel-Konstrukte (2RG, zwei 28-Bp-Repeats mit Guanodin) (Kawakami *et al.* 2003). Der 28-Bp-Repeat und die G-58C-Transversion beeinflussen sich gegenseitig. Kawakami *et al.* (Kawakami *et al.* 2003) haben beide Polymorphismen zusammen in einer Studie untersucht. Sie teilen die untersuchten Probanden ihrer Studie in eine Gruppe mit hoher Expressionsrate (2RG/3RG, 3RC/3RG, 3RG/3RG) und eine Gruppe mit niedriger Expressionsrate (2RG/2RG, 2RG/3RC, 3RC/3RC). Assoziationen dieses Polymorphismus mit dem Homocysteinspiegel sind noch nicht untersucht worden.

Die 6-Bp-Deletion befindet sich im 3'-terminalen Bereich des Thymidylatsynthasegens (Ulrich *et al.* 2000, Ulrich *et al.* 2002). Die Allelfrequenz der Deletion (Del-Allel) in einer kaukasischen Probandengruppe (n = 95) betrug 29%. Die Genotypfrequenzen in dieser Probandengruppe betragen 48% Wildtypen (WT/WT), 44% heterozygote Mutanten (WT/Del) und 7% homozygote Mutanten (Del/Del) (Ulrich *et al.* 2000). Von Mandola *et*

al. (Mandola *et al.* 2003) wird die Allelfrequenz der 6-Bp-Deletion für Chinesen, Afrikaner, Kaukasier und Mestizen mit 76, 52, 41 und 26% angegeben. Die 6-Bp-Deletion ist *in vitro* mit einer verminderten mRNA-Stabilität und *in vivo* mit reduzierten Genexpressionsraten in Tumorzellen assoziiert (Mandola *et al.* 2004, Chu und Dolnick 2002, Volcik *et al.* 2003). Bei Probanden, die in beiden Allelen diese sechs Basenpaare trugen (Wildtypen (WT)), wurden signifikant höhere Thymidylatsynthase-mRNA-Konzentrationen gemessen als bei homozygoten Mutanten (Del/Del) (Mandola *et al.* 2004). Erste Hinweise auf einen Zusammenhang der 6-Bp-Deletion mit dem Folat- und Homocysteinstoffwechsel wurden 2005 von Kealey *et al.* (Kealey *et al.* 2005) beschrieben. Bei nordirischen Nichtrauchern war die Deletion signifikant mit höheren Erythrozytenfolatkonzentrationen und niedrigeren Homocysteinspiegeln assoziiert (Kealey *et al.* 2005).

1.2. Mutationen

Nach dem holländischen Botaniker Hugo de Vries (1848-1925) sind Mutationen bleibende Variationen am genetischen Material, die an die Folgegenerationen weitergegeben werden. Diese Definition von 1901 ist auch heute noch gültig. Zunächst entsteht durch eine genetische Veränderung in einer Zelle eine Prämutation. Wenn diese Prämutation mit dem Leben nicht vereinbar ist, führt sie zum Tod, das heißt sie stirbt aus, bevor sie als Mutation in den Folgegenerationen in Erscheinung treten kann (Körner und Witkowsky 1997). Eine Prämutation hat keinen Einfluss auf den phänotypischen Charakter einer Art, sondern höchstens auf den phänotypischen Charakter ihres Trägers. In der Humangenetik wird nach der Art der betroffenen Zellen zwischen Keimbahnmutationen und somatischen Mutationen unterschieden. Wenn eine genetisch veränderte Keimbahnzelle zur Fortpflanzung gelangt, tragen die Nachkommen diese genetische Veränderung in allen ihren Zellen. Somatische Mutationen betreffen teilungsfähige Körperzellen. Sie werden an die Tochterzellen in einem Organismus, aber nicht an seine Nachkommen weitergegeben. Auf der Ebene des genetischen Materials wird nach Genommutationen, Chromosomenmutationen und Genmutationen unterschieden. Genommutationen sind Veränderungen in der Anzahl der Chromosomen. Von der Veränderung der Chromosomenzahl können ganze Chromosomensätze (Polyploidie), aber auch einzelne Chromosomen (Aneuploidie) betroffen sein. Chromosomenmutationen, auch als strukturelle Chromosomenaberrationen bezeichnet, sind mikroskopisch erkennbare Strukturveränderungen an Chromosomen. Sie entstehen durch Chromosomenbrüche. Eine strukturelle Chromosomenaberration ist balanciert, wenn die Menge an chromosomaler DNA unverändert bleibt. Sie ist unbalanciert, wenn die Menge an chromosomaler DNA verändert ist. Genmutationen sind Veränderungen in der Nukleotidsequenz der DNA im Bereich eines Gens. Sind die codierenden Bereiche eines Gens (exonische DNA-Bereiche) oder Regulatorsequenzen (zum Beispiel Promotorsequenzen oder Splicing-Signalsequenzen) von einer Mutation betroffen, kann es zu Auswirkungen auf die Funktion des Genproduktes kommen. Sind dagegen nicht codierende intronische DNA-Abschnitte betroffen, kommt es fast nie zu phänotypischen Auswirkungen. Deswegen blieben intronische Genmutationen lange Zeit unerkannt. Sie wurden erst mit der Entwicklung der modernen Sequenzieretechniken in vergleichenden Sequenzanalysen entdeckt. Es gibt verschiedene Arten von Genmutationen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Punktmutationen, Deletionen und Insertionen.

1.2.1. Punktmutationen

Eine Punktmutation ist der Austausch eines Nukleotids gegen ein anderes Nukleotid. Es gibt zwei Gruppen von Punktmutationen: Transitionen und Transversionen. Als Transition bezeichnet man den Austausch einer Purinbase gegen eine Purinbase oder einer Pyrimidinbase gegen eine Pyrimidinbase.

Adenin ↔ Guanin

Thymin ↔ Cytosin

Als Transversion bezeichnet man den Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase oder einer Pyrimidinbase gegen eine Purinbase.

Adenin ↔ Thymin

Adenin ↔ Cytosin

Guanin ↔ Thymin

Guanin ↔ Cytosin

1.2.2 Insertionen und Deletionen

Bei Insertionen und Deletionen handelt es sich um den Verlust oder den Zugewinn eines oder mehrerer Nukleotide innerhalb der DNA-Sequenz eines Gens.

1.2.3 Polymorphismen und "Single Nucleotide Polymorphism" (SNP)

Ursprünglich wurde die Bezeichnung Polymorphismus in der Genetik und insbesondere in der Populationsgenetik verwendet. Das Auftreten von unterschiedlichen Phänotypen in einer Population wurde auf unterschiedliche Allele eines Gens zurückgeführt. Die Koexistenz von zwei oder mehr deutlich verschiedenen Formen eines vielgestaltigen (polymorphen) Merkmals innerhalb einer Population wurde als Polymorphismus bezeichnet. In der modernen Humangenetik spricht man von einem Polymorphismus, wenn ein variantes Allel eine Frequenz von mindestens einem Prozent erreicht (Gut 2001, Frueh und Noyer-Weidner 2003). Ist die Allelfrequenz eines Allels an einem Genort kleiner als 1%, wird von einer Mutation gesprochen. Im medizinischen Sprachgebrauch hingegen, wird die Bezeichnung Mutation für Sequenzvariationen benutzt, die eine Erkrankung verursachen. Punktmutationen, bei denen die Allelfrequenz größer als ein Prozent ist (humangenetische Definition) oder die keine Erkrankung verursachen (medizinische Definition), werden als Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) bezeichnet. Ihnen

kommt der größte Anteil an bekannten Sequenzvariationen im menschlichen Genom zu (Antonarakis *et al.* 2000).

1.3 Methoden zum Nachweis von Mutationen

Mutationen sind bis auf Genommutationen, bei denen die Chromosomenzahl verändert ist, stets Variationen an der DNA-Sequenz. Sie können somit auch als DNA-Sequenzvariationen bezeichnet werden. Bei der Auswahl der Methode zum Nachweis einer DNA-Sequenzvariation ist zu berücksichtigen, ob die Sequenzvariation schon beschrieben worden ist oder nicht. Ist sie schon beschrieben, können spezifische Methoden wie zum Beispiel "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), "Allel Specific Oligonucleotid Test" (ASO), "Oligonukleotid Ligations Test" (OLA) oder "Allel Specific PCR" (ASP) benutzt werden. Wird nach unbekanntem Sequenzvariationen gesucht, müssen die Proben entweder sequenziert werden, oder es müssen unspezifische Suchmethoden wie zum Beispiel "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP), "Temperature Gradient Gel Electrophoresis" (TGGE), "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE), "Protein Truncation Test" (PTT), "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) oder "Denaturing High Performance Liquid Chromatography" (DHPLC) benutzt werden. Insertionen und Deletionen können direkt nach der PCR mittels direkter Agarosegelelektrophorese (dAGE), direkter Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE) oder unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels DHPLC ((D)HPLC-Sizing) bestimmt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt der bei der Methodenauswahl berücksichtigt werden muss, ist der benötigte Arbeits- und Zeitaufwand, der für den Nachweis benötigt wird. RFLP, dAGE, dPAGE, ASO, OLA, ASP, SSCP, TGGE, DGGE und PTT sind im Vergleich zu MALDI-TOF-MS, DHPLC und (D)HPLC-Sizing arbeits- und zeitaufwändiger in der Durchführung. Im folgenden sollen die in dieser Arbeit angewendeten Methoden (RFLP, dAGE, DHPLC, (D)HPLC-Sizing) beschrieben werden. Ein umfangreicher Überblick über Methoden zur Detektion von DNA-Sequenzvariationen ist von Drabek (Drabek 2001) publiziert worden.

1.3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

DNA-Sequenzvariationen können zur Bildung bzw. zum Verlust von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme führen. Dieses Phänomen wird bei RFLP-Mutationsanalysen zum Mutationsnachweis benutzt. Führt die Sequenzvariation eine

Restriktionsschnittstelle in die DNA-Sequenz ein, wird das mutierte Allel von dem Restriktionsenzym geschnitten. Beim Verlust einer Restriktionsschnittstelle wird das Wildtypallel geschnitten. Der Mutationsnachweis erfolgt nach Restriktionsverdau eines PCR-Produktes, durch den Nachweis der geschnittenen bzw. nicht geschnittenen DNA-Moleküle mittels Gelelektrophorese.

1.3.2. Direkte elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

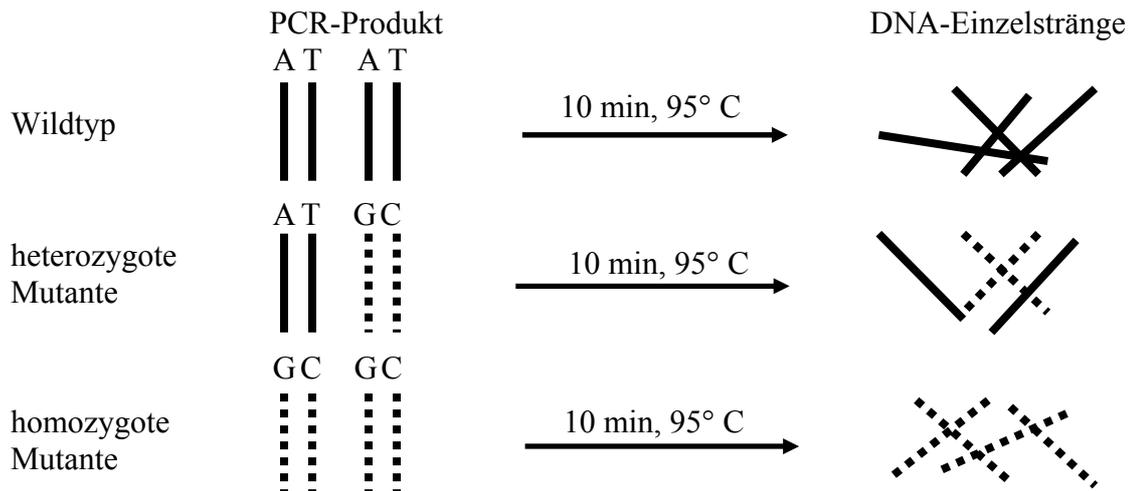
Die direkte elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten kann bei Insertionen und Deletionen von mehreren Nukleotiden angewendet werden. Mittels dAGE können Größenunterschiede, die mehr als 10% des PCR-Produktes betragen, nachgewiesen werden. Bei kleineren Differenzen muss das PCR-Produkt mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt werden. Deletionsallele sind kleiner, Insertionsallele sind größer als Wildtypallele. Der Nachweis der Allele erfolgt durch den Vergleich der DNA-Banden der Probanden-PCR-Produkte mit den DNA-Banden der PCR-Produkte von Referenzprobanden. Deswegen müssen Probanden-PCR-Produkte und PCR-Produkte von Referenzprobanden zusammen auf einem Gel aufgetrennt werden.

1.3.3. Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Mit der "Denaturing High Performance Liquid Chromatography" (DHPLC) wurde ein gut automatisierbares Verfahren entwickelt, mit dem insbesondere Punktmutationen und kleine Deletionen sowie Insertionen mit hoher Zuverlässigkeit detektiert werden können (Xiao und Oefner 2001, Frueh und Noyer-Weidner 2003). Bei der Probenaufarbeitung wird die DNA zunächst mittels PCR amplifiziert. Bei der sich anschließenden Hybridisierung (Abb.: 6) werden die doppelsträngigen, helikalen DNA-Moleküle im PCR-Produkt bei 95° C in zwei DNA-Einzelstränge geschmolzen (Denaturierung). Durch langsames Abkühlen auf circa 12° C werden die DNA-Einzelstränge zufällig wieder zu doppelsträngiger DNA zusammengeführt (Reannealing). Doppelsträngige DNA, die sich aus zwei komplementären Einzelsträngen gebildet hat, wird als Homoduplex bezeichnet. Als Heteroduplex wird doppelsträngige DNA bezeichnet, die sich aus zwei unterschiedlichen DNA-Einzelsträngen gebildet hat. Bei heterozygoten Probanden entstehen bei der Hybridisierung Homo- und Heteroduplexe, bei Wildtypen und homozygoten Mutanten entstehen nur Homoduplexe. Homo- und Heteroduplexe haben unterschiedliche Schmelztemperaturen. Heteroduplexe schmelzen bei einer niedrigeren Temperatur in ihre DNA-Einzelstränge als Homoduplexe. Die Analysetemperatur für DHPLC-Sequenzanalysen wird so gewählt, dass

die Homoduplexe eines PCR-Produktes noch als doppelsträngige DNA, die Heteroduplexe aber schon als einzelsträngige DNA vorliegen. Bei dieser Temperatur wird eine Ionenpaarchromatographie an einer unpolaren Polystyrendivinylbenzol-Umkehrphase (DHPLC-Chromatographiesäule) durchgeführt. Als Laufmittel wird eine 0,5 molare Triethylammoniumacetatlösung (TEAA) mit einem Acetonitrilgradient verwendet.

A) Denaturierung der DNA in DNA-Einzelstränge



B) Reannealing der DNA-Einzelstränge zu DNA-Homo- und Heteroduplexen

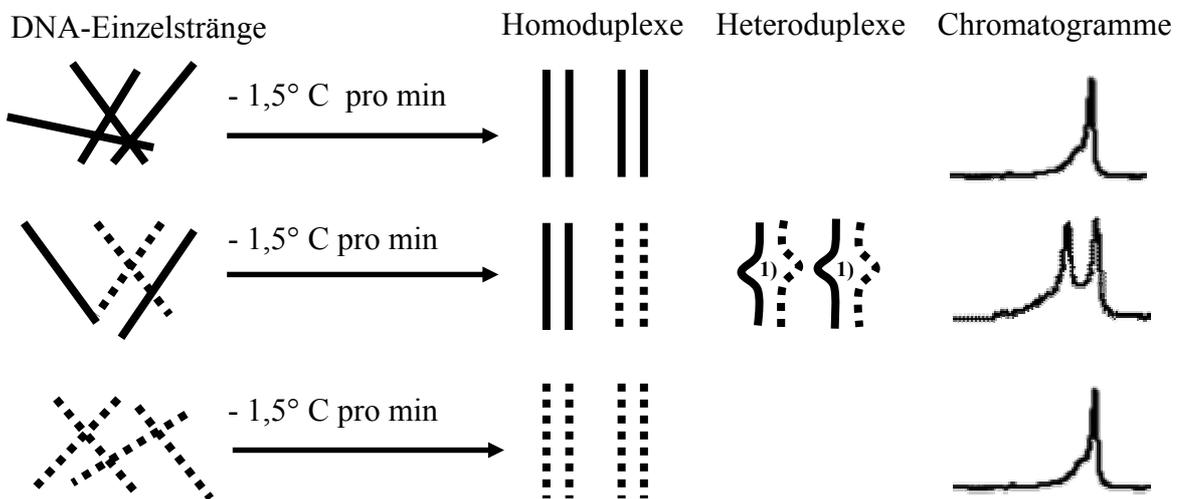


Abbildung 6: Hybridisierung für eine DHPLC-DNA-Sequenzanalyse. Dargestellt ist eine Adenin zu Guanin Transition (A>G). Die Hybridisierung besteht aus der Denaturierung der DNA in DNA-Einzelstränge (A) und dem anschließenden Reannealing der DNA-Einzelstränge (B). Bei Wildtypproben und Proben von homozygoten Mutanten entstehen DNA-Homoduplexe. Beim Wildtyp bestehen sie aus zwei Wildtypallelen, bei der homozygoten Mutante aus zwei varianten Allelen. Bei Proben von heterozygoten Mutanten entstehen DNA-Heteroduplexe aus jeweils einem Wildtypallel und einem varianten Allel. 1) Nicht nach Standardbedingungen gepaarte Basenpaare AG bzw. TC.

DNA-Einzelstränge haben bei diesem Verfahren eine niedrigere Affinität zu der DHPLC-Chromatographiesäule als doppelsträngige DNA. Sie werden deswegen bei einer geringeren Acetonitrilkonzentration von der DHPLC-Chromatographiesäule verdrängt als DNA-Doppelstränge. So entsteht bei der DHPLC-Analyse eines PCR-Produktes von einem heterozygoten Proband ein Chromatogramm mit einem Doppelpeak (Heteroduplexchromatogramm). Der Peak mit der kürzeren Retentionszeit repräsentiert die DNA der Heteroduplexe, der Peak mit der längeren Retentionszeit die DNA der Homoduplexe. Bei Wildtyp-PCR-Produkten und bei PCR-Produkten von homozygoten Mutanten ist nur ein Peak im Chromatogramm (Homoduplexchromatogramm) zu erkennen. PCR-Produkte deren Chromatogramme weder dem Wildtyp- noch dem Heteroduplexchromatogramm (Referenzchromatogramme) entsprechen, deuten auf das Vorhandensein von unbekanntem DNA-Sequenzvariationen in der untersuchten DNA hin. Zur Bestätigung und zur Lokalisierung der potentiellen DNA-Sequenzvariation müssen die Proben sequenziert werden. Weil sich bei der Hybridisierung von PCR-Produkten von Wildtypen und homozygoten Mutanten nur Homoduplexe bilden, lassen sich Wildtypen von homozygoten Mutanten mittels DHPLC nur nach einem zusätzlichen Arbeitsschritt unterscheiden. Das Probanden-PCR-Produkt muss mit einem Wildtyp-PCR-Produkt (Kontroll-DNA) gemischt und hybridisiert werden. Bei einem Wildtyp-PCR-Produkt entstehen bei der Hybridisierung mit Kontroll-DNA nur Homoduplexe, bei einem PCR-Produkt von einer homozygoten Mutante entstehen jedoch Homo- und Heteroduplexe.

Das (D)HPLC-Sizing ist eine Variante der DHPLC, bei der die DNA nur nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt wird. Die PCR-Produkte werden direkt nach der PCR analysiert. Die Analyse erfolgt unter nicht denaturierenden Bedingungen bei einer Analysetemperatur von 50°. Bedingt durch die mit der Größe der DNA-Moleküle zunehmende negative Ladung, verlängert sich die Retentionszeit. Deletionsallele haben eine kürzere, Insertionsallele eine längere Retentionszeit als Wildtypallele. Wildtyp-PCR-Produkte und PCR-Produkte von homozygoten Probanden haben Chromatogramme mit einem Peak, heterozygote PCR-Produkte haben Chromatogramme mit zwei Peaks. Bei (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweisen muss in jeder Serie mindestens ein Referenzproband pro Genotyp mitgeführt werden. Mittels (D)HPLC-Sizing lassen sich Größenunterschiede im Amplifikat die >1% sind nachweisen.

1.3.4. Vor- und Nachteile von RFLP, dAGE, DHPLC (D)HPLC-Sizing

RFLP-Methoden sind in der Praxis weit verbreitet. Sie erlauben die gelelektrophoretische Erkennung einer DNA-Sequenzvariation anhand der vorhersagbaren DNA-Bandenmuster für jeden der drei Genotypen einer DNA-Sequenzvariation. Der Nachweis der Banden erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese (AGE) oder PAGE. Die Methode ist unabhängig von zusätzlichen DNA-Sequenzvariationen innerhalb des PCR-Produktes. Wenn das vorhergesagte Bandenmuster gefunden wird, ist der Mutationsnachweis eindeutig. RFLP-Methoden haben allerdings den Nachteil, dass sich die Genotypen bei unvollständigem Restriktionsverdau des PCR-Produktes nicht unterscheiden lassen. Eine Bande in der Größe des unverdauten PCR-Produktes kann auf unvollständigen Verdau oder auf das Fehlen der Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym in zumindest einem Allel zurückzuführen sein. Dieses Problem kann durch verlängerte Inkubationszeiten, durch hohe Enzymkonzentrationen und durch den Einsatz von weniger PCR-Produkt minimiert sowie durch das Mitführen von Kontroll-PCR-Produkten kontrolliert werden. RFLP-Analysen können nur für Sequenzvariationen durchgeführt werden, bei denen die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym verändert wird. Durch die drei notwendigen Arbeitsschritte (PCR, Restriktionsverdau, Elektrophorese), sind RFLP-Mutationsanalysen zeitaufwändig und arbeitsintensiv.

Die direkte Agarosegelelektrophorese ist ein einfaches, schnelles und robustes Verfahren zum Nachweis von Insertionen, Deletionen, und Repeats (Rigat *et al.* 1992, Lindpaintner *et al.* 1995, Tsai *et al.* 2000, Brown *et al.* 2004). Transitionen und Transversionen lassen sich mittels dAGE nicht nachweisen. Direkte AGE Mutationsnachweise sind besonders anwenderfreundlich, weil sie einfach und schnell durchzuführen sind. Beim Nachweis von Insertionen, Deletionen, und Repeats muss unabhängig von der letztendlich benutzten Methode zum Nachweis der unterschiedlichen Allele (dAGE oder (D)HPLC in dieser Studie) das Problem der bevorzugten Amplifizierung eines Allels beachtet werden (Shanmugam *et al.* 1993, Fogarty *et al.* 1994, Lindpaintner *et al.* 1995, Kaiser *et al.* 2002). Dieses Phänomen führt zu falschen Ergebnissen, wenn eines der beiden Allele einer heterozygoten Probe bevorzugt amplifiziert wurde.

Die DHPLC-Technologie wird vorrangig zum Screenen nach unbekanntem Polymorphismen benutzt wird. Sie kann allerdings auch zum Bestimmen von bekannten Polymorphismen eingesetzt werden. Das Spektrum der nachweisbaren Polymorphismen umfasst Transversionen, Transitionen, Deletionen, Insertionen und DNA-Sequenz-Wiederholungen. DHPLC-Methoden sind leicht automatisierbar, wodurch sie gut zum

Einsatz in der Routinediagnostik geeignet sind. Die Stärken der DHPLC-Technologie sind die gute Anwendbarkeit bei einem weiten Spektrum von verschiedenen DNA-Sequenzvariationen, die einfache Probenvorbereitung, die hohe Sensitivität und Spezifität von 96% (Xiao und Oefner 2001) und der geringe Probenverbrauch von 5 µl pro Sequenzanalyse. Beim Nachweis von homozygoten Mutanten verdoppelt sich der Probenverbrauch und die Analysezeit. Das ist ein wesentlicher Nachteil der DHPLC. Ein weiterer Nachteil der Methode ist die lineare Abarbeitung der Proben durch die DHPLC-Anlage. Eine Analyse dauert zwischen sechs und 15 Minuten. Am Tag können mit einer DHPLC-Anlage zwischen 144 und 240 Proben analysiert werden. Wenn die Genotypen von Polymorphismen mit einer niedrigen Frequenz des mutierten Allels bestimmt werden, verringert sich der Probendurchsatz auf 72-120 Proben am Tag.

Das (D)HPLC-Sizing überzeugt ebenfalls durch die hohe Sensitivität und Spezifität und den geringen Probenverbrauch. Aufgrund der einfachen und schnell durchführbaren Probenvorbereitung ist die (D)HPLC-Methode unter den vier besprochenen Methoden, die anwenderfreundlichste. Ein Nachteil der Methode ist die Analysezeit von 20 Minuten pro Analyse. Bei großen Serien muss durch Abdecken der Proben mit einer Spezialfolie die Evaporation der Proben vermieden werden. Aufgrund dieser langen Analysezeiten können mittels (D)HPLC-Sizing nur bis zu 72 Proben am Tag analysiert werden. Das ist ein Probendurchsatz, der auch mittels dAGE problemlos zu erreichen ist.

2. Ziel der Arbeit

Die Arbeiten dieser Dissertation hatten das Ziel, bekannte und unbekannte DNA-Sequenzvariationen in den Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels zu bestimmen, um ihre Bedeutung für den Homocysteinspiegel zu erarbeiten.

Bis jetzt ist der Einfluss auf den Homocysteinspiegel nur für den MTHFR-C677T befriedigend aufgeklärt worden. Für alle anderen in Tabelle 1 aufgelisteten Polymorphismen sind die Ergebnisse der zur Verfügung stehenden Studien nicht eindeutig. Die Arbeiten dieser Studie sollen dazu beitragen, unser Verständnis über ihren Einfluss auf den Homocysteinspiegel zu vertiefen.

Zu Beginn der Arbeiten gab es keine publizierte Studie, in der das Gen der Thymidylatsynthase systematisch auf unbekannte DNA-Sequenzvariationen untersucht worden war. Aus diesem Grund sollte diese Studie untersuchen, ob es abgesehen von den bekannten Polymorphismen, weitere unbekannte DNA-Sequenzvariationen im Thymidylatsynthasegen gibt, die den Homocysteinspiegel beeinflussen.

Zur Genotypisierung von Probanden sollte bevorzugt die DHPLC-Technologie eingesetzt werden. Die Einsetzbarkeit dieser Technologie zur Genotypisierung von Polymorphismen sollte überprüft werden.

Zur Erarbeitung dieser Ziele wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

1. Entwicklung von DHPLC-Methoden zur Bestimmung von bekannten DNA-Sequenzvariationen in ausgewählten Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels.
2. Epidemiologische Untersuchungen zum Einfluss der Transcobalamin II-C776G-Transversion (TC II-C776G) und der Reduced Folate Carrier I-G80A-Transition (RFC I-G80A) auf den Homocysteinspiegel. Für diese Arbeiten wurden zwei der in Punkt 1 entwickelten Methoden angewendet.
3. Entwicklung und Anwendung von DHPLC-Methoden zum Screenen nach bekannten und unbekanntem DNA-Sequenzvariationen am Beispiel des Gens der Thymidylatsynthase (TYMS).

3. Graphische Darstellung der durchgeführten Arbeiten

In Abbildung 7 sind die in dieser Dissertation durchgeführten praktischen Arbeiten in einem Fließdiagramm dargestellt. Die Probandenrekrutierung und die Blutentnahme wurden nicht selbst durchgeführt. Die DNA-Isolierung für die Etablierung der DHPLC-Methoden (Kapitel 1) wurde innerhalb dieser Studie durchgeführt. Die DNA für die epidemiologischen Untersuchungen zum Einfluss der RFC I-G80A-Transition und der TC II-C776G-Transversion auf den Homocysteinspiegel (Kapitel 2) und für die TYMS-Sequenzanalysen (Kapitel 3) wurde von PD Dr. Jutta Dierkes zur Verfügung gestellt.

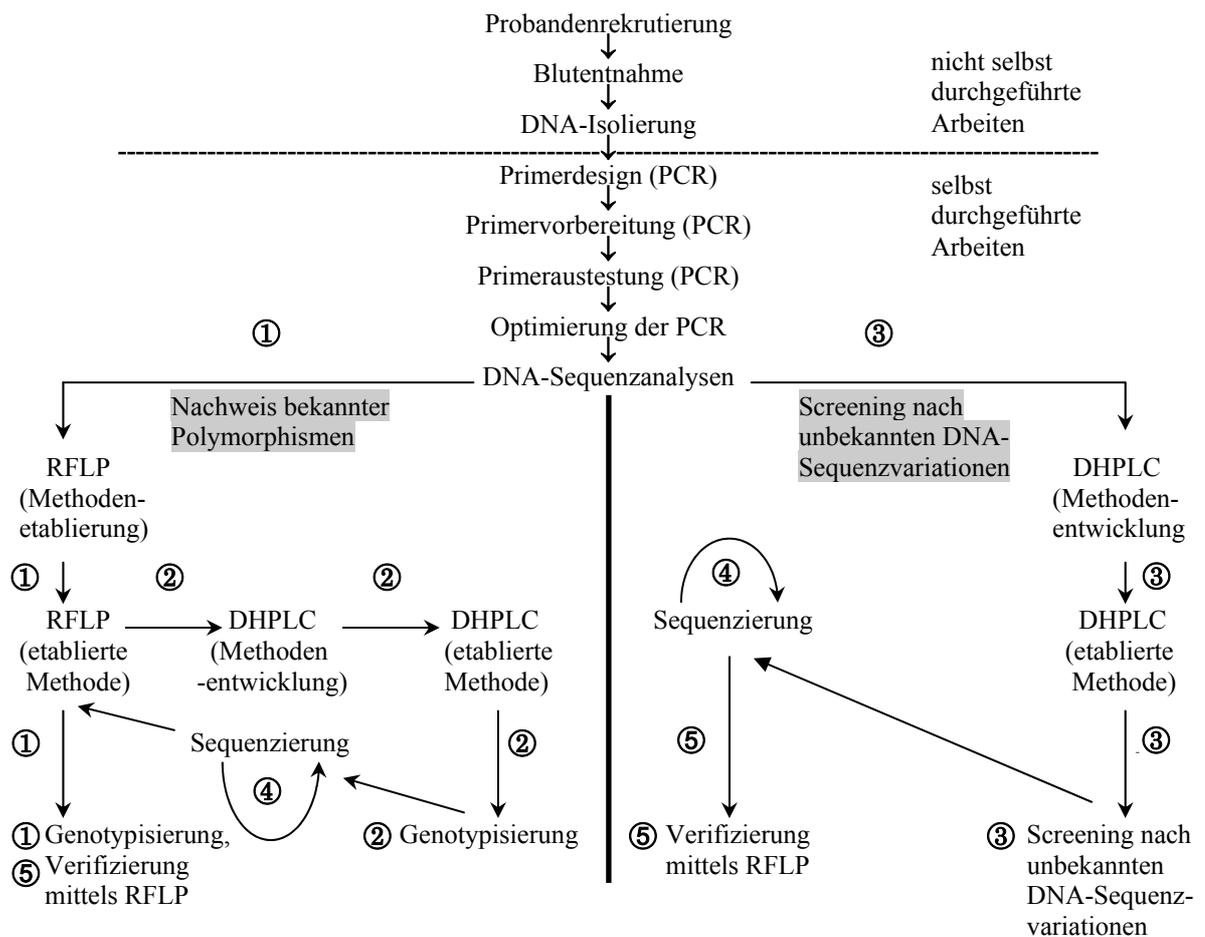


Abbildung 7: Fließdiagramm der durchgeführten Arbeiten.

① RFLP-Analysen wurden für die Bestimmung von bekannten Polymorphismen benutzt. Die Methoden wurden der Fachliteratur entnommen. ② Für die DHPLC-Methodenentwicklung zum Mutationsnachweis von bekannten Polymorphismen wurden mittels RFLP genotypisierte PCR-Produkte herangezogen. ③ Das Screening nach unbekanntem Sequenzvariationen, wurde mittels DHPLC durchgeführt. ④ PCR-Produkte mit auffälligen DHPLC-Chromatogrammen, wurden zur Erkennung der verursachenden DNA-Sequenzvariation sequenziert. ⑤ Die Verifizierung erkannter Sequenzvariationen erfolgte mittels RFLP-Mutationsanalysen. War die Verifizierung einer neu gefundenen Sequenzvariation mittels RFLP nicht möglich (fehlende Restriktionsschnittstelle), wurde wiederholt (2-3 mal) sequenziert.

4. Kapitel 1

Entwicklung von DHPLC-Methoden zur Bestimmung von DNA-Sequenzvariationen in ausgewählten Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels.

4.1. Einleitung

Zur Bestimmung von DNA-Sequenzvariationen gibt es eine Vielzahl von Methoden (Nollau und Wagner 1997, Drabek 2001, Gut 2001). Die am meisten benutzten Methoden sind:

1. "Allelspecific Oligonucleotide Hybridisation" (ASO) (Richter und Seth 1998)
2. "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE) (Fodde und Losekoot 1994)
3. Direkte Agarosegelelektrophorese (dAGE) (Johnson und Grossmann 1997)
4. "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) (Kan und Dozy 1978)
5. "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP) (Markoff *et al.* 1997)
6. "Temperature Gradient Gel Electrophoresis" (TGGE) (Wartell *et al.* 1998)

Der Goldstandard für die Bestimmung von DNA-Sequenzvariationen ist die direkte Sequenzierung der DNA (Nollau und Wagener 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollten Methoden zur Bestimmung von bekannten Polymorphismen in Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels entwickelt werden. Die entwickelten Methoden sollen anschließend in epidemiologischen Studien eingesetzt werden. In diesen Studien soll die Bedeutung der SNPs für den Homocysteinspiegel, bei mehr als 1000 Probanden der EPIC-Studie-Potsdam (Boeing *et al.* 1999, Bergmann *et al.* 1999, Riboli *et al.* 2002, Drogan *et al.* 2004), untersucht werden. Die wichtigsten methodischen Anforderungen zum Nachweis von Polymorphismen in epidemiologischen Studien sind:

1. ein hoher Probendurchsatz,
2. ein geringer Arbeitsaufwand,
3. gute Automatisierbarkeit und
4. eine hohe Sensitivität sowie Spezifität.

Der größte Nachteil der zur Zeit am meisten benutzten Methoden ist, dass mit ihnen ein hoher Probendurchsatz nur mit einem erheblichen Personal- und Zeitaufwand zu erreichen ist (ASO, DGGE, RFLP, SSCP, TGGE). Bei SSCP-Methoden ist außerdem bekannt, dass sie sich nur bedingt standardisieren lassen (Nollau und Wagener 1997), wodurch sie für den Einsatz in epidemiologischen Studien nicht gut geeignet sind. Eine in den letzten Jahren entwickelte Technologie ist die DHPLC (Oefner *et al.* 1994, Huber *et al.* 1993,

Frueh und Noyer-Weidner 2003). Diese Technologie ist gut automatisierbar und die Probenvorbereitung ist mit einem geringen Arbeitsaufwand durchführbar sind. Des Weiteren hat die DHPLC-Technologie eine Sensitivität und Spezifität von >96% (Xiao und Oefner 2001, Frueh und Noyer-Weidner 2003). Aus diesen Gründen verspricht die DHPLC-Technologie eine gut geeignete Methode zur Bestimmung der Genotypen in den geplanten epidemiologischen Studien zu sein.

In den letzten Jahren sind mehr als 20 Polymorphismen in den Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels im Zusammenhang mit dem Homocysteinspiegel erforscht worden (Tabelle 1). In der vorliegenden Arbeit wurden zwölf von diesen Polymorphismen bei 37 Probanden bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Untersuchte Polymorphismen in Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels.

		Art der Mutation		Literatur
1.	MTHFR-C677T	SNP	Transition	Frosst <i>et al.</i> (1995)
2.	MTHFR-A1298C	SNP	Transversion	van der Put <i>et al.</i> 1998
3.	MTHFR-G1793A	SNP	Transition	Rady <i>et al.</i> 2002
4.	MTHFD-G1958A	SNP	Transition	Akar und Akar 1999
5.	MTR-A2756G	SNP	Transition	Leclerc <i>et al.</i> 1996
6.	RFC I-G80A	SNP	Transition	Chango <i>et al.</i> 2000
7.	TC II-C776G	SNP	Transversion	Namour <i>et al.</i> 2001
8.	GCP II-C1561T	SNP	Transition	Devlin <i>et al.</i> 2000
9.	TYMS-6Bp-Del	Deletion	6 Basenpaare	Ulrich <i>et al.</i> 2000
10.	TYMS-28Bp-Rep	Repeat	28 Basenpaare	Hishida <i>et al.</i> 2003
11.	CBS-T833C	SNP	Transition	Tsai <i>et al.</i> 1996
12.	CBS-844Ins68	Insertion	68 Basenpaare	Tsai <i>et al.</i> 1996

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

Zum Nachweis der Genotypen wurden vier unterschiedliche Methoden angewendet:

1. RFLP,
2. dAGE,
3. DHPLC,
4. (D)HPLC-Sizing.

Die RFLP- und dAGE-Methoden wurden der Fachliteratur entnommen. Die DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Methoden mussten entwickelt werden. Zur Ermittlung der Zuverlässigkeit der entwickelten Methoden, wurden die Ergebnisse dieser Mutationsanalysen mit den Ergebnissen der RFLP- bzw. dAGE-Analysen verglichen.

4.2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis von bekannten Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel. Die entwickelten Methoden sollten den Anforderungen zur Bestimmung von Probandengenotypen in groß angelegten epidemiologischen Studien entsprechen.

4.3. Probanden, Material und Methoden

4.3.1. Probanden und Blutentnahme

Für die Evaluierung der RFLP- und der dAGE- sowie für die Entwicklung der DHPLC-Methoden wurde die DNA von 20 männlichen und 17 weiblichen Patienten mit Fettstoffwechselstörungen benutzt. Die Patienten waren zwischen 20 und 71 (\bar{x} 53 Jahre) Jahre alt. Sie hatten sich freiwillig zur Teilnahme an der Studie entschieden und mit der Verwendung der Ergebnisse zur medizinischen Forschung einverstanden erklärt. Den Patienten wurde 4 ml venöses EDTA-Blut (EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure) mit dem Vakutainer-Blutentnahmesystem der Firma Becton Dickinson entnommen. Nach der Blutentnahme wurde die Blutprobe bis zur DNA-Isolierung bei -30°C gelagert.

4.3.2. Molekularbiologische Arbeiten

4.3.2.1 Mutationsnachweise

Zum Nachweis der zwölf Polymorphismen wurden zehn RFLP-, acht DHPLC-, eine (D)HPLC-Sizing- und zwei dAGE-Methoden durchgeführt (Tab.: 3). Für jeden Polymorphismus wurden die Genotypen der 37 Probanden mittels RFLP oder dAGE bestimmt. Anschließend wurden drei Probanden ausgewählt (Wildtyp, heterozygote Mutante, homozygote Mutante) und für die DHPLC- bzw. (D)HPLC-Sizing-Methodenentwicklung benutzt. Für die Methodenentwicklung wurden dieselben PCR-Produkte, die für die RFLP- bzw. dAGE-Analysen benutzt worden waren, eingesetzt. Die CBS-T833C-Transition und die CBS-844Ins68 wurden nur mittels RFLP bzw. dAGE bestimmt.

Bei den Mutationsnachweisen wurden zwischen 20 und 37 Probanden in einer Serie analysiert. Zur Überprüfung des PCR-Mastermixes, des nukleasefreien Wassers und der Primer auf DNA-Verunreinigungen wurden jeweils Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Um die Aktivität der verwendeten Restriktionsenzyme zu kontrollieren, wurde bei jedem Restriktionsverdau ein Ansatz mit Lambda-DNA oder Puc18-Vektor (Positivkontrollen) mitgeführt. Die optimierten Versuchsprotokolle sind im Anhang in Tabelle 19 zusammengestellt.

4.3.2.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde in einer Hera Save Cleanbox mit einem QIAmp DNA Blood Mini Kit durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 200 μl des im Isolationskit enthaltenen

Eluatiionspuffers eluiert. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei +5° C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Bei längerem Nichtgebrauch der DNA wurde sie bei -30° C gelagert.

Tabelle 3: Polymorphismen und angewendete Methoden zum Nachweis der Genotypen.

Nr.	Polymorphismus	RFLP	DHPLC	(D)HPLC-Sizing	dAGE
1.	MTHFR-C677T	X	X		
2.	MTHFR-A1298C	X	X		
3.	MTHFR-G1793A	X	X		
4.	MTHFD-G1958A	X	X		
5.	MTR-A2756G ⁽¹⁾	X	X		
6.	RFC I-G80A	X	X		
7.	TC II-C776G	X	X		
8.	GCP II-C1561T	X	X		
9.	TYMS-6-Bp-Deletion	X		X	X
10.	TYMS-28-Bp-Repeat ⁽²⁾		X	X	X
11.	CBS-T833C	X			
12.	CBS-844Ins68				X

X: Angewendete Methoden, RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography, (D)HPLC-Sizing: Variante der DHPLC, bei der die Proben nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden, dAGE: direkte Agarosegelelektrophorese. Für alle vier Methoden musste eine primäre PCR durchgeführt werden. ⁽¹⁾ Für die DHPLC-Mutationsanalysen der MTR-A2756G-Transition wurden zwei unterschiedliche Amplifikate (Leclerc *et al.* 1996, Harmon *et al.* 1999) benutzt. ⁽²⁾ Für die Mutationsanalysen des TYMS-28-Bp-Repeats wurden ebenfalls zwei unterschiedliche Amplifikate (Hishida *et al.* 2003, Volcik *et al.* 2003) benutzt.

4.3.2.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Primeraustestung, zur PCR-Optimierung und für die RFLP- bzw. dAGE-Mutationsnachweise wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden 2, 2,5 oder 3% Agarosegele mit fünf Volumenprozent (V/V) Ethidiumbromid (EthBr) benutzt. Die Zusammensetzung der Agarosegele ist im Anhang notiert. Entstanden nach dem Restriktionsverdau sehr kleine DNA-Fragmente (50-80 Bp), oder war die Differenz zwischen den verdauten DNA-Fragmenten kleiner als 10%, erfolgte die Auftrennung mit 2,5 bzw. 3% Agarosegelen unter Verwendung einer hochauflösenden Spezial-PCR-Agarose. Vor dem Auftragen wurden die Proben und die Molekulargewichtsstandards mit einem Ladepuffer höherer Dichte als der des Laufpuffers (1X TBE-Puffer: Tris-Borat-EDTA-Puffer) versetzt. Die Elektrophorese wurde für 45-90 min bei einer konstanten Spannung von 100 V, wahlweise in einer Biozym Gelkammer oder mit dem I Mupid Gelelektrophoresesystem der Firma Eurogentec, durchgeführt. Zur Ermittlung der Molekülgröße der Proben wurden ein 50-Basenpaar- und ein 100-Basenpaar-Molekulargewichtsstandard (50-Bp-MGS, 100-Bp-MGS) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele mit einem UV-Transiluminator betrachtet und photographisch mit einer Polaroid-Sofortbildkamera dokumentiert.

Vorbereitung der Proben und der Molekulargewichtsstandards für die Agarosegelelektrophorese.

<u>Proben</u>		<u>Molekulargewichtsstandards</u>	
PCR-Produkt	10 µl	50- bzw. 100-Bp-MGS	2 µl
Ladepuffer (6X)	2 µl	Ladepuffer (6X)	0,2 µl
-----		-----	
Gesamtvolumen	12 µl	Gesamtvolumen	2,2 µl
10 µl wurden aufgetragen		2 µl wurden aufgetragen	
6X: 6-fach konzentriert			

4.3.2.4. Primervorbereitung, Primeraustestung und PCR-Optimierung

Für alle PCR-Protokolle wurde eine Primervorbereitung, eine Primeraustestung und eine PCR-Optimierung durchgeführt. Die Arbeiten wurden in einer DNS/RNS UV Cleaner Box (DNA-Workstation) durchgeführt. Die von MWG Biotech hergestellten Primer wurden in nukleasefreiem Wasser gelöst, wobei die DNA-Konzentration auf 100 pmol/µl (Stammlösung) eingestellt wurde. Die Primerstammlösung wurde in 10 µl Aliquots aufgeteilt und bei -30° C in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen gelagert. Zur Verwendung der Primer wurde die Stammlösung mit nukleasefreiem Wasser auf 10 pmol/µl verdünnt (Gebrauchslösung). Bei der Primeraustestung wurde die ideale Primerkonzentration ermittelt. Für jede PCR wurden fünf Primerkonzentrationen von 0,1 µM bis 1,0 µM Endkonzentration getestet (Tab.: 4). Die Durchführung der PCR fand in einem Corbett Research Thermocycler statt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

5 min	95° C	primäre Denaturierung	
-----	-----	-----	
30 sec	95° C	Denaturierung Annealing Extension	} 35 Zyklen
30 sec	xx° C ⁽¹⁾		
30 sec	72° C		
-----	-----	-----	
7 min	72° C	terminale Extension	
-----	-----	-----	
bis Abbruch	5° C		

⁽¹⁾ Annealingtemperatur, aus derselben Literatur entnommen, aus der auch die Primersequenzen entnommen wurden.

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansätze zur Austestung der idealen Primerkonzentration.

Primer [10pmol/µl]	Primer- konzentration	H ₂ O ⁽¹⁾	PCR Master Mix ⁽²⁾ [2X]	DNA ⁽³⁾	Endvolumen
0,25 µl	0,1 µM	9,5 µl	12,5 µl	2,5 µl	25 µl
0,50 µl	0,2 µM	9,0 µl	2,5 µl	2,5 µl	25 µl
1,00 µl	0,4 µM	8,0 µl	12,5 µl	2,5 µl	25 µl
1,50 µl	0,6 µM	7,0 µl	12,5 µl	2,5 µl	25 µl
2,50 µl	1,0 µM	5,0 µl	12,5 µl	2,5 µl	25 µl
-----	-----	-----	-----	-----	-----
2,50 µl	1,0 µM	7,5 µl	12,5 µl	---	25 µl ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Nukleasefreies Wasser, ⁽²⁾ PCR Master Mix [doppelt konzentriert], ⁽³⁾ DNA-Lösung (DNA-Isolation mit dem Qiagen DNA-Isolationskit), ⁽⁴⁾ Leerwert

Wurden bei der gelelektrophoretischen bzw. der (D)HPLC-Sizing-Überprüfung der PCR (Abb.: 8) unspezifische Banden im Agarosegel bzw. unspezifische Peaks im (D)HPLC-Sizing-Chromatogramm gefunden, folgte auf die Primeraustestung eine PCR-Optimierung.

