

# Einfluss genetischer Polymorphismen des Homocysteinstoffwechsels auf cerebrovaskuläre Erkrankungen

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

Miriam Montenarh  
Ulm

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ullrich Wüllner
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. S. Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.02.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Aus Neurologische Klinik der Universitätsklinik Bonn  
Prof. Dr. med. U. Klockgether

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Der ischämische Hirninfarkt	5
1.2 Homocysteinstoffwechsel	11
1.2.1 Remethylierung	13
1.2.2 Transsulfurierung	17
1.3 Hyperhomocysteinämie	18
1.4 Homocystein und Arteriosklerose	20
1.5 Homocystein als pathogenes Agens der Arteriosklerose	22
1.6 Einfluß genetischer Faktoren auf die Hyperhomocysteinämie	24
1.7 Zielsetzung	26
<b>2 Patienten und Kontrollkollgruppen</b>	<b>27</b>
2.1 Patienten mit ischämischem Insult	27
2.2 Kontrollkollektiv	28
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1 Allgemeines	29
3.1.1 Chemikalien und Lösungen	29
3.1.2 Puffer	29
3.1.3 Geräte	30
3.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	30
3.3 Polymerasekettenreaktion	30
3.3.1 Allgemeines	30
3.3.2 Oligonukleotid-Primer	33
3.3.3 Reinigung von PCR- Produkten	34
3.3.4 Verdau von genomischer DNA mit Restriktionsendonuklen	34

3.3.5 horizontale Agarosegelelektrophorese	35
3.4 Statistik	36
3.5 Ort der Ausführung	37
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1 Methioninsynthase	38
4.2 Methylentetrahydrofolatreduktase c. 677	41
4.3 Methylentetrahydrofolatreduktase c. 1298	45
4.4 Cystathionin- $\beta$ - Synthase	48
4.5 Zusammenfassung	52
<b>5 Diskussion</b>	<b>54</b>
5.1 Methioninsynthase	55
5.2 Cystathionin- $\beta$ - Synthase	56
5.3 Methylentetrahydrofolatreduktase	56
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>61</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>87</b>
8.1 Abbildungsverzeichnis	87
8.2 Abkürzungsverzeichnis	88
8.3 Tabellenverzeichnis	90
8.4 Veröffentlichung	91
<b>Danksagung</b>	<b>92</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der ischämische Hirninfarkt

Der ischämische Insult ist die häufigste neurologische Erkrankung und steht mit 11.4% an Platz drei der Todesursachen in Deutschland nach kardialen- und Tumorerkrankungen (Statistisches Jahrbuch 1998, Kapitel 16 Gesundheitswesen. Wiesbaden 1998, 430-460). Der Schlaganfall stellt zudem die häufigste Ursache für lebenslange Behinderung im Erwachsenenalter dar (Kurtzke, 1982). Die Häufigkeit der zerebralen Ischämie steigt mit zunehmendem Alter stetig an. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes betrug der Anteil der über 65- jährigen in Deutschland im Jahre 1999 ca. 16% der Gesamtbevölkerung, im Jahre 2030 soll aufgrund demographischer Hochrechnungen der Anteil der über 65- jährigen ca. 33% betragen. Durch die fortgesetzte Zunahme der Lebenserwartung in Deutschland muss deshalb mit einem deutlichen Anstieg der zerebralen Ischämie- Häufigkeit gerechnet werden (Malmgren et al., 1987).

Trotz seiner Häufigkeit und seiner Auswirkung auf die Gesundheitssysteme weltweit gibt es nur sehr wenige zuverlässige Aussagen zur Inzidenz des Hirninfarktes. Im Erlanger-Schlaganfall- Register werden seit 1994 alle Hirn- und Kreislaufkrankungen, die im Stadtgebiet Erlangen auftreten, prospektiv und standardisiert erhoben. Im Zeitraum von 1994- 1996 fand sich eine jährliche Hirninfarkt- Inzidenz von 182/100 000 über alle Altersgruppen. Die Inzidenz stieg dabei von 4/100 000 (25- 34- jährige) auf 2117/100 000 bei über 84- jährigen. Die Altersabhängigkeit des Hirninfarktes wird durch diese Ergebnisse besonders eindrücklich demonstriert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz bei Männern gegenüber Frauen um das 1.25 fache erhöht ist (Kolominsky-Rabas et al., 1998). Aus dem Erlanger- Schlaganfall- Register sind auch erstmalig für Deutschland Inzidenzen zu einzelnen Ischämietypen verfügbar. Die Inzidenz des Hirninfarktes betrug 137/100 000.

Klinische und epidemiologische Forschungen haben in der Vergangenheit zahlreiche Risikofaktoren für das Auftreten von ischämischen Insulten identifiziert. Neben morbiditätsbedingten Faktoren wie der Hypertonie, dem Diabetes mellitus und verschiedenen Herzerkrankungen haben verhaltensabhängige Risikofaktoren wegen ihrer

zumindest theoretischen Beeinflussbarkeit besonderen Stellenwert (Bronner et al., 1995). Hierzu zählen in erster Linie das Rauchen, fehlende körperliche Aktivität, Übergewicht und Alkoholkonsum. Studien haben deutlich gemacht, dass viele dieser Faktoren einen unterschiedlichen Stellenwert für den Hirninfarkt darstellen, so dass eine differenzierte Betrachtung notwendig ist.

Die arterielle Hypertonie ist neben dem Lebensalter der bedeutende Risikofaktor für den ischämischen Hirninfarkt (Bogousslavsky, 1999; Bronner et al., 1995). Sie ist wesentlich an der Entstehung makro- und mikroangiopathischer Gefäßveränderungen beteiligt, sowie zu einem großen Teil auch Ursache für kardiale Erkrankungen (z.B. koronare Herzerkrankung oder linksventrikuläre Hypertrophie), die dann sekundär via kardiogener Embolie zu einer zerebralen Ischämie führen können. Das relative Risiko für den Hypertonus insgesamt zusammenzufassen ist schwierig. Die Framingham Studie ist eine wesentliche Kohortenstudie zu kardiovaskulären Risikofaktoren mit 3362 Frauen und 2372 Männern. Hier stieg das relative Risiko für einen Hirninfarkt um das 1.7 fache für Frauen und das 1.9 fache für Männer pro 10 mm Hg Anstieg des systolischen Blutdrucks (Wolf et al., 1991). Steigt der diastolische Blutdruck um 7.5 mm Hg, erhöht sich das Risiko um das 1.5 fache. In der Gruppe mit dem höchsten diastolischen Druck (110 mm Hg) war in der Metaanalyse von MacMahon das Hirninfarktrisiko 12 fach erhöht (MacMahon et al., 1990). In der neuesten Metaanalyse von 61 Beobachtungsstudien mit über 1 Million Patienten zeigte sich, dass das Risiko für eine tödliche zerebrale Ischämie mehr als verdoppelt war, wenn der systolische bzw. diastolische Druck um 20 mm Hg bzw. 10 mm Hg anstieg (Lewington et al., 2002).

Ziel der Primärprävention ist eine Blutdrucksenkung unter 140/90 mm Hg. Mehrere Untersuchungen zeigten durchgehend eine deutliche Reduktion des Hirninfarktrisikos unter antihypertensiver Therapie (Bokura und Kobayashi, 2005; Collins et al., 1990; Grassi et al., 2005; Mulrow et al., 1994; Neal et al., 2000; Psaty et al., 1997). Das absolute Hirninfarktrisiko kann in der Primärprävention um 0.4- 0.5% gesenkt werden.

Neben der Hypertonie stellt das Zigarettenrauchen einen der bedeutendsten Risikofaktoren für den Hirninfarkt dar. In einer Metaanalyse von 32 Einzelstudien wurde

gezeigt, dass Zigarettenrauchen das Hirninfarktrisiko generell um 50% gegenüber Nichtrauchern steigert. Dabei findet sich eine klare Dosis- Wirkungsbeziehung zwischen der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten und dem Risikoanstieg. Starke Raucher (> 40 Zigaretten/ Tag) erhöhen ihr Risiko gegenüber moderaten Rauchern (< 10 Zigaretten/ Tag) nochmals um das 2 fache (Shinton und Beevers, 1989). Die Framingham Studie konnte allerdings zeigen, dass nach Aufgabe des Zigarettenrauchens das Risiko des ischämischen Insultes innerhalb von 5 Jahren auf das von Nichtrauchern zurückgeht. Dabei bildet sich die Hälfte des erhöhten Risikos der Raucher bereits im ersten Jahr nach Aufgabe des Zigarettenkonsums zurück (Wolf et al., 1988). Diese rasche Rückbildung mit Normalisierung des Risikos 2- 4 Jahre nach Aufgabe des Rauchens konnte auch in einer großen amerikanischen Studie an Frauen bestätigt werden (Kawachi et al., 1993). Der Rückgang des Risikos ist unabhängig von der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten oder von dem Vorhandensein weiterer Hirninfarktrisikofaktoren.

Unter den krankheitsbedingten Risikofaktoren des ischämischen Insultes haben Herzerkrankungen eine Schlüsselstellung. Die kardiale Dysfunktion stellt durch verminderte Pumpleistung und vor allem als Quelle von Embolien einen bedeutenden Risikofaktor dar. Herzerkrankungen nehmen mit dem Alter ebenso zu, wie die Inzidenzen für einen ischämischen Insult. In höherem Lebensalter stellen die koronare Herzkrankheit, die Herzinsuffizienz, die linksventrikuläre Hypertrophie und insbesondere das Vorhofflimmern bedeutsame, aber potentiell behandelbare Risikofaktoren des Hirninfarktes dar. Umfangreiche Untersuchungen zur Bedeutung von Herzerkrankungen als Risikofaktoren für zerebrale Ischämien stammen aus der Framingham- Heart- Study (Benjamin et al., 1995; Wolf et al., 1991). Das altersadjustierte Risiko des Hirninfarktes verdoppelt sich bei Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung, verdreifacht sich bei elektrokardiographisch diagnostizierter ventrikulärer Hypertrophie, nahm um den Faktor 3 bis 4 bei vorliegender Herzinsuffizienz und um den Faktor 5 beim Vorhofflimmern zu. Aufgrund des hohen Risikos hat das Vorhofflimmern innerhalb der Herzerkrankungen eine Sonderstellung (Hart und Halperin, 2001). Eine Metaanalyse aus 5 placebokontrollierten Studien zeigte, dass eine orale Antikoagulation mit Vitamin- K-Antagonisten zu einer 72%-igen Risikoreduktion für Hirninfarkte im Vergleich zu Placebos führt (Hart et al., 2002). Patienten, die keine oralen Antikoagulanzen einnehmen können,

profitieren, wenn auch deutlich geringer, von Azetylsalizylsäure. Hier liegt die relative Dosisreduktion im Vergleich zu Placebo bei 22% (van Walraven et al., 2003).

Transitorisch ischämische Attacken (TIA) sind ein weiterer wichtiger Indikator des Hirninfarktes. Das durchschnittliche Risiko bei TIA- Patienten beträgt 4%. Das Risiko wird zum Teil durch die oben beschriebenen Faktoren erklärt, TIAs sind darüber hinaus auch als unabhängiger Risikofaktor beschrieben (Howard et al., 1994). Das Risiko ist größer bei Vorliegen einer ipsilateralen Carotisstenose und in der ersten Zeit nach Auftreten der TIA (Sacco et al., 1997). Vorgehende TIAs waren bei 21% der Patienten mit ischämischen Insulten laut der Stroke Data Bank aufgetreten (Sacco et al., 1989).

Ein weiterer bedeutender Risikofaktor für zerebrale Ischämien ist eine diabetische Stoffwechsellage. Diabetes mellitus ist definiert als eine chronisch progrediente Erkrankung, verursacht durch eine vererbte oder erworbene Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung. Diabetiker haben ein erhöhtes Risiko, eine Arteriosklerose zu entwickeln und haben auch häufiger weitere Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Adipositas und Hypertonie. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Diabetes mellitus das Risiko für einen ischämischen Insult um den Faktor 2- 3 erhöht (Burchfiel et al., 1994; Manson et al., 1991). Es existieren zwei randomisierte Studien in der Primärprävention, die eine intensivierete Blutzuckersenkung in Bezug auf das zerebrale Ischämierisiko bei Typ 1 bzw. Typ 2 Diabetikern untersuchten, mit negativem Ergebnis. Wichtig für eine Hirninfarktprophylaxe sind neben der Diabetestherapie eine Gewichtsreduktion, Ernährungsumstellung und körperliche Aktivität.

Der Zusammenhang zwischen zerebraler Ischämie und Cholesterin bleibt, im Gegensatz zur klaren Evidenz bei der koronaren Herzerkrankung, ein kontroverses Thema. In den großen Kohortenstudien (u.a. Framingham) und in einer Metaanalyse von 45 Kohorten zeigte sich früher keine signifikante Assoziation zwischen einer Cholesterinerhöhung und einer zerebralen Ischämie (prospective studies collaboration 1995 Cholesterol, diastolic blood pressure and stroke). In diesen Studien wurden jedoch meist ischämische Infarkte und Blutungen nicht unterschieden, oder, wie in der MRFIT- Studie (multiple risk factor intervention trial), nur bei tödlichen Infarkten eine Differenzierung vorgenommen. In Jahre



2003 wurden weitere Studien veröffentlicht, worin eine Hypercholesterinämie keinen eigenständigen Risikofaktor für einen Hirninfarkt darstellt (Bowman et al., 2003; Shahar et al., 2003). Eine Reihe von Studien zum Einsatz von Statinen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigte interessanterweise, dass durch Statine auch das Hirninfarkttrisiko reduziert wird. Durch eine regelmäßige Einnahme von Statinen kann das absolute Hirninfarkttrisiko um 0.2- 1.7% reduziert werden (Blauw et al., 1997; Bucher et al., 1999; Corvol et al., 2003; Law et al., 2003; Ross et al., 1999).

Aufgrund von methodischen Problemen (subjektive Datenerhebung zur Trinkmenge und Trinkverhalten, ethnische Unterschiede), unterschiedlichen Definitionen (Alkoholmenge, Gründe von Abstinenz) und den vielfältigen biologischen Auswirkungen von Alkohol ist der Effekt auf den ischämischen Hirninfarkt schwierig zu beurteilen und umstritten. Zudem spielt die Dosis und Darreichungsform wie bei kaum einem anderen Risikofaktor eine Rolle. Pathophysiologisch werden verschiedene Effekte wie Blutdruckzunahme, Gerinnungsstörungen und kardiale Arrhythmien vermutet. In einer älteren Metaanalyse von 6 Studien, in der Framingham- Kohorte und dem Honolulu Heart Programm hatte Alkohol dosisunabhängig kein signifikant erhöhtes Risiko für einen ischämischen Hirninfarkt gezeigt (Corrao et al., 1999; Djousse et al., 2002; Donahue und Abbott, 1986). Andere Kohortenstudien fanden hingegen einen protektiven Effekt von Alkohol. Gering bis moderater Alkoholkonsum und Wein sind vermutlich protektiv, während bei höheren Alkoholmengen das Risiko wieder ansteigt (U- oder J- förmige Dosis-Wirkungsbeziehung) (Berger et al., 1999; Camargo, Jr., 1989; Camargo, Jr., 1996; Emberson et al., 2005; Sacco et al., 1999; Scherr et al., 1992; Zhang et al., 2004). In der neuesten Metaanalyse von 35 Studien war das Ischämierisiko ab 60 g Alkohol/ Tag 1.7 fach erhöht, 12- 24 g Alkohol/ Tag waren protektiv (Reynolds et al., 2003).

In vielen Studien wurde der Einfluss von körperlicher Aktivität auf das zerebrale Ischämierisiko untersucht und ein protektiver Effekt festgestellt. Im Umkehrschluss lässt sich eine Senkung des Hirninfarkttrisikos durch regelmäßige körperliche Aktivität sowohl bei Männern (Kiely et al., 1994; Lee et al., 1999; Wannamethee und Shaper, 1992) als auch bei Frauen (Gillum et al., 1996; Lindenstrom et al., 1993; Shinton und Sagar, 1993) aus mehreren Studien belegen. In der Physicians Health Study zeigte sich der protektive

Effekt bereits bei einmaligem sportlichem Training in der Woche (Lee et al., 1999). Die Risikoreduzierung wird durch eine Reihe von biologischen Mechanismen erklärt. So reduziert körperliche Aktivität die Aggregation von Thrombozyten, erhöht die Sensibilität gegenüber Insulin, erhöht das HDL- Cholesterin und reduziert Gewicht und Blutdruck (Evenson et al., 1999; Lee et al., 1999).

Übergewicht als Risikofaktor ist einerseits eng mit fehlender körperlicher Aktivität, andererseits mit erhöhtem Blutdruck, einer Dyslipidämie, einer Hyperinsulinämie sowie einer gestörten Glukosetoleranz verbunden. Aufgrund dieser Assoziation stellen die verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Abläufe bedeutsame Mediatoren des Hirninfarkttrisikos dar.

Nicht beeinflussbare soziodemographische Faktoren wie Alter, Geschlecht und ethnische Herkunft sind ebenfalls mit dem Auftreten von zerebralen Ischämien assoziiert. Wichtigster unabhängiger Risikofaktor für einen Hirninfarkt ist das Alter. Nach dem fünfzigsten Lebensjahr erhöht sich das Hirninfarkttrisiko mit jeder Dekade in etwa um das Zwei- bis Dreifache. Die Hirninfarktinzidenz bei Männern ist gegenüber Frauen um das 1.25 fache erhöht. Aufgrund der längeren Lebenserwartung von Frauen sterben jedoch jährlich mehr Frauen als Männer an Hirninfarkten (Kolominsky-Rabas et al., 1998). Zerebrale Ischämie- Inzidenzen und Mortalität werden auch durch die ethnische Abstammung beeinflusst. So haben schwarze Amerikaner ein etwa doppelt so hohes Hirninfarkttrisiko als Weiße (Bravata et al., 2005). Gegenüber Europa und Nordamerika ist die Inzidenz zerebrovaskulärer Ereignisse bei der asiatischen Bevölkerung – insbesondere bei Chinesen und Japanern- besonders hoch. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist die Familienanamnese. Eine positive Familienanamnese für zerebrovaskuläre und kardiovaskuläre Ereignisse erhöht das Hirninfarkttrisiko. Dies ist möglicherweise bedingt durch eine genetische Disposition für zerebrale Ischämien, eine genetische Disposition für bestimmte vaskuläre Risikofaktoren, gemeinsame Umwelteinflüsse oder das Zusammenspiel aller drei (Jood et al., 2005; Kim et al., 2004).

Aufgrund der Häufigkeit dieser Erkrankungen und den schwerwiegenden Folgen für den Patienten muss eine Prophylaxe bzw. Aufklärung der Patienten bezüglich der

Risikofaktoren durchgeführt werden. Die klassischen Risikofaktoren Fettstoffwechselstörungen, Hypertonie und Rauchen erklären etwa zwei Drittel aller kardiovaskulären Erkrankungen (Kritz und Sinzinger, 1997). Große klinische Studien zeigten, dass im Falle von Fettstoffwechselstörungen trotz LDL- Cholesterin- senkender Therapie weiterhin kardiovaskuläre Ereignisse auftraten (Stein und McBride, 1998). Auf der Suche nach anderen unabhängigen Risikofaktoren für atherosklerotische Gefäßveränderungen stieß man auf die Hyperhomocysteinämie. Bereits 1969 konnte McCully zeigen, dass es eine Beziehung zwischen erhöhten Homocysteinwerten und dem Auftreten von atherosklerotischen Läsionen und thromboembolischen Ereignissen gibt (McCully, 1969). In zahlreichen Studien konnte eine Hyperhomocysteinämie als unabhängiger Risikofaktor für frühzeitige Atherosklerose gezeigt werden (Kircher und Sinzinger, 1999).

