

Homocysteintoxizität:
Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Kupferdepletion
in PC12-Zellen, Neuroblastomzellen und primären zerebellären Neuronen

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

Holger Heinz Lutz
aus Mannheim
2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.10.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Klockgether

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis.....	8
1 EINLEITUNG	11
1.1 Der Homocysteinestoffwechsel.....	11
1.1.1 Transmethylierung.....	14
1.1.2 Transsulfurierung.....	14
1.1.3 Verhältnis der Stoffwechselwege	14
1.1.4 Glutathion (GSH) und Glutathionverstoffwechlung	15
1.1.5 Homocysteinderivate und Transportmechanismen	16
1.2 Pathologie des Homocysteinestoffwechsels	17
1.2.1 Allgemeines	17
1.2.2 Enzymdefekte	17
1.2.3 Folat-, Vitamin B ₆ - und Vitamin B ₁₂ -Defizienz	19
1.2.4 Hyperhomocysteinämie bei Niereninsuffizienz	19
1.2.5 Differentialdiagnostik der Hyperhomocysteinämie	19
1.3 Pathophysiologische Mechanismen bei Hyperhomocysteinämie.....	20
1.3.1 Neurodegeneration und andere Erkrankungen des zentralen Nervensystems.....	21
1.3.2 Vaskuläre Störungen.....	23
1.3.3 Störungen des Knochenstoffwechsels.....	24
1.3.4 Pigmentierungsstörungen.....	24
1.3.5 Iatrogene Hyperhomocysteinämie	25
1.4 Grundlagen des Kupferstoffwechsels	25
1.5 Pathologie des Kupferstoffwechsels	26
1.5.1 Morbus Menkes	26
1.5.2 Familiäre amyotrophe Lateralsklerose (FALS)	27
1.5.3 Morbus Wilson	27
1.5.4 Alzheimersche Demenz und Prionen-assoziierte Enzephalopathie	28
1.6 Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS).....	28
1.6.1 Pathophysiologie des mitochondrialen oxidativen Stresses.....	30
1.6.2 Klinische Bedeutung oxidativen Stresses	31
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	32
2 MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 Zellkultur	33
2.1.1 Allgemeines	33
2.1.2 Kulturflaschen.....	33
2.1.3 Mediumwechsel.....	33
2.1.4 Passagierung und Zellzählung	33
2.2 Kollagenbeschichtung von Zellkulturschalen	35
2.3 Zellkonservierung.....	35
2.3.1 Einfrieren von Zellen (PC12 und SH-SY5Y)	35
2.3.2 Auftauen von Zellen (PC12 und SH-SY5Y).....	36
2.4 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	36
2.4.1 Allgemeines	36

2.4.2 Messung.....	37
2.5 Messung der Zellvitalität mittels alamarBlue™.....	37
2.6 Poly-L-Lysin-Beschichtung (Objekträgersysteme, 6- bzw. 24-well-Platten).....	38
2.7 Primärkulturen aus Rattenzerebellum (cerebellar granule neurons, CGN).....	39
2.7.1 Allgemeines.....	39
2.7.2 Zellisolierung.....	39
2.7.3 Zellkultivierung.....	39
2.7.4 Konditioniertes Medium bei CGN.....	40
2.8 Phäochromozytomzellen der Ratte PC12.....	41
2.8.1 Allgemeines.....	41
2.8.2 Zellkultivierung.....	41
2.9 Humane Neuroblastomzellen SH-SY5Y.....	41
2.9.1 Allgemeines.....	41
2.9.2 Zellkultivierung.....	42
2.9.3 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen.....	42
2.10 Sterilfiltration.....	42
2.11 Koinkubation von Hcy und Kupfer.....	42
2.12 Präinkubation mit Kupfer.....	42
2.13 Inkubationen mit Homocystein.....	43
2.14 TUNEL-Assay.....	43
2.14.1 Lösungen.....	44
2.14.2 Zellvorbereitung.....	44
2.14.3 TUNEL-Färbung.....	44
2.14.4 Dokumentation.....	45
2.15 Messung der Atmungskettenaktivität (COX).....	45
2.15.1 Vorbereitung der Zellpellets.....	45
2.15.2 Messmethode.....	46
2.16 Substanzen.....	46
2.17 Statistische Auswertung.....	46
3 ERGEBNISSE.....	48
3.1 Allgemeines.....	48
3.2 Toxizität und Apoptoseinduktion durch Homocystein in PC12-Zellen.....	48
3.2.1 Hcy-Toxizität in PC12-Zellen.....	48
3.2.2 TUNEL-Assay zur Apoptosedetektion.....	51
3.3 Vitalität und ROS-Entstehung durch Hcy über 24 Stunden in PC12-Zellen.....	52
3.3.1 5 µM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen.....	52
3.3.2 50 µM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen.....	53
3.3.3 500 µM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen.....	53
3.3.4 1 mM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen.....	54
3.3.5 10 mM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen.....	55
3.4 ROS in Abhängigkeit verschiedener Hcy-Konzentrationen in PC12-Zellen.....	57

3.5 Untersuchungen zur Kupferpräinkubation und Homocysteintoxizität in zerebellären Körnerneuronen der Ratte.....	58
3.5.1 Zelltoxizität durch Homocystein.....	58
3.5.2 Zelltoxizität durch Kupfer	58
3.5.3 Toxizitätspotenzierung von Kupfer und Homocystein bei Koinkubation.....	59
3.5.4 Präinkubation mit Kupfer in verschiedenen Konzentrationen	59
3.1 Untersuchungen zur Kupferpräinkubation und Homocysteintoxizität in undifferenzierten humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y).....	61
3.1.1 Zelltoxizität durch Kupfer	61
3.1.2 Zelltoxizität durch Homocystein.....	62
3.1.3 Präinkubation mit Kupfer	62
3.2 Untersuchungen zur Kupferpräinkubation und Homocysteintoxizität in RA-differenzierten humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y).....	63
3.2.1 Präinkubation mit Kupfer verschiedener Konzentrationen.....	63
4 DISKUSSION	65
4.1 Apoptoseinduktion durch Homocystein	65
4.2 Apoptose und mitochondriale Dysfunktion.....	65
4.3 Die sekundäre Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	66
4.4 Homocysteintoxizität in kardiovaskulären Geweben	68
4.5 Chelatierung von Kupfer und COX-Defizienz durch Homocystein.....	68
4.6 Homocystein und neurodegenerative Erkrankungen.....	70
4.6.1 Morbus Alzheimer	70
4.6.2 Morbus Parkinson.....	71
4.7 Aussicht	72
5 ZUSAMMENFASSUNG	74
6 ANHANG	75
7 LITERATURVERZEICHNIS	79
8 DANKSAGUNG.....	94

Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis

Sämtliche Abkürzungen sind im Fließtext bei der ersten Nennung erklärt.

A β	β -Amyloid
AD	Adenosindeaminase (EC 3.5.4.4)
AdoHcy	S-Adenosyl-Homocystein (SAH)
AdoMet	S-Adenosyl-Methionin (SAM)
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AK	Adenosinkinase (EC 2.7.1.20)
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
<i>Aqua bidest</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B ₆ -non-responder	nicht-Vitamin-B ₆ -sensitiver CBSD-Patient
B ₆ -responder	Vitamin-B ₆ -sensitiver CBSD-Patient
BAD	Betain-Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.8)
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase (EC 2.1.1.5)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Cbl	Cobalamin
CBS	Cystathionin- β -Synthase (EC 4.2.1.22)
CBSD	CBS-Defizienz
CCS	<i>copper chaperone for SOD</i>
CD	Cholin-Dehydrogenase (EC 1.1.99.1)
CGL	Cystathionin- γ -Lyase (EC 4.4.1.1)
CGN	<i>cerebellar granule neurons</i> , zerebelläre Körnerneurone
5-CH ₃ -FH ₄	5-Methyltetrahydrofolsäure
5,10-CH ₂ -FH ₄	5,10-Methylentetrahydrofolsäure
CM-DCF	5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein
CM-H ₂ DCF-DA	5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat
CM-H ₂ DCFH	5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-Dichlorohydrofluorescein
COX	Cytochrom <i>c</i> -Oxidase (EC 1.9.3.1)
CuBD	Kupfer-bindende Domäne des PrP
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1), SOD1
Cys	Cystein
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Dipeptidase
dUTP	2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphat
EA	Etacrynsäure (<i>etacrynic acid</i>)
FADH	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)
FMNH	reduziertes Flavin-Mononukleotid (FMN)
FALS	Familiäre amyotrophe Lateralsklerose
γ -Glu-Cys	γ -Glutamylcystein
γ -GT	γ -Glutamyltransferase (γ -Glutamyl-Transpeptidase) (EC 2.3.2.2)
GCS	γ -Glutamylcysteinsynthetase (EC 6.3.2.2)
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GNMT	Glycin-N-Methyltransferase (EC 2.1.1.20)
GPx	Glutathionperoxidase (EC 1.11.1.9)
GS	Glutathionsynthetase (EC 6.3.2.3)
GSH	Glutathion
HAEC	<i>human aortic endothelial cells</i>
HASMC	<i>human aortic smooth muscle cells</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
Hcy	Homocystein
HEPM	<i>human embryonic palatal mesenchyme</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
K_i	Dissoziationskonstante
LD ₅₀	Letale Dosis, in der für den Behandlungszeitraum 50% der beobachteten Zellen absterben
MAT	Methionin-Adenosyltransferase (EC 2.5.1.6)
MMP-2	Matrixmetalloprotease 2
Mn-SOD	Mangan-Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1)
MNK	Morbus-Menkes-Gen, P-Typ-ATPase
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MS	Methioninsynthase (EC 2.1.1.13)
MSR	Methioninsynthase-Reduktase (EC 1.16.1.8)
MT	Methyltransferasen
MTX	Methotrexat
MTHFR	Methylenetetrahydrofolatreduktase (EC 1.5.1.20)
MW	Mediumwechsel

n.s.	nicht signifikant
NADH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)
NADPH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)
NBT/BCIP	Nitroblautetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid (<i>nitric oxide</i>)
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC12	Phäochromozytomzellen
PD	Parkinsonsche Erkrankung
pen/strep	Penicillin/Streptomycin (P/S)
PLP	Pyridoxalphosphat (Vitamin B ₆)
PrP	<i>prion-binding protein</i>
RA	Retinolsäure
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAH	S-Adenosyl-Homocystein (AdoHcy)
SAHH	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase (EC 3.3.1.1)
SAM	S-Adenosyl-Methionin (AdoMet)
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen
SOD1	Cu/Zn-SOD, Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1)
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
tHcy	totales Homocystein im Plasma
TdT	Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TF	<i>tissue factor</i> , Thromboplastin
THMT	Dimethylthetin-Homocystein-Methyltransferase (EC 2.1.1.3)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>(TdT)-mediated dUTP-nick end labeling</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Homocysteinstoffwechsel

Homocystein (Hcy) wurde 1932 im Rahmen von Studien zu organischen Schwefelverbindungen erstmals beschrieben (Butz und Vigneaud, 1932). 1962 wurde von Carson und Neill eine Homocystinurie bei mental retardierten Zwillingen nachgewiesen (Carson und Neill, 1962). Zwei Jahre später konnte eine Defizienz der Cystathionin- β -Synthase (CBS) als Ursache einer Homocystinurie gefunden (Mudd et al., 1964), sowie 7 Jahre später erstmals eine Assoziation zwischen Hyperhomocysteinämie und Arteriosklerose gezeigt werden (McCully, 1969). Zunehmend rücken in den letzten Jahren Störungen des Homocysteinstoffwechsels auch ins Blickfeld neurologischer Krankheitsbilder, wie z.B. die Alzheimersche Demenz und Morbus Parkinson (PD) (Seshadri et al., 2002). Diese Arbeit soll zur Klärung der grundlegenden toxischen Mechanismen von Homocystein beitragen.

Homocystein ist eine schwefel(sulfhydryl-)haltige, nichtproteinogene Aminosäure, welche im Methioninstoffwechsel an einem wichtigen Kreuzungspunkt verschiedener Stoffwechselwege liegt (siehe Abbildung 1). Zunächst soll auf die hierbei wichtigsten grundlegenden biochemischen Mechanismen eingegangen werden. Methionin dient in Form des S-Adenosyl-Methionins (SAM, AdoMet) als wichtiger Methylgruppendonor, sowie durch den nach Decarboxylierung entstehenden Propylaminrest als Vorstufe verschiedener Polyamine zur Stabilisierung der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Struktur, wie z.B. Spermidin und Spermin (Tabor et al., 1958) (siehe Abbildung 2). SAM entsteht aus Methionin durch die irreversible Übertragung eines Adenosylrestes von Adenosintriphosphat (ATP) auf Methionin. Hierbei entsteht eine energiereiche Bindung (Mudd, 1979). Das SAM-synthetisierende Enzym L-Methionin-S-Adenosyltransferase (MAT) existiert in verschiedenen Isoformen, welche sich hinsichtlich ihrer Verteilung in humanen Geweben und ihrer Kinetik unterscheiden: MAT I und MAT III (MAT1A-Gen) wird ausschließlich in nichtfetaler Leber exprimiert, wogegen MAT II (MAT2A-Gen) nur in geringen Mengen in der Leber, jedoch in verschiedensten anderen Geweben vorkommt (Kotb et al., 1997). Der größte Anteil von SAM wird zur Kreatin-Kreatinin-Synthese verwendet (siehe Abbildung 2). Darüber hinaus sind Phospholipide, DNA, Ribonukleinsäure (RNA) und Katecholamine Ziele der aktiven Methylgruppen. Das bei diesen Transmethylierungsreaktionen entstehende S-Adenosyl-Homocystein (SAH, AdoHcy) ist selbst ein starker Inhibitor der Methyltransferasen (Cantoni et al., 1979) und übt so eine antagonistische Feedbackhemmung aus (Chiang et al., 1977).

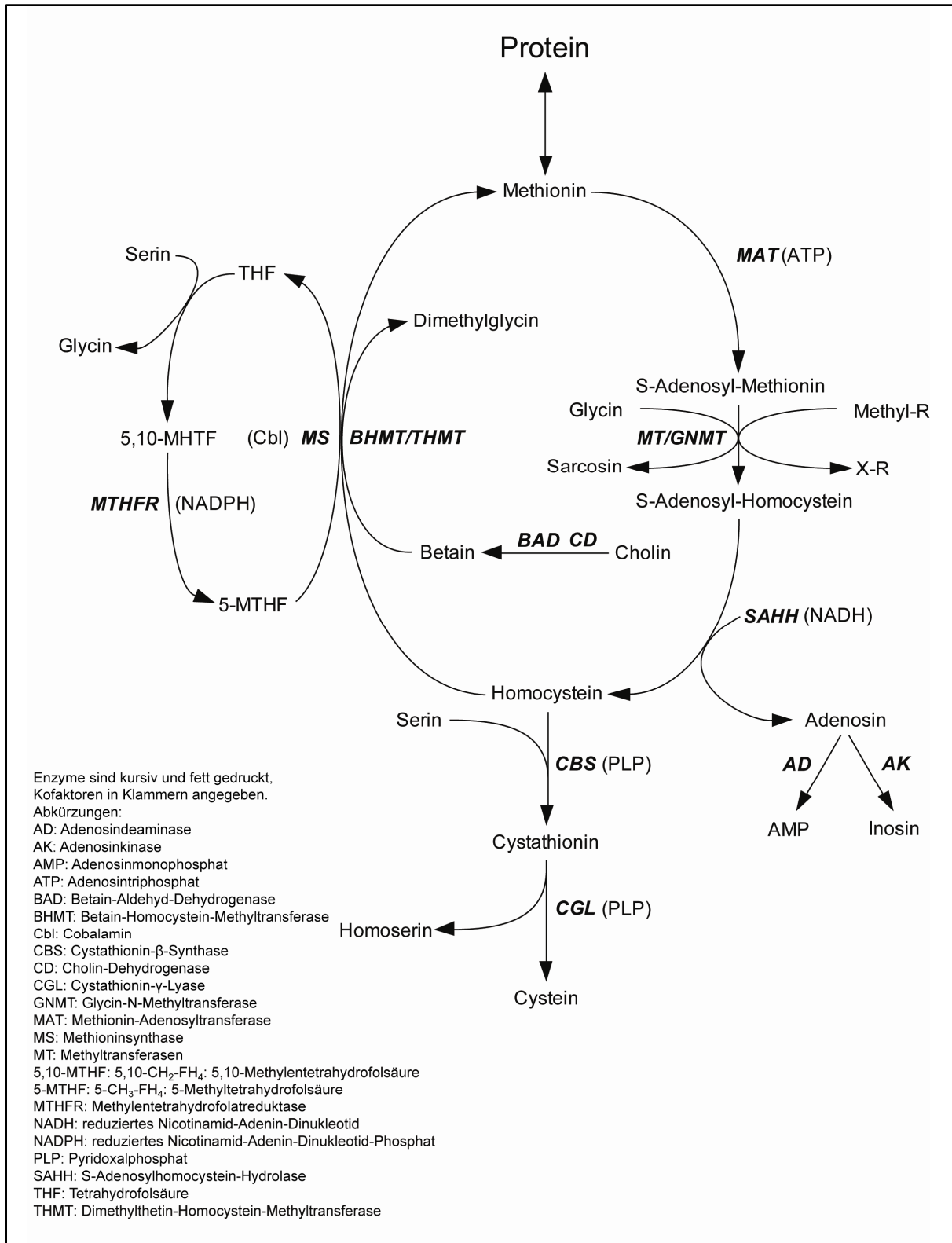


Abbildung 1: Grundlagen des Methionin-Homocysteinestoffwechsels. Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die typischen Stoffwechselwege, genaue Angaben finden sich im Text.

Die Aktivität der Methyltransferasen hängt damit von der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) für AdoMet, der Dissoziationskonstante (K_i) für AdoHcy und den jeweiligen Konzentrationen der beiden Stoffe ab (Clarke und Banfield, 2001).

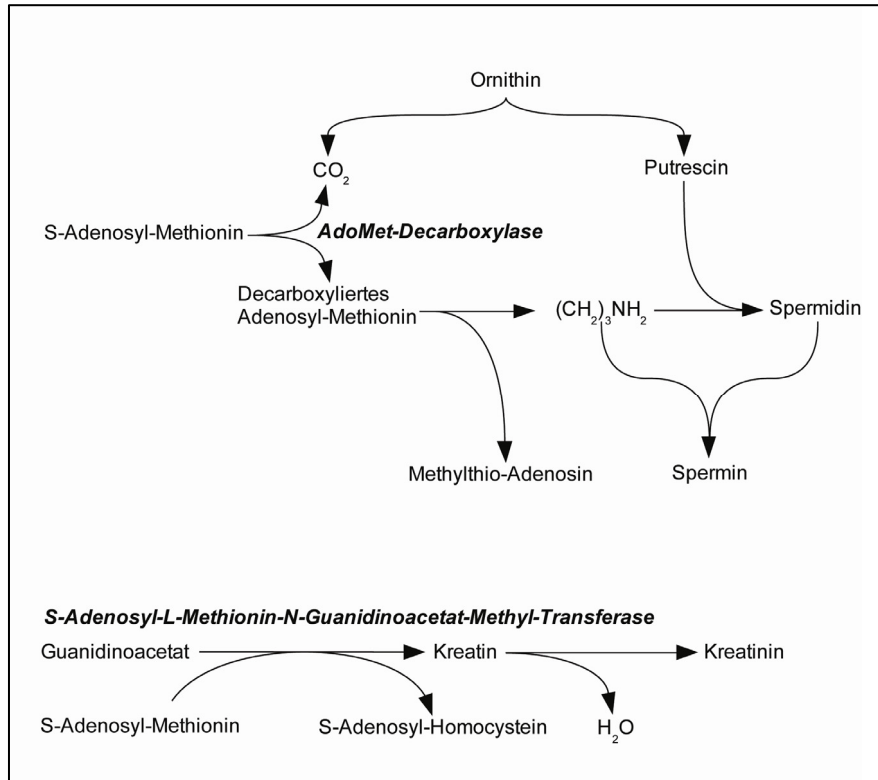


Abbildung 2: SAM wird größtenteils für die Synthese von Kreatin und Spermin / Spermidin verwendet.

Durch Hydrolysierung des SAH (Thioetherspaltung) durch die S-Adenosyl-Homocysteinhydrolase (SAHH) entstehen Homocystein und Adenosin. Die Reaktion ist reversibel, die Richtung der enzymatischen Reaktion ist aufgrund der raschen Entfernung der entstehenden Substrate zur Seite des Homocysteins verschoben (Mudd et al., 2001), so dass Hcy und SAH permanent aus der Reaktion entfernt werden. Homocystein kann nun auf verschiedene Weise verstoffwechselt werden: Zum einen erfolgt die Remethylierung zu Methionin, zum anderen kann ein Abbau zu Cystein, welches als Proteinbaustein oder zur Glutathionsynthese weiterverwendet wird, erfolgen. Störungen an den verschiedenen Stationen dieser Stoffwechselwege können zu Veränderungen des Homocysteinspiegels und toxischen Effekten führen. Zum Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen soll auf die beiden letztgenannten Möglichkeiten nun genauer eingegangen werden.

1.1.1 Transmethylierung

Betain (Trimethylglycin) kann über die Enzyme Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) und Dimethylthetin-Homocystein-Transferase (THMT) als Methylgruppendonor zum „Recycling“ von Homocystein zu Methionin dienen (siehe Abbildung 1). Das genaue Verhältnis der Exprimierung beider Enzyme zueinander ist unbekannt. Die THMT wird primär hepatisch exprimiert (Finkelstein, 1998; Klee et al., 1961). Darüberhinaus kann Methyltetrahydrofolat als Methylgruppendonor zur Remethylierung von Homocystein verwendet werden. Die hierzu notwendige Methioninsynthase (MS) benötigt Cobalamin (Cbl) als essentiellen Kofaktor. Etwa die Hälfte des im Metabolismus anfallenden Homocysteins wird renal ausgeschieden, jeweils etwa ein Viertel wird remethyliert bzw. transsulfuriert (Finkelstein, 1990; Taylor und Weissbach, 1973).

1.1.2 Transsulfurierung

Bei der Transsulfurierung wird Homocystein zu Cystein abgebaut (Mudd und Poole, 1975; Storch et al., 1990; Storch et al., 1991; Young et al., 1998). Zunächst wird über die CBS in einer irreversiblen Kondensationsreaktion mit Serin Cystathionin gebildet (siehe Abbildung 1). Pyridoxalphosphat (PLP; Vitamin B₆) bindet hierbei an das Häm der CBS. Die enzymatische Aktivität ist vollständig abhängig von PLP als Cofaktor (Kery et al., 1998; Kraus et al., 1978). Ein Vitamin B₆-Mangel kann daher zu einer Hyperhomocysteinämie mit entsprechender klinischer Symptomatik führen. Die Spaltung von Cystathionin zu Cystein und Homoserin wird durch die ebenfalls Vitamin B₆-abhängige Cystathionin- γ -Lyase (CGL) vermittelt. Sowohl fetale Gewebe wie auch die Plazenta besitzen keine CGL-Aktivität; Cystein ist deshalb in dieser Entwicklungsphase eine essentielle Aminosäure (Sturman et al., 1970; Vina et al., 1995). Darüberhinaus wird es zur Glutathionsynthese verwendet (siehe 1.1.4).

1.1.3 Verhältnis der Stoffwechselwege

Die Affinität von Homocystein zur CBS ist niedriger als zur MS, es bestehen jedoch größere kapazitive Reserven. SAM hemmt die Methyltetrahydrofolatreduktase (MTHFR) und BHMT und aktiviert die CBS. Dies verhindert die Akkumulation von Hcy (Finkelstein und Martin, 1984; Mudd et al., 1980). Es gibt wesentliche Unterschiede in der Aktivität der beiden Stoffwechselwege in den verschiedenen Geweben: In kardiovaskulären Geweben ist weder CBS noch BHMT exprimiert, so dass dort nur die Remethylierung von Hcy mittels MS möglich ist (Chen et al., 1999). Dies führt zu einer Vulnerabilität gegenüber hohen Hcy-Konzentrationen.

1.1.4 Glutathion (GSH) und Glutathionverstoffwechslung

Homocystein nimmt als Cysteindonor Einfluss auf die Synthese des wichtigsten zellulären Antioxidanz Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinylglycin, GSH). GSH wird aus dem syntheseslimitierenden Cystein, Glutamat und Glycin durch die beiden zytosolischen Enzyme γ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS) und Glutathionsynthetase (GS) synthetisiert (siehe Abbildung 3) (Meister, 1995).

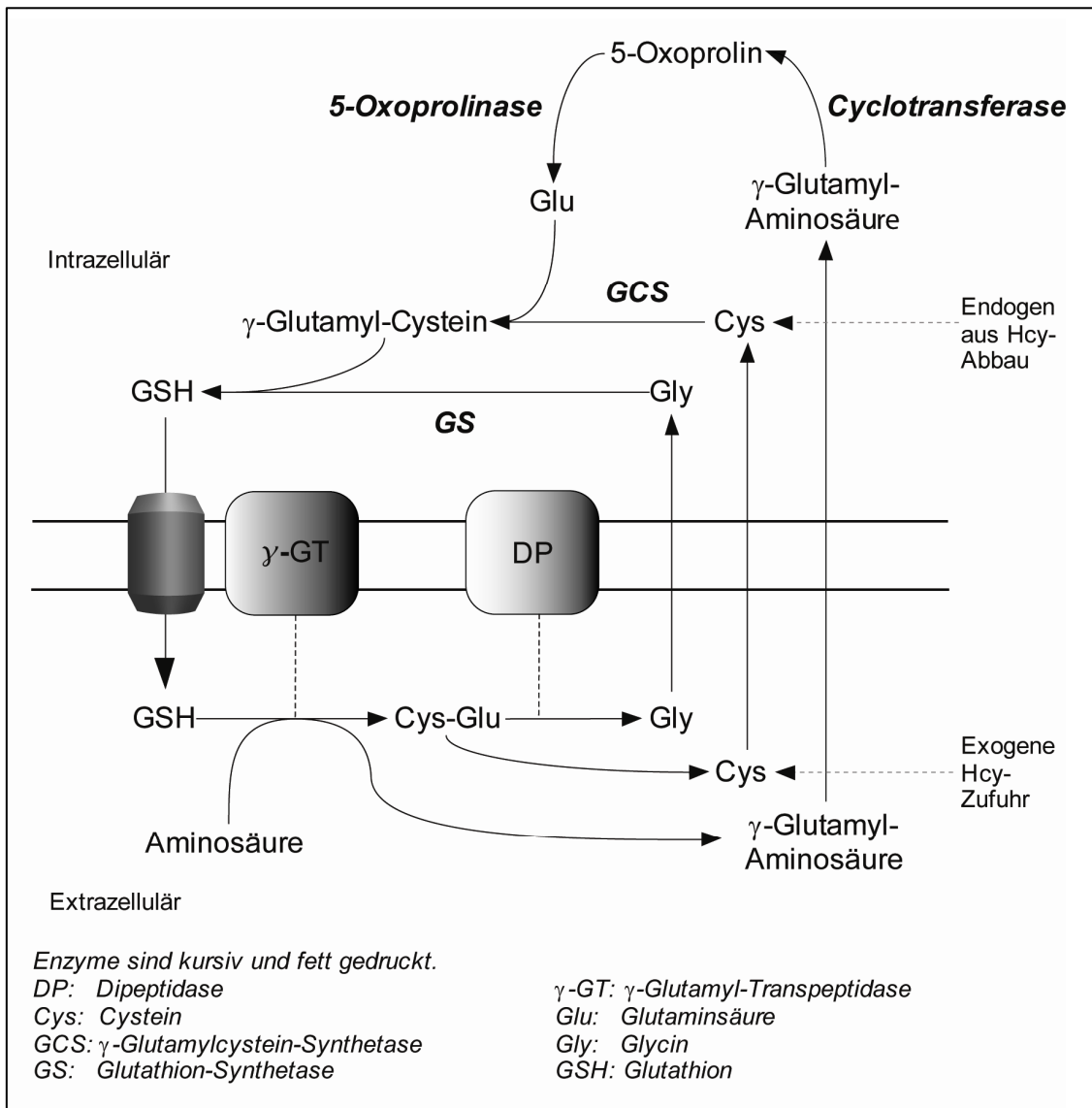


Abbildung 3: Glutathion und Glutathionverstoffwechslung: Homocystein hat sowohl extrazellulär wie intrazellulär als Cysteindonor Einfluß auf das verfügbare Antioxidanz GSH

Der erste Schritt im Rahmen der Glutathion-Biosynthese über die GCS ist geschwindigkeitsbestimmend; die GS scheint keine regulatorische Rolle zu spielen (Lu, 1999). Somit besteht eine direkte Verbindung des aus dem Homocystein entstehenden Cystein und dem

wichtigsten zellulären Antioxidanz Glutathion. In der Substantia nigra von Parkinsonpatienten wurde eine Verminderung des zellulären Glutathions nachgewiesen (Sian et al., 1994) – auf einen möglichen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen zellulärer Glutathion- und Homocysteinkonzentration soll im Späteren weiter eingegangen werden.