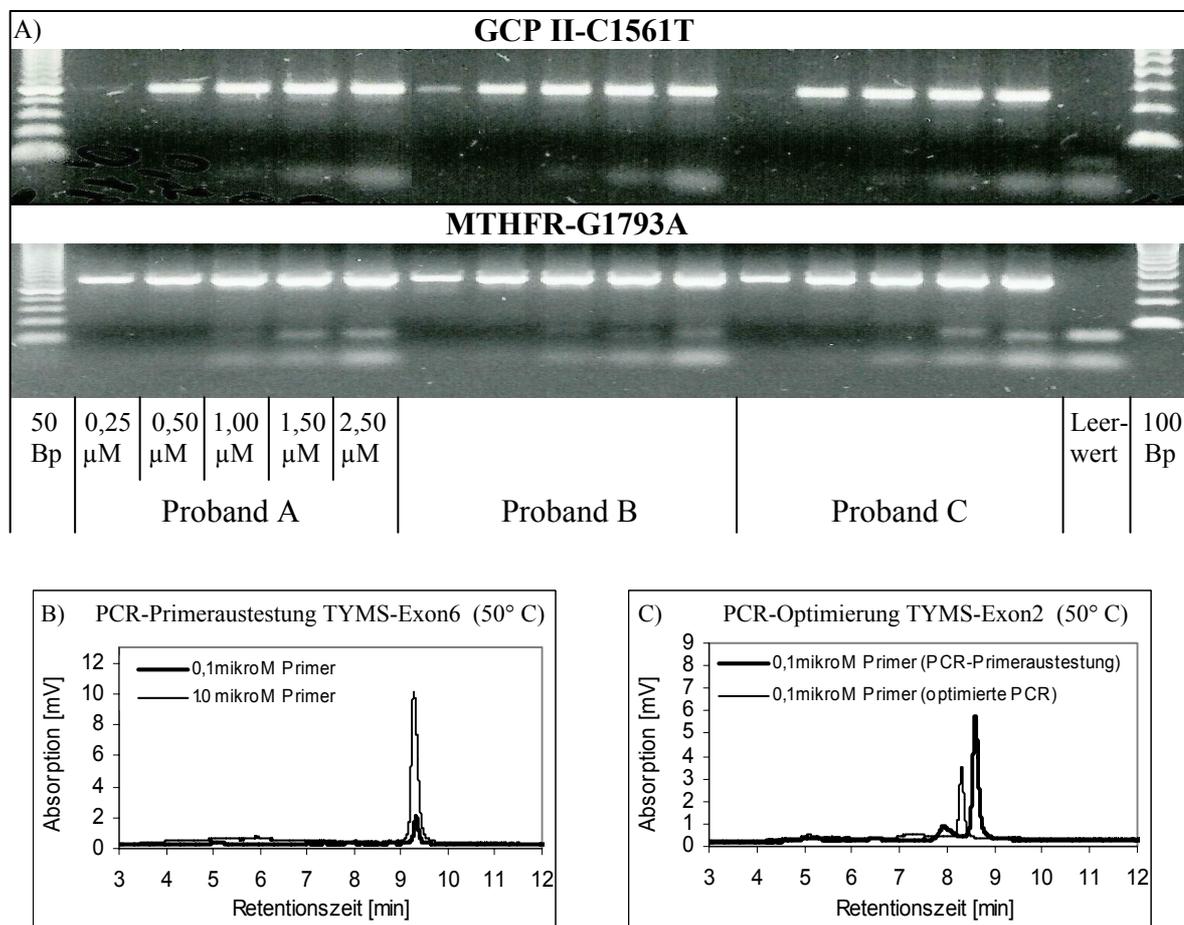


Abbildung 8: Überprüfung der Primeraustestung und der PCR-Optimierung.

A) Gelelektrophoretische Überprüfung der Primeraustestung. 2% Agarosegel, Laufzeit 45 min bei 100 Volt konstant. Dargestellt sind die Primeraustestungen für den Nachweis der GCP II-C1561T-Transition (244 Bp) und der MTHFR-G1793A-Transition (310 Bp) bei jeweils drei Probanden (A, B, C). Primerkonzentrationen: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 μ M. Banden kleiner als 50 Bp repräsentieren die Primer (Primerüberschuss). Banden mit circa 50 Bp repräsentieren Primerdimere (Primerüberschuss).

B) (D)HPLC-Sizing-Überprüfung der PCR-Primeraustestung. Die PCR für das Exon-6 des Thymidylatsynthasegens war bei der PCR-Primeraustestung optimal. Bei den ausgetesteten Primerkonzentrationen wurden keine unspezifischen Peaks im Chromatogramm erkannt. Dargestellt sind die niedrigste (0,1 μ M Primer) und die höchste (1,0 μ M Primer) ausgetestete Primerkonzentration.

C) (D)HPLC-Sizing-Überprüfung der PCR-Optimierung. Die PCR für das Exon-2 des Thymidylatsynthasegens war bei der PCR-Primeraustestung nicht optimal. Das Chromatogramm hatte einen deutlichen Peak vor dem erwarteten Amplifikatpeak. Nach der PCR-Optimierung ist der Vorpeak kleiner, das Peakverhältnis (Vorpeak/Amplifikatpeak) verbessert sich von 0,166 auf 0,066. Die Fläche des Vorpeaks verringert sich von 1770 mV auf 197 mV.

Die PCR-Optimierung wurde mit einer Primerkonzentration durchgeführt, bei der eine deutliche Bande im Agarosegel vorhanden war, aber kein Primerüberschuss in Form von primerspezifischen Banden im Agarosegel nachgewiesen werden konnte (Abb.: 8). Zur Optimierung der PCR wurde die Annealingtemperatur in 1° C Schritten erhöht oder

erniedrigt. Die Annealingzeit, die Denaturierungstemperatur, die Denaturierungszeit und die Extensionszeit mussten an die veränderten Annealingtemperaturen angepasst werden. Für den Nachweis des TYMS-28-Bp-Repeats und der TYMS-G-58C-Transversion im 28-Bp-Repeat wurde der PCR 8% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.

4.3.2.5. RFLP-Methodenetablierung

Die aus der Literatur entnommenen RFLP-Methoden mussten an die vorhandenen Laborbedingungen (Thermocycler, Gelelektrophoresekammer, Raumtemperatur) angepasst werden. Die Länge des Restriktionsverdau und das ideale Restriktionsenzym/PCR-Produkt-Verhältnis wurden experimentell ermittelt. Hierfür wurden 8-10 µl PCR-Produkt und 10-20 Enzymeinheiten (U) Restriktionsenzym, zusammen mit dem angegebenen Volumen des empfohlenen Restriktionspuffers für 1½-16 Stunden verdaut. Der Verdau wurde bei der vom Hersteller des Restriktionsenzym empfohlenen Temperatur durchgeführt. Die Inaktivierung des Restriktionsenzym erfolgte gegebenenfalls für 20 min bei der angegebenen Temperatur. Restriktionsverdau und Enzyminaktivierung wurden in einem Corbett Research Thermocycler durchgeführt. Die verdauten Proben wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 5: Probenansätze und Inkubation für den RFLP-Restriktionsverdau.

	Probandenproben	Kontrollen	
	PCR-Produkt	Puc18-Vektor	Lambda-DNA
PCR-Produkt	8-10 µl	2 µl (1 µg)	3,35 µl (1 µg)
Restriktionsenzym (10X)	1-2 µl (10-20 U)		
H ₂ O	2 µl		
Endvolumen	20 µl		
Restriktionsverdau	1½-16 Stunden		
Inkubationstemperatur	nach den Angaben des Herstellers des Restriktionsenzym		
Inaktivierung	nach den Angaben des Herstellers des Restriktionsenzym		

10X: 10-fach konzentriert

4.3.2.6. Direkte Agarosegelelektrophorese-Methodenetablierung

Zum Nachweis der Insertions- bzw. Deletionspolymorphismen wurden die PCR-Produkte direkt nach der PCR mittels dAGE analysiert. Die Ermittlung der idealen Dichte des Agarosegels und der idealen Laufzeit erfolgte experimentell.

4.3.2.7. DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Methodenentwicklung

Für die DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise wurde das WAVE[®] System mit der Wavemaker[™] Software (Version 4.1.42) von Transgenomic Ltd. benutzt.

Die beiden Laufmittelpuffer-A und -B und die Waschpuffer für die Injektionsnadel bzw. die Chromatographiesäule wurden unter einem Abzug hergestellt und bis zum Gebrauch bei +5° C gelagert. Die Zusammensetzung der Puffer (Tab.: 6) entsprach der Arbeitsanweisung von Transgenomic. Abweichend von dieser Arbeitsanweisung, wurde dem Laufmittelpuffer-A 0,025% Acetonitril zugesetzt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer für die DHPLC-Analysen.

	Laufmittelpuffer			
	Puffer-A		Puffer-B	
	Volumina	Endkonzentration	Volumina	Endkonzentration
Triethylammoniumacetat [2 M]	50 ml	0,1 M	50 ml	0,1 M
Acetonitril [100%]	0,25 ml	0,025%	250 ml	25%
H ₂ O (Milipore)	949,75 ml	---	700 ml	---
	Waschpuffer			
	Injektionsnadel		Chromatographiesäule	
	Volumina	Endkonzentration	Volumina	Endkonzentration
Triethylammoniumacetat [2 M]	---	---	---	---
Acetonitril [100%]	80 ml	8%	750 ml	75%
H ₂ O (Milipore)	920 ml	---	250 ml	---

Die PCR-Reaktionen wurden unverändert von den etablierten RFLP-Protokollen übernommen. Zur Abarbeitung der Proben wurde mit der WavemakerTM Software ein Probenplan erstellt. Dieser Probenplan enthielt die Amplifikatsequenz, die Parameter des DHPLC-Gradienten, die Analysetemperatur, das Probenvolumen und die Reihenfolge, in der die Proben analysiert werden sollten. Für die DHPLC- bzw. (D)HPLC-Sizing-Analysen wurden pro Analyse 5 µl einer Probe analysiert. Zur Entfernung von DNA und anderen Kontaminanten wurde die Chromatographiesäule nach jeder Analyse mit der 75% Acetonitrilwaschlösung gespült. Diese Behandlung ermöglichte die schnelle Reinigung und anschließende Equilibrierung der Chromatographiesäule für die nächste DNA-Sequenzanalyse. Um die Verdunstung der Proben zu minimieren, waren sie auf 12° C gekühlt. Vor der Durchführung der DHPLC-Analysen mussten die PCR-Produkte ohne bzw. mit Kontroll-DNA hybridisiert werden. Hierfür wurden folgende Ansätze vorbereitet:

Ansatz ohne Kontroll-DNA

Probanden-PCR-Produkt	6 µl
Kontroll-DNA-PCR-Produkt	0 µl
-----	-----
Gesamtvolumen	6 µl

5 µl wurden analysiert

Ansatz mit Kontroll-DNA

Probanden-PCR-Produkt	3µl
Kontroll-DNA-PCR-Produkt	3µl
-----	-----
Gesamtvolumen	6 µl

5 µl wurden analysiert

Die dargestellten Volumenverhältnisse wurden für alle DHPLC-Mutationsnachweise beibehalten.

Die vorbereiteten PCR-Produkte wurden für 10 Minuten auf 95° C erhitzt, anschließend langsam (1° C/40 Sekunden) auf 25° C und dann in einem Schritt auf 12° C abgekühlt. Die Hybridisierung wurde mit einem Corbett Research Thermocycler durchgeführt. Die Ermittlung des DHPLC-Laufmittelgradienten und der idealen Analysetemperatur (Tab.: 19 im Anhang) erfolgte mit Hilfe der WavemakerTM Software anhand der DNA-Sequenzen der PCR-Produkte.

4.3.2.8. (D)HPLC-Sizing-Mutationsanalysen

Die (D)HPLC-Sizing-Analysen erforderten keine weitere Behandlung der PCR-Produkte. Die Analysetemperatur betrug 50° C. Der Laufmittelgradient war durch die WavemakerTM Software vorgegeben. Zur Verkürzung der Analysezeit wurde der Laufmittelgradient eine Minute, nachdem das größte DNA-Fragment von der Chromatographiesäule dissoziiert war, beendet. Der ideale Zeitpunkt bzw. die ideale Acetonitrilkonzentration für die Beendigung der Analysen wurde experimentell ermittelt. Die Laufmittelgradienten und Analysetemperaturen für die DHPLC- und die (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise sind im Anhang protokolliert.

4.3.2.9. Verifizierung neu entdeckter Sequenzvariationen

Wurden bei den DHPLC-Mutationsanalysen auffällige Chromatogramme gefunden, wurde die Untersuchung der DNA-Probe wiederholt. Um die Wahrscheinlichkeit eines bei der PCR von der *Taq*-Polymerase eingeführten Fehlers zu minimieren, wurde hierbei eine neue PCR durchgeführt. Nach der Bestätigung des auffälligen Chromatogramms erfolgte eine Sequenzierung des untersuchten PCR-Produktes und eines mittels DHPLC als Wildtyp bestimmten PCR-Produktes. Anschließend wurden die bei der Sequenzierung lokalisierten DNA-Sequenzvariationen anhand von RFLP-Analysen überprüft. Bei dieser Überprüfung wurde dasselbe PCR-Produkt für die DHPLC- und RFLP-Analysen benutzt. Da es nicht für alle zu verifizierenden Sequenzvariation kommerziell erhältliche Restriktionsenzyme gab, war die Verifizierung neuer Sequenzvariationen durch RFLP-Analysen nicht immer möglich. In diesen Fällen wurde die Sequenzierung wiederholt.

4.3.2.10. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die PCR mit einem Biotin und einem Cy5-modifizierten Primer durchgeführt. Beide Modifikationen waren am 5'-Terminus der Primer lokalisiert. Die Primersequenzen wurden unverändert von den RFLP-Protokollen übernommen. Die

Primerkonzentration wurde auf 90% der Primerkonzentration, die bei den etablierten PCR-Reaktionen benutzt worden war, reduziert. Alle anderen Parameter blieben unverändert. Nach der PCR wurde das PCR-Produkt qualitativ und quantitativ untersucht. War es ausreichend hoch konzentriert und ohne unspezifische Nebenprodukte, wurde es mit einem ALF-Sequenzer sequenziert. Zur Probenaufbereitung wurde das Auto Load Solid Phase Sequencing Kit von Amersham Biosciences benutzt.

4.4. Ergebnisse

4.4.1. RFLP-Mutationsnachweise

Nach der Anpassung der RFLP-Methoden an die vorliegenden Laborbedingungen und die verwendeten Standardreagenzien (PCR-Mastermix, Agarose, TBE-Puffer) konnten die Genotypen für neun SNPs zweifelsfrei mittels RFLP ermittelt werden. Der RFLP-Mutationsnachweis der MTHFR-A1298C-Transversion erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse.

4.4.2. dAGE-Mutationsnachweise

Der TYMS-28-Bp-Repeat und die CBS-844Ins68-Deletion konnten nach der Methodenanpassung mit den veröffentlichten dAGE-Methoden nachgewiesen werden. Für den TYMS-28-Bp-Repeat wurde die PCR nach Volcik *et al.* (Volcik *et al.* 2003) und Hishida *et al.* (Hishida *et al.* 2003) durchgeführt. Die Ergebnisse waren identisch. Das PCR-Produkt nach Hishida *et al.* (Hishida *et al.* 2003) ist 238 Bp groß, das nach Volcik *et al.* (Volcik *et al.* 2003) ist 576 Bp groß. Weil die gelelektrophoretische Auftrennung der Allele beim PCR-Produkt nach Hishida *et al.* (Hishida *et al.* 2003) weniger Zeit beanspruchte und die Banden deutlicher getrennt wurden als bei dem PCR-Produkt nach Volcik *et al.* (Volcik *et al.* 2003), wurde in dieser Arbeit das PCR-Protokoll nach Hishida *et al.* (Hishida *et al.* 2003) verwendet.

4.4.3. DHPLC-Mutationsnachweise

Zur Genotypisierung mittels DHPLC muss das Chromatogramm des Wildtyp-PCR-Produktes und das einer heterozygoten Mutante bekannt sein. Sie dienen als Referenzchromatogramme und sind deswegen für alle durchgeführten DHPLC-Mutationsanalysen abgebildet. Die Chromatogramme der homozygoten Mutanten sowie der gemischten Proben (Wildtyp oder homozygote Mutante + Kontroll-DNA) sind nur dargestellt, wenn sie sich von dem jeweiligen Chromatogramm der heterozygoten Mutante unterscheiden.

Für den MTHFR-C677T, den RFC I-G80A, den GCP II-C1561T und den TC II-C776G waren die Ergebnisse der DHPLC-Mutationsanalysen bei allen 37 untersuchten Probanden identisch mit denen der RFLP-Analysen. Die Homoduplexchromatogramme zeigten nur einen Peak (Abb.: 9E, 16E, 18E). Beim MTHFR-C677T hatte dieser Peak eine linksseitige Schulter (Abb.: 9E). Die Heteroduplexchromatogramme des MTHFR-C677T, des RFC I-G80A und des GCP II-C1561T unterschieden sich eindeutig durch einen zusätzlichen Peak

mit kürzerer Retentionszeit von den Homoduplexchromatogrammen (Abb.: 9E, 16E, 18E). Das Heteroduplexchromatogramm des TC II-C776G zeigte zwei zusätzliche Peaks mit kürzerer Retentionszeit (Abb.: 17E).

Die Ergebnisse der DHPLC-Mutationsanalysen für den MTHFR-A1298C, den MTHFR-G1793A, den MTHFD-G1958A und den MTR-A2756G waren nicht bei allen untersuchten Probanden identisch mit denen der RFLP-Analysen. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen für diese vier Polymorphismen werden zusammen mit den Abbildungen der RFLP-Agarosegele und den DHPLC-Chromatogrammen beschrieben. Die Ursachen für diese Schwierigkeiten und Vorschläge zu ihrer Lösung werden in der Diskussion angesprochen.

4.4.4. (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise

Die Ergebnisse der (D)HPLC-Sizing-Mutationsanalysen für den TYMS-28-Bp-Repeat und die TYMS-6-Bp-Deletion waren identisch mit denen der RFLP- bzw. dAGE-Mutationsnachweise. Der Nachweis beider Polymorphismen konnte mit den entwickelten (D)HPLC-Sizing-Methoden zuverlässig durchgeführt werden.

4.4.5. Abbildungen der RFLP-, dAGE-, DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der durchgeführten RFLP-, dAGE-, DHPLC-, und (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise zusammen mit den DHPLC-Schmelzkurven und -Schmelztemperaturprofilen der Amplifikate dargestellt. Die DHPLC-Schmelzkurven und -Schmelztemperaturprofile ermöglichen eine Abschätzung der idealen DHPLC-Analysetemperatur für den sicheren Nachweis des untersuchten Polymorphismus. Es wird empfohlen, die Analysen bei einer Temperatur durchzuführen, bei der das Gesamtamplifikat noch zu 75% in der DNA-Doppelhelixformation vorliegt. Diese Temperatur wird von der WavemakerTM Software errechnet. Bei Amplifikaten mit stark unterschiedlichen Schmelztemperaturbereichen (zum Beispiel MTHFD-G1958A, GCP II-C1561T) wurden mit dieser Temperatur nicht immer die besten Ergebnisse erzielt. In solchen Fällen war es notwendig, die ideale Analysetemperatur experimentell zu ermitteln. Hierfür wurden DHPLC-Sequenzanalysen mit genotypisierten PCR-Produkten in einem Temperaturbereich bis zu 5° C über und unter der errechneten Schmelztemperatur durchgeführt. Die Temperatur, mit der die drei Genotypen eines Polymorphismus am sichersten differenziert werden konnten, wurde für die DHPLC-Sequenzanalysen benutzt. Für die MTR-A2756G-Transition sind nur die Chromatogramme für das Amplifikat nach Harmon *et al.* (Harmon *et al.* 1999) dargestellt. Die DHPLC-Analysen mit dem Amplifikat

nach Leclerc *et al.* (Leclerc *et al.* 1996) erbrachten keine Heteroduplexchromatogramme bei den mittels RFLP bestimmten Referenzprobanden. Die Chromatogramme der untersuchten Referenzprobanden entsprachen alle einem typischen Wildtypchromatogramm mit nur einem Peak. Auch die DHPLC-Analysen der gemischten Proben resultierten in typischen Wildtypchromatogrammen.

4.4.5.1. Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR-C677T)

A) Amplifikatsequenz

5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGAGCCGATTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTTCCGCTTTGTGAAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCCATAGCTCCCTCCACCCACTCTCACCGCACCGTCCT 3'

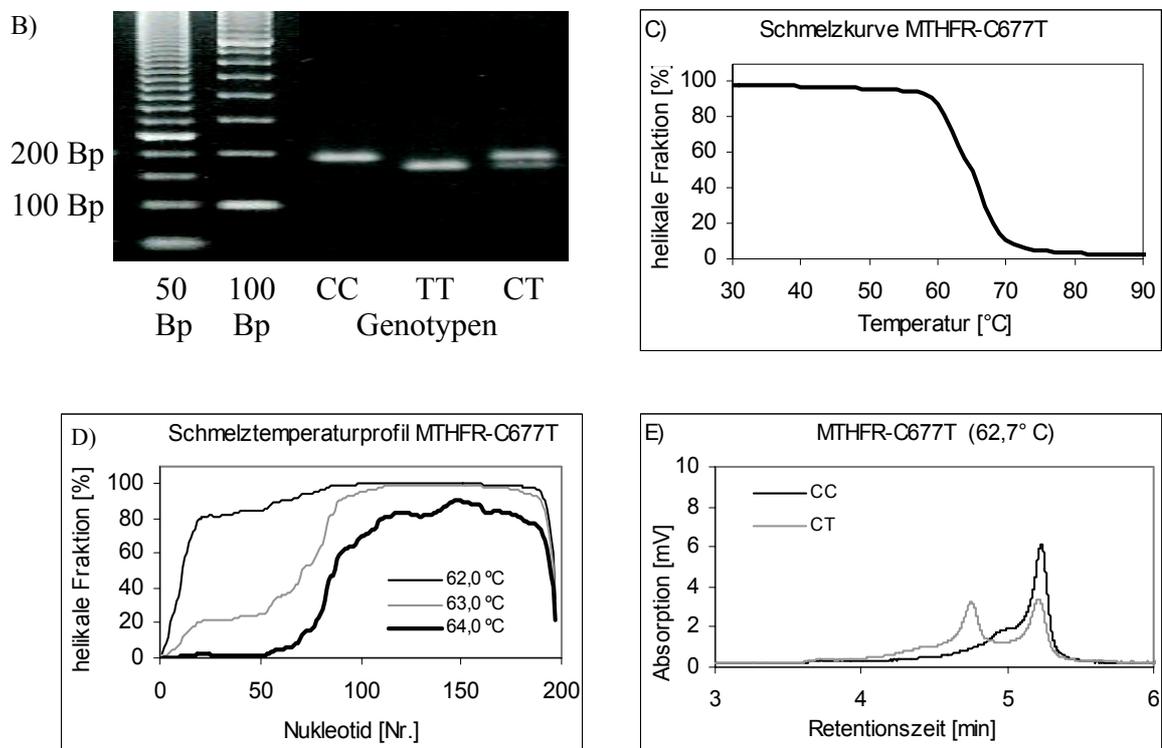


Abbildung 9: MTHFR-C677T-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die C>T-Transition (Nukleotid Nr. 25 von 198) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *Hinf*I, 2% Agarosegel, Laufzeit 90 min bei 100 V konstant. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard, CC (Wildtyp): 198 Bp, TT (homozygote Mutante): 175, 23 Bp, CT (heterozygote Mutante): 198, 175, 23 Bp.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 60° C in DNA-Einzelstränge. Bei 70° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat zwei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-75 Bp, bei 62° C sind noch 75% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 76-198 Bp, bei 64° C sind 75% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: CC: Wildtyp, CT: heterozygote Mutante.

Die Ergebnisse der RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweise erbrachten bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbare und identische Ergebnisse.

4.4.5.2. Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR-A1298C)

A) Amplifikatsequenz

5' CTTTGGGGGAGCTGAAGGACTACTACCTCTTCTACCTGAAGAGCAAGTCCCCCAAGGAGGAGCTGCTGAAG
 ATGTGGGGGGGAGGAGCTGACCAGTGAAGAAAGTGTCTTTGAAGTCTTCGTTCTTTACCTCTCGGGAGAACCAA
ACCGGAATGGTCACAAAGTG 3'

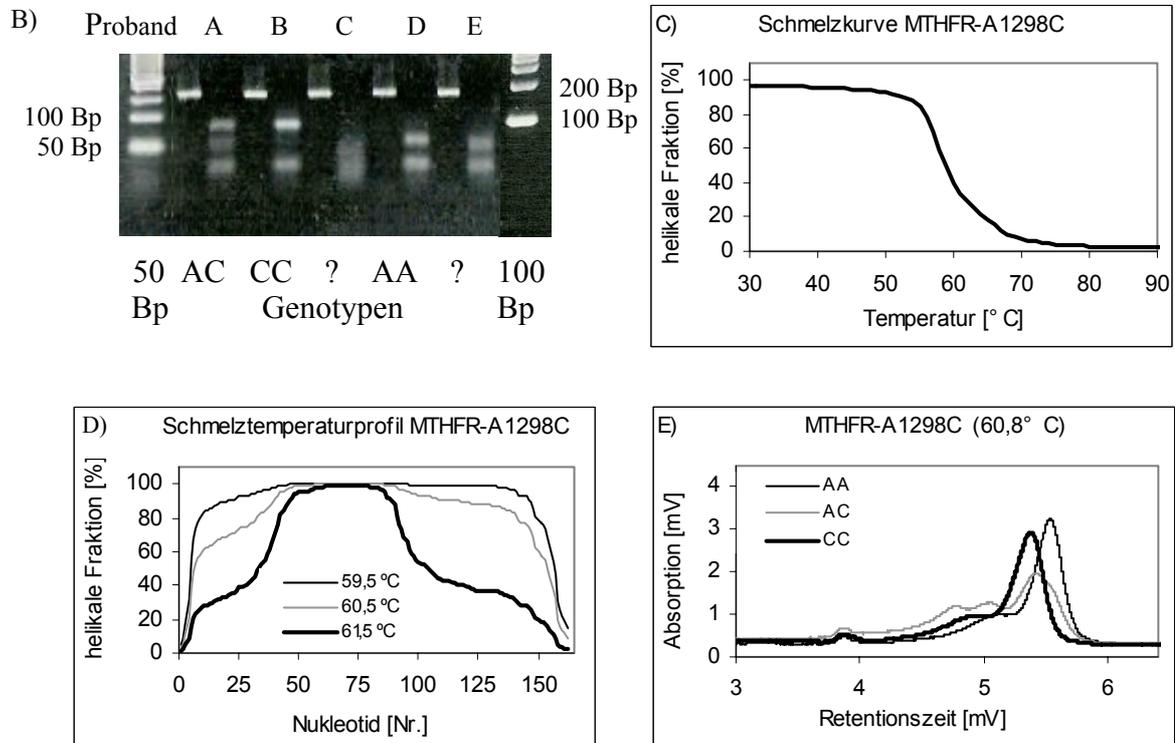


Abbildung 10: MTHFR-A1298C-Transversion.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die A>G-Transversion (Nukleotid Nr. 99 von 163) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *Mbo*II, 3% Agarosegel, Laufzeit 20 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, AC (heterozygote Mutante): 84, 56, 31, 30, 28, 18 Bp, CC (homozygote Mutante): 84, 31, 30, 18 Bp, AA (Wildtyp): 56, 31, 30, 28, 18 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard, ?: DNA-Bandenmuster, die keinem Genotyp zugeordnet wurden. Die 31-, 30- und 28-Basenpaarfragmente wurden nicht getrennt. Das 18-Basenpaarfragment war mittels Agarosegelelektrophorese nicht nachweisbar.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 55° C in DNA-Einzelstränge. Bei 70° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-40 Bp, bei 60,5° C sind noch 75% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 41-85 Bp, bei 61,5° C sind noch 100% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 86-163 Bp, bei 60,5° C sind noch 90% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: AA: Wildtyp, AC: heterozygote Mutante, CC: homozygote Mutante.

Beim RFLP-Mutationsnachweis der MTHFR-A1298C-Transversion wurden bei elf Probanden unspezifische DNA-Banden im Agarosegel beobachtet (Abb.: 10B). Die A1298C-Transversion entfernt eine von vier *Mbo*II-Schnittstellen in dem MTHFR-A1298C-Amplifikat, wodurch das PCR-Produkt des C-Allels nur noch in vier Fragmente von 84, 31, 30 und 18 Basenpaaren geschnitten wird. Beim PCR-Produkt des A-Allels

enthält das 84-Basenpaarfragment eine zusätzliche *Mbo*II-Schnittstelle. Es wird in zwei Fragmente von 56 und 28 Basenpaaren geschnitten, wodurch das A-Allel nach dem Verdau fünf Fragmente von 56, 31, 30, 28, und 18 Basenpaaren aufweist. Heterozygote Mutanten sind durch sechs DNA-Fragmente (84, 56, 31, 30, 28, 18 Bp) charakterisiert. Das unverdaute PCR-Produkt (163 Bp) wurde bei allen Probanden nachgewiesen. Proband A, B und D wurden nach ihrem DNA-Bandenmuster eindeutig als heterozygote Mutante, homozygote Mutante und Wildtyp erkannt (Abb.: 10B). Bei Proband C ist nach dem Restriktionsverdau eine diffuse Bande (20-60 Bp) zu erkennen. Bei Proband E sind nach dem Restriktionsverdau zwei Banden zu erkennen. Die DNA-Fragmente sind kleiner als bei dem Wildtypprobanden. Die Bandenmuster der Probanden C und E konnten keinem MTHFR-A1298C-Genotyp zugeordnet werden. Die Sequenzierung der Probanden-PCR-Produkte ergab die bekannte Wildtypsequenz.

Bei den DHPLC-Analysen der MTHFR-A1298C-Transversion unterschieden sich die Heteroduplexchromatogramme von den Homoduplexchromatogrammen durch zwei zusätzliche Peaks mit kürzerer Retentionszeit (Abb.: 10E). Die Homoduplexe von homozygoten Mutanten hatten eine reproduzierbar kürzere DHPLC-Retentionszeit als die von Wildtypen (Abb.: 10E). Für den Nachweis der homozygoten Probanden wurde dennoch eine zweite DHPLC-Analyse mit einer gemischten Probe (Probanden-PCR-Produkt + Kontroll-DNA) durchgeführt. Beim DHPLC-Mutationsnachweis dieser Transversion wurden die elf Probanden, die mittels RFLP nicht bestimmt werden konnten, eindeutig als Wildtypen genotypisiert. Die Sequenzierungen der Probanden bestätigten die Ergebnisse der DHPLC-Mutationsanalysen.

4.4.5.3. Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR-G1793A)

A) Amplifikatsequenz

5' CTCTGTGTGTGTGTGCATGTGTGCGTGTGTGCGGGGGTATGTGTGTGTAGGACGAGGC[■]TTTGCCCTGTG
 GATTGAGCGGTGGGAAAGCTGTATGAGGAGGAGTCCCCGTCCCGCACCATCATCCAGTACATCCACGACAAC
 TACTTCCTGGTCAACCTGGTGGACAATGACTTCCCCTGGACAACCTGCCTCTGGCAGGTGGTGGAAAGACACAT
 TGGAGCTTCTCAACAGGCCACCCAGAATGCGAGAGAAACGGAGGCTCCATGACCCTGCGTCTGACGCCCTG
CGTTGGAGCCACTCCTGTCCC 3'

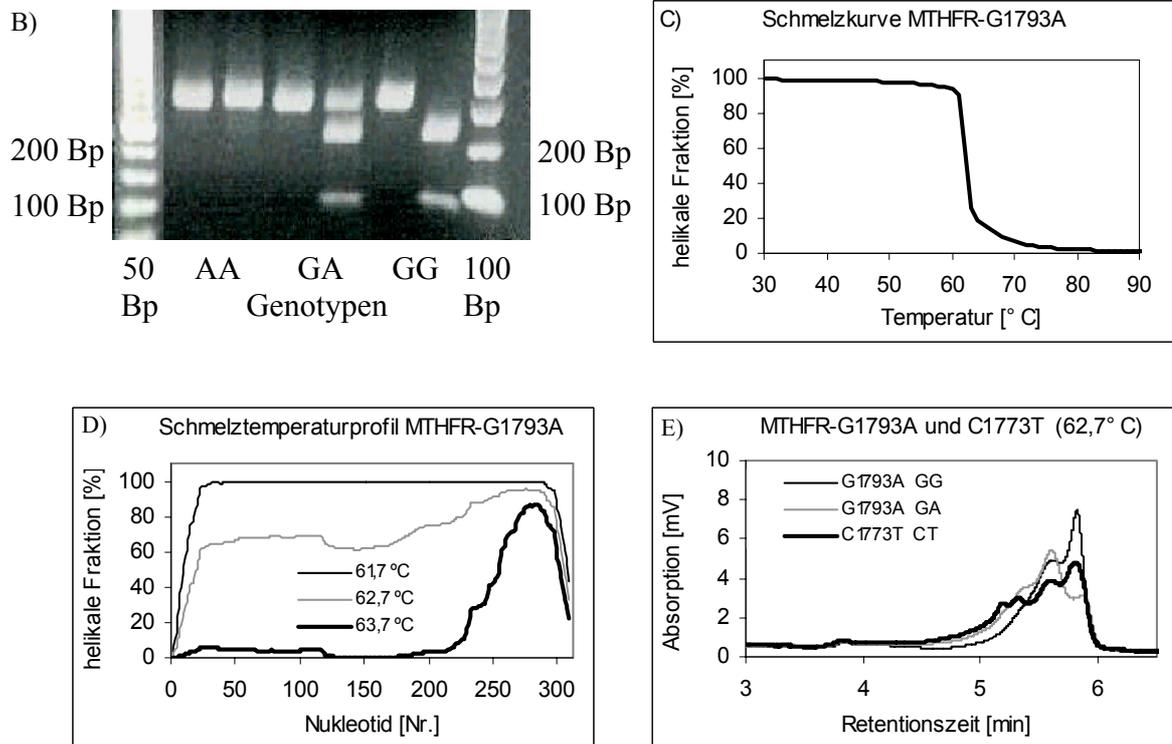


Abbildung 11: MTHFR-G1793A-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die C1773T-Transition, die G1793A-Transition (rs2274976) und die C1970T-Transition (Nukleotid Nr. 59, 79 und 256 von 310) sind schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *MbiI*, 2% Agarosegel, Laufzeit 35 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, AA (homozygote Mutante): 310 Bp, GA (heterozygote Mutante): 310, 233, 77 Bp, GG (Wildtyp): 233, 77 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 62°C in DNA-Einzelstränge. Bei 70°C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat zwei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-200 Bp, bei 61,7°C sind noch 62% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 200-310 Bp, bei 62,7°C sind noch mehr als 90% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: GG: Wildtyp, GA: heterozygote Mutante, C1773T: neu gefundene DNA-Sequenzvariation, heterozygote Mutante der C1771T-Transition.

Bei der MTHFR-G1793A-Transition entsprachen die Homo- und Heteroduplexchromatogramme nicht den theoretischen Erwartungen, nach denen Homoduplexe einen Peak und Heteroduplexe zwei Peaks haben. Bei diesem Polymorphismus hatten die Homoduplexchromatogramme zwei Peaks, einen Hauptpeak (Retentionszeit 5,83 min) und einen Vorpeak (Retentionszeit 5,64 min) (Abb.: 11E). Die

Heteroduplexchromatogramme hatten einen Peak mit einer linksseitigen und einer rechtsseitigen Schulter. Die Retentionszeit des Peaks entsprach der des Vorpeaks des Homozygotenchromatogramms. Die Retentionszeit der rechtsseitigen Schulter entsprach der des Hauptpeaks des Wildtypchromatogramms. Die beschriebenen Chromatogramme waren reproduzierbar. Bei zwei Probanden wurde ein Chromatogramm erhalten, das weder dem Heteroduplexchromatogramm noch dem Homoduplexchromatogramm der MTHFR-G1793A-Transition entsprach (Abb.: 11E). Die zwei Probanden, bei denen diese Chromatogramme auftraten, konnten mittels DHPLC nicht genotypisiert werden. Bei der Sequenzierung der beiden Probanden wurde eine C>T-Transition am Nukleotid Nr. 1773 (C1773T-Transition) gefunden (Abb.: 12). Die Sequenzvariation ist noch nicht beschrieben worden. Beide Probanden waren Wildtypen für die MTHFR-G1793A-Transition.

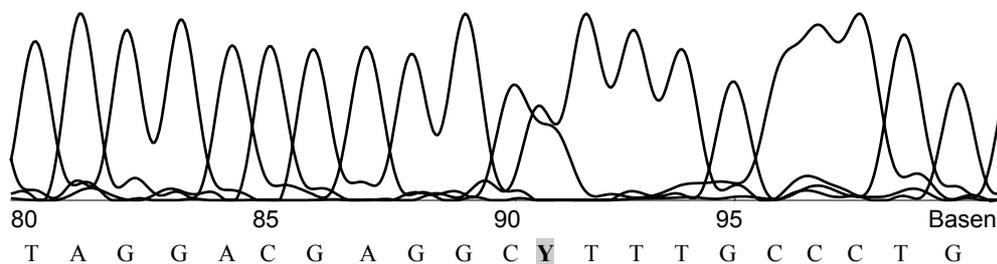


Abbildung 12: Sequenzierung der MTHFR-C1773T-Transition. **Y**: C>T-Transition bei einem heterozygoten Probanden. G: Guanin, C: Cytosin, A: Adenin, T: Thymin.

Ein Proband, der bei den RFLP-Analysen als Wildtyp genotypisiert worden war, wurde mittels DHPLC als heterozygote Mutante erkannt. Bei diesem Proband befand sich eine C>T-Transition am Nukleotid Nr. 1970 (C1970T-Transition) (Abb.: 11A und 13C). Die Sequenzvariation ist nicht in der NCBI-Datenbank beschrieben. In der Datenbank von MutationDiscovery ist sie beschrieben. Der Proband war Wildtyp für die MTHFR-G1793A-Transition. Bei den DHPLC-Analysen wurde das Heteroduplexchromatogramm der MTHFR-C1970T-Transition nicht von dem Heteroduplexchromatogramm der MTHFR-G1793A-Transition unterschieden (Abb.: 13A und B). Deswegen wurde dem Proband ein falscher MTHFR-G1793A-Genotyp zugeordnet.

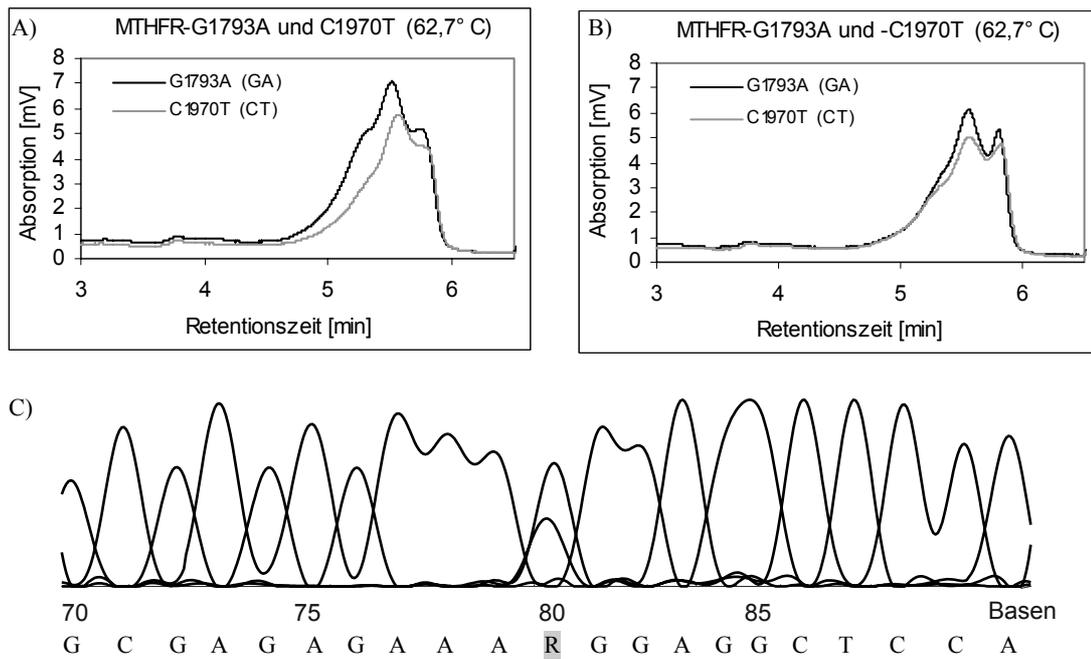


Abbildung 13: DHPLC-Mutationsanalyse der MTHFR-G1793A-Transition und der MTHFR-C1970T-Transition.

A: Heteroduplexchromatogramme der DHPLC-Analysen ohne Kontroll-DNA.

B: Heteroduplexchromatogramme der DHPLC-Analysen mit Kontroll-DNA.

C: Sequenzierung der MTHFR-C1970T-Transition. **R**: C>T-Transition bei einem heterozygoten Probanden.

G: Guanin, C: Cytosin, A: Adenin, T: Thymin.

4.4.5.4. Methylenetetrahydrofolatdehydrogenase (MTHFD-G1958A)

A) Amplifikatsequenz

5' CACTCCAGTGTTTTGTCCATGCTGGCCCGTTTGCCAACATCGCACATGGCAATTCCTCCATCATTGCAGAC
 CGGATCGCACTCAAGCTTGTTGGCCCAAGGGTTGTAGGTTAGTGTTTTTTGCAAACCAGTGAATAGACT
 GTATGTTTCTTTTAACATCAGGGGAATTGGGATGGCATTTTTACTGTTGCTTTTCCTCTTTACAGTGACGGAAG
 CAGGATTTGGAGCAGACATTGGAATGGAAAAGTTTTTAAACATCAAATGCCGGTATTCCGGCCTCTGCCCCCA
 CGTGGTGGTGTGTTGTTGCCACTGTCAGGGCTCTCAAGATGC 3'

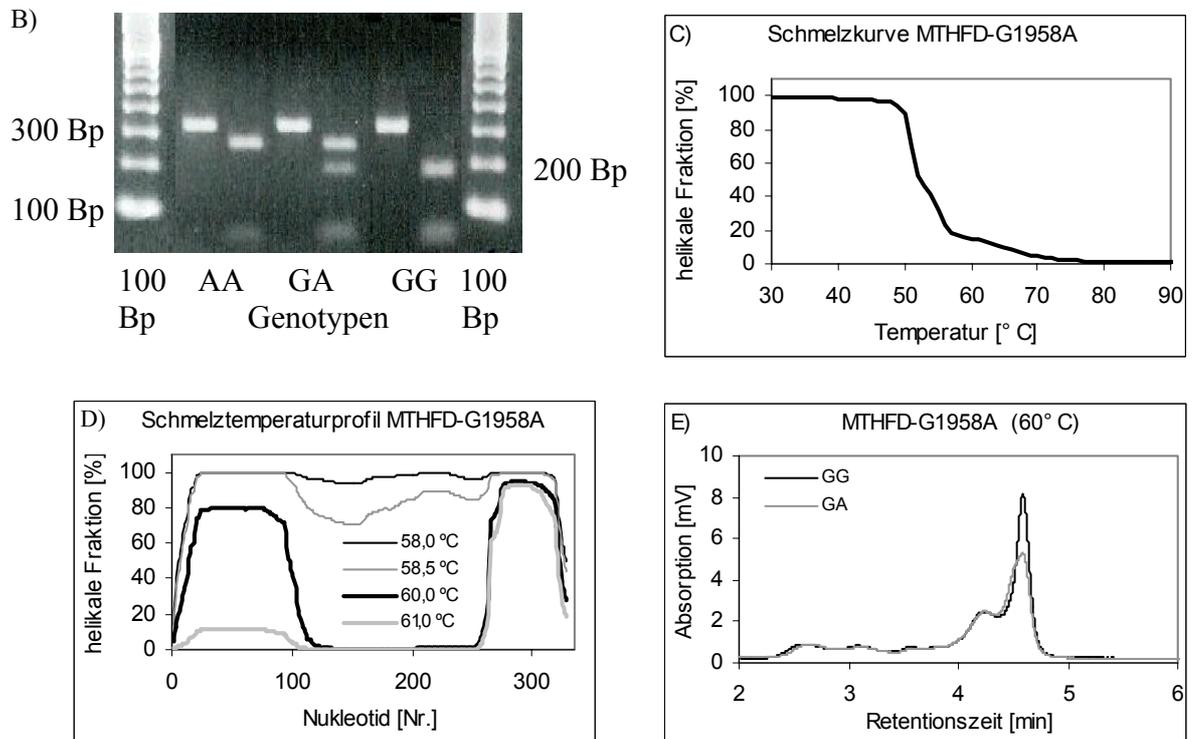


Abbildung 14: MTHFD-G1958A-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die G>A-Transition (Nukleotid Nr. 72 von 330) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *MspI*, 2% Agarosegel, Laufzeit 40 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, AA (homozygote Mutante): 266, 56, 30 Bp, GA (heterozygote Mutante): 266, 196, 70, 56, 8 Bp, GG (Wildtyp): 196, 70, 56, 8 Bp. Die 70- und 56-Bp-Banden wurden nicht aufgetrennt. Die 8-Bp-Bande war aus dem Agarosegel herausgelaufen.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 55° C in DNA-Einzelstränge. Bei 70° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-100 Bp, bei 60° C sind noch 80% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 101-260 Bp, bei 61° C sind noch 82% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 261-330 Bp, bei 61° C sind noch 90% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Bei 63, 64 und 65° C sind noch 85, 75 bzw. 50% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: GG: Wildtyp, GA: heterozygote Mutante.

Das Amplifikat der MTHFD-G1958A-Transition war für eine DHPLC-Mutationsanalyse nicht geeignet. Die Analysen bei 58° C ergaben keine Unterschiede, die zur Genotypisierung herangezogen werden konnten. Die DHPLC-Analysen der drei Referenzprobanden erbrachten Chromatogramme mit nur einem Peak. Bei den Analysen

mit 60° (Abb.: 14E) und 62° C (Ergebnisse nicht dargestellt) wurde bei homozygoten Referenzprobanden ein zweigipfeliges Chromatogramm gefunden. Bei heterozygoten Referenzprobanden und gemischten Proben wurde ebenfalls ein zweigipfeliges Chromatogramm gefunden. Hier hatte der Peak mit der längeren Retentionszeit (4,6 min) allerdings eine kleine, linksseitige Schulter und zeigte eine schwächere Absorption als bei homozygoten Probanden. Weil die DNA-Konzentrationen des G- und A-Allels nicht zu ermitteln waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Absorptionsunterschied durch eine reduzierte Amplifizierung des Wildtypallels verursacht war. Die linksseitige Schulter konnte in wiederholten Analysen nicht ausnahmslos reproduziert werden.