## **1.2 Homocystein- Stoffwechsel**

Die schwefelhaltige Aminosäure Homocystein ist eine nicht- proteinogene Aminosäure, die im Plasma normalerweise in Konzentrationen zwischen 8 und 12  $\mu\text{M}$  vorkommt. Nur 1-2% des Homocysteins liegt in freier, reduzierter Form vor. 20% kommen als freie oxidierte Form vor, die restlichen rund 80% findet man an Albumin gebunden (Sengupta et al., 2001).

Homocystein (Hcy) entsteht als Zwischenprodukt beim Abbau der Aminosäure Methionin (Abb.1). Methionin ist eine semiessentielle Aminosäure, die mit der Nahrung aufgenommen werden muss. In der Gesamtbilanz wird etwa die Hälfte des anfallenden Homocysteins (in freier Form) renal ausgeschieden, die andere Hälfte wird entweder zu Methionin remethyliert oder aber per Transsulfurierung zu Cystein abgebaut (wiederum etwa je zur Hälfte) (Ubagai et al., 1995). Homocystein kann zu Methionin remethyliert werden und dient so der Bereitstellung von S- Adenosylmethionin (SAM), einem wichtigen Methylgruppendonator bei zahlreichen biologischen Reaktionen (DNA, Proteine, Neurotransmitter, Hormone, Phospholipide) (van der Put et al., 1998). Über die Transsulfurierung kann Homocystein über Cystathionin (CYS) zu Cystein und  $\alpha$ -Ketobutyrat abgebaut werden. Homocystein wird vorwiegend hepatisch metabolisiert.

Weiterhin muss beachtet werden, dass nicht- metabolisiertes Hcy ins Blut abgegeben wird (Selhub, 1999). Dies verhindert zwar eine Vergiftung der Zelle, setzt aber das Endothel dem schädlichen Effekt hoher Homocystein- Konzentrationen aus.

Die Fähigkeit, je nach Angebot an Methionin, zwischen Remethylierung und Transsulfurierung, zu unterscheiden, impliziert die Existenz eines Regulators zwischen diesen Stoffwechselwegen. S- Adenosylmethionin scheint dabei als Regulator zu fungieren, indem es sowohl als allosterischer Hemmer der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR), als auch als Aktivator der Cystathionin-  $\beta$ -Synthase (CBS) fungiert. Dabei unterdrückt SAM die Synthese von 5-Methyltetrahydrofolat (5- MTHF), einem wichtigen Substrat, das für die Remethylierung benötigt wird und fördert die Cystathioninsynthese, die Anfangsreaktion der Transsulfurierung. Ist die Konzentration von SAM in der Zelle niedrig, wird die CBS und somit die Transsulfurierung gehemmt (Brattstrom et al., 1990; Selhub und Miller, 1992). Dies führt zu einer Konservierung von Homocystein und im weiteren Verlauf zu einer Erhöhung des SAM- Spiegels. Ist die SAM- Konzentration hoch, wird Homocystein vermehrt über die Transsulfurierung abgebaut (Selhub, 1999; Ueland et al., 1993). Somit ist die intrazelluläre SAM- Konzentration eine wichtige Determinante im Schicksal der Hcy- Moleküle. Studien über die Regulation des Hcy- Metabolismus haben gezeigt, dass die Nutzung der Remethylierung oder der Transsulfurierung auch vom Ernährungszustand abhängt. Wird dem Menschen eine methioninreiche Diät verabreicht wird, durchlaufen die Hcy- Moleküle etwa 1.5- 2 mal den Remethylierungszustand. Wird jedoch die Methioninzufuhr halbiert, durchlaufen die Hcy- Moleküle die Remethylierung doppelt so oft (Eloranta et al., 1990). Wie in Abbildung 1 ersichtlich ist die Remethylierungsreaktion von den Vitaminen B<sub>12</sub> und Folat abhängig. Bei Vitaminmangelzuständen kommt es zu einer inadäquaten Erhöhung des Hcy- Austritts aus den Zellen. Unter physiologischen Bedingungen gelangen etwa 5- 10% der gesamten zellulären Hcy- Produktion ins Plasma. Bei Patienten mit einem Vitamin- B<sub>12</sub>- Mangel können bis zu 80% der intrazellulären Hcy- Produktion ins Plasma exportiert werden (Guttormsen et al., 1996).

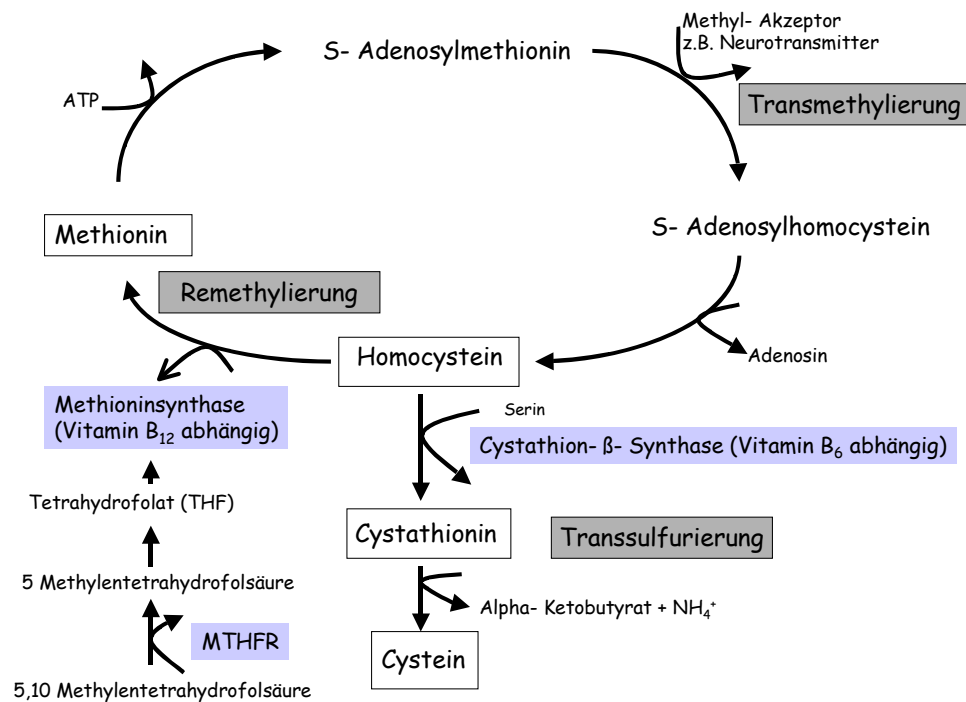


Abbildung 1: Homocysteinestoffwechsel

### 1.2.1 Remethylierung

Hcy wird durch die Vitamin- B<sub>12</sub>- abhängige Methioninsynthase zu Methionin remethyliert. In dieser Reaktion dient 5- MTHF als Methylgruppenlieferant und wird aus 5,10- Methyltetrahydrofolat mit Hilfe der MTHFR gebildet. Das entstehende Methionin ist ein Baustein für die Proteinbiosynthese. Darüber hinaus wird ein gewisser Teil durch ATP zu S- Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt. SAM ist der wichtigste Methylgruppendonor im Zellstoffwechsel. So gehören beispielsweise Ethanolamin (methyliertes Produkt: Cholin), Guanidinoacetat (methyliertes Produkt: Kreatin), Noradrenalin (methyliertes Produkt: Adrenalin) und Basen der DNA und RNA (im Nukleinsäureverband) zu Verbindungen, deren Methylgruppen von S-Adenosylmethionin stammen (Baldessarini, 1987). S- Adenosylhomocystein (SAH), das Nebenprodukt dieser Methylierungsreaktion, wird mit Hilfe der SAH- Hydrolase zu Homocystein und Adenosin hydrolysiert und regeneriert so den Hcy- Pool. Diese Reaktion ist reversibel, und in Gegenwart von Adenosin wird die Entstehung von S- Adenosylhomocystein favorisiert (Hultberg et al.,

2000). Unter physiologischen Bedingungen werden jedoch Adenosin und Homocystein schnell entfernt, was eine Akkumulation von SAH verhindert (Ueland, 1982).

Die Remethylierungsreaktion mit 5- MTHF als Kofaktor ist Vitamin- B<sub>12</sub>- abhängig und findet in allen Geweben statt. In der Leber und in der Niere gibt es einen alternativen, Vitamin- B<sub>12</sub>- unabhängigen Stoffwechselweg, in dem Betain als Methylgruppenlieferant dient und die Methylierung von Homocystein durch die Betain- Homocystein- Methyltransferase katalysiert wird. Die Remethylierung von Homocystein erfolgt in allen Geweben mit Hilfe der Methioninsynthase (MS) (Abbildung 2).

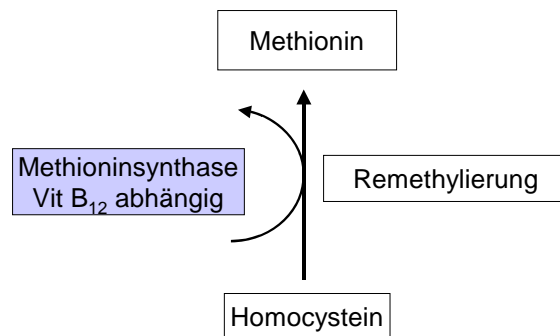


Abbildung 2: Methioninsynthase im Homocysteinstoffwechsel

Eine verminderte Aktivität der MS findet man bei einem Mangel an Folat und Vitamin- B<sub>12</sub> (Eloranta et al., 1990; Ueland et al., 1993), darüber hinaus bei fehlender Bereitstellung von methylierter Tetrahydrofolsäure, beispielsweise bei Gabe von Dihydrofolat- Reduktase- Hemmern (Methotrexat), sowie bei genetisch bedingtem Aktivitätsverlust. Bei einem Methioninsynthasemangel ist die Methylierung von Homocystein zu Methionin eingeschränkt. Es kommt zum Anstieg der 5- MTHF- und Hcy- Konzentration und die Feedback- Kontrolle für die 5- MTHF- Bildung entfällt. Aufgrund der Akkumulation von 5- MTHF ist die Regeneration von Tetrahydrofolat (THF) blockiert, so dass es zum

funktionellen Folatmangel kommt. Diese Verwertungsstörung von 5- MTHF wird mit dem Begriff „Methylfolat- Falle“ bezeichnet (Boss, 1985; Mason und Choi, 2005; Nijhout et al., 2004; Scott und Weir, 1981). Die Methylfolatfalle ist ein normaler physiologischer Vorgang, um sich vor einem Methylgruppenmangel als Resultat eines Methioninmangels zu schützen. Eine Abnahme von Methionin führt zu einer Abnahme der Konzentration von S-Adenosylmethionin, was wiederum das Risiko erhöht, dass zu wenig Methylgruppen für Methylierungsreaktionen zur Verfügung stehen. Um diese Methylierungsreaktionen zu schützen und um den Bedarf an Methionin und an SAM mit höchster Priorität sicherzustellen, hat die Zelle zwei Mechanismen zur Verfügung. Abnehmende SAM Konzentrationen sorgen dafür, dass die Folat Cofaktoren durch den Zyklus laufen, der mit 5-Methyltetrahydrofolat und Methioninsynthase Methionin aus Homocystein herstellt und gleichzeitig die Purinnukleotidsynthese herunterreguliert. Damit ist alles verfügbare Methionin für die lebensnotwendigen Methylierungsreaktionen in Nerven und im Gehirn reserviert. 5-Methyl-THF ist die nahezu einzige Form des Folats, die im Plasma transportiert wird. In der Zelle muss 5-Methyl-THF mit intrazellulärem Homocystein reagieren, um von der Zelle verwertet zu werden. Da Homocystein aus Methionin gebildet wird führt ein Methioninmangel zu einem Mangel an 5-Methyltetrahydrofolat in der Zelle, dadurch sinkt die Mitose und Proliferationsrate der Zellen. Die Mangelsituation tritt auch auf, wenn ein Vitamin- B<sub>12</sub> Mangel vorliegt, den die Zelle als Methioninmangel betrachtet. Während eines Folatmangels ist die Methioninsynthese reduziert. Dies führt genau wie ein Methioninmangel zu einer geringeren Verfügbarkeit von SAM. Um dem entgegen zu wirken wird Folat von der Desoxyribonukleotidbiosynthese zur Methioninbiosynthese umdirigiert (Scott und Weir, 1981).

Eine zentrale Rolle bei der Remethylierung des Homocysteins kommt dem C1-Überträger 5- Methyltetrahydrofolat zu. Dieses 5- MTHF wird mit Hilfe der MTHFR aus 5,10- Methylentetrahydrofolat hergestellt (Abbildung 3).

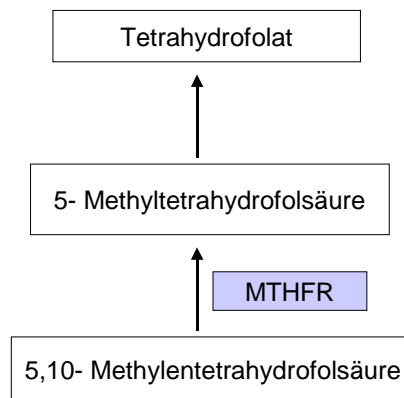


Abbildung 3: Methylentetrahydrofolatreduktase im Homocysteinestoffwechsel

Eine seltene Ursache einer Hyperhomocysteinämie ist der schwere MTHFR- Mangel. Kang und Mitarbeiter fanden bei dieser Form des MTHFR- Mangels weniger als 2% der normalen Enzymaktivität (Kang et al., 1991). Aus der entstehenden Hyperhomocysteinämie resultieren frühzeitige Arteriosklerosen und Thrombosen. Aufgrund der gestörten Remethylierung kommt es zum SAM- Mangel, der zu Entwicklungsstörungen, sowie zu neurologischen und psychiatrischen Auffälligkeiten führt (Pasquier et al., 1994). Eine weitaus häufigere, autosomal- rezessiv vererbte Variante des MTHFR- Mangels besteht in einer, durch eine Punktmutation bedingten Aktivitätsänderung des Enzyms, welche zu moderaten Erhöhungen des Hcy- Spiegels führt. Am bekanntesten ist die MTHFR 677C-T Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin in der katalytischen Domäne des Proteins führt (Frosst et al., 1995). Die Enzymaktivität 677C-T Heterozygoter liegt bei 65%, die 677TT- Homozygoter bei 30- 50% (Frosst et al., 1995; Kluijtmans et al., 1996). Man geht davon aus, dass 10- 30% der Personen mit moderat erhöhten Hcy- Konzentrationen an einem homozygoten Defekt des Enzyms leiden. Träger der homozygoten Punktmutation reagieren mit einer Hcy- Erhöhung um bis zu 25% auf einen Folat- Mangel (Herrmann, 2001; Herrmann, 2003; Meleady et al., 2003). Eine unmittelbare Konsequenz einer gestörten Synthese von 5- MTHF, entweder aufgrund eines Folatmangels, oder wegen



eines Defektes in der MTHFR, ist eine gestörte Remethylierung von Homocystein zu Methionin.

### 1.2.2 Transsulfurierung

Im katabolen Transsulfurierungsweg kondensiert Homocystein mit Serin zu Cystathionin. Diese Reaktion wird von der Vitamin- B<sub>6</sub>- abhängigen Cystathionin-  $\beta$ - Synthase katalysiert und ist unter physiologischen Bedingungen irreversibel. In einer weiteren Vitamin- B<sub>6</sub>- abhängigen Reaktion wird Cystathionin mit Hilfe der Cystathionase zu Cystein und  $\alpha$ - Ketobutyrat hydrolysiert. Zusätzlich zur Synthese von Cystein hat die Transsulfurierung auch die Aufgabe, überschüssiges Homocystein, das nicht für den Methyltransfer benötigt wird, abzubauen. Die für die Transsulfurierung notwendigen Enzyme werden jedoch nur in einigen Geweben wie Leber, Darm, Niere und Bauchspeicheldrüse exprimiert (Finkelstein, 1998).

Das zentrale Enzym der Transsulfurierung ist die Cystathionin-  $\beta$ - Synthase (Abbildung 4).

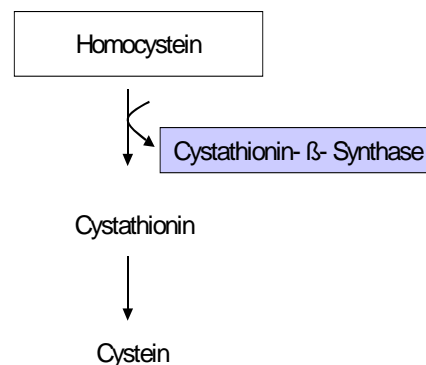


Abbildung 4: Cystathionin-  $\beta$ - Synthase im Homocystein-Stoffwechsel

Dieses Enzym katalysiert die Kondensation von Homocystein zu Cystathionin. Pyridoxal-5-phosphat, die aktive Form des Vitamin- B<sub>6</sub>, dient dabei als Coenzym. Ein Vitamin- B<sub>6</sub>-

Mangel resultiert in einer verminderten Enzymaktivität der CBS. Eine besondere Bedeutung hat die autosomal rezessive Defizienz der Vitamin B<sub>6</sub> abhängigen CBS. Dieser Defekt der CBS führt zur sogenannten klassischen Homocystinurie. Die CBS-Defizienz ist die einzige bekannte Störung der Homocystein- Transsulfurierung, die zur Homocystinurie führen kann. Es kommt zu einer Akkumulation von Homocystein, welches vermutlich nur bei dieser Erkrankung regelmäßig Gesamt- Plasma-Spiegel von über 300 µM erreicht. Da der Homocysteinabbau über den Transsulfurierungsweg defekt ist, kommt es zu einer Akkumulation und gesteigerten Remethylierung von Homocystein, so dass sich auch die Methioninkonzentration erhöht, während das CBS- Produkt Cystathionin und nachfolgend Cystein vermindert vorliegt (Abbildung 1 und 4) (Ubagai et al., 1995).