1.1.5 Homocysteinderivate und Transportmechanismen

Ca. 50% Hcy werden ausgeschieden, der Rest wird verstoffwechselt. Ein gegenseitiger quantitativer Ausgleich ist nur unvollständig möglich (Refsum et al., 1998a). Im Blutplasma findet sich Hcy nicht nur in Form des reinen Thioalkohols, sondern bildet auch verschiedene Derivate, primär über Disulfidbrückenbindung, aus (siehe Abbildung 4) (Mudd et al., 2000; Mudd et al., 2001).

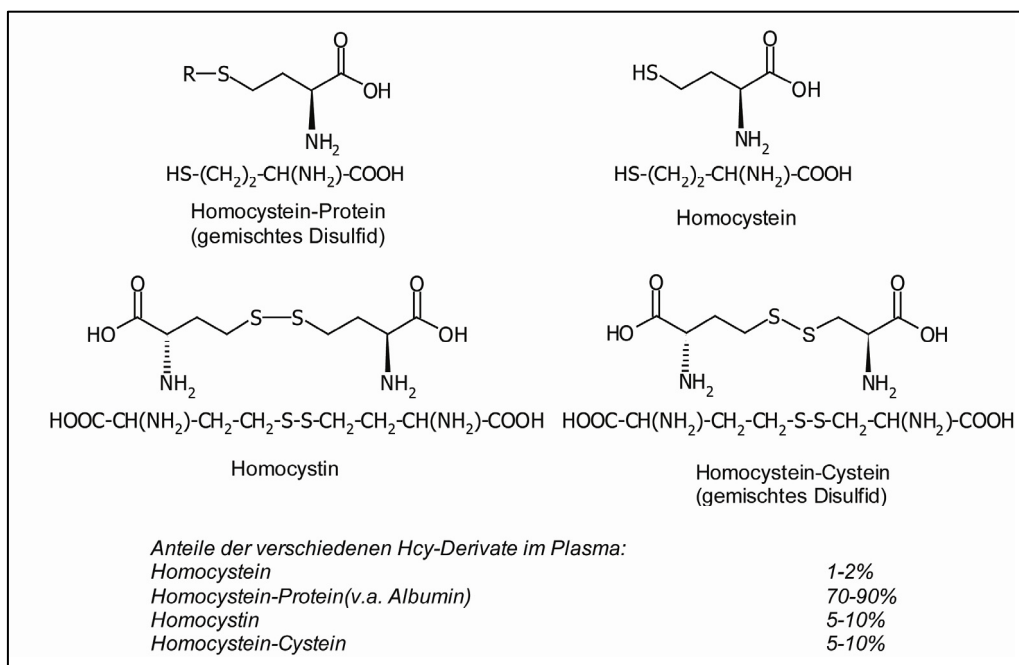


Abbildung 4: Anteile und chemische Struktur der verschiedenen Derivate von Hcy im Plasma

Die Umwandlung von Hcy in seine Derivate geschieht zu 80% über eine nicht-oxidative, thiolgruppengebundene Reaktion durch Albumin. Nur 20% wird über eine autooxidative Reaktion vermittelt (Sengupta et al., 2001). Der transmembranäre Transport von Homocystein ist nicht genau geklärt, es ist jedoch vom Vorhandensein entsprechender Cyst(e)intransporter auszugehen (Hultberg, 2005). Neurone scheinen aufgrund spezifischer Transportmechanismen für Homocystein und seine Derivate besonders vulnerabel zu sein. Sie werden aus dem synaptischen Spalt gemeinsam mit anderen exzitatorisch wirkenden Aminosäuren (z.B. Glutamat) entfernt (Grieve et al., 1992).

1.2 Pathologie des Homocysteinstoffwechsels

1.2.1 Allgemeines

Störungen im Homocysteinstoffwechsel verursachen im Allgemeinen erhöhte Blutplasmaspiegel. Verschiedene Enzymdefekte führen neben der alleinigen Hyperhomocysteinämie zu charakteristischen Symptomen bzw. Syndromen. Individuelle Unterschiede, wie z.B. die unterschiedliche Methionin- oder Vitaminaufnahme (Kofaktoren des Homocysteinstoffwechsels) beeinflussen die Hcy-Konzentration im Plasma. Hyperhomocysteinämien werden anhand der Nüchternplasmaspiegel folgendermaßen eingeteilt (Stanger et al., 2003):

Tabelle 1: Einteilung der Hyperhomocysteinämien nach Blutplasmaspiegel (μM)

Stadium	Blutplasmaspiegel
Normal	<10 μM
Tolerabel (bei Gesunden)	10-12 μM
Moderat	12-30 μM
Intermediär	30-100 μM
Schwer	>100 μM

1.2.2 Enzymdefekte

Im Folgenden werden die wichtigsten im Methionin-/Homocysteinstoffwechsel bekannten Enzymdefekte kurz dargestellt und erläutert.

1.2.2.1 Methioninadenosyltransferase (MAT)

Inaktivierende Mutationen der MAT (vornehmlich MAT1A) führen zur Akkumulation von Methionin und zur verringerten AdoMet-Synthese. Mutationen der MAT können weiterhin nicht nur zu isolierten Hypermethioninämien, sondern auch zu Hyperhomocysteinämien führen und müssen differentialdiagnostisch bei erhöhten Hcy-Spiegeln berücksichtigt werden (Linnebank et al., 2005; Stabler et al., 2002). Heterozygote Mutationen führen zumeist nicht zu einer klinischen Symptomatik, Homozygotie oder Compound-Heterozygotie kann jedoch schon im Kindesalter zu einer ausgeprägten Hypomyelinisierung führen (Mudd et al., 2001).

1.2.2.2 Cystathionin- β -Synthase (CBS)

Die Defizienz der CBS (CBSD) ist eine Ursache der klassischen Homocystinurie. Es kommt zu einer Akkumulation von Homocystein (siehe Abbildung 1), zu einer vermehrten Ausscheidung von Homocystein und seinen Derivaten im Urin (Homocystinurie, siehe Abbildung 4), sowie zu

typischer klinischer Symptomatik mit Linsen(sub)luxation, Hypopigmentierung von Haut und hellem Haar, einem marfanoiden Habitus, Osteoporose, sowie häufigen thromboembolischen Ereignissen und psychomotorischer Retardierung (Mudd et al., 1964). CBSD ist der häufigste angeborene Defekt des Methionin/Homocystein-Metabolismus. Genetische Studien zeigen eine Inzidenz in Dänemark und Deutschland von 1:20.000 (Gaustadnes et al., 1999; Linnebank et al., 2001). Erhöhte Plasma-Hcy-Spiegel sind typisch für CBS-defiziente Kinder, bei denen der Plasmaspiegel auf bis zu 500 µmol/l ansteigen kann. Mehr als 50% der bei der CBSD relevanten Allele sind homozygot für I278T und G307S, I278T betrifft hierbei typischerweise die europäischen Populationen (Mudd et al., 2001). Auch isolierte Thrombosen können ein Hinweis auf eine CBSD sein (Linnebank et al., 2003). Dies konnte auch für seltenere CBS-Mutationen des C-terminalen Endes nachgewiesen werden (P422L, I435T und S466L) (Maclean et al., 2002). Generell zu differenzieren ist die CBSD bezüglich des therapeutischen Ansprechens auf eine Vitamin B₆-Substitution (sog. B₆-responder bzw. -non-responder). Die I278T-Mutation ist assoziiert mit einer guten B₆-response, wie auch mit einer geringer ausgeprägten klinischen Symptomatik.

1.2.2.3 Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR)

Polymorphismen der MTHFR können bei Homozygotie oder Compound-Heterozygotie ebenfalls Ursache einer klassischen Homocystinurie sein. Folgende Polymorphismen, welche zu einer verminderten Enzymaktivität und Hyperhomocysteinämie führen, sind bekannt: c.677C>T (A222V) (sog. thermolabile Variante) und c.1298A>C (E429A). Die Häufigkeiten beider Varianten entsprechen 0,34 bzw. 0,31 in der deutschen Population. Verschiedene Studien zur kardiovaskulären und neurologischen Risikoevaluierung von hetero- und homozygoten Patienten wurden durchgeführt (Shields et al., 1999; Weisberg et al., 2001), zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse: Unter anderem konnte bei Homozygotie des c.1298A>C-Polymorphismus ein protektiver Effekt im Sinne eines späteren *age of onset* bei Patienten mit Morbus Parkinson und Alzheimer-Krankheit nachgewiesen werden (de Lau et al., 2005; Linnebank et al., 2004; Wüllner et al., 2005).

1.2.2.4 S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAHH)

2004 konnte erstmals eine SAH-Hydrolase-Defizienz dokumentiert werden (Baric et al., 2005). Neurologisch zeigten sich bei dem 8 Monate alten Jungen eine Atrophie der weißen Substanz und eine Hypomyelinisation. Der Hcy-Spiegel im Blut war hierbei nur leicht erhöht, es bestanden jedoch eine ausgeprägte Hypermethioninämie und stark erhöhte SAH- und SAM-Spiegel.

1.2.2.5 Methionin-Synthase (MS)

Mutationen der Methioninsynthase selbst, sowie auch der Methioninsynthase-Reduktase (MSR), können zu Symptomen wie Entwicklungsverzögerung, megaloblastäre Anämie, Hyperhomocysteinämie und Hypomethioninämie führen (Fowler, 1998).

1.2.2.6 Cystathionin- γ -Lyase (CGL)

Ein Mangel an Cystathionin- γ -Lyase ist selten. Hierbei kommt es zu einer ausgeprägten Cystathioninurie, Hypermethioninämie, schweren Hyperhomocysteinämie mit Entwicklung einer Homocystinurie und den typischen klinischen Symptomen sowie einem Cysteinmangel (Mudd et al., 2001).

1.2.3 Folat-, Vitamin B₆- und Vitamin B₁₂-Defizienz

Folsäure und Vitamin B₁₂ haben eine große Bedeutung in der Regulierung des tHcy (totales Hcy im Plasma) (Malinow et al., 1998; Thomson et al., 2000). Vor allem im höheren Alter sind Vitaminmangelsyndrome eine typische Ursache erhöhter Hcy-Spiegel (Jacobsen, 1998). Ein Anstieg des tHcy ist ein sensitiver Marker für einen Mangel an Folat oder Vitamin B₁₂ (Refsum et al., 2004). Hierbei kommt es zu einer verminderten Aktivität der Hcy-verstoffwechelnden Enzyme und zur Akkumulation von Hcy. Folsäure und tHcy verhalten sich umgekehrt proportional (Selhub et al., 1993), wobei eine Erhöhung von tHcy und Erniedrigung von Folat mit einer Verschlechterung der Gehirnfunktion im Alter verbunden ist (Nurk et al., 2005). Folsäuredefizienz führt im Mausmodell zu einer verstärkten Dysfunktion dopaminerger Neurone (Duan et al., 2002). Ein Mangel an Folsäure in APP-(Amyloid-Precursor-Protein-)Mutanten-Mäusen führt zu einer Sensitivierung gegenüber A β -(β -Amyloid-)induziertem oxidativen Stress (Kruman et al., 2002). Eine Störung im Hcy-Stoffwechsel durch einen Vitaminmangel kann somit mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sein.

1.2.4 Hyperhomocysteinämie bei Niereninsuffizienz

Beim chronischen Nierenversagen kommt es aufgrund einer verringerten renalen Clearance zu moderaten bis intermediären Hyperhomocysteinämien. Der erhöhte Hcy-Spiegel ist mit einer verstärkten Progredienz einer Arteriosklerose bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz assoziiert (Robinson et al., 1996).

1.2.5 Differentialdiagnostik der Hyperhomocysteinämie

Die Ursachen einer Hyperhomocysteinämie sind wie beschrieben vielfältig, wobei es unabhängig

von der jeweiligen Ursache zu mehr oder weniger ausgeprägten neurotoxischen Effekten und Klinik kommen kann. Bei typischer Symptomatik muss eine Fülle an differentialdiagnostischen Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. In der folgenden Tabelle sind wegweisende differentialdiagnostische Befundkonstellationen aufgeführt.

Tabelle 2: Laborchemische Differentialdiagnostik bzgl. der Genese einer Hyperhomocysteinämie

	Hyperhomocysteinämie	Homocystinurie	Methionin	Cystein	Megaloblastäre Anämie
CBS-Defizienz	ja	ja	erhöht	erniedrigt	nein
MTHFR-Defizienz	ja	ja	erniedrigt	normal	nein
MTHFR-Mutationen	ja	nein	normal	normal	nein
MS-Defizienz	ja	ja	erniedrigt	normal	ja
MAT-Defizienz	ja	nein	erhöht	normal	nein
CGL-Defizienz	ja	ja	erhöht	erniedrigt	nein
B₆-Folsäure-Mangel	ja	möglich	normal	normal	nein
B₁₂-Mangel	ja	möglich	normal oder erniedrigt	normal	möglich

1.3 Pathophysiologische Mechanismen bei Hyperhomocysteinämie

Verschiedene pathophysiologische Mechanismen durch erhöhte Hcy-Spiegel werden diskutiert. Es soll nun auf die wichtigsten eingegangen und ihr Zusammenhang mit den in dieser Arbeit untersuchten Effekten dargestellt werden. In der Literatur wird Hcy-vermittelte Neurotoxizität u.a. über die Entstehung von ROS (*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies) durch einen NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat-)Rezeptor vermittelten Ca²⁺-Influx erklärt. Es kommt zur Glutamatfreisetzung und Exzitotoxizität (Ho et al., 2002; Kruman et al., 2000). Weiterhin kommt es durch Hcy zu einer Schädigung der DNA (Kruman et al., 2000). Hcy potenziert ebenfalls die Aβ-Neurotoxizität (White et al., 2001). Eine Koinkubation von Hcy und Kupfer über 2 Tage steigerte die Entstehung von Hydrogenperoxid in primären Mausneuronen, und damit von ROS-induziertem Zelltod (White et al., 2001). Hcy sensibilisiert weiterhin humane dopaminerge Zellen gegenüber Komplex I-Inhibitoren.

Darüberhinaus wird ein 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin-(MPTP-)induzierter Verlust an Tyrosinhydroxylase durch Hcy-Belastung im Mausmodell verstärkt (Duan et al.,

2002). Diese Tyrosinhydroxylase ist ein kupferabhängiges Enzym. Ein potenzieller Effekt von Hcy auf die Kupfertoxizität mit konsekutiver Apoptoseinduktion konnte ebenfalls an HEPM (humanen embryonischen Gaumenmesenchym) gezeigt werden (Knott et al., 2003). Diese Verbindung der Homocysteintoxizität mit dem Kupferstoffwechsel soll im weiteren Verlauf genauer erläutert und auf für diese Arbeit wichtige Zusammenhänge eingegangen werden.

1.3.1 Neurodegeneration und andere Erkrankungen des zentralen Nervensystems

1.3.1.1 Alzheimersche Erkrankung, Demenz

Ein erhöhter Hcy-Spiegel korreliert mit einer Reduktion der kognitiven Fähigkeiten. CBS-defiziente Patienten zeigen im Allgemeinen eine ausgeprägte mentale Retardierung (IQ-Median: 64) (Mudd et al., 1985). Aber auch moderat erhöhte Hcy-Spiegel werden mit der Entstehung von kognitiver Defizienz im Alter und der Alzheimerschen Demenz in Zusammenhang gebracht (Kruman et al., 2002; Mudd et al., 2001). Im Rahmen des Morbus Alzheimer kommt es zum neuronalen Zelluntergang und zur Ausbildung der typischen Plaques und neurofibrillären Ablagerungen. Hierbei wird aus dem Amyloid-Precursor-Protein das β -Amyloid herausgeschnitten und an der zellulären Oberfläche präsentiert. Zusätzlich konnten bei verstärktem Auftreten von tau (Neurofibrillen) und β -Amyloid vermehrt COX-defiziente Neurone nachgewiesen werden (Cottrell et al., 2002) – die COX ist ein kupferabhängiges Enzym. A β bindet Cu^{2+} über Histidinreste und ändert seine Konformation (Syme et al., 2004). Hcy wiederum ist selbst in der Lage, Kupferkomplexe zu bilden. Entsprechend könnte es einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Homocystein und der COX-Defizienz bei Morbus Alzheimer geben. Auch unter oxidativem Stress kommt es zur vermehrten Aggregation von A β (Dyrks et al., 1992).

1.3.1.2 Parkinsonsche Erkrankung (PD)

Heafield et al. hatten 1990 erstmals gezeigt, dass Parkinson-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (vor Einleitung einer medikamentösen Therapie) niedrige Plasma-Sulfat- und hohe Plasma-Cystein-Spiegel aufweisen (Heafield et al., 1990). Allain et al. untersuchten 1995 Homocystein, Cystein und Sulfat bei L-DOPA-therapierten Patienten. Auffällig war hier eine Erhöhung des Plasmahomocysteinspiegels um 48% (Allain et al., 1995). Inwieweit dies ein medikamentenabhängiger Effekt ist, oder pathogenetisch für den Morbus Parkinson mitverantwortlich ist, ist nicht bekannt. Untersuchungen über die Abhängigkeit dopaminerger Neurone von Folsäurespiegeln im Mausmodell zeigten, dass ein Folsäuremangel zur

Sensitivierung gegenüber MPTP-induzierter Zellschädigung führt (Duan et al., 2002). Wie bereits erwähnt, zeigten sich in diesen Mäusen gleichfalls erhöhte Homocysteinkonzentrationen. Neuere Studien (Rasia et al., 2005) weisen vermehrt auf die gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismen der Parkinsonschen Erkrankung mit der Alzheimerschen Erkrankung sowie den Prionenerkrankungen hin (siehe auch 1.5). Bei PD kommt es zur Akkumulation von α -Synuclein, wobei die Geschwindigkeit der Akkumulation durch niedrige Dosen Cu^{2+} erhöht werden konnte. Die TT-Variante des C677T-Polymorphismus der Methylentetrahydrofolatreduktase ist für Raucher mit einem erhöhten Risiko an PD zu erkranken assoziiert (de Lau et al., 2005). Die CC-Variante des A1298C-Polymorphismus (welche mit einer erniedrigten Aktivität der MTHFR einhergeht), scheint eher einen protektiven Effekt zu haben und führt zu einem späteren *age of onset* (Wüllner et al., 2005). Es gibt eine Assoziation erhöhter Hcy-Spiegel mit L-DOPA-Therapie bei Patienten mit Parkinson-Krankheit (Kuhn et al., 1998; Muller et al., 1999). Mitochondrialer Dysfunktion wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson zugeschrieben (Schapira, 1999). Die These einer mitochondrialen Störung als Ursache für PD wird unterstützt durch die Erkenntnis, dass Rotenon (Inhibitor des Komplex I der Atmungskette) in einem Rattenmodell zur Ausbildung PD-typischer Krankheitsmerkmale führt (Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003a). Ein Einfluss von Hcy auf die Atmungskette könnte einen Einfluss der Hyperhomocysteinämie auf die Alzheimer- und die Parkinson-Krankheit erklären. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diesen Einfluss von Homocystein auf die Atmungskette zu untersuchen.

1.3.1.3 Epilepsie

Epilepsie gehört zu den ZNS-Symptomen einer CBS-Defizienz (Prävalenz: 21% aller nicht-behandelten CBSD-Patienten). Darüber hinaus sind extrapyramidalmotorische Zeichen sowie unspezifische EEG-Veränderungen möglich. Die intraperitoneale Injektion von Homocystein und Homocysteinthiolacton in Ratten induziert epileptische Anfälle. Hohe Homocysteindosen binden Adenosin in Form von AdoHcy, welches seine hemmende Funktion im Methioninstoffwechsel (siehe Abbildung 1) nicht mehr wahrnehmen kann (Folbergrova, 1994; Folbergrova, 1997; Lipton et al., 1997; McIlwain und Poll, 1986; Santhosh-Kumar et al., 1994).

1.3.1.4 Psychiatrische Erkrankungen

Im Rahmen einer Hyperhomocysteinämie kann es auch zu psychiatrischen Störungen kommen. Bei CBS-Defizienz zeigen sich in 19% Persönlichkeitsstörungen, 17% Verhaltensstörungen und in 10% episodische Depressionen (Abbott et al., 1987).

1.3.2 Vaskuläre Störungen

Die durch Homocystein ausgelösten Effekte am Gefäßsystem sind vielfältig. Die wichtigsten sollen nun dargelegt und ihre Bedeutung für diese Arbeit herausgestellt werden.

1.3.2.1 Arteriosklerose und Thrombose

McCully berichtete 1969 erstmals, dass eine Hyperhomocysteinämie zur Entstehung von Arteriosklerose führen kann (McCully, 1969). Inzwischen gilt Homocystein als gesicherter unabhängiger Risikofaktor für Arteriosklerose (Kang et al., 1992; Mayer et al., 1996; Refsum et al., 1998b; Stampfer et al., 1992). In humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) konnte keine bzw. nur geringe CBS-Aktivität festgestellt werden, ebenso wie in humanen aortalen glatten Muskelzellen (HASMC). Das Fehlen der Hcy-Transsulfurierung macht das Gefäßsystem vulnerabel für Hyperhomocysteinämien, da in diesen Zellen Hcy nicht durch Transsulfuration abgebaut werden kann und die intrazellulären Homocystein-Konzentrationen von Konzentrationsgradienten gegen das Plasma abhängen (Chen et al., 1999). Die pathologischen Effekte von Hcy auf das Endothel sind vielfältig. Hcy stört die tPA-Rezeptor-Funktion, Protein C-Aktivierung in humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) und führt zu einer verstärkten Aktivierung von Faktor V. *In vivo*-Versuche an Ratten zeigten unter Hcy-Belastung eine Proliferation glatter arterieller Muskelzellen und eine Hypotrophie des Endothels (Tsai et al., 1994). An Orten der Endothelschädigung kommt es zur Freilegung subendothelialer Matrix mit konsekutiver Plättchenaggregation und Thrombusbildung (Harker et al., 1974). Hcy führt über eine verstärkte Expressierung von Thromboplastin (*tissue factor*, TF) an HUVEC zu einer vermehrten Thrombogenität (Dardik et al., 2000). Einen direkten Einfluss durch einen Wirkmechanismus am Thrombozyten selbst scheint es allerdings nicht zu geben (Stamler et al., 1993).

Weiterhin wird, wie bereits erwähnt, Hcy die Induktion von oxidativem Stress zugeschrieben. Mit einem oralen Methionin-Belastungstest ausgelöste Hyperhomocysteinämien führten zu einer Endotheldysfunktion, welche durch die Gabe von Vitamin C als Antioxidanz verhindert werden kann (Chambers et al., 1999). Die Entstehung von ROS hat hierbei seine Ursache in einer LDL-Aggregat-Bildung, welche in die Gefäßwand aufgenommen werden und zur Schaumzellbildung führen. Schaumzellen haben die Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und verursachen damit weitere pathologische Effekte (endotheliale Dysfunktion, Proliferation glatter Muskelzellen, NO-(Stickoxid-)Deaktivierung, LDL-Oxidation und Lipid-Peroxidation). Über eine verminderte NO-Freisetzung kann eine Störung der Mikrozirkulation erklärt werden (Ungvari et al., 1999). Versuche an glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*,

VSMC) zeigten eine vermehrte Synthese und Aktivität von MMP-2 (Matrixmetalloprotease 2), welche für das Plaque-Remodelling mitverantwortlich gemacht wird (Doronzo et al., 2005). Bei Patienten mit cerebrovaskulärer, koronarer oder peripherer Arteriosklerose findet sich eine Hyperhomocysteinämie in bis zu 40% der Fälle (Clarke et al., 1991). Es wird geschätzt, dass eine Erhöhung des tHcy um 5 mmol/l das Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung genauso erhöht wie ein Anstieg des Cholesterinspiegels um 0,5 mmol/l (19 mg/dl) (Boushey et al., 1995).

1.3.2.2 Stroke und Vaskuläre Demenz

Erhöhte Hcy-Spiegel werden über gestörtes Kollagen-cross-linking und Hyperproliferation glatter Muskelzellen für die Zerstörung des Gefäßendothels und damit für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen verantwortlich gemacht (Mudd et al., 2001).

Die Assoziation erhöhter Homocysteinspiegel mit cerebrovaskulären Erkrankungen ist jedoch größer als mit anderen vaskulären Erkrankungen (Lindgren et al., 1995; Perry et al., 1990). Wie bereits erwähnt, wird Hcy eine direkte Neurotoxizität über die Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)Subtyps der Glutamatrezeptoren zugesprochen (Lipton et al., 1997). Eine verstärkte Stimulation dieser Rezeptoren vermittelt eine Zellschädigung in fokalen Hirnischämien (Lipton und Rosenberg, 1994; Simon et al., 1984). Hcy scheint also nicht nur über die Gefäßschädigung, sondern auch über einen eigenständigen neurotoxischen Mechanismus an der klinischen Ausprägung cerebrovaskulärer Ereignisse beteiligt zu sein.

1.3.3 Störungen des Knochenstoffwechsels

Osteoporose tritt als häufigste Störung des Knochenbaus auf. 50% der CBS-defizienten Patienten haben bis zum Ende des zweiten Lebensjahrzehnts eine Osteoporose. Hier gilt – wie auch für andere, bisher genannte Pathophysiologien – das frühere und schwerere Auftreten bei Vitamin B₆-non-respondern. Der Osteoporose liegt eine Schädigung des Fibrillins zugrunde. Ein weiterer möglicher Pathomechanismus ist ein Fehler im Kollagenaufbau (Harris und Sjoerdsma, 1966); die Ursache hierfür ist unklar. Ein Mechanismus über eine vermehrte Hcy-Thiolactonsynthese wird postuliert (Jakubowski, 1997).

1.3.4 Pigmentierungsstörungen

Bei einzelnen Fällen homocystinurischer Patienten zeigt sich eine Hypopigmentierung der Haare, welche nach adäquater Behandlung reversibel war. An Melanomzellen wurde unter Hcy-Behandlung *in vitro* eine verminderte Tyrosinaseaktivität gefunden, welche sich durch Zugabe von Kupfer zum Wachstumsmedium aufheben ließ. Dies lässt sich durch eine mögliche

Chelatierung des Kupfers durch Homocystein erklären (Reish et al., 1995).

1.3.5 Iatrogene Hyperhomocysteinämie

Eine mögliche Ursache einer Hyperhomocysteinämie ist die MTX-(Methotrexat-)induzierte Reduktion von 5,10-Methylen tetrahydrofolat, welche zu einem Mangel in der Bereitstellung zur Resynthese von Methionin führt (Becker et al., 2007; Mudd et al., 2001). Durch Hemmung der Vitamin B₁₂-Resorption können auch andere Medikamente (z.B. Metformin oder Protonenpumpenhemmer) zu erhöhten Homocysteinspiegeln führen (Stanger et al., 2003).

1.4 Grundlagen des Kupferstoffwechsels

Die Bedeutung von Kupfer und Hcy in der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen ist bereits angeklungen. Nun soll auf die wichtigsten Grundlagen des Kupferstoffwechsels eingegangen und der Zusammenhang zu Homocystein dargestellt werden.

Tabelle 3: Kupferabhängige Enzyme und ihre physiologische Funktion (Shim und Harris, 2003)

Kupferabhängige Enzyme	Funktion
Cu/Zn-Superoxid-Dismutase	Antioxidativ
Cytochrom <i>c</i> -Oxidase	Oxidative Phosphorylierung
Tyrosinase	Melaninsynthese
Lysyl-Oxidase	Kollagen- und Elastincrosslinking
Dopamin- β -Hydroxylase	Katecholaminproduktion

Die zelluläre Aufnahme von Kupfer wird über einen ubiquitär exprimierten membranären Kupfertransporter, hCtr1, gesteuert (Klomp et al., 2002). Zellulär aufgenommenes Kupfer wird cytosolischen oder mitochondrialen kupferabhängigen Enzymen zugeführt (siehe Tabelle 3). Kommt es zu einer Hemmung kupferabhängiger Enzyme, werden grundlegende Stoffwechselfvorgänge gestört, z.B. durch Hemmung der Cytochrom *c*-Oxidase (COX), dem Komplex IV der Atmungskette (DiMauro et al., 1990a). Die COX zählt zu der Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen. Sie verfügt über vier redoxaktive prosthetische Gruppen, Cytochrom_a, Cytochrom_{a3} und Cu_A und Cu_B, die in den Untereinheiten I und II lokalisiert sind. Cytochrom_aCu_A und Cytochrom_{a3}Cu_B sind die zwei katalytischen Zentren (Azzi und Müller, 1990). Sowohl in freier Form, als auch z.T. komplexgebunden ist Kupfer ein stark toxisches Metall, da es durch Übertragung eines Elektrons auf O₂ ROS erzeugen kann (Halliwell und Gutteridge, 1984).