4.4.5.5. Methioninsynthase (MTR-A2756G) (PCR nach Harmon *et al.* 1999)

A) Amplifikatsequenz

5' TGTTCCCGCTGTTAGATGAAAAATCTAAAGGATGAATACTTTGAGGAAATCATGGAAGAATATGAAGATA
 TTAGACAGGACCATTATGAGTCTCTCAAGGTAAGTGGTAGAAACAGATTTTTGCTTGTTTTTAATGTGACTGT
 TTTTTATGATCCTAGTTTTTTAATGTGACTTTTTTAAAATGGTTTTTGAGGAGTGATAAAGGCTTTGGATC 3'

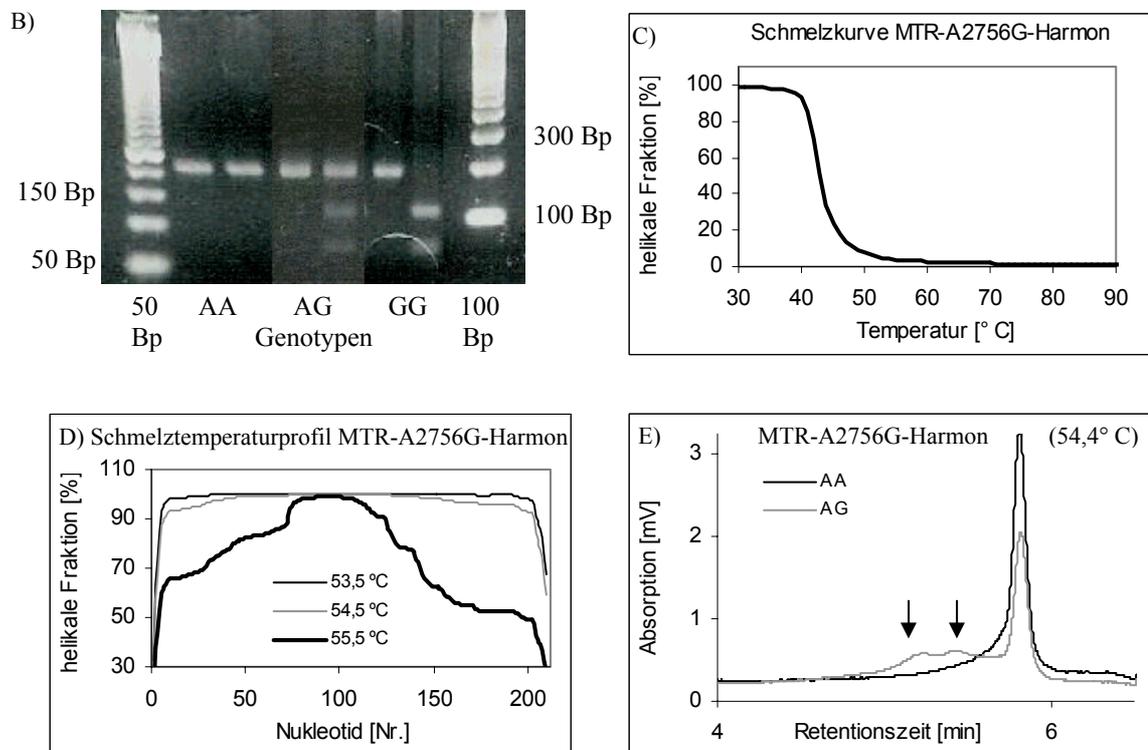


Abbildung 15: MTR-A2756G-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die A>G-Transition (Nukleotid Nr. 80 von 211) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdauung mit *Bsu*RI, 2% Agarosegel, Laufzeit 40 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, AA (Wildtyp): 211 Bp, AG (heterozygote Mutante): 211, 131, 80 Bp, GG (homozygote Mutante): 131, 80 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 40°C in DNA-Einzelstränge, bei 49°C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat vier Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-75 Bp, bei 55,5°C sind noch zwischen 68 und 88% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 76-110 Bp, bei 55,5°C sind 100% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 111-150 Bp, bei 55,5°C sind noch zwischen 60 und 100% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation, 4). 151-211 Bp, bei 55,5°C sind noch 52% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: AA: Wildtyp, AG: heterozygote Mutante. Die beiden Vorpeaks des Heterozygotenchromatogramms sind durch Pfeile markiert.

Der DHPLC-Mutationsnachweis der MTR-A2756G-Transition wurde mit zwei unterschiedlichen PCR-Produkten durchgeführt. Das Amplifikat der von Leclerc *et al.* (Leclerc *et al.* 1996) beschriebenen PCR erwies sich als ungeeignet für eine DHPLC-Mutationsanalyse. Die DHPLC-Chromatogramme von Probanden, die mittels RFLP eindeutig als Wildtyp (AA), heterozygote- oder homozygote Mutante (AG bzw. GG)

genotypisiert worden waren, konnten nicht voneinander unterschieden werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Für das PCR-Produkt mit den Primern von Harmon *et al.* (Harmon *et al.* 1999) wurde bei einem heterozygoten Probanden ein DHPLC-Heteroduplexchromatogramm erhalten (Abb.: 15E). Dieses Ergebnis konnte in späteren Versuchen nicht reproduziert werden. Versuche mit gemischten Proben (Kontroll-DNA + homozygote Mutante) erbrachten nicht die erwarteten Heteroduplexchromatogramme.

4.4.5.6. Reduced Folate Carrier I (RFC I-G80A)

A) Amplifikatsequenz

5' AGTGTACACCTTCGTCCCCTCCGGAGCTGCACGTGGCCTGAGCAGGATGGTGCCCTCCAGCCCAGCGGTGG
 AGAAGCAGGTGCCCGTGGAACTGGGCCTGACCCCGAGCTCCGGTCTGGCGGGGGCCTCGTGTGTACCTTTG
 CTTCTACGGCTTCATGGCGCAGATACGGCCAGGGGAGAGCTTCATCACCCCTACCTCCTGGGGCCCCGACAAG
AACTTCACGCGGGAG 3'

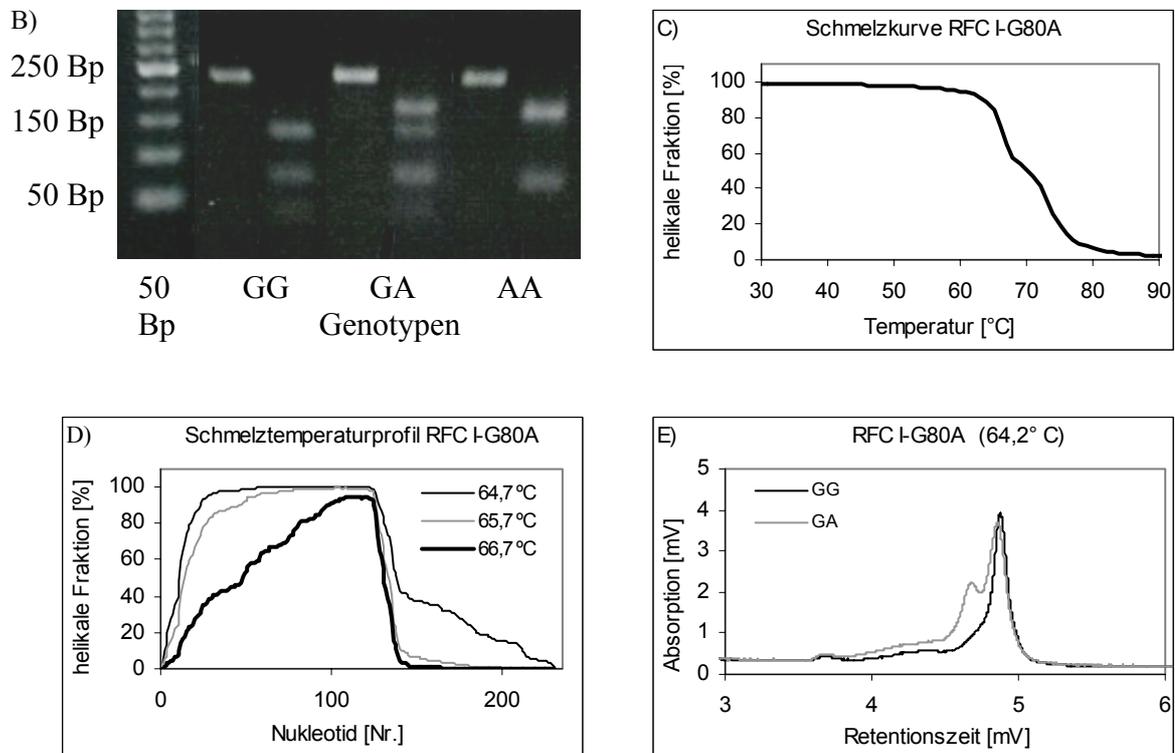


Abbildung 16: RFC I-G80A-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die G>A-Transition (Nukleotid Nr. 125 von 231) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *CfoI*, 2% Agarosegel, Laufzeit 60 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, GG (Wildtyp): 125, 68, 37 Bp, GA (heterozygote Mutante): 162, 125, 68, 37 Bp, AA (homozygote Mutante): 162, 68 Bp.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 62° C in DNA-Einzelstränge. Bei 77° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-125 Bp, bei 66,7° C sind noch zwischen 0 und 90% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Die Schmelztemperatur nimmt vom 1. zum 125. Basenpaar gleichmäßig zu. 2) 126-145 Bp, bei 66,7° C sind noch zwischen 90 und 0% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Die Schmelztemperatur nimmt vom 126. zum 145. Basenpaar gleichmäßig ab. 3) 146-230 Bp, bei 66,7° C sind noch zwischen 0% und 40% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Die Schmelztemperatur nimmt vom 146. zum 231. Basenpaar gleichmäßig ab.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: GG: Wildtyp, GA: heterozygote Mutante.

Die Ergebnisse der RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweise erbrachten bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbare und identische Ergebnisse.

4.4.5.7. Transcobalamin II (TC II-C776G)

A) Amplifikatsequenz

5' GTCAGGTGCTGGAACACCTAGCCCCTCCCTGCCGGCTGACTTCCTCTCTCTCTTCTCACTCTATCAC
 CAGTTCCTCATGACTTCCCCCATGC **G**TGGGGCAGAAGTGGGAACAGCATGTCTCAAGGCGAGGGTTGCTTT
 GCTGGCCAGTCTGCAGGATGGAGCCTTCCAGAATGCTCTCATGATTTCCAGCTGCTGCCCGTTCTGAACC
ACAAGACCTA 3'

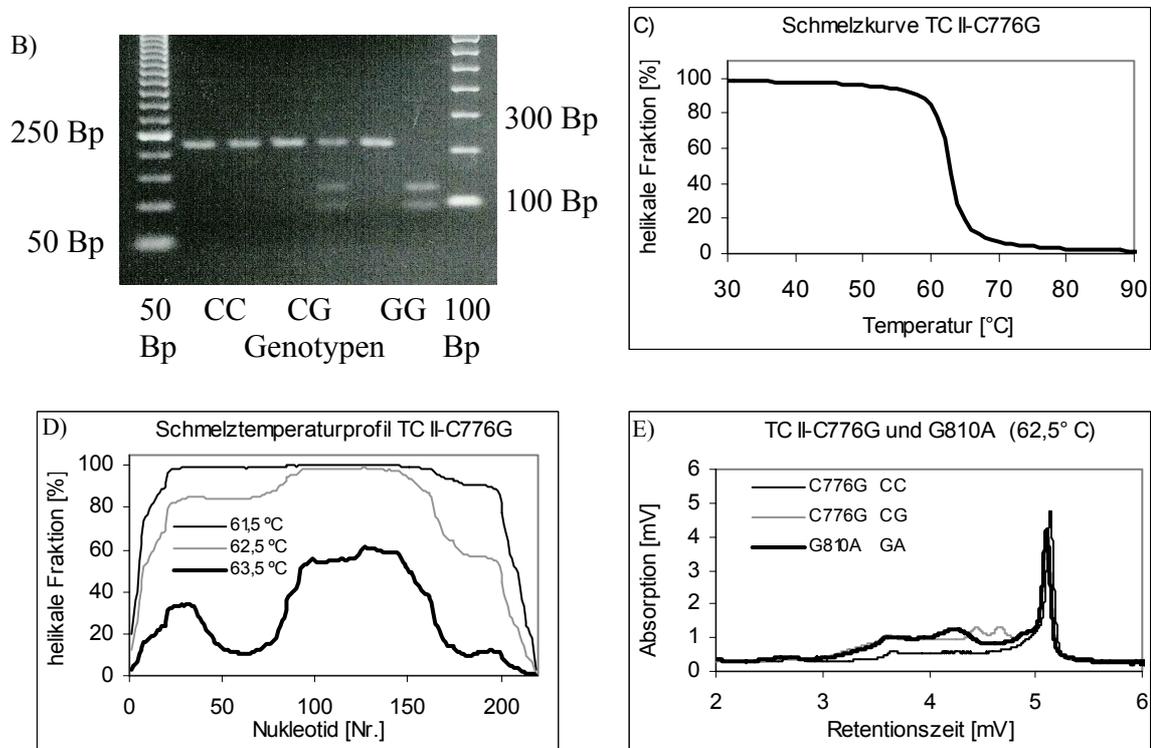


Abbildung 17: TC II-C776G-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die C>G-Transversion (Nukleotid Nr. 94 von 220) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *Mva*I, 2% Agarosegel, Laufzeit 60 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, TT (Wildtyp): 218 Bp, TC (heterozygote Mutante): 218, 128, 90 Bp, AA (homozygote Mutante): 128, 90 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 60° C in DNA-Einzelstränge. Bei 68° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-95 Bp, bei 62,5° C sind noch 82% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 96-155 Bp, bei 62,5° C sind 100% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 156-220 Bp, bei 62,5° C sind noch zwischen 60 und 100% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: C776G CC: Wildtyp, C776G CG: heterozygote Mutante, G810A: neu gefundene DNA-Sequenzvariation, heterozygote Mutante der G810A-Transition.

Die Ergebnisse der RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweise erbrachten bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbare und identische Ergebnisse.

4.4.5.8. Glutamatcarboxypeptidase II (GCP II-C1561T)

A) Amplifikatsequenz

5' CATTCTGGTAGGAATTTAGCAGTGGTCTTTGAAGAAAATAATAACAGAAAGAAATTAATTTTAAAAATCT
 ATTCCTTTTCTTATTTTTTCAGGAAACTACACTCTGAGAGTTGATTGTACACCGCTGATGTACAGCTTGGTACAC
 AACCTAACAAAAGAGGTATATAATTACATATAATTTAAGAAAACCCAAATTCTACAAATGATGTTTTCTTGAG
 GTATTATGTTAAACATAGGTGGTGTTT 3'

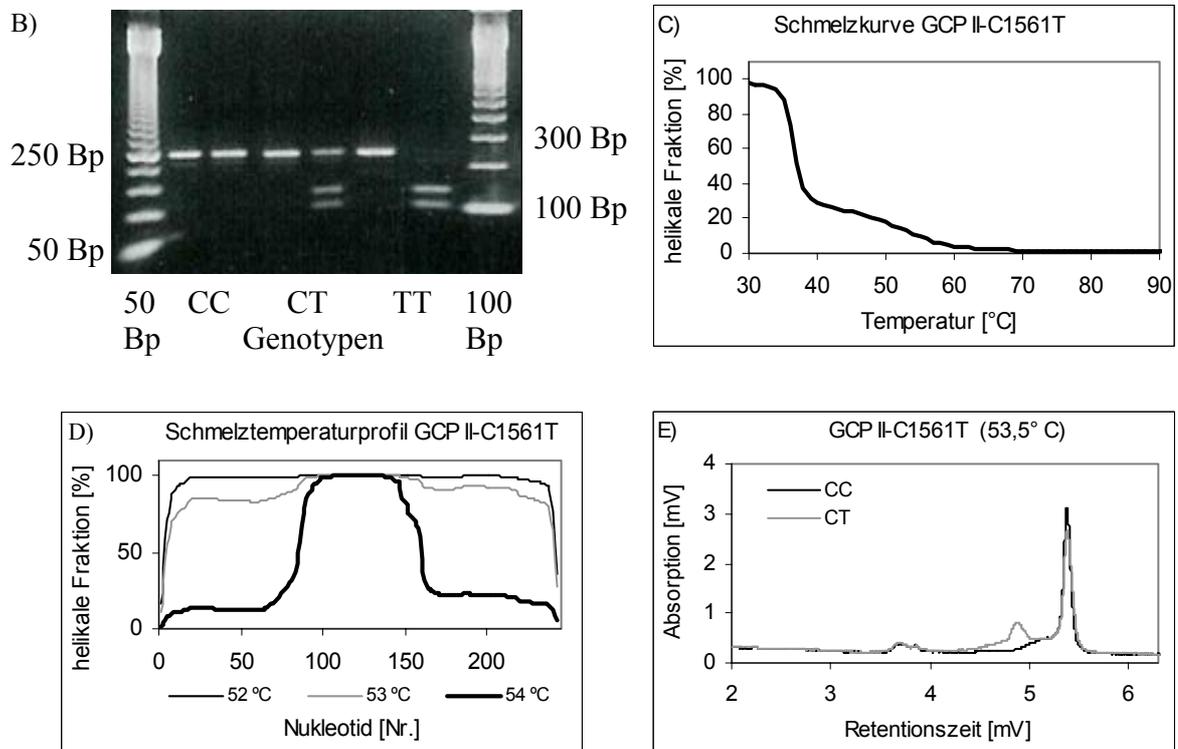


Abbildung 18: GCP II-C1561T-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die C>G-Transversion (Nukleotid Nr. 141 von 244) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *AccI*, 2% Agarosegel, Laufzeit 60 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, CC (Wildtyp): 244 Bp, CG (heterozygote Mutante): 244, 141, 103 Bp, CC (homozygote Mutante): 141, 103 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard.

C) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 35° C in DNA-Einzelstränge. Bei 60° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

D) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-90 Bp, bei 53° C sind noch 82% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 91-150 Bp, bei 53° C sind 100% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 151-244 Bp, bei 53° C sind noch 90% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

E) DHPLC-Mutationsnachweis: CC: Wildtyp, CT: heterozygote Mutante.

Die Ergebnisse der RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweise erbrachten bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbare und identische Ergebnisse.

4.4.5.9. Thymidylatsynthase (TYMS-6-Bp-Deletion)

A) Amplifikatsequenz

5' CAAATCTGAGGGAGCTGAGTAACACCATCGATCATGATGTAGAGTGTGGTTATGAACTTTAAAGTTATAG
 TTGTTTTATATGTTGCTATAATAAAGAAGTGTCTGCATTTCGTCCACGCTTTGTTTCATTCTGTACTGCCACTT
ATCTG 3'

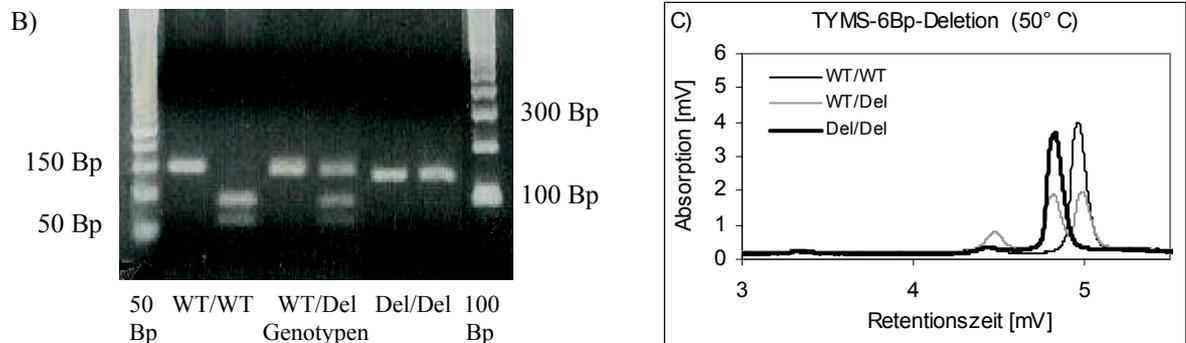


Abbildung 19: TYMS-6-Bp-Deletion.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die 6-Bp-Deletion (Nukleotid Nr. 59-64 von 148 Bp (WT), 142 Bp (homozygote Mutante)) ist schattiert.

B) RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *DraI*, 2% Agarosegel, Laufzeit 30 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, WT/WT (Wildtyp): 88, 60 Bp, WT/Del (heterozygote Mutante): 142, 88, 60 Bp, Del/Del (homozygote Mutante): 142 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard.

C) (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweis: WT/WT: Wildtyp, WT/Del: heterozygote Mutante, Del/Del: homozygote Mutante.

Beim (D)HPLC-Sizing-Nachweis der TYMS-6-Bp-Deletion zeigten die homozygoten Proben jeweils nur einen Peak (Abb.: 19C). Das PCR-Produkt von homozygoten Mutanten (Del/Del, -6Bp/-6Bp) hatte eine kürzere Retentionszeit als das PCR-Produkt von Wildtypen (WT/WT, +6Bp/+6Bp). Das PCR-Produkt von heterozygoten Mutanten (WT/Del, +6Bp/-6Bp) hatte zwei Peaks mit den Retentionszeiten der PCR-Produkte der jeweils homozygoten Probanden. Die Ergebnisse der RFLP- und (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise erbrachten bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbare und identische Ergebnisse.

4.4.5.10. Thymidylatsynthase (TYMS-28-Bp-Repeat)

A) Amplifikatsequenz

5' CGTGGCTCCTGCGTTTTCCCCCTGGCGCACGCTCTCTAGAGCGGGGGCCGCCGCGACCCCGCCGAGCAGGA
 AGAGGCGGAGCGCGGGACGGCCGCGGGAAAAGGCGCGCGGAAGGGGTCTTGCCA **CCGCGCCACTTGGCCTGCC**
TCCGTCCCGCCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTTTCGCCTGCCTCCGTCCCCCGCCCCGC
 CGCCATGCCTGTGGCCGGCTC 3'

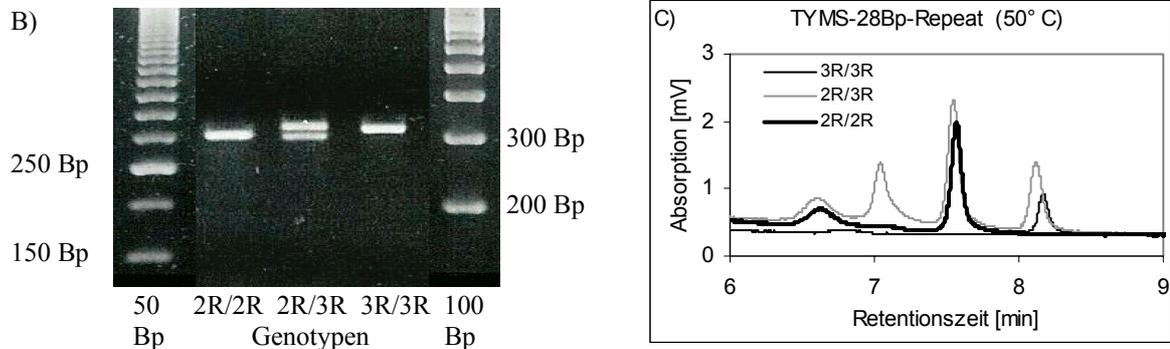


Abbildung 20: TYMS-28-Bp-Repeat (PCR nach Hishida *et al.* 2003).

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Der 28-Bp-Repeat (Nukleotid Nr. 125-208 von 238 Bp (3R-Allel (R: Repeat)) ist schattiert.

B) dAGE-Mutationsnachweis: 3% Agarosegel, Laufzeit 45 min bei 100 V konstant, Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, 2R/2R (homozygote Mutante): 210 Bp, 2R/3R (heterozygote Mutante): 210, 238 Bp, 3R/3R (Wildtyp): 238 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard.

C) (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweis: 3R/3R, 2R/3R, 2R/2R.

Der TYMS-28-Bp-Repeat konnte mittels dAGE, DHPLC, und (D)HPLC-Sizing nachgewiesen werden. Mit der DHPLC-Technik war die Genotypisierung unter nicht denaturierenden Bedingungen ((D)HPLC-Sizing bei 50° C, Abb.: 20C) und unter denaturierenden (DHPLC bei 67,5° C, Ergebnisse nicht dargestellt) möglich. Die Ergebnisse der RFLP-, DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise erbrachten bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbare und identische Ergebnisse.

4.4.5.11 und 12. Cystathionin- β -Synthase (CBS-T833C und CBS-844Ins68)

A) Amplifikatsequenz

5' CTGGCCTTGAGCCCTGAAGCCGCGCCCTCTGCAGATCATTGGGGTGGATCATCCAGGCGGGGCTTTTGCT
GGCCTTGAGCCCTGAAGCCGCGCCCTCTGCAGATCATTGGGGTGGATCCCGAAGGGTCCATCCTCGCAGAGCC
 GGAGGAGCTGAACCAGACGGAGCAGACAACCTACGAGGTGGAAGGGATCGGCTACGACTTCATCCCCACGGTG
 CTGGACAGGACGGTAGGTCGAGTCCAGAGCCCGGCC 3'

B)

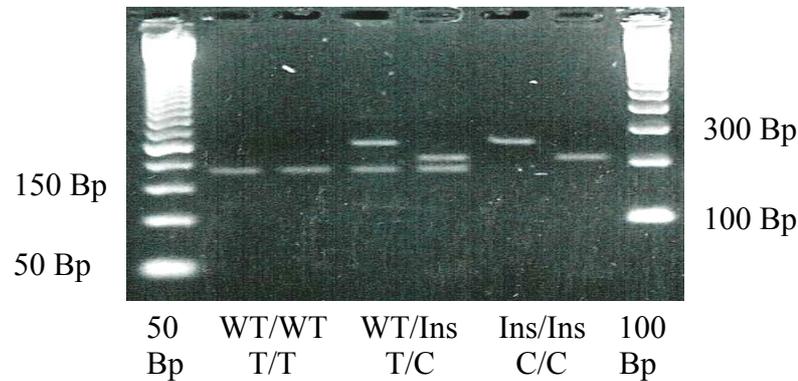


Abbildung 21: CBS-844Ins68 und CBS-T833C kombinierter dAGE- und RFLP-Mutationsnachweis.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die CBS-844Ins68 (Nukleotid Nr. 50-117 von 252 Bp (Allel mit 68-Bp-Insertion) und die CBS-T833C-Transition (Nukleotid Nr. 39 von 252 Bp) sind schattiert.

B) dAGE- und RFLP-Mutationsnachweis: Restriktionsverdau mit *Bse*NI. CBS-844-Ins-68: WT: Wildtypallel, Ins: 68-Bp-Insertionsallel. CBS-T833C: T: Wildtypallel, C: mutiertes Allel. 2% Agarosegel, Laufzeit 30 min bei 100 V konstant. Proben von links nach rechts: 50-Bp-Molekulargewichtsstandard, WT/WT + T/T: 184 Bp, WT/Ins + C/T unverdaut 252, 184 Bp, verdaut 209, 184, 43 Bp, Ins/Ins + C/C unverdaut 252 Bp, verdaut 209, 43 Bp, 100-Bp-Molekulargewichtsstandard. Das 43-Basenpaarfragment bei den verdauten Proben war aufgrund zu niedriger DNA-Konzentration nicht nachweisbar.

Die 68-Bp-Insertion und die T>C-Transition im CBS-Gen wurden in einem kombinierten dAGE/RFLP-Mutationsnachweis durchgeführt (Abb.: 21B). Die Ergebnisse dieses kombinierten Mutationsnachweises waren bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig auswertbar.

4.5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis von bekannten Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel. Die entwickelten Methoden sollen im Rahmen von epidemiologischen Studien zur Anwendung kommen. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die untersuchten Polymorphismen und die angewendeten Methoden. Für jeden Polymorphismus wird anhand der erarbeiteten Ergebnisse eine Methode für den Nachweis der Genotypen empfohlen.

Tabelle 7: Polymorphismen mit angewendeten und empfohlenen Methoden zum Mutationsnachweis.

		RFLP		DHPLC		(D)HPLC-Sizing		dAGE		identische Ergebnisse	sequenziert	empfohlene Methode
1	MTHFR-C677T	X	✓	X	✓					ja		DHPLC
2	MTHFR-A1298C	X		X	✓					nein	ja	DHPLC
3	MTHFR-G1793A	X	✓	X						nein	ja	RFLP
4	MTHFD-G1958A	X	✓	X						nein	nein	RFLP
5	MTR-A2756G	X	✓	X						nein	nein	RFLP
6	RFC I-G80A	X	✓	X	✓					ja		DHPLC
7	TC II-C776G	X	✓	X	✓					ja		DHPLC
8	GCP II-C1561T	X	✓	X	✓					ja		DHPLC
9	TYMS-6-Bp-Del	X	✓			X	✓	X	✓	ja		(D)HPLC-Siz.
10	TYMS-28-Bp-Rep			X	✓	X	✓	X	✓	ja		dAGE
11	CBS-T833C	X	✓									RFLP
12	CBS-844Ins68							X	✓			dAGE

X: Angewendete Methoden, ✓: eindeutige Ergebnisse, RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography, (D)HPLC-Sizing: DHPLC-Analyse bei 50° C, dAGE: direkte Agarosegelelektrophorese.

4.5.1. RFLP-Mutationsnachweise

Für zehn Polymorphismen wurden RFLP-Mutationsnachweise durchgeführt. Nach der Anpassung der Methoden konnten neun Polymorphismen eindeutig mittels RFLP bestimmt werden (Tab.: 7). Die Probleme beim Nachweis der MTHFR-A1298C-Transversion sind wahrscheinlich auf den Restriktionsverdau mit *MboII* zurückzuführen. Beim Wildtypallel (A-Allel) enthält die amplifizierte DNA-Sequenz fünf *MboII*-Erkennungssequenzen, im C-Allel sind vier *MboII*-Erkennungssequenzen vorhanden (Abb.: 22A) (van der Put *et al.* 1998). Neben der MTHFR-A1298C-Transversion (rs1801131) befindet sich in dem Amplifikat noch ein zweiter Polymorphismus (MTHFR-T1317C-Transition (rs4846051)), der sich auf eine *MboII*-Erkennungssequenz auswirkt (Abb.: 22A). Bei der A1298C-Transversion wird durch den Basenaustausch eine Schnittstelle entfernt, bei der T1317C-Transition wird eine Schnittstelle eingefügt. Die nach dem Restriktionsverdau der 1298A/1317T-, 1298A/1317C-, 1298C/1317T- und 1298C/1317C-Allele theoretisch möglichen DNA-Fragmente, sind mittels Agarosegelelektrophorese nicht zu

differenzieren, weil DNA-Fragmentgrößenunterschiede von nur einem Basenpaar agarosegelelektrophoretisch nicht nachweisbar sind (Tab.: 8).

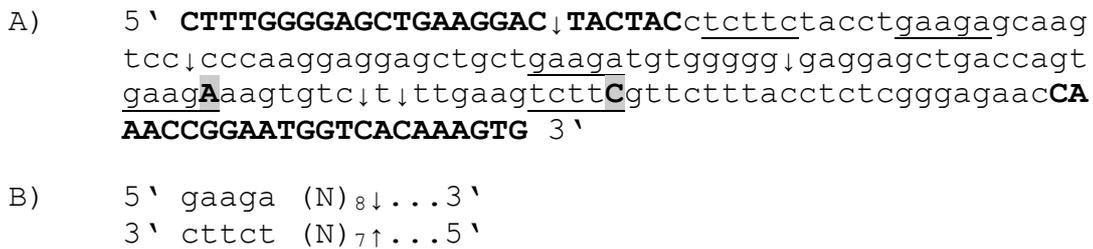


Abbildung 22: *MboII*-Erkennungssequenzen und Restriktionsschnittstellen im Amplifikat für den Mutationsnachweis der MTHFR-A1298C-Transversion (PCR nach van der Put *et al.* 1998).

A) Amplifikatsequenz mit *MboII*-Erkennungssequenzen und Restriktionsschnittstellen. **A**: A1298C-Transversion (rs1801131), **C**: T1317C-Transition (rs4846051). Unterstrichen: *MboII*-Erkennungssequenz, 5'>3' gaaga, 3'>5' ctct, ↓: *MboII*-Restriktionsschnittstelle. Fette Grossbuchstaben: Forward- und Reverseprimer.

B) *MboII*-Erkennungssequenz und Restriktionsschnittstelle nach Angaben des Herstellers.

Die Restriktionsschnittstelle liegt außerhalb der Erkennungssequenz. In 5'>3'-Ausrichtung liegt sie acht Nukleotide außerhalb, in 3'>5'-Ausrichtung liegt sie sieben Nukleotide außerhalb der Erkennungssequenz. N: Platzhalter für C, G, T oder A.

Durch die von der T1317C-Transition eingeführte *MboII*-Schnittstelle wird die A1298C-Transversion maskiert, wodurch der Polymorphismus im 1298A/1317C- und im 1298C/1317C-Allel nicht zweifelsfrei erkannt wird. Das liegt daran, dass das Bandenmuster keine Rückschlüsse darüber erlaubt, aufgrund welcher der beiden Polymorphismen das Amplifikat geschnitten wurde (Tab.: 8).

Tabelle 8: DNA-Fragmente nach Verdau des MTHFR-A1298C-Amplifikates mit *MboII* (PCR nach van Put *et al.* 1998).

	MTHFR-A1298C	MTHFR-T1306C	DNA-Fragmente	NCBI
Allele	A (+)	T (-)	56, 30, 30, 28, 19	✓
	A (+)	C (+)	56, 30, 30, 27, 19, 1	✓
	C (-)	T (-)	84, 30, 30, 19	✓
	C (-)	C (+)	57, 30, 30, 27, 19	negativ

(+): *MboII*-Erkennungssequenz vorhanden, (-): *MboII*-Erkennungssequenz nicht vorhanden, ✓: Allel in der NCBI-Datenbank gefunden, neg: Allel nicht in der NCBI-Datenbank gefunden. A: Adenin, C: Cytosin, T: Thymin.

Die abgebildeten Bandenmuster der Proben C und E (Abb.: 10B) weisen darauf hin, dass der Restriktionsverdau durch die zwei nur ein Nukleotid auseinander liegenden *MboII*-Schnittstellen behindert wurde. Das Bandenmuster der Probe C lässt zusätzlich die Vermutung zu, dass es durch einen Überschuss an Restriktionsenzym und eine zu lange Inkubation der Proben zu unspezifischen Restriktionsreaktionen (Star-Aktivität) gekommen war. *MboII*-Star-Aktivität wird vom Hersteller des Restriktionsenzym für Inkubationszeiten ab einer Stunde beschrieben. Zum vollständigen Verdau der DNA musste das PCR-Produkt 6 ½ Stunden verdaut werden, weswegen Star-Aktivität als

Ursache für den diskutierten unspezifischen Restriktionsverdau nicht ausgeschlossen werden kann. Versuche, den Restriktionsverdau durch Anwendung des Restriktionsenzym *Eam1104I* zu optimieren, erbrachten keine besser auswertbaren Ergebnisse. Die elektrophoretische Auftrennung des verdauten Amplifikates mittels Agarosegelelektrophorese ist nicht die ideale Methode für die Differenzierung von DNA-Fragmenten, die kleiner als 50 Basenpaare sind. Die von van der Put *et al.* (van der Put *et al.* 1998) beschriebene Originalmethode benutzt zur Auftrennung der verdauten Amplifikate eine Polyacrylamidgelelektrophorese, was sicherlich zu gut auswertbaren DNA-Banden führt. Dennoch haben van der Put und Blom (van der Put und Blom 2000) eine optimierte RFLP-Methode zum Nachweis des MTHFR-C1298T-Transition veröffentlicht. In dieser Methode wird ein anderes Primerpaar benutzt. Daraus resultiert ein PCR-Produkt, das nur eine *MboII*-Schnittstelle enthält, womit das Problem des unsauberen Restriktionsverdaus wahrscheinlich gelöst ist. Bei dieser Methode liegt der Forwardprimer allerdings über der MTHFR-T1309C-Transition, die eine Heterozygotenfrequenz von 0,2 hat (NCBI). Deswegen war zu erwarten, dass die Genotypisierung auch mit dieser Methode nicht problemlos durchzuführen gewesen wäre.

4.5.2. dAGE-Mutationsnachweise

Die TYMS-6-Bp-Deletion, der TYMS-28Bp-Repeat und die CBS-844Ins68-Insertion konnten eindeutig mittels PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese bestimmt werden. Die Genotypisierung mittels direkter Agarosegelelektrophorese war für alle drei Polymorphismen effizient und zuverlässig. Der Nachweis der TYMS-6-Bp-Deletion mittels dAGE erforderte allerdings die Auftrennung des PCR-Produktes mit einer hochauflösenden Spezialagarose.

Bei der PCR für den Nachweis von Insertionen, Deletionen und Tandem-Repeats kann es bei heterozygoten Probanden zur bevorzugten Amplifizierung eines Allels kommen. Dieses Phänomen ist bekannt. Es wurde von Kaiser *et al.* (Kaiser *et al.* 2002) systematisch untersucht, wobei festgestellt wurde, dass die Verwendung eines Polymerasegemisches aus *Taq*- und *Pwo*-Polymerasen oder der Einsatz von 7-deaza-dGTP die bevorzugte Amplifikation unterdrückt. Beim Nachweis des TYMS-28-Bp-Repeats wird die bevorzugte Amplifizierung des 2R-Allels durch die Zugabe von 10% Glycerin (Hishida *et al.* 2003) oder DMSO (Horie *et al.* 1995, Luo *et al.* 2002, Ulrich *et al.* 2002) verhindert. In der vorliegenden Studie wurde gefunden, dass 8% DMSO zur Unterdrückung der bevorzugten Amplifizierung des 2R-Allels ausreichen. Für die PCR der TYMS-6-Bp-Deletion und der

CBS-844Ins68-Insertion wurde in wiederholten Analysen von heterozygoten Probanden keine bevorzugte Amplifizierung eines Allels beobachtet.

4.5.3. DHPLC-Mutationsnachweise

Für acht Polymorphismen wurden DHPLC-Protokolle entwickelt (Tab.: 7). Bei vier Polymorphismen (MTHFR-C677T, RFC I-G80A, TC II-C776G, GCP II-C1561T) konnten die Genotypen bei allen 37 untersuchten Probanden eindeutig mittels DHPLC bestimmt werden. Bei drei Polymorphismen, (MTHFR-G1793A, MTHFD-G1958A, MTR-A2756G) waren die Genotypen bei den untersuchten Probanden nicht eindeutig mittels DHPLC zu bestimmen.

Die MTHFR-G1793A-Transition konnte bei drei Probanden nicht mittels DHPLC bestimmt werden. Die Probanden hatten zusätzliche Sequenzvariationen innerhalb der DNA-Sequenz des benutzten Amplifikates (C^2 , C^3 in Abb.: 23). Die resultierenden Chromatogramme der Probanden entsprachen deswegen keinem der beiden Referenzchromatogramme. Wird bei einer DHPLC-Mutationsanalyse ein Chromatogramm erhalten, das keinem der beiden Referenzchromatogramme entspricht, kann der Genotyp des Probanden mittels DHPLC nicht ermittelt werden. In solchen Fällen zeigt die DHPLC die Anwesenheit eines zusätzlichen Polymorphismus innerhalb der untersuchten DNA-Sequenz an. Zum Nachweis von Mutationen ist die DHPLC deswegen nur dann optimal einsetzbar, wenn ein Amplifikat entwickelt werden kann, in dem nur die zu bestimmende Sequenzvariation enthalten ist. Bei sehr polymorphen DNA-Sequenzen kann dieses Ziel nicht immer erreicht werden.

Die Homo- und Heteroduplexchromatogramme der MTHFR-G1793A-Transition entsprachen nicht den theoretisch erwarteten Chromatogrammen. Zur Aufklärung der Ursache für die erhaltenen Chromatogramme wurde die DNA-Sequenz des PCR-Produktes betrachtet. Zwei DNA-Sequenzvariationen waren bereits bei der Sequenzierung des PCR-Produktes gefunden worden (G^1 , C^2 in Abb.: 23). In den Datenbanken des NCBI, des University of California at Santa Cruz Genome Bioinformatics Genome Bioinformatics (UCSC Genome Bioinformatics) und von MutationDiscovery sind zusammen vier weitere Sequenzvariationen innerhalb dieser DNA-Sequenz beschrieben (C^1 , C^3 , C^4 und G^2 in Abb.: 23). Drei von diesen vier Sequenzvariationen (C^1 , C^3 , G^2) konnten in dieser Studie nachgewiesen werden. Die C2024N-Substitution (C^4) wurde nicht nachgewiesen.

5' **GTTCTATTCCGGGAAATGTCCT**GTTGAGCAGAGCCCTTGGAGAGCCCTGTTAATCTT
 GCCT**C¹**TGTGTGTGTGTGCATGTGT**GCG¹**TGTGTGCGGGGTATGTGTGTGTAGgacgagg
 c**C²**tttgccctgtggattgagc**G²**gtgggaaagctgtatgaggaggagtccccgtcccg
 accatcatccagtacatccacgacaactacttcttggtcaacctggtggacaatgacttc
 ccaactggacaactgcctctggcaggtggtggaagacacattggagcttctcaacaggccc
 acccagaatgagagagaaa**C³**ggaggctccatgaccctgcgctcctgacgccc**cctgcgttgga**
gccactcctgtccC⁴gccttctcctccacagtgtgtgcttctcttgg**ggaactccactctcc**
ttcgtg 3'

Abbildung 23: Amplifikatsequenz für den Nachweis der MTHFR-G1793A-Transition nach der Methode von Rady *et al.* (Rady *et al.* 2002).

Intronische DNA-Sequenzen sind in Großbuchstaben, exonische in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Primer für die PCR der DHPLC-Analysen sind schattiert, die Primer für die DNA-Sequenzierung sind fett dargestellt. C¹: C>G-Transversion (rs3818762), G¹: A>G-Transition, C²: C1773T-Transition (rs2274976), C³: C1970T-Transition, C⁴: C2024N-Substitution (N: Platzhalter für Adenosin, Cytosin, Guanin, Thymin). G¹ und C² sind die bei der Sequenzierung gefundenen, bis jetzt unbekannt Sequenzvariationen. C³ und C⁴ sind nur in der Datenbank von MutationDiscovery angegeben. (NCBI-Sequenz-ID: NM_005957.2).

Die Allelfrequenz des G-Allels der rs3818762-C>G-Transversion (C¹) ist mit 0,195 angegeben (NCBI). Die Allelfrequenzen der A>G-Transition (G¹) sind unbekannt. Beide DNA-Sequenzvariationen liegen unter dem Forwardprimer (Abb.: 23). Auch unter dem Reverseprimer liegt eine DNA-Sequenzvariation (C2024N-Substitution (C⁴)). Die Allelfrequenzen dieser DNA-Sequenzvariation sind auch unbekannt. Im ungünstigsten Fall, hat ein Allel drei nicht mit den Primern übereinstimmende Nukleotide. Es würde gar nicht oder nur sehr schwach amplifiziert werden. Ein Einfluss dieser drei DNA-Sequenzvariationen auf das Ergebnis der PCR kann deswegen nicht ausgeschlossen werden. Bei den DHPLC-Analysen war der GG-Homoduplexpeak (Peak mit der längsten Retentionszeit (5,83 min)) bei den Heteroduplexchromatogrammen nur als rechtsseitige Schulter zu erkennen (Abb.: 11E). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das G-Allel der MTHFR-G1793A-Transition bei heterozygoten MTHFR-G1793A-Probanden (GA) schwächer amplifiziert wurde als bei Wildtypprobanden (GG). Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Amplifizierung des G-Allels durch die unter den Primern liegenden Sequenzvariationen (C¹, G¹, C⁴) behindert wird. Diese Hypothese wird durch den Nachweis der C¹- und der G¹-Sequenzvariationen im MTHFR-G1793A-G-Allel unterstützt. Die sichere Ermittlung von Probandengenotypen für die MTHFR-G1793A-Transition ist mit dem PCR-Produkt nach Rady (Rady *et al.* 2002) nicht zu gewährleisten. Um die Genotypisierung der Transition zuverlässig und zweifelsfrei durchführen zu können, wird eine PCR mit neu entwickelten Primern benötigt. Bei der Entwicklung dieser PCR muss darauf geachtet werden, dass keine DNA-Sequenzvariationen unter den Primern und innerhalb des PCR-Produktes liegen. Hierfür müssen potentielle Primersequenzen und

die resultierenden PCR-Produkt-Sequenzen mit Datenbanksequenzen (NCBI, UCSC, MutationDiscovery) verglichen werden.

Die MTHFD-G1958A-Transition konnte mittels DHPLC nicht nachgewiesen werden. Das verwendete Amplifikat hat drei Schmelztemperaturbereiche (Abb.: 11D). Der Bereich bis zum 100. Basenpaar beginnt bei 59° C zu schmelzen. Bei 61° C liegen mehr als 80% der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereiches als DNA-Einzelstrang vor. Der DNA-Bereich zwischen dem 101. und dem 270. Basenpaar beginnt bei 58° C zu schmelzen. Bei 61° C sind von diesem DNA-Bereich keine doppelsträngigen DNA-Moleküle mehr vorhanden. Der DNA-Bereich vom 271. Basenpaar bis zum 5'-terminalen Ende des Amplifikates schmilzt erst ab 61° C vollständig in DNA-Einzelstränge. Bei 61° C liegt dieser DNA-Bereich noch bei mehr als 90% der DNA-Moleküle als DNA-Doppelstrang vor. Bei 63°, 64° und 65° C liegen jeweils 85, 75 und 50 % der DNA-Moleküle dieses DNA-Bereiches als DNA-Einzelstrang vor. Die hohe Schmelztemperatur wird durch den GC-Gehalt von 78% zwischen dem 273. und dem 300. Basenpaar verursacht. Die Guanin zu Adenosin Transition betrifft das 72. Basenpaar des Amplifikates. Der DNA-Bereich um das 72. Basenpaar beginnt bei einer DHPLC-Analysetemperatur von 60° C in DNA-Einzelstränge zu schmelzen. Die DNA-Homoduplexe in der Probe verbleiben bei 60° C noch vollständig in der Doppelhelixformation. Deswegen wird die Guanin zu Adenosin Transition mittels DHPLC theoretisch am sichersten bei dieser Analysetemperatur erkannt. Diese Theorie wird durch die linksseitige Schulter im Chromatogramm der heterozygoten Probe in Abbildung 11E unterstützt. In wiederholten Analysen von heterozygoten Probanden erlaubte diese Schulter allerdings keine eindeutige Genotypisierung, weil sie nicht immer erkannt wurde. Der Grund für diese Schwierigkeiten ist wahrscheinlich der beschriebene Hochtemperaturschmelzbereich. Bedingt durch diesen DNA-Bereich beginnen die DNA-Moleküle des Amplifikates erst ab einer Schmelztemperatur von circa 62° C vollständig in ihre DNA-Einzelstränge zu schmelzen. Bei 62,7° C liegen nur etwa 10% der DNA-Moleküle als DNA-Einzelstrang vor. Das ideale Verhältnis zwischen vollständig einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA (25 zu 75%) wird erst bei einer Analysetemperatur von 64° C erreicht. Der DNA-Bereich, in dem sich die MTHFR-G1958A-Transition befindetet, liegt bei dieser Temperatur schon bei allen DNA-Molekülen einzelsträngig vor. Deswegen hat der Polymorphismus wahrscheinlich keinen Einfluss auf das Schmelzverhalten des Gesamtamplifikates, wodurch die Homo- und Heteroduplexe bei derselben Schmelztemperatur vollständig in ihre DNA-Einzelstränge zu schmelzen beginnen. Nach dieser Hypothese gibt es keine Analysetemperatur, bei der die

Heteroduplexe schon als DNA-Einzelstränge vorliegen, die Homoduplexe aber noch als DNA-Doppelstrang. Dementsprechend haben Homo- und Heteroduplexe theoretisch identische Retentionszeiten, wodurch der DHPLC-Nachweis unmöglich wird. Da die RFLP-Analysen zufrieden stellende Ergebnisse erbrachten, wurde darauf verzichtet, eine DHPLC-Methode für diesen Polymorphismus zu etablieren.

Für die MTR-A2756G-Transition wurden die DHPLC-Analysen an zwei unterschiedlichen PCR-Produkten durchgeführt. Mit beiden PCR-Produkten war kein Nachweis der Genotypen mittels DHPLC möglich. Die Schmelzkurve und das Schmelztemperaturprofil (Abb.: 15C und D) der beiden untersuchten Amplifikate können nicht erklären warum die DHPLC-Analysen keine eindeutigen Ergebnisse erbracht haben. Das PCR-Produkt hat einen Bereich, in dem die Schmelztemperatur deutlich erhöht ist. Die MTR-A2756G-Transition liegt bei beiden untersuchten Amplifikaten innerhalb dieses Bereiches. Es ist möglich, dass es bei diesem PCR-Produkt nur einen kleinen Temperaturbereich gibt, in dem die DNA-Heteroduplexe schon schmelzen, die DNA-Homoduplexe aber noch in der Doppelhelixstruktur vorliegen. Da in dieser Arbeit der Temperaturbereich von -5 bis $+5^{\circ}$ C um die errechnete ideale DHPLC-Analysetemperatur in $0,5^{\circ}$ C Schritten überprüft wurde, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass die ideale DHPLC-Analysetemperatur in den Experimenten übersehen worden ist. Bei einer heterozygoten Probe wurde einmal ein typisches Heteroduplexchromatogramm mit zwei kleinen Vorpeaks erkannt (Abb.: 15E). Dieses Chromatogramm konnte allerdings nicht reproduziert werden. Wahrscheinlich schmelzen bei den beiden verwendeten Amplifikaten die Homo- und Heteroduplexe bei fast derselben Temperatur, wodurch eine DHPLC-Analyse verhindert wird. Zum Nachweis dieses Polymorphismus mittels DHPLC ist es notwendig eine PCR zu etablieren die ein Amplifikat mit einem geeigneten Schmelztemperaturprofil generiert. Die Überprüfung potentieller Amplifikate auf ihre Einsetzbarkeit kann mit der WavemakerTM Software durchgeführt werden. Auf die Etablierung einer DHPLC-Methode wurde in dieser Arbeit verzichtet, weil die Ergebnisse der RFLP-Analysen zufrieden stellende Ergebnisse erbrachten.