### **1.3 Hyperhomocysteinämie**

Die Hcy- Konzentration im Plasma wird sowohl durch demographische, genetische und physiologische Faktoren, als auch durch die Lebensgewohnheiten, die Ernährung und verschiedene Medikamente beeinflusst. Normale Hcy- Konzentrationen im Plasma liegen im Bereich von 5- 12 µmol/l (van der Put et al., 1999). In der Framingham- Herz- Studie konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko schon bei Hcy- Konzentrationen von 11.4 µmol/l beginnt (Montalescot, 1996). Bei Patienten mit manifesten Gefäßerkrankungen bzw. bei Hochrisikopatienten sollten Hcy- Konzentrationen <10 µmol/l angestrebt werden (Stanger et al., 2003). In den meisten Studien weisen Männer signifikant höhere Hcy- Werte auf als Frauen (Lussier-Cacan et al., 1996; Rasmussen et al., 1996; Selhub et al., 1993). Diese Differenz wird unter anderem auf eine größere Muskelmasse, eine höhere Kreatinphosphatsynthese sowie auf einen Hcy- senkenden Effekt des Östrogens zurückgeführt (Andersson et al., 1992; Malinow und Stampfer, 1994). Gleichzeitig findet auch eine altersabhängige Erhöhung der Hcy- Konzentrationen statt, wobei ab dem 70. Lebensjahr der geschlechtsspezifische Unterschied in der Hcy- Konzentration nicht mehr statistisch signifikant ist (Selhub et al., 1993).

Hcy- Plasmakonzentrationen von 12- 30 µmol/l werden als moderat oder milde, von 30- 100 µmol/l als intermediär und Konzentrationen größer 100 µmol/l als schwere

Hyperhomocysteinämie bezeichnet (Kang et al., 1992). Erhöhte Hcy- Werte findet man bei verschiedenen Erkrankungen im Blut (Hyperhomocysteinämie, HHcy) oder im Urin (Homocystinurie). Eine HHcy tritt auf, wenn die Regulation des intrazellulären Hcy- Spiegels gestört und in Folge dessen Hcy vermehrt ins Plasma exportiert wird, und/oder die Clearance von Hcy aus dem Blut eingeschränkt ist. Zusätzlich zu einer Hyperhomocysteinämie kann es zu Homocysteinausscheidung im Urin kommen (Homocystinurie). Bei einigen Patienten wird eine Hyperhomocysteinämie erst durch einen positiven Methioninbelastungstest diagnostiziert, d.h. einem Anstieg der Serumkonzentration von Homocystein über 30  $\mu\text{mol/l}$  nach Gabe von 0.1 g/kg L- Methionin per oral (de Jong et al., 2001). Heterozygote CBS- Defekte und ein Vitamin- B<sub>6</sub>- Mangel führen oft erst nach einem Methioninbelastungstest zu erhöhten Hcy- Werten (Ubbink et al., 1996). Auch der thermolabile MTHFR- Polymorphismus und erniedrigte Folat- oder Vitamin- B<sub>12</sub>- Werte können zu erhöhten Hcy- Werten nach einem Methioninbelastungstest führen (de Jong et al., 1999). Kinetische Studien beim Menschen lassen darauf schließen, dass eine Hyperhomocysteinämie bei Vitamin- B<sub>12</sub>- oder Folat- Mangel auf einen verstärkten Export des Homocysteins aus dem Gewebe beruht (Guttormsen et al., 1996). Im Gegensatz dazu resultieren erhöhte Hcy- Konzentrationen im Blut bei Personen mit eingeschränkter Nierenfunktion aus einer verminderten Clearance des Plasma- Hcy (Guttormsen et al., 1997). Der Schweregrad der HHcy ist abhängig davon, inwiefern die betroffenen Störungen die Koordination der Transsulfurierung und der Remethylierung beeinflussen. Schwere Hyperhomocysteinämien sind die Folge angeborener, seltener genetische Störungen, wie ein Mangel der Enzyme 5,10- Methylentetrahydrofolat- Reduktase (MTHFR), Methionin- Synthase (MS), Methionin- Synthase- Reduktase (MSR), Cystathionin-  $\beta$ - Synthase (CBS) oder von Enzymen, die an der Methylcobalaminsynthese beteiligt sind. Eine intermediäre HHcy wird durch eine stark eingeschränkte Nierenfunktion, schwere Folat- und Vitamin- B<sub>12</sub>- Mangelsituationen oder den thermolabilen MTHFR- C677T- Polymorphismus, kombiniert mit einem niedrigem Folatstatus, hervorgerufen. Eine moderate HHcy ist assoziiert mit der Einnahme bestimmter Medikamente (Antiepileptika, Methotrexat), einer eingeschränkten Nierenfunktion, Hypothyreoidismus, hyperproliferativen Störungen, Polymorphismen in den Genen, die für die MTHFR, MS,

MSR und CBS kodieren und einen moderaten Folat- oder Vitamin- B<sub>12</sub>- Mangel (Schneede et al., 2000).

#### **1.4 Homocystein und Arteriosklerose**

Die Arteriosklerose ist die häufigste Systemerkrankung der Arterien. Fortschreitende zelluläre und gewebliche Stoffwechselstörungen lassen Schäden an den Gefäßwänden entstehen. Dieser Prozess kann bis zu einem gewissen Grad als altersphysiologischer Vorgang angesehen werden. Homocystin wurde ursprünglich 1962 im Urin geistig retardierter Kinder nachgewiesen (Carson und Neill, 1962). Einige Jahre später wurde der genetische Defekt im CBS- Gen, der die Homocystinurie auslöst und hohe Hcy-Plasmakonzentrationen zur Folge hat, identifiziert (Mudd et al., 1964). Man fand heraus, dass diese Patienten eine hohe Frequenz an thromboembolischen Ereignissen aufwiesen. Mehr als 50% der Patienten hatten kardiovaskuläre Ereignisse und 25% starben vor dem Alter von 30 Jahren. 1969 beschrieb McCully die Gefäßpathologie dieser Patienten mit einer Proliferation der glatten Muskelzellen, progressiven Arterienstenosen und Veränderungen im Gerinnungssystem (McCully, 1969). Die Beobachtung, dass Patienten mit hohen Hcy- Plasmaspiegeln häufig Gefäßerkrankungen hatten, führte zu der Hypothese, dass Hcy selbst toxisch auf das Gefäßsystem wirkt. McCully vermutete, dass Hcy direkt einen toxischen Effekt auf die Endothelzellen ausübt und formulierte, basierend auf diesen Daten, 1975 die Hcy- Theorie der Arteriosklerose (McCully und Wilson, 1975). 1976 veröffentlichten Wilcken und Wilcken die erste Studie, die zeigte, dass die Konzentration an gemischten Homocystein- Cystein- Disulfiden nach einem Methioninbelastungstest bei Patienten mit koronaren arteriellen Erkrankungen signifikant höher war. Die Konzentrationen dieser Disulfide waren dabei jedoch viel niedriger als bei Patienten mit Homocystinurie (Wilcken und Wilcken, 1976). 1991 wurden erhöhte Hcy-Konzentrationen nach einem Methioninbelastungstest zum ersten Mal als Risikofaktor für Erkrankungen der Koronararterien angesehen, und zwar unabhängig von den klassischen Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie oder Rauchen (Clarke et al., 1991).

Boushey und Mitarbeiter konnten bereits 1995 in einer Meta- Analyse zeigen, dass Hcy ein unabhängiger Risikofaktor für arteriosklerotische Erkrankungen in den koronaren, cerebralen und peripheren Gefäßen darstellt. Eine Erhöhung der Hcy- Konzentration im Plasma um 5  $\mu\text{mol/l}$  führt zu einem erhöhten Risiko für Herzerkrankungen bei 60% der Männer und 80% der Frauen (Boushey et al., 1995). Zahlreiche unter diesem Gesichtspunkt durchgeführte Studien konnten erhöhte Hcy- Spiegel als einen unabhängigen Risikofaktor neben den klassischen Faktoren (Rauchen, erhöhte Cholesterinspiegel, Hypertonus, Diabetes mellitus) für die Entstehung einer klinischen oder subklinischen Arteriosklerose verantwortlich machen (Aguilar et al., 2004; Fowler, 2004; Gupta et al., 2005; Yang et al., 2005). Die Bedeutung erhöhter Hcy-Werte wird von einigen Arbeitsgruppen als vergleichbar mit der des Rauchens oder erhöhter Blutfettwerte angesehen (Graham et al., 1997). So geht man davon aus, dass ein Anstieg der Plasma-Hcy- Konzentration um 5  $\mu\text{mol/l}$  das Risiko einer koronaren Herzerkrankung im selben Maße erhöht, wie ein Anstieg der Serum- Cholesterin- Konzentration um 0.5 mmol/l (Fowler, 2004). Nygard und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Hcy- Spiegel im Plasma einen fundierten Vorhersagewert der Gesamtmortalität sowie der Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen bei Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung darstellen (Nygard et al., 1997). Von den Patienten mit Hcy- Spiegeln  $<9 \mu\text{mol/l}$  überlebten nach 5 Jahren Beobachtungszeit 93%, während Patienten mit Hcy- Konzentrationen  $<20 \mu\text{mol/l}$  nur eine Überlebensrate von 67% aufwiesen. Ein mit steigendem Hcy- Spiegel exponentiell wachsendes Risiko für einen Myokardinfarkt wurde in einer Populationsstudie gefunden (Ma et al., 1996). In den letzten Jahren konnten einige Meta- Analysen mit Tausenden von Patienten zeigen, dass auch eine milde Hyperhomocysteinämie ein kardiovaskulärer Risikofaktor, zumindest für einige Bevölkerungsgruppen, darstellt (Boushey et al., 1995; Ford et al., 2002; Vollset et al., 2000). Jedoch kamen Cleophas und Mitarbeiter in einer Studie zu dem Ergebnis, dass eine HHcy nicht ein unabhängiger Risikofaktor, sondern ein Indikator für einen ungesunden Lebensstil ist (Cleophas et al., 2000). In vielen Untersuchungen geht daher die Debatte weiter, ob erhöhte Plasma- Hcy- Werte ein ursächlicher Faktor in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen oder einfach nur ein Marker für einen fortschreitenden Prozess sind (Hankey und Eikelboom, 1999; Morrow, 2000; Ubbink und Delpport, 2000).

### **1.5 Homocystein als pathogenes Agens der Arteriosklerose**

Die „response to injury“ Hypothese setzt die Verletzung des Endothels als kritisches Anfangsereignis in der Entstehung der Arteriosklerose voraus (Harrison et al., 1994; Ross, 1993). Das Endothel bildet die innere Schicht der Blutgefäße und funktioniert als semipermeable Membran für Makromoleküle. Es ist das größte endokrine Organ und ist maßgeblich an der Regulation des Gefäßtonus der glatten Muskelzellen, der Plättchenadhäsion und –aggregation, der lokalen Gerinnung und des Gefäßwachstums beteiligt. Das Endothel ist ein dynamisches Gewebe, das vasoaktive Substanzen ausschüttet, die das Verhalten anderer Zelltypen in den Blutgefäßen kontrollieren. Stickstoffoxid (NO oder “endothelium- derived relaxing factor” (EDRF)) spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Gefäßreaktivität und Gerinnung. Eine endotheliale Dysfunktion führt zu einer verminderten EDRF- Aktivität und kann auch ohne histologischen Nachweis eines Endothelschadens oder einer Atheromatose auftreten. Harker et al. konnten 1974 zeigen, dass durch hohe Hcy- Konzentrationen ( $> 30 \mu\text{mol/l}$ ) eine Verletzung der arteriellen Endothelzellen induziert wird, die die Entstehung von Thrombosen und Arteriosklerose beschleunigt (Harker et al., 1974). Infundierte man Labortieren 0.1- 0.3 mM L-Homocystein, zeigten ihre Arterien eine dickere Intima, eine Proliferation der glatten Muskelzellen und einen größeren Anteil an Schaumzellen (Harker et al., 1976). Diese proliferativen Effekte von Hcy auf die glatten arteriellen Muskelzellen sind relevante Eigenschaften der Arteriosklerose (Ross, 1993). In einer Studie von Tsai und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass hohe Hcy- Konzentrationen die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen stimulieren (Tsai et al., 1994). Darüber hinaus konnten Wang et al. zeigen, dass durch Zugabe physiologischer Hcy- Konzentrationen ( $10- 50 \mu\text{mol/l}$ ), aber nicht durch Cystein, die Proliferation von Gefäßendothelzellen gehemmt wurde (Wang et al., 1997). Das kardiovaskuläre System reagiert auf Hcy- Erhöhungen besonders empfindlich, da in Zellen des kardiovaskulären Systems der Hcy- Metabolismus ausschließlich auf die Folat- und Vitamin-  $\text{B}_{12}$ - abhängige Remethylierung angewiesen ist, weil in Endothelzellen humaner Gefäße der Transsulfurierungsstoffwechselweg nicht aktiv zu sein scheint (Chen et al., 1999). Die direkte Veränderung der Endothel- und glatten Muskelzellfunktion durch HHcy wird in der verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen gesehen, die zum Kontakt und zur Diapedese von Neutrophilen und Monozyten führt (Pruefer et al., 1999). Die Bildung löslicher Adhäsionsmoleküle im

Plasma, die über die Inhibition der NO- Bildung induziert wird, ist bei hyperhomocysteinämischen Patienten mit atherothrombotischen Erkrankungen erhöht (Mercie et al., 1999). Unter normalen Bedingungen wird NO kontinuierlich vom Endothel abgegeben, um den Gefäßtonus zu regulieren. In Gegenwart hoher Hcy- Konzentrationen reagiert ein Teil des abgegebenen NO mit Hcy, um S- Nitroso- Hcy zu bilden (Loscalzo, 1996; Stamler et al., 1993). Diese Reaktion wird auch als Schutzmechanismus des Endothels angesehen, da es über die Sekretion von NO mit nachfolgender Bindung freier SH- Gruppen in Nitrosothiole die thrombogene und zytotoxische Potenz sulfhydrylhaltiger Verbindungen vermindern kann (Stamler et al., 1993). Demzufolge verstärkt ein Ungleichgewicht zwischen Hcy- Akkumulation und NO- Verfügbarkeit, wie sie aus Endothelschäden und einer HHcy resultieren, die Zytotoxizität von Hcy. Wenn das Endothel verletzt ist entsteht weniger NO um S- Nitroso- Hcy zu bilden und freies Hcy wird im Plasma oxidiert und es entsteht Wasserstoffperoxid. Die Bildung von Wasserstoffperoxid und Hcy- Thiolacton trägt weiter zur Dysfunktion der Endothel-abhängigen Relaxation der Blutgefäße bei (Stamler und Slivka, 1996).

Hcy- Thiolactat ist ein sehr reaktiver interner Thioester und bildet mit LDL Aggregate (Jakubowski, 1997). Diese werden von Makrophagen aufgenommen, die sich dann bei Cholesterinüberladung zu Schaumzellen umwandeln. Die durch Hcy vermittelten oxidativen Effekte führen zu oxidierten Formen von LDL mit der Folge einer mangelhaften Aufnahme durch den LDL- Rezeptor, sowie einer gesteigerten Aufnahme der LDL- Partikel durch Makrophagen. Diese begünstigt die Entstehung atherosklerotischer Schaumzellen (Heinecke et al., 1987; Loscalzo, 1996). Die Schaumzell- induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unterstützt die Bildung oxidiertes LDL wie auch die Deaktivierung von NO, was wiederum zum atherogenen Prozess durch Vasokonstriktion, Plättchenaggregation und Monozytenadhäsion an die Endothelschicht beiträgt (Sydow und Boger, 2001). Die Daten zeigen, dass Hcy nicht nur direkt, sondern auch durch Oxidation und die dadurch entstehenden ROS die Endothelzellen schädigt (Jacobsen, 1998). ROS, Wasserstoffperoxid und freie Radikale entstehen darüber hinaus auch bei der Sauerstoff- unabhängigen Autoxidation von freiem Hcy zu Homocystin (Starkebaum und Harlan, 1986). Wasserstoffperoxid und freie Radikale wirken zytotoxisch auf Endothelzellen (Starkebaum und Harlan, 1986; Wall et al., 1980) und

führen zu deren Ablösung. So konnten Untersuchungen *in vitro* einen direkten Zusammenhang zwischen der Hcy- Konzentration und der Anzahl der abgelösten Zellen zeigen (Harker et al., 1976; Wall et al., 1980).

### **1.6 Einfluß genetischer Faktoren auf die Hyperhomocysteinämie**

Die Hcy- Konzentration wird nicht nur durch demographische und physiologische Faktoren, Lebensgewohnheiten, Ernährung und Medikamente beeinflusst sondern auch durch genetische Faktoren. 1991 publizierten Frosst und Mitarbeiter die thermolabile Form der MTHFR. Bei dieser c.677 C>T Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin (A222V) in der katalytischen Domäne des Proteins (Frosst et al., 1995). Das c.677T- Allel führt bei homozygoten Trägern mit niedrigen Folsäure- Blutspiegeln durch eine gestörte Remethylierung von Hcy zu Methionin zu einer HHcy (Mills et al., 1999; Parle-McDermott et al., 2003; Shields et al., 1999). In der gesunden niederländischen Bevölkerung betrug die Frequenz des c.677 C>T Allels 0.38, die der Homozygoten 0.12. Homozygotie für diese Mutation reduziert die Enzymaktivität *in vitro* auf etwa 30% (Frosst et al., 1995; Kluijtmans et al., 1996). Die Allelfrequenz für die deutsche Normalbevölkerung wurde mit 0.34 bestimmt (Linnebank et al., 2000). Ein weiterer Polymorphismus, c.1298 A>C (E429A), führt zu vergleichbar reduzierten Enzymaktivität und wies eine Allelfrequenz von 0.33 in der niederländischen und 0.31 in der deutschen Normalbevölkerung auf (Linnebank et al., 2000; van der Put et al., 1998). Bei dieser Mutation kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Alanin. Die mögliche Bedeutung dieser Polymorphismen für kardiovaskuläre Erkrankungen (Brattstrom et al., 1998; Klerk et al., 2002; Refsum und Ueland, 1998) und Neuralrohrdefekte (Molloy et al., 1999; Parle-McDermott et al., 2003; Shields et al., 1999; van der Put et al., 1998) ist umstritten, wird von der Mehrzahl der publizierten Studien aber gezeigt. Auch eine Assoziation mit Lippenpalten/ Lippen- Gaumen- Spalten und akutem Hörsturz scheint möglich (Capaccio et al., 2005; Capaccio et al., 2005; Martinelli et al., 2001).

Wie bereits genannt ist eine autosomal- rezessiv vererbte Mutation der CBS eine der wichtigsten Ursachen für eine Homocystinurie. Bei dieser „missense“ Mutation kommt es



zu einer Punktmutation am Nukleotid c.833 (c.833C>T), wobei Thymin durch Cytosin ausgetauscht wird (I278T) (Kluijtmans et al., 1996). Häufige Leitsymptome sind thromboembolische Ereignisse, psychomotorische Retardierung, okuläre Linsen(sub)luxation, marfanoider Habitus, Osteoporose und eine geringe Pigmentierung (helle Haut, blonde Haare, blaue Iris) (Allen et al., 1990; Borota et al., 1997; Franco et al., 1998; Gerritsen et al., 1962; Linnebank et al., 2003; Mudd et al., 1985;). Die Diagnosestellung erfolgt in sehr unterschiedlichem Alter. Während einige Patienten bereits in der frühen Kindheit manifest werden, sind andere noch als Erwachsene unauffällig oder noch nicht der richtigen Diagnose zugeführt. Linnebank und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Häufigkeit der klassischen Homocystinurie in Deutschland sehr viel höher liegt (ca 1: 20 000) als bislang angenommen (ca 1: 130 000) (Linnebank et al., 2000; Linnebank et al., 2001). Eine weitere Mutation der CBS findet man an Nukleotid 844. Es kommt zu einer Insertion von 68 Basenpaaren, wobei das 3`Ende von Intron 7 und das 5`Ende von Exon 8 verdoppelt wird (Romano et al., 2002). Patienten mit diesem Polymorphismus erleiden thromboembolische Ereignisse, wie tiefe Beinvenenthrombose sowie koronare Herzerkrankungen (Grossmann et al., 2002; Marcucci et al., 2003; Zhang und Dai, 2002).