1.5 Pathologie des Kupferstoffwechsels

Kupfer spielt eine bedeutende Rolle in verschiedensten Krankheitsbildern (siehe Abbildung 5). Die jeweils relevanten pathophysiologischen Mechanismen und ihr Zusammenhang zum Homocystein soll in den folgenden Kapiteln dargestellt werden.

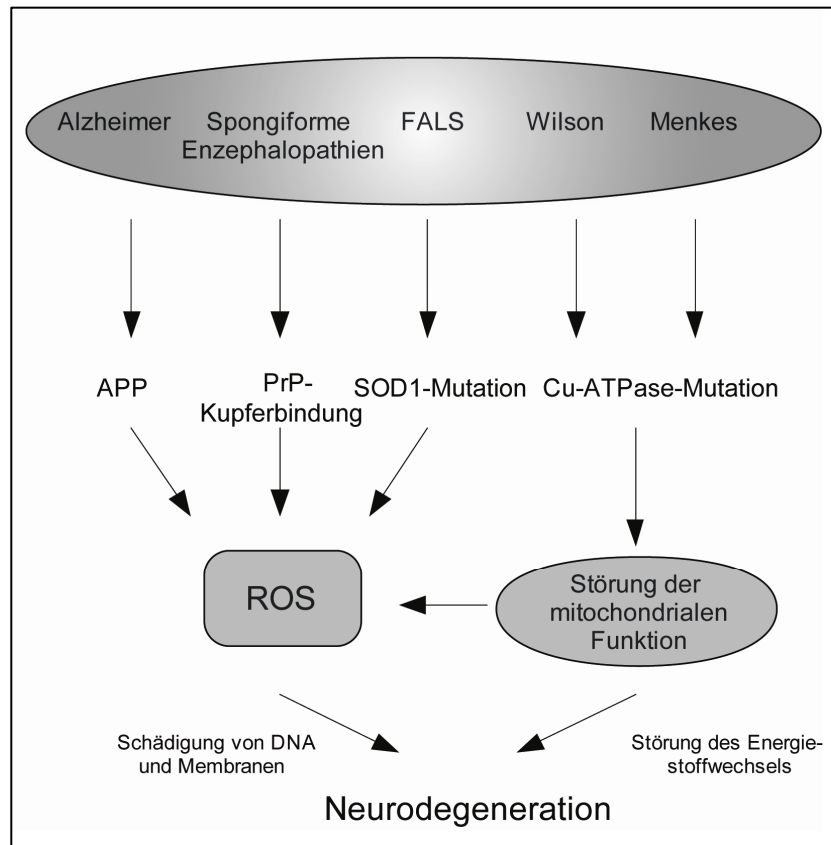


Abbildung 5: Übersicht über vom Kupferstoffwechsel beeinflusste Krankheiten und ihre grundlegenden pathophysiologischen Mechanismen (Rotilio et al., 2000)

1.5.1 Morbus Menkes

Der Morbus Menkes ist eine in der Regel vor dem 3. Lebensjahr letal verlaufende, X-chromosomal vererbte Erkrankung, bei der eine Mutation einer transmembranalen P-Typ-ATPase (MNK oder ATP7A), welche für den Kupfertransport verantwortlich ist, vorliegt. Es kommt zu einer gestörten Kupferabsorption im Dünndarm und Reabsorption in der Niere, mit dem Effekt einer systemischen Kupferdefizienz und Ablagerungen von Kupfer in den oben genannten Geweben (Danks, 1995). Normalerweise findet sich diese ATPase in der trans-GOLGI-Domäne, um Cuproenzyme (z.B. die Lysyl-Oxidase) mit der benötigten Menge Kupfer zu versorgen (Royce und Steinmann, 1990). Kommt es zu einem Anstieg des Kupferspiegels, wird die ATPase kupferabhängig transmembranär eingebaut, und es kommt zu einem verstärkten

Kupferefflux (Goodyer et al., 1999). MNK ist in der Lage, die kupferabhängige, für die Melanogenese verantwortliche Tyrosinase (Tyrosinkinase) zu aktivieren. Dieser Effekt ist durch eine Chelatierung von Kupfer unterdrückbar (Petris et al., 2000). Die Menkessche Erkrankung führt deshalb zu einer kombinierten Toxizität aus intrazellulärer Kupferakkumulation und einem Mangel funktioneller Cuproenzyme. Die klinischen Zeichen der Kupferdefizienz bei Patienten mit Morbus Menkes sind typisch für den Mangel an funktionsfähigen Enzymen: Es kommt zur Hypopigmentation der Haare aufgrund des Mangels an Tyrosinkinaseaktivität, zu Bindegewebsanomalien und aortalen Aneurysmen aufgrund von mangelhafter Lysyloxidaseaktivität, zum sogenannten „Kinky hair syndrome“ aufgrund verminderten Keratin-crosslinkings (Entstehung von *pili torti*), sowie zu einer schweren Neurodegeneration und therapierefraktären Epilepsie als Resultat einer Defizienz der Cytochrom *c*-Oxidase (Shim und Harris, 2003). Magnetresonanztomographisch zeigt sich ein neuronaler Abbau, welcher mit einer Demyelinisation beginnt (Santos et al., 2001). Das klinische Bild ist in seiner Ausprägung vergleichbar mit einer schweren Hyperhomocysteinämie, was einen möglichen gemeinsamen Pathomechanismus durch einen intrazellulären Kupfermangel verdeutlicht.

1.5.2 Familiäre amyotrophe Lateralsklerose (FALS)

Die Bedeutung einer fehlerhaften Komplexierung von Kupfer, wie sie auch durch Homocystein vorkommen kann, wird auch bei der FALS deutlich. Hierbei kann ein Enzymdefekt der Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD, SOD1) vorliegen, ein ubiquitär exprimiertes Enzym zum Abbau von Superoxidradikalen, welches ein Prozent des zellulären Gesamtproteins repräsentiert (Waggoner et al., 1999). Des Weiteren wird eine Störung der oxidativen Phosphorylierung, also einer Störung der mitochondrialen Funktion, mit der amyotrophen Lateralsklerose in Zusammenhang gebracht (Wiedemann et al., 1998). Mutationen der SOD1 führen zu einer Fehlkomplexierung von Kupfer, zu einer verstärkten Entstehung von ROS und zur Apoptoseinduktion. Durch chelatierende Substanzen können die toxischen Effekte vermindert werden (Ciriolo et al., 2000).

1.5.3 Morbus Wilson

Auch hier liegt – wie beim Morbus Menkes – ein Defekt einer Kupfertransport-ATPase vor, welche im Gegensatz zur MNK primär in der Leber exprimiert wird. ATP7B ist das auf Chromosom 13 gelegene Äquivalent, welches im Golgi-Apparat von Hepatozyten verbleibt (Bull et al., 1993). ATP7B ist verantwortlich für die Gallesekretion von Kupfer (Schaefer et al., 1999). Neben der typischen Hepatopathie entwickeln Patienten mit Morbus Wilson eine progrediente

extrapyramidalmotorische Symptomatik. Dysarthrie, Dysphagie, Apraxie und ein Tremor-Rigiditätssyndrom sind die neurologisch häufigsten Symptome (Kitzberger et al., 2005). Die vermehrte mitochondriale Kupferakkumulation und die damit einhergehende Entstehung von freien Radikalen und oxidativem Stress wird für die Zerstörung der Hepatozyten verantwortlich gemacht (Gu et al., 2000). Die Rolle des erhöhten Kupferspiegels für die Entwicklung neurologischer Symptome ist unklar. Extrazellulär erhöhte Kupferkonzentrationen werden als pathophysiologisch ursächlich diskutiert. Typischerweise erfolgt die Behandlung des Morbus Wilson durch Chelatbildner wie z.B. D-Penicillamin (Roberts und Schilsky, 2003) oder Zink, was zu einer Induktion von Metallothionein in intestinalen Zellen führt. Dadurch wird Kupfer gebunden und der Transport ins Blut verringert (Sturniolo et al., 1999). Homocystein könnte durch eine Chelatierung von Kupfer die klinische Ausprägung der Erkrankung beeinflussen – die chemische Struktur ist dem D-Penicillamin ähnlich. Die genaue Rolle von Hcy in diesem Zusammenhang ist bisher allerdings unbekannt.

1.5.4 **Alzheimersche Demenz und Prionen-assoziierte Enzephalopathie**

Neben der Alzheimerschen Erkrankung ist auch die Neurodegeneration im Rahmen von Prionenerkrankungen wie z.B. der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung mit einem kupferbindenden Protein (*prion-binding protein*, PrP) assoziiert. PrP ist in der Lage, als kupferbindendes Metalloprotein zu fungieren, wobei es zu einer Veränderung der vorhandenen Kupfermenge im Hirngewebe kommt (Brown et al., 1997). Darüberhinaus wirkt die kupferbindende Domäne (CuBD) des PrP als eine Kupfer-Reduktase, genau wie die CuBD des APP (Opazo et al., 2003; Ruiz et al., 1999). APP ist in der Lage Cu^{2+} zu Cu^{+} zu reduzieren, was eine mögliche Entstehung von ROS fördern kann (Multhaup et al., 1996). Wildtyp-Neurone zeigen sich gegenüber Kupfer sensibler als APP0/0-Neurone, was mit einer vermehrten Entstehung von Cu^{+} und entsprechenden sekundären Effekten in Zusammenhang gebracht wird (White et al., 1999a; White et al., 1999b; White et al., 1999c; White et al., 1999d). Eine Änderung des Kupferspiegels hat Einfluss auf die Aggregation von A β und PrP, wobei noch unklar ist, inwiefern ein protektiver Effekt durch ein Überangebot an Kupfer bzw. die Wirkung chelatierender Substanzen wie Homocystein zu deuten ist (Cerpa et al., 2005).

1.6 **Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS)**

Die folgenden Tabellen zeigen die zur Gruppe der ROS gehörenden Substanzen, die typischen zellulären Kompartimente, sowie die antioxidativ wirkenden Mechanismen.

Tabelle 4: Aufzählung der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Reactive oxygen species (ROS)	
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH [·]	Hydroxylradikal
LOO [·]	Lipidperoxyradikal
LO [·]	Lipidalkoxyradikal
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HOCl	Hypochlorämische Säure

Tabelle 5: Endogene Quellen oxidativen Stresses

Zelluläre Entstehung von ROS	Lokalisation
Elektronentransport	Mitochondrien
NADPH-Oxidase	Plasmamembran
Cyclooxygenasen	
Lipoxygenasen	
Xanthin-Oxidase	Zytosol
Katecholamine	
Riboflavin	
Metalle (Fe ^{2+/3+} , Cu ⁺²⁺)	
Oxidasen	Peroxisomen
Elektronentransport	Endoplasmatisches Retikulum
Cytochrom P450 und b5	

Tabelle 6: Antioxidativ wirkenden Enzyme und ihre zelluläre Lokalisation

Antioxidative zelluläre Mechanismen	Lokalisation
Superoxid-Dismutase Mn-SOD	Mitochondriale Matrix/Peroxisomen
Superoxid-Dismutase Cu/Zn-SOD	Zytoplasma
Katalase	Zytoplasma/Peroxisomen
Glutathionperoxidase	Mitochondrien/Zytoplasma/Nukleus/ Peroxisomen

1.6.1 Pathophysiologie des mitochondrialen oxidativen Stresses

Das Mitochondrium ist der Hauptentstehungsort von ROS (Halliwell und Gutteridge, 1984).

1-3% des über die Atmungskette verstoffwechselten Sauerstoffs werden nicht komplett reduziert (Boveris et al., 1972) (siehe auch Abbildung 6).

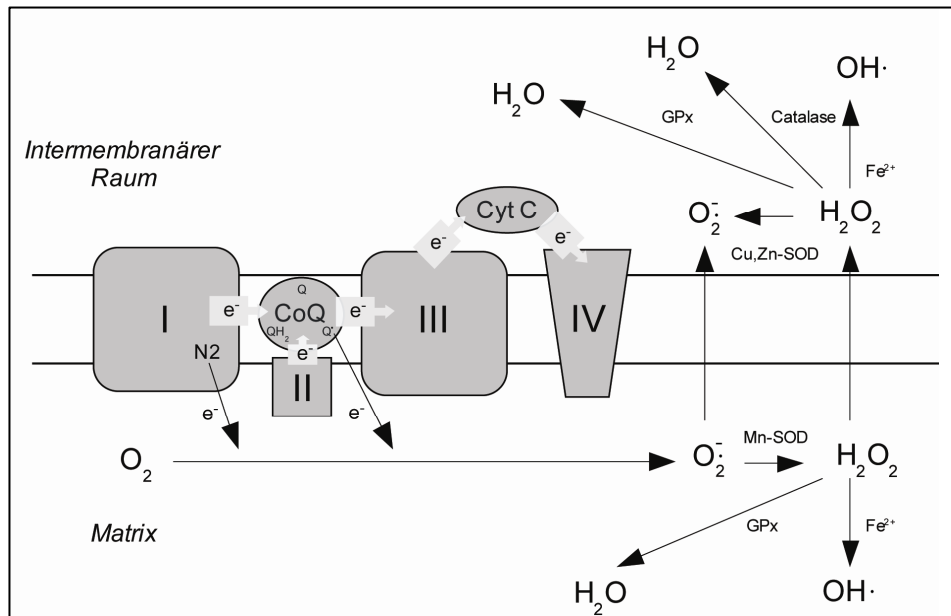


Abbildung 6: Entstehung von ROS bei der oxidativen Phosphorylierung (Batandier et al., 2002)

Hierbei entsteht an Komplex I der Atmungskette Superoxidanion. Dieses ist selbst kein starkes Oxidanz, jedoch eine Vorstufe anderer Oxidanzien. Es wird – sowohl über zytosolische wie auch mitochondriale – Superoxiddismutasen (Cu/Zn-SOD bzw. Mn-SOD) zu Hydrogenperoxid (H_2O_2) oder hochreaktivem Hydroxylradikal umgewandelt (Han et al., 2001). Im Alter kommt es zu einem zunehmenden Verlust antioxidativer Enzyme (Ciriolo et al., 1997). Neurone sind besonders sensibel gegenüber H_2O_2 aufgrund ihrer niedrigen zellulären Reserven an antioxidativen Enzymen und sind darüber hinaus abhängig von oxidativer Phosphorylierung (Buckman et al., 1993; Whittemore et al., 1994). Somit stellen die Mitochondrien sowohl einen möglichen Ursprungort wie auch einen Angriffspunkt für ROS dar. Radikale entstehen in vivo weiterhin u.a. durch eine Fenton-Reaktion über eine Metall-katalysierte Umwandlung von H_2O_2 (Halliwell und Gutteridge, 1990): $Metall + H_2O_2 \rightarrow Metall^+ + OH\text{-Radikal} + OH$.

Die Hemmung der Atmungskettenenzyme führt in unterschiedlichem Maße zur Entstehung von oxidativem Stress. Eine Hemmung des Komplex IV der Atmungskette mittels Cyanid führt erst nach einer 70%igen Hemmung zu einem relevanten Anstieg an ROS (Sipos et al., 2003). In Hirnschnitten von Parkinson-Patienten beträgt die Verminderung der Komplex I-Aktivität charakteristischerweise 25-30% (Schapira et al., 1989). In synaptischen Mitochondrien führt

nachweislich bereits eine Hemmung von 10% zu einer Sensitivierung gegenüber oxidativem Stress, was eine wichtige Rolle in der Pathogenese des M. Parkinson spielen könnte (Chinopoulos und Adam-Vizi, 2001). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten einen protektiven Effekt durch eine Kupferpräinkubation auf über 24 Stunden mit Hcy gestresste PC12-(Phäochromozytom-)Zellen. Hierbei war ersichtlich, dass es primär zu einer Hemmung des Komplex IV der Atmungskette, nicht jedoch des Komplex I (als typischem Indikator für die Entstehung oxidativen Stresses) gekommen war (Linnebank et al., 2006). Dies war unerwartet, da allgemein die Entstehung von ROS als wichtiger toxischer Mechanismus von Homocystein diskutiert wird. Diese Hemmung der COX durch Homocystein über einen kupferchelatierenden Mechanismus in Zusammenhang mit der Entstehung von ROS soll in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.6.2 Klinische Bedeutung oxidativen Stresses

Bei vielen mit neuronalem Zelluntergang assoziierten Erkrankungen ist die Bedeutung von oxidativem Stress als pathogenetischem Faktor ausführlich diskutiert (Beal, 2003; Halliwell und Gutteridge, 1998). Dazu gehören neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Parkinson, die Alzheimersche Demenz, Ischämie-Reperfusionssphänomene im Rahmen von cerebralen Minderdurchblutungen, zelluläres Altern oder auch Exzitotoxizität. Die kontinuierliche Exposition gegenüber freien Radikalen soll verantwortlich für den progredienten Verlust zellulär lebenswichtiger Makromoleküle sein (Harman, 1988). Für den Morbus Parkinson sind Hemmungen des Komplex I der Atmungskette belegt, für die Alzheimersche Demenz sind Komplex IV-Defizienzen an Hirnschnitten von Patienten nachgewiesen worden. Die genauen Mechanismen, in wie weit ROS sowohl positive wie auch negative Einflüsse auf neurodegenerative Erkrankungen hat, sind nicht geklärt. Untersuchungen dieser Arbeit zur ROS-Entstehung durch Homocystein sollen einen Teil zur weiteren Aufklärung beitragen.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Es sollte zunächst mittels TUNEL-Assay verifiziert werden, welche Art des Zelltodes in PC12-Zellen durch Homocystein induziert wird, im Speziellen, ob es durch eine mögliche Hemmung der mitochondrialen Atmungskette (Hemmung der COX) zur Induktion von Apoptose oder zur Zellnekrose kommt.

Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits ein protektiver Effekt einer Kupferbeladung von PC12-Zellen gegenüber Homocystein gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, ob es auch in weiteren Zellmodellen (neben PC12-Zellen) zu einem protektiven Effekt durch eine Kupferbeladung der Zellen gegenüber Homocystein kommt. Hierfür wurden zum einen humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) sowie primäre zerebelläre Rattenneurone (*cerebellar granule neurons*, CGN) gewählt, welche auf ihre toxische Sensibilität gegenüber Kupfer und Homocystein, sowie auf ihre Sensibilität gegenüber einer Präinkubation mit Kupfer untersucht werden sollten. Darüberhinaus war zu untersuchen, ob der protektive Effekt einer Präinkubation mit Kupfer hierbei einer Dosisabhängigkeit unterliegt. Dies soll zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Homocysteintoxizität beitragen.

Anschließend sollte die Entstehung von ROS durch Hcy in PC12-Zellen untersucht werden. Da ROS als pathophysiologischer Faktor der Homocysteintoxizität diskutiert wird, Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe jedoch andere pathologische Mechanismen vermuten ließen, sollte ein besonderes Augenmerk auf die Kinetik der ROS-Entstehung, den zeitlichen Zusammenhang zur Hcy-Beladung und die Hemmung der Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität gelegt werden.

Dabei sollte weiterhin untersucht werden, ob die durch Homocystein ausgelösten toxischen Effekte, speziell in Bezug auf die Entstehung von ROS, auch in niedrigen, weniger toxischen Konzentrationen wie sie z.B. bei der intermediären Hyperhomocysteinämie oder auch bei schweren Hyperhomocysteinämien wie z.B. bei homozygoter CBS-Defizienz vorkommen, nachweisbar sind, und ob eine Dosisabhängigkeit dieser Effekte besteht. Dies sollte die klinische Relevanz der bisher gefundenen pathologischen Mechanismen bestätigen und einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Homocysteintoxizität ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Allgemeines

Zellkulturexperimente wurden nach entsprechenden Sicherheitsrichtlinien im Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Verwendet wurde ausschließlich eine Sterilwerkbank der Klasse 2 nach DIN 12950 mit turbulenzarmer Verdrängungsströmung (Heraeus Instruments „Hera safe“, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Eine Desinfektion der innerhalb der Werkbank verwendeten Geräte sowie der Werkbank selbst erfolgte mit 70 %-igem Ethanol. Verwendete Verbrauchsmaterialien waren steril. Das entsprechend den Vorschriften zur Zellzüchtung notwendige Milieu ist in den Abschnitten zum jeweiligen Zelltyp angegeben.

2.1.2 Kulturflaschen

Je nach Zelltyp und Versuchsaufbau wurden zur Kultur 75 cm²- oder 175 cm²-Filter-Top-Flaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) verwendet.

2.1.3 Mediumwechsel

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurden Mediumwechsel alle zwei bis vier Tage durchgeführt. Zellen wurden, je nach Zellart und Versuchsaufbau, in verschiedenen Gefäßen und Gefäßgrößen kultiviert (siehe auch 2.1.2). Genaue Angaben finden sich in den jeweiligen Abschnitten. Bei Konfluenz der Zellen wurden bei undifferenzierten Neuroblastomzellen und PC12-Zellen Subkultivierungen mittels einer Trypsin-Passagierung durchgeführt (siehe 2.1.4).

2.1.4 Passagierung und Zellzählung

Bei Konfluenz der Zellen wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, und die Zellen mit (im Wasserbad auf 37°C erwärmten) PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt, und 1 ml Trypsin (Trypsin EDTA 1:250, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in die Zellkulturflasche gegeben, so dass der Boden vollständig bedeckt war (kompletter Film über der Kultur). Es erfolgte nun die 5-minütige Inkubation im für die jeweilige Zelllinie entsprechenden Milieu. Anschließend erfolgte die vollständige Lösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen durch Beklopfen der Flaschen. Mit 10 ml Medium wurden die nun gelösten Zellen mittels einer Pipettierhilfe in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Noch anhaftende Zellen konnten mit dem verwendeten Medium

abgespült werden. Die Zentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 1200 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen/Minute). Das Medium/Trypsingemisch wurde nun abgesaugt und das Zellpellet mit neuem Medium resuspendiert (siehe Abbildung 7). Zur Zellvereinzlung wurden zunächst nur 2 ml Medium verwendet, in denen – mittels einer an der Spitze verengten Pasteurpipette (durch mehrfaches Durchziehen durch die Bunsenbrennerflamme) – durch mehrfaches Resuspendieren vorhandene Zellklumpen voneinander gelöst wurden.

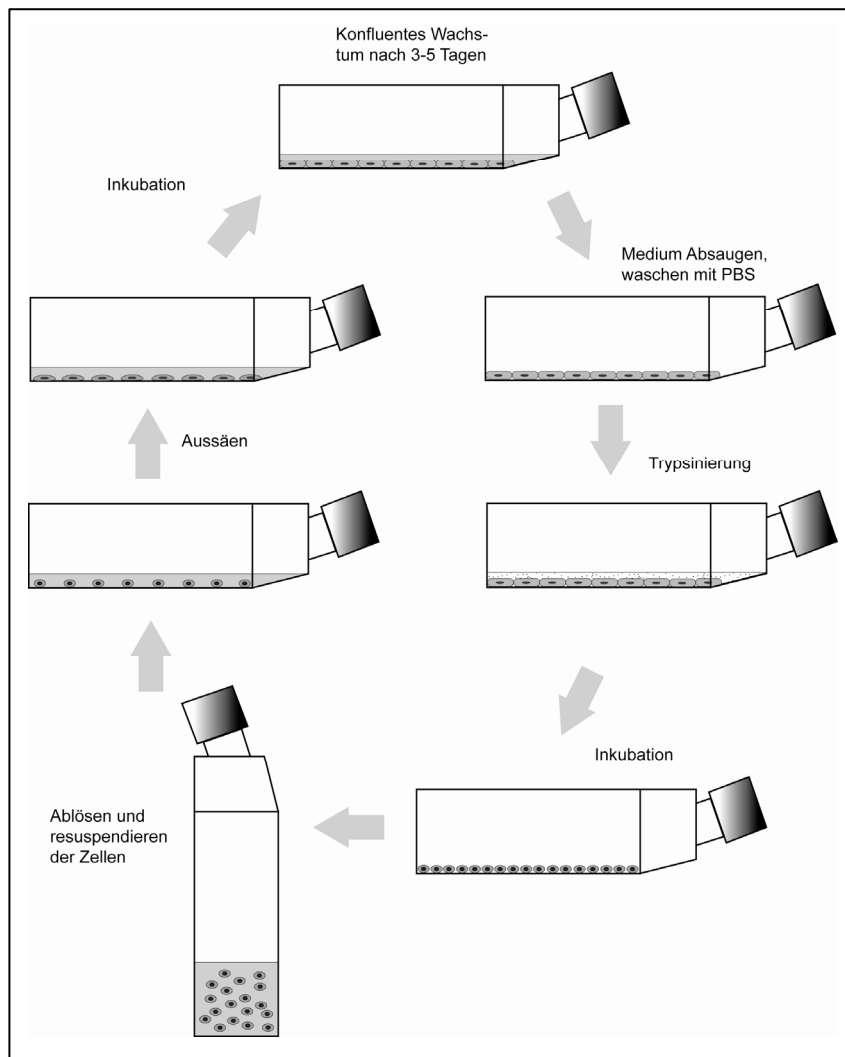


Abbildung 7: Trypsinierung und Zellpassagierung

Zur Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet, wobei (je nach Dicke des vorhandenen Pellets) vor der Zellzählung entweder auf 5 ml oder 10 ml Gesamtvolumen mit Medium verdünnt wurde. Die Zellzählung erfolgte immer zweimal mit jeweils 15 μ l Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer nach einem entsprechenden Standardverfahren (Lindl, 2002). Nach Auszählung ergab sich so aus der gezählten Menge X aus $X \times 10^4$ die Zellzahl pro ml. Entsprechend der jeweiligen Größe der Wells erfolgte dann die Verdünnung (in

der Regel 5000 oder 10000 Zellen pro 100 µl zur Aussaat in 96 well-Mikrotiterplatten, bzw. entsprechende Mengen in 6- oder 24-well, je nach Versuchsplanung). Splits zur Subkultivierung wurden, je nach Größe des Pellets und zeitlicher Planung der Experimente in Verdünnungen zwischen 1:5 und 1:20 durchgeführt. Zur Untersuchung wurden keine Zellen mit mehr als 15-maliger Passagierung verwendet.

2.2 Kollagenbeschichtung von Zellkulturschalen

Um optimale Adhärenz der Zellen zu erreichen, wurde zur Beschichtung der wells Kollagenlösung (Kollagen Typ 1) aus Rattenschwanzsehnen (ROCHE Diagnostics, Mannheim) verwendet. Hierzu wurde nach Herstellerangabe eine Stammlösung in 5 ml steriler 0,2%-iger Essigsäure (v/v) erzeugt. Dies entspricht einer Konzentration von 2 mg/ml. Anschließend wurde die Stammlösung verdünnt, so dass je well 30 µl *aqua destillata* mit einer Konzentration von 5 µg/cm² Kollagen auf die 96 well-Mikrotiterplatten aufgetragen wurden. Weiter erfolgte die Trocknung bei 15–20°C über mindestens 12 Stunden entsprechend der Herstellerangabe in der sterilen Werkbank. Bei einer well-Größe von 0,35 cm² ergaben sich so 1,75 µg Kollagen pro well.

2.3 Zellkonservierung

2.3.1 Einfrieren von Zellen (PC12 und SH-SY5Y)

Zur Bereitstellung der Zellen für die Messung der COX-Aktivität, sowie zur kurzzeitigen Lagerung, wurden die Zellen bei -80°C konserviert. Als Einfriermedium wurde 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie 50% aktives fetales Kälberserum in RPMI-1640 verwendet. Die Formulierung wurde Mitte der 1960er Jahre von G. E. Moore und Kollegen am Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entwickelt. Wie fast alle heute gebräuchlichen Zellkulturmedien benutzt RPMI-1640 ein Hydrogencarbonat-Puffersystem und basiert auf einer Lösung von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen. Als Indikator für den pH-Wert ist Phenolrot zugesetzt. Zunächst erfolgte die Zellpelletierung (siehe 2.1.4) sowie die anschließende Überführung des Zellpellets in ein Kryotube mit 1 ml eisgekühltem Einfriermedium. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C. Sollten Zellen für die Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff konserviert werden, wurden sie nach Konservierung bei -80°C über Nacht zur Kryokonservierung überführt.