4.5.4. (D)HPLC-Sizing Mutationsnachweise

Der TYMS-28-Bp-Repeat und die TYMS-6-Bp-Deletion wurden mittels (D)HPLC-Sizing bestimmt. Um die Chromatographiesäule so gering wie möglich zu belasten, wurde versucht die PCR für das TYMS-Exon-1 ohne DMSO durchzuführen. Dabei kam es bei heterozygoten Probanden (2R/3R) aber zur bevorzugten Amplifikation des 2R-Allels

(Abb.: 24), weswegen nicht auf die Zugabe von DMSO verzichtet werden konnte. Nach Angaben des Herstellers beschädigen DMSO-Konzentrationen bis 10% die Chromatographiesäule nicht. Die für diese Arbeiten benutzte Chromatographiesäule erreichte eine hohe Injektionszahl (>6000) bei gleich bleibend guter Qualität der DNA-Sequenzanalysen. Daraus lässt sich schließen, dass die Zugabe von 8% DMSO keine erhöhte Belastung der Chromatographiesäule darstellte.

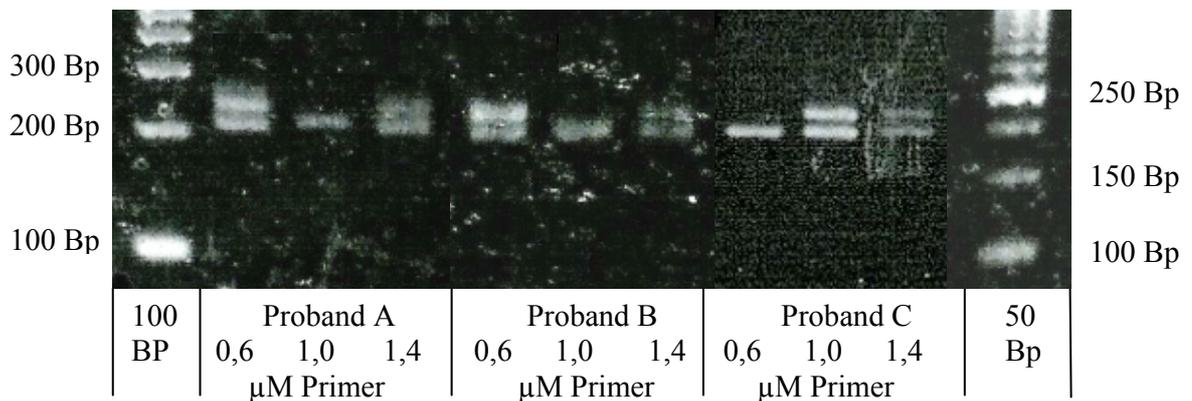


Abbildung 24: Gelelektrophoretischer Mutationsnachweis des TYMS-28-Bp-Repeats.

Es sind drei heterozygote Probanden (3R/2R) dargestellt (A, B, C). Die PCR wurde ohne Zugabe von DMSO durchgeführt. Bei allen drei Probanden sind abhängig von der Primerkonzentration unterschiedliche Ergebnisse zu erkennen. Heterozygote Mutanten wurden falsch als 3R/3R-Probanden bestimmt. 100-Bp-Molekulargewichtsstandard, 2R/2R (homozygote Mutante): 210 Bp, 2R/3R (heterozygote Mutante): 210, 238 Bp, 3R/3R (Wildtyp): 238 Bp, 50-Bp-Molekulargewichtsstandard.

Die entwickelte (D)HPLC-Sizing-Methode zum Nachweis des TYMS-28-Bp-Repeats erlaubte die zuverlässige Genotypisierung der 37 untersuchten Probanden. Auch die TYMS-6-Bp-Deletion wurde mittels (D)HPLC-Sizing eindeutig und zuverlässig erkannt. Die beiden Methoden zeichnen sich durch ihre einfache und zeitsparende Probenvorbereitung und ihre gute Automatisierbarkeit aus. Des Weiteren fallen die beiden Methoden positiv durch ihren geringen Probenbedarf auf.

4.5.5. Bewertung der RFLP-, dAGE-, DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Methoden

Keine der vier angewendeten Methoden zum Nachweis von DNA-Sequenzvariationen konnte für alle zwölf untersuchten Polymorphismen benutzt werden. Mittels RFLP konnten acht Polymorphismen eindeutig bestimmt werden. Dieses positive Ergebnis ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen:

1. Zur ersten Bestimmung der zwölf untersuchten Polymorphismen wurde in der Fachliteratur gezielt nach RFLP-Methoden gesucht.

2. RFLP war eine der ersten Methoden die zur Bestimmung von DNA-Sequenzvariationen benutzt wurde. Sie ist dementsprechend ausgereift und weit verbreitet in der Anwendung (Drabek 2001).
3. Durch die Isolierung und Clonierung neuer Restriktionsenzyme ist die Anwendbarkeit der Methode stark gestiegen.
4. Es wird keine Spezialausrüstung benötigt, wodurch der Nachweis der DNA-Sequenzvariation nicht durch unabsehbare Geräteeigenschaften beeinflusst wird und in jedem molekularbiologischen bzw. biochemischen Labor durchgeführt werden kann.
5. Die Übernahme von RFLP-Methoden aus der Fachliteratur ist unkompliziert durchführbar.

Von den neun aus der Fachliteratur entnommenen Methoden konnten nach einer Methodenanpassung, acht Methoden etabliert werden. Das die Etablierung der RFLP-Methode zum Nachweis des MTHFR-A1298C nicht funktioniert hat, ist auf die diskutierten Schwachpunkte bei dem verwendeten Versuchsprotokoll und nicht auf das Prinzip der RFLP-Methode zurückzuführen. Für den Nachweis von bekannten DNA-Sequenzvariationen bei Einzeluntersuchungen und in kleinen Probandenkollektiven ist die RFLP-Methode die beste Methode, unter den in dieser Arbeit angewendeten vier Methoden.

Mit der DHPLC-Methode konnten sechs der zwölf untersuchten Polymorphismen nachgewiesen werden. Für drei Polymorphismen wurde keine DHPLC-Methodenentwicklung durchgeführt. Sie wurden entweder zusammen mit einem zweiten Polymorphismus gelelektrophoretisch nachgewiesen (CBS-T833C, CBS-844Ins68) oder wenigstens eine der drei anderen Methoden lieferte schon zufrieden stellende Ergebnisse (TYMS-6-Bp-Deletion). Für drei Polymorphismen konnten keine DHPLC-Analysen durchgeführt werden. Dafür gab es folgende Gründe: Zum einen gab es mehr als eine DNA-Sequenzvariation im Amplifikat, zum anderen wurde keine Analysetemperatur gefunden, bei der Unterschiede zwischen den Chromatogrammen von Wildtypen bzw. homozygoten Mutanten und heterozygoten Mutanten erkennbar und reproduzierbar waren. Für die sechs Polymorphismen die mittels DHPLC nachweisbar waren, erforderte die DHPLC den geringsten Arbeitssaufwand und Probenbedarf.

Für den schnellen und zuverlässigen Nachweis von Insertionen, Deletionen und DNA-Sequenz-Wiederholungen in Einzeluntersuchungen und in kleinen Probandengruppen ist die (D)HPLC-Sizing-Methode die Beste unter den angewendeten Methoden. Die Methode besticht durch die einfache Probenaufarbeitung, den geringen Probenbedarf und die hohe Sensitivität. Die dAGE erforderte für den Mutationsnachweis der Mutationen die

arbeitsaufwändigere gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Ein weiterer Nachteil der dAGE gegenüber der (D)HPLC-Sizing ist die geringere Sensitivität. Proben, die mittels dAGE nicht sicher zu Genotypisieren waren (weil die DNA-Banden im Agarosegel sehr schwach waren), konnten mittels (D)HPLC-Sizing eindeutig bestimmt werden. Das lag daran, dass die DNA-Nachweisgrenze bei der (D)HPLC-Sizing Methode niedriger ist, als bei der dAGE. Deswegen konnten mittels (D)HPLC-Sizing auch niedrig konzentrierte PCR-Produkte problemlos genotypisiert werden.

Am arbeitsintensivsten war die Probenaufarbeitung für die RFLP-Methoden. Am wenigsten Arbeitsaufwand wurde für die Probenaufarbeitung der (D)HPLC-Sizing-Analysen benötigt. DHPLC- und dAGE-Analysen erfordern in etwa einen gleich hohen Arbeitsaufwand für die Probenvorbereitung.

Eine abschließende Bewertung der Methoden ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Bewertung der durchgeführten Methoden.

	Methode			
	RFLP	dAGE	DHPLC	(D)HPLC-Sizing
Probenaufarbeitung	---	++	++	+++
Automatisierbarkeit	---	--	+++	+++
Probendurchsatz	---	+/-	+/-	--
Anwendungsspektrum	+	-	+++	-
Probenbedarf	--	-	+	++
Auswertung	++	++	-	++
Anschaffungskosten	++	+++	--	--

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, dAGE: direkte Agarosegelelektrophorese, DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography, (D)HPLC: Variante der DHPLC, +: positiv, -: negativ

In dieser Arbeit wurde die DHPLC-Technologie vor allem wegen der folgenden Vorteile gegenüber den RFLP- und dAGE-Methoden angewendet:

1. wegen ihrer zeitsparenden Probenvorbereitung,
2. der automatischen Abarbeitung der Proben,
3. der hohen Sensitivität,
4. dem geringen Probenbedarf.

Der geringe Probenbedarf ermöglichte die Wiederholung von problematischen Analysen mit dem Probenmaterial derselben PCR. Dadurch konnten Geräte- oder Bedienungsfehler ausgeschlossen werden, bevor eine neue Probenaufarbeitung durchgeführt wurde. Neben den dargestellten positiven Merkmalen hat die DHPLC-Technologie aber auch einige nicht zu unterschätzende Nachteile wie zum Beispiel:

1. die schwierige und dadurch zeitaufwändige Auswertung der Chromatogramme,
2. die langsame, lineare Abarbeitung der vorbereiteten Proben von der DHPLC-Anlage,
3. die Unverträglichkeit der Säulenmatrix mit einigen Chemikalien,
4. die hohen Anschaffungskosten.

5. Kapitel 2

Epidemiologische Untersuchungen zum Einfluss der Transcobalamin II-C776G-Transversion (TC II-C776G) und der Reduced Folate Carrier I-G80A-Transition (RFC I-G80A) auf Homocystein.

5.1. Einleitung

Eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Folaten und Cobalamin (Vitamin B₁₂) ist die Voraussetzung für die Bereitstellung von Methylgruppen für die Desoxythymidinmonophosphat- (dTMP) und Methioninsynthese sowie für alle Methylierungen die im Homocysteinkreislauf mit Hilfe des Methylgruppendonators S-Adenosylmethionin (SAM) durchgeführt werden (Antony 1992, Nguyen *et al.* 1997, Stover 2004). Bei unzureichender Versorgung der Zellen mit Folaten kommt es zum Zusammenbruch des Methylierungskreislaufes und der DNA-Synthese. Des Weiteren führt ein Folatmangel zu Störungen bei der Erythropoese, wodurch es zu einer Megaloblastie und in der Folge zum vorzeitigen Absterben von Zellen kommen kann (Herbert 1962, Herbert 1964, Antony 1992). Weitere Symptome des Folatmangels sind Schleimhautveränderungen im Bereich der Mundhöhle, gastrointestinale Störungen (Diarrhö), Wachstumsstörungen, eine verminderte Antikörperbildung, Fortpflanzungsstörungen, das Auftreten von Fehlbildungen, und in seltenen Fällen Neuropathien (Pietrzik 1985, Bässler *et al.* 1997, Koletzko und Pietrzik 2004).

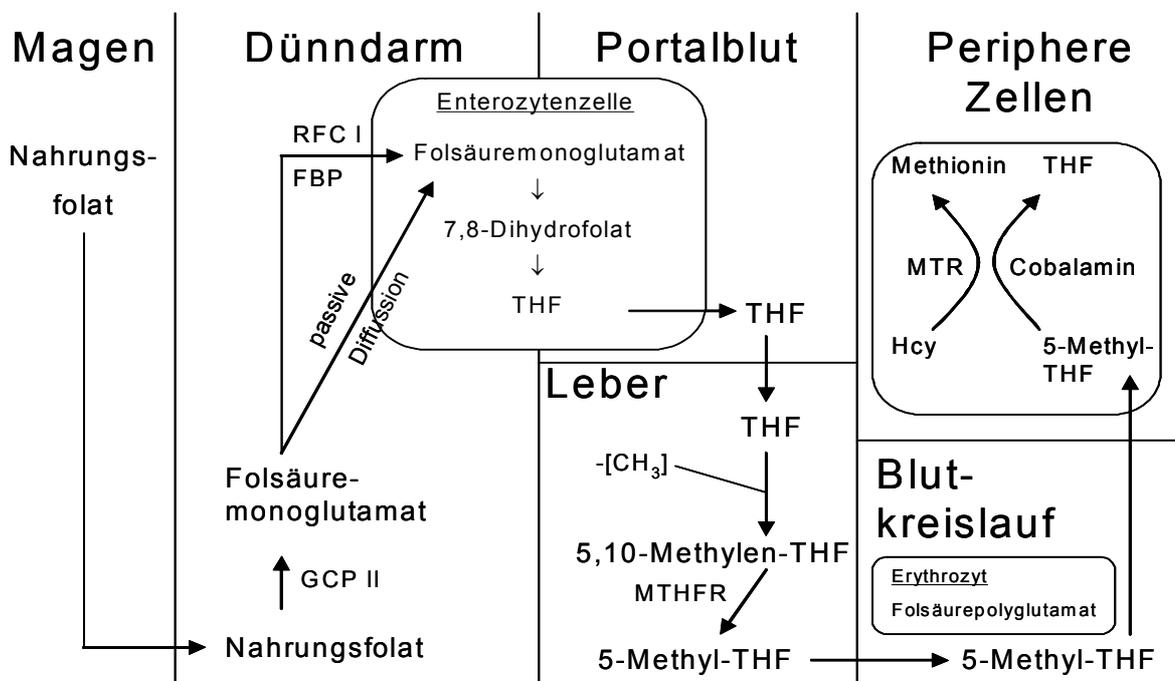


Abbildung 25: Vereinfachte Darstellung der Aufnahme und des Stoffwechsels von Folsäure und Folaten. GCP II: Glutamatcarboxypeptidase II, RFC I: Reduced Folate Carrier I, FBP: Folate Binding Protein, MTHFR: Methylentetrahydrofolatreduktase, THF: Tetrahydrofolat, Hcy: Homocystein.

In der Nahrung liegen Folate hauptsächlich als Polyglutamate vor. Diese müssen zunächst von der Carboxypeptidase II zu Folsäuremonoglutamat hydrolysiert werden (Abb.: 25). Die Resorption von Folsäuremonoglutamat erfolgt beim Menschen in den Enterozyten. Sie wird über den Reduced Folate Carrier I (RFC I) und das Folate Binding Protein (FBP) vermittelt. Neben diesen beiden proteinabhängigen Resorptionsmechanismen werden Folate auch zu 20-30% über passive Diffusion von den Enterozyten aufgenommen (Antony 1992, Stover 2004). Nach der Resorption werden die Folate zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF) reduziert, zur Leber transportiert und dort zur aktiven Form, 5,10-Methylen tetrahydrofolat (5,10-Methylen-THF) methyliert.

Der Mensch nimmt Cobalamin, das von ihm nicht selbst synthetisiert werden kann, mit der Nahrung in proteingebundener Form auf. Im sauren Milieu des Magens wird es aus der Proteinbindung gelöst und an Haptocorrin (HC) (synonyme Bezeichnungen: R-Binder, Transcobalamin I + TC III) gebunden (Abb.: 26). An Haptocorrin gebundenes Cobalamin wird als Holo-Haptocorrin (Holo-HC) bezeichnet.

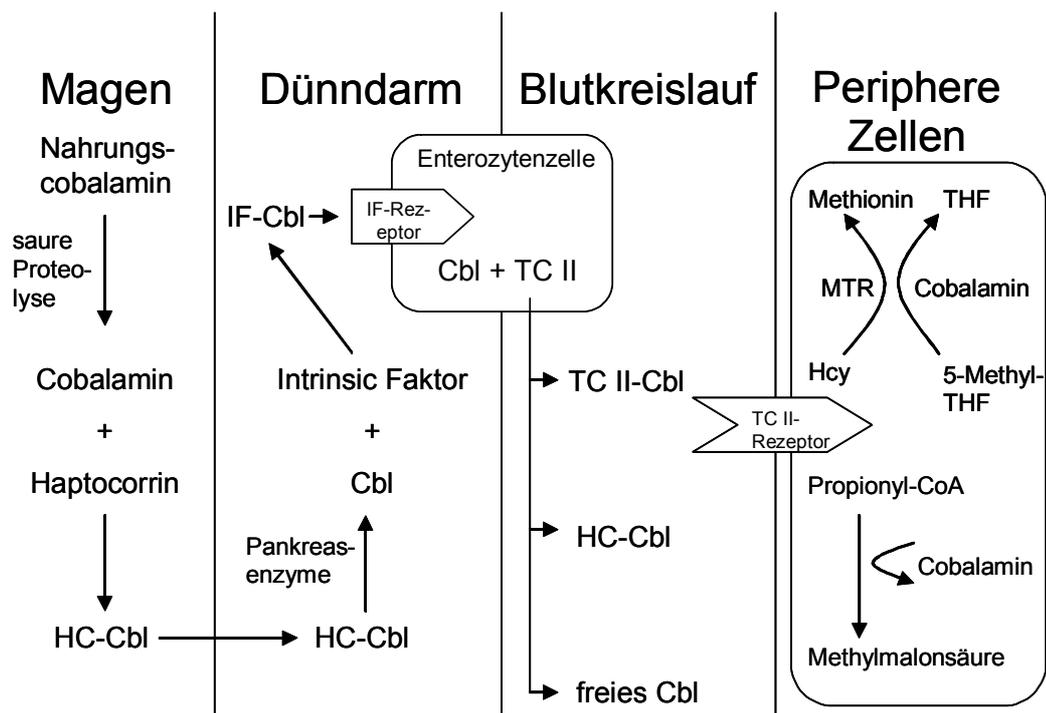


Abbildung 26: Vereinfachte Darstellung der Aufnahme und des Stoffwechsels von Cobalamin. Cbl: Cobalamin, HC-Cbl: Haptocorrin-Cobalamin-Komplex, IF-Cbl: Intrinsic-Faktor-Cobalamin-Komplex, IF-Rezeptor: Intrinsic-Faktor-Rezeptor, TC II: Transcobalamin II, TC II-Cbl: Transcobalamin-Cobalamin-Komplex, Hcy: Homocystein, MTR: Methioninsynthase, THF: 5,6,7,8-Tetrahydrofolat, 5-Methyl-THF: 5-Methyltetrahydrofolat, TC II-Rezeptor: Transcobalamin II-Rezeptor, Propionyl-CoA: Propionyl-Coenzym-A.

Anschließend wird der Proteinteil des Holo-HC im Zwölffingerdarm verdaut, Cobalamin wird freigesetzt und schließlich an den Intrinsic-Faktor (IF) gebunden (Allen *et al.* 1978). Der Intrinsic-Faktor-Cobalamin-Komplex reagiert im terminalen Ileum mit Cubillin und wird dann von dem Transportrezeptor Megalin endozytisch in die Enterozyten aufgenommen (Andersen *et al.* 1979, Birn *et al.* 1997). In den Enterozyten wird Cobalamin an Transcobalamin II (TC II) gebunden und gelangt in den Blutkreislauf (Quadros *et al.* 1999, Brada *et al.* 2001), durch den es zu den peripheren Zellen transportiert wird. An TC II gebundenes Cobalamin wird als Holo-Transcobalamin II (Holo-TC II) bezeichnet. Etwa 20% des Gesamtcobalamins sind an TC II gebunden. Die restlichen 80% sind an Haptocorrin gebunden (Afman *et al.* 2002). Von den peripheren Zellen kann nur das an TC II gebundene, bioverfügbare Cobalamin aufgenommen werden. Patienten mit einem Cobalaminmangel entwickeln in circa 60% der Fälle eine makrozytäre Anämie mit den typischen Symptomen wie Schwindel, Blässe, Schwäche, Ikterus und im Extremfall Dyspnoe und Herzinsuffizienz (Stabler *et al.* 1990, Nexo *et al.* 1994). Bei bis zu 30% der Patienten mit einem klinischen Cobalaminmangel kommt es zu neuropsychiatrischen Auffälligkeiten (Stabler *et al.* 1990, Healton *et al.* 1991). Bei einem subklinischen Cobalaminmangel sind leichte kognitive Störungen die bisher einzigen beschriebenen Auffälligkeiten (Riggs *et al.* 1996, van Asselt *et al.* 2001). Neben den genannten klinischen Symptomen werden Cobalamin- und Transcobalaminmangel unter anderen auch als Risikofaktoren für das Auftreten von Neuralrohrdefekten (van der Put *et al.* 1996, Afman *et al.* 2002) und spontanen Aborten (Stegers-Theunissen 1992, Zetterberg *et al.* 2002) diskutiert.

Es ist bekannt, dass reduzierte Folat- und Cobalaminspiegel mit erhöhten Homocysteinspiegeln assoziiert sind (Olszewski *et al.* 1989, Ubbink *et al.* 1993, Ward *et al.* 1997, Brouwer *et al.* 1999). Erhöhte Homocysteinspiegel sind signifikant und unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (Boushey *et al.* 1995, Clarke und Armitage 2000, Ford *et al.* 2002, Wald *et al.* 2002). Deswegen wird diskutiert, erhöhte Homocysteinspiegel ($>12\mu\text{mol/l}$) bei Patienten mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen medikamentös zu senken (Stanger *et al.* 2003). Homocystein kann kostengünstig durch Folsäure- (0,2-0,8 mg/Tag) und Cobalaminsupplementierung (3-100 $\mu\text{g/Tag}$) bis um 32% gesenkt werden (Clarke 1998, Stanger *et al.* 2003, Liem *et al.* 2003). Diese Vitamin B-Therapie normalisiert auch die endotheliale Dysfunktion (Doshi *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass die Verbesserung

der endothelialen Dysfunktion mit der Senkung des Homocysteins zusammenhängt, was jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Doshi *et al.* 2001, Doshi *et al.* 2003). Der Homocysteinspiegel wird neben der Nierenfunktion, dem Lebensstil, der körperlichen Aktivität, dem Geschlecht und dem Vitaminstatus auch von genetischen Variationen bestimmt. DNA-Sequenzvariationen in den Genen des Reduced Folate Carriers I und des Transcobalamin II können sich auf die zur Verfügung stehende Menge an Folaten und Cobalamin und in der Folge auf den Homocysteinspiegel auswirken. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von häufigen Polymorphismen im RFC I- und TC II-Gen auf den Homocysteinspiegel untersucht werden.

Das RFC I-Gen des Menschen liegt auf dem Chromosom 21 (Chango *et al.* 2000). Es besteht aus sechs Exons. Die Nukleotidsequenz der sechs Exons codiert für ein RFC I-Protein mit 591 Aminosäuren (Nguyen *et al.* 1997). Die RFC I-DNA-Sequenz wurde 2000 von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) untersucht. Es konnte ein häufiger Polymorphismus, die RFC I-G80A-Transition, nachgewiesen werden. Bei der RFC I-G80A-Transition sind die Frequenzen der beiden Allele nahezu identisch (A-Allel: 48-56%, G-Allel: 44-52%), so dass beide Allele als Wildtypallel betrachtet werden können (Rady *et al.* 2001). In dieser Arbeit wurde die Nomenklatur aus der Arbeit von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) übernommen, in der das G-Allel als Wildtypallel angenommen wird. Der Einfluss dieser Transition auf die Folat- und Homocysteinspiegel wurde in mehreren Studien untersucht (Chango *et al.* 2000, Winkelmayr *et al.* 2003, Födinger *et al.* 2003). In den Studien von Winkelmayr *et al.* und Födinger *et al.* (Winkelmayr *et al.* 2003, Födinger *et al.* 2003) konnte kein Zusammenhang zwischen der RFC I-G80A-Transition und den Folat- und Homocysteinspiegeln im Plasma festgestellt werden. In den Arbeiten von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) wurde gefunden, dass Personen die homozygot für die MTHFR-C677T-Transition und gleichzeitig Wildtypen für die RFC I-G80A-Transversion waren (MTHFR-677TT/RFC I-80GG), die höchsten Homocysteinspiegel in Verbindung mit den niedrigsten Plasmafolat- und Erythrozytenfolatspiegeln hatten. Diese Ergebnisse waren für das Homocystein und das Erythrozytenfolat signifikant.

Das TC II-Gen des Menschen liegt auf dem Chromosom 22 (Li *et al.* 1994). Es besteht aus neun Exons mit insgesamt 1281 Basenpaaren und 8 Introns mit insgesamt 16421 Basenpaaren (Regec *et al.* 1995). Die Nukleotidsequenz der neun Exons codiert für ein TC II-Protein mit 427 Aminosäuren (Li *et al.* 1994, Regec *et al.* 1995). Im TC II-Gen sind sechs DNA-Sequenzvariationen innerhalb der neun Exons (NCBI) bekannt. Vier von

diesen sind Mutationen, zwei sind Polymorphismen. Der häufigste Polymorphismus ist die TC II-C776G-Transversion. Der Zusammenhang zwischen der TC II-C776G-Transversion und Homocystein wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Namour *et al.* 2001, Lievers *et al.* 2002a, Afman *et al.* 2002). Namour *et al.* (Namour *et al.* 2001) konnten zeigen, dass das C-Allel mit niedrigeren Homocysteinspiegeln assoziiert ist als das G-Allel. In den Arbeiten von Lievers *et al.* (Lievers *et al.* 2002a) wurde dieser Effekt nur bei den Probanden mit den höchsten Cobalaminspiegeln (>299 pmol/l) gefunden. In der Studie von Afman *et al.* (Afman *et al.* 2002) konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Homocysteinspiegel erkannt werden.

Die zur Verfügung stehenden Studien können nicht zweifelsfrei klären, ob die beiden Polymorphismen mit dem Homocysteinspiegel assoziiert sind.

Folat und Cobalamin sind zwei Vitamine, bei denen es in Mitteleuropa nur in Ausnahmen zu einem klinischen Mangel kommt (Stanger *et al.* 2003, Quinn und Basu 1996). Risikogruppen sind vor allem Vegetarier und Veganer, Säuglinge und Kinder von sich vegetarisch oder veganisch ernährenden Müttern, Alkoholiker, Personen mit einer atrophischen Gastritis (Magenschleimhautentzündung) und ältere Personen (van Asselt *et al.* 1998).

5.2. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die RFC I-G80A-Transition und die TC II-G776C-Transversion in einer Risikogruppe für Folat- und Cobalaminmangel mit dem Homocysteinspiegel assoziiert sind. Hierfür wurden die beiden Polymorphismen bei 159 gesunden Senioren zwischen 59 und 92 Jahren mittels DHPLC bestimmt. Des Weiteren wurden die relevanten Laborparameter des Homocystein- und Folatstoffwechsels gemessen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Hat die RFC I-G80A-Transition bei den untersuchten Senioren einen Einfluss auf den Homocysteinspiegel?
2. Hat die TC II-G776C-Transversion bei den untersuchten Senioren einen Einfluss auf den Holo-Transcobalamin II-Spiegel?
3. Hat die TC II-G776C-Transversion bei den untersuchten Senioren einen Einfluss auf den Homocysteinspiegel?

5.3. Probanden, Material und Methoden

5.3.1. Probanden und Blutentnahme

Für diese Studie wurden 159 gesunde Probanden (92 Frauen und 67 Männer) im Alter von 59-92 Jahren, die über Zeitungsanzeigen geworben wurden, untersucht. Probanden, bei denen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, kardiovaskuläre Erkrankungen oder ein Diabetes mellitus bekannt waren, wurden ausgeschlossen. Probanden, die Medikamente einnahmen, die Auswirkungen auf die Funktion des Magen-Darm-Traktes oder Wechselwirkungen mit dem Cobalaminstoffwechsel haben (Antiepileptika, Methotrexat, Protonenpumpeninhibitoren oder H₂-Rezeptor-Antagonisten) wurden ebenfalls ausgeschlossen. Den Probanden wurde nüchtern eine EDTA-Blutprobe entnommen. Zur Blutentnahme wurde das Vacutainer-Blutentnahmesystem der Firma Becton Dickinson verwendet.

5.3.2. Laborparameter

Es wurden Holo-TC II, Serumcobalamin, Serum-Pyridoxal-5-Phosphat, Serumfolat, tHcy und Methylmalonsäure gemessen. Holo-TC II wurde mit einem Testkit der Firma Axis-Shields gemessen. Zur Bestimmung des Serumcobalamins und des Serumfolats wurde ein Testkit von Roche benutzt. Die Hcy-Konzentration wurde mit einer High Performance Liquid Chromatography-Methode (HPLC-Methode) von Vester *et al.* (Vester *et al.* 1991) ermittelt. Bei dieser Methode wird freies und proteingebundenes Homocystein, das Gesamthomocystein (tHcy), bestimmt. Die Methylmalonsäurekonzentration wurde nach einer gaschromatischen Methode (GC-MS) von Stein *et al.* (Stein *et al.* 2001) bestimmt. Pyridoxal-5-Phosphat wurde mit einem Testkit von Immundiagnostik mittels HPLC bestimmt. Von jedem Proband wurde zusätzlich ein kleines Blutbild nach Standardmethoden angefertigt. Die genannten Laborparameter wurden vom technischen Personal des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie bestimmt.

5.3.3. Molekularbiologische Arbeiten

5.3.3.1. DNA-Isolierung

Die Isolierung von genomischer DNA wurde in einer Hera Save Cleanbox mit dem QIAmp DNA Blood Mini Kit nach den Arbeitsanweisungen des Herstellers durchgeführt. Sie ist in Kapitel 1 beschrieben.

5.3.3.2. Mutationsanalysen

Zur Ermittlung der TC II-C776G- und der RFC I-G80A- Genotypen der Probanden wurden die in Kapitel 1 entwickelten PCR- und DHPLC-Protokolle benutzt. Auffällige Probanden-PCR-Produkte wurden zur Bestimmung der potentiellen DNA-Sequenzvariationen und zu ihrer Lokalisierung sequenziert. Die Probenvorbereitung für die Sequenzierung ist ebenfalls in Kapitel 1 beschrieben.

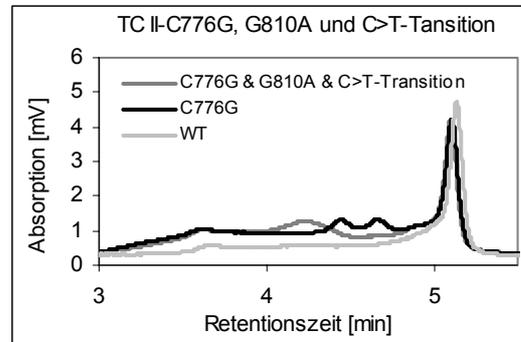
5.4. Ergebnisse

Bei den DHPLC-Mutationsanalysen der TC II-C776G-Transversion wurden für die ungemischten Proben drei unterschiedliche Chromatogramme gefunden. Die DHPLC-Homoduplexchromatogramme (Abb.: 27B) von Wildtypen (WT) und homozygoten Probanden (nicht abgebildet) waren identisch und zeigten beide nur einen Peak mit einer Retentionszeit von 5,10 min. Die Heteroduplexchromatogramme von heterozygoten Probanden hatten drei Peaks mit Retentionszeiten von 4,50, 4,70 und 5,10 min. Die Peaks mit den kürzeren Retentionszeiten (4,50 und 4,70 min) repräsentierten die beiden DNA-Einzelstränge des CG-Heteroduplexes (C-Allel und G-Allel). Gemischte Proben zeigten entweder ein mit dem Homoduplexchromatogramm identisches (WT) oder ein mit dem Heteroduplexchromatogramm identisches (homozygote Mutanten) Peakmuster. Bei einem Probanden ergaben die DHPLC-Analysen ein von den Referenzchromatogrammen (Homoduplexchromatogramm und Heteroduplexchromatogramm) unterschiedliches Chromatogramm (C776G & G810A & C>T-Transition in Abb.: 27B). Das PCR-Produkt wurde zur Lokalisierung einer potentiellen unbekanntes DNA-Sequenzvariation sequenziert, wobei zwei zusätzliche Sequenzvariationen neben der TC II-C776G-Transversion gefunden wurden. Die erste Sequenzvariation war eine im Intron-5 lokalisierte Cytosin zu Thymin Transition (C>T-Transition), die schon von Yusuke in der NCBI-Datenbank beschrieben wurde (rs2267163, Abb.: 27A-C). Die bei NCBI veröffentlichten Allelfrequenzen betragen 0,55 für das C-Allel und 0,45 für das T-Allel. Die angegebene Heterozygotenfrequenz (CT) beträgt 0,495. Bei der zweiten Sequenzvariation handelte es sich um eine Guanin zu Adenin Transition (G>A-Transition) des Nukleotids 810 im Exon-6 des TC II-Gens (Abb.: 27A-C). Der G810A-Basenaustausch verursacht keine Veränderung in der Aminosäuresequenz des TC II-Proteins. Diese Sequenzvariation war bis jetzt unbekannt gewesen. Der Indexpatient war eine 78 Jahre alte Frau. Sie hatte eine Holo-TC II-Konzentration von 37 pmol/l. Die Serumcobalamin-, Serumfolat- und tHcy-Konzentrationen betragen 220 pmol/l, 6,8 ng/ml und 22 µmol/l. Da der Indexpatient für drei DNA-Sequenzvariationen innerhalb des PCR-Produktes heterozygot war, konnte der TC II-C776G-Genotyp anhand des erhaltenen Heteroduplexchromatogramms nicht ermittelt werden. Das erhaltene Chromatogramm repräsentierte ein PCR-Produkt mit allen drei heterozygoten DNA-Sequenzvariationen. Der TC II-Genotyp wurde mittels Sequenzierung ermittelt.

A) Amplifikatsequenz

5' GTCAGGTGCTGGAACACCTAGCCCCCTCCCTGCCGGCTGACT**T**TCCTCTCTCTCTTCCTCACTCTATCACC
 AGTtcctcatgacttcccccatgc**C**tgggggcagaactgggaacagcatgtctcaaggc**G**aggggttgctttgc
 tggccagtctgcaggatggagccttccagaatgctctcatgatttcccagctgctgccc**cg**ttctgaaccaca
agaccta 3'

B)



C)

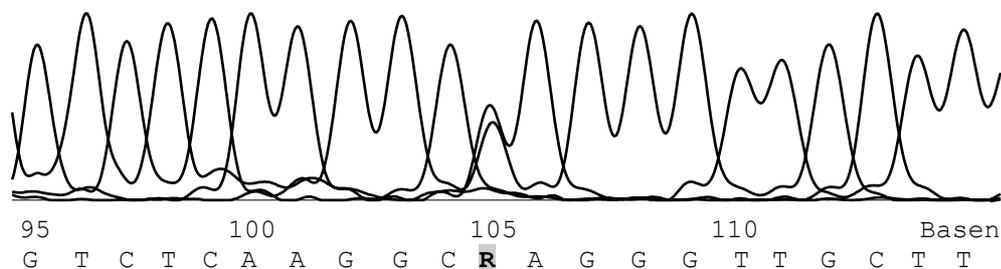


Abbildung 27: Mutationsnachweis der TC II-C776G-Transversion, der TC II-G810A-Transition und der TC II-C>T-Transition.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. **T**: C>T-Transition (rs2267163), **C**: TC II-C776G-Transversion (rs1801198), **G**: G810A-Transition (neue DNA-Sequenzvariation).

B) DHPLC-Mutationsanalyse der TC II-C776G-Transversion und Nachweis der beiden zusätzlichen DNA-Sequenzvariationen. WT: Wildtyp (CC), C776G: heterozygote TC II-C776G-Mutante (CG), C776G & G810A & C>T-Transition: heterozygote TC II-C776G + TC II-G810A + TC II C>T-Mutante (CG + GA + TC).

C) Sequenzierung der TYMS-G810A-Transition, **R**: G>A-Transition bei dem heterozygoten Probanden. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

Die ermittelten Genotypfrequenzen der TC II-C776G-Transversion sind in Tabelle 10 angegeben. Bei homozygoten TC II-C776G-Patienten (GG) wurden signifikant niedrigere Holo-TC II Konzentrationen gemessen als bei heterozygoten Mutanten und bei Wildtypen (Tab.: 10). Die Korrelation zwischen Holo-TC II und Serumcobalamin war bei den homozygoten Probanden schwächer als bei den heterozygoten Probanden und den Wildtypen (Abb.: 28).

Tabelle 10: Alter, Body Mass Index, tHcy, Serumfolat, Serumcobalamin, Plasma-Pyridoxal-5-Phosphat, Holo-TC II und Methylmalonsäure bei den drei TC II-C776G Genotypen.

	TC II-C776G-Genotyp		
	CC (n = 55)	CG (n = 77)	GG (n = 27)
Genotypfrequenzen [%]	35	48	17
Allelfrequenzen [%]	C-Allel: 59		G-Allel: 41
Alter [Jahre]	67 ± 6	67 ± 6	66 ± 5
Body Mass Index [kg/m ²]	26 ± 3,7	26,5 ± 4,2	26,0 ± 3,6
tHcy [µmol/l]	12,3 ± 4,0	12,2 ± 3,5	12,8 ± 3,4
tHcy > 15 µmol/l [n, %]	n=10, 18%	n=16, 21%	n=6, 21%
Serumfolat [ng/ml]	7,9 (2,2-60)	8,2 (1,9-47,2)	7,1 (2,5-25,5)
Serumcobalamin [pmol/l]	397 ± 134	414 ± 193	392 ± 165
Holo-TC II [pmol/l]	68 ± 28	67 ± 41	46 ± 21*
Holo-TC II < 40 pmol/l [n, %]	n=6, 11%	n=24, 31%	n=13, 46%
Methylmalonsäure [nmol/l]	180 (95-1047)	177 (78-830)	182 (118-490)

Angegeben sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen oder Mediane mit größter und kleinster Abweichung. * Signifikante Abweichung von anderen Genotypen. Ermittelt mit ANOVA bei $p < 0,05$. tHcy: Gesamthomocystein, Holo-TC II: Holo-Transcobalamin II.

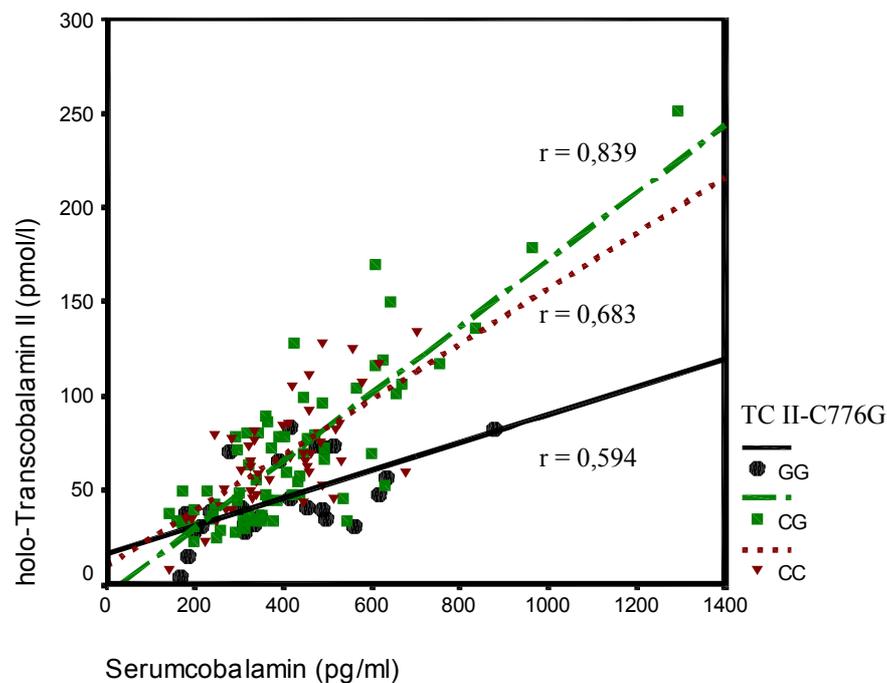


Abbildung 28: Assoziation zwischen Holo-TC II und Serumcobalamin in Abhängigkeit von den TC II-C776G-Genotypen CC, CG und GG. (entnommen aus Schüttler 2004, Seite 43).

Die Cobalamin-, Folat- und tHcy-Konzentrationen wurden nicht durch den TC II-C776G-Genotyp beeinflusst (Tab.: 10). Die Erythrozyten- und Leukozytenzahl, das mittlere korpuskulare Erythrozytenvolumen, der Hämatokritwert, und die Thrombozytenzahl wurden ebenfalls nicht beeinflusst (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei den DHPLC-Mutationsanalysen für die RFC I-G80A-Transition hatte das Homoduplexchromatogramm des Wildtyp-PCR-Produktes und des PCR-Produktes von homozygoten Mutanten nur einen Peak mit einer Retentionszeit von 4,88 min (Abb.: 29). Das Heteroduplexchromatogramm des PCR-Produktes von heterozygoten Mutanten zeigte einen zusätzlichen Peak bei einer Retentionszeit von 4,68 min (Abb.: 29). Bei den gemischten Proben wurde für den Wildtyp das gleiche Chromatogramm wie bei den ungemischten Wildtypproben gefunden. Für die homozygoten Mutanten wurde das gleiche Chromatogramm wie bei den ungemischten PCR-Produkten von heterozygoten Probanden gefunden. Bei den gemessenen Laborparametern wurden keine signifikanten Zusammenhänge mit den Genotypen der RFC I-G80A-Transition ermittelt (Tab.: 11).

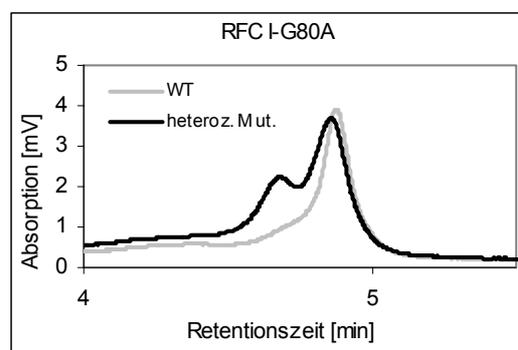


Abbildung 29: DHPLC-Mutationsanalyse der RFC I-G80A-Transversion. WT: Wildtyp (GG), heteroz. Mut.: heterozygote Mutante (GA).

Tabelle 11: Alter, BMI, tHcy, Serumfolat, Serumcobalamin, Pyridoxal-5-Phosphat, Holo-TC II und Methylmalonsäure bei den drei RFC I-G80A-Genotypen.

	RFC I-G80A-Genotyp		
	GG (n = 49)	GA (n = 69)	AA (n = 39)
Genotypfrequenzen [%]	31	44	25
Allelfrequenzen [%]	G-Allel: 53		A-Allel: 47
Alter [Jahre]	67 ± 6	66 ± 6	66 ± 5
Body Mass Index [kg/m ²]	26,0 ± 4,3	26,3 ± 3,2	25,7 ± 3,4
tHcy [µmol/l]	12,2 ± 4,2	12,7 ± 3,2	11,8 ± 3,8
Serumfolat [ng/ml]	10,1 (3,5-28,7)	10,6 (3,0-22,9)	11,6 (3,0-32,8)
Serumcobalamin [pmol/l]	307 ± 105	276 ± 120	315 ± 108
Pyridoxal-5-Phosphat [nmol/l]	62,2 (21,4-161,7)	63,8 (18,2-126,8)	67,6 (18,6-230,3)
Holo-TC II [pmol/l]	61 ± 31	64 ± 35	65 ± 26
Methylmalonsäure [nmol/l]	203 ± 108	236 ± 164	226 ± 147

Angegeben sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen oder Mediane mit 5. und 95. Perzentile. tHcy: Gesamthomocystein, Holo-TC II: Holo-Transcobalamin II.

5.5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeiten war es, den Einfluss der TC II-C776G-Transversion und der RFC I-G80A-Transition auf den Homocysteinspiegel bei gesunden, älteren Menschen zu untersuchen. Zur Bestimmung der Genotypen wurden DHPLC-Mutationsnachweise durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die DHPLC-Technologie zum Nachweis der beiden SNPs in einer epidemiologischen Studie gut geeignet war.

Die ermittelten TC II-Genotyp- und Allelfrequenzen entsprechen den Literaturdaten für gesunde Kaukasier (Zetterberg *et al.* 2002, Afman *et al.* 2002). Des Weiteren wurden mittels DHPLC bei einem Probanden zwei weitere DNA-Sequenzvariationen im TC II-Gen entdeckt. Diese Sequenzvariationen wären mit einer spezifischen Methode, wie zum Beispiel RFLP, nicht erkannt worden. Es handelte es sich um eine bis jetzt unbekannte Guanin zu Adenin Transition des 810. Nukleotids (TC II-G810A) der codierenden DNA-Sequenz des TC II-Gens und um eine schon bekannte intronische C>T-Transition (rs2267163). Die TC II-G810A-Transition verursacht keinen Aminosäureaustausch im TC II-Protein. Stoffwechselphysiologische Effekte dieser Sequenzvariation sind unbekannt.

Die in der NCBI-Datenbank angegebene Allelfrequenz des T-Allels der C>T-Transition (rs2267163) beträgt 0.450. In der vorliegenden Studie wurde nur ein T-Allel nachgewiesen woraus sich eine Allelfrequenz von 0,0032 errechnet. Diese sehr große Abweichung der erarbeiteten Ergebnisse von den NCBI-Daten kann durch folgende Ursachen begründet sein:

1. Die Daten in der NCBI-Datenbank sind nicht auf unser Probandenkollektiv übertragbar. Die bei NCBI hinterlegten Allelfrequenzen sind an japanischen Probanden ermittelt worden. Es ist möglich, dass der SNP in einer mitteleuropäischen Bevölkerung wesentlich seltener ist, als in der japanischen.
2. Die 24 japanischen Probanden waren nicht repräsentativ für die Genotyp- und Allelfrequenzen des SNPs.
3. Der SNP wurde bei den DHPLC-Analysen nicht erkannt, wenn er alleine oder nur mit der TC II-C776G-Transversion auftrat. Um diese Hypothese zu beweisen müsste die C>T-Transition (rs2267163) bei den untersuchten Probanden mit einer spezifischen Methode, wie zum Beispiel RFLP, bestimmt werden.

Für die TC II-C776G-Transversion konnten in dieser Studie keine signifikanten Effekte auf die tHcy-, Methylmalonsäure-, Serumfolat- und Serumcobalaminkonzentrationen gefunden werden. Die Erythrozyten- und Leukozytenzahl, das mittlere korpuskulare

Erythrozytenvolumen, das Hämatokrit und die Thrombozytenzahl wurden ebenfalls nicht durch den Polymorphismus beeinflusst.