1997 beschrieben van der Put und Mitarbeiter einen weiteren Polymorphismus des Homocysteinestoffwechsels, der als Risikofaktor für Neuralrohrdefekte und cardio-vaskuläre Erkrankungen angesehen wird. Bei dieser Mutation der Methioninsynthase kommt es durch Austausch der Basen Adenin gegen Guanin am Basenpaar c.2756 was zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin durch Glycin auf Proteinebene führt (Harmon et al., 1999; van der Put et al., 1997). Es ist bislang noch nicht endgültig geklärt, in wie weit diese Mutationen in den Genen, die für Enzyme des Methioninstoffwechsels kodieren, Risikofaktoren für den Hirninfarkt darstellen.

### **1.7 Zielsetzung**

Aufgrund der bereits publizierten Relevanz der verschiedenen Polymorphismen in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen sollten in dieser Arbeit die Gene für die Enzyme Methioninsynthase, Cystathion- $\beta$ - Synthase und 5, 10 Methylentetrahydro-folatreduktase auf mögliche Polymorphismen untersucht und mit dem Risiko für einen ischämischen cerebralen Insult unterschiedlicher Ätiologie korreliert werden.

## 2 Patienten und Kontrollgruppen

Alle Patienten oder deren rechtliche Vertreter haben Ihr schriftliches Einverständnis zu den durchgeführten genetischen Untersuchungen und den wissenschaftlichen Auswertungen ihrer klinischen und persönlichen Daten gegeben. Diese Studie wurde von der lokalen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

### 2.1 Patienten mit ischämischem Insult

Für diese Studie standen 159 DNA- Proben von Patienten mit ischämischem Insult zur Verfügung. Diese Proben waren in einer interdisziplinären Studie rekrutiert worden. Diese Studie, geleitet von Herrn PD Dr. med. C. Pohl, wurde von Bonfor gefördert.

Die demographischen Daten des Patientenkollektivs sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die unterschiedlichen Arten des Hirninfarktes bzw. die unterschiedlichen Ursachen, die dem Hirninfarkt zugrunde liegen werden anhand des "Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment" (TOAST) in verschiedene Subtypen untergliedert (Adams, Jr. et al., 1993).

	w, m	aao/Abw.
Patienten n= 159	57, 102	55.0+/- 16.2
TOAST 1 n= 55	13, 42	56.2+/- 13.8
TOAST 2 n= 39	16, 23	53.3+/- 17.5
TOAST 3 n= 24	6, 18	64.0+/- 10.0
TOAST 4 n= 15	8, 7	58.5+/- 18.8
TOAST 5 n= 26	13, 13	41.0+/- 16.3

Tabelle1 : Tabellarische Darstellung des Patientenkollektivs

w= weiblich, m= männlich, aao= age at onset, Abw.= Standardabweichung

TOAST 1: Arteriosklerose der großen Hirngefäße (atherothrombotischer Schlaganfall)

Höhergradige Stenose (>50%) oder Verschluss hirnzuführender Gefäße; in der Bildgebung ein kortikaler, zerebellärer, Hirnstamm- oder subkortikaler Infarkt in der Regel >1.5 cm; als mögliche Infarktmechanismen ein lokal thrombotischer Gefäßverschluss im Bereich einer arteriosklerotischen Plaque, ein embolischer Gefäßverschluss ausgehend von einer Plaque bzw. einem Thrombus oder eine hämodynamisch bedingte Minderperfusion.

TOAST 2: kardiale Embolie

Kardiale Emboliequelle; in der Bildgebung Läsionen wie unter 1. beschrieben; Infarkte in verschiedenen Stromgebieten

TOAST 3: Mikroangiopathie

Lipohyalinose der kleinen Gefäße; anamnestisch Hypertonus oder Diabetes; in der Bildgebung ein subkortikaler oder Hirnstamminfarkt <1.5 cm.

TOAST 4: Hirninfarkte anderer Ätiologie

Nicht- arteriosklerotische Vaskulopathie, Hyperkoagulabilität, hämatologische Erkrankungen.

TOAST 5: Hirninfarkte unbekannter Ursache

- a) konkurrierende Ursachen (häufig z.B. ipsilaterale Arteria carotis interna Stenose und gleichzeitig kardiale Emboliequelle)
- b) negative Untersuchungsbefunde

## **2.2 Kontrollkollektiv**

Zur Untersuchung der Häufigkeit dieser Mutationen in der Normalbevölkerung wurde von Dr. Michael Linnebank ein Kollektiv von 159 DNA Proben analysiert. Die Daten wurden mir von Dr. Linnebank zur Verfügung gestellt. Das Kontrollkollektiv stimmte sowohl in der Alters- als auch in der Geschlechtsverteilung mit den in der vorliegenden Arbeit benutzten Patientenkontrollen überein.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Allgemeines

##### 3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, waren alle Lösungen wässrig in deionisiertem/ zweifach destilliertem Wasser, Aqua bidestillata (Aqua <sub>bidest.</sub>) oder in reinem Aqua ad injectabilia (Aqua <sub>ad i.</sub>). Konzentrationen werden für die jeweiligen Arbeitsschritte in Molarität oder Prozent angegeben. Soweit nicht anders angegeben, fanden alle Reaktionen bei Raumtemperatur statt.

##### 3.1.2 Puffer

Lysispuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0.1 mM EDTA, pH 7.4
SE Puffer	75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0
50 x TAE Puffer	2 M Tris- Acetat, 0.5 M EDTA, pH 8.3
1 x TAE Puffer	aus 50 x TAE Puffer
TE Puffer	1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
PB Puffer	vom Hersteller keine Angaben über Zusammensetzung
PE Puffer	vom Hersteller keine Angaben über Zusammensetzung
Puffer Nr. 2	50 mM NaCl, 10 mM Tris- HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9
Puffer Nr. 3	100 mM NaCl, 50 mM Tris- HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9

Xylencyanolpuffer      0.25% Bromphenolblau (w/v), 0.25% Xylencyanol (w/v),  
15% Ficoll (w/v) (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

### 3.1.3 Geräte

Benutzt wurden Standardgeräte der üblichen Laborausstattung. Die Hersteller werden an entsprechender Stelle genannt.

## 3.2 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die zur Verfügung gestellten DNA- Proben wurden auf Konzentrationen von 100 ng/ml verdünnt. Die Konzentration von DNA-Lösungen lässt sich photometrisch über die Messung ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermitteln. Diese Wellenlänge stellt das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren (DNA, RNA) dar. Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde folgender Zusammenhang zugrunde gelegt:

$$C_{(\text{mg/ml})} = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) * \varepsilon * \text{VF}$$

OD= optische Dichte bei 260 nm bzw. 310 nm,  $\varepsilon$  =Extinktionskoeffizient, VF= Verdünnungsfaktor

Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  bei doppelsträngiger DNA, 33  $\mu\text{g/ml}$  bei einzelsträngiger DNA und 25  $\mu\text{g/ml}$  bei DNA- Oligonukleotiden. Der Quotient  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  ist ein Maß für den Reinheitsgrad und sollte bei DNA idealerweise  $>1.8$  betragen (Sambrook und Gething, 1989).

## 3.3 Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

### 3.3.1 Allgemeines

Die Polymerase- Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte *in vitro* (Mullis et al., 1986). Dabei wird die Eigenschaft der DNA- Polymerasen an ein freies 3`OH- Ende eines kurzen DNA- Stückes (Primer) weitere Basen anzuhängen, ausgenutzt. Die beiden Primer sind so ausgewählt, dass sie jeweils an einen der beiden Stränge hybridisieren. Im ersten

Reaktionszyklus wird die DNA durch Hitzebehandlung in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Anschließend werden die beiden Primer hybridisiert („annealing“). Die Annealing- Temperatur hängt im Wesentlichen von der Anzahl der Wasserstoffbrücken ab, die zwischen template und Primer ausgebildet werden. Diese wiederum ist gegeben durch den Grad der Homologie, die Länge der Primer und seinem Gehalt an Deoxy- Nukleotiden: A und T bilden untereinander zwei, G und C drei Wasserstoffbrücken aus. In einer durch die DNA- Polymerase in Gegenwart von dNTPs (Gene Craft, Münster, Deutschland) katalysierten Reaktion werden die Einzelstränge zum Doppelstrang aufgefüllt (Elongation). Als Produkte entstehen zwei neue doppelsträngige DNA- Moleküle. Durch mehrfache Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, „annealing“, Elongation) erhält man eine exponentielle Anreicherung des zwischen den beiden Primern liegenden DNA- Bereiches (Mullis et al., 1986). Als DNA- Polymerase benötigt man wegen der hohen Temperaturen, die zum Schmelzen der DNA benötigt werden, eine thermostabile Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird (Taq- Polymerase, Gene Craft, Münster, Deutschland) (Chien et al., 1976). Die optimale Arbeitstemperatur der Taq- Polymerase lag bei 72°C. Ein Sonderfall lag vor, wenn die optimale Annealing- Temperatur so hoch war (>65°C), dass sie in den Bereich der optimalen Arbeitstemperatur der Taq- Polymerase reichte. In diesem Fall konnten die Arbeitsschritte „Annealing“ und „Synthese“ zusammengefaßt werden. Als template wurde je nach PCR etwa 1 µl DNA (ca. 100 ng) eingesetzt. Die PCR wurde in 0.5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) im „Touchdowncycler“ mit Deckelheizung (Biometra, T- Gradient oder Thermocycler) durchgeführt, in dem die PCR vollautomatisch nach individuell vorgegebenen Bedingungen ablief. Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

### Standard- PCR- Ansatz

10x Reaktionspuffer <sup>1</sup>	15 mM Mg <sup>2+</sup>
10x dNTP (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) <sup>1</sup>	je 2 mM
forward primer	20 µM
reverse primer	20 µM
Template	variabel
Taq Polymerase <sup>1</sup>	0.5- 2 U/µl
Aqua ad i.	ad 20 µl

<sup>1</sup> Gene Craft, Münster, Deutschland

Tabelle 2: Standard- PCR- Ansatz

### PCR- Protokoll

hot start			
1x	94°C	60 sec	Denaturierung
35x	94°C	45- 60 sec	Denaturierung
	68- 72°C	45- 90 sec	"annealing"
1x	72°C	45- 60 sec	Elongation

Tabelle 3: PCR- Protokoll

Am Ende der Polymerasekettenreaktion erfolgte ein letzter, verlängernder Syntheseschritt bei 72°C für 5 min, um sicherzustellen, dass möglichst sämtliche DNA als stabiler Doppelstrang vorlag. Die Dauer der jeweiligen Schritte variierte je nach PCR.



PCR	1 x	35 x			1 x
CBS	94°C - 4 min	94°C - 45 sec	69°C - 90 sec		72°C - 5 min
MTHFR 677	94°C - 4 min	94°C - 60 sec	60°C - 45 sec	72°C - 45 sec	72°C - 5 min
MTHFR 1298	94°C - 4 min	94°C - 45 sec	70°C - 60 sec		72°C - 5 min
MS	94°C - 4 min	94°C - 60 sec	62°C - 45 sec	72°C - 45 sec	72°C - 5 min

Tabelle 4: PCR- Protokoll für die Analyse der einzelnen Polymorphismen

Die Proben wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei 4°C gelagert.

### 3.3.2 Oligonukleotid- Primer

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Thermo Hybaid (Heidelberg, Deutschland) synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Die Lagerung der wässrigen Stamm- (100 mM) und Gebrauchslösung (20 mM) erfolgte bei – 20°C.

Folgende Primer wurden benutzt:

Primer	Sequenz 5` - 3`	Bp	Referenz
CBS- 833/844- s	GTCCCCAAAGGCTCTGCTGC	453/ 531	Kim et al.; 1997
CBS- 833/844- as	GTGGGGATGAAGTCGTAGCC		
MTHFR- 677- s	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	198	Frosst et al., 1995
MTHFR- 677- as	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG		
MTHFR- 1298- s	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC	163	van der Put et al., 1998
MTHFR- 1298- as	CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG		
MTR- 2756- s	TGTTCCCAGCTGTTAGATGAAAATC	211	Harmon et al., 1999
MTR- 2756- as	GATCCAAAGCCTTTTACACTCCTC		

Tabelle 5: Primer zur Analyse der einzelnen Polymorphismen

s= sense, forward primer, as= antisense, reverse primer, CBS= Cystathionin- β- synthase, MTHFR= Methylentetrahydrofolatreduktase, MS= Methioninsynthase, Zahlen bezeichnen die zu untersuchende Marker, z.B. "677" für bp 677 (MTHFR)

### 3.3.3 Reinigung von PCR- Produkten

Bei Bedarf (siehe 4.3) erfolgte eine Reinigung der DNA mittels QIAquick- PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers. Nach erfolgter PCR wurden zu 20 µl PCR- Produkt 100 µl Puffer PB hinzugegeben. Nun wurde eine QIAquick Säule in das vorgesehene 1.5-ml Eppendorfgefäß gestellt. Das Gemisch aus PCR-Produkt und Puffer wurde auf die Säule gegeben und für 1 Minute mit 13.000 rpm bei RT in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Säule wieder zurück auf dasselbe Sammelgefäß gestellt. Dann wurde 750 µl Puffer PE auf die Säule geladen und für 1 Minute bei 13.000 rpm ebenfalls wieder bei RT in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nachdem man den Durchfluss verworfen und die QIAquick Säule für eine weitere Minute mit 13.000 rpm abzentrifugiert hat, wurde die Säule in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Zum Eluieren der DNA wurden 20 µl H<sub>2</sub>O in die Mitte der Säule gegeben und diese dann für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Die eluierte DNA konnte nun für Restriktionsanalysen benutzt werden. Entweder wurden die Proben direkt weiterverarbeitet oder bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 3.3.4 Verdau von genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen, die so ausgesucht wurden, dass die Mutation nach der gesucht wurde, die Erkennungssequenz des Enzyms betraf. Die DNA wurde in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Mutation geschnitten oder unverändert gelassen. So entstanden unterschiedliche Restriktionsmuster, anhand deren der Allelstatus (Wildtyp, heterozygot, homozygot) definiert wurde. Der Restriktionsmix wurde folgendermaßen hergestellt:

PCR Produkt	10 µl (ca. 100 ng)
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	Variable
Aqua ad i.	ad 20 µl

Tabelle 6: Restriktionsmix

Die Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) mit dem jeweiligen Enzym mitgeliefert. In Tabelle 7 sind die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen zusammengefasst. Weiterhin ist aus dieser Tabelle ersichtlich, welcher Puffer bei welchem Enzym benutzt wurde und wie viel Enzym pro Ansatz benötigt wurde.

PCR-Produkt	Enzym	Puffer	U/ Ansatz	Restriktionsfragmentlänge in bp		
CBS	Bsr I	3	2.5	WT: 453	844ins68: 351, 170	833T>C: 351, 102
MTHFR 677	Hinf I	2	5	C: 198	T: 176, 22	
MTHFR 1298	Mbo II	2	2.5	A: 56, 31, 30, 28, 18	C: 84, 31, 30, 18	
MS	Hae III	2	2.5	A: 221	G: 131, 80	

Tabelle 7: Bedingungen für die Mutationsanalysen

Alle Restriktionsansätze wurden über Nacht bei 37°C bzw. im Falle von Bsr I bei 65°C inkubiert. Danach wurden 3 µl Xylencyanolpuffer (0.25% Bromphenolblau (w/v), 0.25% Xylenxanol w/v), 15% Ficoll (w/v)) hinzupipettiert. Die Proben wurden auf ein vorbereitetes Agarosegel (3.3.5.) aufgetragen. Nach der sich anschließenden Gelelektrophorese wurden die DNA- Banden auf dem UV- Schirm sichtbar gemacht (s.u).

### 3.3.5 Horizontale Agarosegel- Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA- Fragmenten wurde die Agarosegel- Elektrophorese verwendet. DNA- Fragmente sind auf Grund ihres Zucker- Phosphat- Rückgrats negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose (Eurogentec, Seraing, Belgien) mit TAE- Puffer versetzt und in der Mikrowelle

aufgekocht. Je nach Größe der DNA- Fragmente wurden 2.5%ige- 4%ige Agarosegele hergestellt. Die Agaroselösung wurde danach auf 55°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (aus einer 10 mg/ml Stammlösung in einer 1:15 000 Verdünnung) versetzt und in eine Gelkammer mit 3 Taschenkämmen gegossen. Nach der Polymerisation wurden die Kämmen gezogen, das Gel in eine Horizontal- Gel- Apparatur überführt und mit TAE- Puffer überschichtet. Die DNA- Proben, die vorher mit Auftragspuffer (3 µl Xylencyanolphosphat) versehen wurden, konnten nun in die Geltaschen pipettiert werden. Zur Größenbestimmung wurden der „100- base“ DNA- Marker der Fa. Gene Craft (Münster, Deutschland) in eine Geltasche gegeben. Die DNA- Proben wurden nun bei 10- 15 Volt pro Zentimeter Gellänge aufgetrennt. Nach der Elektrophorese konnte die aufgetrennte DNA auf einem UV- Transiluminator (INTAS UV- Systeme, Göttingen, Deutschland) bei 302 nm ausgewertet werden. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit Hilfe des zwischen die Basenpaare der Nukleinsäure interkalierenden Phenanthridinium- Rings des Ethidiumbromidkomplexes. Bei einer Bestrahlung des so entstandenen DNA- Ethidiumbromidkomplexes mit UV- Licht der Wellenlänge 302 nm kommt es zur Emission von Licht im sichtbaren Bereich (590 nm).

### **3.4 Statistik**

In dieser Arbeit wurden folgende statistische Verfahren angewendet:

Mit Hilfe der logistischen Regression wurde analysiert, welche Einflussfaktoren für das Auftreten eines Hirninfarkts verantwortlich sind. Die logistische Regression ist ein multivariantes Verfahren zur Analyse der Abhängigkeit einer Variablen von mehreren Einflussvariablen, d.h. man möchte eine abhängige binäre Variable mittels einer oder mehrerer unabhängigen Variablen vorhersagen. In meiner Arbeit war die Frage: Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Hirninfarktes abhängig von den einzelnen Polymorphismen des Homocysteinestoffwechsels sowie des Alters und des Geschlechts der Patienten. Die abhängige Variable ist binär (dichotom): Hirninfarkt ja (1) oder nein (0) (Bender et al., 2002).