2.3.2 Auftauen von Zellen (PC12 und SH-SY5Y)

Es erfolgte die rasche Erwärmung der Zellpellets im Wasserbad bei 37°C und die anschließende Verdünnung ad 10 ml mit dem jeweiligen verwendeten Standard-Zellkulturmedium zur Vermeidung des toxischen Effektes von DMSO. Danach erfolgte die Zentrifugation (1200 rpm, 5 min.) und die jeweilige Kultivierung nach entsprechendem Standard (siehe auch 2.1.4).

2.4 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

2.4.1 Allgemeines

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies wurde mittels des ROS-sensitiven Fluoreszenz 5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-Dichlorohydrofluorescein-diacetat (CM-H₂DCF-DA, Firma: Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) nach einem entsprechenden Standardprotokoll detektiert (Aon et al., 2003; Wüllner et al., 1999). CM-H₂DCF-DA wird intrazellulär aufgenommen, und anschließend werden die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Dies führt dazu, dass das nun entstehende nicht-fluoreszierende 5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-Dichlorohydrofluorescein (CM-H₂DCFH) in der Zelle „fixiert“ wird (Sanchez Ferrer et al., 1990). Durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, insbesondere H₂O₂ und Hydroxylradikal, sowie indirekt durch Superoxidation, welches durch zelluläre Superoxid-Dismutasen zu H₂O₂ verstoffwechselt wird, entsteht nun das fluoreszierende 5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein (CM-DCF), welches als Maß für die Entstehung von ROS verwendet werden kann. Hierbei ist eine Dosisabhängigkeit von H₂O₂ und Fluoreszenz gegeben, so dass H₂O₂ auch als stöchiometrischer Indikator für die Entstehung von Superoxidationen gesehen werden kann (Loschen et al., 1974). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt, sowie eine standardisierte positive Kontrolle zur semiquantitativen Messung durch eine Stunde vor Messung appliziertes H₂O₂ (45 µM) (Oyama et al., 1994). Aufgrund seiner hohen Membranpermeabilität ist exogen appliziertes H₂O₂ in der Lage, in die Zellen einzudringen und die zellulär toxisch wirkenden oxidativen Mechanismen auszulösen (Halliwell, 1992; Makino et al., 1994). Zur Depletion des zellulär vorhandenen Glutathions wurde eine Stunde vor Fluoreszenzmessung eine Inkubation mit 100 µM Etacrynsäure (*etacrynic acid*, EA) durchgeführt, so dass die zum Zeitpunkt der Messung vorhandenen bzw. durch die Inkubation mittels Hcy entstehenden ROS nicht über einen vermehrten Abbau durch Glutathion verstoffwechselt wurden. Das Niveau der ROS wurde gegenüber parallel mitgeführten Vitalitätsmessungen mittels alamarBlue™ normalisiert, so dass ein korrekter quantitativer Bezug zur jeweils vorhandenen vitalen Zellmenge hergestellt werden konnte.

2.4.2 Messung

2.4.2.1 Aliquotieren von DCF

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit erfolgte die Aliquotierung von CM-H₂DCF-DA lichtgeschützt in DMSO gemäß Herstellerangaben zu 5 mM Aliquots zu je 25 µl.

2.4.2.2 Vorbereitung

Die 5 mM Stockaliquots wurden nun direkt vor der Messung im entsprechenden Standardmedium 1:50 verdünnt (25 µl Aliquot in 1,25 ml Medium).

2.4.2.3 Fluoreszenzmessung

Die Zellen wurden in 96-well Platten (100 µl Medium pro well, zu je 5000 oder 10000 Zellen) ausgesät und über 48 Stunden inkubiert. Bei ausreichender Konfluenz wurden die jeweiligen Inkubationen mit verschiedenen Hcy-Konzentrationen über die entsprechende Inkubationszeit durchgeführt. Zwei Stunden vor Messung erfolgte die Zugabe von 1 µl Etacrynsäure pro well aus einem 10 mM Stock (siehe hierzu auch 2.4.1). Ein Stunde vor der Messung erfolgt die Zugabe von 10 µl CM-H₂DCF-DA-Verdünnung pro well und die anschließende Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Die Fluoreszenzmessung (Extinktion: 485 nm, Emission: 530 nm) wurde im SpectraMax Gemini Reader durchgeführt (siehe auch 2.5).

2.5 Messung der Zellvitalität mittels alamarBlue™

alamarBlue™ (BioSource International) wird als oxidiertes Farbstoff blau (nicht fluoreszierend) und als reduzierter Farbstoff rot (fluoreszierend) dargestellt. In vitalen Zellen wird vermehrt alamarBlue™ (durch NADH, FMNH, FADH, und NADPH) reduziert, und es kann über die Fluoreszenzmessung bei einer spezifischen Emissionswellenlänge eine Abschätzung der in den wells vorhandenen Zellvitalität vorgenommen werden (Lelkes et al., 1997; Liu et al., 2001). Zur Vergleichbarkeit der Fluoreszenz wurden auf den Mikrotiterplatten jeweils unbehandelte Kontrollen mitgeführt, da die Fluoreszenz abhängig von der Zelldichte in den jeweiligen wells ist. Waren Mediumwechsel durch den entsprechenden Versuchsaufbau notwendig, so wurden diese gleichfalls bei den mitgeführten Kontrollen durchgeführt um die Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten. Die jeweiligen Fluoreszenzmessungen wurden in Abhängigkeit vom spezifischen Versuchsaufbau und der verwendeten Zelllinie an 96-, 24- oder 6-well-Platten durchgeführt. Für ROS- und Vitalitätsmessungen wurden prinzipiell verschiedene wells verwendet um mögliche Interaktionen zu vermeiden. Zur Vergleichbarkeit wurden die Messungen in derselben Mikrotiterplatte (nach zeit- und zellzahlgleicher Beimpfung)

durchgeführt.

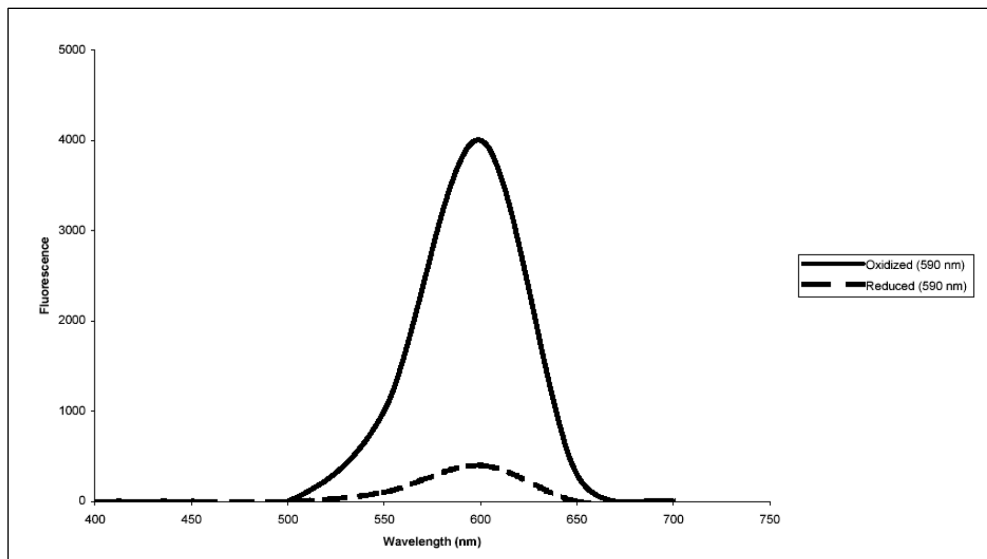


Abbildung 8: alamarBlue™ Fluoreszenz-Emissions-Spektrum
Die Fluoreszenz zur Vitalitätsbestimmung ist bei einer Anregungswellenlänge von 530-560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm dargestellt (alamarBlue™ Assay U.S. Patent No. 5,501,959; BioSource International, Camarillo, CA, USA).

Hierzu wurde nach der jeweiligen Inkubation das Medium vorsichtig abgesaugt und bei 96 well-Platten 100 µl reines Medium pro well aufpipettiert (bei 24 well und 6 well-Platten entsprechend die höhere Mediummenge in Abhängigkeit der Grundfläche). Generell wurden nicht-reduzierende Medien verwendet um keine Interaktionen durch das Medium mit alamarBlue™ zuzulassen. 10 µl alamarBlue™ wurden nun pro well aufpipettiert, und die Zellen im Anschluss zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte im SpectraMax Gemini Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA) (Extinktion: 544 nm; Emission: 590 nm, siehe Abbildung 8) und dem dazugehörigen Computerprogramm SOFT max® Pro. alamarBlue™ wird nach Händlerangaben bei 4°C gelagert. Bei den in den Experimenten verwendeten Konzentrationen von Hcy kam es zu keiner Änderung des pH-Wertes im Medium. Zur Bestimmung der LD₅₀ (Letale Dosis, in der für den Behandlungszeitraum 50% der beobachteten Zellen absterben) von Homocystein mittels alamarBlue™ wurde entsprechend Herstellerangabe folgende Formel verwendet: $\text{Fluoreszenz}_{590} \text{ der Testsubstanz} / \text{Fluoreszenz}_{590} \text{ der Kontrollsubstanz} \times 100$. Die LD₅₀ ergab sich also aus der Konzentration, bei der 50% der Fluoreszenz gegenüber der Kontrollsubstanz messbar war.

2.6 Poly-L-Lysin-Beschichtung (Objekträgersysteme, 6- bzw. 24-well-Platten)

100-300 µl 0,01% Poly-L-Lysin (Firma: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden gemäß Herstellerangaben pro Kammer oder well aufgetragen, so dass die Oberfläche vollständig

bedeckt war und 2 Stunden im Brutschrank aufbewahrt (siehe hierzu auch 2.14.2). Anschließend erfolgte die Trocknung in der Sterilbank.

2.7 Primärkulturen aus Rattenzerebellum (*cerebellar granule neurons, CGN*)

2.7.1 Allgemeines

Zerebelläre Körnerneurone (*cerebellar granule neurons, CGN*) sind glutamaterge, exzitatorische Interneurone des zerebellären Kortex (Gallo et al., 1982). Die Primärkulturen wurden als Modell verwendet, um spezifische neurotoxische Untersuchungen durchzuführen. Die Gewinnung von Körnerzellen ist nicht genehmigungspflichtig, sondern muss nur angezeigt werden. Diese Meldung ist entsprechend den Vorschriften bei dem Regierungspräsidium Köln erfolgt.

2.7.2 Zellisolierung

Primäre zerebelläre Körnerneurone wurden aus acht Tage alten Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) nach einem standardisierten Protokoll gewonnen (Dodel et al., 1999; Yan et al., 1994). Dabei wurden den Ratten die Köpfe mittels einer Schere abgetrennt, die Kopfhaut eröffnet und mit einer kleinen Schere in das Hinterhauptsloch eingestochen. Von dort wurde ein Schnitt entlang der Augen-Ohr-Linie durchgeführt. Der Schädel wurde anschließend abgehoben und das Gehirn mit einem kleinen Spatel aus der Hirnschale entnommen. Das Zerebellum wurde abgetrennt, die Hirnhäute wurden entfernt und in zellspezifisches Medium (siehe 2.7.3) überführt. Anschließend erfolgte die Dissoziation der zerebellären Strukturen: Das Zerebellum wurde zunächst mittels Pinzette in 3 bis 4 Stücke grob zerteilt und anschließend mittels Schere oder Skalpell weiter mechanisch zerkleinert. Hierbei wurde steril gearbeitet. Zur weiteren Dissoziation der zellulären Strukturen wurden die Zerebelli für 20 Minuten bei 37°C mit 0,25% Trypsin und 0,01% DNase in Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem *Hanks' balanced salt solution* (HBSS, Hanks-Puffer) inkubiert. Terminiert wurde diese Reaktion durch Zugabe von eiweißhaltigem Medium (siehe 2.7.3) mit anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten.

2.7.3 Zellkultivierung

Die so gewonnenen zerebellären Neurone wurden in Basal Medium Eagle (Bio Whitaker Europe, Cambrex, Deutschland) – versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland), 0,1 mg/ml Gentamicin und 26 mM KCl – aufgenommen und in einer Dichte von 1,2 x 10⁶ bis 1,6 x 10⁶ Zellen/ml auf Poly-L-Lysin beschichteten 6-well- und 24-well-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde Cytosin-Arabinosid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen,

Deutschland) in einer Konzentration von 10 mM hinzugegeben. Hierdurch wurde das Wachstum nichtneuronaler Zellen unterbunden (Dichter, 1978) und Kulturen mit 95% Körnerzellen erzeugt (Nicoletti et al., 1986). Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Begasung. Nach 7 Tagen wurde 10 mM Glukose zugeführt, nach 8-10 Tagen wurde die primäre Zellkultur für die weiterführenden Experimente genutzt.

2.7.4 Konditioniertes Medium bei CGN

Aufgrund des experimentellen Aufbaus wird ein Mediumwechsel (MW) zur Entfernung des Kupfers aus dem Versuch notwendig. Hierfür wurde konditioniertes Medium verwendet (siehe Abbildung 9), welches aus parallel gezüchteten CGN-Kulturen gewonnen wurde.

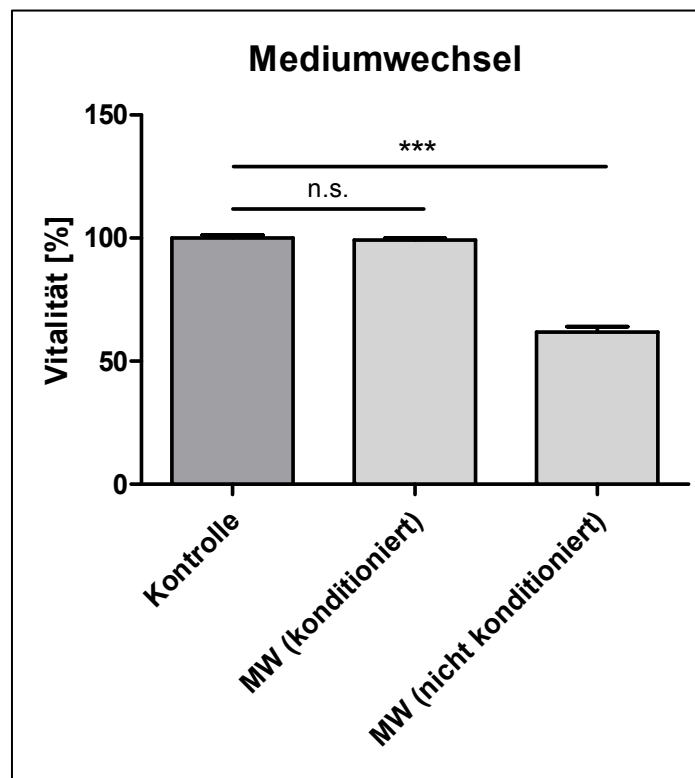


Abbildung 9: Mediumwechsel bei zerebellären Körnerneuronen, Messung der Vitalität nach 24 Stunden (alamarBlue™). Durch die Verwendung konditionierten Mediums ergibt sich kein signifikanter Abfall der Vitalität durch den Wechsel des Mediums

Durch das *in vitro*-Wachstum der Zellen entstand hierbei ein für die weitere Kultivierung notwendiges Milieu, mit z.B. typischer Freisetzung von Zytokinen. Dieses Medium wurde zum jeweiligen Versuch von den begleitend gezüchteten Kulturen abpipettiert und mit den entsprechenden zu untersuchenden Substanzen (CuCl₂) versetzt. Bei Inkubation mit frischem Medium kam es zu einem Abfall der Zellvitalität auf 61,8% ± 5,4% ($p < 0,001$), wogegen mit konditioniertem Medium eine Vitalität von 99,1% ± 1,28% (nicht signifikant (n.s.) im Vergleich zur Kultur ohne Mediumwechsel) nach jeweils 24 Stunden messbar war. Lichtmikroskopisch

ergab sich ein vergleichbares Bild in der Kontrolle gegenüber dem Mediumwechsel mit konditioniertem Medium; bei nicht-konditioniertem Medium hingegen zeigt sich ein Teil der Zellen avital, ohne Adhärenz und ohne die typischen Dendriten. Durch die Verwendung von konditioniertem Medium konnten auf diese Weise auch an primären Neuronen Präinkubationen mit Kupfer durchgeführt werden.

2.8 Phäochromozytomzellen der Ratte PC12

2.8.1 Allgemeines

PC12 ist eine permanente Zelllinie, welche 1976 erstmals aus einem Tumor des Nebennierenmarks der Ratte isoliert wurde. Diese neuronähnlichen Zellen sind reich an Mitochondrien und besitzen eine effektive Homocysteinaufnahme. Des Weiteren sind sie in der Lage, Dopamin zu synthetisieren und zu speichern und bieten sich so als Modell im Rahmen neurobiologischer Studien an (Lindl, 2002).

2.8.2 Zellkultivierung

Nach Auftauen der Zelllinie, bzw. nach Pelletierung einer gewachsenen Kultur, erfolgte die mehrfache Resuspension mit abgeflammter Pasteurpipette mit 2 ml Medium zur Lösung von Zelladhäsionen. Anschließend erfolgte die Auszählung in der Neubauer-Zählkammer nach Verdünnung ad 10-20 ml Medium, je nach Größe der vorhandenen Pellets. Die 96 well-Mikrotiterplatten wurden mit je 5000 bis 10000 Zellen pro well nach Kollagenbeschichtung (s. 2.2) beimpft. Zur Kultivierung wurden die PC12-Zellen in 75 cm²-Flaschen kultiviert und alle 2 bis 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Medium wurde RPMI-1640 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) – mit 5 % fetalen Kälberserum, 10% Pferdeserum sowie 1 % (50 µg/ml) Penicillin/Streptomycin (pen/strep, P/S) versetzt – verwendet. Die Kultivierung über 2 bis 4 Tage bis zur Konfluenz erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.9 Humane Neuroblastomzellen SH-SY5Y

2.9.1 Allgemeines

SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomzellen) sind ein Subklon der SK-N-SH-Zelllinie, welche ursprünglich aus einem Knochenmarksaspirat eines thorakalen katecholaminsezernierenden Neuroblastoms gewonnen wurde (Biedler et al., 1973; Biedler et al., 1978). SH-SY5Y-Zellen haben die Fähigkeit, unter dem Einfluss verschiedener Substanzen *in vitro* auszudifferenzieren (s. 2.9.3).

2.9.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung erfolgte in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), mit 15% fetalem Kälberserum, 1% P/S und 1% Glutamin; zur Passagierung der Zellen wurde Trypsin verwendet (zur Trypsinierung siehe 2.1.4). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Zellpassagierungen wurden nicht öfter als 15-mal durchgeführt.

2.9.3 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen sind in der Lage, durch Behandlung mit verschiedenen Substanzen auszudifferenzieren. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden sowohl undifferenzierte Zellen verwendet, wie auch eine Differenzierung der Zellen über 5 bis 7 Tage mit 10 µM Retinolsäure (RA) vorgenommen. Hierbei kommt es durch eine Verminderung der Proliferationsrate zu einer Hemmung des Zellwachstums, Verstärkung der Adhärenz und zur Ausbildung neuritischer Zellfortsätze (Pahlman et al., 1995; Yu et al., 2003). Ausdifferenzierung mittels Retinolsäure führt weiterhin zur Expressierung von Dopamin(D2)-Rezeptoren an der Zelloberfläche.

2.10 Sterilfiltration

Sämtliche in Inkubationsexperimenten verwendeten chemischen Substanzen wurden (wenn nicht anders vermerkt) nach Abwiegen in Medium gelöst und mit Einmalfiltereinheiten sterilfiltriert. Anschließend wurden die Substanzen entweder direkt für Experimente genutzt oder als Stocklösung bei -80° eingefroren.

2.11 Koinkubation von Hcy und Kupfer

Für die Experimente wurde das in Medium lösliche Kupferchlorid (CuCl₂) mit einem Molekulargewicht von 170,5 verwendet. Dies wurde gemeinsam mit ebenfalls in Medium gelöstem Hcy zur Inkubation in die jeweiligen wells pipettiert.

2.12 Präinkubation mit Kupfer

Für die Experimente wurde ebenfalls das in Medium lösliche Kupferchlorid (CuCl₂) wie bei der Koinkubation mit Hcy verwendet. Die direkte Interaktion zwischen Hcy und Kupfer in Präinkubationsversuchen wurde verhindert, indem die Zellen nach einer zwölfstündigen Präinkubation mit Kupfer mit PBS gewaschen und anschließend mit der entsprechenden Konzentration Hcy in Medium inkubiert wurden. Parallel mitgeführte Kontrollen ohne Kupferpräinkubation, wie auch ohne Hcy-Inkubation, wurden nach dem gleichen Prozedere mit

PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Bei den CGN wurde konditioniertes Medium zum Waschen und zur nachfolgenden Kupferpräinkubation verwendet, da ein Waschen mit PBS zu einer starken Verminderung der Vitalität der CGN geführt hätte (zur Gewinnung von konditioniertem Medium siehe 2.7.4).

2.13 Inkubationen mit Homocystein

Hcy wurde in Medium gelöst und in entsprechender Konzentration zu den wells pipettiert. Bei den hier verwendeten Hcy-Konzentrationen kam es zu keiner Veränderung des pH-Wertes im Medium.

2.14 TUNEL-Assay

Zur Detektion des programmierten Zelltodes wurden die für Apoptose spezifischen DNA-Strangbrüche am 3'-Ende mit Biotin-gekoppelten 2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphat (dUTP) über eine Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) markiert (siehe Abbildung 10) und anschließend über Nitroblautetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (NBT/BCIP) angefärbt.

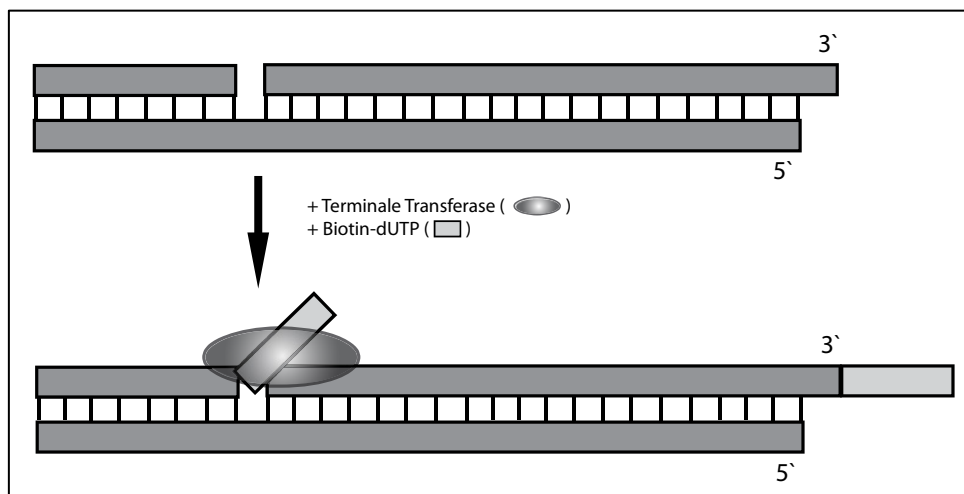


Abbildung 10: Prinzip des TUNEL-Assays: Strangbrüche in apoptotischen Zellen werden unter Zugabe von biotinylierten dNTPs mit Hilfe einer Terminalen Transferase markiert und anschließend gefärbt

Die so markierten Strangbrüche können auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Vitale Zellen nehmen keine relevanten Mengen gekoppelter dUTPs auf, da die hierfür benötigten 3'-hydroxyl-DNA-Enden fehlen.

2.14.1 Lösungen

TdT-Puffer:	30 mM Tris, 140mM Natriumcacodylat ad <i>Aqua bidestillata (Aqua bidest)</i> [pH=6,6]
Saline-sodium citrate-(SSC-)Puffer:	150 mM NaCl, 15 mM Natriumacetat ad <i>Aqua bidest</i>
Alkalische Phosphatase-(AP-)Puffer:	100mM Tris, 50 mM NaCl ad <i>Aqua bidest</i> [pH 7,5]
Blocking:	BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>) (2 g ad PBS 100 ml)

2.14.2 Zellvorbereitung

Die PC12-Zellen wurden auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgersystem aufgetragen. 1%-iges Poly-L-Lysin aus (in sterilem *Aqua bidest* gelöst und bei -20 °C eingefrorenen) Aliquots wurde vor Gebrauch 1:100 mit *Aqua bidest* verdünnt. Die 8 Kammern des Objektträgers wurden mit je 100 µl 0,01% Poly-L-Lysin beschichtet und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde, sofern erforderlich, überschüssiges Poly-L-Lysin abgesaugt und die Objektträger luftgetrocknet. Pro Kammer wurden 50000 bis 100000 Zellen ausgesät und über Nacht inkubiert. Generell wurden unbehandelte Kontrollzellen mitgeführt und gefärbt.

2.14.3 TUNEL-Färbung

1. Medium absaugen
2. 10 Minuten mit 100 µl 4% Formaldehyd/PBS fixieren
3. Absaugen
4. 10 Minuten mit 100 µl 0,5% Triton X/PBS zur Membranpermeabilisierung inkubieren
5. Absaugen
6. Waschen mit PBS
7. 10 Minuten mit 100 µl TdT Puffer äquilibrieren
8. Terminale Transferase Detektion (Angaben pro Probe)

<i>Aqua bidest</i>	73,5 µl
TdT Puffer	20,0 µl
CoCl ₂ (Kobalt(II)chlorid)	4,0 µl (1 mM)
dUTP	2,0 µl (20 µM)
Terminale Transferase	0,5 µl (0,25 U)
Σ	100 µl

Proben eine Stunde bei 37 °C inkubieren.

9. Absaugen
10. 15 Minuten 1-fach SSC Puffer aufpipettieren (Stoppen der Enzymaktivität)
11. Zweimal mit PBS spülen
12. 10 Minuten mit 2%igem BSA in PBS blockieren
13. Zweimal mit *Aqua bidest* spülen
14. 100 µl / Probe Streptavidin-AP-Konjugat (Boehringer, Ingelheim, Deutschland) 1:500 mit AP-Puffer verdünnen, aufpipettieren und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
15. Fünfmal mit *Aqua bidest* waschen
16. 100 µl / Probe AP-Substrat aufpipettieren:

<u>Ansatz für 10 Proben:</u>	NBT	3,5 µl
	BCIP	3,75 µl
	NBT-Puffer	1 ml
17. Farbreaktion abwarten (5 bis 20 Minuten)
18. Proben eindeckeln oder trocknen lassen

2.14.4 Dokumentation

Repräsentative Fotos der TUNEL-Färbungen wurden mittels Kameramikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss Jena) aufgenommen und in Adobe Photoshop CS3 lediglich zur Schwarz-Weiß-Abbildung bearbeitet.

2.15 Messung der Atmungskettenaktivität (COX)

2.15.1 Vorbereitung der Zellpellets

Für die Messung der Cytochrom *c*-Oxidase (COX) wurden Zellen in 75 cm²-Flaschen parallel passagiert, kultiviert und bei gleichmäßig bewachsenem Flaschenboden ein Mediumwechsel (mit und ohne 10 mM Hcy) durchgeführt. Der Mediumwechsel wurde sowohl bei der zu jeder Messung parallel kultivierten Kontrolle wie auch bei den entsprechenden Hcy-Inkubationen über die jeweils veranschlagte Zeit durchgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert (siehe 2.1.4) und die Zellpellets wie beschrieben in DMSO bei -80° eingefroren und der Messung der COX-Aktivität zugeführt.

2.15.2 Messmethode

Die Messung der Atmungskettenenzyme wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wolfram Kunz durchgeführt.

Die Messung der Aktivität der Atmungskette (Komplex IV) wurde nach einem entsprechenden Standardverfahren durchgeführt (Wiedemann et al., 2000):

Cytochrom *c*-Oxidase (COX, Komplex IV): Die COX-Aktivität wurde bei 30°C in 100 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) mit 0,02% Laurylmaltosid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mittels der Oxidation von Ferrocycytochrom *c* in seiner β -Bande mittels der Wellenlängen von 510 bis 535 nm ($\epsilon_{\text{red-ox}}=5,9/\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in einem Dual-Wellenlängenspektrophotometer (Aminco DW 2000, SLM Instruments, Rochester, NY, USA) gemessen.