Für die Holo-TC II-Konzentrationen konnte eine signifikante Erniedrigung für den GG-Genotyp gefunden werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Afman *et al.* und Miller *et al.* (Afman *et al.* 2002, Miller *et al.* 2002) überein. Da sich das Serumcobalamin unter den drei Genotypen nicht unterschied, ist es möglich, dass das G-Allel eine verminderte Affinität des resultierenden Proteins für Cobalamin verursacht. Miller *et al.* (Miller *et al.* 2002) formulierte in seiner Publikation dieselbe Hypothese. In der Arbeit von Afman *et al.* (Afman *et al.* 2002) wurde neben der reduzierten Holo-TC II-Konzentration auch ein niedrigerer Holo-TC II/Serumcobalaminquotient gefunden. Die Holo-HC-Konzentration (Haptocorrin + Cobalamin) und Serumcobalaminkonzentration zwischen den drei TC II-Genotypen waren identisch. Auch in diesem Fall wird von den Autoren postuliert, dass der niedrigere Holo-TC II/Serumcobalaminquotient auf eine eingeschränkte Affinität des vom G-Allel codierten TC II-Proteins für Cobalamin zurückzuführen sein könnte. Die C776G-Transversion verursacht einen Austausch von Prolin gegen Arginin am Aminosäurecodon 259. Diese Aminosäure liegt zwischen der vierten und fünften von insgesamt sechs stark konservierten, hydrophilen Regionen der TC II-Aminosäuresequenz (Namour *et al.* 1998). Wahrscheinlich sind diese sechs konservierten Regionen zusammen an der Bildung einer hydrophoben Tasche beteiligt, in der möglicherweise das Cobalamin gebunden wird (Li *et al.* 1994, Hippe and Olesen 1971). Es ist möglich, dass die TC II-C776G-Transversion die Bildung dieser hydrophoben Tasche behindert, wodurch die Affinität des Proteins für Cobalamin reduziert werden könnte. Gegen eine reduzierte Affinität des vom G-Allel codierten TC II-Proteins sprechen allerdings die Beobachtungen von Hansen und Nexo, Quadros *et al.* und Li *et al.* (Hansen und Nexo 1987, Quadros *et al.* 1993, Li *et al.* 1994), die *in vitro* nachweisen konnten, dass die beiden Proteine eine gleich hohe Affinität für Cobalamin haben. Eine andere Hypothese geht davon aus, dass die von Namour *et al.* (Namour *et al.* 1998) beschriebene reduzierte Expression des G-Allels die Ursache für die niedrigere Holo-TC II-Konzentration bei den homozygoten Probanden (GG) darstellt. In den Arbeiten von Namour *et al.* (Namour *et al.* 1998) war die Proteinkonzentration des vom C-Allel codierten Proteins *in vivo* 1,6 mal höher, als die Konzentration des vom G-Allel codierten Proteins. In der Studie von Namour *et al.* (Namour *et al.* 2001), in der 159 gesunde Kaukasier untersucht wurden, hatten die heterozygoten Probanden signifikant erhöhte Homocysteinkonzentrationen gegenüber den Wildtypen und homozygoten Mutanten. Von McCaddon *et al.* (McCaddon *et al.* 2001) und Namour und Gueant (Antwort auf

McCaddon *et al.* 2001) wird deswegen diskutiert, dass die TC II-C776G-Transversion möglicherweise die Stabilität eines TC II-Dimers beeinflusst, und somit die Bindung an den von Bose *et al.* (Bose *et al.* 1996) beschriebenen dimerischen TC II-Rezeptor (TC II-R) beeinflusst. TC II-Heterodimere, postulieren Namour und Gueant (Antwort auf McCaddon *et al.* 2001), sind instabiler und binden weniger gut an den dimerischen TC II-R als TC II-Homodimere. Der Vorteil von TC II-R-Dimeren besteht nach einer Hypothese von Bose *et al.* (Bose *et al.* 1996) darin, dass Dimere zwei Mol TC II binden können und somit die Aufnahme von Cobalamin in die Zellen effektiver durchgeführt werden könnte als durch TC II und TC II-R-Monomere. Ob zur Aufnahme des Cobalamins TC II- und TC II-R-Proteindimere notwendig sind oder ob die Aufnahme von Cobalamin auch mit Proteinmonomeren stattfindet, ist nicht eindeutig geklärt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Holo-TC II-Konzentration vom TC II-C776G-Genotyp beeinflusst werden. Dieser Einfluss ist nur bei homozygoten Probanden (GG) signifikant und macht sich mit einer Reduzierung des Holo-TC II von durchschnittlich 32% bemerkbar. Ein Einfluss der TC II-C776G-Transversion auf die tHcy-Konzentration konnte bei den untersuchten Senioren nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass der Polymorphismus keinen Einfluss auf andere Metabolite des Homocystein- und Folsäurestoffwechsels hat. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die TC II-C776G-Transversion in dieser Studie keine klinisch relevanten Veränderungen bei den gemessenen Parametern erkennbar waren.

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Genotyp- und Allelfrequenzen für die RFC I-G80A-Transition entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Frequenzen für gesunde Kaukasier (Rady *et al.* 2001). Bei den untersuchten Probanden waren keine Zusammenhänge zwischen den Genotypen und dem Plasma- bzw. Erythrozytenfolatspiegel und der tHcy-Konzentration nachweisbar. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten mehrerer Arbeitsgruppen (Födinger *et al.* 2003, Winkelmayr *et al.* 2003). Von Födinger *et al.* (Födinger *et al.* 2003) und Winkelmayr *et al.* (Winkelmayr *et al.* 2003) wurden bei Dialysepatienten bzw. bei Patienten nach einer Nierentransplantation keine signifikanten Unterschiede der Plasma- bzw. Erythrozytenfolatspiegel und der tHcy-Konzentration gefunden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) erhöhte Homocysteinspiegel für Probanden die homozygot für den MTHFR-C677T und gleichzeitig Wildtyp für den RFC I-G80A (MTHFR-677TT/RFC I-80GG) waren, beschrieben. Der Einfluss der RFC I-G80A-Transition auf die Erhöhung des Homocysteinspiegels ist wahrscheinlich nicht sehr

groß, da die MTHFR-C677T-Transition auch alleine schon eine Erhöhung des Homocysteins bei heterozygoten und homozygoten MTHFR-C677T-Probanden (CT und TT) verursacht (Frosst *et al.* 1995). In den Arbeiten von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) waren die Homocysteinspiegel auch dann signifikant erhöht, wenn nur die MTHFR-C677T-Transition berücksichtigt wurde. Der Anstieg der Homocysteinkonzentration war bei den doppelt homozygoten Probanden (MTHFR-677TT/RFC I-80GG) allerdings ausgeprägter als bei den Probanden die nur für den MTHFR-C677T homozygot waren (MTHFR-677TT). Bei alleiniger Betrachtung der RFC I-G80A-Transition war kein signifikanter Effekt auf den Homocysteinspiegel nachweisbar. Neben den erhöhten Homocysteinspiegeln wurden von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) bei denselben Probanden (MTHFR-677TT/RFC I-80GG) auch niedrigere Plasmafolat- und Erythrozytenfolatspiegel gefunden. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass der RFC-G80A-GG-Genotyp mit einer reduzierten Folataufnahme assoziiert ist, wodurch auch die höchsten Homocysteinspiegel bei den doppelt homozygoten Probanden in der Studie von Chango *et al.* (Chango *et al.* 2000) erklärt werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den untersuchten Probanden weder die TC II-C776G-Transversion noch die RFC-G80A-Transition mit dem Homocysteinspiegel assoziiert waren. Die Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen (Afman *et al.* 2002, Miller *et al.* 2002, Födinger *et al.* 2003, Winkelmayr *et al.* 2003,) und deuten darauf hin, dass keiner der beiden Polymorphismen einen wesentlichen Einfluss auf den Homocysteinspiegel hat. Beide Polymorphismen sind nicht als Determinanten des Homocysteinspiegels zu anzusehen.

6. Kapitel 3

Entwicklung und Anwendung von DHPLC-Methoden zum Screenen nach bekannten und unbekanntem DNA-Sequenzvariationen am Beispiel des Thymidylatsynthasegens.

6.1. Einleitung

Thymidylatsynthase (TYMS) katalysiert die Reduktion von dUMP (Desoxyuridinmonophosphat) zu dTMP (Desoxythymidinmonophosphat) (Abb.: 30). Die von der Thymidylatsynthase katalysierte dTMP-Synthese ist der einzige Stoffwechselweg für die Neusynthese von dTMP. Deswegen hat die Thymidylatsynthase eine wichtige Funktion bei der DNA-Synthese und Reparatur sowie für das Zellwachstum (Trinh *et al.* 2002, Liu *et al.* 2002, Kawate *et al.* 2002, Ulrich *et al.* 2002, Volcik *et al.* 2003).

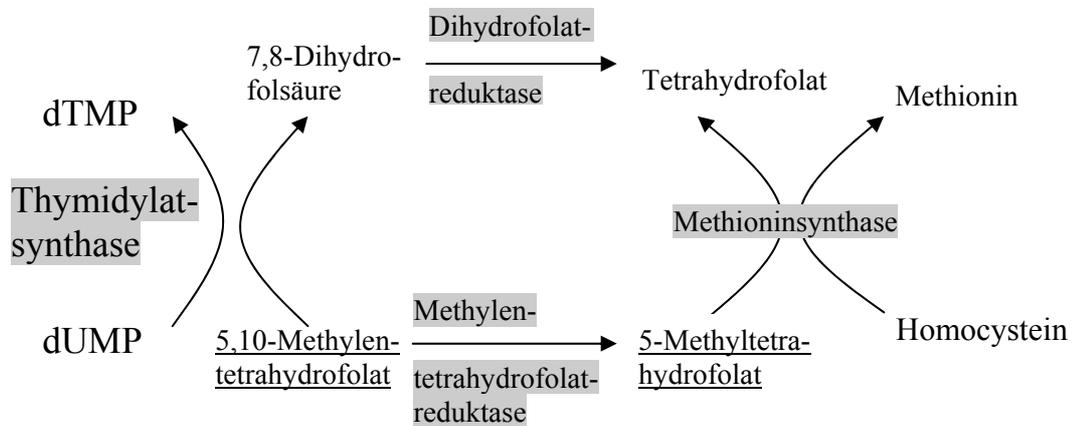


Abbildung 30: Thymidylatsynthase und Folatstoffwechsel. dUMP: Desoxyuridinmonophosphat, dTMP: Desoxythymidinmonophosphat. Erklärung der Abbildung im Text.

Das bei der dTMP-Synthese benötigte 5,10-Methylen-THF ist auch der Methylgruppendonator für die von der Methylen-tetrahydrofolatreduktase (MTHFR) katalysierten Reduktion des 5,10-Methylen-THFs zu 5-Methyl-THF. Bei reduzierten 5,10-Methylen-THF-Konzentrationen kann es zu einem verstärkten Konkurrenzdruck unter den beiden Enzymen und theoretisch zu einer verminderten Methylierung von Homocystein zu Methionin (Brown *et al.* 2004) oder zu einer reduzierten dTMP-Synthese (Trinh *et al.* 2002) kommen. Bekannte Polymorphismen im Gen der Thymidylatsynthase sind der TYMS-28-Bp-Repeat, die TYMS-G-58C-Transversion und die TYMS-6Bp-Deletion. Alle drei Polymorphismen beeinflussen die Proteinbiosynthese der Thymidylatsynthase (Kawakami *et al.* 2001, Mandola *et al.* 2003, Mandola *et al.* 2004). Der Einfluss des TYMS-28-Bp-Repeats und der TYMS-6Bp-Deletion auf die Folat- und Homocysteinkonzentrationen wurde in mehreren Studien untersucht. Er ist aber noch nicht endgültig aufgeklärt worden. Für den 28-Bp-Repeat sind die Ergebnisse der vorliegenden

Studien widersprüchlich. So wurde von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002) eine Assoziation von Probanden, die jeweils drei 28-Bp-Repeats in beiden Allelen trugen (3R/3R), mit signifikant reduzierten Folatkonzentrationen und erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Vergleich zu Probanden mit 2R/2R- und 2R/3R-Genotypen gefunden. Von Brown *et al.* (Brown *et al.* 2004) wurde dagegen kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und den Folat- bzw. den Homocysteinkonzentrationen gefunden. Für das Deletionsallel der 6-Bp-Deletion wurden bei Nichtrauchern niedrigere Homocysteinkonzentrationen gefunden als für das Wildtypallel (Kealey *et al.* 2005). Weitere Studien stehen noch nicht zur Verfügung. Die G-58C-Transversion wurde noch nicht auf Assoziationen mit dem Homocysteinspiegel untersucht.

Der Einfluss des 28-Bp-Repeats, der G-58C-Transversion und der 6-Bp-Deletion auf die Genexpression des Thymidylatsynthasegens legt die Vermutung nahe, dass diese drei Polymorphismen sich auch auf die quantitative Umsetzung des 5,10-Methylen-THFs durch die Thymidylatsynthase auswirken. Es ist denkbar, dass die für die Methylenetetrahydrofolatreduktase zur Verfügung stehende Menge an 5,10-Methylen-THF mit der Proteinkonzentration der Thymidylatsynthase in Verbindung steht. Über diesen Mechanismus könnten DNA-Sequenzvariationen im Thymidylatsynthasegen einen Einfluss auf den Homocysteinspiegel haben. Diese Hypothese wird durch die Studien von Trinh *et al.* und Kealey *et al.* (Trinh *et al.* 2002, Kealey *et al.* 2005) unterstützt. Da die Assoziationen des TYMS-28-Bp-Repeats und der TYMS-6Bp-Deletion mit reduzierten Homocysteinkonzentrationen durch die Ergebnisse von nur jeweils einer Studie nicht ausreichend abgesichert sind, müssen weitere Studien zur Festigung der Hypothese durchgeführt werden.

Zu diesem Zweck und um zu überprüfen ob die G-58C-Transversion mit dem Homocysteinspiegel assoziiert ist, wurden 63 gesunde kaukasische Probanden untersucht. Folgende Arbeiten wurden durchgeführt:

1. Bestimmung der Konzentrationen des Gesamthomocysteins (tHcy), des Plasmafolats, des Erythrozytenfolats, des Serumcobalamins, des Serum-Pyridoxal-5-Phosphats und des Kreatinins durch das Laborpersonal.
2. Bestimmung der Genotypfrequenzen der drei bekannten Polymorphismen (6-Bp-Deletion, 28-Bp-Repeat, G-58C-Transversion).
3. DHPLC-Screening der gesamten exonischen DNA-Sequenz des Thymidylatsynthasegens auf unbekannte DNA-Sequenzvariationen. Die flankierenden 5'- bzw. 3'-terminalen Bereiche der sieben Exons wurden bei diesen Untersuchungen mit berücksichtigt.
4. Bestätigung neu gefundener DNA-Sequenzvariationen mittels DNA-Sequenzierung.
5. Bestimmung der Genotypfrequenzen neu gefundener DNA-Sequenzvariationen.

6.2. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der genetische Einfluss der Thymidylatsynthase auf den Homocysteinspiegel bei 63 gesunden kaukasischen Probanden untersucht werden.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Sind die 6-Bp-Deletion, der 28-Bp-Repeat und die G-58C-Transversion bei den 63 untersuchten Probanden mit dem Homocysteinspiegel assoziiert?
2. Gibt es unbekannte DNA-Sequenzvariationen in den sieben Exons und in den angrenzenden intronischen DNA-Bereichen dieser Exons, die mittels DHPLC erkannt werden können?
3. Gibt es unbekannte DNA-Sequenzvariationen die mit dem Homocysteinspiegel assoziiert sind?

6.3. Probanden, Material und Methoden

6.3.1. Probanden und Blutentnahme

Für die Arbeiten der vorliegenden Studie stand eine Subpopulation der EPIC-Studie-Potsdam (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) von 63 gesunden Probanden (29 Frauen, 34 Männer) im Alter von 41-65 Jahren zur Verfügung. Die Probandenrekrutierung, die Datenaufnahme und das Probandenmonitoring für die EPIC-Potsdam-Probanden sind ausführlich beschrieben worden (Boeing *et al.* 1999, Bergmann *et al.* 1999, Dierkes *et al.* 2001, Riboli *et al.* 2002, Drogan *et al.* 2004).

Die Blutentnahme wurde vom Deutschen Institut für Ernährungswissenschaften (DIfE) in Potsdam durchgeführt. Detaillierte Informationen sind von Riboli *et al.* (Riboli *et al.* 2002) publiziert worden.

6.3.2. Laborparameter

Die folgenden Laborparameter wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben, gemessen: Serumcobalamin, Serum-Pyridoxal-5-Phosphat und tHcy.

Plasmafolat und Erythrozytenfolat wurden mit einem Testkit der Firma Abbott Diagnostics gemessen.

6.3.3. Molekularbiologische Arbeiten

6.3.3.1. DNA-Isolierung

Die DNA wurde mittels alkalischer Lyse von peripheren Blutzellen und anschließender Phenol/Chloroform/Amylalkohol-Extraktion isoliert (Dierkes *et al.* 2001).

6.3.3.2. Mutationsanalysen von bekannten Polymorphismen

Die Bestimmung des TYMS-28-Bp-Repeats erfolgte mittels dAGE der PCR-Produkte. Das Versuchsprotokoll wurde in Anlehnung an die Methode von Hishida *et al.* (Hishida *et al.* 2003) entwickelt. Die PCR-Produkte konnten direkt nach der PCR auf das Agarosegel aufgetragen werden. Die TYMS-G-58C-Transversion wurde mittels RFLP bestimmt. Es wurde dasselbe PCR-Produkt wie für den Nachweis des TYMS-28-Bp-Repeats (Hishida *et al.* 2003) benutzt. Der Restriktionsverdau des PCR-Produktes wurde ausgehend von der Methode nach Mandola *et al.* (Mandola *et al.* 2003) durchgeführt. Das optimierte Versuchsprotokoll ist im Anhang in Tabelle 19 protokolliert. Unverdaute (TYMS-28-Bp-Repeat-Mutationsnachweis) und verdaute PCR-Produkte (TYMS-G-58C-Mutationsnachweis) wurden nebeneinander auf ein Agarosegel aufgetragen und

aufgetrennt. Diese Vorgehensweise ermöglichte den gleichzeitigen Nachweis beider Polymorphismen in einer Agarosegelelektrophorese. Die (D)HPLC-Sizing-Methode zum Nachweis der TYMS-6-Bp-Deletion wurde ausgehend von dem PCR-Protokoll von Ulrich *et al.* (Ulrich *et al.* 2002) entwickelt.

Außer den drei bekannten Polymorphismen im Thymidylatsynthasegen wurden auch die MTHFR-C677T-Transition, die GCP II-C1561T-Transition, die RFC I-G80A-Transition und die CBS-844Ins68-Insertion bestimmt. Die drei SNPs wurden mittels DHPLC nachgewiesen. Die CBS-844Ins68-Insertion wurde durch dAGE bestimmt. Die Methoden zur Bestimmung aller untersuchten Polymorphismen, außer der TYMS-G-58C-Transversion, sind in Kapitel 1 (4.3.2.3-4.3.2.8) beschrieben. Bei allen Mutationsnachweisen wurden die notwendigen Leerwerte und Positivkontrollen mitgeführt.

6.3.3.3. DHPLC-Sequenzanalysen

Zu Beginn der praktischen Arbeiten gab es keine publizierten Studien, in denen die codierende DNA-Sequenz der Thymidylatsynthase systematisch auf DNA-Sequenzvariationen untersucht worden war. Deswegen mussten für die Amplifizierung der sieben Exons des Gens PCR-Protokolle entwickelt werden. Als DNA-Matrize wurde die TYMS-DNA-Sequenz D00596.1 des NCBI herangezogen (Abb.: 31). Die Entwicklung der Primer wurde mit der Software Genamics-Expression (Version 1,100[©] 2000) von Genamics durchgeführt. Die Primer wurden nach Möglichkeit so gewählt, dass jeweils circa 50 Basenpaare des flankierenden intronischen 3'-Terminus bzw. 5'-Terminus mit amplifiziert wurden. Die Größe der Amplifikate wurde auf 200 bis 600 Nukleotide beschränkt. Die Differenz der Annealingtemperatur der beiden Primer betrug maximal 2° C, der GC-Gehalt der Primer lag zwischen 40 und 60%. Weitere Kriterien für die Primerauswahl waren die Wahrscheinlichkeit Self-Dimere, Cross-Dimere oder Hairpins zu bilden. Für die ausgewählten Primersequenzen wurde überprüft, ob sie mehrmals im menschlichen Genom vorkommen. Hierzu wurden die Primersequenzen mit Hilfe des auf dem NCBI-Server zur Verfügung stehenden "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) mit den in der NCBI-Datenbank vorhandenen DNA-Sequenzen verglichen (align). Primersequenzen, die im menschlichen Genom mehrmals vorkamen, wurden verworfen. Primersequenzen mit weniger als drei unterschiedlichen Nukleotiden zu anderen Genorten im menschlichen Genom, wurden ebenfalls verworfen.

Für alle durchgeführten PCR-Reaktionen wurde eine Primervorbereitung, eine Primeraustestung und eine PCR-Optimierung durchgeführt. Die optimierten PCR-Protokolle sind im Anhang in Tabelle 19 zusammengefasst. Nach der PCR erfolgte die Hybridisierung der PCR-Produkte, jeweils ohne und mit Kontroll-DNA. Die Primervorbereitung, die Primeraustestung, die PCR-Optimierung und die Hybridisierung der PCR-Produkte sind in Kapitel 1 (4.3.2.7) beschrieben.

Die Ermittlung des DHPLC-Laufmittelgradienten und der idealen Analysetemperatur (Tab.: 12) erfolgte mit Hilfe der WavemakerTM Software anhand der DNA-Sequenzen der PCR-Produkte.

Tabelle 12: DHPLC-Laufmittelgradienten und Analysetemperaturen für die Amplifikate der sieben Exons des Thymidylatsynthasegens.

	Zeit	TYMS-Exons 1 bis 7						
		Exon-1	Exon-2	Exon-3	Exon-4	Exon-5	Exon-6	Exon-7
Arbeitsschritt	[min]	Puffer B [%]						
Probenauftragung	0	54	48	51	50	50	49	48
Start Gradient	0,1	59	53	56	55	55	54	53
Stopp Gradient	4,6	68	62	65	64	64	63	62
Start Waschen (Säule)	4,7	54	48	51	50	50	49	48
Stopp Waschen (Säule)	4,8	54	48	51	50	50	49	48
Start Equilibrieren	4,9	54	48	51	50	50	49	48
Stopp Equilibrieren	5,0	54	48	51	50	50	49	48
DHPLC-Analysetemperaturen [°C]								
niedrigste Analysetemperatur		66,7	55,0	58,0	57,5	59,0	53,2	56,5
mittlere Analysetemperatur		67,5	57,0	59,6	58,3	62,7	56,2	57,7
höchste Analysetemperatur		68,6	59,0	61,0	60,0	63,5	57,4	59,0

6.3.3.4. Verifizierung neu entdeckter DNA-Sequenzvariationen

Traten bei den DHPLC-Sequenzanalysen auffällige Chromatogramme auf, wurde die dazugehörige DNA-Probe noch einmal untersucht, wobei ein neues PCR-Produkt benutzt wurde. PCR-Produkte, bei denen die auffälligen DHPLC-Chromatogramme bestätigt wurden, mussten zur Lokalisierung der verursachenden Sequenzvariationen sequenziert werden. Für die Sequenzierung musste eine eigene PCR durchgeführt werden, weil hier modifizierte Primer eingesetzt wurden. Die bei der Sequenzierung ermittelten Sequenzvariationen wurden anschließend zusätzlich mittels RFLP-Analysen überprüft. Bei dieser Verifizierung wurde dasselbe PCR-Produkt benutzt, welches für die DHPLC-Analysen benutzt worden war. Die Probenvorbereitung für die Sequenzierung und die Durchführung der RFLP-Analysen ist in Kapitel 1 (4.3.2.5) beschrieben.

Exon-1: 205 Bp Amplifikat: 576 Bp (drei 28-Bp-Wiederholungen)
 CTGTGCCACACCCCGTGGCTCCTGCGTTTTCCCCCTGGCGCACGCTCTCTAGAGCGGGGGCCGCCGACCCCGC
 CGAGCAGGAAGAGGGCGGAGCGCGGGACGGCCGCGGAAAGGCGCGCGGAAGGGGTCTGCCACCGCGCCACT
 TGGCTGCTCCGTCCTCCGCCCGGCCACTTGGCCTGCC**TCCGTCCC GCCCGCCCACTTCGCCTGCCCTCCGTCCC**
CCGCCCGCCGCCatgctgtgcccggctcggagctgcgcgcgcgcgccttgcctcccccgcgcgcacaggagcg
 ggacgcccagcgcgcctccgcgcacggggagctgcagtagctggggcagatccaacacatcctccgctgaggc
 gtcaggaaggacgaccgcacgggcaccctgtcggtattcggcatgcaggcgcgctacagcctgagag
GTGACGCCGCGGGCCCTGCGGGACGGGTGGCGGAAAGGAGGGAGGCGCGGCTGGGGAGAGCGCTCGGGAGCT
 GCCGGGCGCTGCGGACCCCGTTTTAGTCCTAACCTCAATCCTGCCAGGGAGGGGACGCATCGTCCTCCTCGCCT
TACAGACGCCGA

Intron-1: 1698 Bp
 Exon-2: 74 Bp Amplifikat: 253 Bp
 TCCAGGCCTCACGTCCCAGGGCAGTTTTCTTCCCTGAAGAAAGTTGGAT**GGCATGATCTGTCTTCCCATCTTG**
AAACCGTATGGCAAATGTTTTTCAGatgaattccctctgctgacaaccaaactgctgtgcttctggaagggtggt
 ttggaggagtgtgctgtggtttatcaag**GTAAGAAGTCGCTGCTATTAGAAGTCAGTAGTCTGTTCTCAACAC**
AGCAGCCAGTGAGATCCTTTCAAAACTCAAAGCAGCCAGGTGTGGTGGCTCACG

Intron-2: 2427 Bp
 Exon-3: 175 Bp Amplifikat: 231 Bp
 AACTGAGAT**GGCTTAAGATTTACCTGGATGCCTGCTCTGCTCTCCCATCTCTTCCAG**ggatccacaaatgct
 aaagagctgtcttccaaggagtgaaaatctgggatgccaatggatcccagactttttggacagcctgggat
 tctccaccagagaagaaggggacttgggccagtttatggcttccagtgaggcattttggggcagaatacag
 agatatggaatcag**GTGAGGAGATAGAACAATGCCTTCCATTTCCGGGTGCCCTTCTAGCACGTGTTTGCTC**

Intron-3: 6272 Bp
 Exon-4: 102 Bp Amplifikat: 313 Bp
 ACTTTGCAGGATGCACCAGATGTCTTGTAGCCATGGGTCAAGGGGGGACCCTGGGTAAGAGACTGTAATAGAT
 GACCTCTAAGGCCATCTCATGACATGTGTGATTAATGTATGTACCTGTCTCTTTTTGACAATTCTACAGa
 ttattcaggacaggagttgaccaactgcaaagagtgattgacaccatcaaaaccaaccctgacgacagaaga
 atcatcatgtgcgcttggaaatccaagag**GTTGAAAGAACC CGTCGTCTTCA**TTATACTAACCATACTCTTA
GAGGAAGCAATCTGGTTTTGTGCAGAGGCACTGAGGGAGG

Intron-4: 1504 Bp
 Exon-5: 176 Bp Amplifikat 347 BP
 CATATGAGTTGGCTTCTGTTTTCTCTCTGTTTTACTTTGCTTTAGCTGT**GGTCTTTCAAACCACCATCCCTC**
CTTATCTTCTCTGCTGGTTCCTCAGatcttccctctgatggcgcctgcctccatgccatgcctctgccagttc
 tatgtggtgaacagtgagctgtcctgccagctgtaccagagatcgggagacatgggctcgggtgtgcctttca
 acatcgccagctacgccctgctcacgtacatgattgcgcacatcacgggctgaag**GTGGGCTGTCTCGGGAA**
GGGTGACTTGCCAGCCTACCACATGAGCTCTTAGTTCTTTAATATGGGAAACAAATTGCAGAGTTAGTCT

Intron-5: 508 Bp
 Exon-6: 72 Bp Amplifikat 287 Bp
 ATTATTTTTTTTAAAAAAGCCTTGCGGTGTCTGCATATTCTAATGTTTTTAAATGAT**TTTTAAAGAATTGAA**
ACTAACATACTGTTCTGCTTTCTCCCGTTTTATAGccaggtgactttatacacactttgggagatgcacatat
 ttacctgaatcacatcgagccactgaaaattcag**GTAAGAATTAGATGTTATACTTTTGGGTTTGGTACCTTC**
TCTTGATAAAAGTTGACTGTGGAACAGGTATCTGCTCAATGCTGTGTCCAAGATAAAGATGACTGCTCCAAA
TGTGGGGCTTCAGTT

Intron-6: 1408 Bp
 Exon-7: 138 Bp Amplifikat 249 Bp
 CGCGAAGGTatcgacaggatcactcctgTAAATAGACATACTCCTGTAAAATAGAACTTTGTTGATCACA
TCCTGTGTACTTGTTCACGGACATGAGGAGCAATTACAACAGGTCGTACAATTATGGCAAATAATGGCCTT
ATTTTGTTTTTAGccttcagcgagaaccagacctttcccaaagctcaggattcttcgaaaagttgagaaaatt
 gatgacttcaaagctgaagactttcagattgaagggtacaatccgcatccaactattaaaatggaaatggctg
 tttag**GGTGCTTTCAAAGGAGCTCGAAGGATATTGTCAGTCTTTAGGGGTTGGGCT**TGGATGCCGA

Abbildung 31: Nukleotidsequenz der sieben Exons des Thymidylsynthasegens mit ihren flankierenden Introns in 5'→3' terminaler Ausrichtung dargestellt (NCBI-Sequenz-ID: D00596.1).

Exon-1 bis 7 des Thymidylsynthasegens sind vollständig dargestellt. Intron-1 bis 6 sind nur mit ihren die Exons 1 bis 7 flankierenden Nukleotiden dargestellt. Die Größe der Introns ist zwischen den Exons angegeben. Kleine Buchstaben: Exon-1 bis 7, fett: 5'- und 3'-flankierende intronische DNA-Bereiche (jeweils 50 Basenpaare), Unterstrichen: Forward- und Reverseprimer, unterstrichene kleine Buchstaben: Forwardprimer für die Sequenzierung von Exon-7. Bp: Basenpaare.

6.4. Ergebnisse

6.4.1. Mutationsanalysen der bekannten Polymorphismen

Bei den Probanden wurden vier bekannte Polymorphismen in den Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels (MTHFR-C677T, der GCP II-C1561T, der RFC I-G80A, CBS-844Ins68) und drei bekannte Polymorphismen im Thymidylatsynthasegen (TYMS-28-Bp-Repeat, TYMS-G-58C-Transversion, TYMS-6-Bp-Deletion) bestimmt. Die Ergebnisse der durchgeführten Mutationsanalysen sind in den Tabelle 13, 14 und 15 dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse der durchgeführten Mutationsanalysen.

Polymorphismen in Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels			
MTHFR-C677T n = 63	GCP II-C1561T n = 63	RFC I-G80A n = 63	CBS-844Ins68 n = 45
Genotypen [n]			
CC: 33	CC: 56	GG: 17	WT/WT: 39
CT: 25	CT: 7	GA: 32	WT/Ins: 6
TT: 5	TT: 0	AA: 14	Ins/Ins: 0
Genotypfrequenzen [%]			
CC: 52	CC: 89	GG: 27	WT/WT: 87
CT: 40	CT: 11	GA: 51	WT/Ins: 13
TT: 8	TT: 0	AA: 22	Ins/Ins: 0
Allelfrequenzen [%]			
C: 72	C: 95	G: 52	WT: 93
T: 28	T: 5	A: 48	Ins: 7
Polymorphismen im Thymidylatsynthasegen			
TYMS-28-Bp-Repeat n = 57	TYMS-G-58C n = 55	TYMS-6-Bp-Deletion n = 59	
Genotypen [n]			
2R/2R: 14	GG: 28	WT/WT: 27	
2R/3R: 25	GC: 25	WT/Del: 24	
3R/3R: 18	CC: 2	Del/Del: 8	
Genotypfrequenzen [%]			
2R/2R: 25	GG: 51	WT/WT: 46	
2R/3R: 44	GC: 45	WT/Del: 41	
3R/3R: 31	CC: 4	Del/Del: 13	
Allelfrequenzen [%]			
2R: 54	G: 74	WT: 66	
3R: 46	C: 26	Del: 34	

n: Anzahl

Tabelle 14: TYMS-28-Bp- und TYMS-G-58C-Genotypen.

	TYMS-28-Bp-Rep n = 57	TYMS-G-58C n = 55
Probanden		
Genotypen n (%)	3R/3R: 18 (31)	3RG/3RG: 6 (11)
		3RG/3RC: 10 (18)
		3RC/3RC: 2 (4)
	3R/2R: 25 (44)	3RG/2RG: 9 (16)
		3RC/2RG: 15 (27)
	2R/2R: 14 (25)	2RG/2RG: 13 (24)

2R: Zwei 28-Bp-Repeats, 3R: drei 28-Bp-Repeats, 3RG: drei 28-Bp-Repeats und Guanin, 3RC: drei 28-Bp-Repeats und Cytosin, 2RG: zwei 28-Bp-Repeats und Cytosin. n: Anzahl.

In Abbildung 32A ist das Amplifikat für den Nachweis des TYMS-28-Bp-Repeats und der TYMS-G-58C-Transversion dargestellt. Die G-58C-Transversion erzeugt eine zusätzliche *Hae*III-Schnittstelle im zweiten 28-Basenpaar-Repeat des 3R-Allels. Dadurch wird das 94 Basenpaare große Fragment in zwei Fragmente von 28 und 66 Basenpaaren geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau zeigten 2RG/2RG, 2RG/3RG und 3RG/3RG sowie 2RG/3RC und 3RG/3RC Probanden identische Bandenmuster (Abb.: 32B). Deswegen konnten die TYMS-G-58C-Genotypen nur ermittelt werden, wenn die unverdauten Proben zum Nachweis des 28-Bp-Repeats auf demselben Agarosegel analysiert wurden.

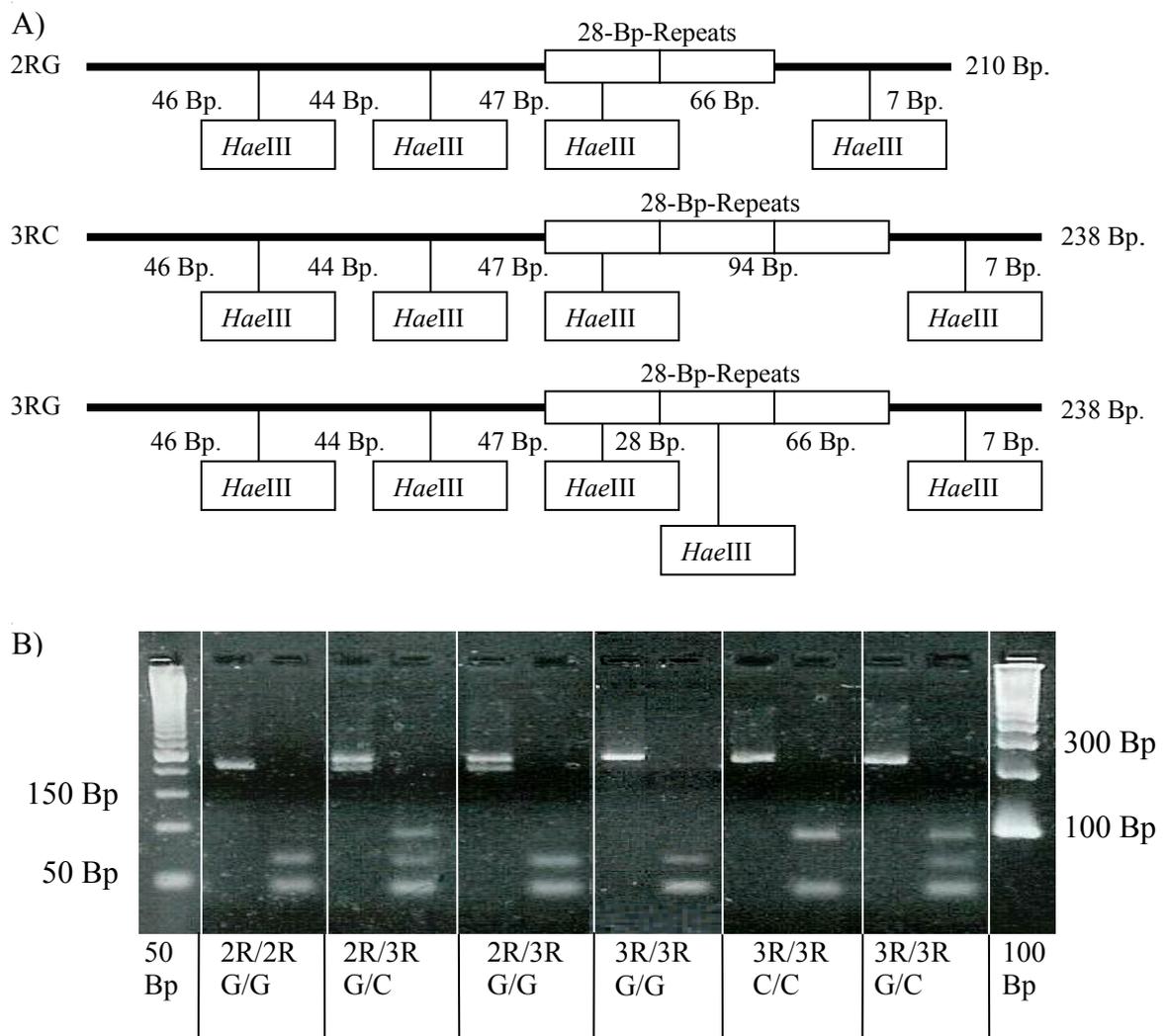


Abbildung 32: TYMS-28-Bp-Repeat- und TYMS-G-58C-Transversion-Mutationsnachweise.
 A) *Hae*III-Erkennungssequenzen im PCR-Produkt nach der Methode von Hishida *et al.* 2003.
 B) dAGE- und RFLP-Nachweis des TYMS-28-Bp-Repeats und der TYMS-G-58C-Transversion. TYMS-28-Bp-Repeat: linke, unverdaute Proben. 2R/2R: 210Bp, 2R/3R: 238/210 Bp, 3R/3R: 238 Bp. TYMS-G-58C-Transversion: rechte unverdaute und linke, mit *Hae*III verdaute Proben, müssen zusammen ausgewertet werden. 2RG/2RG: 66, 47, 46, 44, 7 Bp, 2RG/3RC: 94, 66, 47, 46, 44, 7 Bp, 2RG/3RG: 66, 47, 46, 44, 28, 7 Bp, 3RG/3RG: 66, 47, 46, 44, 28, 7 Bp, 3RC/3RC: 94, 47, 46, 44, 7 Bp, 3RG/3RC: 94, 66, 47, 46, 44, 28, 7 Bp. 3% Agarosegel, Laufzeit 45 min bei 100 V konstant.

Die Analyse der unverdauten und verdauten PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese ermöglichte die effiziente und zweifelsfreie Bestimmung beider Polymorphismen. Allele mit mehr als drei 28-Bp-Repeats oder mit zwei 28-Bp-Repeats (2RC-Allel) wurden bei den untersuchten Probanden nicht gefunden. Die TYMS-6-Bp-Deletion konnte bei allen untersuchten Probanden problemlos mittels (D)HPLC-Sizing bestimmt werden.

6.4.2. DHPLC-Screening nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen

Die Ergebnisse der DHPLC-Sequenzanalysen sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Für die Amplifikate der Exons 1, 2, 6 und 7 des Thymidylatsynthasegens wurden unterschiedliche Chromatogramme erkannt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisse der DHPLC-Sequenzanalysen der Amplifikate der sieben Exons des Thymidylatsynthasegens.

Chromatogramme [n]							
TYMS-Exon	Exon-1 ⁽¹⁾	Exon-2	Exon-3	Exon-4	Exon-5	Exon-6	Exon-7
Probanden ⁽ⁿ⁾	46	44	54	58	47	46	54
unterschiedl. Chromatogramme ⁽ⁿ⁾	4	2	---	---	---	2	3
Chromatogramm 0 ⁽ⁿ⁾	7	43	54	58	47	33	24
Chromatogramm 1 ⁽ⁿ⁾	10	1	---	---	---	13	18
Chromatogramm 2 ⁽ⁿ⁾	11	---	---	---	---	---	12
Chromatogramm 3 ⁽ⁿ⁾	18	---	---	---	---	---	---
Polymorphismen							
Exon-2 8-Bp-Deletion (neue Sequenzvariation)	n = 44	Exon-6 C>T-Transition (rs2853536) ⁽²⁾	n = 46	Exon-7 C>T-Transition (rs1059394) ⁽²⁾	n = 46	Exon-7 A>G-Transition (rs1059393) ⁽²⁾	n = 54
Genotypen [n]							
WT/WT: 43	CC: 25		CC: 19		AA: 46		
WT/Del: 1	CT: 13		CT: 19		AG: 7		
Del/Del: 0	TT: 8		TT: 8		GG: 1		
Genotypfrequenzen [%]							
WT/WT: 98	CC: 55		CC: 41		AA: 85		
WT/Del: 2	CT: 28		CT: 41		AG: 13		
Del/Del: 0	TT: 17		TT: 18		GG: 2		
Allelfrequenzen [%]							
WT: 99,86	C: 68		C: 62		A: 92		
Del: 1,14	T: 32		T: 38		G: 8		

Chromatogramm 0 = Wildtyp (WT)

Chromatogramm 1-3 = verschiedene vom Wildtypchromatogramm abweichende Chromatogramme

⁽ⁿ⁾ Anzahl

⁽¹⁾ Die Chromatogramme konnten dem TYMS-28-Bp-Repeat, der TYMS-G-58C und der TYMS-6-Bp-Deletion zugeordnet werden. Die Genotypen sind in Tabelle 13 und 14 aufgeschrieben.

⁽²⁾ Bezeichnung bei NCBI

Die Sequenzierungen ergaben, dass die verursachenden Sequenzvariationen in den Amplifikaten von Exon-1 (TYMS-28-Bp-Repeat, TYMS-G-58C), von Exon-6 (TYMS-T661520C (rs2853536)) und von Exon-7 (TYMS-C662792T (rs1059394)), TYMS-A662836G (rs1059393)) schon beschrieben waren. Sie sind in den flankierenden Introns

der drei Exons lokalisiert. Die Sequenzvariation im Exon-2-Amplifikat war noch nicht beschrieben. Sie wird später ausführlich besprochen.

Bei den Analysen der Amplifikate der Exons 3, 4 und 5 des Thymidylatsynthasegens wurden keine vom jeweiligen Wildtypchromatogramm unterschiedlichen Chromatogramme gefunden.

TYMS-Exon-1

Wegen des sehr hohen GC-Gehalts der DNA-Sequenz im 5'-terminalen-Bereich des Startcodons (ATG) des Thymidylatsynthasegens war das Primerdesign für das Exon-1 problematisch. Erschwerend kam hinzu, dass der 28-Bp-Repeat 97 (3R) bzw. 69 (2R) Nukleotide vor dem Startcodon beginnt und aus drei oder zwei nahezu identischen Wiederholungen von 28 Nukleotiden besteht (Abb.: 33A). Er endet 13 Nukleotide vor dem Startcodon. Weil die 13 Nukleotide zwischen dem Startcodon und dem 28-Bp-Repeat nicht als Primersequenz geeignet sind, wurde bei der PCR für das Exon-1 nach Volcik *et al.* (Volicik *et al.* 2003) der 28-Bp-Repeat mit amplifiziert. Bei heterozygoten Probanden kam es aufgrund der unterschiedlichen Allele (2R-Allel, 3R-Allel) grundsätzlich zu ausgeprägten Heteroduplexchromatogrammen (Abb.: 33D). Da die Maskierung unbekannter Sequenzvariationen durch die 2R/3R Heteroduplexchromatogramme nicht auszuschließen war, wurden bei heterozygoten 28-Bp-Probanden keine DHPLC-Sequenzanalysen durchgeführt.

Das Amplifikat für das Exon-1 des Thymidylatsynthasegens wurde bei 66,7° C, bei 67,5° C und bei 68,6° C mittels DHPLC untersucht. Es konnten vier unterschiedliche Chromatogramme für jede der drei Analysetemperaturen gefunden werden (Tab.: 15). Die drei auffälligen Heteroduplexchromatogramme wurden bei allen drei Analysetemperaturen bei denselben Probanden gefunden. Bei 67,5° C waren die Heteroduplexchromatogramme am deutlichsten von den Homoduplexchromatogrammen zu unterscheiden (Abb.: 33D1-D4). Die Heteroduplexchromatogramme lassen sich dem TYMS-28-Bp-Repeat (Abb.: 33D4) und der TYMS-G-58C-Transversion (Abb.: 7D1-3) im TYMS-28-Bp-Repeat zuordnen. Die Homoduplexchromatogramme der 3RG/3RG-, 3RC/3RC- (nicht abgebildet) und 2RG/2RG-Probanden hatten nur einen Peak (Abb.: 33D1 und D2). Die Retentionszeit des Peaks war bei 2R/2R Probanden kürzer als bei 3R/3R Probanden (Abb.: 33D2). Die TYMS-G-58C-Transversion war mittels DHPLC nur bei Probanden mit zwei identischen TYMS-28-Bp-Repeat-Allelen (3R/3R, 2R/2R) nachweisbar. Das Heteroduplexchromatogramm eines 3RG/3RC-Probanden hatte eine linksseitige Schulter (Abb.: 33D2).

Bei heterozygoten TYMS-28-Bp-Probanden wurde diese Schulter nicht erkannt, was auf eine Maskierung der TYMS-G-58C-Tranversion durch den TYMS-28-Bp-Repeat hinweist. Abbildung 33D4 zeigt das dreigipfelige Chromatogramm eines heterozygoten TYMS-28-Bp-Repeat-Probanden (2R/3R). Auch mittels DHPLC wurden keine 2RC-Allele oder Allele mit mehr als drei 28-Bp-Repeats gefunden.

TYMS-Exon-2

Das Amplifikat für das Exon-2 des Thymidylatsynthasegens wurde bei 55,0° C, bei 57,0° C, und bei 59,0° C untersucht. Das Homoduplexchromatogramm des Wildtyps hatte bei allen drei Temperaturen einen Peak. Bei einem Proband wurden bei den Analysen mit 55° C und mit 57° C vom Wildtypchromatogramm unterschiedliche Chromatogramme erhalten (Abb.: 34D1). Die beiden auffälligen Chromatogramme (55° C, 57° C) waren identisch. Sie zeigten einen Doppelpeak (Abb.: 34D1). Bei den Analysen mit 59° C wurden keine Peaks im Chromatogramm gefunden. Die Agarosegelelektrophorese (Abb.: 34E), das (D)HPLC-Sizing (Abb.: 34D2) und die DNA-Sequenzierung (Abb.: 34F) der Probandenprobe erbrachten deutliche Hinweise auf eine Deletion von mehreren Nukleotiden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die drei Peaks einer (D)HPLC-Sizing-Analyse (Abb.: 34D2) mit einem Fragmentsammler (Transgenomic) gesammelt und erneut mittels PCR amplifiziert. Das anschließende (D)HPLC-Sizing der PCR-Produkte der drei gesammelten Peaks resultierte in drei unterschiedlichen Chromatogrammen (Ergebnisse nicht dargestellt). Das Chromatogramm des PCR-Produktes des Peaks mit der kürzesten Retentionszeit (8,25 min) war identisch mit dem des ursprünglichen Probanden-PCR-Produktes (Abb.: 34D2). Das Chromatogramm des PCR-Produktes des Peaks mit der längsten Retentionszeit (8,85 min) hatte nur einen Peak. Die Retentionszeit entsprach der des gesammelten Ausgangspeaks (8,85 min) und war identisch mit der Retentionszeit eines Wildtyp-PCR-Produktes (8,85 min) (Abb.: 34D2). Das Chromatogramm des PCR-Produktes des Peaks mit der zweitlängsten Retentionszeit (8,65 min) hatte ebenfalls nur einen Peak mit der gleichen Retentionszeit des gesammelten Ausgangspeaks (8,65 min) (Abb.: 34D2). Die um 0,25 min kürzere Retentionszeit legte nahe, dass der gesammelte ursprüngliche Peak ein Allel mit einer Deletion repräsentierte. Zur Lokalisierung der postulierten Deletion wurde die gesammelte DNA-Probe dieses Peaks (Retentionszeit: 8,65 min) sequenziert. Es wurde eine 8-Basenpaar-Deletion (5' AGTTGGAT 3') gefunden (Abb.: 34F). Die Deletion liegt 58 Nukleotide vor dem ersten Nukleotid von Exon-2. Die

flankierenden 5'-terminalen bzw. 3'-terminalen Nukleotide sind 5' CCTGAAGAA 3' und 5' GGCATGATC 3' (Abb.: 34A).