Das gebräuchliche Effektmaß in der Epidemiologie ist die Odds Ratio (OR), die als Verhältnis der Chancen zwischen exponierten und nicht exponierten Personen definiert

ist. Bei der logistischen Regression kann die OR für jede Einflussvariable aus dem zugehörigen Regressionskoeffizienten berechnet werden. Dieser Wert ist dann bezüglich der anderen in die Analyse eingeschlossenen Einflussgrößen adjustiert, d.h. dass eventuelle Wechselwirkungen zwischen den Einflussvariablen berücksichtigt sind. Wenn ein Einflussfaktor keinen Einfluss auf die abhängige Variable hat, ist der (wahre) Wert der  $OR = 1$ . Deshalb ist für die Interpretation der OR die Angabe eines Konfidenzintervalls erforderlich. Nur wenn der Wert 1 nicht im Konfidenzintervall enthalten ist, kann man von einem signifikanten OR sprechen.

Zum paarweisen Vergleich zweier unabhängiger Gruppen bezüglich der Erwartungswerte einer stetigen Zielgröße dient der t- Test für unverbundene Stichproben. Er wurde angewandt, um Unterschiede im Alter zwischen Patienten und Kontrollen bzw. zwischen einzelnen TOAST- Gruppen zu testen.

Für die Untersuchung der Abhängigkeit von Alter beim Auftreten eines Schlaganfalls und den einzelnen Genotypen wurden zwei Altersgruppen gebildet und ein Chi- Quadrat- Test durchgeführt.

Für den Polymorphismus MTHFR 677 wurde eine Kaplan- Meier- Analyse durchgeführt. Als Überlebenszeit wurde das Alter bis zum Auftreten eines Schlaganfalls definiert. Die Genotypen CC und CT wurden zusammengefasst und mit dem Genotyp TT hinsichtlich der Überlebenszeit graphisch dargestellt und mit Hilfe des Log- Rank- Tests verglichen. Als Signifikanzniveau wurde generell 5% festgelegt. Dementsprechend wurden 95% Konfidenzintervalle berechnet.

### **3.5 Ort der Ausführungen**

Die DNA Präparation und die anschließende Untersuchung der Polymorphismen fand in den Labors der Neurobiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms- Universität statt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Methioninsynthase

Ein relativ häufiger Polymorphismus der Methioninsynthase ist eine A nach G Transition an Position 2756 des Methioninsynthasegens, was im Enzym zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Glycin führt. Harmon und Mitarbeiter fanden 1999, dass dieser Polymorphismus Einfluss auf die Hcy- Konzentration hat (Harmon et al., 1999). Aus diesem Grund habe ich 159 Patienten, die im Alter zwischen 6 und 88 Jahren einen Hirninfarkt erlitten hatten, auf diesen Polymorphismus und seine Relevanz in Bezug auf zerebrale Ischämien untersucht. Dazu wurde die DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (3.3) amplifiziert. Für die Analyse des Polymorphismus MS c.2756 wurde die Sequenz des Methioninsynthasegens mit Hilfe von Primern amplifiziert (siehe Tabelle 5). Anschließend wurde der Polymorphismus MS c.2756 durch Verdau der DNA mittels der Restriktionsendonuklease HAE III, welches die amplifizierte DNA bei einer Sequenz von GGCC in zwei Restriktionsfragmente schneidet, analysiert. Beim Vorliegen eines Polymorphismus der MS wird mit Hilfe dieses Restriktionsenzym der amplifizierte DNA-Abschnitt von 221 Basenpaaren in zwei Fragmente mit 131 bp bzw. 80 bp gespalten. Abbildung 5 zeigt die Restriktionsfragmente, die man bei einer Sequenz von GGCC im Falle der Mutation erhält.

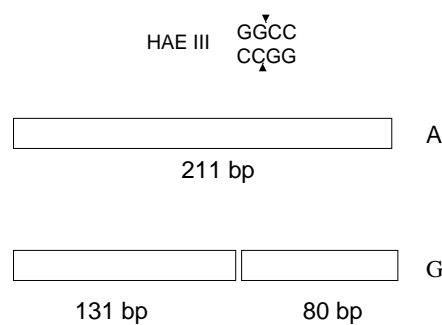


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Schnittstelle des Restriktionsenzym HAE III und der durch Restriktion generierten DNA-Fragmente

Die DNA- Fragmente wurden auf einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend unter dem UV- Licht sichtbar gemacht.

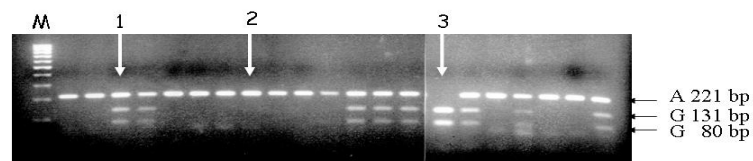


Abbildung 6: Analyse des Polymorphismus der Methioninsynthase c. 2756, 159 Patientenproben wurden mittels PCR amplifiziert und durch Verdau der DNA mittels Restriktionsendonukleasen HAE III analysiert. Anschließend wurden die DNA- Proben auf einem 3%- igen Agarosegel aufgetrennt und unter einem UV- Schirm sichtbar gemacht. M= 100 bp DNA Längenstandard, 1, 2, und 3 zeigen Restriktionsfragmente von homo- bzw. heterozygoten Patienten.

Abbildung 6 zeigt ein repräsentatives Agarosegel. In Spur 1 sieht man die DNA- Fragmente eines Patienten, der heterozygot AG bezüglich dieses untersuchten Polymorphismus ist. Zu sehen ist eine DNA- Bande bei 221 bp, die charakteristisch für das Allel A ist. Zusätzlich findet man zwei Banden bei 131 bp und 80 bp, die charakteristisch für das Allel G sind. In Spur 2 sieht man nur eine Bande bei 221 bp, d.h. dieser Patient ist homozygot für das Allel A (AA). In Spur 3 sind zwei DNA- Banden bei 131 bp und 80 bp sichtbar, somit ist dieser Patient homozygot bezüglich des Allels G (GG). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse des Polymorphismus MS c.2756 für alle 159 Patienten und Kontrollen zusammengefasst.

	AA	AG	GG
Patienten n= 159	105 (66%)	46 (29%)	8 (5%)
Kontrollen n= 159	94 (59%)	60 (38%)	5 (3%)
TOAST 1	41 (76%)	11 (20%)	3 (5%)
TOAST 2	30 (77%)	7 (18%)	2 (5%)
TOAST 3	11 (46%)	12 (50%)	1 (4%)
TOAST 4	9 (60%)	5 (33%)	1 (7%)
TOAST 5	14 (54%)	11 (42%)	1 (4%)
Logistische Regression OR= 0.81 [0.52; 1.28]			

Tabelle 8: Ergebnisse des Polymorphismus der MS aller Patienten- und Kontrollproben

[ ] = 95% Konfidenzintervall

Demnach waren 105 Patienten homozygot für das Allel A (AA), was einem Prozentsatz von 66% entsprach. Bei 46 Patienten konnte man eine Heterozygotie (AG) nachweisen und nur 8 Patienten waren homozygot für das Allel G (GG). Als Kontrollkollektiv dienten 159 gesunde Probanden, deren DNA ebenfalls mittels der oben beschriebene Verfahren auf das Vorliegen von Polymorphismen des Homocysteinstoffwechsels untersucht wurden. Bei dem Kontrollkollektiv waren 94 Probanden homozygot für das Allel A (AA), 60 waren heterozygot AG und 5 waren homozygot für das Allel G (GG).

Anhand der logistischen Regression wurde überprüft ob die einzelnen Genotypen der Methioninsynthase AA, AG, GG, das Alter der Patientin und das Geschlecht einen Einfluss auf das Ereignis Hirninfarkt haben. Das Ergebnis in Tabelle 8 zeigt, dass weder die einzelnen Polymorphismen der Methioninsynthase, noch das Alter oder das Geschlecht der Patienten einen Einfluss auf das Ereignis Hirninfarkt haben.



## 4.2 Methylentetrahydrofolatreduktase c.677

Ein weiteres wichtiges Enzym im Homocysteinestoffwechsel stellt die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) dar, die für die Remethylierung des Homocysteins essentiell ist. 1991 fanden Kang und Mitarbeiter einen schweren MTHFR-Mangel als Ursache der Hyperhomocysteinämie (HHcy) heraus. Im Folgenden wurde daher untersucht, in wieweit diese Mutation der MTHFR einen Einfluss auf das Auftreten von Ischämien hat. Von 159 Patienten, die in unterschiedlichem Alter einen Hirninfarkt erlitten hatten, wurde die DNA mittels PCR amplifiziert (3.3). Nach der PCR erfolgte der Verdau der amplifizierten DNA mit der Restriktionsendonuklease Hinf I. Bei einem Polymorphismus am Nukleotid 677 wird mit Hilfe des Restriktionsenzym das DNA-Fragment von 198 Basenpaaren in zwei DNA-Fragmente geschnitten. Abbildung 7 zeigt die Erkennungssequenz für Hinf I und die Restriktionsfragmente, die man bei einer Sequenz von GATTC im Falle der Mutation an Codon 677 erhält.

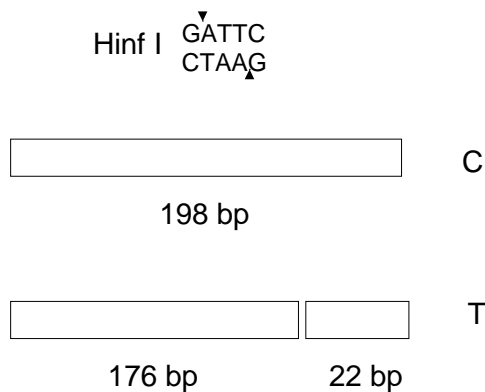


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Schnittstellen des Restriktionsenzym Hinf I und der DNA Fragmente, die nach Spaltung mit Hinf I entstehen.

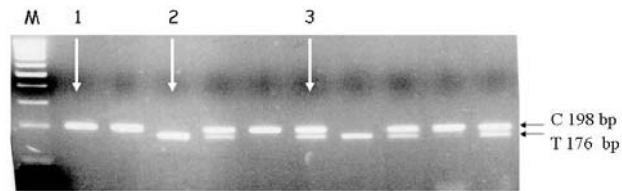


Abbildung 8: Analyse des Polymorphismus der Methylentetrahydrofolatreduktase c.677. DNA von 159 Patienten wurden mittels PCR amplifiziert und durch Verdau der DNA mittels der Restriktionsendonuklease Hinf I analysiert. Anschließend wurden die DNA- Proben auf ein 3%- iges Agarosegel aufgetragen. Nach Auftrennung der DNA nach Größe wurden die DNA- Fragmente unter einem UV- Schirm sichtbar gemacht. M = 100 bp DNA- Längenstandard; 1, 2 und 3 zeigen DNA- Fragmente von homo- bzw. heterozygoten Patienten.

In Abbildung 8 ist stellvertretend für alle untersuchten Proben ein Agarosegel mit 10 DNA- Proben dargestellt. In Spur 1 ist eine DNA- Bande bei 198 bp ersichtlich, dieses Restriktionsfragment wird dem Allel C zugeordnet, so dass dieser Patient homozygot für C (CC) ist. In Spur 2 ist ebenfalls nur eine Bande sichtbar, jedoch bei einer Fragmentlänge von 176 bp. Dieser Patient ist homozygot für T (TT). In Spur 3 ist sowohl eine Bande bei 198, als auch bei 176 bp zu sehen, so dass ein heterozygoter Status (CT) für diese DNA vorliegt. Die gleichen Untersuchungen wurden ebenfalls für 159 Kontrollprobanden durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 9 dargestellt:

	CC	CT	TT
Patienten n= 159	70 (44%)	63 (40%)	26 (16%)
Kontrollen n= 159	78 (49%)	62 (39%)	19 (12%)
TOAST 1	24 (44%)	21 (38%)	10 (18%)
TOAST 2	20 (51%)	13 (33%)	6 (15%)
TOAST 3	10 (42%)	13 (54%)	1 (4%)
TOAST 4	6 (40%)	7 (47%)	2 (13%)
TOAST 5	10 (36%)	9 (35%)	7 (27%)
Logistische Regression 1.20 (0.76; 1.89)			

Tabelle 9: Ergebnisse der Untersuchung zum Polymorphismus MTHFR 677 der Patienten- und Kontrollproben, [ ] = 95% Konfidenzintervall

Bei 44% der Patienten war ein homozygoter Status für das Allel C (CC) zu finden. In 40% der Fälle lag ein heterozygoter (CT) Status vor und 16% der Patienten waren homozygot für das Allel T (TT). Betrachtet man die einzelnen TOAST- Gruppen in Bezug auf die Häufigkeit der einzelnen Polymorphismen dann fällt auf, dass der Polymorphismus MTHFR c.677TT in TOAST 5 (Ursache des Hirninfarkts ungeklärt) häufiger vorkommt als in allen anderen Gruppen. Daraus könnte man interpretieren, dass das T- Allel des Polymorphismus MTHFR c.677 C>T bei Patienten ohne genaue Ursache des Hirninfarktes eine Rolle spielen könnte. Diese Annahme konnte jedoch nicht als signifikant nachgewiesen werden (p- Wert 0.06). Trägt man alle Patienten, die homozygot für den Polymorphismus MTHFR c.677TT gegen die Patienten mit MTHFR c.677CC oder MTHFR c.677CT in einer Kaplan- Meier Kurve auf (Abbildung 9), so fällt auf, dass der MTHFRc.677TT Polymorphismus mit einem früheren Alter des ersten Hirninfarkts vergesellschaftet ist. Patienten mit dem MTHFR c.677TT Allel bekommen im Durchschnitt mit 38 +/- 3 Jahren einen Hirninfarkt, während Patienten mit den Genotypen MTHFR c.677 CT oder CC erst im Alter von 45 +/- 1 Jahr einen Hirninfarkt bekommen (Abb.) Diese ermittelten Daten waren jedoch nicht statistisch signifikant

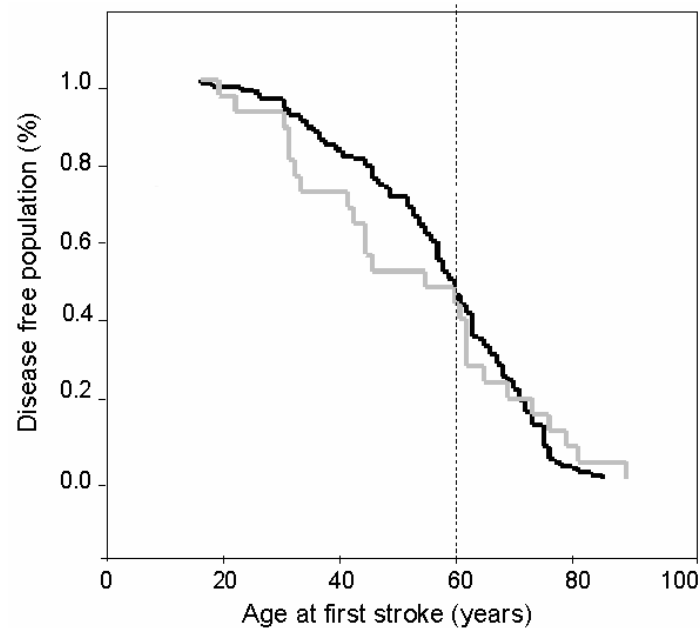


Abbildung 9: Kaplan- Meier- Überlebenskurve bei Polymorphismus MTHFR c.677 C>T

Mit der dicken schwarzen Kurve wurden alle Patienten, die für das T- Allel homozygot waren, dargestellt.

Mit der dünnen grauen Linie wurde alle anderen Patienten mit CT oder CC Allelen dargestellt. Die

senkrechte Linie trennt die Patienten mit frühem Erkrankungsalter von denen mit spätem Erkrankungsalter.

Mit Hilfe der logistischen Regression wurde untersucht, ob das Alter, in dem die Patienten einen Hirninfarkt erlitten hatten, das Geschlecht und die einzelnen Ausprägungen des Polymorphismus MTHFR c.677 C>T einen Einfluss auf das Ereignis Hirninfarkt haben. Es ergab sich kein signifikantes Ergebnis (Tabelle 9).

### 4.3 Methylentetrahydrofolatreduktase c.1298

In jüngster Zeit wurde ein weiterer Polymorphismus der Methylentetrahydrofolatreduktase, nämlich c.1298A>C veröffentlicht. Bei dieser Mutation kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Alanin. Auch dieser Polymorphismus der MTHFR führt zu einer HHcy und wird als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen (Weisberg et al., 2001; Wolf et al., 1991). Da es in der Literatur Hinweise darauf gibt, dass eine Mutation an der Base 1298 von A nach C der MTHFR zu vaskulären Erkrankungen führt, habe ich 159 Patienten untersucht, die in unterschiedlichem Alter einen Hirninfarkt erlitten hatten, um zu klären, in wieweit dieser Polymorphismus der MTHFR Einfluss auf die Ätiologie und Genese des Hirninfarkts hat. Die DNA der Patienten wurde mittels PCR (3.3) amplifiziert. Die PCR wurde dabei unter den in 3.3 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Da unter diesen Bedingungen mehrfach keine DNA- Banden in den Agarosegelen sichtbar wurden habe ich die eingesetzte DNA- Menge photometrisch quantifiziert (3.2). Dabei stellte sich heraus, dass die DNA- Konzentration in einigen Proben sehr niedrig war. Daraufhin wurden steigende Mengen an DNA in den PCR- Ansatz eingesetzt, um zu sehen, ab welcher Ausgangsmenge nach der Polymerasekettenreaktion DNA- Banden im Gel sichtbar wurden. Weiterhin habe ich die Proben nach der PCR über eine QIAquicksäule gereinigt (3.3.3), um die DNA von eventuellen Primer- und dNTP- Rückständen zu befreien. Anschließend wurde die "annealing"- Temperatur für die Primerassoziation solange variiert, bis die PCR erfolgreich war. Die besten Ergebnisse konnten mit den folgenden Bedingungen erzielt werden:

#### PCR Ansatz:

10x Reaktionspuffer <sup>1</sup>	15 mM Mg <sup>2+</sup>	2.0 µl
10x dNTP (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) <sup>1</sup>	8 mM	2.0 µl
forward primer	20 µM	1.0 µl
reverse primer	20 µM	1.0 µl
Template	Versch. Konzentrationen	8.0 µl
Taq- Polymerase		0.2 µl
Aqua ad i.		5.8 µl

<sup>1</sup> Gene Craft, Münster, Deutschland

Tabelle 10: PCR Ansatz zur Analyse des Polymorphismus MTHFR c.1298

PCR- Programm:

PCR	1 x	35 x		1 x
MTHFR 1298	94°C - 4 min	94°C - 45 sec	70°C - 60 sec	72°C - 5 min

Tabelle 11: PCR Protokoll des Polymorphismus MTHFR c.1298

Nach erfolgreicher PCR erfolgte der Verdau der DNA mittels der Restriktionsendonuklease Mbo II (3.3.4). Bei Vorliegen eines Polymorphismus an der Base 1298 wird mit Hilfe des Restriktionsenzym Mbo II das amplifizierte DNA- Fragment mit einer Länge von 163 Basenpaaren in mehrere DNA- Fragmente geschnitten. Abbildung 10 zeigt die Restriktionsfragmente, die man bei einer Sequenz von GAAGA(N)<sub>2</sub> im Falle der Mutation an Codon 1298 erhält.