Zitratsynthase: Die Zitratsynthaseaktivität wurde mittels Standardmethode ermittelt, und diente der Normalisierung der Komplex-IV-Aktivität (Zusätzlich wurden Zellzählungen zur Normalisierung der Enzymaktivität durchgeführt).

2.16 Substanzen

Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland in höchstmöglicher Reinheit bezogen und, wenn nicht anders beschrieben, in Medium gelöst und sterilfiltriert.

2.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels univariater Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) und anschließender post-hoc-Analyse (Bonferroni) vorgenommen (SPSS 15.0).

	Kontrolle A		5 mM Hcy		10 mM Hcy		20 mM Hcy			
A										
B	1287,5	1700,9	1463	1349,2	823,55	859,63	811,61	480,46	339,99	0
C	1671,5	1501,9	1254,3	1232,3	966,62	919,12	669,59	473,42	307,11	0
D	1312,6	1451,4	1163,6	1185,2	973,85	853,11	788,27	437,99	318,75	0
E	1654,4	1526,5	1054,3	1293,9	806,7	746,89	682,4	396,47	374,95	0
F	1873,9	1648,9	1381,9	1129,1	955,98	817,94	568,55	443,73	336,86	0
G	1609,5	1811,6	0	0	800,37	752,93	517,74	0	0	0
H										
I										
J										

Abbildung 11: Exemplarischer Aufbau der Messung in einer 96 well – Mikrotiterplatte (siehe auch Fluoreszenzmessung 3.2.1)

Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus der Gesamtheit der Versuchsergebnisse errechnet, die Analyse wurde mit mindestens 5 Werten pro Versuchsreihe (in SH-SY5Y und CGN mindestens 3 Werten) durchgeführt (siehe auch Abbildung 11 und 3.2.1). Unabhängige Wiederholungen mit jeweiligen Kontrollen wurden mindestens zweimal auf neu ausgesäten und beimpften Platten zur Bestätigung durchgeführt und mittels ANOVA analysiert. Generell wurden nach signifikantem Ergebnis in der ANOVA post-hoc-Analysen nach Bonferroni durchgeführt und die verschiedenen Gruppen untereinander und gegen die Kontrolle verglichen. Als signifikantes Testergebnis wurde $p < 0,05$ bei einem Konfidenzintervall von 95% gewählt. Sternchen kennzeichnen die Signifikanzen: ein Sternchen bedeutet $p < 0,05$, zwei Sternchen bedeuten $p < 0,01$, drei Sternchen $p < 0,001$.

.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form von Tabellen und Diagrammen. Die Diagramme zeigen jeweils normierte prozentuale Angaben von ROS (Fluoreszenz), COX-Aktivität und zellulärer Vitalität sowie die korrespondierenden Standardabweichungen in Prozent. Exemplarisch für die Berechnungen sind die vollständigen Daten einer Versuchsreihe (Absolutwerte der Fluoreszenz), positive und negative Kontrollen, Homocysteintoxizität sowie ihre statistische Auswertung für folgende Experimente tabellarisch aufgeführt: Hcy-Toxizität in PC12-Zellen (Vitalität, 3.2.1) und ROS-Entstehung über 24 Stunden durch eine 10 mM Hcy-Inkubation in PC12-Zellen (3.3.5). Aufgrund der Fülle der Einzelwerte wird ansonsten auf eine vollständige Darstellung verzichtet. Generell wurden auf jeder Mikrotiterplatte Kontrollen zur Vergleichbarkeit (positive Kontrollen mit H₂O₂ für ROS, negative Kontrollen für ROS und Vitalität in unbehandelten Zellen) verschiedener Platten mitgeführt. Diese wurden dazu genutzt, die jeweiligen Werte gegenüber 100% Zellvitalität oder ROS zu normieren, um die korrekte Relation gegenüber der zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung vitalen Zellzahl herzustellen. Bei allen Versuchen zur Vitalitätsbestimmung erfolgte nach Zugabe der Reagenzien eine Kontrolle des pH-Wertes. Veränderungen zeigten sich hierbei nicht.

3.2 Toxizität und Apoptoseinduktion durch Homocystein in PC12-Zellen

3.2.1 Hcy-Toxizität in PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden in 96 well-Platten über 24 Stunden mit verschiedenen Hcy-Konzentrationen von 100 µM bis 20 mM beimpft. Bei der anschließenden Messung der Vitalität (alamarBlue™, siehe 2.5) zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des Vitalitätsverlustes durch Hcy mit einer LD₅₀ von 10 mM Hcy. Diese Hcy-Konzentration wurde in den weiterführenden Experimenten an PC12-Zellen im Zeitverlauf und zur Untersuchung des Zelltodes mittels TUNEL-Assay verwendet. Beispielfhaft an 96 well-Mikrotiterplatten sind hier einmalig die kompletten Fluoreszenzmessdaten eines Versuches (alamarBlue™) aufgeführt. Analog hierzu wurden in den folgenden Vitalitätsmessungen dieser Arbeit die Auswertungen durchgeführt. Kontrollen A, B und C entsprechen hier jeweils den mitgeführten Kontrollen einer Platte, gegen die normiert wurde (entspricht 100%). Hierdurch wurde eine korrekte Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch zwischen verschiedenen Platten gewährleistet.

Tabelle 7: alamarBlue™-Fluoreszenz (Zellvitalität) nach 24 Stunden Inkubation verschiedener Konzentrationen (100 µM bis 20 mM) von Hcy sowie unbehandelten Zellen (Kontrolle) in PC12-Zellen (siehe auch Abbildung 12)

Kontrolle A	5 mM	10 mM	20 mM
1287,5	1463	823,55	480,46
1671,5	1254,3	966,62	473,42
1312,6	1163,6	973,85	437,99
1654,4	1054,3	806,7	396,47
1873,9	1381,9	955,98	443,73
1609,5	1349,2	800,37	339,99
1700,9	1232,3	859,63	307,11
1501,9	1185,2	919,12	318,75
1451,4	1293,9	853,11	374,95
1526,5	1129,1	746,89	336,86
1648,9		817,94	
1811,6		752,93	
		811,61	
		669,59	
		788,27	
		682,4	
		568,55	
		517,74	

Kontrolle B	250 µM	1 mM	Kontrolle C	100 µM
1206,7	970,32	849,01	1382,8	1430,3
1270,5	981,48	949,84	1592	1501,6
1031	991,88	894,96	1485,7	1561
1173,1	1062,4	952,02	1270,4	1183,2
1067,1	1028,2	924,46	1583,7	1261,7
	1017,5	1010	1434,5	1246,1
	1054,3	958,48	1216,3	1165,3
	1146,1	1001,9	1242,7	1353,5
			1452	1129,8
			1330,1	1379,6
			1391	1189,9
			1435,4	1287,5
			1362,5	1416

	Kontrolle A	5 mM	10 mM	20 mM
Mittelwerte	1587,55	1250,68	795,27	390,97
Standardabweichungen	172,25	118,09	123,1	61,53
Normierte Mittelwerte	1587,55	1250,68	795,27	390,97
Mittelwerte [%]	100	78,78	50,09	24,63
Standardabweichungen [%]	10,85	7,44	7,75	3,88

	Kontrolle B	250 µM	1 mM	Kontrolle C	100 µM
Mittelwerte	1149,68	1031,52	942,58	1398,39	1315,81
Standardabweichungen [%]	88,66	53,19	49,76	112,67	130,84
Normierte Mittelwerte	1587,55	1424,39	1301,58	1587,55	1493,79
Mittelwerte [%]	100	89,72	81,99	100	94,09
Standardabweichungen [%]	5,58	3,35	3,13	7,1	8,24

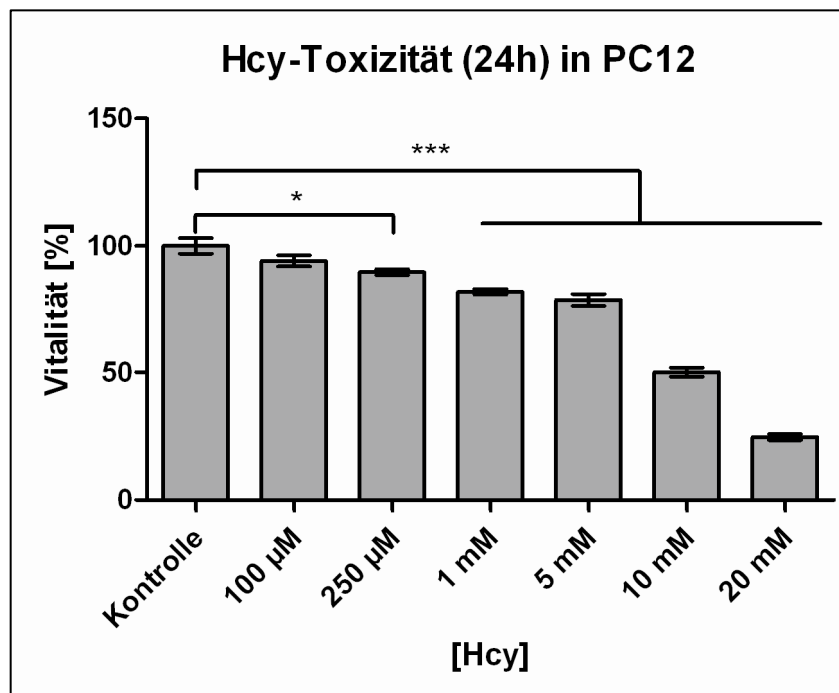


Abbildung 12: Für die Hcy-Toxizitätsreihe in PC12-Zellen über 24 Stunden ergibt sich eine Dosisabhängigkeit der Vitalität nach Hcy-Inkubation; die LD₅₀ liegt diesbezüglich bei 10 mM Homocystein; für weitere Experimente (TUNEL, siehe 3.2.2) wurde die entsprechende Konzentration verwendet.

3.2.2 TUNEL-Assay zur Apoptosedetektion

Nach Bestimmung der LD₅₀ von 10 mM Hcy wurde nach einer Inkubation über 24 Stunden ein TUNEL-Assay zur Untersuchung des Zelltodes durchgeführt. Hierbei zeigte sich vornehmlich Apoptose durch die Hcy-Inkubation. TUNEL-Assays wurden sowohl in Objektträgersystemen wie auch in 96-well-plates zur Bestätigung durchgeführt. Exemplarisch hier aufgeführte repräsentative Bilder zeigen apoptotische Zellen mit den typischen Charakteristika (Schrumpfung der Zellen, „membrane blebbing“).

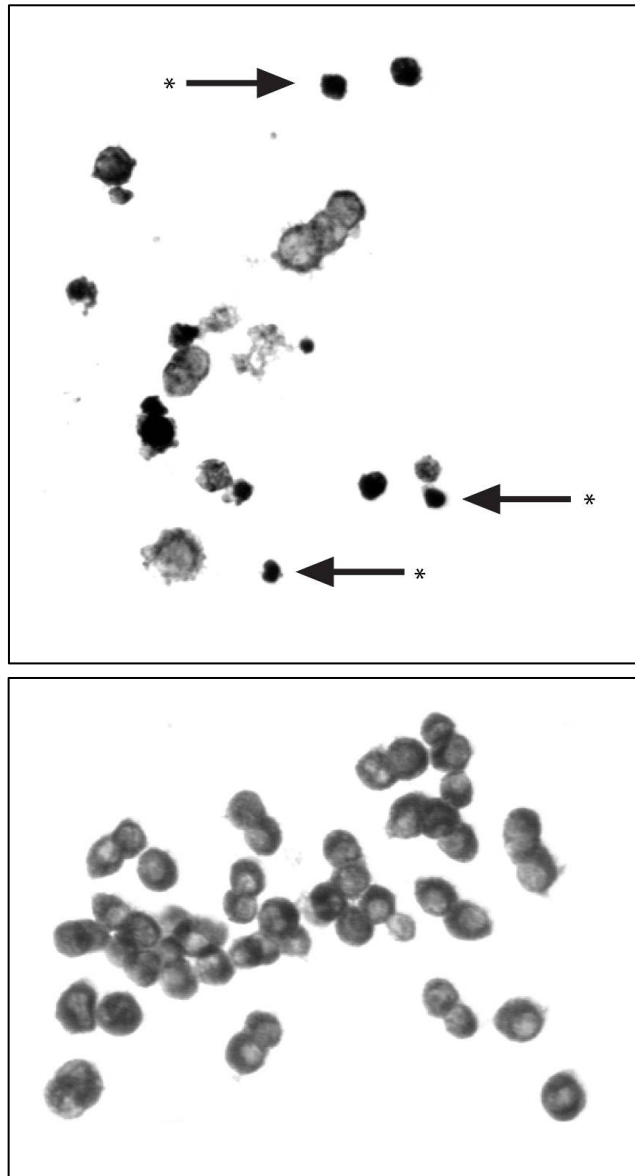


Abbildung 13: TUNEL-Bilder PC12, *markiert TUNEL-positive, apoptotische Zellen mit typischen Merkmalen; 20-fach vergrößert (13a: Inkubation mit 10 mM Hcy über 24 Stunden, 13b: Kontrollzellen nach 24 Stunden ohne Hcy-Stress, Mediumwechsel wurden zur Vergleichbarkeit auch bei Kontrollen durchgeführt)

3.3 Vitalität und ROS-Entstehung durch Hcy über 24 Stunden in PC12-Zellen

Zur Untersuchung der Rolle reaktiver Sauerstoffspezies in der Hcy-vermittelten Toxizität wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden die entstehenden ROS (mittels DCF-Fluoreszenz) sowie die Zellvitalität für Hcy-Konzentrationen von 5 μM bis 10 mM Hcy untersucht. Es zeigte sich für die Kinetik der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ein von der Konzentration des Hcy in seiner quantitativen Ausprägung abhängiger, in seiner qualitativen Ausprägung vergleichbarer Verlauf: Ab einer Konzentration von 500 μM kam es – entgegen der Erwartung, dass Homocystein selbst zur Entstehung von ROS führt – signifikant zu einer Verringerung der intrazellulären ROS-Konzentration 3 Stunden nach Beginn der Hcy-Inkubation ($p < 0,001$), eine Tendenz zeigte sich bereits bei 50 μM Hcy. Im weiteren Verlauf zeigte sich dann ein Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies gegenüber unbehandelten Zellen. Dies unterstützt bisherige Experimente unserer Arbeitsgruppe, in denen wir zeigen konnten, dass es nicht zu einer Hemmung der NADH-Q-Reduktase (welche allgemein als Marker für die Entstehung von ROS gilt) kommt, sondern zu einer Hemmung der Cytochrom *c* Oxidase (COX) (Linnebank et al., 2006). Weiterhin wurde für die LD₅₀ von 10 mM an PC12-Zellen eine vergleichende Zeitkinetik über die Hemmung der COX-Aktivität bestimmt (*Durchführung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfram Kunz*). Es zeigte sich hierbei ein zeitabhängiger Verlust der Enzymfunktion (siehe 3.3.5).

3.3.1 5 μM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen

Zunächst wurden PC12-Zellen mit 5 μM Hcy inkubiert (siehe auch Abbildung 14).

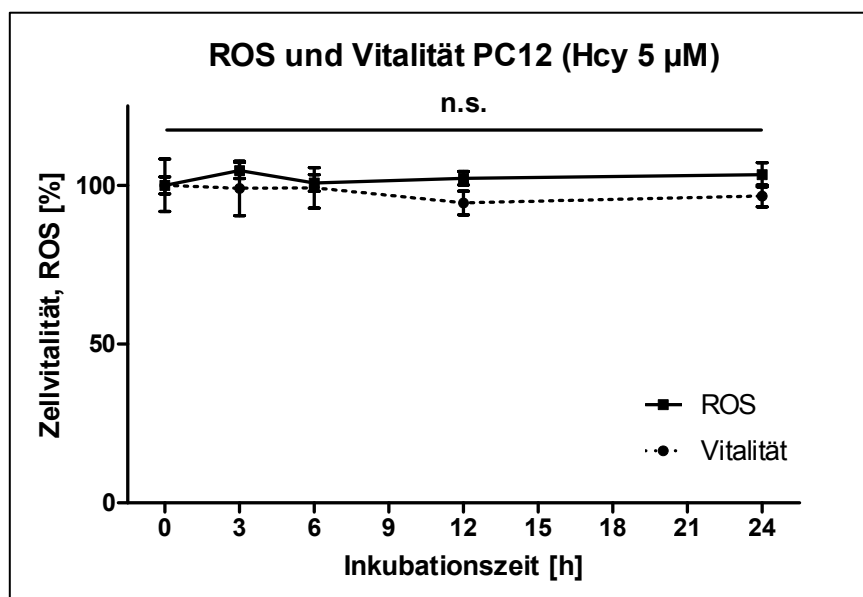


Abbildung 14: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden Hcy-Inkubation (5 μM Hcy). Kontrollwerte zu Beginn entsprechen 100 %.

Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies oder Minderung der Zellvitalität über 24 Stunden (n.s. in der univariaten ANOVA, $p = 0,106$ [ROS], $p = 0,659$ [Vitalität]).

3.3.2 50 μM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen

Durch Inkubation von PC12-Zellen mit 50 μM Homocystein ergab sich über 24 Stunden ein signifikanter Unterschied in der Entstehung von ROS (ANOVA, $p < 0,001$) und Vitalität (ANOVA, $p < 0,01$).

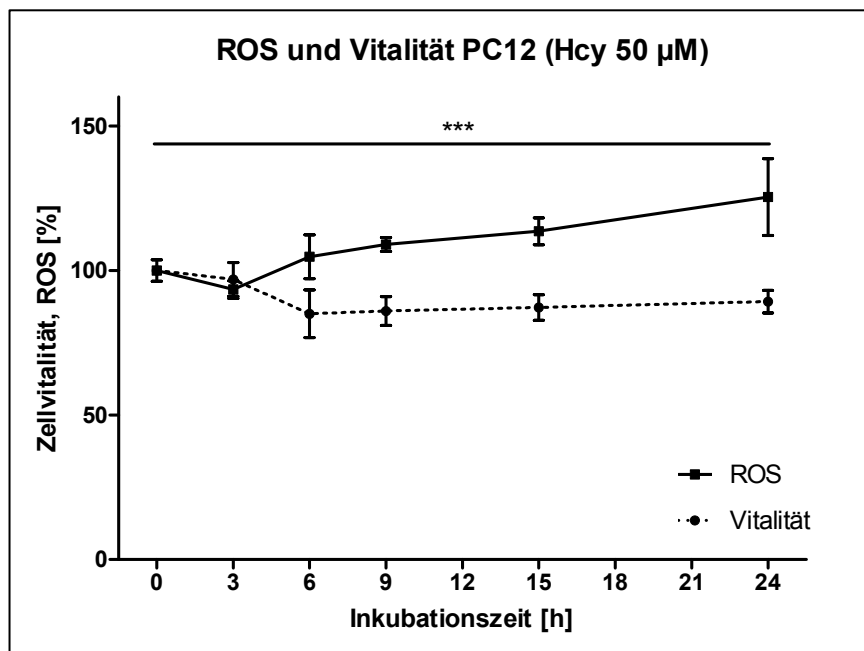


Abbildung 15: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlueTM) über 24 Stunden in PC12-Zellen durch 50 μM -Homocysteininkubation. Signifikante Erhöhung der ROS-Entstehung nach 24 Stunden ($p < 0,001$, ANOVA, Bonferroni post hoc). Kontrollwerte zu Beginn entsprechen 100 %.

Nach 3 Stunden zeigte sich eine tendenzielle Verminderung von ROS welche in der Bonferroni-Angleichung noch nicht signifikant war (einfacher t-Test zwischen 0 und 3 Stunden $p = 0,03$), sowie 24 Stunden nach Inkubation ein signifikanter Anstieg der ROS ($p < 0,001$). 6 Stunden nach Beginn der Inkubation zeigt sich die Zellvitalität ebenfalls gegenüber dem Ausgangswert signifikant verringert ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 15).

3.3.3 500 μM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen

Durch Inkubation von PC12-Zellen mit 500 μM Homocystein ergab sich zunächst ein signifikanter Abfall der ROS-Konzentration (Bonferroni-Angleichung, $p = 0,032$) nach 3 Stunden, sowie im Verlauf ein Anstieg der durch Hcy-Inkubation entstehenden ROS ($p = 0,002$) bei 24 Stunden (siehe Abbildung 16).

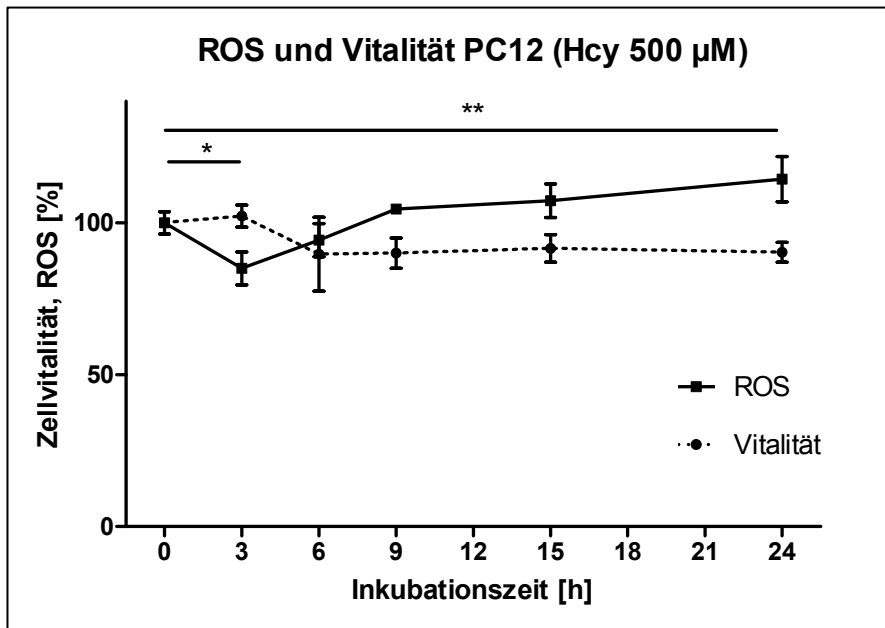


Abbildung 16: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden in PC12-Zellen durch 500 µM-Homocysteininkubation. Kontrollwerte zu Beginn entsprechen 100 %.

3.3.4 1 mM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen

Durch Inkubation von PC12-Zellen mit 1 mM Homocystein über 24 Stunden ergab sich zunächst ein hochsignifikanter Abfall der entstehenden ROS ($p < 0,001$) nach 3 Stunden.

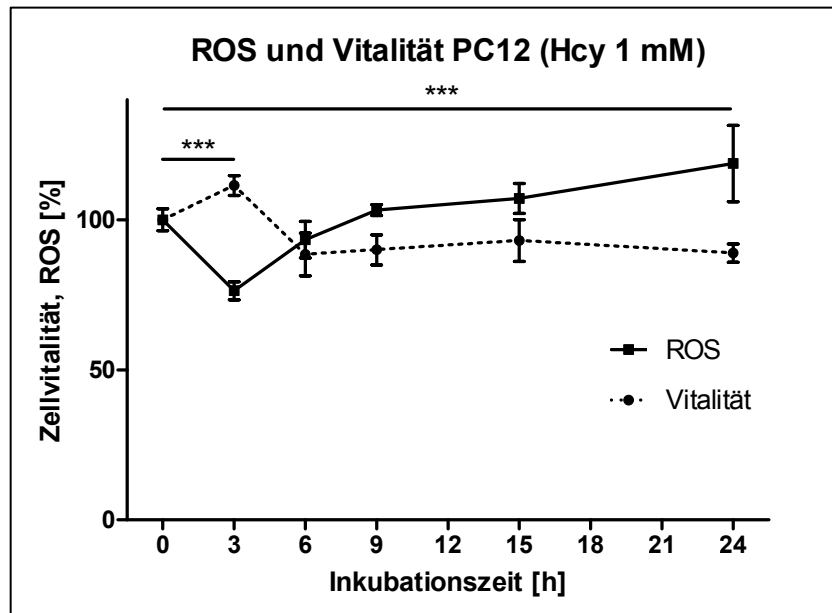


Abbildung 17: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden in PC12-Zellen (1 mM-Homocysteininkubation). Kontrollwerte zu Beginn entsprechen 100 %.

Im weiteren Verlauf zeigte sich dann ein hochsignifikanter Anstieg der durch die Hcy-Inkubation entstandenen ROS ($p < 0,001$ bei 24 Stunden, siehe Abbildung 17).

3.3.5 10 mM Homocystein über 24 Stunden in PC12-Zellen

Für die LD_{50} von 10 mM zeigte sich in der Zeitkinetik über 24 Stunden nach 3 Stunden der ausgeprägte Abfall intrazellulär entstandener ROS verglichen mit der DCF-Fluoreszenz niedrigerer Hcy-Konzentrationen (Bonferroni-Angleichung $p < 0,001$ für 3 und 6 Stunden gegenüber Ausgangswert).

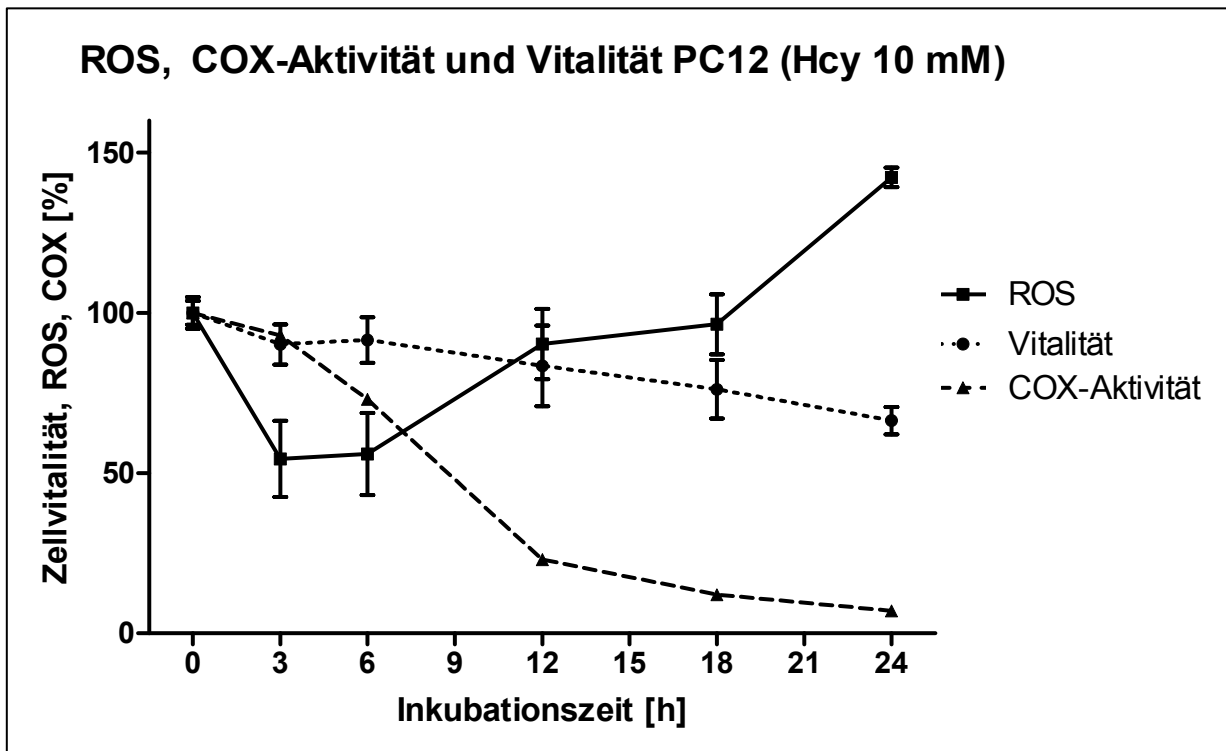


Abbildung 18: ROS, COX, Vitalität über 24 Stunden Inkubation mit Hcy (10 mM) in PC12-Zellen. Bei zunehmender Minderung der COX-Aktivität kommt es zu einem Abfall der Zellvitalität und verstärkter ROS-Entstehung (zur Bonferroni-Analyse nach ANOVA zur ROS-Entwicklung über 24 Stunden siehe Tabelle 8)

Parallel zur Messung des oxidativen Stresses wurden Zellpellets für die COX-Messung in 75 cm²-Flaschen kultiviert. Folgend wurden neben ROS, COX und Vitalität im Diagramm auch exemplarisch die ROS-Fluoreszenzmessungen mit den entsprechenden Berechnungen dargestellt (siehe auch 2.17). Es zeigte sich ein im Zeitverlauf zunehmender Verlust der COX-Aktivität, wobei nach etwa 12 Stunden noch eine Restfunktion der COX von 23% vorhanden war, nach 24 Stunden nur noch 7% (siehe Abbildung 18). Begleitend kam es zu einem Anstieg zellulärer ROS.