A) Amplifikatsequenz TYMS-Exon-2

5' TCCAGGCCTCCAGTCCCAGGGCAGTTTTCTTCCCTGAAGAAAGTTGGATGGCATGATCTGTCTTCCCATC
 TTGAAACCGTATGGCAAATTGTTTTTCAGatgaattccctctgctgacaaccaaacgtgtgttctggaagggt
 gttttggaggagtgtgctgtggtttatcaagGTAAAGAAGTCGCTGCTATTAGAAGTCAGTAGTCTGTTCTCAA
 CACAGCAGCCAGTGAGATCCTTTCAAAACTCAAAGCAGCCAGGTGTGGTGGCTCACG 3'

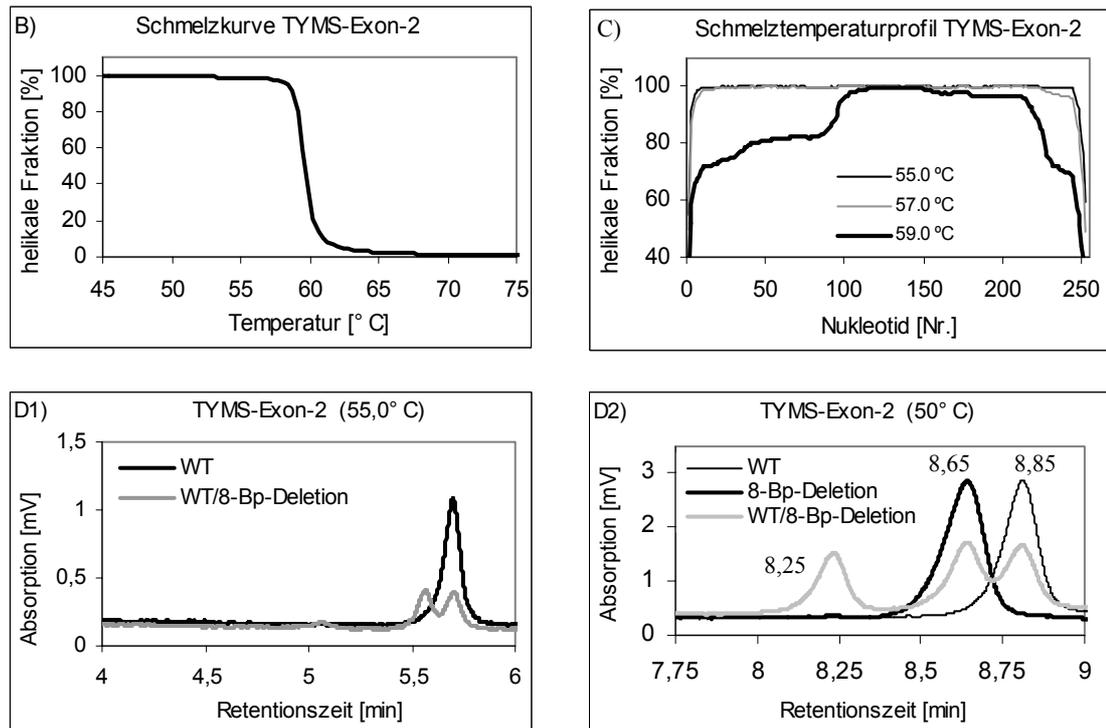


Abbildung 34: DHPLC- (D)HPLC-Sizing- und dAGE-Sequenzanalysen sowie DNA-Sequenzierung am Exon-2 des Thymidylatsynthasegens.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die 8-Bp-Deletion (Nukleotid Nr. 32-40 von 253) ist schattiert. Exon-2 ist in kleinen Buchstaben dargestellt.

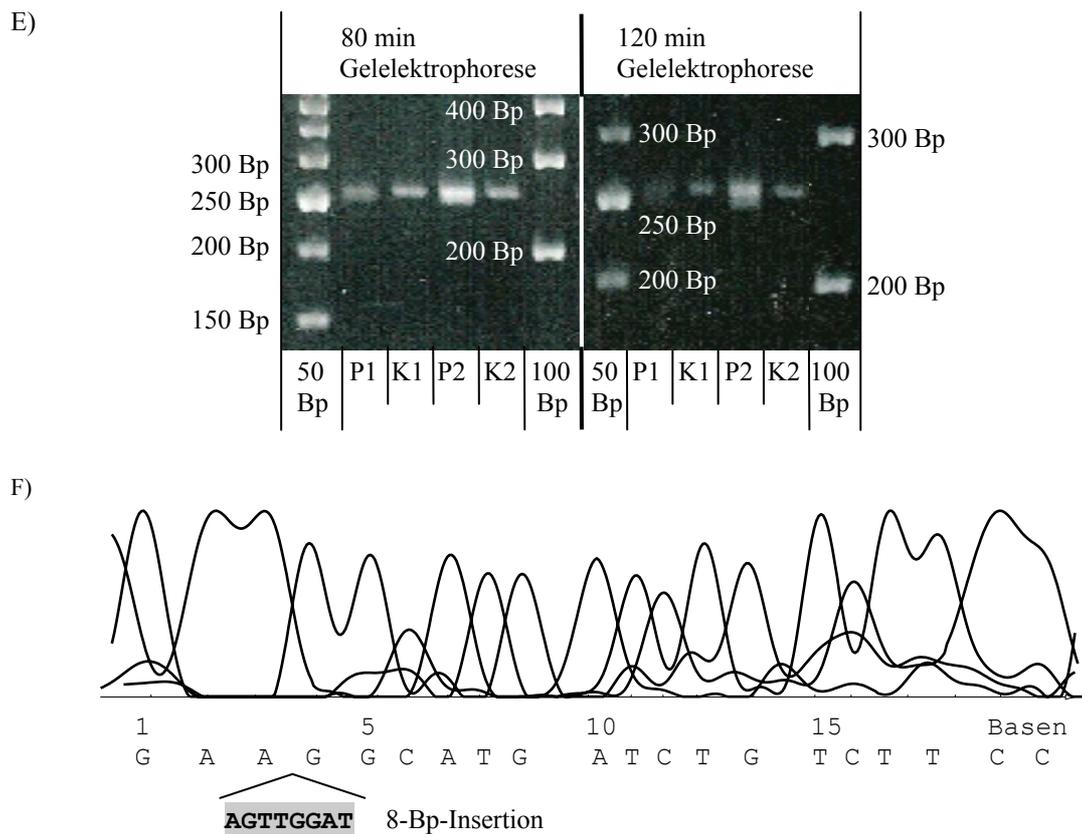
B) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 58° C in DNA-Einzelstränge. Bei 61° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

C) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-94 Bp, bei 59,0° C sind zwischen 70 und 80% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 95-215 Bp, bei 59,0° C sind mehr als 96% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 216-253 Bp, bei 59,0° C sind zwischen 96 und 67% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

D1) DHPLC-Homo- und Heteroduplexchromatogramme: WT: Wildtyp, 8-Bp-Deletion.

D2) (D)HPLC-Sizing-Homo- und Heteroduplexchromatogramme: WT: Wildtyp, 8-Bp-Deletion.

Abbildung 34: Fortsetzung.



E) Direkte Agarosegelelektrophorese: Die Proben wurden mit einem 3% Agarosegel aufgetrennt. Die Spannung betrug 100V konstant. Das Gel wurde nach 80 min (links) und nach 120 min Laufzeit (rechts) fotografiert. Proben von links nach rechts: 50-Basenpaarleiter, P1: Probe1, K1: Kontrolle1, P2: Probe2, K2: Kontrolle2, 100-Basenpaarleiter. Es wurden zwei unabhängige Probenaufarbeitungen durchgeführt (P1 und K1, P2 und K2). Die PCR-Produkte der Probe1 und der Kontrolle1 sind niedriger konzentriert als die der zweiten Probenaufarbeitung. Nach einer Laufzeit von 80 min war bei Probe1 schwach und bei Probe2 deutlich zu erkennen, dass eine zweite DNA-Bande mit einem niedrigeren Molekulargewicht in dem PCR-Produkt vorhanden war. Bei Probe2 waren die beiden DNA-Banden nach 120 min Laufzeit voneinander getrennt.

F) Sequenzierung des PCR-Produktes des auffälligen Probanden.

AGTTGGAT: 8-Bp-Deletion, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

TYMS-Exon-3

Das Exon-3 des Thymidylatsynthasegens enthält zwei bekannte DNA-Sequenzvariationen (T>C-Transition (NCBI: rs11540152), G>A-Transition (NCBI: rs3786362) (Abb.: 35A). Die an das Exon-3 angrenzenden Introns 2 und 3 enthalten beide jeweils einen Polymorphismus innerhalb der ersten 50 flankierenden Nukleotide (A>G-Transition (NCBI: rs1001761), C>T-Transition (NCBI: rs2612095) (Abb.: 35A). Da die beiden intronischen Polymorphismen eine DHPLC-Sequenzanalyse behindert hätten, wurde das Amplifikat für die DHPLC-Sequenzanalysen so entwickelt, dass sie nicht mit amplifiziert wurden. Der Nachteil des Ausschlusses dieser zwei Polymorphismen liegt darin, dass das generierte Amplifikat nur noch drei (5'-Terminus) bzw. sieben Nukleotide (3'-Terminus)

von den angrenzenden Introns 2 und 3 enthält (Abb.: 35A), die auf Sequenzvariationen untersucht werden. Befindet sich eine Sequenzvariation weiter innerhalb der beiden flankierenden Introns, kann sie nicht detektiert werden.

Das Amplifikat für das Exon-3 des Thymidylatsynthasegens wurde bei 58° C, bei 59,6° C und bei 61° C mittels DHPLC analysiert. Es wurden keine heterozygoten DNA-Sequenzvariationen erkannt.

A) Amplifikatsequenz TYMS-Exon-3

5' AGATGGCTTAAGATTTACCTGGATGCCTGCTCTGCTCTCCCCATCTCTTCCAGgggatccacaaatgctaa
agagctgtcttccaagggagtgaaaatctgggatgccaatggatcccagagactttttggacagcctgggattc
tccaccagagaggaaggggacttgggccagtttatggcttccagtggaggcattttggggcagaatacagag
atatggaatcagGTGAGGAGATAGAACAAATGCCTTCCATTTCCGGGTGCCCTTCTAGCACGTGTTTTGCTC 3'

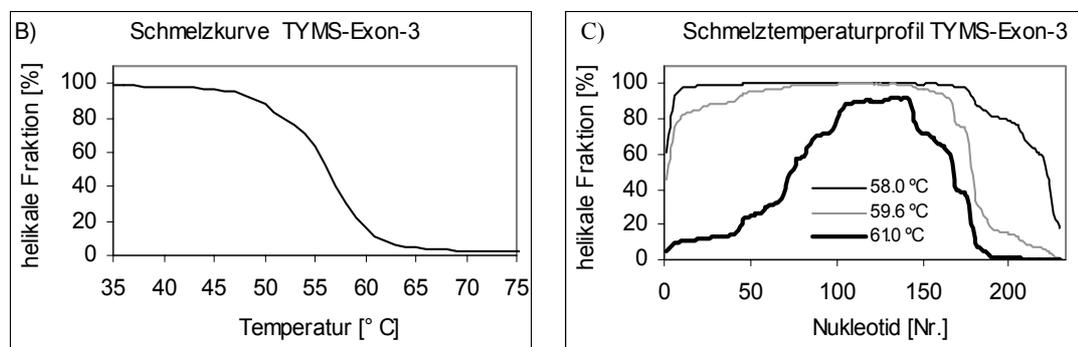


Abbildung 35: DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-3 des Thymidylatsynthasegens.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Exon-3 ist in kleinen Buchstaben dargestellt. Die bekannten DNA-Sequenzvariationen sind schattiert. **A**: rs1001761, **t**: rs11540152, **g**: rs3786362, **C**: rs2612095. Das TYMS-Exon-3-Amplifikat hat 231 Nukleotide.

B) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 45° C in DNA-Einzelstränge. Bei 69° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

C) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-110 Bp, bei 61° C sind zwischen 10 und 85% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Die Schmelztemperatur nimmt vom 1. zum 110. Nukleotid kontinuierlich zu. 2) 111-143 Bp, bei 61° C sind 90% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 144-231 Bp, bei 58° C sind zwischen 100 und 18% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Die Schmelztemperatur nimmt vom 144. zum 231. Nukleotid kontinuierlich ab.

TYMS-Exon-4

Das Exon-4 des Thymidylatsynthasegens enthält zwei bekannte DNA-Sequenzvariationen (G>T-Transversion (NCBI: rs596909), C>T-Transition (NCBI: rs11540153)) (Abb.: 36A). Das Amplifikat für die DHPLC-Analysen des vierten Exons des Thymidylatsynthasegens wurde bei 57,5° C, bei 58,3° C und bei 60° C mittels DHPLC analysiert. Es wurden keine heterozygoten Probanden gefunden.

A) Amplifikatsequenz TYMS-Exon-4

```
5' ACTTTGCAGGATGCACCAGATGTCTTGTAGCCATGGGTCAAGGGGGGACCCTGGGTAAGAGACTGTAATA
GATGACCTCTAAGGCCATCTCATGACATGTGTGATTAATGTATGTACCTGTCCTCTCTTTTTGACAATTCTAC
AGattattcaggacagggagttgaccaactgcaagagtgattgacacatcaaaaccaaccctgacgacaga
agaatcatcatgtgcgcttggaatccaagagGTTGAAAGAACCCCGTCGTCTTCATTTATACTAACCATACTC
TTAGAGGGAAGCAATCTGGTTTTGTGCAGAGGCACTGAGGGAGG 3'
```

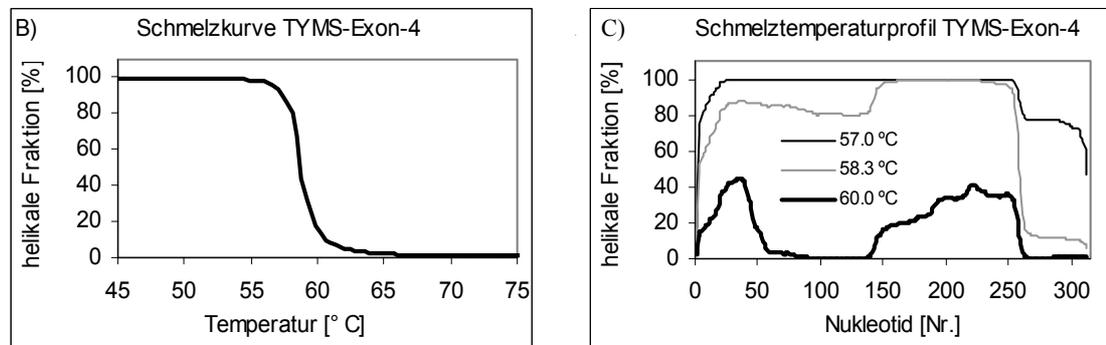


Abbildung 36: DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-4 des Thymidylatsynthasegens.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Exon-4 ist in kleinen Buchstaben dargestellt. Die bekannten DNA-Sequenzvariationen sind schattiert. **g**: rs596909, **c**: rs11540153. Das TYMS-Exon-4-Amplifikat hat 313 Nukleotide.

B) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 57° C in DNA-Einzelstränge. Bei 60° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

C) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-140 Bp, bei 58,3° C sind zwischen 60 und 87% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 141-254 Bp, bei 58,3° C sind 100% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 255-313 Bp, bei 58,3° C sind weniger als 15% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

TYMS-Exon-5

Das Amplifikat für die DHPLC-Analysen des Exons 5 des Thymidylatsynthasegens wurde bei 59° C, bei 62,7° C und bei 63,5° C analysiert. Es wurden keine Probanden heterozygoten DNA-Sequenzvariationen detektiert.

A) Amplifikatsequenz TYMS-Exon-5

```
5' CATATGAGTTGGCTTCTGTTTCTCTCCTGTTTTACTTTGCCTTTAGCTGTGGTCTTTCAAACCACCATCC
CTCCTTATCTTCCTCTGCTGGTTCCCTCAGatcttcctctgatggcgctgcctccatgccatgccctctgccag
ttctatgtgggtgaacagtgagctgtcctgccagctgtaccagagatcgggagacatgggectcggtgtgcctt
tcaacatgccagctacgccctgctcacgtacatgattgcgcacatcacgggcctgaagGTGGGCTGTCTCGG
GAAGGGTGACTTGCCAGCCTACCACATGAGCTCTTCAGTTCTTTAATATGGGAAAACAAATTGCAGAGTTTAG
TCTCT 3'
```

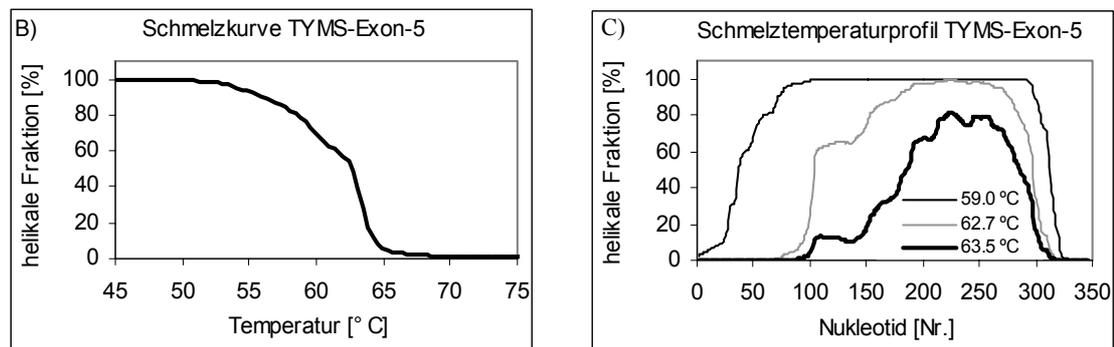


Abbildung 37: DHPLC-Sequenzanalysen am Exon-5 des Thymidylatsynthasegens.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Exon-5 ist in kleinen Buchstaben dargestellt.

B) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 54° C in DNA-Einzelstränge. Bei 65° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

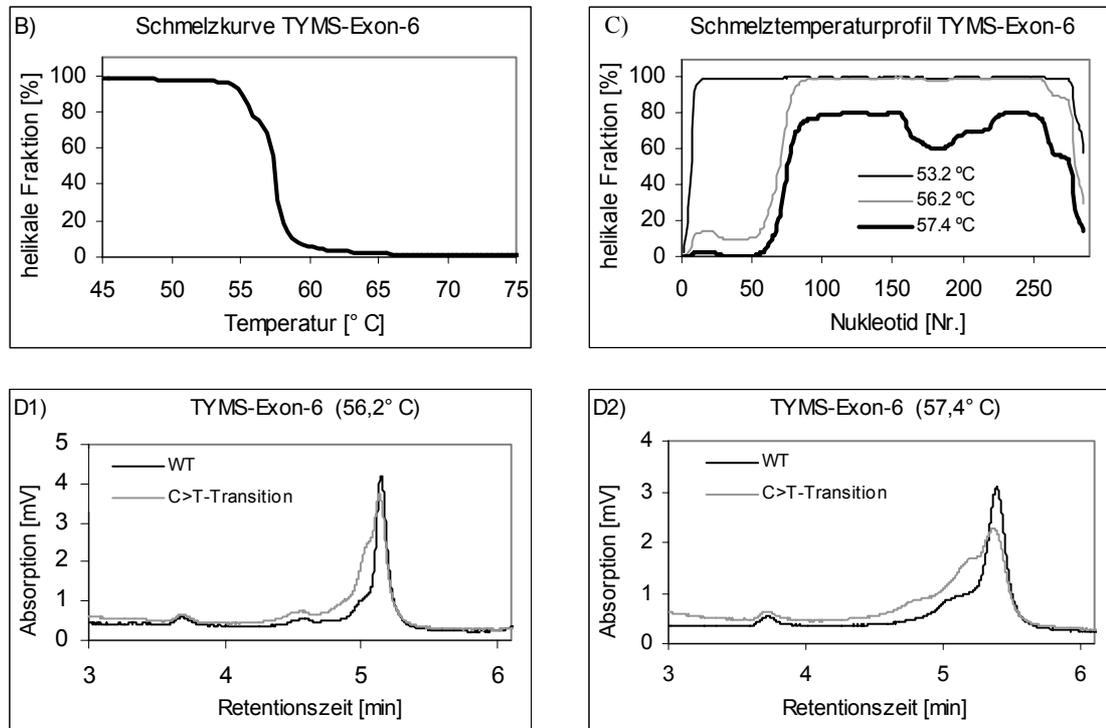
C) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 1-100 Bp, bei 62,7° C liegt die DNA dieses Bereichs noch vollständig in der Doppelhelixformation vor. 2) 101-309 Bp, bei 62,7° C sind zwischen 60 und 100% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. Die Schmelztemperatur nimmt vom 1. Nukleotid bis zum 220. kontinuierlich zu. Ab dem 221. Nukleotid nimmt sie kontinuierlich ab. 3) 310-347 Bp, bei 62,7° C liegt die DNA dieses Bereichs noch vollständig in der Doppelhelixformation vor.

TYMS-Exon-6

Das Amplifikat für das Exon-6 der Thymidylatsynthase wurde bei 53,2° C, bei 56,2° C und bei 57,4° C mittels DHPLC nach heterozygoten Sequenzvariationen untersucht. Die Analysen bei 53,2° C erbrachten keine unterschiedlichen Chromatogramme (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei den Analysen mit 56,2° C und 57,4° C konnten zwei unterschiedliche Chromatogramme erkannt werden (Abb.: 38D1 und D2). Das Homoduplexchromatogramm des Wildtyps zeigte bei diesen zwei Temperaturen nur einen Peak. Bei dem Heteroduplexchromatogramm hatte dieser Peak eine linksseitige Schulter, die bei den Analysen mit 57,4° C (Abb.: 38D2) deutlicher ausfiel als bei den Analysen mit 56,2° C (Abb.: 38D1). Die auffälligen Chromatogramme wurden bei 56,2° C und bei 57,4° C jeweils bei denselben Probanden gefunden.

A) Amplifikatsequenz TYMS-Exon-6

5' ATTATTTTTTTTAAAAAAGCCTTGCGGTGTCTGCATATTCTAATGTTTTTAAATGATGTTTTAAAGAATT
GAACTAACATACTGTTCTGCTTTCTCCCGGTTTATAGccagggtgactttatacacactttgggagatgcaca
tatttacctgaatcacatcgagccactgaaaattcagGTAAGAATTAGATGTTATACTTTTGGGTTTGGTACC
TTCTCTTGATAAAAGGTTGACTGTGGAACAGGTATCTGCTCAATGCTGTGTCCAAGATAAAGATGACTGCTCC
AAATGTGGGGCTTCAGTT 3'



E)

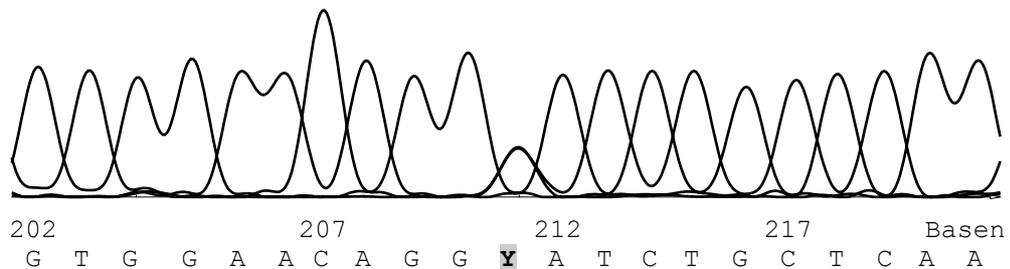


Abbildung 38: DHPLC-Sequenzanalysen und DNA-Sequenzierung am Exon-6 des Thymidylatsynthasegens.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Die C>T-Transition (rs2853536, Nukleotid Nr. 239 von 287) ist schattiert. Exon-6 ist in kleinen Buchstaben dargestellt.

B) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 54° C in DNA-Einzelstränge. Bei 59° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

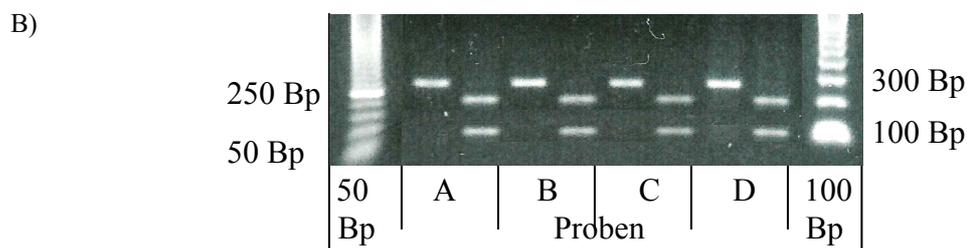
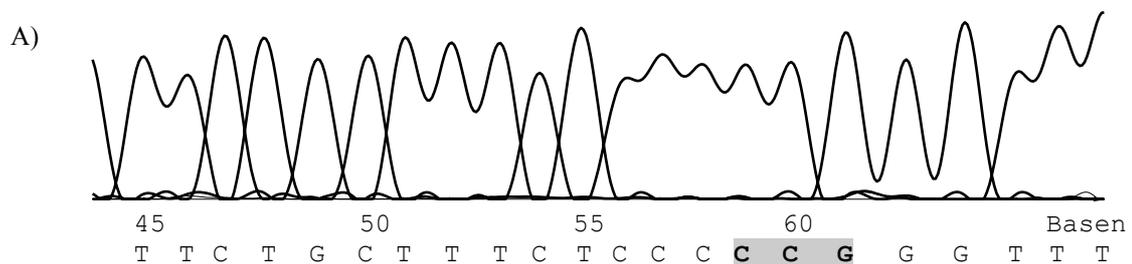
C) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat drei Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-58 Bp, bei 56,2° C sind noch zwischen 15 und 18% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 59-158 Bp, bei 57,4° C sind noch 80% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 159-287 Bp, bei 57,4° C sind zwischen 55 und 80% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

D) DHPLC-Homo- und Heteroduplexchromatogramme: WT: Wildtyp, C>T-Transition.

E) Sequenzierung der C>T-Transition (rs2853536) im Exon-6 des Thymidylatsynthasegens. **Y**: C>T-Transition bei einer heterozygoten Probe, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei der verursachenden DNA-Sequenzvariation um die bei NCBI beschriebene T>C-Transition rs2853536 handelte (Abb.: 38E). Die ermittelten Allel- und Genotypfrequenzen sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Bei der Sequenzierung wurde bei allen sequenzierten Proben (zwei auffällige heterozygote Proben und zwei Wildtypkontrollen) eine weitere DNA-Sequenzvariation gefunden. Es handelte sich um eine CCG-Insertion, die im 3'-terminalen Bereich des fünften Introns lokalisiert war (Abb.: 39A, B und C). Die Bestätigung der Insertion erfolgte mittels RFLP. Diese CCG-Insertion wurde bei allen vier Probanden immer in beiden Allelen detektiert. Die Überprüfung der mittels Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenz in den NCBI- und UCSC-DNA-Datenbanken ergab keine Übereinstimmungen mit den vorhandenen Datenbanksequenzen.



C) Ermittelte DNA-Sequenz

5' attatttttttTAAAAAAGCCTTGC~~CGT~~GTCTgcatattctaattgtttttaaatgatgttttaagaatt
gaaactaacatactgttctgctttctccc**CC↓G**ggtttatagccaggtgactttatacacactttgggagatg
cacatatttacctgaatcacatcgagccactgaaaattcaggaagaattagatgttataacttttgggtttgg
taccttctcttgataaaagggttgactgtggaacaggTatctgctcaatgctgtgtccaagataAAGATGACTG
CTCCAATGTGGggttcagtt 3'

Abbildung 39: Mutationsnachweis der CCG-Insertion im Intron-5 des Thymidylatsynthasegens.

A) Sequenzierung der TYMS-CCG-Insertion im Intron-5 der Thymidylatsynthase. **CCG**: Insertion, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

B) RFLP-Mutationsanalyse der TYMS-CCG-Insertion im Intron-5 der Thymidylatsynthase. Verdau mit *Sma*I (Fermentas) für 16 h bei 30° C, Inaktivierung bei 65° C für 20 min, 2% Agarosegel, Laufzeit 30 min bei 100 V konstant, links unverdaute, rechts verdaute Proben. Proben von links nach rechts: 50-Basenpaarleiter, Probe A, B, C und D, 100-Basenpaarleiter. Das Amplifikat wird geschnitten wenn die CCG-Insertion vorhanden ist. Resultierende Banden: Ins/Ins 199, 91 Bp, Ins/WT 287, 199, 91 Bp, WT/WT 287 Bp. Alle vier untersuchten Probanden haben denselben Genotyp (Ins/Ins).

C) Ermittelte DNA-Amplifikatsequenz für die DHPLC-Analysen am Exon-6 der Thymidylatsynthase. Die CCG-Insertion (Nukleotid Nr. 90-92 von 287) ist schattiert. **T**: C>T-Transition (rs2853536). Die beiden Primer sind unterstrichen. Exon-6 ist in kleinen Buchstaben dargestellt. *Sma*I-Erkennungssequenz und -Schnittstelle (↓): 5' CCC↓GGG 3'.

TYMS-Exon-7

Bei Exon-7 sind nach der Primerentwicklung zwei neue intronische Sequenzvariationen im 5'-terminalen Bereich der amplifizierten DNA veröffentlicht worden (T>C-Transition (rs1059394), A>G-Transition (rs1059393)) (Abb.: 40A). Diese wurden bei der Sequenzierung nicht erfasst, weil sie zu nahe am Forwardprimer lokalisiert waren. Um überprüfen zu können, ob diese Sequenzvariationen den von uns gefundenen Heteroduplexchromatogrammen entsprachen, musste für die Sequenzierung des TYMS-Exon-7-Amplifikates ein neuer, weiter im Intron-6 liegender Forwardprimer entwickelt werden (Abb.: 40A).

Die DHPLC-Analysen am Exon-7 des Thymidylatsynthasegens wurden bei 56,5° C, 57,5° C und 59,0° C durchgeführt. Bei allen drei Analysetemperaturen wurden jeweils drei unterschiedliche Chromatogramme erhalten. Die zwei auffälligen Heteroduplexchromatogramme und die Homoduplexchromatogramme der Wildtypen (Abb.: 40D1-4) wurden immer bei denselben Probanden gefunden. Bei 56,5° C waren die Heteroduplexchromatogramme am deutlichsten von den Homoduplexchromatogrammen und untereinander zu unterscheiden. Abbildung 40D1 zeigt das Chromatogramm eines Wildtyps und das auffällige Chromatogramm eines heterozygoten Probanden (C>T-Transition) bei einer Analysetemperatur von 56,5° C. In Abbildung 40D2 sind die Chromatogramme derselben zwei Probanden, allerdings bei 57,7° C analysiert, dargestellt. Der Peak des Homoduplexchromatogramms ist hier breiter und deutlich niedriger als bei den DHPLC-Analysen mit 56,5° C. Die zwei gleich großen Heteroduplexpeaks, die bei den Analysen mit 56,5° C beobachtet wurden, sind hier als ein breiter Peak mit einer kleinen rechtsseitigen Schulter zu erkennen. Die Heteroduplexchromatogramme repräsentieren die bei NCBI beschriebene TYMS-C662792T-Transition (NCBI: rs1059394). Das zweite auffällige Heteroduplexchromatogramm (A>G-Transition) hatte bei den Analysen mit 56,5° C einen unscharfen Heteroduplexpeak vor dem Homoduplexpeak (Abb.: 40D3). Bei den Analysen mit 57,7° C zeigten dieselben Probanden Heteroduplexchromatogramme mit einem deutlichen Heteroduplexpeak und einem reduzierten Homoduplexpeak gegenüber den Analysen mit 56,5° C (Abb.: 40D4). Bei den Analysen mit 57,7° C waren die zwei Heteroduplexchromatogramme (Probe 1 und 2) an einer rechtsseitigen Schulter im Heteroduplexpeak und unterschiedlichen Retentionszeiten zu unterscheiden (Abb.: 40D4). Bei diesem Polymorphismus handelte es sich um die bei NCBI beschriebene A>G-Transition rs1059393. Beide DNA-Sequenzvariationen wurden mittels DNA-Sequenzierung bestätigt (Abb.: 40E und F). Die

errechneten Allel- und Genotypfrequenzen der DNA-Sequenzvariationen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

A) Amplifikatsequenz TYMS-Exon-7

ACGCGAAGGTATCGACAGGATCATACTCCTGTAAAATAGACATACTCCTGTAAAATAGAACTTTGTTGATCAC
ATCCTGTGTACTTGTTCACCGGACATGAGGAGCAATTACAACAGGTCGTACAATTATGGCAAAAATAATGGCCT
 TATTTTGTTTTTAGcttcagcgagaaccagacctttcccaaagctcaggattcttcgaaaagttgagaaaat
 tgatgacttcaaagctgaagactttcagattgaagggtacaatccgcatccaactattaaaatggaaatggct
 gtttagGGTGCTTTCAAAGGAGCTCGAAGGATAT

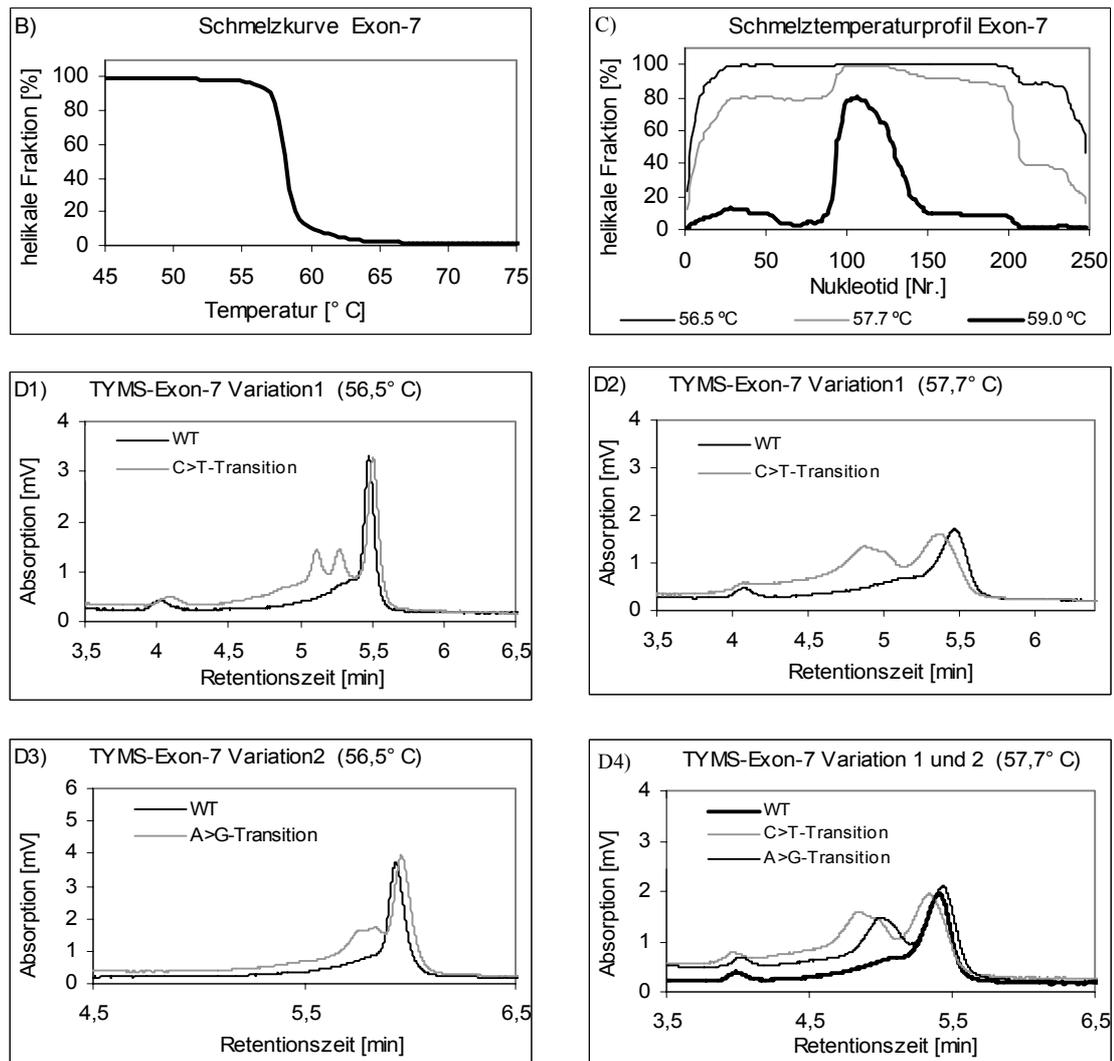


Abbildung 40: DHPLC-Sequenzanalysen und Sequenzanalysen am Exon-7 des Thymidylatsynthasegens.

A) Amplifikatsequenz: Die beiden Primer sind unterstrichen. Der Forwardprimer für die Sequenzierung ist fett und unterstrichen. Die C>T-Transition (rs1059394, Nukleotid Nr. 82 von 249) und die A>G Transition (rs1059393, Nukleotid Nr. 126 von 249) sind schattiert. Exon-7 ist in kleinen Buchstaben dargestellt.

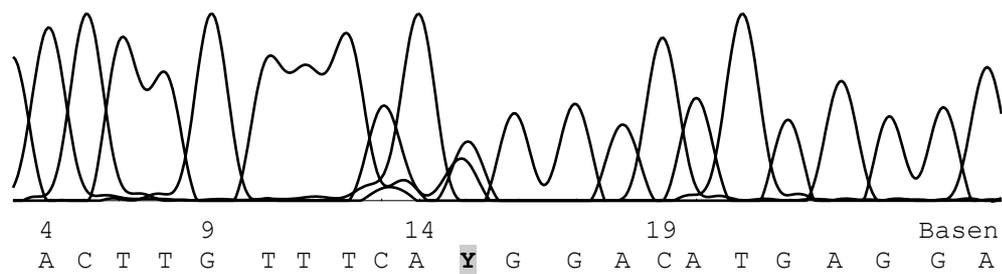
B) DHPLC-Schmelzkurve: Die DNA-Doppelstränge schmelzen ab 56° C in DNA-Einzelstränge. Bei 62° C liegt die DNA vollständig als Einzelstrang vor.

C) DHPLC-Schmelztemperaturprofil: Das Amplifikat hat vier Schmelztemperaturdomänen. 1) 0-90 Bp, bei 59° C sind weniger als 20% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 2) 91-150 Bp, bei 57,7° C sind zwischen 71 und 85% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 3) 150-200 Bp, bei 59° C sind weniger als 20% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation. 4) 201-249 Bp, bei 57,7° C sind zwischen 40 und 20% dieses DNA-Bereichs in der Doppelhelixformation.

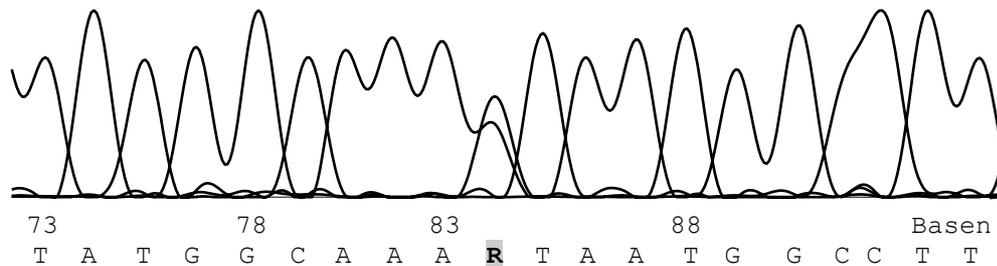
D1-4) DHPLC-Homo- und Heteroduplexchromatogramme: WT: Wildtyp, C>T-Transition, A>G-Transition.

Abbildung 40: Fortsetzung.

E)



F)



E) Sequenzierung der C>T-Sequenzvariation im Exon-7 der Thymidylatsynthase (NCBI: rs1059394). **Y**: C>T-Transition bei einem heterozygoten Proband. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

F) Sequenzierung der A>G-Sequenzvariation im Exon-7 der Thymidylatsynthase (NCBI: rs1059393). **R**: A>G-Transition bei einem heterozygoten Proband. A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

6.4.3. Assoziationen mit Homocystein

Keiner der vier untersuchten Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel war signifikant mit den bestimmten Laborparametern assoziiert. Für den TYMS-28-Bp-Repeat und die TYMS-G-58C-Transversion wurden ebenfalls keine Assoziationen mit den gemessenen Laborparametern ermittelt. Die TYMS-6-Bp-Deletion war mit dem Homocysteinspiegel assoziiert. Homozygote Mutanten (Del/Del (tHcy: 18,5 $\mu\text{mol/L} \pm 12,6$)) hatten im Vergleich zu heterozygoten Mutanten (WT/Del (tHcy: 10,2 $\mu\text{mol/L} \pm 5$)) und Wildtypen (WT/WT (Hcy: 12,9 $\mu\text{mol/L} \pm 5,6$)) signifikant erhöhte Homocysteinspiegel ($p = 0,013$).

Bei den vier mittels DHPLC-Screening nachgewiesenen Sequenzvariationen war die C>T-Transition im Amplifikat von Exon-7 signifikant mit dem Plasma- und Erythrozytenfolat ($p = 0,022$ und $0,014$) assoziiert (Tab.: 16). Probanden mit TT-Genotyp (homozygote Mutanten) hatten die niedrigsten ($14,0 \pm 3,7$ nmol/l), Probanden mit CT-Genotyp (heterozygote Mutanten) die höchsten ($19,9 \pm 7,1$ nmol/l) Plasmafolatkonzentrationen. Probanden mit CC-Genotyp (Wildtypen) hatten eine durchschnittliche Plasmafolatkonzentration von $15,7 \pm 4,3$ nmol/l. Die niedrigsten Erythrozytenfolatkonzentrationen wurden bei den Probanden mit CC-Genotyp (626 ± 131 nmol/l), die höchsten bei den Probanden mit CT-Genotyp (782 ± 143 nmol/l) gemessen.

Probanden mit TT-Genotyp hatten eine durchschnittliche Erythrozytenfolatkonzentration von 653 ± 107 nmol/l. Eine Assoziation mit dem Homocysteinspiegel wurde nicht gefunden.

Bei dem Indexproband für die 8-Bp-Deletion im Exon-2-Amplifikat wurden folgende Werte bestimmt: 12,3 nmol/l Plasmafolat, 765 nmol/l Erythrozytenfolat, 16,7 μ mol/l tHcy, 36,4 pmol/l Vitamin B₆, 136 pmol/l Serumcobalamin. Alle gemessenen Laborwerte waren innerhalb der errechneten Standardabweichung. Für die C>T-Transition im Exon-6-Amplifikat und die A>G-Transition im Exon-7-Amplifikat wurden keine Zusammenhänge mit den gemessenen Laborparametern gefunden.

Tabelle 16: Plasmafolat, Erythrozytenfolat, tHcy, Vitamin B₆ und Serumcobalamin bei den Genotypen der C>T-Transition im Exon-7-Amplifikat, der 6-Bp-Deletion im 3'-Terminus und der 8-Bp-Deletion im Exon-2-Amplifikat.

Sequenzvariation (Genort bzw. SNP)	Genotypen [n]	Plasmafolat [nmol/l]	Erythrozytenfolat [nmol/l]	tHcy [μ mol/l]	Serum-PLP [pmol/l]	Serum-Cbl [pmol/l]
C>T-Transition (Exon-7-Amplifikat) n = 46	CC: 25	15,7 \pm 4,3	626 \pm 131	14,2 \pm 5,7	35,8 \pm 28,0	202 \pm 90
	CT: 13	19,9 \pm 7,1*	782 \pm 143*	10,1 \pm 4,6	47 \pm 28,2	268 \pm 123
	TT: 8	14,0 \pm 3,7	653 \pm 107	13,4 \pm 6,8	38,2 \pm 23,7	209 \pm 94
6-Bp-Deletion (3'-Terminus) n = 59	WT/WT: 27	17,0 \pm 6,2	683 \pm 152	12,9 \pm 5,6	46,4 \pm 31,2	241 \pm 116
	WT/Del: 24	19,2 \pm 7,5	784 \pm 257	10,2 \pm 5,0	45,1 \pm 26,3	251 \pm 90
	Del/Del: 8	13,8 \pm 4,0	637 \pm 110	18,5 \pm 12,6*	39,2 \pm 23,4	184 \pm 107
8-Bp-Deletion n= 44 (Exon-2-Amplifikat)	WT/WT: 43	17,8 \pm 7,4	708 \pm 195	12,7 \pm 7,3	46,7 \pm 29,8	229 \pm 103
	WT/Del: 1	12,3	765	16,7	36,4	136

* signifikante Unterschiede untereinander (p<0.05)

Serum-PLP: Serum-Pyridoxal-5-Phosphat

Serum-Cbl: Serumcobalamin

6.5. Diskussion

6.5.1. DNA-Sequenzanalysen, Mutationsanalysen und Assoziationen mit Homocystein

Bei den DNA-Sequenzanalysen am Gen der Thymidylatsynthase wurden sieben DNA-Sequenzvariationen nachgewiesen. Unter diesen sieben DNA-Sequenzvariationen waren der 28-Bp-Repeat, die G-58C-Transversion und die 6-Bp-Deletion. Neben diesen bekannten und schon genauer untersuchten Polymorphismen wurden drei DNA-Sequenzvariationen (rs2853536 (Exon-6-Amplifikat), rs1059394 (Exon-7-Amplifikat), rs1059393 (Exon-7-Amplifikat) nachgewiesen, zu denen es bis jetzt noch keine detaillierten Untersuchungen gab. In der NCBI-Datenbank waren diese drei DNA-Sequenzvariationen schon verzeichnet. Im Exon-2 wurde bei einem Probanden eine 8-Basenpaar-Deletion nachgewiesen. Diese DNA-Sequenzvariation war bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

Die bei den Mutationsanalysen ermittelten Frequenzen für die vier Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel entsprachen den in der Literatur publizierten Frequenzen für kaukasische Populationen (Frosst *et al.* 1995, Chango *et al.* 2000, Tsai *et al.* 2000, Lievers *et al.* 2002b). Auch die Frequenzen des TYMS-28-Bp-Repeat, der TYMS-G-58C-Transversion und der TYMS-6-Bp-Deletion entsprachen den in der Literatur veröffentlichten Frequenzen für kaukasische Populationen (Marsh *et al.* 1999, Ulrich *et al.* 2000, Ulrich *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003, Brown *et al.* 2004). Die Genotyp- und Allelfrequenzen der drei noch nicht systematisch untersuchten Polymorphismen entsprachen für den rs1059394 (Amplifikat von Exon-7) und den rs1059393 (Amplifikat von Exon-7) den bei NCBI publizierten Frequenzen. Für den rs2853536 (Amplifikat von Exon-6) wurden deutliche Unterschiede zwischen den ermittelten und den publizierten Frequenzen gefunden. Bei diesen drei Polymorphismen beruht die Ermittlung der Genotyp- und Allelfrequenzen nur auf wenigen Probanden (rs2853536: 71/46, rs1059394: 71/46, rs1059393: 181/54 (NCBI/diese Studie)). Es ist deswegen nicht erstaunlich, dass für einen der drei Polymorphismen keine gute Übereinstimmung der Genotyp- und Allelfrequenzen gefunden wurde.