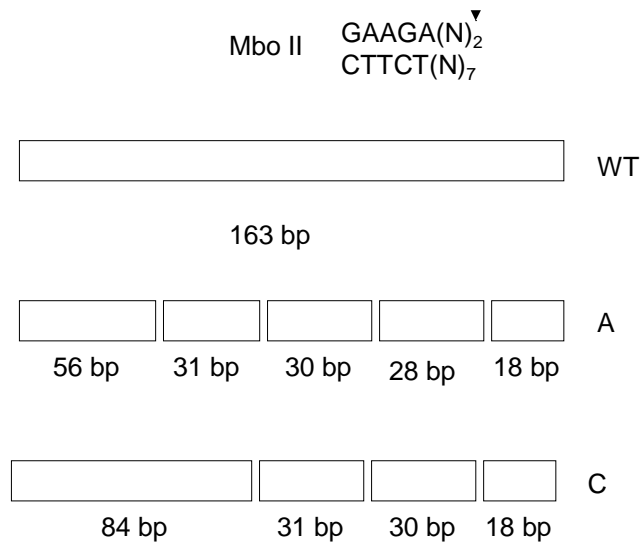


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Schnittstelle des Restriktionsenzym Mbo II und der bei Vorliegen eines Polymorphismus erzeugten DNA- Fragmente

Die DNA- Fragmente wurden auf einem 4 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend unter dem UV- Schirm sichtbar gemacht.

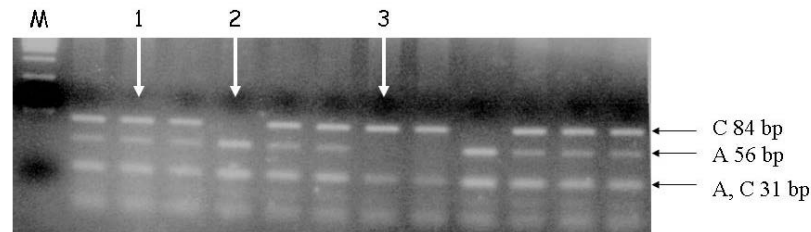


Abbildung 11: Analyse des Polymorphismus der Methylentetrahydrofolatreduktase an der Base 1298. DNA von 159 Patienten wurde mittels PCR amplifiziert und durch Verdau der DNA mit der Restriktionsendonuklease Mbo II bei 37° analysiert. Anschließend wurden die DNA- Proben auf ein 4%-iges Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente unter dem UV- Schirm sichtbar gemacht. M= 100 bp DNA- Längenstandard; 1, 2 und 3 zeigen DNA-Proben von hetero- bzw. homozygoten Patienten.

Abbildung 11 zeigt stellvertretend ein Agarosegel mit 12 von 159 analysierten DNA Proben der Patienten und von 159 Kontrollprobanden. In Spur 1 sind drei DNA- Banden zu sehen, eine bei 84 bp, dieses Restriktionsfragment ist dem Allel C zuzuordnen. Allel A wird dem Fragment bei 56 bp zugeordnet und bei 31 bp können sowohl A als auch C vertreten sein. Somit ist dieser Patient heterozygot (AC) für den Polymorphismus an der Base 1298 der Methylentetrahydrofolatreduktase. In Spur 2 sind zwei Banden erkennbar, eine bei 56 bp und eine bei 31 bp, so dass dieser Patient homozygot für das Allel A (AA) ist. In Spur 3 sind ebenfalls zwei Banden zu sehen, jedoch bei 84 bp und 31 bp, so dass dieser Patient homozygot für das Allel C (CC) ist. Die Banden für das 31 bp und das 30 bp lange Fragment können auf dem Gel nicht aufgelöst werden. Die Ergebnisse für 159 Patienten und ebenfalls 159 Kontrollpatienten sind in Tabelle 12 zusammengefasst:

	AA	AC	CC
Patienten n= 159	134 (84%)	24 (15%)	1 (1%)
Kontrollen n= 159	135 (85%)	24 (15%)	0 (0%)
TOAST 1	27 (49%)	23 (42%)	5 (9%)
TOAST 2	17 (44%)	17 (44%)	5 (13%)
TOAST 3	12 (50%)	9 (38%)	3 (13%)
TOAST 4	9 (60%)	5 (33%)	1 (7%)
TOAST 5	15 (58%)	11 (42%)	0 (0%)
OR= 1.13			
logistische regression [0.54; 2.48]			

Tabelle 12: Ergebnisse zur Untersuchung des Polymorphismus MTHFR 1298 der Patienten- und Kontrollproben. [ ] = 95% Konfidenzintervall

Mit Hilfe der logistischen Regression wurde untersucht, ob die einzelnen Genotypen AA, AC und CC, das Geschlecht und das Alter in dem sich der Hirninfarkt ereignet hat einen Einfluss auf das Ereignis Hirninfarkt haben. Das Ergebnis in Tabelle 12 zeigt, dass diese untersuchten Größen keinen Einfluss auf eine zerebrale Ischämie haben.

#### 4.4 Cystathionin- $\beta$ - Synthase

Die Cystathionin-  $\beta$ - Synthase (CBS) katalysiert die Kondensation von Homocystein zu Cystathionin. Da Vitamin- B<sub>6</sub> bei dieser Reaktion als Coenzym fungiert, resultiert aus einem Vitamin- B<sub>6</sub>- Mangel eine verminderte Enzymaktivität der CBS.

Durch einen autosomal- rezessiven Defekt der CBS, bei der es am Nukleotid 833 zu einem Austausch von Thymin zu Cytosin kommt, kommt es zu einer fehlenden Verstoffwechslung von Homocystein zu Cystathionin bzw. Cystein. Durch den Anstieg des Homocystein- Spiegels kommt es frühzeitig zu arteriosklerotischen Veränderungen und Gerinnungsstörungen. Eine weitere relativ seltene genetische Veränderung der CBS ist eine Insertion von 68 Nukleotiden an Position 844, welche zu einem inaktiven Enzym und damit zu einem Anstieg des Homocysteinspiegels führt. Ich habe im nächsten Schritt daher untersucht, ob diese beiden Mutationen der CBS im Zusammenhang mit der



Entstehung des Hirninfarktes stehen. Aus dem Blut von 159 Patientenproben wurde DNA präpariert und mittels PCR amplifiziert (3.3).

Nach erfolgreicher PCR erfolgte der Verdau der DNA mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Bsr I (3.3.4). Liegt ein Polymorphismus 833 vor, so wird mit Hilfe des Restriktionsenzym der Genabschnitt von 453 Basenpaaren in zwei DNA-Fragmente geschnitten. Abbildung 12 zeigt die Restriktionsfragmente, die man bei einer Sequenz von ACTGGN im Falle der Mutation an Codon 833 erhält.

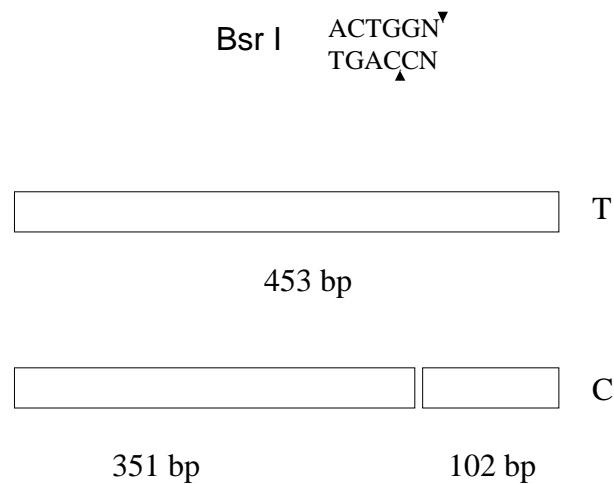


Abbildung 12: Darstellung der Schnittstelle des Restriktionsenzym Bsr I und der DNA- Fragmente bei Vorliegen eines Polymorphismus

Kommt es an Codon 844 zu einer Insertion, so entsteht durch das Restriktionsenzym Bsr I ein 68 Basenpaar längeres Restriktionsfragment.

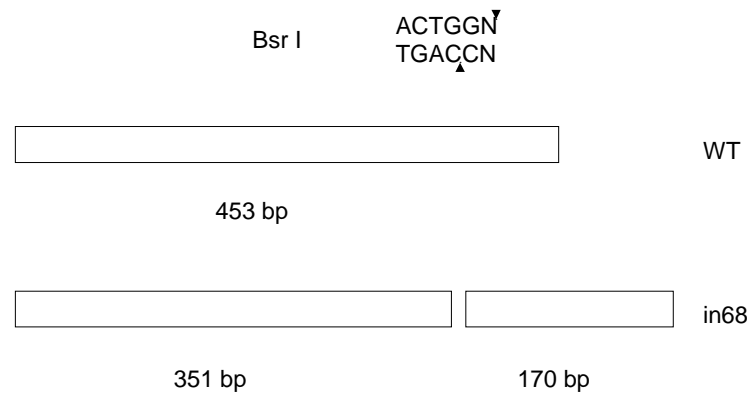


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Schnittstelle des Restriktionsenzym Bsr I und der DNA-Fragmente bei Vorliegen eines Polymorphismus

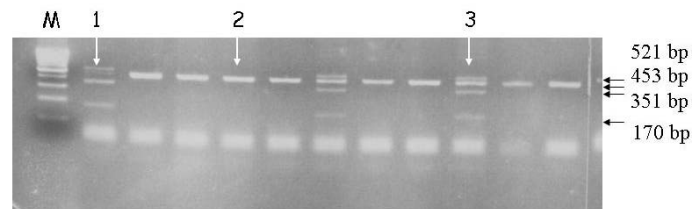


Abbildung 14: Untersuchung zum Polymorphismus der CBS. DNA von 159 Patienten wurden mittels PCR amplifiziert und durch Verdau der DNA mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Bsr I bei 65 °C analysiert. Anschließend wurden die 11 DNA- Proben auf ein 3% Agarosegel aufgetragen und unter dem UV- Schirm sichtbar gemacht. M = 100 bp DNA- Längenstandard, die Banden 1, 2 und 3 zeigen DNA- Proben von hetero- bzw. homozygoten Patienten.

Die mit Bsr I behandelten DNA- Proben wurden auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend unter dem UV- Schirm sichtbar gemacht. Abbildung 14

zeigt stellvertretend ein Gel mit 11 verschiedenen DNA- Proben. Insgesamt wurden 159 Patientenproben und 159 Kontrollproben auf die gleiche Weise analysiert.

In Spur 1 sind drei DNA- Banden zu sehen, eine bei 521 bp, eine bei 351 bp und eine dritte Bande ist bei 170 bp ersichtlich. Diese DNA Fragmente sind charakteristisch für das homozygote Vorliegen für die Insertion an Codon 833. Man findet das um 68 bp verlängerte Fragment und zusätzlich zwei Fragmente der Längen 351 bp und 170 bp. In Spur 2 ist eine Bande bei 453 bp erkennbar. Dieses Fragment ist charakteristisch für den Wildtyp. In Spur 3 sind vier Banden zu sehen und zwar bei 521, 453, 351 und 170 bp. Dieser Patient weist eine Heterozygotie für die Insertion an Codon 833 auf. Diese DNA weist sowohl die Bande bei 453 bp des Wildtyps auf, als auch die drei Fragmente, die charakteristisch für die Insertion sind auf. Die Ergebnisse für 159 Patienten und 159 Kontrollen sind in Tabelle 13 zusammengefasst:

	dd	id	ii
Patienten n= 159	134 (84%)	24 (15%)	1 (1%)
Kontrollen n= 159	135 (85%)	24 (15%)	0 (0%)
TOAST 1	42 (76%)	12 (22%)	1 (2%)
TOAST 2	36 (92%)	3 (8%)	0 (0%)
TOAST 3	21 (88%)	3 (13%)	0 (0%)
TOAST 4	14 (93%)	1 (7%)	0 (0%)
TOAST 5	21 (81%)	5 (19%)	0 (0%)
logistische regression 0.01 (<0.01- 10 <sup>28</sup> )			

Tabelle 13 : Ergebnisse der Untersuchung zum Polymorphismus CBS für Patienten- und Kontrollproben  
dd= Wildtyp, id= heterozygot bzgl. der Insertion, ii= homozygot bzgl. der Insertion, [ ]= 95%  
Konfidenzintervall

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass 84% der Patienten einen Wildtypstatus aufwiesen, in 15% der Fälle fand ich ein heterozygotes Bild bezüglich der Insertion an Codon 833 und 1% der Patienten waren für die Insertion homozygot. Die seltene "missense" mutation CBS c.833T>C wurde im gesamten Patientenkollektiv nicht gefunden. Im Kontrollkollektiv wurde der heterozygote Allelzustand zweimal gefunden und wurde nicht

weiter untersucht. Eine logistische Regression wurde auf Grund der fehlenden Werte in ii nicht durchgeführt. Das Ergebnis in Tabelle 13 zeigt, dass diese Größen keinen Einfluss auf einen Hirninfarkt haben.

#### **4.5 Zusammenfassung**

Von den 159 untersuchten Hirninfarktpatienten waren 57 Frauen und 103 Männer, das durchschnittliche Alter, in dem die Patienten einen Hirninfarkt erlitten hatten lag bei 55+/- 16 Jahren. Die meisten Patienten, nämlich 55, gehören in die Gruppe TOAST 1. Bei diesem Kollektiv wurde eine Makroangiopathie diagnostiziert, die zur cerebralen Ischämie geführt haben könnte. 39 Patienten wurden aufgrund von kardialen Embolien der Untergruppe TOAST 2 zugeordnet. 24 Patienten mit Mikroangiopathien wurden in die TOAST- Untergruppe 3 eingeteilt gefolgt von 15 Patienten mit unterschiedlichen Hirninfarktursachen in Gruppe 4. Bei 26 Patienten konnte eine Ursache nicht eindeutig gefunden werden, sie wurden TOAST 5 zugeordnet.

In TOAST 3 war das Erkrankungsalter am höchsten. Dies besagt, dass Patienten, die aufgrund einer Mikroangiopathie einen Hirninfarkt erleiden, diesen erst in späteren Jahren (64 +/- 10 Jahre) bekommen. Der Unterschied zu den anderen TOAST- Gruppen ist signifikant ( $p = 0.05$ , t- Test). Weiterhin habe ich untersucht ob das Alter, in dem die Patienten einen Hirninfarkt erlitten hatten, durch die verschiedenen Genotypen beeinflusst wird. Ausgehend vom Median des Alters beim ersten ischämischen Insult wurden zwei Gruppen gebildet: jünger als 60 Jahre und 60 Jahre und älter. Bei dieser Betrachtungsweise fand ich, dass junge Patienten (43+/- 12 Jahre; 26 weiblich, 57 männlich) früher einen Hirninfarkt bekommen, wenn bei Ihnen der Genotyp MTHFR c.677 TT vorhanden ist. MTHFR c.677 TT Träger ( $n = 13/83$ ) entwickelten in der Regel einen Hirninfarkt mit 38 +/- 3 Jahren, während Patienten mit den Genotypen MTHFR c.677 CT oder CC ( $n = 70/83$ ) erst im Alter von 45 +/- 1 Jahr den ersten Hirninfarkt erlitten. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Untergruppe und statistisch signifikant ( $p = 0.043$ , Chi- quadrat- test).

Der mögliche Einfluss der Polymorphismen auf das Auftreten eines Hirninfarktes

wurde mit Hilfe der logistischen Regression untersucht. Dabei zeigte sich, dass keiner der betrachteten Polymorphismen einen signifikanten Einfluss hat. Bei dem Polymorphismus MTHFR 677 kann man auf Grund der Kaplan- Meier- Kurve zwar vermutet, dass der Genotyp TT einen Einfluss hat. Aber auch dieser Unterschied gegenüber CC und CT war nicht signifikant.

## 5 Diskussion

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit Risikofaktoren, wie Hypertonie, Diabetes Mellitus, kardiologische Erkrankungen, Rauchen, Alkoholkonsum, fehlende körperliche Aktivität und Übergewicht für das Auftreten von ischämischen Insulten identifiziert. Diese klassischen Risikofaktoren erklären jedoch nur etwa zwei Drittel der kardiovaskulären Erkrankungen (Kritz und Sinzinger, 1997). Hyperhomocysteinämie stellt einen weiteren unabhängigen Faktor dar. Zahlreiche retrospektive und prospektive Studien fanden übereinstimmend eine unabhängige Beziehung zwischen bereits leicht erhöhten Homocysteinwerten (nüchtern und nach oraler Methioninbelastung) und kardiovaskulären Erkrankungen (Boushey et al., 1995; De Bree et al., 2002; Durand et al., 2001; Stampfer et al., 1992; Wald et al., 1998;). Als Ursache für erhöhte Homocysteinwerte im Serum spielen Alter, Geschlecht, Vitaminunterversorgung, Medikamente und genetische Faktoren eine wichtige Rolle. Mausmodelle mit transgenen CBS bzw. MTHFR defizienten Tieren tragen zum Verständnis der Rolle von CBS bzw. MTHFR bei Hyperhomocysteinämien bei. Homozygote CBS defiziente Mäuse haben einen 40 fach erhöhten Plasma- Homocysteinspiegel, sie zeigen Wachstumsstörungen und hepatische Steatosen. Heterozygote Mäuse sind gute Modelle für eine milde Form der HHcy. Obwohl diese Mäuse endotheliale Dysfunktionen aufweisen gibt es bislang keine Hinweise auf atherosklerotische Läsionen (Lentz, 1997). Im Gegensatz dazu entwickeln MTHFR-defiziente Mäuse viel häufiger Atherosklerose (Chen et al., 2001).

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, in denen Polymorphismen des Homocysteinstoffwechsels eine wichtige Rolle in Bezug auf diverse Erkrankungen spielen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit 159 Patientenproben dahingehend untersucht, in wieweit diese Polymorphismen einen Einfluss auf das Ereignis ischämischer Insult haben. In der jüngsten Zeit sind eine Reihe von Methoden daraufhin getestet worden, ob sie einen höheren Probendurchsatz und eine schnellere und kostengünstigere Identifizierung von "single nucleotid polymorphismus" (SNP) ermöglichen könnten. Zu diesen Methoden gehören die "Taqman"- Methode, die DNA chip- Methode und der „Invader assay“ (Fors et al., 2000; Kwiatkowski et al., 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass man mit einer Chip- basierten MALDI- TOFS Methode

(Matrix- assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy) sehr schnell und sehr zuverlässig SNP Analysen durchführen kann (Bray et al., 2001; Buetow et al., 2001). Mit Hilfe dieser Methode konnte auch bereits der 677C>T Polymorphismus des MTHFR Gens hinsichtlich koronarer Herzerkrankung untersucht werden. In einer Kontrollgruppe von 14 Personen konnten bei 7 Personen homozygote Wildtypsequenzen, bei 6 Personen heterozygote Sequenzen und bei 1 Person homozygote Mutantenformen gefunden werden. Bei Patienten mit einem Myokardinfarkt lagen bei 8 Personen homozygote, bei 6 heterozygote Formen und bei 5 Personen homozygote Mutantenformen vor (Nakai et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der "single nucleotid polymorphism" (SNP) für die Gene, die für die Enzyme des Hcy-Stoffwechsels codieren, mit Hilfe der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (RLFP) durchgeführt.