Tabelle 8: Signifikante Veränderung der ROS-Freisetzung bei 3, 6 und 24 Stunden in der Bonferroni-Angleichung nach ANOVA ($p < 0,001$, 10 mM Hcy in PC12-Zellen)

<i>Bonferroni post hoc nach ANOVA</i>	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h
p	< 0,001	< 0,001	n.s.	n.s.	< 0,001

Tabelle 9: Fluoreszenzmessungen zur Zellvitalität und ROS sowie Bestimmung der COX-Aktivität in PC12-Zellen über 24 Stunden (10 mM Hcy)

Kontr. 3 h	H ₂ O ₂ 3 h	Hcy 3 h	Kontr. 6 h	H ₂ O ₂ 6 h	Hcy 6 h	Kontr. 12 h
361,92	718,64	203,37	246,28	415,34	145,15	286,77
457,66	611,34	208,06	253,8	411,5	162,5	305,29
453,14	651,72	221,82	256,76	481,71	110,64	317,37
458,06	685,85	180,5	256,48	407,23	136,14	326,65
351,19	724,33	219,72	276,34	481,26	96,87	410,01
456,24	763,93	189,65		412,45	138,41	460,66
		242,97			149,21	
		254,28			160,24	
		209,08			124,73	
		186,27			109,64	
		163,36			110,46	
		162,25			130,21	
		238,66			130,69	
		220,7			140,47	
		213,31			136,14	

H ₂ O ₂ 12 h	Hcy 12 h	Kontr. 18 h	H ₂ O ₂ 18 h	Hcy 18 h	Kontr. 24 h	H ₂ O ₂ 24 h	Hcy 24 h
504,29	264,53	346,81	527,99	294,51	160,93	244,96	164,37
494,86	265,04	356,87	562,52	235,33	164,87	257,51	157,04
524,62	279,03	379,4	624,94	280,24	173,62	250,65	169,26
547,48	294,04	382,93	575,09	343,37	168,12	247,07	162,67
602,21	258,5	397,14	577,57	278,14	171,08	250,47	168,01
	318,01		627,28	282,39	178,48	259,14	169,47
	254,35			309,91			160,42
	288,25			243,79			152,28
	154,14			316,14			164,31
	269,77			257,24			153,08
	295,21			212,66			161,89
	306,25			253,95			163,65
	281,69			252			149,03
	176,75			292,69			146,06
				254,32			

	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Kontrollen absolut	423,04	257,93	351,13	372,63	169,52
Hcy absolut	207,6	132,1	264,68	273,78	160,11
H₂O₂ absolut	692,64	434,92	534,69	582,57	251,63
Standardabweichungen Kontrollen absolut	47,14	9,95	62,51	18,26	5,73
Standardabweichungen Hcy absolut	26,45	18,36	44,35	33,9	7,23
Standardabweichungen H₂O₂ absolut	50,15	33,02	38,3	34,78	5,14
Hcy [%]	49,07	51,21	75,38	73,47	94,45
H₂O₂ [%]	163,73	168,62	152,28	156,34	148,44
Standardabweichungen Kontrollen [%]	11,14	3,86	17,8	4,9	3,38
Standardabweichungen Hcy [%]	6,25	7,12	12,63	9,1	4,27
Standardabweichungen H₂O₂ [%]	11,86	12,8	10,91	9,33	3,03
Vitalität bei Hcy-Inkubation [%]	90,17	91,54	83,49	76,17	66,38
Normierung der ROS auf die Zellvitalität [%]	54,42	55,95	90,29	96,45	142,29
COX-Aktivität	93	73	23	12	7

3.4 ROS in Abhängigkeit verschiedener Hcy-Konzentrationen in PC12-Zellen

Abbildung 19 zeigt noch einmal graphisch vergleichend die Kinetik der ROS-Entstehung in Abhängigkeit der verwendeten Hcy-Konzentration.

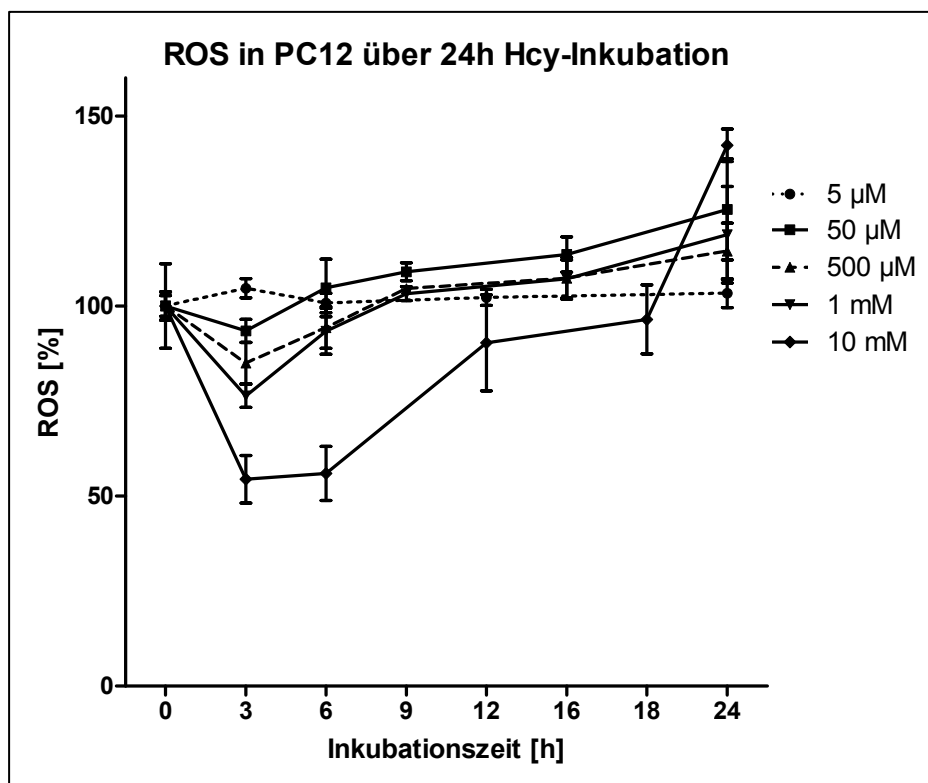


Abbildung 19: Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies über 24 Stunden durch Inkubation mit Homocystein in PC12-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration (von 5 µM bis 10 mM Hcy)

Dosisabhängig kam es hierbei zu einer initial geringeren ROS-Produktion und im Verlauf zu einer sekundären Vermehrung der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies. Verringerte Zellvitalität durch Hcy-Inkubation wurde initial nicht begleitet von einem signifikanten Anstieg von ROS; im Gegenteil kam es (in den hier dargestellten Untersuchungen in der Tendenz ab 50 μM , signifikant ab 500 μM Hcy) zu einer verminderten Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies. Die Dosisabhängigkeit der durch Homocystein induzierten Vitalitätsminderung und sekundären ROS-Entstehung gibt einen Hinweis auf die Bedeutsamkeit des hier gezeigten toxischen Effektes auch für die Hyperhomocysteinämie-typischen Serumkonzentrationen im Menschen.

3.5 Untersuchungen zur Kupferpräinkubation und Homocysteintoxizität in zerebellären Körnerneuronen der Ratte

3.5.1 Zelltoxizität durch Homocystein

Zur Bestimmung der Toxizität von Hcy in primären zerebellären Neuronen wurde eine Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Hcy durchgeführt. Hieraus ergab sich für 10 mM eine Restvitalität nach 24 Stunden von $58,21 \pm 5,60\%$. Entsprechend wurde 10 mM Hcy als ungefähre LD_{50} in den weiteren Präinkubationen verwendet.

3.5.2 Zelltoxizität durch Kupfer

Zur Abschätzung der Toxizität einer Kupferpräinkubation über 12 Stunden wurde zunächst eine Inkubation der CGN mit verschiedenen Kupfer-Konzentrationen durchgeführt.

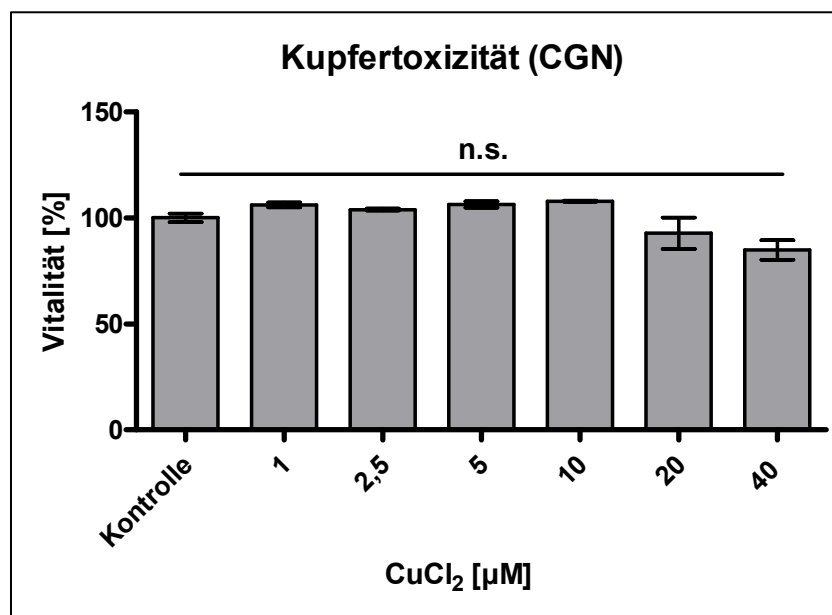


Abbildung 20: Kupfertoxizität in primären zerebellären Neuronen über 24 Stunden. Bis zu einer Konzentration von 40 μM zeigt sich kein signifikanter Anfall der Zellvitalität durch Kupferinkubation (ANOVA, $p = 0,064$).

Eine über 24 Stunden durchgeführte Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen zeigte keinen signifikanten Vitalitätsabfall ($p = 0,064$; ANOVA), so dass zwischen $5 \mu\text{M}$ und $40 \mu\text{M}$ CuCl_2 zur intrazellulären Kupferbeladung verwendet wurden (siehe auch 3.5.4). Die Präinkubation erfolgte im Gegensatz zur Toxizitätsbestimmung nur über 12 Stunden, so dass im sicher subtoxischen Bereich gearbeitet wurde.

3.5.3 Toxizitätspotenzierung von Kupfer und Homocystein bei Koinkubation

Bisherige Studien zeigten einen Synergismus bzw. eine Sensitivierung der Toxizität von Hcy und Kupfer *in vitro* (Austin et al., 1998; Starkebaum und Harlan, 1986). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse führten wir parallel ebenfalls eine Koinkubation von Hcy und Kupfer in den für die Präinkubation verwendeten Konzentrationen durch. Die Koinkubation in entsprechend niedrigen Konzentrationen in CGN führte zu einer Erniedrigung der gemessenen Zellvitalität auf 10% nach 24 Stunden, und bestätigte hiermit einen synergistischen Effekt von Kupfer und Hcy bei simultaner Inkubation (siehe Abbildung 21).

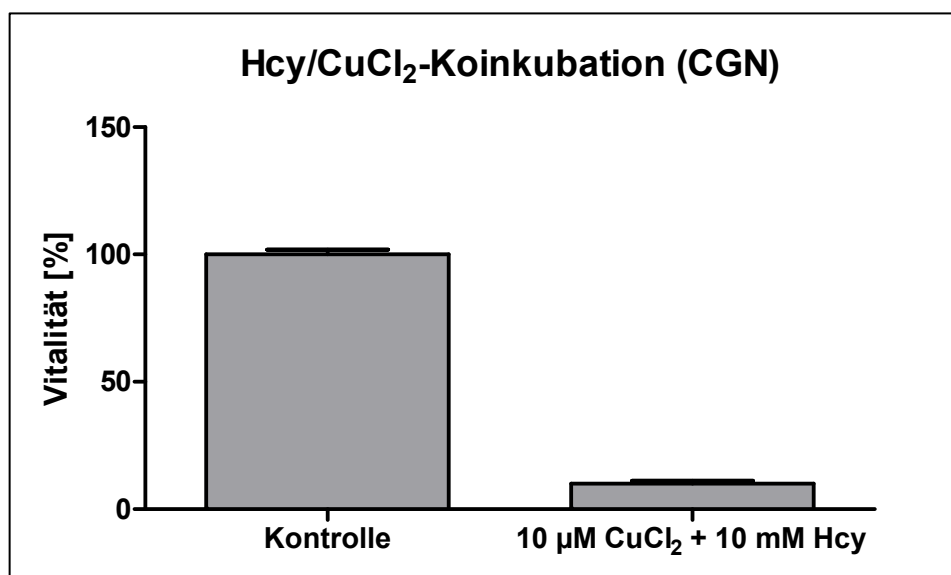


Abbildung 21: Koinkubation Homocystein / CuCl_2 in primären zerebellären Körnerneuronen

3.5.4 Präinkubation mit Kupfer in verschiedenen Konzentrationen

Zur Vermeidung von Interaktionen zwischen Kupfer und Homocystein im Medium wurden die Zellen mit einer subtoxischen Menge CuCl_2 vorinkubiert. Neben der Frage, ob sich eine Protektion gegenüber Homocystein durch eine Beladung der Zellen mit Kupfer auch in CGN zeigen würde, wurde auch mit einer Reihe verschiedener Kupfer-Konzentrationen präinkubiert

um eine mögliche Dosisabhängigkeit des erwarteten protektiven Effektes zu untersuchen.

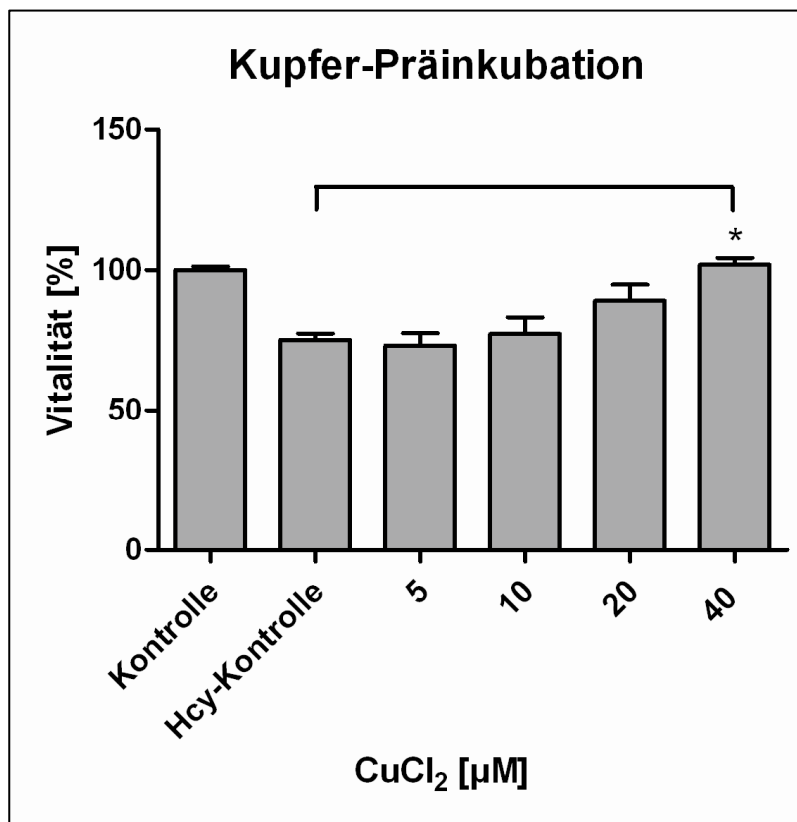


Abbildung 22: Kupferbeladung in CGN über 12 Stunden in Konzentrationen von 5 µM bis 40 µM mit anschließender Inkubation von 10 mM Hcy. Die Wiederherstellung der Vitalität zeigt sich dosisabhängig mit einem maximalen Effekt bei 40 µM CuCl₂ (p < 0,05).

Die Zellen wurden für 12 Stunden mit verschiedenen Kupfer-Konzentrationen von 5 µM bis 40 µM beladen, mit konditioniertem Medium gewaschen und anschließend mit 10 mM Homocystein über 24 Stunden inkubiert. In den Vitalitätsmessungen zeigte sich eine kupferabhängige Protektion vor Homocysteintoxizität (10 mM), welche bei 40 µM CuCl₂-Präinkubation am ausgeprägtesten (Wiederherstellung der Vitalität auf 102 ± 4%) war. Der aus den Vorversuchen ermittelte toxische Effekt von 10 mM Hcy mit einem Vitalitätsabfall auf 58% wurde in den Folgeversuchen hier quantitativ nicht erreicht (siehe Abbildung 22), was sich durch die Verwendung einer zweiten Charge zerebellärer Neurone erklären lässt (Mischkultur mit Astrozyten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber Hcy). Qualitativ zeigte sich jedoch hier ebenfalls der protektive Effekt durch eine Kupferaufladung der Zellen (siehe Tabelle 10). Mikroskopisch stellte sich eine Auflösung der typischen netzartigen Zellstruktur der primären Neurone mit Verlust der Dendriten und Ablösung der adhärenen Zellen in den Zellen ohne Kupferpräinkubation dar. In vorbeladenen Zellen zeigt sich eine Aufrechterhaltung der Zellintegrität, vergleichbar mit den Kontrollzellen. Präinkubation mit Kupfer schützt somit

dosisabhängig primäre Neuronen vor Homocysteintoxizität.

Tabelle 10: Protektion durch Kupferpräinkubation in zerebellären Neuronen (CGN), mit signifikanter Protektion bei 40 μM CuCl_2 über 12 Stunden Präinkubation (10 mM Hcy)

Post-hoc Bonferroni	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM
p	n.s.	n.s.	n.s.	< 0,05

3.1 Untersuchungen zur Kupferpräinkubation und Homocysteintoxizität in undifferenzierten humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)

3.1.1 Zelltoxizität durch Kupfer

Undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen wurden zunächst analog zu den primären zerebellären Neuronen auf ihre Toleranz gegenüber einer 24-stündigen Inkubation mit CuCl_2 untersucht (Toxizitätsbestimmung vor Kupferbeladung). Hier zeigte sich auch für Dosierungen von 50 und 100 μM Kupfer kein signifikanter Abfall der Vitalität (Bonferroni post hoc-Analyse nach einer ANOVA).

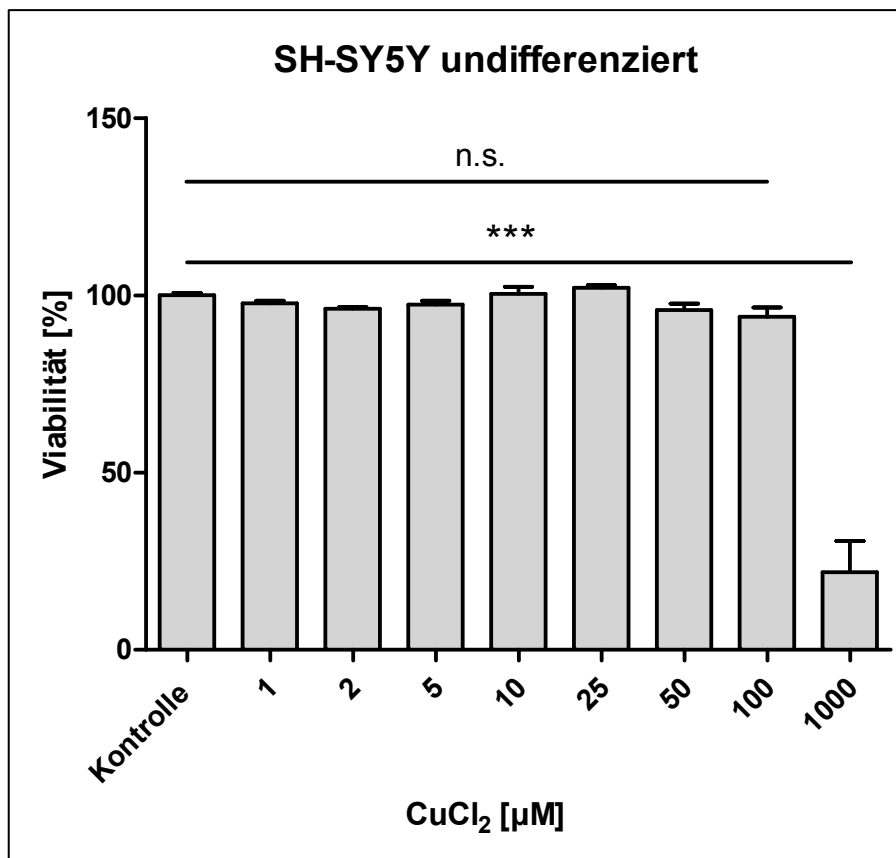


Abbildung 23: Toxizität durch CuCl_2 in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen (Inkubation über 24 Stunden): Vitalitätsabfall nicht signifikant bis 100 μM Kupfer, $p < 0,001$ für eine Kupferkonzentration von 1000 μM (Positivkontrolle) gegenüber unbehandelten Zellen

Als Positivkontrolle wurde mit 1 mM Kupferchlorid inkubiert. Hierbei zeigte sich ein Abfall der

Vitalität auf 21,9% ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 23).

3.1.2 Zelltoxizität durch Homocystein

Analog zu den PC12-Zellen wurde auch bei den SH-SY5Y eine Toxizitätsreihe mit verschiedenen Hcy-Konzentrationen erstellt. Hierbei zeigte sich eine LD_{50} zwischen 6 und 8 mmol/l (siehe Tabelle 11); Für weitere Experimente wurde 7 mmol/l Hcy zur Untersuchung der Homocysteintoxizität verwendet.

Tabelle 11: Hcy-Toxizität in SH-SY5Y-Zellen (Zellvitalität mittels alamarBlue™) über 24 Stunden, siehe auch Abbildung 24

	Kontrolle	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1 mM
Mittelwerte [%]	100	98,17	98,45	96,68	89,4
Std.-Abw. [%]	2,56	1,78	1,85	0,8	2,05

	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM	20 mM
Mittelwerte [%]	62,08	53,01	46,36	40,82	14,33
Std.-Abw. [%]	2,82	1,6	1,48	0,8	2,47

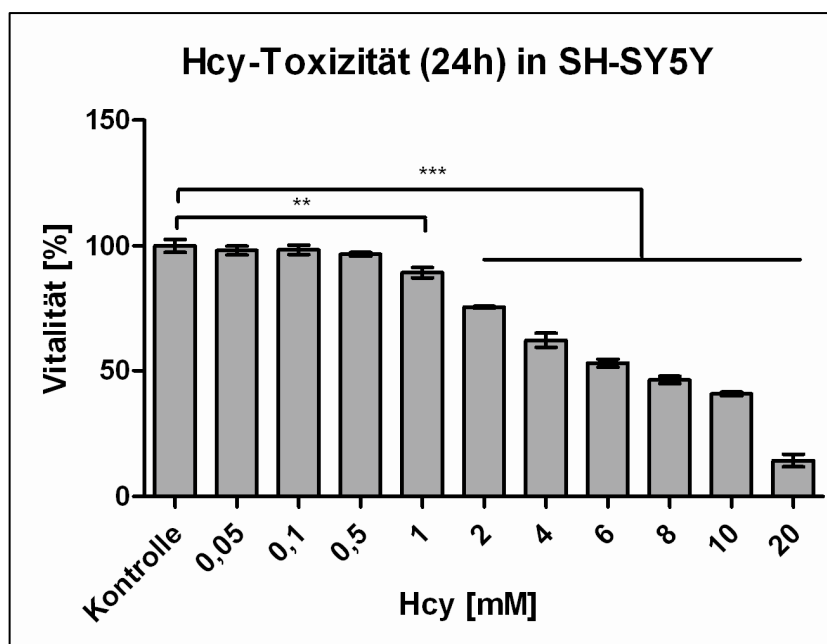


Abbildung 24: Zellvitalität und prozentuale Standardabweichung nach Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit verschiedenen Konzentration von Hcy über 24 Stunden. Ab 1 mM Hcy ergibt sich ein signifikanter Vitalitätsabfall ($p < 0,01$, ab 2 mM Hcy $p < 0,001$). Es zeigt sich eine LD_{50} zwischen 6 und 8 mmol/l; 7 mmol/l wurden als LD_{50} für weitere Versuche verwendet.

3.1.3 Präinkubation mit Kupfer

Undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen wurden über 12 Stunden mit 50 und 100 μ mol/l Kupfer inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit 7 mM Hcy inkubiert. Es zeigte sich hierbei

eine hochsignifikante Erhaltung der Zellvitalität durch CuCl_2 -Präinkubation, sowohl mit 50 als auch 100 $\mu\text{mol/l}$ Kupfer ($p < 0,001$ in beiden Fällen).

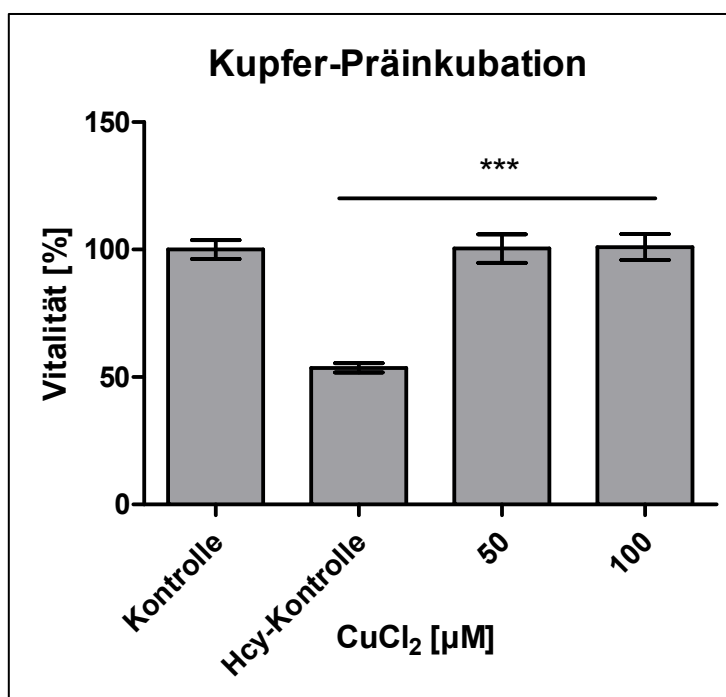


Abbildung 25: CuCl_2 -Präinkubation in undifferenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen; durch Kupferbeladung kommt es zu einer hochsignifikanten Protektion vor Hcy-Toxizität ($p < 0,001$ für unbeladene Zellen [Kontrolle] gegenüber 50 und 100 μM CuCl_2).

Tabelle 12: Kupferbeladung (50 μM und 100 μM) vor 24 Stunden Inkubation mit 7 mM Hcy

	Kontrolle	ohne Kupfer	50 μM CuCl_2	100 μM CuCl_2
Mittelwert [%]	100	53,62	100,39	100,99
Std.-Abw. [%]	3,75	1,84	5,58	5,04

3.2 Untersuchungen zur Kupferpräinkubation und Homocysteintoxizität in RA-differenzierten humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)

3.2.1 Präinkubation mit Kupfer verschiedener Konzentrationen

Weiterführend wurden SH-SY5Y mittels Retinolsäure ausdifferenziert (siehe 2.9.3). Hier wurde ebenfalls auf Dosisabhängigkeit des protektiven Effektes durch die Beladung mit verschiedenen Kupferkonzentrationen untersucht. Es wurde die gleiche Konzentration Hcy (7 mM) zur Messung verwandt, jedoch wurde die Messung hier nach 36 Stunden Inkubation mit Hcy durchgeführt, da in ausdifferenzierten Zellen nach 24 Stunden noch kein ausgeprägter toxischer Effekt durch Hcy nachweisbar war. Es zeigte sich im Vergleich zu den undifferenzierten SH-SY5Y ein geringerer

protektiver Effekt (maximaler Erhöhung der Vitalität auf $52 \pm 7\%$ von $32,25 \pm 4,96\%$), welcher sich dosisabhängig verstärkte, und ab $20 \mu\text{M}$ CuCl_2 hochsignifikant war ($p < 0,001$).