Assoziationen mit dem Homocysteinspiegel wurden nur für die 6-Bp-Deletion gefunden. Probanden mit dem Del/Del-Genotyp hatten höhere Homocysteinspiegel als Wildtypen und heterozygote Mutanten. Für die Erythrozyten- und Plasmafolat Spiegel wurden keine Unterschiede bei den Probanden gefunden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Del/Del-Genotyp mit höheren Homocysteinspiegeln assoziiert ist. Das widerspricht den

Ergebnissen einer Studie von Kealey *et al.* (Kealey *et al.* 2005), in der für die untersuchte Gesamtpopulation keine Assoziation der 6-Bp-Deletion mit dem Homocysteinspiegel gefunden wurde. Die in dieser Studie gefundene Assoziation des Del/Del-Genotyps mit höheren Homocysteinspiegeln entspricht nicht der formulierten Arbeitshypothese. Nach dieser Hypothese wird aufgrund niedrigerer TYMS-Proteinkonzentrationen weniger 5,10-Methylen-THF von der Thymidylatsynthese verbraucht, wodurch niedrigere Homocysteinspiegel zu erwarten gewesen wären. Die Hypothese wurde anhand der Ergebnisse von Mandola *et al.* (Mandola *et al.* 2004), die *in vitro* eine reduzierte Genexpression des Del-Allels in Tumorzellen gefunden haben, formuliert. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Mandola *et al.* (Mandola *et al.* 2004) wurden in der vorliegenden Studie *in vivo* Untersuchungen an gesunden Probanden durchgeführt. Diese Untersuchungen erlauben die Hypothese, dass der 5,10-Methylen-THF-Pool von Del/Del-Genotypen stärker beansprucht wird als von Wildtypen und heterozygoten Mutanten. Dies mag mit der gestörten Proteinbiosynthese zusammenhängen, wodurch die dTMP-Synthese als schnelle und unmittelbare Antwort auf dTMP-Mangel verhindert wird. Zur Vermeidung eines dTMP-Mangels wären die vorhandenen Enzyme der Thymidylatsynthese permanent mit der Thymidylatsynthese beschäftigt und würden somit auch permanent den 5,10-Methylen-THF-Pool beanspruchen. Die Neusynthese von Thymidylat ist ein besonders wichtiger Prozess für das Zellwachstum. Es ist möglich, dass die Affinität der Thymidylatsynthese für 5,10-Methylen-THF größer ist, als die der Methylenetetrahydrofolatreduktase. Dies würde in dem postulierten Modell dazu führen, dass die Methylenetetrahydrofolatreduktase insbesondere bei einem hohen dTMP-Bedarf nicht ausreichend mit 5,10-Methylen-THF versorgt wäre.

Die C>T-Transition im Exon-7 war unter den untersuchten DNA-Sequenzvariationen als einzige mit den Erythrozyten- und Plasmafolatkonzentrationen assoziiert. Heterozygote Mutanten hatten höhere Erythrozyten- und Plasmafolatkonzentrationen als Wildtypen und homozygote Mutanten. Obwohl der Folatstatus mit dem Homocysteinspiegel assoziiert ist (Clarke und Armitage 2000, Pinto *et al.* 2005), wurden in dieser Studie keine signifikanten Effekte der C>T-Transition auf den Homocysteinspiegel ermittelt. Die Varianz zwischen den Homocysteinspiegeln verfehlte allerdings nur knapp die Signifikanzgrenze von $p = 0,05$

($p = 0,071$). Die erarbeiteten Ergebnisse lassen folgende Hypothesen zu:

1. Der Polymorphismus verursachte einen niedrigeren 5,10-Methylenetetrahydrofolatbedarf der Thymidylatsynthese, wodurch der

Methylentetrahydrofolatreduktase mehr 5,10-Methylentetrahydrofolat zur Verfügung steht. In der Folge stünden der Methioninsynthese mehr Methylgruppen für die Methylierung des Homocysteins zur Verfügung.

2. Die untersuchte Studienpopulation war nicht groß genug um eine statistisch signifikante Varianz bei den Homocysteinspiegeln zu ermitteln.

Assoziationen des 28-Bp-repeats mit dem Homocysteinspiegel sind von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002) und Brown *et al.* (Brown *et al.* 2004) untersucht worden. Nach der Studie von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002) ist der Polymorphismus mit dem Homocysteinspiegel assoziiert. Der Widerspruch zwischen der Studie von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002) und der vorliegenden Studie beruht mit großer Wahrscheinlichkeit darauf, dass in der Studie von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002) nicht für den Effekt der MTHFR-C677T-Transition auf den Homocysteinspiegel korrigiert wurde. Da das T-Allel der MTHFR-C677T-Transition eine unabhängige Determinante des Homocysteinspiegels ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002) publizierten, erhöhten Homocysteinspiegel bei MTHFR-TT/3R/3R-Probanden allein durch den MTHFR-Polymorphismus verursacht wurden. Die Ergebnisse der Studie von Brown *et al.* (Brown *et al.* 2004) stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Von den Autoren wird diskutiert, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen ihrer und der Studie von Trinh *et al.* (Trinh *et al.* 2002), zumindest teilweise auf die unterschiedlichen ethnischen Gruppen die untersucht wurden (Kaukasier, Brown *et al.* 2004, chinesische Bürger Singapurs, Trinh *et al.* 2002), zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang verweisen die Autoren auf unterschiedliche Nahrungsgewohnheiten, Umwelteinflüsse und auf zusätzliche genetische Einflüsse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 6-Bp-Deletion und die C>T-Transition im Exon-7 bei den untersuchten Probanden mit dem Homocysteinspiegel bzw. den Erythrozyten- und Plasmafolatkonzentrationen assoziiert war. Des Weiteren weisen die Ergebnisse der vorliegenden und der Studie von Brown *et al.* (Brown *et al.* 2004) darauf hin, dass der TYMS-28-Bp-Repeat in kaukasischen Bevölkerungsgruppen keine Determinante des Homocysteinspiegels ist.

6.5.2. Schwierigkeiten bei den DHPLC-Sequenzanalysen

Bei den DNA-Sequenzanalysen des Amplifikates für das Exon-1 wurde festgestellt, dass die TYMS-G-58C-Transversion durch den 28-Bp-Repeat maskiert wurde. Obwohl die

Genotypen beider Polymorphismen bekannt waren, wurde der 28-Bp-Repeat nicht zweifelsfrei bei allen Probanden mittels DHPLC erkannt. Die Transversion war nur bei Probanden, die zwei Allele mit drei 28-Bp-Repeats (3R/3R) trugen, nachweisbar. Der Nachweis des 28-Bp-Repeats wurde dagegen nicht durch die G-58C-Transversion beeinflusst. Sein Einfluss auf das Schmelzverhalten und das resultierende DHPLC-Chromatogramm ist bei dem benutzten Amplifikat wahrscheinlich so groß, dass der zusätzliche Einfluss der G-58C-Transversion nicht im Chromatogramm erkannt wurde. Dieses Beispiel zeigt, dass die Sensitivität und Spezifität der DHPLC durch die Anwesenheit von Polymorphismen innerhalb eines PCR-Produktes abnehmen kann. Daraus wurde die Schlussfolgerung getroffen, dass die Suche nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen im Amplifikat von Exon-1 nur bei homozygoten Probanden (2R/2R, 3R/3R) sinnvoll ist. Von Ezzeldin *et al.* (Ezzeldin *et al.* 2004) wurde eine DHPLC-Methode zur gleichzeitigen Detektion des 28-Bp-Repeats und der G-58C-Transversion veröffentlicht. Die Methode von Ezzeldin *et al.* (Ezzeldin *et al.* 2004) verwendet ein kleineres Amplifikat als in dieser Studie benutzt wurde (242/576 Bp (Ezzeldin *et al.* 2004/diese Studie), wodurch 2RG/3RG- und 2RG/3RC-Probanden differenziert werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, 2RG/3RG- und 2RG/3RC-Probanden mit Hilfe des Amplifikates nach Hishida *et al.* (Hishida *et al.* 2003) (238 Bp) zu differenzieren. Diese Versuche erbrachten allerdings keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisse.

Der Nachweis von mehreren Sequenzvariationen in einem Amplifikat ist mittels DHPLC nicht immer zu realisieren ist. Dafür gibt es folgende Gründe:

1. Die Chromatogramme der einzelnen Heteroduplexe sind sich sehr ähnlich, so dass sie sich kaum oder gar nicht unterscheiden lassen (MTHFR-G1793A und MTHFR-C1970T, Kapitel 1).
2. Das Heteroduplexchromatogramm des ersten Polymorphismus wird durch das Heteroduplexchromatogramm des zweiten Polymorphismus überlagert. Dadurch kann eine Schulter oder ein niedriger Vorpeak maskiert werden (TYMS-28-Bp-Repeat und G-58C-Transversion).
3. Bei der Suche nach homozygoten Mutanten ändern sich durch die Zugabe von Kontroll-DNA die Peakverhältnisse. Die in den Punkten 1 und 2 genannten Schwierigkeiten kommen dadurch stärker zur Ausprägung.

6.5.3. Bewertung der entwickelten DHPLC-Methoden zur Suche nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen

Die DHPLC-Sequenzanalysen für die Exons 2 bis 7 des Thymidylatsynthasegens konnten erfolgreich durchgeführt werden.

Der Nachweis der 8-Bp-Deletion im Exon-2 konnte mittels DHPLC und (D)HPLC-Sizing eindeutig durchgeführt werden. Der Polymorphismus konnte unter den 37 Probanden, die in Kapitel 1 zur DHPLC-Methodenentwicklung benutzt wurden, einmal nachgewiesen werden. Das spricht für die Sensitivität und Spezifität der entwickelten Methode. Beim Exon-3 gab es innerhalb der angrenzenden Introns jeweils eine Punktmutation. Diese konnten bei der Primerentwicklung ausgeschlossen werden, so dass sie keine Probleme bei den DNA-Sequenzanalysen bereiteten. Die DHPLC-Sequenzanalysen der Exons 4, 5 und 6 bereiteten keinerlei Probleme. Die C>T-Transition (rs2853536) im Exon-6 konnte eindeutig nachgewiesen werden. Das Amplifikat für die DHPLC-Sequenzanalysen von Exon-7 enthielt zwei Polymorphismen, die beide eindeutig nachgewiesen wurden. Eine anschließende Überprüfung der Polymorphismen in der NCBI-DNA-Datenbank ergab, dass beide Polymorphismen nach der Entwicklung der PCR entdeckt worden waren. Der von ihrer Entdeckung in anderen Arbeitsgruppen unabhängige Nachweis der beiden Polymorphismen in dieser Arbeit, spricht für die hohe Sensitivität und Spezifität auch dieser entwickelten Methode. Keiner der beiden Polymorphismen behinderte den Nachweis des anderen Polymorphismus. Dies mag damit zusammenhängen, dass beide Polymorphismen SNPs sind, von denen wahrscheinlich keiner einen so dominanten Einfluss auf das Schmelzverhalten des Amplifikates hat wie der 28-Bp-Repeat. Auch liegen die beiden SNPs 43 Basenpaare weit auseinander. Die G-58C-Transversion liegt dagegen innerhalb des 28-Bp-Repeats.

Innerhalb der untersuchten Amplifikate für die sieben Exons des Thymidylatsynthasegens befinden sich neun DNA-Sequenzvariationen. Vier davon sind exonische DNA-Sequenzvariationen, von denen drei bis jetzt nur bei einem (rs11540152, rs11540153) bzw. bei zwei (rs596909) Probanden gefunden wurden. Konsequenterweise müssen sie als Mutationen angesehen werden. Die vierte exonische DNA-Sequenzvariation (rs3786362) ist eine seltene T>C-Transition mit einer Allelfrequenz des C-Allels von 0,043. Sie wurde bis jetzt nur bei amerikanischen Chinesen und bei Japanern gefunden. Erwartungsgemäß wurde weder eine der drei Mutationen, noch die T>C-Transition unter den 63 mitteleuropäischen Probanden nachgewiesen. Der 28-Bp-Repeat wurde mittels dAGE bzw.

RFLP bestimmt. Die Ergebnisse dieser Mutationsnachweise wurden bei den DHPLC-Sequenzanalysen bei allen 63 untersuchten Probanden bestätigt. Bei den drei Polymorphismen in den Amplifikaten von Exon-6 (rs2853536) und Exon-7 (rs1059393, rs1059394) haben die seltenen Allele Frequenzen von 0,472, 0,150 und 0,472. Dementsprechend wurden alle drei Polymorphismen unter den 63 untersuchten Probanden gefunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der DHPLC-Technologie alle bekannten Polymorphismen, die innerhalb der gescreenten DNA-Sequenz lagen, außer dem rs3786362-SNP im Exon-3 des Thymidylatsynthasegens, erkannt wurden. Zusätzlich zu den bekannten Polymorphismen wurde eine bis jetzt unbekannte 8-Bp-Deletion im Exon-2-Amplifikat erkannt. Die bei dieser Suche nachgewiesenen Sequenzvariationen konnten anschließend anhand ihrer spezifischen Chromatogramme eindeutig bestimmt werden. Für die Arbeiten dieser Studie wird das Resümee getroffen, dass die DHPLC-Technologie eine gut einsetzbare und zuverlässige Methode für die Suche nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen in den sieben Exons des Thymidylatsynthasegens war. Die positiven Merkmale der DHPLC-Technologie waren:

1. Die einfache Probenaufarbeitung
2. Die hohe Sensitivität und Spezifität
3. Die gute Automatisierbarkeit
4. Der geringe Probenbedarf
5. Die gleich bleibend hohe Qualität der DNA-Sequenzanalysen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die in der Literatur beschriebene hohe Sensitivität und Spezifität der DHPLC-Technologie (Xiao und Oefner 2001) bei der Suche nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen. Schwachpunkte der DHPLC-Technologie sind die diskutierten Schwierigkeiten beim Nachweis von mehreren DNA-Sequenzvariationen in einem PCR-Produkt und die zeitaufwändige, lineare Abarbeitung der Proben durch die DHPLC-Anlage. Der Nachweis von mehreren DNA-Sequenzvariationen ist auch mittels SSCP, DGGE und TGGE nicht immer zu realisieren. Die Sensitivität der SSCP wird bei Amplifikaten bis zu 200 Basenpaaren mit 80-90% (Nollau *et al.* 1997), die der DGGE und TGGE bei Amplifikaten bis zu 600 Basenpaaren mit 95% (Grompe 1993) angegeben. Die Sensitivität nimmt bei diesen Methoden bei größeren Amplifikaten stark ab (Grompe 1993). Die Sensitivität der DHPLC-Technologie

wird dagegen bei Amplifikaten bis zu 1500 Basenpaaren mit über 96% angegeben (Xiao und Oefner 2001, Spiegelman *et al.* 2000). Um Abschätzen zu können ob die DHPLC tatsächlich und insbesondere bei Amplifikaten über 200 bzw. 600 Basenpaaren sensitiver und spezifischer ist als SSCP, DGGE und TGGE, müssen gleichzeitige DNA-Sequenzanalysen mit DHPLC und SSCP oder DGGE und TGGE durchgeführt werden. Vergleiche der DHPLC-Technologie mit SSCP wurden von Jones *et al.*, Gross *et al.* und Yamanoshita *et al.* (Jones *et al.* 1999, Gross *et al.* 1999, Yamanoshita *et al.* 2004) durchgeführt. In diesen drei Arbeiten war die DHPLC mit einer Sensitivität >96% sensitiver als die SSCP (85% Jones *et al.* 1999, 87% Yamanoshita *et al.* 2004, 94% Gross *et al.* 1999). In einem von Breton *et al.* (Breton *et al.* 2003) durchgeführten Vergleich war die DGGE sensitiver als die DHPLC. Diese Zahlen weisen darauf hin, dass die DHPLC sensitiver ist als die SSCP ist. Die Ergebnisse von Breton *et al.* (Breton *et al.* 2003) müssen in weiteren Studien überprüft werden, bevor sicher davon ausgegangen werden kann, dass die DGGE sensitiver als die DHPLC ist.

7. Allgemeine Diskussion und Ausblick

Patienten mit einer Hyperhomocysteinämie haben ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Wald *et al.* 2002, Casas *et al.*). Neben Lebensstilfaktoren spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Hyperhomocysteinämie. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Polymorphismen in Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels auf den Homocysteinspiegel untersucht.

Der Einfluss eines einzelnen Polymorphismus auf den Homocysteinspiegel ist bis jetzt nur für den MTHFR-C677T eindeutig aufgeklärt worden (Casas *et al.*, Lievers *et al.* 2003a). Für die anderen in dieser Studie untersuchten Polymorphismen ist der Einfluss auf den Homocysteinspiegel noch nicht zufrieden stellend aufgeklärt worden. Das liegt daran, dass es an vergleichbaren Studien fehlt und die zur Verfügung stehenden Studien zum Teil widersprüchliche Ergebnisse liefern. Zur endgültigen Aufklärung der Assoziationen der untersuchten Polymorphismen mit dem Homocysteinspiegel müssen daher weitere Studien, insbesondere prospektive Studien, durchgeführt werden. Da in diesen Studien die Polymorphismen und die relevanten Laborparameter des Homocystein- und Folatstoffwechsels untersucht werden müssen, leisten die in Kapitel 1 durchgeführten Arbeiten einen wichtigen methodischen Beitrag zur Erforschung der genetischen Determinanten des Homocystein- und Folsäurestoffwechsels. Die entwickelten DHPLC-Methoden wurden bereits erfolgreich in einigen epidemiologischen Studien zur Genotypisierung von Probanden angewendet (MTHFR-C677T-Transition, RFC-G80A-Transition, GCP-C1561T-Transition (Drogan *et al.* 2004), TC-C776G-Transversion (Wans *et al.* 2003), RFC-G80A-Transition (Kapitel 2), TYMS-6-Bp-Repeat (Kapitel 3). Sie erwiesen sich als zuverlässig und gut in der Laborroutine einsetzbar. Für die Zukunft sind weitere Studien, in denen die entwickelten DHPLC-Methoden benutzt werden sollen, geplant. Diese Studien werden wichtige Informationen über den Einfluss der Polymorphismen auf den Homocystein- und Folsäurestoffwechsel liefern. Ein wichtiger Aspekt, der noch nicht aufgeklärt ist, sind zum Beispiel die Auswirkungen von mehreren Polymorphismen auf den Homocysteinspiegel. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse von Studien zusammengefasst, in denen mehr als ein Polymorphismus in einer Probandengruppe untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen zum einen, dass der Homocysteinspiegel auf genetischer Ebene polygen reguliert wird und zum anderen, dass sich die Polymorphismen in ihrer Auswirkung auf den Homocysteinspiegel gegenseitig beeinflussen.

Tabelle 17: Studien in denen Assoziationen von kombinierten Genotypen mit Homocystein untersucht wurden.

Studie	Polymorphismen	Ergebnisse
Tsai <i>et al.</i> (2000) n = 1031	CBS-844-Ins-68 MTR-A2756G MTHFR-C677T	Der addierte Einfluss des CBS-844-Ins-68 und des MTR-A2756G war entgegengesetzt zu dem des MTHFR-C677T.
van der Put <i>et al.</i> (1998) n = 628	MTHFR-C677T MTHFR-A1298C	Probanden, die für beide SNPs heterozygot waren, hatten höhere Homocystein- und niedrigere Folatspiegel als Probanden, die nur für einen SNP heterozygot waren.
Dekou <i>et al.</i> (2001) n = 754	MTHFR-C677T MTHFR-A1298C	Es wurden keine Assoziationen von kombinierten Genotypen mit Homocystein gefunden.
Meisel <i>et al.</i> (2001) n = 2000	MTHFR-C677T MTHFR-A1298C	
Chango <i>et al.</i> (2000) n = 169	MTHFR-C677T RFC-G80A	Die Assoziation des T-Allels des MTHFR-C677T mit erhöhten Homocysteinspiegeln wurde durch den zweiten Polymorphismus verstärkt.
Trinh <i>et al.</i> (2002) n = 505	MTHFR-C677T TYMS-28-Bp-Repeat	

n: Anzahl

Die meisten Studien, die sich mit Effekten von mehreren Polymorphismen auf den Homocysteinspiegel beschäftigen, bestimmen zwei bis fünf Polymorphismen, werten dann aber nicht alle möglichen Genotypkombinationen statistisch aus (Geisel *et al.* 2003). Das liegt wahrscheinlich daran, dass es in diesen Studien für einige Genotypen gar keine oder nur sehr wenige Probanden gibt. Dadurch haben solche sehr arbeitsintensiven Auswertungen oft keine signifikanten Ergebnisse, wenn das Probandenkollektiv zum Beispiel zu klein gewesen ist. Eine Studie, in der der Effekt von mehreren Polymorphismen auf den Homocysteinspiegel untersucht werden soll, wird zurzeit am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums in Magdeburg in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährungswissenschaften in Potsdam durchgeführt. In diese prospektive Studie wurden mehr als 1000 Probanden eingeschlossen, so dass Assoziationen von Genotypkombinationen häufiger Polymorphismen mit dem Homocysteinspiegel untersucht werden können.

Auch die Bedeutung der untersuchten Polymorphismen für kardiovaskuläre Erkrankungen ist bis jetzt nur für den MTHFR-C677T zufrieden stellend aufgeklärt worden. In mehreren Meta-Analysen wurde eine Assoziation des Polymorphismus mit kardiovaskulären Erkrankungen bestätigt (Wald *et al.* 2002, Klerk *et al.* 2002, Casas *et al.*). Am Beispiel des MTHFR-C677T wird deutlich, wie arbeitsintensiv und zeitaufwändig es ist, die Bedeutung eines SNPs für kardiovaskuläre Erkrankungen aufzuklären. Eine von Brattström *et al.* (Brattström *et al.* 1998) durchgeführte Meta-Analyse aus dem Jahr 1998 kommt noch zu dem Ergebnis, dass die MTHFR-C677T-Transition zwar mit dem Homocysteinspiegel assoziiert ist, aber keinen Einfluss auf das Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen hat. In dieser Meta-Analyse wurden die Ergebnisse von 23, vorwiegend

retrospektiven Studien, analysiert. Die Meta-Analysen von Wald *et al.*, Klerk *et al.* und Casas *et al.* (Wald *et al.* 2002, Klerk *et al.* 2002, Casas *et al.*) analysierten 72, 40 und 111 Studien mit vorwiegend prospektivem Studiendesign und kommen zu dem Ergebnis, dass der Polymorphismus sowohl mit dem Homocysteinspiegel als auch mit dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert ist. Für alle anderen in dieser Studie untersuchten Polymorphismen müssen weitere Studien durchgeführt werden, bevor eindeutige Aussagen über ihre Assoziationen mit dem Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu erkranken, gemacht werden können. Nach den Erfahrungen, die bei der Erforschung des MTHFR-C677T gemacht wurden, sollten bei der Untersuchung dieser Polymorphismen groß angelegte Studien mit einem prospektiven Studiendesign durchgeführt werden. Der Einsatz der DHPLC-Technologie ermöglicht die Bestimmung von Genotypen in großen Probandenkollektiven mit einem vergleichsweise geringen Arbeitsaufwand. Daher stellen die entwickelten DHPLC- und (D)HPLC-Sizing-Methoden eine gute Voraussetzung für die Durchführung dieser Studien dar.

Beim Nachweis von bekannten Polymorphismen mittels DHPLC werden neben dem Zielpolymorphismus auch zusätzliche DNA-Sequenzvariationen angezeigt. In Kapitel 2 wurde berichtet, dass bei einem Probanden zwei zusätzliche Polymorphismen nachgewiesen wurden. Der Einfluss dieser beiden Polymorphismen auf den Homocysteinestoffwechsel ist bis jetzt unbekannt. Des Weiteren scheint die C>T-Transition (rs2267163) bei Kaukasiern wesentlich seltener zu sein als bei Japanern. Da aber nicht zweifelsfrei davon ausgegangen werden kann, dass diese Transition auch bei allen Probanden erkannt wurde, müssen weitere Studien durchgeführt werden um die Genotyp- und Allelfrequenzen dieses Polymorphismus bei Kaukasiern abschätzen zu können. In diesen Studien sollte eine spezifische Methode, wie zum Beispiel RFLP, für die Genotypisierung der Probanden benutzt werden.

Die Thymidylatsynthase ist das verantwortliche Enzym für die Bereitstellung von dTMP für die DNA-Synthese beim Menschen (Takeishi *et al.* 1989, Carreras und Santi 1995). Aus diesem Grund spielt die Thymidylatsynthase eine wichtige Funktion bei der DNA-Synthese und Reparatur (Volcik *et al.* 2003) sowie für das Wachstum von Zellgeweben (Kawate *et al.* 2002). In Kapitel 3 wurde die codierende DNA-Sequenz des Thymidylatsynthasegens auf unbekannte DNA-Sequenzvariationen untersucht. Es gibt bis jetzt nur eine vergleichbare veröffentlichte Arbeit, in der die codierende DNA-Sequenz des

Gens bei 100 Probanden sequenziert wurde (Volcik *et al.* 2003). In der Arbeit von Volcik *et al.* (Volcik *et al.* 2003) und in der vorliegenden Arbeit wurden keine unbekanntes DNA-Sequenzvariationen in der codierenden DNA-Sequenz des Thymidylatsynthasegens nachgewiesen. DNA-Sequenzvariationen in der codierenden DNA-Sequenz des Gens können zu einem funktionslosen Protein führen, was zwangsläufig das Absterben der betroffenen Zellen zur Folge hätte. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Thymidylatsynthase zum Einbau von dUMP in die DNA führt, wodurch es zu Chromosomenbrüchen und letztendlich zum Absterben der betroffenen Zellkulturen (thymineless death) kam (Ayusawa *et al.* 1983, Ladner *et al.* 2001). Daher ist es nicht erstaunlich, dass unter den untersuchten gesunden Probanden keine unbekanntes DNA-Sequenzvariationen in der codierenden DNA-Sequenz gefunden wurden.

Durch ihre zentrale Rolle bei der Proliferation von Zellgeweben ist die Thymidylatsynthase ein wichtiges Enzym bei der Entstehung und Behandlung von Krebs (Kawate *et al.* 2002, Kornmann *et al.* 2003, Libra *et al.* 2004). Ein die Thymidylatsynthase hemmendes Chemotherapeutikum, das seit etwa 50 Jahren in der Krebstherapie eingesetzt wird, ist zum Beispiel 5-Fluorouracil (Voeller *et al.* 2002, Uchida *et al.* 2004). Bei der Chemotherapie mit 5-Fluorouracil sprechen allerdings nur 60-70% der Patienten gut auf die Behandlung an (Phan *et al.* 2001, Kornmann *et al.* 2003). *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass der Erfolg der Chemotherapie mit 5-Fluorouracil mit der Thymidylatsynthaseaktivität assoziiert ist (Johnston *et al.* 1994, van Triest *et al.* 1999, Salonga *et al.* 2000). Es ist deswegen von besonderem Interesse für die Krebsforschung, die Mechanismen die zu einer gesteigerten Thymidylatsynthaseaktivität führen, zu untersuchen. Es ist bekannt, dass die Thymidylatsynthaseaktivität von insgesamt drei intronischen Polymorphismen (28-Bp-Repeat, G-58C-Transversion, 6-Bp-Deletion) beeinflusst wird. Für den 28-Bp-Repeat konnte ein Zusammenhang zwischen dem Patientengenotyp, der Thymidylatsynthaseaktivität und dem Erfolg einer Chemotherapie mit 5-Fluorouracil festgestellt werden (Iacopetta *et al.* 2001, Chen *et al.* 2003, Uchida *et al.* 2004). Die 6-Bp-Deletion und die G-58C-Transversion müssen in diesem Zusammenhang noch detailliert untersucht werden.

Die in dieser Arbeit entwickelten Methoden für die Bestimmung der drei Polymorphismen sind ein wichtiger methodischer Beitrag zur Durchführung von Forschungsprojekten, die den Einfluss der drei bekannten Polymorphismen auf die Thymidylatsynthaseaktivität und den Therapieerfolg mit 5-Fluorouracil aufklären sollen. Von besonderem Interesse wäre eine Studie, in der zum einen Tumorzellen von Probanden, die gut auf eine Chemotherapie

und zum anderen Tumorzellen von Probanden, die schlecht auf eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil ansprechen, untersucht werden. Die entwickelten DHPLC-Methoden zur Suche nach unbekanntem DNA-Sequenzvariationen im Thymidylat synthasegen sind zur Durchführung einer solchen Studie gut geeignet. Die in dieser Arbeit erstmalig beschriebene intronische 8-Bp-Deletion ist unter den untersuchten Probanden nur einmal nachgewiesen worden. Assoziationen dieser Deletion mit dem Krebsrisiko oder dem Behandlungserfolg einer 5-Fluorouracil-Krebstherapie sind unbekannt. Eine Studie, in der im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten gesunden Probanden, Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen untersucht werden, würde Auskunft darüber geben ob die 8-Bp-Deletion in Tumorzellen häufiger auftritt als in gesunden Zellen. Des Weiteren könnte die Frage geklärt werden, ob die 8-Bp-Deletion mit dem Behandlungserfolg einer 5-Fluorouracil-Krebstherapie assoziiert ist.

Von Trinh *et al.* und Kealey *et al.* (Trinh *et al.* 2002, Kealey *et al.* 2005) wurden Assoziationen des TYMS-28-Bp-Repeat und der TYMS-6-Bp-Deletion mit dem Homocysteinspiegel erkannt. In dieser Arbeit wurden Assoziationen der TYMS-6-Bp-Deletion und der TYMS-C>T-Transition im Exon-7 mit dem Homocysteinspiegel bzw. mit der Erythrozytenfolatkonzentration nachgewiesen. Diese Ergebnisse müssen an weiteren Studien bestätigt werden. Eine Assoziation der TYMS-C>T-Transition mit dem Homocysteinspiegel wurde nicht nachgewiesen, wobei dies möglicherweise darauf zurück zu führen ist, dass die untersuchte Probandengruppe zu klein war, um einen signifikanten Effekt zu erkennen. Aus diesem Grund muss in einem größeren Probandenkollektiv überprüft werden ob dieser Polymorphismus mit dem Homocysteinspiegel assoziiert ist.

8. Zusammenfassung

Die Ergebnisse zahlreicher epidemiologischer Studien weisen darauf hin, dass der Homocysteinspiegel ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist. Der Homocysteinspiegel ist neben Lebensstilfaktoren auch von genetischen Determinanten abhängig. In den letzten Jahren wurden vor allem Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel untersucht. Der am besten untersuchte Polymorphismus ist die MTHFR-C677T-Transition im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Polymorphismus mit dem Homocysteinspiegel und mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von weiteren Polymorphismen in den Genen des Homocystein- und Folatstoffwechsels für den Homocysteinspiegel aufzuklären.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Methoden zum Nachweis von bekannten Polymorphismen etabliert. Als besonders anwenderfreundlich erwiesen sich die Denaturing High Performance Chromatography (DHPLC) und die direkte Agarosegelelektrophorese (dAGE). Restriction Fragment Length Polymorphism-Methoden (RFLP-Methoden) waren im Vergleich zu DHPLC- und dAGE-Methoden arbeitsintensiver in der Durchführung. Die DHPLC-Methoden fielen positiv durch geringen Probenverbrauch und die gute Automatisierbarkeit auf. RFLP konnte bei neun, DHPLC bei sieben und dAGE bei drei von zwölf Polymorphismen angewendet werden.

Im zweiten Teil wurde der Einfluss der TC II-C776G-Transversion und der RFC I-G80A-Transition auf den Homocysteinspiegel bei 159 gesunden Senioren untersucht. Es wurde ermittelt, dass bei den untersuchten Probanden weder die TC II-C776G-Transversion noch die RFC-G80A-Transition mit dem Homocysteinspiegel assoziiert waren. Das G-Allel der Transversion war bei diesen Probanden mit reduzierten Holo-Transcobalaminspiegeln assoziiert. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wurde bei einem Probanden eine bis jetzt unbekannte stille DNA-Sequenzvariation nachgewiesen. Die Genotyp- und Allelfrequenzen sowie stoffwechselphysiologischen Effekte dieser DNA-Sequenzvariation müssen in weiteren Studien untersucht werden.

Im dritten Teil wurde der Einfluss von drei bekannten Polymorphismen (6-Bp-Deletion, 28-Bp-Repeat, G-58C-Transversion) im Thymidylatsynthasegen bei 63 gesunden Probanden auf den Homocysteinspiegel und die Folatkonzentrationen untersucht. Des Weiteren wurde die codierende DNA-Sequenz des Gens mittels DHPLC auf unbekannte DNA-Sequenzvariationen untersucht. Für die 6-Bp-Deletion wurden bei homozygoten Probanden höhere Homocysteinspiegel als bei heterozygoten Probanden und Wildtypen ermittelt. Eine C>T-Transition im Intron-6 des Thymidylatsynthasegens zeigte bei heterozygoten Probanden höhere Erythrozyten- bzw. Plasmafolatkonzentrationen als bei Wildtypen und homozygoten Probanden. Bei einem Probanden wurde eine weitere bis jetzt unbekannte 8-Bp-Deletion im Intron-1 des Thymidylatsynthasegens nachgewiesen. Auch zur Ermittlung der Genotyp- und Allelfrequenzen sowie der stoffwechselphysiologischen Effekte dieser Deletion müssen weitere Studien durchgeführt werden. Es wurden keine bis jetzt unbekannten exonischen DNA-Sequenzvariationen im Gen der Thymidylatsynthase entdeckt.

Die DHPLC-Technologie erwies sich in dieser Arbeit als eine zuverlässige Methode zum Screenen nach bekannten und unbekanntem DNA-Sequenzvariationen.

9. Anhang

Pufferlösungen

TBE-Puffer

TBE-Puffer-Stammlösung (10X) (Zusammensetzung)

Tris-Borat	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM
pH (25° C)	8,2-8,4

TBE-Puffer-Gebrauchslösung (1X) (Zusammensetzung)

Tris-Borat	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
pH (25° C)	8,2-8,4

TBE-Puffer-Gebrauchslösung (1X) (Herstellung)

TBE-Puffer (10X)	100 ml
Aqua bidest	900 ml

DHPLC-Puffer (Zusammensetzung)

Puffer A	Volumina	Endkonzentration
Triethylammoniumacetat [2 M]	50 ml	0,1 M
Acetonitril [100%]	0,25 ml	0,025 %
H ₂ O (Milipore)	949,75 ml	---

Puffer B	Volumina	Endkonzentration
Triethylammoniumacetat [2 M]	50 ml	0,1 M
Acetonitril [100%]	250 ml	25 %
H ₂ O (Milipore)	700 ml	---

PCR

Zusammensetzung des PCR Master Mix (Promega)

Der PCR-Master-Mix ist doppelt konzentriert (Stammlösung). Er wurde in dieser Arbeit so eingesetzt, dass er im PCR-Reaktionsgemisch einfach konzentriert vorlag. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten sind in der nachstehenden Liste angegeben.

Komponenten des PCR Master Mix	doppelt konzentriert (Stammlösung)	einfach konzentriert (Endkonzentration)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	50 Einheiten/ml	25 Einheiten/ml
MgCl ₂	3 mM	1,5 mM
Nukleotide		
dATP	400 µM	200 µM
dGTP	400 µM	200 µM
dCTP	400 µM	200 µM
dTTP	400 µM	200 µM
pH-Wert	8,5	8,5

Primersequenzen

Bekannte Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel			
Polymorphismus	Primer	Primersequenz	Literatur
MTHFR-C677T	Forward	5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3'	Kluijtmans <i>et al.</i> (1996)
	Reverse	5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'	
MTHFR-A1298C	Forward	5' CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'	Van der Put <i>et al.</i> (1998)
	Reverse	5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3'	
MTHFR-G1793A	Forward	5' CTCTGTGTGTGTGTGCATGTGTGCG 3'	Rady <i>et al.</i> (2002)
	Reverse	5' GGGACAGGAGTGGCTCCAACGCAGG 3'	
MTHFD-G1958A	Forward	5' CACTCCAGTGTGGTCCATG 3'	Akar und Akar (1999)
	Reverse	5' GCATCTTGAGAGCCCTGAC 3'	
MTR-A2756G (Leclerc)	Forward	5' CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC 3'	Leclerc <i>et al.</i> (1996)
	Reverse	5' GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA 3'	
MTR-A2756G (Harmon)	Forward	5' TGTTCCAGCTGTAGATGAAAAT 3'	Harmon <i>et al.</i> (1999)
	Reverse	5' GATCCAAAGCCTTTTACACTCCTC 3'	
RFC I-G80A	Forward	5' AGTGTCACCTTCGTCCTCCTC 3'	Chango <i>et al.</i> (2000)
	Reverse	5' CTCCCGCGTGAAGTTCTT 3'	
TC II-C776G	Forward	5' GTCAGGTGCTGGAACACCTAG 3'	Miller <i>et al.</i> (2002)
	Reverse	5' TAGGTCTTGTGGTTCAGAACG 3'	
GCP II-C1561T	Forward	5' CATTCTGGTAGGAATTTAGCA 3'	Devlin <i>et al.</i> (2000)
	Reverse	5' AAACACCACCTATGTTTAACA 3'	
TYMS-6Bp-Del	Forward	5' CGTGGCTCCTGCGTTTCC 3'	Ulrich <i>et al.</i> (2000)
	Reverse	5' GAGCCGGCCACAGGCAT 3'	
CBS-T833C	Forward	5' CTGGCCTTGAGCCCTGAA 3'	Tsai <i>et al.</i> (1996)
	Reverse	5' GGCCGGGCTCTGGACTC 3'	
TYMS-28bp-Rep	Forward	5' CGTGGCTCCTGCGTTTCC 3'	Hishida <i>et al.</i> (2003)
	Reverse	5' GAGCCGGCCACAGGCAT 3'	
CBS-844Ins68	Forward	5' CTGGCCTTGAGCCCTGAA 3'	Tsai <i>et al.</i> (1996)
	Reverse	5' GGCCGGGCTCTGGACTC 3'	
TYMS-G-58C	Forward	5' CGTGGCTCCTGCGTTTCC 3'	Hishida <i>et al.</i> (2003)
	Reverse	5' GAGCCGGCCACAGGCAT 3'	
Sequenzanalysen der sieben Exons der Thymidylatsynthase			
TYMS Exon	Primer	Primersequenz	Literatur
Exon-1	Forward	5' CCCGTGGCTCCTGCGTTTCC 3'	Volcik <i>et al.</i> (2003)
	Reverse	5' TAAGGCGAGGAGGACGATGC 3'	
Exon-2	Forward	5' ACGTCCCAGGGCAGTTTTCTT 3'	#
	Reverse	5' CACACCTGGCTGCTTTGAGTTT 3'	
Exon-3	Forward	5' GCTCTGCTCTCCCCATCTCTTC 3'	#
	Reverse	5' GGAAATGGAAGGCATTGTTCTATC 3'	
Exon-4	Forward	5' ATGCACCAGATGTCTTGTAGCCA 3'	#
	Reverse	5' TGCCT TGCACAAAACCAGATT 3'	
Exon-5	Forward	5' GGCTTCTGTTTCTCTCCTGTTT 3'	#
	Reverse	5' CTCTGCAATTTGTTTTCCA 3'	
Exon-6	Forward	5' TAAAAAAGCCTTGCGGTGTC 3'	#
	Reverse	5' CCACATTTGGAGCAGTCATCTT 3'	
Exon-7	Forward	5' GATCACATCCTGTGACTTGTTTC 3'	#
	Reverse	5' AGCTCCTTTGAAAGCACC 3'	
Exon-7 Sequenzierung	Forward	5' TCGACAGGATCATACTCCTG 3'	#
	Reverse	5' AGCTCCTTTGAAAGCACC 3'	

Tabelle 18: Primerpaare und Primersequenzen und Literatur für die durchgeführten Mutationsanalysen und für die DHPLC-Sequenzanalysen am Thymidylatsynthasegen. #: in dieser Arbeit entwickelt.

Herstellung der Agarosegele

TBE-Puffer (1X)	80 ml
EthBr [10mg/ml]	4.0 µl
Agarose	1,6 g (2,0% Agarosegel)
	2,0 g (2,5% Agarosegel)
	2,4 g (3,0% Agarosegel)

Zuerst wurde 1 Liter 1X TBE-Puffer aus einer 10X TBE-Puffer-Stammlösung hergestellt. In 80 ml dieses Puffers wurde die entsprechende Einwaage an Agarose gegeben. Nach Quellung des TBE-Puffer/Agarosegemisches für 15 Minuten, wurde es auf einem heizbaren Magnetprüher erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde das Gemisch zum Abkühlen auf einen zweiten Magnetprüher gestellt. Sobald es auf etwa 70° C abgekühlt war, wurde die EthBr-Lösung zugegeben. Bei etwa 65° C wurde das Agarosegemisch in die Gelelektrophoresekammer gegossen und der Kamm für die Geltaschen wurde eingesetzt. Siedeverzug wurde durch das Verschließen des Erlenmeyer Kolbens mit Aluminiumfolie vermieden. Den restlichen 920 ml TBE-Puffer (Laufpuffer) wurden 46 µl EthBr-Lösung zugegeben. Beim Befüllen der Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer, wurde darauf geachtet, dass der Laufpuffer das Agarosegel etwa 1 cm überdeckte.

Tabelle 19: Versuchsprotokolle für die RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweise.

			MTHFR-C677T	MTHFR-A1298C	MTHFR-G1793A	MTHFD-G1958A	MTR-A2756G (Leclerc)
Literatur (2)			Kluijtmans <i>et al.</i> (1996)	Van der Put <i>et al.</i> (1998)	Rady <i>et al.</i> (2002)	Akar und Akar (1999)	Leclerc <i>et al.</i> (1996)
PCR	Ansatz	Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
		Forwardprimer	2,5 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]	0,75 µl [10 pmol/µl]	3 µl [10 pmol/µl]
		Reverseprimer	2,5 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]	0,75 µl [10 pmol/µl]	3 µl [10 pmol/µl]
		nukleasefreies Wasser	15 µl	16 µl	18 µl	18,5 µl	14 µl
		DMSO	---	---	---	---	---
		Probanden-DNA (1)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
	Gesamtvolumen		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
	Zyklen	primäre Denaturierung	5 min (96° C)	5 min (95° C)	5 min (95° C)	5 min (95° C)	2 min (95° C)
		Denaturierung	50 sec (93° C)	60 sec (95° C)	60 sec (95° C)	50 sec (95° C)	60 sec (95° C)
		Annealing	50 sec (55° C)	60 sec (58° C)	60 sec (66° C)	50 sec (53° C)	90 sec (60° C)
Elongation		30 sec (72° C)	45 sec (72° C)	60 sec (72° C)	90 sec (72° C)	60 sec (72° C)	
terminale Elongation		7 min (72° C)	7 min (72° C)	7 min (72° C)	7 min (72° C)	7 min (72° C)	
Wiederholungen		35	35	40	35	35	
Produkt [Bp]		unverdaut	198	163	310	330	189
Restriktionsverdau	Enzym	Name, Lieferant	<i>HinfI</i> , Fermentas	<i>MboI</i> , Fermentas	<i>MbiI</i> , Fermentas	<i>MspI</i> , Fermentas	<i>HaeIII</i> , Roche
	PCR Produkt [µl]		10	10	10	11	10
	Ansatz	Enzym [Vol, Enz.-Einh.]	2 µl, 20 U	2 µl, 10 U	1 µl, 10 U	2 µl, 20 U	2 µl, 20 U
		Puffer [10X] nukleasefreies Wasser	2 µl 1 µl	2 µl 6 µl	2 µl 7 µl	1,5 µl 0,5 µl	2 µl 6 µl
	Inkubation	[Temperatur, Zeit]	37° C, 2 h	37° C, 6 h 30 min	37° C, 16 h	37° C, 90 min	37° C, 3 h
Inaktivierung	[Temperatur, Zeit]	65° C, 20 min	65° C, 20 min	65° C, 20 min	65° C, 20 min	---	
Gelelektrophorese	Agarosegel		2%	3% (PCR-Agarose)	2%	2%	2%
	Laufzeit		90 min	20 min	35 min	40 min	90 min
	Spannung		100 V	100 V	100 V	100 V	100 V
Banden	Wildtyp		198	56, 31, 30, 28, 18	233, 77	196, 70, 56, 8	189
	heterozygote Mutante		198, 175, 23	84, 56, 31, 30, 28, 18	310, 233, 77	266, 196, 70, 56, 8	189, 159, 30
	homozygote Mutante		175, 23	84, 31, 30, 18	310	266, 56, 8	159, 30
DHPLC-Analysetemperatur	errechnete (3)		62,0° C	59,5° C	61,7° C	58,7° C	55,6° C
	experimentell ermittelte		62,7° C	60,8° C	62,7° C	---	---

(1) DNA-Lösung aus der DNA-Isolation mit dem Qiagen DNA-Isolations Kit

(2) Literatur aus der die Primer entnommen wurden

(3) Wavemaker™ Software

Enz.-Einh: Enzym-Einheiten in Units (U)

Vol: Volumen

DMSO: Dimethylsulfoxid

10X: 10-fach konzentriert

Tabelle 19: Fortsetzung.

			MTR-A2756G	RFC I-G80A	TC II-C776G	GCP II-C1561T	TYMS-G-58C
Literatur (2)			Harmon <i>et al.</i> (1999)	Chango <i>et al.</i> (2000)	Miller <i>et al.</i> (2002)	Devlin <i>et al.</i> (2000)	Hishida <i>et al.</i> (2003)
PCR	Ansatz	Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl	12,5 µl	25 µl
		Forwardprimer	2 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	2,5 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]
		Reverseprimer	2 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	2,5 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]
		nukleasefreies Wasser	16 µl	16 µl	15 µl	8 µl	12 µl
		DMSO	---	---	---	---	4 µl
		Probanden-DNA (1)	5 µl	5 µl	5 µl	2,5 µl	5 µl
	Gesamtvolumen		50 µl				
	Zyklen	primäre Denaturierung	4 min (95° C)	2 min (94° C)	2 min (94° C)	5 min (95° C)	7 min (95° C)
		Denaturierung	50 sec (95° C)	30 sec (94° C)	60 sec (94° C)	45 sec (95° C)	60 sec (95° C)
		Annealing	45 sec (61° C)	45 sec (61° C)	60 sec (64° C)	60 sec (53° C)	45 sec (60° C)
		Elongation	60 sec (72° C)	45 sec (72° C)	60 sec (72° C)	45 sec (72° C)	60 sec (72° C)
		terminale Elongation	7 min (72° C)				
	Wiederholungen		35	35	30	34	
Produkt [Bp]		unverdaut	211	230	218	244	238/210 (2R/3R)
Restriktionsverdau	Enzym	Name, Lieferant	<i>Bsu</i> RI, Fermentas	<i>Cfo</i> I, Roche	<i>Mva</i> I, Fermentas	<i>Acc</i> I, Roche	<i>Bsu</i> RI, Fermentas (4)
	PCR Produkt [µl]		8	15	15 µl	10	9 µl
	Ansatz	Enzym [Vol., Enz.-Einh.]	2 µl, 20 U	2 µl, 20 U	2 µl, 20 U	4 µl, 20 U	1 µl, 10 U
		Puffer [10X] nukleasefreies Wasser	2 µl 8 µl	2 µl 1 µl	2 µl 1 µl	2 µl 4 µl	2 µl 8 µl
	Inkubation	[Temperatur, Zeit]	37° C, 3 h	37° C, 6 h	37° C, 5 h	37° C, 3 h	37° C, 2h
Inaktivierung	[Temperatur, Zeit]	80° C, 20 min	nicht inaktivierbar	80° C, 20 min	nicht inaktivierbar	80° C, 20 min	
Gelelektrophorese	Agarosegel		2%	2%	2%	2%	3%
	Laufzeit		40 min	60 min	60 min	60 min	45 min
	Spannung		100 V				
Banden	Wildtyp		211	125, 68, 37	128, 90	244	7, 44, 46, 47, 94
	heterozygote Mutante		211, 131, 80	162; 125; 68; 37	218, 128, 90	244, 141, 103	7, 28, 44, 46, 47, 66, 94
	homozygote Mutante		131, 80	162; 68	218	141, 103	7, 28, 44, 46, 47, 66
DHPLC-Analysetemperatur	errechnete (3)		55,5° C	65,7° C	61,5° C	52,0° C	---
	experimentell ermittelte		54,4° C	64,2° C	62,5° C	53,5° C	---

(1) DNA-Lösung aus der DNA-Isolation mit dem Qiagen DNA-Isolations Kit

(2) Literatur aus der die Primer entnommen wurden

(3) Wavemaker™ Software

(4) Mandola *et al.* (2003)

Enz.-Einh: Enzym-Einheiten in Units (U)

Vol: Volumen

DMSO: Dimethylsulfoxid

10X: 10-fach konzentriert

Tabelle 19: Fortsetzung.