## **5.1 Methioninsynthase**

Bei meinen ermittelten Ergebnissen hatte der Polymorphismus der Methioninsynthase c.2756 keinen signifikanten Einfluss auf das Ereignis Hirninfarkt. In einer jüngst veröffentlichten Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass der D919G Polymorphismus des Methioninsynthasegens mit einer deutlich geringeren Reduktion des diastolischen Blutdrucks nach Behandlung mit Benazepril verbunden ist. Diese Beobachtung könnte den D919G Polymorphismus zu einem genetischen Marker machen, um antihypertensive Effekte bei der Behandlung hypertensiver Patienten vorauszusagen (Zhang et al., 2004). Linnebank *et al.* fanden deutlich geringere Genträger des Methioninsynthase D919G Missensepolymorphismus unter den Patienten mit Lymphomen des Zentralnervensystems als bei Gesunden (Linnebank et al., 2004). Weiterhin spielt die D919G Mutation bei der Methioninsynthase auch eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Kolonkarzinoms (Goode et al., 2004).

## 5.2 Cystathionin- $\beta$ - Synthase

Eine CBS Defizienz manifestiert sich in vielen klinischen Krankheitsbildern wie mentale Retardierung, Ektopia lentis, Osteoporose, Skelettanomalitäten und hepatische Steatosen. Homozygoter Verlust von CBS ist ein seltenes Ereignis, eine heterozygote Defizienz findet man in 1% der Normalbevölkerung. Die relativ seltene Mutation CBS 833 C>T fand ich im Patientengut nicht, während in den Kontrollen zwei Probanden heterozygot für diese Mutation waren. Da dies nicht signifikant war wurde dieser Polymorphismus nicht weiter untersucht. Eine neue Klasse von Mutationen im C-Terminus von CBS P422C, I435T und S466L wurden neulich gefunden. Die betroffenen Patienten leiden an Thrombose, haben aber keine der erblichen, Homocystein-bedingten Symptome, die man üblicherweise bei CBS- defizienten Patienten findet (Maclean et al., 2002). Darüber hinaus wurden jüngst zwei neue Mutationen 429C>G und 1039G>T gefunden (Orendae et al., 2004). Nicht nur die C- terminalen CBS Mutationen sondern auch die häufigste Mutation I278T kann zu thromboembolischen Ereignissen ohne weitere Symptome führen (Linnebank et al., 2001). Bei meinen untersuchten Patientenproben hatten Polymorphismen der Cystathionin-  $\beta$ - Synthase allerdings keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten von zerebralen Ischämien.

## 5.3 Methylentetrahydrofolatreduktase

Der Einfluss der Polymorphismen der Methylentetrahydrofolatreduktase, MTHFR c.677 und c.1298, hinsichtlich der Erkrankung Hirninfarkt wurde mit Hilfe der logistischen Regression ermittelt. Dabei kam ich zu dem Ergebnis, dass genetische Veränderungen der MTHFR keinen signifikanten Einfluss auf das Ereignis Hirninfarkt haben. In der Literatur hingegen wurde gezeigt, dass diese Polymorphismen Einfluss auf die Entstehung diverser Erkrankungen haben. Die 1298 Variante kann unter besonderen klinischen Bedingungen, wie niedrige Folataufnahme bei Schwangerschaften und während der Embryogenese eine wichtige Rolle spielen (van der Put et al., 1998). Diese Mutation findet man in der deutschen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 0.31 (Linnebank et al., 2000). Die 677 C>T Mutation wird autosomal rezessiv vererbt. Die Frequenz dieser Mutation variiert zwischen Rassen und zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. Dabei sind bei Kaukasiern und Asiaten



zwischen 10- 13% homozygot für TT und 50% für CT heterozygot. Bei Afrikanern und Amerikanern tritt der Polymorphismus selten auf (Bailey und Gregory, III, 1999; Brattstrom et al., 1998). In allerjüngster Zeit wurde gefunden, dass ein funktioneller Polymorphismus der MTHFR das Risiko für die Ausbildung der Lippen- bzw. Gaumenspalte erhöht. Obwohl diese Befunde nach wie vor kontrovers diskutiert werden konnte eine weitere Studie zeigen, dass eine niedrigere MTHFR Enzymaktivität bedingt durch die 677 C>T Mutation bei Schwangeren dafür verantwortlich ist, dass die Nachkommen ein höheres Risiko für Lippen- und Gaumenspalten haben (Pezzetti et al., 2004). Es wurde auch gezeigt, dass der TT Genotyp unter Folatsubstitution bei milder Hyperhomocysteinämie ein signifikant niedrigeres Risiko hat, an einem Colocarcinom zu erkranken als die CC oder CT Genotypen (Chen et al., 1998). Andere Daten zeigen, dass der MTHFR Polymorphismus auch in Spätstadien der kolorektalen Tumorgenese eine Rolle spielt.

Die Rolle des 677 C>T MTHFR Polymorphismus für koronare arterielle Erkrankungen wird kontrovers diskutiert. Die Frequenz des 677 C>T Polymorphismus wird mit 34.9% bzw. 33.6% für Patienten mit koronaren arteriellen Erkrankungen bzw. ohne diese Erkrankung angegeben (Nakai et al., 2001). Der homozygote Polymorphismus wird mit 10.9 bzw. 12.8 % angegeben. Auch in diesem Fall wurden ethnische Unterschiede beschrieben. In der deutschen Bevölkerung tritt das 677T Allel in einem Drittel aller Allele auf (Linnebank et al., 2000; Stegmann et al., 1999). Das 677T Allel ist mit einem verringerten fötalem Tod, einem verringerten Risiko an Leukämie und Colocarcinom zu erkranken, verbunden (Rosenberg et al., 2002). Das MTHFR A677V Allel ist signifikant mit schweren Arteria Carotis Stenosen assoziiert (Bova et al., 1999).

Bei genetischen Veränderungen des MTHFR- Gens, die die enzymatische Aktivität der MTHFR verändern, erwartet man nicht nur einen Einfluss auf den Homocystein- und Methioninstoffwechsel sondern auch auf den Nukleotidpool und auf die DNA Synthese weil MTHFR auch eine wichtige Rolle bei der Synthese des Thymidins spielt. Darüber hinaus spielt MTHFR eine wichtige Rolle bei der Synthese des S-Adenosylmethionins, das den Methylgruppdonor bei DNA Methylierungen darstellt (Andreassi et al., 2003; Zijno et al., 2003). Der homozygote TT Genotyp ist mit einer reduzierten MTHFR Aktivität assoziiert und führt zu hohen Homocysteinspiegeln. Eine hohe Aktivität der MTHFR

Aktivität erniedrigt den Gehalt an MTHF, was zu einer Abnahme der Thymidylatsynthese führt. Eine niedrige MTHFR Aktivität führt zu einer Erniedrigung der DNA Methylierung in der Zelle. So könnte die protektive Wirkung des TT Genotyps des MTHFR- Gens ihren Grund in der erhöhten Verfügbarkeit von 5, 10 Methylen- THF und der damit verbundenen erleichterten Nukleotidsynthese haben. Ähnliche Überlegungen, die die Verfügbarkeit von Thymidin betreffen und nicht den Hcy- Stoffwechsel tangieren müssen wohl auch für kardiovaskuläre Erkrankungen bzw. atherosklerotischen Erkrankungen angestellt werden. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine modifizierte DNA-Methylierung bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielt. Weiterhin habe ich in meiner Arbeit untersucht, ob das Vorhandensein einer Mutation eines Enzyms des Homocysteinestoffwechsel einen Einfluss auf das Erkrankungsalter hat. Bei dieser Betrachtungsweise fand ich, dass junge Patienten (43+/- 12 Jahre; 26 weiblich, 57 männlich) früher einen Hirninfarkt bekommen, wenn bei Ihnen der Genotyp MTHFR c.677 TT vorhanden ist. MTHFR c.677 TT Träger (n= 13/83) entwickelten in der Regel einen Hirninfarkt mit 38 +/- 3 Jahren, während Patienten mit den Genotypen MTHFR c.677 CT oder CC (n= 70/83) erst im Alter von 45 +/- 1 Jahr den ersten Hirninfarkt erlitten. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Untergruppe und statistisch signifikant (p= 0.043, Chi- quadrat- test).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die untersuchten Polymorphismen des Homocysteinestoffwechsels für das Auftreten eines Hirninfarktes keinen signifikanten Risikofaktor darstellen.

Man hat die Vermutung, dass das homozygote Auftreten des T- Allels der Methylentetrahydrofolatreduktase einen Einfluss auf das Erkrankungsalter hat.

Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass diese Polymorphismen eine wichtige Rolle in der Entstehung anderer diverser Erkrankungen spielen können.

## 6 Zusammenfassung

Die Hyperhomocysteinämie ist ein epidemiologisch bedeutsamer Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, Thrombosen und viele psychiatrische und neurologische Erkrankungen. Homocysteinämien sind die Folge von Medikamenteneinnahmen (Antiepileptika, Methotrexat), Vitamin- B<sub>6</sub> und Vitamin- B<sub>12</sub>- Mangelzuständen, eingeschränkter Nierenfunktion, aber auch Folge von angeborenen genetischen Störungen, wie Mutationen in den Genen für die Enzyme MTHFR, Methioninsynthase und Cystathionin-  $\beta$ - Synthase, die für Transsulfurierung und Remethylierung des Homocysteins unabdingbar sind.

Zum ersten Mal wurden in meiner Arbeit Polymorphismen alle vier Schlüsselenzyme des Homocysteinestoffwechsels auf ihre Relevanz in Bezug auf Ätiologie und Genese des ischämischen Hirninfarktes untersucht.

Von den 159 untersuchten Hirninfarktpatienten waren 57 Frauen und 102 Männer, das durchschnittliche Alter, in dem die Patienten einen Hirninfarkt erlitten hatten, lag bei 55 $\pm$ 16 Jahren. Die meisten Patienten, nämlich 55, gehören in die Gruppe TOAST 1. Bei diesem Kollektiv wurde eine Makroangiopathie diagnostiziert, die zur cerebralen Ischämie geführt haben könnte. 39 Patienten wurden aufgrund von kardialen Embolien der Untergruppe TOAST 2 zugeordnet. 24 Patienten mit Mikroangiopathien wurden in die TOAST- Untergruppe 3 eingeteilt, gefolgt von 15 Patienten mit unterschiedlichen Hirninfarktursachen in Gruppe 4. Bei 26 Patienten konnte eine Ursache nicht eindeutig gefunden werden, sie wurden Gruppe TOAST 5 zugeordnet.

In der Gruppe TOAST 3 war das Erkrankungsalter am höchsten. Dies besagt, dass Patienten, die aufgrund einer Mikroangiopathie einen Hirninfarkt erleiden, diesen erst in späteren Jahren (64  $\pm$  10 Jahre) bekommen. Der Unterschied zu den anderen TOAST- Gruppen ist signifikant ( $p = 0.05$ , t- Test). Weiterhin habe ich untersucht, ob das Alter, in dem die Patienten einen Hirninfarkt erlitten hatten, durch die verschiedenen Genotypen beeinflusst wird. Ausgehend vom Median des Alters beim ersten ischämischen Insult

wurden zwei Gruppen gebildet: jünger als 60 Jahre und 60 Jahre und älter. Bei dieser Betrachtungsweise fand ich, dass junge Patienten (43 $\pm$  12 Jahre; 26 weiblich, 57 männlich) früher einen Hirninfarkt bekommen, wenn bei Ihnen der Genotyp MTHFR c.677 TT vorhanden ist. MTHFR c.677 TT Träger (n= 13/83) entwickelten in der Regel einen Hirninfarkt mit 38  $\pm$  3 Jahren, während Patienten mit den Genotypen MTHFR c.677 CT oder CC (n= 70/83) erst im Alter von 45  $\pm$  1 Jahr den ersten Hirninfarkt erlitten. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Untergruppe und statistisch signifikant (p= 0.043, Chi- quadrat- test).

Der mögliche Einfluss der Polymorphismen auf das Auftreten eines Hirninfarktes wurde mit Hilfe der logistischen Regression untersucht. Dabei zeigte sich, dass keiner der betrachteten Polymorphismen einen signifikanten Einfluss hat. Bei dem Polymorphismus MTHFR 677 kann man auf Grund der Kaplan- Meier- Kurve zwar vermutet, dass der Genotyp TT einen Einfluss hat. Aber auch dieser Unterschied gegenüber den Genotypen CC und CT war statistisch nicht signifikant.

## 7 Literatur

Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, III. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41

Aguilar B, Rojas JC, Collados MT. Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 18: 75-87

Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990; 34: 90-98

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; 22: 79-87

Andreassi MG, Botto N, Cocci F, Battaglia D, Antonioli E, Masetti S, Manfredi S, Colombo MG, Biagini A, Clerico A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. *Hum Genet* 2003; 112: 171-177

Bailey LB, Gregory JF, III. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999; 129: 919-922

Baldessarini RJ. Neuropharmacology of S-adenosyl-L-methionine. *Am J Med* 1987; 83: 95-103

Bender R, Ziegler A, Lange S. Multiple Regression. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: 8-10

Benjamin EJ, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA, Levy D. Left atrial size and the risk of stroke and death. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1995; 92: 835-841

Berger K, Ajani UA, Kase CS, Gaziano JM, Buring JE, Glynn RJ, Hennekens CH. Light-to-moderate alcohol consumption and risk of stroke among U.S. male physicians. *N Engl J Med* 1999; 341: 1557-1564

Blauw GJ, Lagaay AM, Smelt AH, Westendorp RG. Stroke, statins, and cholesterol. A meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials with HMG-CoA reductase inhibitors. *Stroke* 1997; 28: 946-950

Bogousslavsky J. Stroke: the neurological emergency. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 45

Bokura H, Kobayashi S. [Management of hypertension for elderly patients with stroke]. *Nippon Rinsho* 2005; 63: 1029-1032

Borota J, Milosevic-Tosic M, Katanic D. [Homocystinuria--biochemical, clinical and genetic aspects]. *Med Pregl* 1997; 50: 187-193

Boss GR. Cobalamin inactivation decreases purine and methionine synthesis in cultured lymphoblasts. *J Clin Invest* 1985; 76: 213-218

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; 274: 1049-1057

Bova I, Chapman J, Sylantiev C, Korczyn AD, Bornstein NM. The A677V methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke* 1999; 30: 2180-2182

Bowman TS, Sesso HD, Ma J, Kurth T, Kase CS, Stampfer MJ, Gaziano JM. Cholesterol and the risk of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 2930-2934

Brattstrom L, Israelsson B, Norrving B, Bergqvist D, Thorne J, Hultberg B, Hamfelt A. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis* 1990; 81: 51-60

Brattstrom 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; 98: 2520-2526

Bravata DM, Wells CK, Gulanski B, Kernan WN, Brass LM, Long J, Concato J. Racial Disparities in Stroke Risk Factors. The Impact of Socioeconomic Status. *Stroke* 2005; 36: 1507-1511

Bray MS, Boerwinkle E, Doris PA. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. *Hum Mutat* 2001; 17: 296-304

Bronner LL, Kanter DS, Manson JE. Primary prevention of stroke. *N Engl J Med* 1995; 333: 1392-1400

Bucher HC, Griffith LE, Guyatt GH. Systematic review on the risk and benefit of different cholesterol-lowering interventions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 187-195

Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J, Little DP, Strausberg R, Koester H, Cantor CR, Braun A. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 581-584

Burchfiel CM, Curb JD, Rodriguez BL, Abbott RD, Chiu D, Yano K. Glucose intolerance and 22-year stroke incidence. The Honolulu Heart Program. *Stroke* 1994; 25: 951-957

Camargo CA, Jr. Case-control and cohort studies of moderate alcohol consumption and stroke. *Clin Chim Acta* 1996; 246: 107-119

Camargo CA, Jr. Moderate alcohol consumption and stroke. The epidemiologic evidence. *Stroke* 1989; 20: 1611-1626

Capaccio P, Ottaviani F, Cuccarini V, Ambrosetti U, Fagnani E, Bottero A, Cenzuales S, Cesana BM, Pignataro L. Methylenetetrahydrofolate reductase gene mutations as risk factors for sudden hearing loss. *Am J Otolaryngol* 2005; 26: 383-387

Capaccio P, Ottaviani F, Cuccarini V, Ambrosetti U, Fagnani E, Bottero A, Cenzuales S, Cesana BM, Pignataro L. Sudden hearing loss and MTHFR 677C>T/1298A>C gene polymorphisms. *Genet Med* 2005; 7: 206-208



Carson NA, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-513

Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE, Ma J, Willett WC, Spiegelman D, Kelsey KT, Hunter DJ. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2129-2132

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

Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 433-443

Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976; 127: 1550-1557

Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-1155

Cleophas TJ, Hornstra N, van Hoogstraten B, van der MJ. Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am J Cardiol* 2000; 86: 1005-1009

Collins R, Peto R, Godwin J, MacMahon S. Blood pressure and coronary heart disease. *Lancet* 1990; 336: 370-371

Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Arico S. Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. *Addiction* 1999; 94: 1551-1573

Corvol JC, Bouzamondo A, Sirol M, Hulot JS, Sanchez P, Lechat P. Differential effects of lipid-lowering therapies on stroke prevention: a meta-analysis of randomized trials. *Arch Intern Med* 2003; 163: 669-676

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; 54: 599-618

de Jong N, Chin APM, de Groot LC, Rutten RA, Swinkels DW, Kok FJ, van Staveren WA. Nutrient-dense foods and exercise in frail elderly: effects on B vitamins, homocysteine, methylmalonic acid, and neuropsychological functioning. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 338-346

de Jong SC, Stehouwer CD, van den BM, Kostense PJ, Alders D, Jakobs C, Pals G, Rauwerda JA. Determinants of fasting and post-methionine homocysteine levels in families predisposed to hyperhomocysteinemia and premature vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1316-1324

Djousse L, Ellison RC, Beiser A, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. Alcohol consumption and risk of ischemic stroke: The Framingham Study. *Stroke* 2002; 33: 907-912

Donahue RP, Abbott RD. Alcohol and haemorrhagic stroke. *Lancet* 1986; 2: 515-516

Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; 81: 645-672

Eloranta TO, Martikainen V, Smith TK. Adaptation of adenosylmethionine metabolism and methionine recycling to variations in dietary methionine in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 194: 364-371

Emberson JR, Shaper AG, Wannamethee SG, Morris RW, Whincup PH. Alcohol intake in middle age and risk of cardiovascular disease and mortality: accounting for intake variation over time. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 856-863

Evenson KR, Rosamond WD, Cai J, Toole JF, Hutchinson RG, Shahar E, Folsom AR. Physical activity and ischemic stroke risk. The atherosclerosis risk in communities study. *Stroke* 1999; 30: 1333-1339

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 Suppl 2: 40-44

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; 31: 59-70

Fors L, Lieder KW, Vavra SH, Kwiatkowski RW. Large-scale SNP scoring from unamplified genomic DNA. *Pharmacogenomics* 2000; 1: 219-229

Fowler B. Homocystein als kardiovaskulärer Risikofaktor. *Kardiovaskuläre Medizin* 2004; 7: 71-77

Franco R, Maffei F, Lourenco D, Piccinato C, Morelli V, Thomazini I, Zago M. The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine beta-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis. *Haematologica* 1998; 83: 1006-1008