Tabelle 13: Kupferpräinkubation (12 Stunden) in differenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen vor Hcy-Toxizität (10 mM Hcy über 36 Stunden)

	Kontrolle	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM
Mittelwerte [%]	100	32,25	36,72	36,86	47,57	52,28
Std.-Abw. [%]	7,16	4,96	4,15	2,99	3,89	6,89

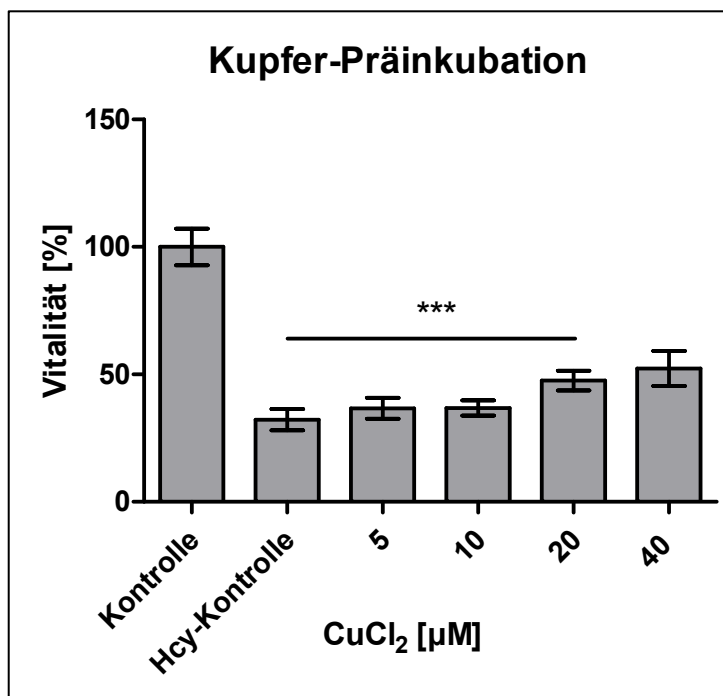


Abbildung 26: CuCl_2 -Präinkubation über 12 Stunden in Konzentrationen von 5 bis 40 μM vor Hcy-Belastung (7 mM über 36 Stunden) in RA-differenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Es zeigt sich eine von der Kupferkonzentration abhängige Protektion vor Hcy-Toxizität ($p < 0,001$ ab $20 \mu\text{M}$ CuCl_2).

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollten zunächst der durch Homocystein induzierte Zelltod, die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies durch eine Homocysteinbelastung in PC12-Zellen, sowie im Weiteren die Effekte einer Kupferbelastung in SH-SY5Y-Zellen und primären zerebellären Neuronen auf die Toxizität von Homocystein untersucht werden. Durch die ermittelten Ergebnisse konnten neue Erkenntnisse zu den durch Homocystein verursachten pathologischen Effekten gewonnen werden.

4.1 Apoptoseinduktion durch Homocystein

1972 beschrieben Kerr, Wyllie und Currie erstmals die Apoptose als endogen induzierten zellulären „Suizid“, welcher dazu dient, den physiologischen zellulären Umsatz zu regulieren (Kerr et al., 1972). Apoptose ist charakterisiert durch eine zelluläre Schrumpfung, „membrane blebbing“ (Ausstülpungen der Plasmamembran), der Kondensation von Chromatin und DNA-Fragmentation. Die Membranintegrität bleibt hierbei erhalten, und mittels Phagozytose wird die Zelle ohne Induktion einer inflammatorischen Reaktion abgeräumt. Homocystein ist in der Lage, Apoptose in hippokampalen Rattenneuronen zu induzieren, indem es die DNA-Integrität stört, zur Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Aktivierung führt und p53 induziert (Kruman et al., 2000). SAM (als Homocysteinvorstufe) ist in der Lage, in PC12-Zellen Apoptose zu induzieren (Zhao et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Homocystein in PC12-Zellen ebenfalls zur Induktion von Apoptose führt. Dieses Ergebnis dient als wichtige Grundlage zum weiteren Verständnis der toxischen Mechanismen von Hcy in den angeschlossenen Experimenten.

4.2 Apoptose und mitochondriale Dysfunktion

Im Rahmen der Apoptose ist die mitochondriale Struktur und Funktion gestört: Poren bilden sich in der äußeren Membran, Cytochrom *c* und *apoptosis inducing factor* (AIF) werden freigesetzt. Es kommt zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten zwischen mitochondrialer Membran und Zytosol. Das Cytochrom *c* komplexiert nach Freisetzung mit *apoptosis protease-activating factor 1*, dATP, und Procaspase-9 zur Bildung des Apoptosom (Cain et al., 2000; Liu et al., 1996). Eine Verkleinerung des mitochondrialen Membranpotentials aufgrund einer Störung des Elektronentransports führt ebenfalls durch eine Protonen-„leakage“ zur Induktion von Apoptose (Ankarcrona et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Homocystein zu einer Apoptoseinduktion durch eine Störung der mitochondrialen Atmungskette, insbesondere durch die Hemmung der COX (Komplex IV), führt.

Pathobiochemisch liegt diesem Effekt nach unseren Experimenten eine Komplexierung von Kupfer durch Homocystein zu Grunde. Bestätigt wird die pathophysiologische Bedeutung dieses Mechanismus durch die Reproduzierbarkeit der protektiven Effekte durch Kupferbeladung in allen hier verwendeten Zelllinien.

Bei der Alzheimerschen Demenz kommt es durch A β ebenfalls zur Komplexierung von Kupfer und zur Apoptose von Neuronen (Cottrell et al., 2002). Nach den hier gezeigten Ergebnissen sollte der Einfluss der COX-Aktivität und Kupferspiegel sowie mögliche therapeutische Optionen diesbezüglich für die Behandlung der Alzheimerschen Demenz weiter untersucht werden. Die Störung Kupfer-abhängiger Enzyme führt auch bei der FALS zur Apoptoseinduktion. In einem Zellkulturmodell hierzu wurde bereits eine verminderte Aktivität der Atmungskettenenzyme Komplex II und IV festgestellt (Menziés et al., 2002). Diese Ergebnisse geben einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der COX-Defizienz durch die Depletion von intrazellulärem Kupfer.

4.3 Die sekundäre Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Obwohl in vielen Studien Hyperhomocysteinämie-assoziierte Gefäßdefekte und Neurodegeneration mit oxidativem Stress verknüpft werden (Ho et al., 2001; Moat et al., 2000; Sengupta et al., 2001; Seshadri, 2006; Starkebaum und Harlan, 1986; Streck et al., 2003), fanden wir initial nach Behandlung der Zellen mit Hcy eine verminderte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies mittels DCF-Fluoreszenz. Diese stiegen im weiteren zeitlichen Verlauf an und werden erst nach ca. 12 Stunden Inkubation vermehrt gegenüber Kontrollen ohne Hcy freigesetzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen Studien, welche ROS-Freisetzung nicht als pathophysiologisch grundlegenden Mechanismus für die Toxizität von Hcy sehen (Duan et al., 2002; Fink et al., 2007). Es ist im Gegenteil zu diskutieren, ob Hcy in Form seiner Thiolgruppe antioxidativ wirkt, bzw. Hcy als Vorläufersubstanz des Cysteins und damit des antioxidativen Glutathions eine antioxidative Rolle spielt. Aktuelle Untersuchungen an L5178Y- und HL60-Zellen geben Hinweise auf einen derartigen Mechanismus (Fink et al., 2007). Weiterhin bestätigen die hier gefundenen Ergebnisse frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass der Komplex I der Atmungskette (NADH-Q-Reduktase) keiner Beeinflussung durch Hcy unterliegt (Linnebank et al., 2006). Dieser gilt als Quelle einer vermehrten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (Ide et al., 1999). Unterstützt werden diese Ergebnisse dadurch, dass Hcy-Behandlung von Megakaryozyten zu einer Vermehrung der COX-kodierenden mRNA führt (Austin et al., 1998). In Bezug auf unsere Ergebnisse weist dies auf einen möglichen Kompensationsmechanismus durch eine vermehrte Transkription von COX

aufgrund der funktionellen Kupferdefizienz hin.

In den hier durchgeführten Experimenten sind die pathophysiologischen Effekte in für Homocystinuriepatienten typischen Hcy-Konzentrationen gezeigt. Die Dosisabhängigkeit der durch Homocysteininkubation verursachten Effekte lässt diese aber auch für milde und intermediäre Hyperhomocysteinämien klinisch bedeutsam erscheinen und eröffnet neue therapeutische Wege für die Zukunft.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass es durch Hcy zeitlich verzögert zur Freisetzung von ROS kommt, nachdem es bereits zu einer massiven Hemmung der COX gekommen ist. Dies verdeutlicht den zu Grunde liegenden toxischen Mechanismus von Homocystein durch eine Kupferchelatierung und konkomitanten Störung der Atmungskettenfunktion. Die COX (Komplex IV der Atmungskette) retiniert teilreduzierte Intermediate der oxidativen Phosphorylierung bis sie vollständig reduziert sind. Kommt es aufgrund einer Störung in der Atmungskette zu einem „Leck“, entstehen ROS und Störungen der Integrität der mitochondrialen Membran, und Cytochrom *c* wird freigesetzt (Huang et al., 2000). Weiterhin führen Mutationen mitochondrialer DNA (mtDNA) – und damit eine gestörte oxidative Phosphorylierung – zu einer vermehrten Sensibilität gegenüber oxidativem Stress (Harrison et al., 2005).

Die ROS-Entstehung wurde in den hier durchgeführten Experimenten mittels DCF-Fluoreszenz bestimmt. Folgende Probleme können durch die Messung von ROS mittels DCF entstehen: Durch Photoreduktion kann DCF selbst die Quelle reaktiver Sauerstoffspezies sein: Es kann DCF-Semiquinon entstehen, welches wiederum selbst als freies Radikal unter aeroben Bedingungen zur Entstehung von Superoxid-Radikal durch Oxidation führen kann (Rota et al., 1999a; Rota et al., 1999b). Deshalb wurde die Verarbeitung von DCF möglichst ohne den Einfluss von Licht durchgeführt.

Ein weiteres Problem liegt in der geringen Spezifität von DCF, da auch andere niedermolekulare Oxidanzien zu einer Fluoreszenz von DCF führen können (Reid et al., 1998). Hierzu ist zu sagen, dass sowohl negative als auch positive Kontrollen (Beladung mit einer niedrigen Dosis H₂O₂ zur relativen Quantifizierung, siehe auch 2.4) durchgeführt wurden. So kann sowohl eine verstärkte, wie auch eine verringerte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies gegenüber unbehandelten Zellen quantitativ nachgewiesen werden.

Hcy und die Entstehung von oxidativem Stress wird häufig über autooxidative Mechanismen erklärt. Es sollen hierbei reaktive Stoffe entstehen, welche über eine Langzeitbelastung zum vermehrten Zelluntergang führen könnten. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass 80% der Hcy-Derivate nicht über oxidative Mechanismen entstehen (Sengupta et al., 2001), und

physiologischerweise ein konstantes Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen der verschiedenen Hcy-Derivate vorliegt. Dies lässt eine direkte Belastung durch Hcy unwahrscheinlich erscheinen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimente zur Bestimmung der Rolle des oxidativen Stresses und der Atmungskettendysfunktion durch Homocystein sollten in weiterführenden *in vivo*-Experimenten im Mausmodell bestätigt und genauer spezifiziert werden.

4.4 Homocysteintoxizität in kardiovaskulären Geweben

Inwieweit eine Übertragbarkeit auf andere Gewebe, insbesondere auf das Gefäßsystem hinsichtlich einer Hyperhomocysteinämie-assoziierten Thrombophilie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen besteht, bleibt offen und ist in weiterführenden Experimenten zu überprüfen. Unterschiedliche Effekte können hierbei durch die verschiedenen Verstoffwechslungsmöglichkeiten für Homocystein bedingt sein. Dies ist insofern wichtig, da in kardiovaskulären Geweben nur die Remethylierung von Hcy als möglicher Abbauweg vorhanden ist (siehe auch 1.1.1).

4.5 Chelatierung von Kupfer und COX-Defizienz durch Homocystein

Wie bereits beschrieben, wird der Hcy-vermittelte oxidative Stress durch eine direkte chemische Reaktion (autooxidativ oder durch Bindung mit Kupfer, Proteinen, o.ä. (Sengupta et al., 2001)) erklärt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Hcy nicht unmittelbar zur ROS-Entstehung führt, sondern eine Störung des Zellmetabolismus induziert. Durch vergleichbare Struktur von Hcy und z.B. dem chelatierenden D-Penicillamin könnte eine kupferbindende Wirkung von Homocystein für die verminderte Aktivität der (kupferabhängigen) COX im zeitlichen Verlauf verantwortlich sein. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass Hcy Kupfer mit einer pK_a von $1,55 \pm 0,12$ bindet (Linnebank et al., 2006). Dies führt zum Verlust wichtiger intrazellulärer physiologischer Mechanismen (Funktion der Atmungskette) und zur Apoptose. Neben der COX dienen weitere kupferabhängige Enzyme der zellulären Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies. Zellmedium zugesetztes CCS (*copper chaperone for SOD*) verursacht eine bessere Bereitstellung von Kupfer für die SOD und schützt vor ROS-induziertem Zelltod in hippokampalen Neuronen (Choi et al., 2005). Diese Daten unterstützen die hier präsentierten Ergebnisse, welche einen protektiven Effekt durch die Bereitstellung von Kupfer für kupferabhängige Enzyme (in unserem Fall die COX) zeigen konnten.

Freies Cu^{2+} katalysiert die extrazelluläre Entstehung von Disulfidbrücken durch Oxidation von Hcy. Möglicherweise führt auch ein Synergismus von Cu^{2+} und Hcy durch Komplexbildung zur

Entstehung entsprechender Toxizität (Austin et al., 1998; Bessedé et al., 2001; Hultberg et al., 1998a; Hultberg et al., 1998b; Hultberg et al., 1998c; Starkebaum und Harlan, 1986). Hcy-Kupfer-Komplexe stören die Glutathionperoxidaseaktivität (Apostolova et al., 2003). Diese Toxizität von Homocystein-Kupfer-Komplexen konnte in den hier gezeigten Experimenten bei einer Koinkubation beider Substanzen bestätigt werden (siehe 3.5.3). Zwischen der totalen Plasmakonzentration von Homocystein und dem Kupferspiegel in Patienten mit peripher-vaskulären Erkrankungen besteht eine starke Korrelation (Mansoor et al., 2000). Homocysteinuriepatienten mit ausgeprägter Hyperhomocysteinämie zeigen ebenfalls erhöhte Kupfer-Blutspiegel (Dudman und Wilcken, 1983). Trotzdem nehmen wir an, dass aufgrund der geringen physiologischen Kupferkonzentrationen die Komplexbildung und Bildung toxischer Verbindungen mit Homocystein nicht alleine für dessen Toxizität verantwortlich gemacht werden kann. In den Experimenten wurde die extrazelluläre Bildung toxischer Komplexe durch Waschen der Zellen mit PBS nach Kupferbeladung und den Wechsel auf kupferfreies Medium vermieden. Die bisher nur in PC12-Zellen untersuchte Hypothese, dass es durch Hcy zu einer funktionellen Depletion von Kupfer und zum Zelltod durch Störung der Atmungskette kommt, wurde in dieser Arbeit sowohl für humane Neuroblastomzellen (in undifferenzierter Form und durch RA differenziert) wie auch an primären zerebellären Rattenneuronen gezeigt. Nach Differenzierung der SH-SY5Y zeigte sich der protektive Effekt nicht so ausgeprägt wie bei undifferenzierten SH-SY5Y, war jedoch ebenfalls signifikant. Die Differenz kann mit unterschiedlicher zellulärer Expression von Transportern und einem veränderten Zellstoffwechsel zusammenhängen. Die an PC12-Zellen gezeigten Effekte werden hier bestätigt und deuten damit auf einen allgemein gültigen pathophysiologischen Mechanismus hin, welcher nicht auf einen speziellen Zelltyp festgelegt ist. Klinisch wird dies u.a. durch die auf einer Defizienz des Cuproenzym Tyrosinase beruhende typische Hypopigmentierung homocystinurischer Patienten (Reish et al., 1995) bestätigt. Der toxische Effekt durch die funktionelle Depletion weiterer kupferabhängiger Enzyme bleibt nachzuweisen. Weiterhin ist fraglich, welche quantitative Rolle die Entstehung der entsprechenden toxischen Hcy-Kupfer-Komplexe spielt, oder inwieweit sie die toxischen Effekte durch die Defizienz der COX verstärkt. COX-Defizienz allein führt bereits u.a. zur Apoptose, ebenso wie Hcy an PC12-Zellen. Dies deutet ebenfalls auf einen möglichen gemeinsamen pathologischen Mechanismus hin.

Auffällig ist die klinische Ähnlichkeit zwischen einer schweren Hyperhomocysteinämie (z.B. bei einer CBS-Defizienz) und Kupferdefizienz. Der Morbus Menkes, ein angeborener Defekt der intestinalen Cu^{2+} -Resorption, präsentiert sich typischerweise mit einer ausgeprägten mentalen Retardierung, Störungen des kardiovaskulären Systems und Hypopigmentation der Haare

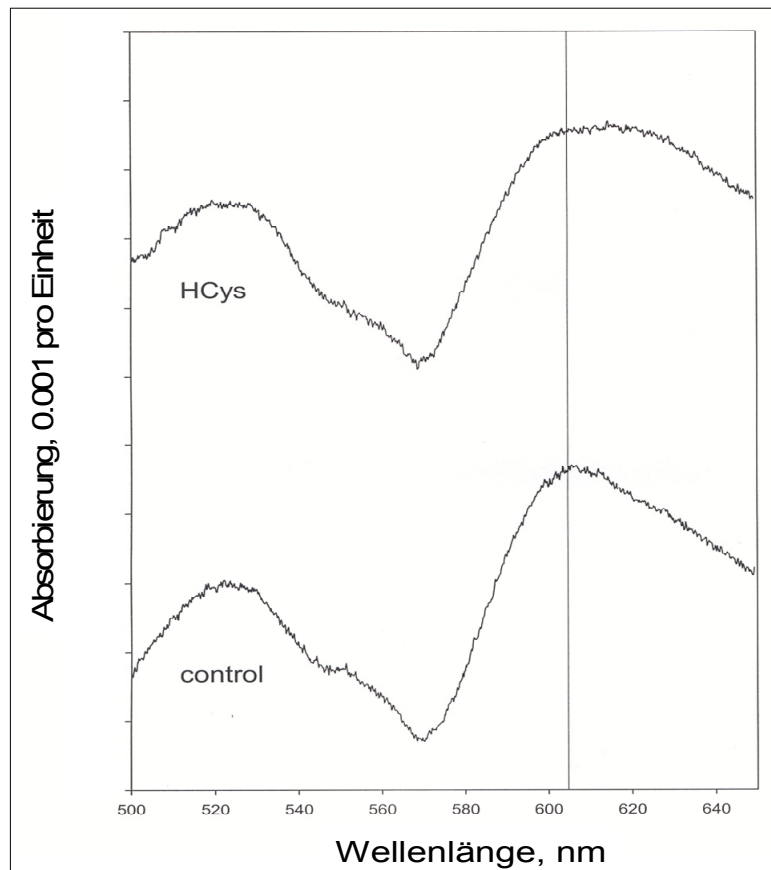


Abbildung 27: reduziertes-oxidiertes Cytochromspektrum von Homocystein-behandelten PC12-Zellen (zur Verfügung von Prof. Kunz)

Das dargestellte Spektrum ist die numerische Differenz der Spektren in der reduzierten und oxidierten Form. Beide Graphen sind hier in einem Diagramm dargestellt. Die Differenz besteht in dem stark abgeflachten Graph der mit Homocystein behandelten Zellen im Absorptionsbereich um 605 nm.

(Menkes, 1988). Dieser Symptomenkomplex ist wie bereits erwähnt ebenfalls typisch für die Homocystinurie. Der Morbus Menkes ist bemerkenswerterweise mit einer Störung der COX assoziiert (DiMauro et al., 1990b). Ein vergleichbarer Effekt auf das aa3-Spektrum der COX durch Hcy-Stress wie bei kupferdefizienten Menkes-Mäusen war in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Linnebank et al., 2006) nachweisbar (siehe Abbildung 27).

4.6 Homocystein und neurodegenerative Erkrankungen

4.6.1 Morbus Alzheimer

Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass eine Hyperhomocysteinämie eine Störung des

Gehirnstoffwechsels mit einer COX-Defizienz in hippocampalem Gewebe verursacht (Streck et al., 2003). Weiterhin ist in hippocampalen Zellen von Alzheimer-Patienten eine verminderte COX-Aktivität nachgewiesen worden (Cottrell et al., 2002). Senkung einer Hyperhomocysteinämie führt zur Verbesserung kognitiver Leistung (Boxer et al., 2005). A β , welches in Neuronen von AD-Patienten aggregiert, transportiert physiologischerweise intrazelluläres Kupfer in das extrazelluläre Kompartiment. Da weiterhin eine Hyperhomocysteinämie mit dem Auftreten bzw. der Schwere der Alzheimerschen Erkrankung assoziiert ist (Bayer et al., 2003; Seshadri et al., 2002; Seshadri, 2006), könnte es sein, dass die verstärkte Depletion von Kupfer durch Hcy den Krankheitsprozess verstärkt. Weiterhin stabilisiert über die Nahrung zugeführtes Kupfer die Gehirn-Superoxid-Dismutase 1 – Aktivität und verringert die A β -Produktion in APP23-transgenen Mäusen (Bayer et al., 2003). Ein weiterer pathologischer Mechanismus ist die mögliche Bindung von Hcy an Thiolgruppen von Proteinen, wodurch es zu deren Dysfunktion kommen kann (Hultberg et al., 1997).

Wenn Hcy in der Lage ist Kupfer zu binden, kann es somit auf der einen Seite einen protektiven Effekt gegenüber einer kupferabhängigen Toxizität ausüben, obwohl es auf der anderen Seite selbst – wie hier gezeigt – durch intrazelluläre Kupferdepletion toxisch wirken kann. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass vermehrtem oxidativem Stress in Alzheimer-Patienten ein anderer Mechanismus als im Gesunden unterliegt (Leutner et al., 2005). Dies ist in soweit interessant, da hier gezeigt werden konnte, dass Hcy auf der einen Seite einen Einfluß auf die Aktivität von COX als Atmungskettenenzym hat (und somit auf die Fähigkeit der Zelle ROS abzubauen) als auch auf der anderen Seite durch seine Thiolgruppe oder Glutathion selbst einen antioxidativen Effekt haben kann. Homocystein dient als Cysteinlieferant und ist damit Bestandteil der Glutathionsynthese (siehe Abbildung 1). Ein Cysteinmangel wird als wichtiger physiologischer Mechanismus für das Altern diskutiert (Droge, 2005).

4.6.2 Morbus Parkinson

Ein Folsäuremangel ist mit neurodegenerativen Erkrankungen bzw. mit einer verminderten kognitiven Leistung im Alter assoziiert. Es kommt hierbei zu einer erniedrigten Enzymaktivität im Hcy-Stoffwechsel (insbesondere der MTHFR, siehe auch Abbildung 1) und einem konsekutiven Einfluss auf den Homocysteinspiegel (Ho et al., 2002; Ho et al., 2003). MTHFR-Polymorphismen können entsprechend ebenfalls, wie bereits beschrieben, Hcy-Spiegel beeinflussen. Ein erhöhter Homocysteinspiegel kann über die in dieser Arbeit dargestellten Mechanismen zur gestörten Atmungskettenaktivität und einer neuronalen Dysfunktion führen. Mitochondriale Dysfunktion steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Parkinsonschen

Erkrankung. In dopaminergen Neuronen (SK-M-NC) erzeugt die Blockade des Komplex I mit Rotenon ROS-vermittelten Zelltod, welcher durch Antioxidantien verhindert werden konnte (Haas et al., 1995; Mizuno et al., 1989; Parker et al., 1989; Sherer et al., 2003a; Sherer et al., 2003b). In der Substantia nigra von Patienten mit Parkinson-Krankheit konnte eine Verminderung des Glutathionspiegels nachgewiesen werden (Sian et al., 1994). Milde Hyperhomocysteinämien könnten hierbei jedoch selbst sowohl über eine antioxidative Hcy-Wirkung wie auch über die Bindungsfähigkeit von Kupfer einen protektiven Effekt im Rahmen neurodegenerativer oder auch kupferassoziierter Erkrankungen haben. Homocystein hat hierdurch Einfluss auf gegenüber exogener Belastung (z.B. durch oxidativen Stress) anfällige Zellen, wie dopaminerge Neurone. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass mit einer Hyperhomocysteinämie einhergehende MTHFR-Polymorphismen mit einem späteren *age of onset* von Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht werden können (Wüllner et al., 2005). Dies ist insoweit interessant, als dass ROS als elementarer pathologischer Mechanismus für den Untergang dopaminergener Neurone angesehen wird (Jiang et al., 2004). Der Einfluss von Homocystein auf die Pathogenese und den klinischen Verlauf des Morbus Parkinson ist in Zusammenschau der vorhandenen Studien noch nicht hinreichend geklärt. Die hier gezeigte Chelatierung von Kupfer bzw. antioxidative Wirkung durch leicht erhöhte Homocysteinspiegel könnte einen positiven Effekt auf den Verlauf der Erkrankung haben. Weitere Untersuchungen zu möglichen therapeutischen Konsequenzen sollten durchgeführt werden.

4.7 Aussicht

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen der Toxizität von Homocystein und der mitochondrialen Atmungskette. In Zusammenschau der hier gewonnenen Ergebnisse zeigt sich, dass die Kupferbindung durch Homocystein mit konsekutiver COX-Defizienz eine Schlüsselrolle der Hcy-Neurotoxizität einnehmen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt durch eine Beladung der Zellen mit Kupfer nicht für PC12-Zellen spezifisch ist, sondern sich an Neuroblastomzellen, wie auch an primären Neuronen bestätigt. Diese Erkenntnis sollte in *in vivo*-Versuchen verifiziert und spezifiziert werden, um Hypothesen zu möglichen prophylaktischen und therapeutischen Ansätzen für Krankheiten zu erarbeiten, die mit einer Störung des Homocystein- oder des Kupfer-Stoffwechsels assoziiert sind.

Eine weiter zu beachtende Erkenntnis ist, dass Hcy unter bestimmten Bedingungen *in vitro* vorübergehend protektive Effekte haben könnte. Dies zeigt sich in den hier durchgeführten Experimenten in einer verminderten Produktion oxidativen Stresses durch die Behandlung der

Zellen mit Homocystein initial nach Beginn der Beladung. Diese beiden gegensätzlichen Effekte sind „dosisabhängig“, wobei die toxischen Mechanismen im Allgemeinen bei klinisch vorhandenen Hyperhomocysteinämien zu überwiegen scheinen. Diese Ergebnisse müssen weiter verfolgt werden, um mit den hier erlangten Erkenntnissen über die durch Hcy ausgelösten molekularen Mechanismen optimierte und neue Therapiestrategien zu entwickeln. Potentiell positive Effekte durch Homocystein müssten gefördert (antioxidative Wirkung / Kupferbindung bei kupferbedingter Toxizität) und potentiell negative Effekte (Kupferdepletion mit Funktionsverlust der betroffenen Enzyme) verhindert werden, um den negativen Einfluss von Homocystein auf das kardiovaskuläre System, dopaminerge sowie hippokampale Neurone, oder andere Gewebe möglichst gering zu halten. Kupfer könnte der Schlüssel zur Synergie zwischen Hyperhomocysteinämie und der Alzheimer-Krankheit sein: Hohe Homocystein-Spiegel und niedrige Kupfer-Spiegel könnten sich negativ auf Neurodegeneration auswirken. Diese Schlussfolgerungen über mögliche Mechanismen der Toxizität von Homocystein sind Grundlage aktueller und künftiger weiterer Experimente der Arbeitsgruppe.

5 Zusammenfassung

Homocysteintoxizität:

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Kupferdepletion in PC12-Zellen, Neuroblastomzellen und primären zerebellären Neuronen

Schwere Hyperhomocysteinämien (z.B. bei der klassischen Homocystinurie) präsentieren sich häufig mit ausgeprägter neurologischer Symptomatik wie mentaler Retardierung oder Anfallsleiden. Auch eine moderate Hyperhomocysteinämie ist z.B. mit einer verminderten kognitiven Leistung im Alter und dem Morbus Alzheimer assoziiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die durch Homocystein ausgelösten neurotoxischen Effekte und pathophysiologischen Grundlagen an Phäochromozytomzellen (PC12), humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) und primären zerebellären Rattenneuronen (CGN) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Homocystein Apoptose induziert. Durch Belastung der Zellen mit Homocystein kommt es zeitabhängig zu einer Abnahme der Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase (COX). Homocystein bindet deren Kofaktor Kupfer und führt so zur COX-Defizienz. Durch eine Beladung der Zellen mit Kupfer vor einer Belastung mit Homocystein konnte dessen Toxizität in allen verwendeten Zelllinien signifikant verringert werden.

Weiterhin entsteht oxidativer Stress, der als Mechanismus der Homocystein-Toxizität angesehen wird, nach den hier dargestellten Ergebnissen nicht primär durch Homocystein selbst; im Gegenteil verringerte die Inkubation mit Hcy zunächst die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Im zeitlichen Verlauf über 24 Stunden zeigte sich ein langsamer Anstieg der ROS, welcher allerdings einer zunehmenden Störung der Atmungskettenfunktion (COX) folgte. Die Entstehung von ROS ist somit vermutlich als sekundärer Effekt durch die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung über die Hemmung der COX zu werten. Homocystein bindet Kupfer und führt so zu einer verminderten Aktivität der Kupfer-abhängigen COX.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einblicke in die Mechanismen der Homocystein-Toxizität. Dies gilt insbesondere für Erkrankungen, in deren Pathogenese dem Kupfer und Homocystein eine Rolle spielen könnten (u.a. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer). Durch die Klärung dieser grundlegenden Mechanismen bieten sich neue therapeutische Ansätze für Patienten mit diesen Krankheiten oder mit erhöhten Homocystein-Plasma-Spiegeln, bei denen eine Hcy-Senkung und Kupfersubstitution bzw. -depletion eine wichtige Ergänzung ihrer Therapie darstellen könnten. Im Rahmen weiterer Forschungsvorhaben z.B. im Tiermodell sollten diese positiven Effekte weiter verfolgt und untersucht werden.

6 Anhang

Veröffentlichungen über Ergebnisse dieser Arbeit

Linnebank M, Lutz H, Jarre E, Vielhaber S, Noelker C, Struys E, Jakobs C, Klockgether T, Evert BO, Kunz WS, Wüllner U. Binding of copper is a mechanism of homocysteine toxicity leading to COX deficiency and apoptosis in primary neurons, PC12 and SHSY-5Y cells. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 725-730.

Abstracts, Poster über Ergebnisse dieser Arbeit:

Lutz H, Linnebank M, Jarre E, Vielhaber S, Struys E, Jakobs C, Klockgether T, Kunz W, Wüllner U. Homocysteine decreases mitochondrial cytochrome C oxidase activity in a copper - dependent manner. Program No. 216.2

Abstract: Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience

Poster: Annual meeting Society for Neuroscience, San Diego 2004

Wüllner U, Lutz H, Jarre E, Vielhaber S, Klockgether T, Kunz W, Linnebank M. Mechanisms of homocysteine (neuro-)toxicity: a novel point of view. Poster und Präsentation auf dem 77. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie, Düsseldorf

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Grundlagen des Methionin-Homocysteinstoffwechsels	12
Abbildung 2: SAM-Verarbeitung	13
Abbildung 3: Glutathion und Glutathionverstoffwechslung.....	15
Abbildung 4: Anteile und chemische Struktur der verschiedenen Derivate von Hcy im Plasma..	16
Abbildung 5: Übersicht über vom Kupferstoffwechsel beeinflusste Krankheiten und ihre grundlegenden pathophysiologischen Mechanismen.....	26
Abbildung 6: Entstehung von ROS bei der oxidativen Phosphorylierung	30
Abbildung 7: Trypsinierung und Zellpassagierung.....	34
Abbildung 8: alamarBlue™ Fluoreszenz-Emissions-Spektrum	38
Abbildung 9: Mediumwechsel bei zerebellären Körnerneuronen	40
Abbildung 10: Prinzip des TUNEL-Assays.....	43
Abbildung 11: Exemplarischer Aufbau der Messung in einer 96 well – Mikrotiterplatte.....	46
Abbildung 12: Hcy-Toxizitätsreihe in PC12-Zellen über 24 Stunden.....	50
Abbildung 13: TUNEL-Bilder PC12,	51
Abbildung 14: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden Hcy-Inkubation (5 µM Hcy) in PC12-Zellen	52
Abbildung 15: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden Hcy-Inkubation (50 µM Hcy) in PC12-Zellen.	53
Abbildung 16: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden Hcy-Inkubation (500 µM Hcy) in PC12-Zellen	54
Abbildung 17: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-Fluoreszenz) und Zellvitalität (alamarBlue™) über 24 Stunden Hcy-Inkubation (1 mM Hcy) in PC12-Zellen.....	54
Abbildung 18: ROS, COX, Vitalität über 24 Stunden Inkubation mit Hcy (10 mM) in PC12	55
Abbildung 19: Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies über 24 Stunden durch Inkubation mit Homocystein in PC12-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration (von 5 µM bis 10 mM Hcy) ..	57
Abbildung 20: Kupfertoxizität in primären zerebellären Neuronen über 24 Stunden.....	58
Abbildung 21: Koinkubation Homocystein / CuCl ₂ in primären zerebellären Körnerneuronen...	59
Abbildung 22: Kupferbeladung in CGN über 12 Stunden in Konzentrationen von 5 µM bis 40 µM mit anschließender Inkubation von 10 mM Hcy.....	60
Abbildung 23: Toxizität durch CuCl ₂ in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen (über 24 Stunden).	61
Abbildung 24: Zellvitalität und prozentuale Standardabweichung nach Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit verschiedenen Konzentration von Hcy über 24 Stunden.....	62

Abbildung 25: CuCl ₂ -Präinkubation in undifferenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen	63
Abbildung 26: CuCl ₂ -Präinkubation über 12 Stunden in Konzentrationen von 5 bis 40 µM vor Hcy-Belastung (7 mM über 36 Stunden) in RA-differenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen.	64
Abbildung 27: reduziertes-oxidiertes Cytochromspektrum von Homocystein-behandelten PC12-Zellen (zur Verfügung von Prof. Kunz).....	70

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Einteilung der Hyperhomocysteinämien nach Blutplasmaspiegel (μM).....	17
Tabelle 2: Laborchemische Differentialdiagnostik der Hyperhomocysteinämie.....	20
Tabelle 3: Kupferabhängige Enzyme und ihre physiologische Funktion.....	25
Tabelle 4: Aufzählung der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	29
Tabelle 5: Endogene Quellen oxidativen Stresses	29
Tabelle 6: Antioxidativ wirkenden Enzyme und ihre zelluläre Lokalisation	29
Tabelle 7: alamarBlue TM -Fluoreszenz (Zellvitalität) nach 24 Stunden Inkubation verschiedener Konzentrationen (100 μM bis 20 mM) von Hcy sowie unbehandelten Zellen.....	49
Tabelle 8: Veränderung der ROS-Freisetzung über 24 Stunden (10 mM Hcy in PC12-Zellen) ...	56
Tabelle 9: Fluoreszenzmessungen zur Zellvitalität und ROS sowie Bestimmung der COX-Aktivität in PC12-Zellen über 24 Stunden (10 mM Hcy).....	56
Tabelle 10: Protektion durch Kupferpräinkubation in zerebellären Neuronen (CGN), mit signifikanter Protektion bei 40 μM CuCl_2 über 12 Stunden Präinkubation (10 mM Hcy).....	61
Tabelle 11: Hcy-Toxizität in SH-SY5Y-Zellen (Zellvitalität mittels alamarBlue TM) über 24 Stunden.....	62
Tabelle 12: Kupferbeladung (50 μM und 100 μM) vor 24 Stunden Inkubation mit 7 mM Hcy...	63
Tabelle 13: Kupferpräinkubation (12 Stunden) in differenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen vor Hcy-Toxizität (10 mM Hcy über 36 Stunden).....	64

7 Literaturverzeichnis

Abbott MH, Folstein SE, Abbey H, Pyeritz RE. Psychiatric manifestations of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: prevalence, natural history, and relationship to neurologic impairment and vitamin B6-responsiveness. *Am J Med Genet* 1987; 26: 959-969

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

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15: 961-973

Aon MA, Cortassa S, Marban E, O'Rourke B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 44735-44744

Apostolova MD, Bontchev PR, Ivanova BB, Russell WR, Mehandjiev DR, Beattie JH, Nachev CK. Copper-homocysteine complexes and potential physiological actions. *J Inorg Biochem* 2003; 95: 321-333

Austin RC, Sood SK, Dorward AM, Singh G, Shaughnessy SG, Pamidi S, Outinen PA, Weitz JI. Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H₂O₂ act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J Biol Chem* 1998; 273: 30808-30817

Azzi A, Müller M. Cytochrome c oxidases: polypeptide composition, role of subunits, and location of active metal centers. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 242-251

Baric I, Cuk M, Fumic K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, Maradin M, Pazanin L, Pogribny I, Rados M, Sarnavka V, Schulze A, Stabler S, Wagner C, Zeisel SH, Mudd SH. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inher Metab Dis* 2005; 28: 885-902

Batandier C, Fontaine E, Keriel C, Leverve XM. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 175-187

Bayer TA, Schafer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, Eckert A, Schussel K, Eikenberg O, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Staufenbiel M, Multhaup G. Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid A β production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14187-14192

Beal MF. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 120-131

Becker A, Vezmar S, Linnebank M, Pels H, Bode U, Schlegel U, Jaehde U. Marked elevation in homocysteine and homocysteine sulfinic acid in the cerebrospinal fluid of lymphoma patients receiving intensive treatment with methotrexate. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45: 504-515

Bessede G, Miguet C, Gambert P, Neel D, Lizard G. Efficiency of homocysteine plus copper in

inducing apoptosis is inversely proportional to gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Faseb J* 2001; 15: 1927-1940

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1301-1306

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973; 33: 2643-2652

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 1978; 38: 3751-3757

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

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972; 128: 617-630

Boxer AL, Kramer JH, Johnston K, Goldman J, Finley R, Miller BL. Executive dysfunction in hyperhomocystinemia responds to homocysteine-lowering treatment. *Neurology* 2005; 64: 1431-1434

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 1997; 390: 684-687

Buckman TD, Sutphin MS, Mitrovic B. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation. *J Neurochem* 1993; 60: 2046-2058

Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5: 327-337

Butz LW, Vigneaud V. The formation of a homologue of Cysteine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *J Biol Chem* 1932; 99: 135-142

Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 2000; 275: 6067-6070

Cantoni GL, Richards HH, Chiang PK. Inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation. *Transmethylation*. New York: Elsevier/North-Holland, 1979: 155

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

Cerpa W, Varela-Nallar L, Reyes AE, Minniti AN, Inestrosa NC. Is there a role for copper in neurodegenerative diseases? *Mol Aspects Med* 2005; 26: 405-420

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

Chen 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

Chiang PK, Richards HH, Cantoni GL. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase: analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors. *Mol Pharmacol* 1977; 13: 939-947

Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2001; 76: 302-306

Choi SH, Kim DW, Kim SY, An JJ, Lee SH, Choi HS, Sohn EJ, Hwang SI, Won MH, Kang TC, Kwon HJ, Kang JH, Cho SW, Park J, Eum WS, Choi SY. Transduced human copper chaperone for Cu,Zn-SOD (PEP-1-CCS) protects against neuronal cell death. *Mol Cells* 2005; 20: 401-408

Ciriolo MR, Marasco MR, Iannone M, Nistico G, Rotilio G. Decrease of immunoreactive catalase protein in specific areas of ageing rat brain. *Neurosci Lett* 1997; 228: 21-24

Ciriolo MR, De Martino A, Lafavia E, Rossi L, Carri MT, Rotilio G. Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 5065-5072

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

Clarke S, Banfield K. In: Carmel R, Jacobsen DW, Hrsg. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001: 63-78

Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM. The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002; 28: 390-396

Danks DM. Disorders of copper transport. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Hrsg. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 2211-2235

Dardik R, Varon D, Tamarin I, Zivelin A, Salomon O, Shenkman B, Savion N. Homocysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation. *Thromb Haemost* 2000; 83: 338-344

de Lau LM, Koudstaal PJ, van Meurs JB, Uitterlinden AG, Hofman A, Breteler MM. Methylene tetrahydrofolate reductase C677T genotype and PD. *Ann Neurol* 2005; 57: 927-930

Dichter MA. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res* 1978; 149: 279-293

- DiMauro S, Bonilla E, Lombes A, Shanske S, Minetti C, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Neurol Clin* 1990a; 8: 483-506
- DiMauro S, Lombes A, Nakase H, Mita S, Fabrizi GM, Tritschler HJ, Bonilla E, Miranda AF, DeVivo DC, Schon EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatr Res* 1990b; 28: 536-541
- Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM. Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 64: 141-148
- Doronzo G, Russo I, Mattiello L, Trovati M, Anfossi G. Homocysteine rapidly increases matrix metalloproteinase-2 expression and activity in cultured human vascular smooth muscle cells. Role of phosphatidyl inositol 3-kinase and mitogen activated protein kinase pathways. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1285-1293
- Droge W. Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360: 2355-2372
- Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman, II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002; 80: 101-110
- Dyrks T, Dyrks E, Hartmann T, Masters C, Beyreuther K. Amyloidogenicity of beta A4 and beta A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem* 1992; 267: 18210-18217
- Fink K, Brink A, Vienken J, Heidland A, Stopper H. Homocysteine exerts genotoxic and antioxidative effects in vitro. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1402-1408
- Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984; 259: 9508-9513
- Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-237
- Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 Suppl 2: S40-44
- Folbergrova J. NMDA and not non-NMDA receptor antagonists are protective against seizures induced by homocysteine in neonatal rats. *Exp Neurol* 1994; 130: 344-350
- Folbergrova J. Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Exp Neurol* 1997; 145: 442-450
- Fowler B. Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *Eur J Pediatr* 1998; 157 Suppl 2: S60-66
- Gallo V, Ciotti MT, Coletti A, Aloisi F, Levi G. Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 7919-7923
- Gaustadnes M, Ingerslev J, Rutiger N. Prevalence of congenital homocystinuria in Denmark. *N Engl J Med* 1999; 340: 1513

- Goodyer ID, Jones EE, Monaco AP, Francis MJ. Characterization of the Menkes protein copper-binding domains and their role in copper-induced protein relocalization. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1473-1478
- Grieve A, Butcher SP, Griffiths R. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. *J Neurosci Res* 1992; 32: 60-68
- Gu M, Cooper JM, Butler P, Walker AP, Mistry PK, Dooley JS, Schapira AH. Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 2000; 356: 469-474
- Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, Shults CW. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995; 37: 714-722
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, other reactive species and disease. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, Hrsg. *Free radicals in Biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1998: 617-784
- Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; 353: 411-416
- Harker LA, Slichter SJ, Scott CR, Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med* 1974; 291: 537-543
- Harman D. Free radicals in aging. *Mol Cell Biochem* 1988; 84: 155-161
- Harris ED, Jr., Sjoerdsma A. Collagen profile in various clinical conditions. *Lancet* 1966; 2: 707-711
- Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 4660-4671
- Heafield MT, Fearn S, Steventon GB, Waring RH, Williams AC, Sturman SG. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1990; 110: 216-220
- Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 2001; 78: 249-253

Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 2002; 70: 694-702

Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 2003; 14: 32-42

Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 2000; 407: 390-395

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology* 1997; 123: 33-40

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology* 1998a; 126: 203-212

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Protein binding of homocysteine and other thiols in HeLa cell cultures after addition of homocysteine and copper ions. *Clin Chim Acta* 1998b; 269: 175-184

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Higher export rate of homocysteine in a human endothelial cell line than in other human cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1998c; 1448: 61-69

Hultberg B. Elimination of high amounts of extracellular homocysteine in human cell lines. *Clin Chim Acta* 2005; 356: 117-124

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; 85: 357-363

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

Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1745-1754

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

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257

Kery V, Poneleit L, Kraus JP. Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch Biochem Biophys* 1998; 355: 222-232

- Kitzberger R, Madl C, Ferenci P. Wilson disease. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 295-302
- Klee WA, Richards HH, Cantoni GL. The synthesis of methionine by enzymic transmethylation. VII. Existence of two separate homocysteine methyltransferases on mammalian liver. *Biochim Biophys Acta* 1961; 54: 157-164
- Klomp AE, Tops BB, Van Den Berg IE, Berger R, Klomp LW. Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem J* 2002; 364: 497-505
- Knott L, Hartridge T, Brown NL, Mansell JP, Sandy JR. Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39: 98-105
- Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, Cantoni GL. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet* 1997; 13: 51-52
- Kraus J, Packman S, Fowler B, Rosenberg LE. Purification and properties of cystathionine beta-synthase from human liver. Evidence for identical subunits. *J Biol Chem* 1978; 253: 6523-6528
- Kruman, II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; 20: 6920-6926
- Kruman, II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; 22: 1752-1762
- Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, Buttner T, Woitalla D, Muller T. Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1998; 40: 225-227
- Lelkes PI, Ramos E, Nikolaychik VV, Wankowski DM, Unsworth BR, Goodwin TJ. GTSF-2: a new, versatile cell culture medium for diverse normal and transformed mammalian cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33: 344-351
- Leutner S, Schindowski K, Frolich L, Maurer K, Kratzsch T, Eckert A, Muller WE. Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry* 2005; 38: 312-315
- Lindgren A, Brattstrom L, Norrving B, Hultberg B, Andersson A, Johansson BB. Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke* 1995; 26: 795-800
- Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5 ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2002
- 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, Junker R, Nabavi DG, Linnebank A, Koch HG. Isolated thrombosis due to the

cystathionine beta-synthase mutation c.833T>C (1278T). *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 509-511

Linnebank M, Linnebank A, Jeub M, Klockgether T, Wullner U, Kolsch H, Heun R, Koch HG, Suormala T, Fowler B. Lack of genetic dispositions to hyperhomocysteinemia in Alzheimer disease. *Am J Med Genet A* 2004; 131: 101-102

Linnebank M, Lagler F, Muntau AC, Roschinger W, Olgemoller B, Fowler B, Koch HG. Methionine adenosyltransferase (MAT) I/III deficiency with concurrent hyperhomocysteinemia: two novel cases. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 1167-1168

Linnebank M, Lutz H, Jarre E, Vielhaber S, Noelker C, Struys E, Jakobs C, Klockgether T, Evert BO, Kunz WS, Wullner U. Binding of copper is a mechanism of homocysteine toxicity leading to COX deficiency and apoptosis in primary neurons, PC12 and SHSY-5Y cells. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 725-730

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 613-622

Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5923-5928

Liu S, Kawai K, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Fabisiak JP, Quinn PJ, Pitt BR, Kagan VE. Nitric oxide-dependent pro-oxidant and pro-apoptotic effect of metallothioneins in HL-60 cells challenged with cupric nitrotriacetate. *Biochem J* 2001; 354: 397-406

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1974; 42: 68-72

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 1999; 13: 1169-1183

Macleane 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

Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269: 1020-1025

Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, Gluckman RA, Block PC, Upson BM. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1009-1015

Mansoor MA, Bergmark C, Haswell SJ, Savage IF, Evans PH, Berge RK, Svardal AM, Kristensen O. Correlation between plasma total homocysteine and copper in patients with peripheral vascular disease. *Clin Chem* 2000; 46: 385-391

Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 517-527

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

McIlwain H, Poll JD. Adenosine in cerebral homeostatic role: appraisal through actions of homocysteine, colchicine, and dipyridamole. *J Neurobiol* 1986; 17: 39-49

Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3-7

Menkes JH. Kinky hair disease: twenty five years later. *Brain Dev* 1988; 10: 77-79

Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2002; 125: 1522-1533

Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1450-1455

Moat SJ, Bonham JR, Cragg RA, Powers HJ. Elevated plasma homocysteine elicits an increase in antioxidant enzyme activity. *Free Radic Res* 2000; 32: 171-179

Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an Enzymatic Defect. *Science* 1964; 143: 1443-1445

Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 1975; 24: 721-735

Mudd SH. Diseases of sulphur metabolism: implications for the methionine-homocysteine cycle, and vitamin responsiveness. *Ciba Found Symp* 1979: 239-258

Mudd SH, Ebert MH, Scriver CR. Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism* 1980; 29: 707-720

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

Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1704-1706

Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B, Hrsg. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 2007-2056

Muller T, Werne B, Fowler B, Kuhn W. Nigral endothelial dysfunction, homocysteine, and Parkinson's disease. *Lancet* 1999; 354: 126-127

- Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, Beher D, Ruppert T, Masters CL, Beyreuther K. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* 1996; 271: 1406-1409
- Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, Costa E. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1986; 6: 1905-1911
- Nurk E, Refsum H, Tell GS, Engedal K, Vollset SE, Ueland PM, Nygaard HA, Smith AD. Plasma total homocysteine and memory in the elderly: the Hordaland Homocysteine Study. *Ann Neurol* 2005; 58: 847-857
- Opazo C, Barria MI, Ruiz FH, Inestrosa NC. Copper reduction by copper binding proteins and its relation to neurodegenerative diseases. *Biometals* 2003; 16: 91-98
- Oyama Y, Hayashi A, Ueha T, Maekawa K. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res* 1994; 635: 113-117
- Pahlman S, Hoehner JC, Nanberg E, Hedborg F, Fagerstrom S, Gestblom C, Johansson I, Larsson U, Lavenius E, Ortoft E, et al. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 453-458
- Parker WD, Jr., Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989; 26: 719-723
- Perry TL, Krieger C, Hansen S, Eisen A. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 1990; 28: 12-17
- Petris MJ, Strausak D, Mercer JF. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2845-2851
- Rasia RM, Bertoncini CW, Marsh D, Hoyer W, Cherny D, Zweckstetter M, Griesinger C, Jovin TM, Fernandez CO. Structural characterization of copper(II) binding to alpha-synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4294-4299
- Refsum H, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur J Pediatr* 1998a; 157 Suppl 2: S45-49
- Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998b; 49: 31-62
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3-32
- Reid MB, Kobzik L, Brecht DS, Stamler JS. Nitric oxide modulates excitation-contraction coupling in the diaphragm. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998; 119: 211-218

Reish O, Townsend D, Berry SA, Tsai MY, King RA. Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 127-132

Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology* 2003; 37: 1475-1492

Robinson K, Gupta A, Dennis V, Arheart K, Chaudhary D, Green R, Vigo P, Mayer EL, Selhub J, Kutner M, Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 1996; 94: 2743-2748

Rota C, Chignell CF, Mason RP. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med* 1999a; 27: 873-881

Rota C, Fann YC, Mason RP. Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J Biol Chem* 1999b; 274: 28161-28168

Rotilio G, Carri MT, Rossi L, Ciriolo MR. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life* 2000; 50: 309-314

Royce PM, Steinmann B. Markedly reduced activity of lysyl oxidase in skin and aorta from a patient with Menkes' disease showing unusually severe connective tissue manifestations. *Pediatr Res* 1990; 28: 137-141

Ruiz FH, Gonzalez M, Bodini M, Opazo C, Inestrosa NC. Cysteine 144 is a key residue in the copper reduction by the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 1999; 73: 1288-1292

Sanchez Ferrer A, Santema JS, Hilhorst R, Visser AJ. Fluorescence detection of enzymatically formed hydrogen peroxide in aqueous solution and in reversed micelles. *Anal Biochem* 1990; 187: 129-132

Santhosh-Kumar CR, Hassell KL, Deutsch JC, Kolhouse JF. Are neuropsychiatric manifestations of folate, cobalamin and pyridoxine deficiency mediated through imbalances in excitatory sulfur amino acids? *Med Hypotheses* 1994; 43: 239-244

Santos LM, Teixeira C, Vilanova LC, Micheletti C, Mendes CS, Borri ML, Martins AM. Menkes disease: case report of an uncommon presentation with white matter lesions. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59: 125-127

Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, Gitlin JD. Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol* 1999; 276: G639-646

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1: 1269

Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary

spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 159-170

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

Sengupta S, Wehbe C, Majors AK, Ketterer ME, DiBello PM, Jacobsen DW. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 46896-46904

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 476-483

Seshadri S. Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 393-398

Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2003a; 23: 10756-10764

Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 2003b; 179: 9-16

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

Shim H, Harris ZL. Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr* 2003; 133: 1527S-1531S

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

Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 1984; 226: 850-852

Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V. Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals. *J Neurochem* 2003; 84: 112-118

Stabler SP, Steegborn C, Wahl MC, Oliveriusova J, Kraus JP, Allen RH, Wagner C, Mudd SH. Elevated plasma total homocysteine in severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *Metabolism* 2002; 51: 981-988

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

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

Storch KJ, Wagner DA, Burke JF, Young VR. [1-¹³C; methyl-²H₃]methionine kinetics in humans: methionine conservation and cystine sparing. *Am J Physiol* 1990; 258: E790-798

Storch KJ, Wagner DA, Young VR. Methionine kinetics in adult men: effects of dietary betaine on L-[²H₃-methyl-1-¹³C]methionine. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 386-394

Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2003; 18: 147-154

Sturman JA, Gaull G, Raiha NC. Absence of cystathionase in human fetal liver: is cystine essential? *Science* 1970; 169: 74-76

Sturniolo GC, Mestriner C, Irato P, Albergoni V, Longo G, D'Inca R. Zinc therapy increases duodenal concentrations of metallothionein and iron in Wilson's disease patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 334-338

Syme CD, Nadal RC, Rigby SE, Viles JH. Copper binding to the amyloid-beta (A β) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A β -(1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques. *J Biol Chem* 2004; 279: 18169-18177

Tabor H, Rosenthal SM, Tabor CW. The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine and methionine. *J Biol Chem* 1958; 233: 907-914

Taylor RT, Weissbach H. N⁵-Methyltetrahydrofolat-homocysteine methyltransferases. In: Boyer PD, Hrsg. *The enzymes:PART B*. 3 ed. New York: Academic, 1973

Thomson SW, Heimburger DC, Cornwell PE, Turner ME, Sauberlich HE, Fox LM, Butterworth CE. Correlates of total plasma homocysteine: folic acid, copper, and cervical dysplasia. *Nutrition* 2000; 16: 411-416

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

Ungvari Z, Pacher P, Rischak K, Szollar L, Koller A. Dysfunction of nitric oxide mediation in isolated rat arterioles with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1899-1904

Vina J, Vento M, Garcia-Sala F, Puertes IR, Gasco E, Sastre J, Asensi M, Pallardo FV. L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 1067-1069

Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 221-230

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

White AR, Bush AI, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Exacerbation of copper toxicity in primary neuronal cultures depleted of cellular glutathione. *J Neurochem* 1999a; 72: 2092-2098

White AR, Collins SJ, Maher F, Jobling MF, Stewart LR, Thyer JM, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol* 1999b; 155: 1723-1730

White AR, Multhaup G, Maher F, Bellingham S, Camakaris J, Zheng H, Bush AI, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J Neurosci* 1999c; 19: 9170-9179

White AR, Reyes R, Mercer JF, Camakaris J, Zheng H, Bush AI, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res* 1999d; 842: 439-444

White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 2001; 76: 1509-1520

Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* 1994; 5: 1485-1488

Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998; 156: 65-72

Wiedemann FR, Vielhaber S, Schroder R, Elger CE, Kunz WS. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal Biochem* 2000; 279: 55-60

Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Loschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res* 1999; 826: 53-62

Wüllner U, Kolsch H, Linnebank M. Methylenetetrahydrofolate reductase in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 58: 972-973

Yan GM, Ni B, Weller M, Wood KA, Paul SM. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res* 1994; 656: 43-51

Young VR, Y-M. Y, Fukagawa NK, Raguso CA. Methionine kinetics and balance. In: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, Hrsg. *Homocysteine Metabolism: From Basic Science to Clinical Medicine*. Boston: Kluwer Academic, 1998

Yu YM, Han PL, Lee JK. JNK pathway is required for retinoic acid-induced neurite outgrowth of human neuroblastoma, SH-SY5Y. *Neuroreport* 2003; 14: 941-945

Zhao WQ, Williams Z, Shepherd KR, Reuben JS, Lee ES, Darling-Reed S, Lamango N, Soliman KF, Charlton CG. S-adenosyl-methionine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002; 69: 519-529

8 Danksagung

Folgenden Personen danke ich für Ihre Unterstützung:

Herrn Prof. Dr. U. Wüllner für die Überlassung des Themas

Herrn Prof. W. Kunz für die Messung der COX-Aktivität und Verfügung der Daten

Herrn Dr. M. Linnebank für die Hilfe im Rahmen der experimentellen Durchführung im Labor sowie für den Rat, die Mithilfe und Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit

Frau Dr. C. Nölker für die Bereitstellung der SH-SY5Y-Neuroblastomzellen, sowie die Unterstützung bei der Kultivierung der primären Neurone

Frau S. Proske-Schmitz für die Einarbeitung und Hilfe im Rahmen der experimentellen Durchführung im Labor

Herrn T. Höller für die statistische Beratung