			TYMS-6Bp-Del	CBS-T833C	TYMS-28Bp-Rep		CBS-844Ins68
Literatur (2)			Ulrich <i>et al.</i> (2000)	Tsai <i>et al.</i> (1996)	Hishida <i>et al.</i> (2003)	Volcik <i>et al.</i> (2003)	Tsai <i>et al.</i> (1996)
PCR	Ansatz	Master Mix	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
		Forwardprimer	2,5 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	3 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]
		Reverseprimer	2,5 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]	3 µl [10 pmol/µl]	2 µl [10 pmol/µl]
		nukleasefreies Wasser	15 µl	16 µl	4 µl	10 µl	16 µl
		DMSO	---	---	4 µl [8%]	4 µl [8%]	---
		Probanden-DNA (1)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
		Gesamtvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
	Zyklen	primäre Denaturierung	5 min (95° C)	3 min (95° C)	7 min (95° C)	5 min (95° C)	3 min (95° C)
		Denaturierung	30 sec (95° C)	60 sec (95° C)	60 sec (95° C)	60 sec (95° C)	60 sec (95° C)
		Annealing	45 sec (58° C)	60 sec (63° C)	45 sec (60° C)	45 sec (65° C)	60 sec (63° C)
		Elongation	45 sec (72° C)	60 sec (72° C)	60 sec (72° C)	30 sec (72° C)	60 sec (72° C)
		terminale Elongation	7 min (72° C)	3 min (72° C)	7 min (72° C)	7 min (72° C)	3 min (72° C)
		Wiederholungen	30	30	35	35	30
	Produkt [Bp]	unverdaut	148/142 (Ins/Del)	252/184 (Ins/Del)	238/210 (3R/2R)	576/548 (3R/2R)	252/184 (Ins/Del)
	Enzym	Name, Lieferant	Dral, Fermentas	BseNI, Fermentas	---	---	---
	PCR Produkt	[µl]	10	16 µl	---	---	---
Restriktionsverdau	Ansatz	Enzym [Vol., Enz.-Einh.]	1 µl, 10 U	2 µl, 20 U	---	---	---
		Puffer [10X]	2 µl	2 µl	---	---	---
		nukleasefreies Wasser	7 µl	---	---	---	---
	Inkubation	[Temperatur, Zeit]	37° C, 3h	37°, 5 h	---	---	---
	Inaktivierung	[Temperatur, Zeit]	65° C, 20 min	80° C, 20 min	---	---	---
Gelelektrophorese		Agarosegel	2%	2%	3%	2,5%	2%
		Laufzeit	30 min	30 min	45 min	75 min	30 min
		Spannung	100 V	100 V	100 V	100 V	100 V
Banden		Wildtyp	88, 60	252	238	576	184
		heterozygote Mutante	142, 88, 60	252, 209, 43	238, 210	576, 548	184, 252
		homozygote Mutante	142	209, 43	210	548	252
DHPLC Analysetemperatur		errechnete (3)	50,0° C (Sizing-Analyse)	---	---	---	---
		experimentell ermittelte	---	---	---	---	---

(1) DNA-Lösung aus der DNA-Isolation mit dem Qiagen DNA-Isolations Kit

(2) Literatur aus der die Primer entnommen wurden

(3) Wavemaker™ Software

Enz.-Einh: Enzym-Einheiten in Units (U)

Vol: Volumen

DMSO: Dimethylsulfoxid

10X: 10-fach konzentriert

Laufmittelgradienten und Analysetemperaturen für die DHPLC- und die (D)HPLC-Sizing-Mutationsnachweise

Tabelle 20: Laufmittelgradienten und DHPLC- bzw. (D)HPLC-Analysetemperaturen für die Analysen der Polymorphismen im Homocystein- und Folatstoffwechsel.

A)	Polymorphismus				
	MTHFR-C677T	MTHFR-A1298C	MTHFR-1793A	MTHFD-G1958A	MTR-A2756G ⁽²⁾
Zeit [min]	Puffer B [%]				
0	50	43	50	50	45
0,1	55	48	55	55	50
4,6	64	57	64	64	59
4,7	50	43	50	50	45
4,8	50	43	50	50	45
4,9	50	43	50	50	45
5,0	50	43	50	50	45
DHPLC T. [°C]	62,7	60,8	62,7	--- ⁽¹⁾	--- ⁽¹⁾
B)	Polymorphismus				
	MTR-A2756G ⁽³⁾	RFC I-G80A	TC II-C776G	GCP II-C1561T	TYMS-28-Bp-Rep. ⁽⁴⁾
Zeit [min]	Puffer B [%]				
0	46	47	46	47	54
0,1	51	52	51	52	59
4,6	60	61	60	61	68
4,7	46	47	46	47	54
4,8	46	47	46	47	54
4,9	46	47	46	47	54
5,0	46	47	46	47	54
DHPLC T. [°C]	54,4	64,2	62,5	53,5	67,5
C)	Polymorphismus				
	TYMS-6-Bp-Del	TYMS-28-Bp-Rep. ⁽⁵⁾			
Zeit [min]	Puffer B [%]	Zeit [min]			
0	45	0	35		
0,5	50	3,0	55		
3,6	58	10,0	65		
3,7	45	11,0	35		
3,8	45	12,0	35		
3,9	45	12,1	35		
4,0	45	12,2	35		
(D)HPLC T. [°C]	50	(D)HPLC T. [°C]	50		

A und B: DHPLC-Analysen, C: (D)HPLC-Sizing-Analyse. ⁽¹⁾ Es wurde keine DHPLC-Analysetemperatur ermittelt, bei der alle Genotypen erkannt werden konnten. ⁽²⁾ PCR nach Leclerc *et al.* 1996, ⁽³⁾ PCR nach Harmon *et al.* 1999, ⁽⁴⁾ PCR nach Volcik *et al.* 2003, ⁽⁵⁾ PCR nach Hishida *et al.* 2003.

Die 20 Aminosäuren mit ihren Kurzbezeichnungen

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
Q	Glu	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
T	Thr	Threonin
S	Ser	Serin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

Kurzbezeichnungen der vier Basen in DNA-Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Kurzbezeichnungen für nicht eindeutig identifizierbare Basen

B	C oder G oder T	R	A oder G
D	A oder G oder T	S	G oder C
H	A oder C oder T	V	A oder C oder G
K	G oder T	W	A oder T
M	A oder C	Y	C oder T
N	A oder C oder G oder T		

10. Literaturverzeichnis

- Afman LA, Lievers KJ, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ.
Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects.
Eur J Hum Genet. 2002 Jul;10(7):433-8
- Akar N, Akar E.
Methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958 G-A (R653 Q) polymorphism in Turkish patients with venous thromboembolism.
Acta Haematol. 1999;102(4):199-200
- Allen RH, Seetharam B, Podell E, Alpers DH.
Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency.
J Clin Invest. 1978 Jan;61(1):47-54
- Andersen KJ, von der Lippe G.
The effect of proteolytic enzymes on the vitamin B12-binding proteins of human gastric juice and saliva.
Scand J Gastroenterol. 1979;14(7):833-8
- Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B.
Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status.
Eur J Clin Invest. 1992 Feb;22(2):79-87
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN.
Disease-causing mutations in the human genome.
Eur J Pediatr. 2000 Dec;159 Suppl 3:S173-8
- Antony AC.
The biological chemistry of folate receptors.
Blood. 1992 Jun 1;79(11):2807-20
- Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Takeishi K, Seno T.
Accumulation of DNA strand breaks during thymineless death in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells.
J Biol Chem. 1983 Oct 25;258(20):12448-54
- Bässler KH, Golly T, Loew D, Pietrzik K.
Vitamin-Lexikon
2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Frankfurt am Main, 1997:126-8
ISBN 3-437-21140-4
- Bates CJ, Mansoor MA, van der Pols J, Prentice A, Cole TJ, Finch S.
Plasma total homocysteine in a representative sample of 972 British men and women aged 65 and over.
Eur J Clin Nutr. 1997 Oct;51(10):691-7
- Bergmann MM, Bussas U, Boeing H.
Follow-up procedures in EPIC-Germany--data quality aspects. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.
Ann Nutr Metab. 1999;43(4):225-34
- Birn H, Verroust PJ, Nexo E, Hager H, Jacobsen C, Christensen EI, Moestrup SK.
Characterization of an epithelial approximately 460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B12 and binds receptor-associated protein.
J Biol Chem. 1997 Oct 17;272(42):26497-504

- Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Refsum H.
Elevated plasma total homocysteine and C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with spina bifida.
QJM. 1997 Sep;90(9):593-6
- Bleich S, Degner D, Javaheripour K, Kurth C, Kornhuber J.
Homocysteine and alcoholism.
J Neural Transm Suppl. 2000a;(60):187-96
- Bleich S, Degner D, Kropp S, Ruther E, Kornhuber J.
Red wine, spirits, beer and serum homocysteine.
Lancet. 2000b Aug 5;356(9228):512
- Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tudball N.
Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration.
Atherosclerosis. 1996 May;122(2):163-72
- Boeing H, Korfmann A, Bergmann MM.
Recruitment procedures of EPIC-Germany. European Investigation into Cancer and Nutrition.
Ann Nutr Metab. 1999;43(4):205-15
- Bolander-Gouaille C.
Focus on Homocysteine and the Vitamins involved in its Metabolism.
2. Auflage, Springer Verlag Berlin, 2001:11-31
ISBN:2-287-59712-3
- Bose S, Feix J, Seetharam S, Seetharam B.
Dimerization of transcobalamin II receptor. Requirement of a structurally ordered lipid bilayer.
J Biol Chem. 1996 May 17;271(20):11718-25
- Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Williams RR, Ellison RC, Selhub J.
Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study.
Atherosclerosis. 1995 Jul;116(1):147-51
- Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG.
A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.
JAMA. 1995 Oct 4;274(13):1049-57
- Brada N, Gordon MM, Wen J, Alpers DH.
Transfer of cobalamin from intrinsic factor to transcobalamin II.
J Nutr Biochem. 2001 Apr;12(4):200-206
- Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L.
Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis.
Circulation. 1998 Dec 8;98(23):2520-6
- Breton J, Sichel F, Abbas A, Marnay J, Arsene D, Lechevrel M.
Simultaneous use of DGGE and DHPLC to screen TP53 mutations in cancers of the esophagus and cardia from a European high incidence area (Lower Normandy, France).
Mutagenesis. 2003 May;18(3):299-306
- Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CM, Duran M, Hautvast JG, Eskes TK, Steegers-Theunissen RP.
Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial.
Am J Clin Nutr. 1999 Jan;69(1):99-104

- Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, McNulty H, Mitchell LE, Yarnell JW, Woodside JV, Boreham CA, McMaster D, Murray L, Strain JJ, Whitehead AS.
The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects.
Hum Genet. 2004 Jan;114(2):182-5
- Carreras CW, Santi DV.
The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase.
Annu Rev Biochem. 1995;64:721-62
- Carson NA, Neill DW.
Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland.
Arch Dis Child. 1962 Oct;37:505-13
- Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD.
Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation.
Lancet. 2005 Jan 15-21;365(9455):224-32
- Celermajer DS, Sorensen K, Ryalls M, Robinson J, Thomas O, Leonard JV, Deanfield JE.
Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents.
J Am Coll Cardiol. 1993 Sep;22(3):854-8
- Chadwick LH, McCandless SE, Silverman GL, Schwartz S, Westaway D, Nadeau JH.
Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes.
Genomics. 2000 Nov 15;70(1):66-73
- Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, Nicolas JP
A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia.
Mol Genet Metab. 2000 Aug;70(4):310-5
- Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, Mosig R, Selhub J, Ma J. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003 Oct;12(10):958-62
- Chu J, Dolnick BJ.
Natural antisense (rTSalpha) RNA induces site-specific cleavage of thymidylate synthase mRNA.
Biochim Biophys Acta. 2002 Jul 18;1587(2-3):183-93
- Clarke R, Armitage J.
Vitamin supplements and cardiovascular risk: review of the randomized trials of homocysteine-lowering vitamin supplements.
Semin Thromb Hemost. 2000;26(3):341-8
- Clarke R.
Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials.
Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration.
BMJ. 1998 Mar 21;316(7135):894-8
- Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira FC.
Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status.
Am J Clin Nutr. 1996 Feb;63(2):220-4
- Dallongeville J, Marecaux N, Fruchart JC, Amouyel P.
Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis.
J Nutr. 1998 Sep;128(9):1450-7

- De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ.
Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease.
Pharmacol Rev. 2002 Dec;54(4):599-618
- De Franchis R, Sperandio MP, Sebastio G, Andria G.
Clinical aspects of cystathionine beta-synthase deficiency: how wide is the spectrum? The Italian Collaborative Study Group on Homocystinuria.
Eur J Pediatr. 1998 Apr;157 Suppl 2:67-70
- De Stefano V, Dekou V, Nicaud V, Chasse JF, London J, Stansbie D, Humphries SE, Gudnason V.
Linkage disequilibrium at the cystathionine beta synthase (CBS) locus and the association between genetic variation at the CBS locus and plasma levels of homocysteine. The Ears II Group. European Atherosclerosis Research Study.
Ann Hum Genet. 1998 Nov;62 (Pt 6):481-90
- Dekou V, Whincup P, Papacosta O, Ebrahim S, Lennon L, Ueland PM, Refsum H, Humphries SE, Gudnason V.
The effect of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British regional heart study.
Atherosclerosis. 2001 Feb 15;154(3):659-66
- DeMille MM, Kidd JR, Ruggeri V, Palmatier MA, Goldman D, Odunsi A, Okonofua F, Grigorenko E, Schulz LO, Bonne-Tamir B, Lu RB, Parnas J, Pakstis AJ, Kidd KK.
Population variation in linkage disequilibrium across the COMT gene considering promoter region and coding region variation.
Hum Genet. 2002 Dec;111(6):521-37
- Demuth K, Atger V, Borderie D, Benoit MO, Sauvaget D, Lotersztajn S, Moatti N.
Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells.
Eur J Biochem. 1999 Jul;263(2):367-76
- Devlin AM, Ling EH, Peerson JM, Fernando S, Clarke R, Smith AD, Halsted CH
Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia.
Hum Mol Genet. 2000 Nov 22;9(19):2837-44
- Dierkes J, Jeckel A, Ambrosch A, Westphal S, Luley C, Boeing H.
Factors explaining the difference of total homocysteine between men and women in the European Investigation Into Cancer and Nutrition Potsdam study.
Metabolism. 2001 Jun;50(6):640-5
- Doshi S, McDowell I, Moat S, Lewis M, Goodfellow J.
Folate improves endothelial function in patients with coronary heart disease.
Clin Chem Lab Med. 2003 Nov;41(11):1505-12
- Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, Lewis MJ, Goodfellow J.
Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide?
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Jul;21(7):1196-202
- Drabek J.
A commented dictionary of techniques for genotyping.
Electrophoresis. 2001 Apr;22(6):1024-45
- Drogan D, Klipstein-Grobusch K, Wans S, Luley C, Boeing H, Dierkes J.
Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study.
Br J Nutr. 2004 Sep;92(3):489-96

- Drunat S, Moatti N, Demuth K.
Homocysteine decreases endothelin-1 expression by interfering with the AP-1 signaling pathway.
Free Radic Biol Med. 2002 Sep 1;33(5):659-68
- Drunat S, Moatti N, Paul JL, Cogny A, Benoit MO, Demuth K.
Homocysteine-induced decrease in endothelin-1 production is initiated at the extracellular level and involves oxidative products.
Eur J Biochem. 2001 Oct;268(20):5287-94
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S.
Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence.
Ann Intern Med. 1999 Sep 7;131(5):363-75
- Ezzeldin H, Hoffmayer C, Soong R, Johnson MR, Lee A, Heslin M, Diasio R.
Simultaneous detection of variable number tandem repeats, single nucleotide polymorphisms, and allelic imbalance in the thymidylate synthase gene enhancer region using denaturing high-performance liquid chromatography.
Anal Biochem. 2004 Nov 15;334(2):276-83
- Finkelstein JD, Mudd SH, Irreverre F, Laster L.
Homocystinuria due to cystathionine synthetase deficiency: the mode of inheritance.
Science. 1964 Nov 6;146:785-7
- Finkelstein JD.
Homocysteine: a history in progress.
Nutr Rev. 2000 Jul;58(7):193-204
- Fodde R, Losekoot M.
Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).
Hum Mutat. 1994;3(2):83-94
- Fogarty DG, Maxwell AP, Doherty CC, Hughes AE, Nevin NC.
ACE gene typing.
Lancet. 1994 Apr 2;343(8901):851
- Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, Steinberg KK, Mueller PW, Thacker SB.
Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies.
Int J Epidemiol. 2002 Feb;31(1):59-70
- Födinger M, Dierkes J, Skoupy S, Rohrer C, Hagen W, Puttinger H, Hauser AC, Vychytil A, Sunder-Plassmann G.
Effect of glutamate carboxypeptidase II and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients.
J Am Soc Nephrol. 2003 May;14(5):1314-9
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP.
A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.
Nat Genet. 1995 May;10(1):111-3
- Frueh FW, Noyer-Weidner M.
The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics.
Clin Chem Lab Med. 2003 Apr;41(4):452-61
- Gallagher PM, Ward P, Tan S, Naughten E, Kraus JP, Sellar GC, McConnell DJ, Graham I, Whitehead AS.
High frequency (71%) of cystathionine beta-synthase mutation G307S in Irish homocystinuria patients.
Hum Mutat. 1995;6(2):177-80

- Gaustadnes M, Ingerslev J, Rutiger N.
Prevalence of congenital homocystinuria in Denmark.
N Engl J Med. 1999 May 13;340(19):1513
- Gaustadnes M, Rudiger N, Rasmussen K, Ingerslev J.
Familial thrombophilia associated with homozygosity for the cystathionine beta-synthase 833T-->C mutation.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 May;20(5):1392-5
- Geisel J, Hubner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, Herrmann W.
The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia.
Clin Chem Lab Med. 2003 Nov;41(11):1427-34
- Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA.
The identification of homocystine in the urine.
Biochem Biophys Res Commun. 1962 Dec 19;9:493-6
- Grompe M.
The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids.
Nat Genet. 1993 Oct;5(2):111-7
- Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M.
A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC.
Hum Genet. 1999 Jul-Aug;105(1-2):72-8
- Gut IG.
Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms.
Hum Mutat. 2001 Jun;17(6):475-92
- Guttormsen AB, Ueland PM, Lonning PE, Mella O, Refsum H.
Kinetics of plasma total homocysteine in patients receiving high-dose methotrexate therapy.
Clin Chem. 1998 Sep;44(9):1987-9
- Halsted CH.
Lifestyle effects on homocysteine and an alcohol paradox.
Am J Clin Nutr. 2001 Mar;73(3):501-2
- Hansen M, Nexø E.
The interaction of human transcobalamin isopeptides in cerebrospinal fluid and plasma with cobalamin and the cellular acceptor.
Biochim Biophys Acta. 1987 Dec 7;926(3):359-64
- Harker LA, Harlan JM, Ross R.
Effect of sulfapyridazine on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons.
Circ Res. 1983 Dec;53(6):731-9
- Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR.
Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis.
J Clin Invest. 1976 Sep;58(3):731-41
- Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, Peng K, Shane B, Evans AE, Whitehead AS.
Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations.
Genet Epidemiol. 1999 Nov;17(4):298-309
- Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE.
The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia.
QJM. 1996 Aug;89(8):571-7

- Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J.
Neurologic aspects of cobalamin deficiency.
Medicine (Baltimore). 1991 Jul;70(4):229-45
- Heil SG, Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ.
Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans.
Mol Genet Metab. 2000 Nov;71(3):511-9
- Heil SG, Van der Put NM, Waas ET, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ.
Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects?
Mol Genet Metab. 2001 Jun;73(2):164-72
- Herbert V.
Experimental nutritional folate deficiency in man.
Trans Assoc Am Physicians. 1962;75:307-20
- Herbert V.
Studies of folate deficiency in man.
Proc R Soc Med. 1964 May;57:377-84
- Herrmann M, Schorr H, Obeid R, Scharhag J, Urhausen A, Kindermann W, Herrmann W.
Homocysteine increases during endurance exercise.
Clin Chem Lab Med. 2003a Nov;41(11):1518-24
- Herrmann M, Wilkinson J, Schorr H, Obeid R, Georg T, Urhausen A, Scharhag J, Kindermann W, Herrmann W.
Comparison of the influence of volume-oriented training and high-intensity interval training on serum homocysteine and its cofactors in young, healthy swimmers.
Clin Chem Lab Med. 2003b Nov;41(11):1525-31
- Hippe E, Olesen H.
Nature of vitamin B 12 binding. 3. Thermodynamics of binding to human intrinsic factor and transcobalamins.
Biochim Biophys Acta. 1971 Jul 25;243(1):83-8
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Morishima Y, Emi N, Tajima K.
Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma.
Haematologica 2003 Feb;88(2):159-66.
- Homocysteine Studies Collaboration.
Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis.
JAMA. 2002 Oct 23-30;288(16):2015-22
- Hori T, Ayusawa D, Glover TW, Seno T.
Expression of fragile site on the human X chromosome in somatic cell hybrids between human fragile X cells and thymidylate synthase-negative mouse mutant cells.
Jpn J Cancer Res. 1985 Oct;76(10):977-83
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K.
Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase.
Cell Struct Funct. 1995 Jun;20(3):191-7
- Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK.
High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers.
Anal Biochem. 1993 Aug 1;212(2):351-8

- Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H.
A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil.
Br J Cancer. 2001 Sep 14;85(6):827-30
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R.
Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.
Circulation. 1996 Jan 1;93(1):7-9
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J.
Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort.
Am J Clin Nutr. 2001 Mar;73(3):613-21
- Johnson PH, Grossman LI.
Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs.
Biochemistry. 1977 Sep 20;16(19):4217-25
- Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, Chabner BA, Allegra CJ.
The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer.
J Clin Oncol. 1994 Dec;12(12):2640-7
- Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC.
Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis.
Clin Chem. 1999 Aug;45(8 Pt 1):1133-40
- Kaiser R, Tremblay PB, Roots I, Brockmoller J.
Validity of PCR with emphasis on variable number of tandem repeat analysis.
Clin Biochem. 2002 Feb;35(1):49-56
- Kan YW, Dozy AM.
Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells.
Lancet. 1978 Oct 28;2(8096):910-2
- Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Gotoh O, Seno T, Ayusawa D.
Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene.
J Biol Chem. 1990 Nov 25;265(33):20277-84
- Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV.
Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression.
Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12):4096-101
- Kawakami K, Watanabe G.
Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene.
Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):6004-7
- Kawate H, Landis DM, Loeb LA.
Distribution of mutations in human thymidylate synthase yielding resistance to 5-fluorodeoxyuridine.
J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36304-11
- Kealey C, Brown KS, Woodside JV, Young I, Murray L, Boreham CA, McNulty H, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM, Whitehead AS.
A common insertion/deletion polymorphism of the thymidylate synthase (TYMS) gene is a determinant of red blood cell folate and homocysteine concentrations.
Hum Genet. 2005 Apr;116(5):347-53

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 Oct 23-30;288(16):2023-31

Kluijtmans LA, Boers GH, Kraus JP, van den Heuvel LP, Cruysberg JR, Trijbels FJ, Blom HJ. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. Am J Hum Genet. 1999 Jul;65(1):59-67

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 Jan;58(1):35-41

Körner und Witkowsky
Humangenetik systematisch
1. Auflage, Bremen und Lorch/Württemberg: Uni-Med, 1997:115-6)
ISBN 3-89599-125-2

Koehler KM, Baumgartner RN, Garry PJ, Allen RH, Stabler SP, Rimm EB. Association of folate intake and serum homocysteine in elderly persons according to vitamin supplementation and alcohol use. Am J Clin Nutr. 2001 Mar;73(3):628-37

Koletzko B, Pietrzik K.
Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr.
Deutsches Ärzteblatt 2004 Jun; 23:1670-81

Kornmann M, Schwabe W, Sander S, Kron M, Strater J, Polat S, Kettner E, Weiser HF, Baumann W, Schramm H, Hausler P, Ott K, Behnke D, Staib L, Beger HG, Link KH. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. Clin Cancer Res. 2003 Sep 15;9(11):4116-24

Kozich V, Kraus JP.
Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in E. coli: homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency.
Hum Mutat. 1992;1(2):113-23

Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandio MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. Hum Mutat. 1999;13(5):362-75

Kruger WD, Evans AA, Wang L, Malinow MR, Duell PB, Anderson PH, Block PC, Hess DL, Graf EE, Upton B. Polymorphisms in the CBS gene associated with decreased risk of coronary artery disease and increased responsiveness to total homocysteine lowering by folic acid. Mol Genet Metab. 2000 May;70(1):53-60

Ladner RD.
The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy.
Curr Protein Pept Sci. 2001 Dec;2(4):361-70

LaRosa JC.
Atherosclerotic risk factors in cardiovascular disease.
J Reprod Med. 1986 Sep;31(9 Suppl):906-12

- Laster L, Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F.
Homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency: the metabolism of L-methionine.
J Clin Invest. 1965 Oct;44(10):1708-19
- Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA.
Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders.
Hum Mol Genet. 1996 Dec;5(12):1867-74
- Lentz SR, Sadler JE.
Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine.
J Clin Invest. 1991 Dec;88(6):1906-14
- Li N, Sood GK, Seetharam S, Seetharam B.
Polymorphism of human transcobalamin II: substitution of proline and/or glutamine residues by arginine.
Biochim Biophys Acta. 1994 Oct 18;1219(2):515-20
- Libra M, Navolanic PM, Talamini R, Cecchin E, Sartor F, Tumolo S, Masier S, Travali S, Boiocchi M, Toffoli G.
Thymidylate synthetase mRNA levels are increased in liver metastases of colorectal cancer patients resistant to fluoropyrimidine-based chemotherapy.
BMC Cancer. 2004 Mar 25;4:11
- Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH, Jukema JW, van Veldhuisen DJ.
Secondary prevention with folic acid: effects on clinical outcomes.
J Am Coll Cardiol. 2003 Jun 18;41(12):2105-13
- Lievers KJ, Afman LA, Kluijtmans LA, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ.
Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients.
Clin Chem. 2002a Sep;48(9):1383-9
- Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ.
A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk.
J Mol Med. 2001 Sep;79(9):522-8
- Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ.
Genetics of hyperhomocysteinaemia in cardiovascular disease.
Ann Clin Biochem. 2003a Jan;40:46-59
- Lievers KJ, Kluijtmans LA, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ.
Influence of a glutamate carboxypeptidase II (GCPII) polymorphism (1561C-->T) on plasma homocysteine, folate and vitamin B(12) levels and its relationship to cardiovascular disease risk.
Atherosclerosis. 2002b Oct;164(2):269-73
- Lievers KJ, Kluijtmans LA, Heil SG, Boers GH, Verhoef P, Den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ.
Cystathionine beta-synthase polymorphisms and hyperhomocysteinaemia: an association study.
Eur J Hum Genet. 2003b Jan;11(1):23-9.
- Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH.
A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease.
N Engl J Med. 1995 Mar 16;332(11):706-11
- Liu J, Schmitz JC, Lin X, Tai N, Yan W, Farrell M, Bailly M, Chen T, Chu E.
Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression.
Biochim Biophys Acta. 2002 Jul 18;1587(2-3):174-82

- Loscalzo J.
The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia.
J Clin Invest. 1996 Jul 1;98(1):5-7
- Lu SC.
S-Adenosylmethionine.
Int J Biochem Cell Biol. 2000 Apr;32(4):391-5
- Luo HR, Lu XM, Yao YG, Horie N, Takeishi K, Jorde LB, Zhang YP.
Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles.
Biochem Genet. 2002 Feb;40(1-2):41-51
- Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, Ladner RD.
A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity.
Cancer Res. 2003 Jun 1;63(11):2898-904
- Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, Lenz HJ, Ladner RD.
A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels.
Pharmacogenetics. 2004 May;14(5):319-27
- Mangoni AA, Jackson SH.
Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects.
Am J Med. 2002 May;112(7):556-65
- Manjunath G, Tighiouart H, Coresh J, Macleod B, Salem DN, Griffith JL, Levey AS, Sarnak MJ.
Level of kidney function as a risk factor for cardiovascular outcomes in the elderly.
Kidney Int. 2003 Mar;63(3):1121-9
- Manolio TA, Kronmal RA, Burke GL, O'Leary DH, Price TR.
Short-term predictors of incident stroke in older adults. The Cardiovascular Health Study.
Stroke. 1996 Sep;27(9):1479-86
- Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I, Ganey V.
Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol.
Clin Chem. 1997 Jan;43(1):30-3
- Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL.
Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations.
Hum Mutat. 2000 Dec;16(6):528
- Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL.
Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations.
Genomics. 1999 Jun 15;58(3):310-2
- McCaddon A, Blennow K, Hudson P, Regland B, Hill D.
Transcobalamin polymorphism and homocysteine.
Blood. 2001 Dec 1;98(12):3497-9
- McCully KS, Wilson RB.
Homocysteine theory of arteriosclerosis.
Atherosclerosis. 1975 Sep-Oct;22(2):215-27
- McCully KS.
Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis.
Am J Pathol. 1969 Jul;56(1):111-28

- McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP.
Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland.
Stroke. 2002 Oct;33(10):2351-6
- McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM.
Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat.
Clin Sci (Lond). 1991 Oct;81(4):551-6
- McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP.
Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons.
N Engl J Med. 2004 May 13;350(20):2042-9
- Meisel C, Cascorbi I, Gerloff T, Stangl V, Laule M, Muller JM, Wernecke KD, Baumann G, Roots I, Stangl K.
Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease.
Atherosclerosis. 2001 Feb 15;154(3):651-8
- Miller AL.
The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases.
Altern Med Rev. 2003 Feb;8(1):7-19
- Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R
Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults.
Blood 2002 Nov 15;100(10):3483
- Miller JW.
Homocysteine, Alzheimer's disease, and cognitive function.
Nutrition. 2000 Jul-Aug;16(7-8):675-7
- Moat SJ, Bao L, Fowler B, Bonham JR, Walter JH, Kraus JP.
The molecular basis of cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in UK and US patients with homocystinuria.
Hum Mutat. 2004a Feb;23(2):206
- Moat SJ, Lang D, McDowell IF, Clarke ZL, Madhavan AK, Lewis MJ, Goodfellow J.
Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease.
J Nutr Biochem. 2004b Feb;15(2):64-79
- Morris MS.
Homocysteine and Alzheimer's disease.
Lancet Neurol. 2003 Jul;2(7):425-8
- 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 Oct 24;39(42):13005-11
- Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L.
Homocystinuria: an enzymatic defect.
Science. 1964 Mar 27;143:1443-5
- Mudd SH, Levy HL.
Disorders of transsulfuration. Metabolic basis of inherited disease.
J.B. Stanbury, J.B. Wyngarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein, M.S. Brown, editors.
McGraw-Hill Book Co., New York, Fifth Edition 1983, 522-59

- Namour F, Olivier J, Abdelmoutaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J.
Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood.
Blood. 2001 Feb 15;97(4):1092-8
- Namour F, Guy M, Aimone-Gastin I, de Nonancourt M, Mrabet N, Gueant JL.
Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoproteins related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism.
Biochem Biophys Res Commun. 1998 Oct 29;251(3):769-74
- Nexo E, Hansen M, Rasmussen K, Lindgren A, Grasbeck R.
How to diagnose cobalamin deficiency.
Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1994;219:61-76
- Nguyen TT, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM.
Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA.
Gastroenterology. 1997 Mar;112(3):783-91
- Nollau P, Wagener C.
Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment.
Clin Chem. 1997 Jul;43(7):1114-28
- Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE.
Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study.
Am J Clin Nutr. 1998 Feb;67(2):263-70
- Obeid R, Kuhlmann MK, Kohler H, Herrmann W.
Response of homocysteine, cystathionine, and methylmalonic acid to vitamin treatment in dialysis patients.
Clin Chem. 2005 Jan;51(1):196-201
- Oefner PJ, Huber CG, Umlauf F, Berti GN, Stimpfl E, Bonn GK.
High-resolution liquid chromatography of fluorescent dye-labeled nucleic acids.
Anal Biochem. 1994 Nov 15;223(1):39-46
- Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS.
Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis.
Atherosclerosis. 1989 Jan;75(1):1-6
- Phan J, Steadman DJ, Koli S, Ding WC, Minor W, Dunlap RB, Berger SH, Lebioda L.
Structure of human thymidylate synthase suggests advantages of chemotherapy with noncompetitive inhibitors.
J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):14170-7
- Pietrzik K.
Concept of borderline vitamin deficiencies.
Int J Vitam Nutr Res Suppl. 1985;27:61-73
- Pinto X, Vilaseca MA, Balcells S, Artuch R, Corbella E, Meco JF, Vila R, Pujol R, Grinberg D.
A folate-rich diet is as effective as folic acid from supplements in decreasing plasma homocysteine concentrations.
Int J Med Sci. 2005;2(2):58-63
- Quadros EV, Regec AL, Khan KM, Quadros E, Rothenberg SP.
Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood.
Am J Physiol. 1999 Jul;277:161-6
- Quadros EV, Sai P, Rothenberg SP.
Functional human transcobalamin II isoproteins are secreted by insect cells using the baculovirus expression system.
Blood. 1993 Mar 1;81(5):1239-45

- Quinn K, Basu TK.
Folate and vitamin B12 status of the elderly.
Eur J Clin Nutr. 1996 Jun;50(6):340-2
- Rady PL, Szucs S, Matalon RK, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H.
Genetic polymorphism (G80A) of reduced folate carrier gene in ethnic populations.
Mol Genet Metab. 2001 Jul;73(3):285-6
- Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK.
Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A.
Am J Med Genet. 2002 Jan 15;107(2):162-8
- Rasmussen LB, Ovesen L, Bulow I, Knudsen N, Laurberg P, Perrild H.
Folate intake, lifestyle factors, and homocysteine concentrations in younger and older women.
Am J Clin Nutr. 2000 Nov;72(5):1156-63
- Regec A, Quadros EV, Platica O, Rothenberg SP.
The cloning and characterization of the human transcobalamin II gene.
Blood. 1995 May 15;85(10):2711-9
- Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, Charrondiere UR, Hemon B, Casagrande C, Vignat J, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Thiebaut A, Wahrendorf J, Boeing H, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Vineis P, Palli D, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Engeset D, Gonzalez CA, Barricarte A, Berglund G, Hallmans G, Day NE, Key TJ, Kaaks R, Saracci R.
European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection.
Public Health Nutr. 2002 Dec;5:1113-24
- Richter S, Seth A.
One step direct detection of recurrent mutations in the breast cancer susceptibility gene, BRCA1.
Int J Oncol. 1998 Jun;12(6):1263-7
- Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F.
PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1).
Nucleic Acids Res. 1992 Mar 25;20(6):1433
- Riggs KM, Spiro A 3rd, Tucker K, Rush D.
Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study.
Am J Clin Nutr. 1996 Mar;63(3):306-14
- Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K.
Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in stroke patients.
Bone. 2005 Apr;36(4):721-6
- Saw SM, Yuan JM, Ong CN, Arakawa K, Lee HP, Coetzee GA, Yu MC.
Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore.
Am J Clin Nutr. 2001 Feb;73(2):232-9
- Schüttler K.
Determinanten, Diagnose und klinische Konsequenzen eines subklinischen Vitamin B₁₂ Mangels bei gesunden Senioren.
Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (2004)
- 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 Feb 14;346(7):476-83

- Shanmugam V, Sell KW, Saha BK.
Mistyping ACE heterozygotes.
PCR Methods Appl. 1993 Oct;3(2):120-1
- Sobczynska-Malefora A, Harrington DJ, Rangarajan S, Kovacs JA, Shearer MJ, Savidge GF.
Hyperhomocysteinemia and B-vitamin status after discontinuation of oral anticoagulation therapy in patients with a history of venous thromboembolism.
Clin Chem Lab Med. 2003 Nov;41(11):1493-7
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV.
Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase.
Clin Cancer Res. 2000 Apr;6(4):1322-7
- Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frosing R, Bernstein L, Hayes AA.
Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil.
Cancer Res. 1988 Oct 15;48(20):5894-900
- Spiegelman JI, Mindrinos MN, Oefner PJ.
High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC.
Biotechniques. 2000 Nov;29(5):1084-90
- Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J.
Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency.
Blood. 1990 Sep 1;76(5):871-81
- 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 Nov;41(11):1392-403
- Stangl V, Gunther C, Jarrin A, Bramlage P, Moobed M, Staudt A, Baumann G, Stangl K, Felix SB.
Homocysteine inhibits TNF-alpha-induced endothelial adhesion molecule expression and monocyte adhesion via nuclear factor-kappaB dependent pathway.
Biochem Biophys Res Commun. 2001 Feb 2;280(4):1093-100
- Starkebaum G, Harlan JM.
Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine.
J Clin Invest. 1986 Apr;77(4):1370-6
- Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Eskes TK.
Hyperhomocysteinemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae.
Lancet. 1992 May 2;339(8801):1122-3
- Stein G, Muller A, Busch M, Fleck C, Sperschneider H.
Homocysteine, its metabolites, and B-group vitamins in renal transplant patients.
Kidney Int Suppl. 2001 Feb;78:262-5
- Stover PJ.
Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease.
Nutr Rev. 2004 Jun;62(6):3-12
- Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP.
Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine.
Circulation. 2001 Nov 20;104(21):2569-75
- Sydow K, Böger RH.
Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options
Z Kardiol. 2001 Jan;90(1):1-11

- Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O, Seno T.
Human thymidylate synthase gene: isolation of phage clones which cover a functionally active gene and structural analysis of the region upstream from the translation initiation codon.
J Biochem (Tokyo). 1989 Oct;106(4):575-83
- Transgenomic
Getting Started on the WAVE® DNA Fragment Analysis System
480066a Version 2.0, October, 1999
- Transgenomic
Users Guide to PCR for the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System
Version 1.6 March 2002
Transgenomic Europe
- Trinh BN, Ong CN, Coetzee GA, Yu MC, Laird PW.
Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels.
Hum Genet. 2002 Sep;111(3):299-302
- 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 Jul 5;91(14):6369-73
- Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ
High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene.
Am J Hum Genet. 1996 Dec;59(6):1262-7
- Tsai MY, Bignell M, Yang F, Welge BG, Graham KJ, Hanson NQ.
Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels.
Atherosclerosis. 2000 Mar;149(1):131-7
- Ubbink JB, van der Merwe A, Vermaak WJ, Delport R.
Hyperhomocysteinemia and the response to vitamin supplementation.
Clin Investig. 1993 Dec;71(12):993-8
- Uchida K, Hayashi K, Kawakami K, Schneider S, Yochim JM, Kuramochi H, Takasaki K, Danenberg KD, Danenberg PV.
Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene.
Clin Cancer Res. 2004 Jan 15;10(2):433-9
- Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD.
Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas.
Cancer Res. 2002 Jun 15;62(12):3361-4
- Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD.
Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Dec;9(12):1381-5
- Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J.
Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase.
J Biol Chem. 1997 Jul 4;272(27):17012-7
- van Asselt DZ, de Groot LC, van Staveren WA, Blom HJ, Wevers RA, Biemond I, Hoefnagels WH.
Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects.
Am J Clin Nutr. 1998 Aug;68(2):328-34

- van Asselt DZ, Pasman JW, van Lier HJ, Vingerhoets DM, Poels PJ, Kuin Y, Blom HJ, Hoefnagels WH. Cobalamin supplementation improves cognitive and cerebral function in older, cobalamin-deficient persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001 Dec;56(12):775-9
- van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998 May;62(5):1044-51
- van der Put NM, Blom HJ. Reply to donnelly *Am J Hum Genet*. 2000 Feb;66(2):744-5
- van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 1995 Oct 21;346(8982):1070-1
- van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RP, Trijbels FJ, Eskes TK, Mariman EC, den Heyer M, Blom HJ. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med*. 1996 Nov;74(11):691-4
- van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med*. 2004 May 13;350(20):2033-41
- van Triest B, Pinedo HM, van Hensbergen Y, Smid K, Telleman F, Schoenmakers PS, van der Wilt CL, van Laar JA, Noordhuis P, Jansen G, Peters GJ. Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 1999 Mar;5(3):643-54
- Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1991 Sep;29(9):549-54
- Voeller DM, Zajac-Kaye M, Fisher RJ, Allegra CJ. The identification of thymidylate synthase peptide domains located in the interface region that bind thymidylate synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Sep 13;297(1):24-31
- Volcik KA, Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Laurent C, Finnell RH. Associations between polymorphisms within the thymidylate synthase gene and spina bifida. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*. 2003 Nov;67(11):924-8
- Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002 Nov 23;325(7374):1202
- Wald NJ, Law MR. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ*. 2003 Jun 28;326(7404):1419
- Wang H, Jiang X, Yang F, Chapman GB, Durante W, Sibinga NE, Schafer AI. Cyclin A transcriptional suppression is the major mechanism mediating homocysteine-induced endothelial cell growth inhibition. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):939-45

- Wans S, Schüttler K, Jakubiczka S, Müller A, Luley C, Dierkes J.
Analysis of the transcobalamin II 776C>G (259P>R) single nucleotide polymorphism by denaturing HPLC in healthy elderly: associations with cobalamin, homocysteine and holo-transcobalamin II.
Clin Chem Lab Med. 2003 Nov;41(11):1532-6
- Ward M, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Weir DG, Scott JM.
Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid.
QJM. 1997 Aug;90(8):519-24
- Wartell RM, Hosseini S, Powell S, Zhu J.
Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods.
J Chromatogr A. 1998 May 8;806(1):169-85
- Weiß M.
Homocystein - ein kardiovaskulärer Risikofaktor? – betrachtet unter sportmedizinischen Aspekten
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 2003 54(4):102-7
- Welch GN, Loscalzo J.
Homocysteine and atherothrombosis.
N Engl J Med. 1998 Apr 9;338(15):1042-50
- Wilcken DE, Wilcken B.
The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism.
J Clin Invest. 1976 Apr;57(4):1079-82
- Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R.
A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida.
Mol Genet Metab. 1999 Aug;67(4):317-23
- Winkelmayer WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Födinger M.
Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients.
Kidney Int. 2003 Jun;63(6):2280-5
- Wouters MG, Moorrees MT, van der Mooren MJ, Blom HJ, Boers GH, Schellekens LA, Thomas CM, Eskes TK.
Plasma homocysteine and menopausal status.
Eur J Clin Invest. 1995 Nov;25(11):801-5
- Xiao W, Oefner PJ.
Denaturing high-performance liquid chromatography: A review.
Hum Mutat. 2001 Jun;17(6):439-74
- Yamanoshita O, Kubota T, Hou J, Ping YM, Zhang XL, Li XP, Li SS, Li XX, Zhu DC, Fukushima Y, Nakajima T.
DHPLC is superior to SSCP in screening p53 mutations in esophageal cancer tissues.
Int J Cancer. 2004 Nov 2;13(9):651-8
- Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Rymo L, Zafiroopoulos A, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K.
The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion.
Hum Reprod. 2002 Dec;17(12):3033-6

11. Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt den Betreuern dieser Dissertation:

Jutta Dierkes

Claus Luley

und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Weiterhin möchte ich allen Danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben:

Lili Wiens

Elke Hinze

Jeannette Seger

Frau Engelberg

Ruma Makarova

Herr Felsche

Sibylle Jakubiczka

Corinna Eberle

Steffi Kästner

Gerd Lutze

Ansgar Kettrup

Lars Teichmann

Oliver Blechert

Katrin Borucki

Marianne Spindler

Michael Niebur

Sabine Westphal

Elina Taneva

Uta Zimmermann-Krause

Horst Witt

Jens-Martin Köser

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Beschäftigten des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie, bei meinen Eltern und bei meinen Freunden für die moralische Unterstützung während der letzten 3½ Jahre bedanken.

DANKE!

12. Publikationen

Marquardt J, **Wans S**, Rhiel E, Randolph A, Krumbein WE.

Intron-exon structure and gene copy number of a gene encoding for a membrane-intrinsic light-harvesting polypeptide of the red alga *Galdieria sulphuraria*
Gene. 2000; 255(2): 257-265

Marquardt J, Lutz B, **Wans S**, Rhiel E, Krumbein WE.

The gene family coding for the light-harvesting polypeptides of Photosystem I of the red alga *Galdieria sulphuraria*
Photosynth Res. 2001; 68(2): 121-130

Wans S, Schüttler K, Jakubiczka S, Müller A, Luley C, Dierkes J.

Analysis of the transcobalamin II 776C>G (259P>R) single nucleotide polymorphism by denaturing HPLC in healthy elderly: associations with cobalamin, homocysteine and holo-transcobalamin II
Clin Chem Lab Med. 2003; 41(11): 1532-1536

Drogan D, Klipstein-Grobusch K, **Wans S**, Luley C, Boeing H, Dierkes J.

Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study
Br J Nutr. 2004; 92(3): 489-96

Posterpräsentationen

Drogan D, Klipstein-Grobusch K, **Wans S**, Luley C, Boeing H, Dierkes J.

Plasma folate as a marker of folate status in the EPIC-Potsdam Study

41. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung
März 2004, Weihenstephan

Wans S, Jakubiczka S, Makarova R, Luley C, Dierkes J.

Sequence variations in the thymidylate synthase gene: frequency and possible influence on homocysteine and folate metabolism

1. Deutscher Atherosklerosekongress#
Oktober 2004, Leipzig

13. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema:

"Genetische Determinanten des Homocystein- und Folatstoffwechsels"

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 25.08.2005

14. LEBENSLAUF**Persönliche Daten**

Name	Stephan Wans
Geburtsdatum	17. März 1967
Geburtsort	Siegen
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
Nationalität	deutsch

Berufspraxis als Biologe

05.2002 – 05.2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand Institut für Klinische Chemie Universitätsklinikum Magdeburg
07.2001 – 01.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Universität Bremen
06.2000 – 06.2001	Auslandserfahrung Fremdenführer im tropischen Regenwald in Ecuador

Studium

10.1993 – 05.2000	Studium der Biologiewissenschaften Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zwei Auslandssemester am University College in Dublin Beginn des Studiums an der Philipps Universität Marburg Abschluß mit dem Diplom am 25.05.2000 Gesamtnote: gut
-------------------	---

Berufspraxis als Zimmermann

03.1993 – 09.1993	Zimmermann Holzbau Meyer in Neunkirchen
-------------------	---

Schulbildung

02.1989 – 06.1992	Siegerlandkolleg in Siegen Abschluß Abitur (Allgemeine Hochschulreife)
-------------------	--

Zivildienst

04.1987 – 11.1988	Bethesda Krankenhaus in Freudenberg
-------------------	-------------------------------------

Berufspraxis als Zimmermann

05.1986 - 03.1987	Zimmermann Hochtief AG-Köln
-------------------	---------------------------------------

Ausbildung

08.1983 – 04.1986	Ausbildung zum Zimmermann Hochtief AG-Köln
-------------------	--

Schulbildung

1977 – 1983	Hauptschule in Freudenberg
1973 – 1977	Grundschule in Siegen