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; 10: 111-113

Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9: 493-496

Gillum RF, Mussolino ME, Ingram DD. Physical activity and stroke incidence in women and men. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 860-869

Goode EL, Potter JD, Bigler J, Ulrich CM. Methionine synthase D919G polymorphism, folate metabolism, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 157-162

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

Grassi G, Quarti F, Mancia G. Hypertension, antihypertensive treatment and stroke prevention. *Neurol Sci* 2005; 26 Suppl 1: 22-23

Grossmann R, Schwender S, Geisen U, Schambeck C, Merati G, Walter U. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res* 2002; 107: 13-15

Gupta M, Sharma P, Garg G, Kaur K, Bedi GK, Vij A. Plasma homocysteine: an independent or an interactive risk factor for coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 121-125

Guttormsen AB, Schneede J, Ueland PM, Refsum H. Kinetics of total plasma homocysteine in subjects with hyperhomocysteinemia due to folate or cobalamin deficiency. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 194-202

Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 495-502

Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-413

Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-741

Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-543

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; 17: 298-309

Harrison GJ, Jordan LR, Willis RJ. Deleterious effects of hydrogen peroxide on the function and ultrastructure of cardiac muscle and the coronary vasculature of perfused rat hearts. *Can J Cardiol* 1994; 10: 843-849

Hart RG, Halperin JL. Atrial fibrillation and stroke : concepts and controversies. *Stroke* 2001; 32: 803-808

Hart RG, Palacio S, Pearce LA. Atrial fibrillation, stroke, and acute antithrombotic therapy: analysis of randomized clinical trials. *Stroke* 2002; 33: 2722-2727

Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 10098-10103

Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 666-674

Herrmann W. Where are we standing in homocysteine research? *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1389-1391

Howard G, Evans GW, Crouse JR, III, Toole JF, Ryu JE, Tegeler C, Frye-Pierson J, Mitchell E, Sanders L. A prospective reevaluation of transient ischemic attacks as a risk factor for death and fatal or nonfatal cardiovascular events. *Stroke* 1994; 25: 342-345

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Thiol redox status influences extracellular concentration of homocysteine in HeLa cell cultures. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1243-1247

Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998; 44: 1833-1843

Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 1997; 272: 1935-1942

Jood K, Ladenvall C, Rosengren A, Blomstrand C, Jern C. Family History in Ischemic Stroke Before 70 Years of Age. The Sahlgrenska Academy Study on Ischemic Stroke. *Stroke* 2005; 36: 1383-1387

Kang SS, Wong PW, Bock HG, Horwitz A, Grix A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 546-551

Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-298

Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Smoking cessation and decreased risk of stroke in women. *JAMA* 1993; 269: 232-236

Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Kannel WB. Physical activity and stroke risk: the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 608-620

- Kim H, Friedlander Y, Longstreth WT, Jr., Edwards KL, Schwartz SM, Siscovick DS. Family history as a risk factor for stroke in young women. *Am J Prev Med* 2004; 27: 391-396
- Kircher T, Sinzinger H. [Hyperhomocysteinemia]. *Vasa* 1999; 28: 306
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2023-2031
- Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 35-41
- Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, von Stockert TR. A prospective community-based study of stroke in Germany--the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months. *Stroke* 1998; 29: 2501-2506
- Kritz H, Sinzinger H. Tea consumption, lipid metabolism, and atherosclerosis. *Wien Klin Wochenschr* 1997; 109: 944-948
- Kurtzke JF. The current neurologic burden of illness and injury in the United States. *Neurology* 1982; 32: 1207-1214



Kwiatkowski RW, Lyamichev V, de Arruda M, Neri B. Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. *Mol Diagn* 1999; 4: 353-364

Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003; 326: 1423-

Lee IM, Hennekens CH, Berger K, Buring JE, Manson JE. Exercise and risk of stroke in male physicians. *Stroke* 1999; 30: 1-6

Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci* 1997; 61: 1205-1215

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360: 1903-1913

Lindenstrom E, Boysen G, Nyboe J. Lifestyle factors and risk of cerebrovascular disease in women. The Copenhagen City Heart Study. *Stroke* 1993; 24: 1468-1472

Linnebank M, Homberger A, Junker R, Nowak-Goettl U, Harms E, Koch HG. High prevalence of the I278T mutation of the human cystathionine beta-synthase detected by a novel screening application. *Thromb Haemost* 2001; 85: 986-988

Linnebank M, Homberger A, Koch HG, Bova I, Sylantiev C, Bornstein NM, Chapman J, Korczyn AD. Frequent polymorphism of the human methylenetetrahydrofolate reductase. *Stroke* 2000; 31: 990

Linnebank M, Homberger A, Nowak-Gottl U, Marquardt T, Harms E, Koch HG. Linkage disequilibrium of the common mutations 677C > T and 1298A > C of the human

methylenetetrahydrofolate reductase gene as proven by the novel polymorphisms 129C > T, 1068C > T. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 472-473

Linnebank M, Junker R, Nabavi DG, Linnebank A, Koch HG. Isolated thrombosis due to the cystathionine beta-synthase mutation c.833T>C (1278T). *J Inher Metab Dis* 2003; 26: 509-511

Linnebank M, Schmidt S, Kolsch H, Linnebank A, Heun R, Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A, Fliessbach K, Klockgether T, Schlegel U, Pels H. The methionine synthase polymorphism D919G alters susceptibility to primary central nervous system lymphoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 1969-1971

Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 5-7

Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J, Jr. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 587-593

Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996; 94: 2410-2416

Macleaun KN, Gaustadnes M, Oliveriusova J, Janosik M, Kraus E, Kozich V, Kery V, Skovby F, Rudiger N, Ingerslev J, Stabler SP, Allen RH, Kraus JP. High homocysteine and thrombosis without connective tissue disorders are associated with a novel class of cystathionine beta-synthase (CBS) mutations. *Hum Mutat* 2002; 19: 641-655

MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335: 765-774

Malinow MR, Stampfer MJ. Role of plasma homocyst(e)ine in arterial occlusive diseases. *Clin Chem* 1994; 40: 857-858

Malmgren R, Warlow C, Bamford J, Sandercock P. Geographical and secular trends in stroke incidence. *Lancet* 1987; 2: 1196-1200

Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Arky RA, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1141-1147

Marcucci R, Giusti B, Betti I, Evangelisti L, Fedi S, Sodi A, Cappelli S, Menchini U, Abbate R, Prisco D. Genetic determinants of fasting and post-methionine hyperhomocysteinemia in patients with retinal vein occlusion. *Thromb Res* 2003; 110: 7-12

Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L, Gombos F, Tognon M. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet* 2001; 98: 357-360

Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. *Alcohol* 2005; 35: 235-241

McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128

McCully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-227

Meleady R, Ueland PM, Blom H, Whitehead AS, Refsum H, Daly LE, Vollset SE, Donohue C, Giesendorf B, Graham IM, Ulvik A, Zhang Y, Bjorke Monsen AL. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 63-70

Mercie P, Seigneur M, Conri C, Boisseau MR. Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in peripheral arterial disease. *Thromb Res* 1999; 93: 97-99

Mills JL, Kirke PN, Molloy AM, Burke H, Conley MR, Lee YJ, Mayne PD, Weir DG, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. *Am J Med Genet* 1999; 86: 71-74

Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Weir DG, Scott JM. Folate status and neural tube defects. *Biofactors* 1999; 10: 291-294

Montalescot G. Homocysteine: the new player in the field of coronary risk. *Heart* 1996; 76: 101-102

Morrow LE. Homocysteine: more questions than answers. *Nutrition* 2000; 16: 780-781

Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. HOMOCYSTINURIA: AN ENZYMATIC DEFECT. *Science* 1964; 143: 1443-1445

Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, . The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1-31

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-273

Mulrow CD, Cornell JA, Herrera CR, Kadri A, Farnett L, Aguilar C. Hypertension in the elderly. Implications and generalizability of randomized trials. *JAMA* 1994; 272: 1932-1938

Nakai K, Habano W, Fujita T, Nakai K, Schnackenberg J, Kawazoe K, Suwabe A, Itoh C. Highly multiplexed genotyping of coronary artery disease-associated SNPs using MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat* 2002; 20: 133-138

Nakai K, Itoh C, Nakai K, Habano W, Gurwitz D. Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *Am J Cardiovasc Drugs* 2001; 1: 353-361

Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet* 2000; 356: 1955-1964

Nijhout HF, Reed MC, Budu P, Ulrich CM. A mathematical model of the folate cycle: new insights into folate homeostasis. *J Biol Chem* 2004; 279: 55008-55016

Nygaard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 230-236

Orendae M, Pronicka E, Kubalska J, Janosik M, Sokolova J, Linnebank M, Koch HG, Kozich V. Identification and functional analysis of two novel mutations in the CBS gene in Polish patients with homocystinuria. *Hum Mutat* 2004; 23: 631

Parle-McDermott A, Mills JL, Kirke PN, O'Leary VB, Swanson DA, Pangilinan F, Conley M, Molloy AM, Cox C, Scott JM, Brody LC. Analysis of the MTHFR 1298A-->C and 677C-->T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet* 2003; 48: 190-193

Pasquier F, Lebert F, Petit H, Zittoun J, Marquet J. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by a neuropathy in a psychotic adult. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 765-766

Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, Carinci P, Caramelli E, Rullo R, Gombos F, Tognon M. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2004; 24: 104-105

Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Homocysteine provokes leukocyte-endothelium interaction by downregulation of nitric oxide. *Gen Pharmacol* 1999; 33: 487-498

Psaty BM, Smith NL, Siscovick DS, Koepsell TD, Weiss NS, Heckbert SR, Lemaitre RN, Wagner EH, Furberg CD. Health outcomes associated with antihypertensive therapies

used as first-line agents. A systematic review and meta-analysis. *JAMA* 1997; 277: 739-745

Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M, Pedersen AM, Dybkjaer L. Age- and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 1996; 42: 630-636

Refsum H, Ueland PM. Recent data are not in conflict with homocysteine as a cardiovascular risk factor. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 533-539

Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2003; 289: 579-588

Romano M, Marcucci R, Buratti E, Ayala YM, Sebastio G, Baralle FE. Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine Beta -synthase gene. *J Biol Chem* 2002; 277: 43821-43829

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 758-762

Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc* 1993; 25: 2041-2043

Ross SD, Allen IE, Connelly JE, Korenblat BM, Smith ME, Bishop D, Luo D. Clinical outcomes in statin treatment trials: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1793-1802

Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM, Goldstein LB, Gorelick PB, Howard G, Kittner SJ, Manolio TA, Whisnant JP, Wolf PA. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* 1997; 28: 1507-1517

Sacco RL, Elkind M, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, Shea S, Paik MC. The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA* 1999; 281: 53-60

Sacco RL, Ellenberg JH, Mohr JP, Tatemichi TK, Hier DB, Price TR, Wolf PA. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. *Ann Neurol* 1989; 25: 382-390

Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 1989; 342: 224-225

Scherr PA, LaCroix AZ, Wallace RB, Berkman L, Curb JD, Cornoni-Huntley J, Evans DA, Hennekens CH. Light to moderate alcohol consumption and mortality in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40: 651-657

Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 263-279

Scott JM, Weir DG. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 1981; 2: 337-340

Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 217-246



Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270: 2693-2698

Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 131-138

Sengupta S, Chen H, Togawa T, DiBello PM, Majors AK, Budy B, Ketterer ME, Jacobsen DW. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J Biol Chem* 2001; 276: 30111-30117

Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD, Boland LL, Ballantyne CM, McGovern PG, Sharrett AR. Plasma lipid profile and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke* 2003; 34: 623-631

Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1045-1055

Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ* 1989; 298: 789-794

Shinton R, Sagar G. Lifelong exercise and stroke. *BMJ* 1993; 307: 231-234

Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318

Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev* 1996; 54: 1-30

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-881

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

Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77: 1370-1376

Statistisches Jahrbuch 1998, Kapitel 16, Gesundheitswesen. Wiesbaden: 1998: 430- 460

Stegmann K, Ziegler A, Ngo ET, Kohlschmidt N, Schroter B, Ermert A, Koch MC. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects(NTD). *Am J Med Genet* 1999; 87: 23-29

Stein JH, McBride PE. Hyperhomocysteinemia and atherosclerotic vascular disease: pathophysiology, screening, and treatment. *Arch Intern Med* 1998; 158: 1301-1306

Sydow K, Boger RH. [Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options]. *Z Kardiol* 2001; 90: 1-11

Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6369-6373

Ubagai T, Lei KJ, Huang S, Mudd SH, Levy HL, Chou JY. Molecular mechanisms of an inborn error of methionine pathway. Methionine adenosyltransferase deficiency. *J Clin Invest* 1995; 96: 1943-1947

Ubbink JB, Delport R. Homocysteine as atherothrombotic agent: is the bark worse than the bite? *Nutrition* 2000; 16: 672-674

Ubbink JB, van der MA, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJ. The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996; 98: 177-184

Ueland PM. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev* 1982; 34: 223-253

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-1779

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; 62: 1044-1051

van der Put NM, Griend R., Haas FJ, Biesma DH, Duran M, Meuwissen OJ, Banga JD. Combination of low-dose folic acid and pyridoxine for treatment of hyperhomocysteinaemia in patients with premature arterial disease and their relatives. *Atherosclerosis* 1999; 143: 177-183

van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 1997; 90: 511-517

van Walraven C, Hart RG, Singer DE, Koudstaal PJ, Connolly S. Oral anticoagulants vs. aspirin for stroke prevention in patients with non-valvular atrial fibrillation: the verdict is in. *Card Electrophysiol Rev* 2003; 7: 374-378

Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen AL, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 962-968

Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 1998; 158: 862-867

Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-121

Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, Lee ME. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 1997; 272: 25380-25385

Wannamethee G, Shaper AG. Physical activity and stroke in British middle aged men. *BMJ* 1992; 304: 597-601

Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis ER, Eckfeldt JH, Rozen R. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001; 156: 409-415

Wilcken DE, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-1082

Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991; 22: 983-988

Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke* 1991; 22: 312-318

Wolf PA, D'Agostino RB, Kannel WB, Bonita R, Belanger AJ. Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. *JAMA* 1988; 259: 1025-1029

Yang F, Tan HM, Wang H. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Sheng Li Xue Bao* 2005; 57: 103-114

Zhang G, Dai C. [Correlation analysis between plasma homocysteine level and polymorphism of homocysteine metabolism related enzymes in ischemic cerebrovascular or cardiovascular diseases]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2002; 23: 126-129

Zhang LF, Zhao LC, Zhou BF, Yang J, Li Y, Wu YF. [Alcohol consumption and incidence of ischemic stroke in male Chinese.]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2004; 25: 954-957

Zhang Y, Zhang M, Niu T, Xu X, Zhu G, Huo Y, Chen C, Wang X, Xing H, Peng S, Huang A, Hong X, Xu X. D919G polymorphism of methionine synthase gene is associated with blood pressure response to benazepril in Chinese hypertensive patients. *J Hum Genet* 2004; 49: 296-301

Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, Marcon F, Rossi S, Caiola S, Verdina A, Galati R, Cafolla A, Crebelli R. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1097-1103

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Homocysteinestoffwechsel	13
Abbildung 2: Methioninsynthese im Homocysteinestoffwechsel	14
Abbildung 3: Methyltetrahydrofolatreduktase im Homocysteinestoffwechsel	16
Abbildung 4: Cystathionin- $\beta$ - Synthase im Homocysteinestoffwechsel	17
Abbildung 5: Schnittstelle des Restriktionsenzym Hae III	38
Abbildung 6: Analyse des Polymorphismus MS auf einem Agarosegel	39
Abbildung 7: Schnittstelle des Restriktionsenzym Hinf I	41
Abbildung 8: Analyse des Polymorphismus MTHFR 677 auf einem Agarosegel	42
Abbildung 9: Kaplan- Meier- Überlebenskurve	44
Abbildung 10: Schnittstelle des Restriktionsenzym Mbo II	46
Abbildung 11: Analyse des Polymorphismus MTHFR 1298 auf einem Agarosegel	47
Abbildung 12: Schnittstelle des Restriktionsenzym Bsr I bei CBS 833	49
Abbildung 13: Schnittstelle des Restriktionsenzym Bsr I bei CBS 844	50
Abbildung 14: Analyse des Polymorphismus CBS auf einem Agarosegel	50

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
as	antisense
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
CBS	Cystathion- $\beta$ - Synthase
CYS	Cystathionin
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy- Nukleosidtriphosphat
dATP	desoxy- Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy- Cytosintriphosphat
dGTP	desoxy- Guanintriphosphat
dTTP	desoxy- Thymintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
gDNA	genomische DNA
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Aqua bidestillata
H <sub>2</sub> O <sub>ad i.</sub>	Aqua ad injectabilia
HHcy	Hyperhomocysteinämie
Hcy	Homocystein
kb	kilobasenpaare
LDL	low density lipoprotein
min	Minute
ml	Milliliter
5- MTHF	5- Methyltetrahydrofolat
MTHFR	5, 10- Methylentetrahydrofolat- Reduktase
MS	Methioninsynthase
MSR	Methioninsynthasereduktase
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
OD <sub>260</sub>	optische Dichte bei 260 nm



OD <sub>280</sub>	optische Dichte bei 280 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PD	Privatdozent
Prof	Professor
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	sense
SAH	S- Adenosylhomocystein
SAM	S- Adenosylmethionin
sec	Sekunde
SDS	20% (w/v), sodium dodecyl sulfat entspricht Laurylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
THF	Tetrahydrofolat
TOAST	Trial of Org 10172 in acute stroke treatment
Tris	Tris (-hydroxymethyl) – aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: tabellarische Darstellung des Patientenkollektivs	27
Tabelle 2: Standard- PCR- Ansatz	32
Tabelle 3: PCR- Protokoll	32
Tabelle 4: PCR- Protokoll der einzelnen Polymorphismen	33
Tabelle 5: Primer der einzelnen Polymorphismen	33
Tabelle 6: Restriktionsmix	34
Tabelle 7: Bedingungen für die Mutationsanalysen	35
Tabelle 8: Ergebnis der Untersuchung des Polymorphismus Methioninsynthase	40
Tabelle 9: Ergebnis der Untersuchung des Polymorphismus MTHFR 677	43
Tabelle 10: PCR- Ansatz MTHFR 1298	45
Tabelle 11: PCR- Protokoll MTHFR 1298	46
Tabelle 12: Ergebnis der Untersuchung des Polymorphismus MTHFR 1298	48
Tabelle 13: Ergebnis der Untersuchung des Polymorphismus CBS	51

## 8.4 Veröffentlichung

Linnebank M, Montenarh M, Kölsch H, Linnebank A, Schnez K, Schweichel D, Pohl C, Urbach H, Heun R, Harbrecht U, Klockgether T, Wüllner U.

Common genetic variants of homocysteine metabolism in ischemic stroke: A case-control study. Eur. J. Neurology 2005; 12 (8): 614- 618

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Wüllner für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und die Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ich danke Herrn Dr. M. Linnebank für seine Einführung in die Arbeitstechniken und für seine Betreuung während der Arbeit im Labor der Neurobiologie.

Ganz herzlich möchte ich Herrn PD Dr. Stefan Gräber für die Hilfe bei der Statistik danken.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein Dank gilt vor allem Frau Sabine Proske-Schmitz.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern.