

**Klinisch-epidemiologische und *in-vitro*-Analysen
zum Einfluss der Variante
Methylentetrahydrofolat-Reduktase c.1298A>C
auf neurodegenerative Erkrankungen**

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

Anna Antonina Miśkiewicz
aus Krakau/ Polen

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.12.2010

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

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 7 |
| 1 EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN..... | 9 |
| 1.1.1 M. Parkinson | 10 |
| 1.1.2 Multisystematrophie | 11 |
| 1.1.3 X-Adrenoleukodystrophie | 13 |
| 1.2 GLUTATHION UND OXIDATIVER STRESS BEI NEURODEGENERATION | 14 |
| 1.2.1 Glutathion..... | 14 |
| 1.2.2 Oxidativer Stress unter dem Aspekt der Neurodegeneration | 17 |
| 1.2.2.1 Allgemeines | 17 |
| 1.2.2.2 Entstehung des oxidativen Stresses..... | 17 |
| 1.2.2.3 Verhalten des Glutathions beim oxidativen Stress | 18 |
| 1.2.2.4 Oxidativer Stress am Beispiel des M. Parkinson | 19 |
| 1.3 HOMOCYSTEIN | 21 |
| 1.3.1 Metabolismus des Homocysteins..... | 21 |
| 1.3.1.1 Allgemeines | 21 |
| 1.3.1.2 Homocystein und Prokoagulation | 24 |
| 1.3.1.3 Wirkung des Homocysteins an Neurotransmitter-Rezeptoren | 24 |
| 1.3.1.4 Variabilität des Homocysteinspiegels | 25 |
| 1.3.2 Polymorphismen: MTHFR c.677C>T, c.1298A>C..... | 26 |
| 1.3.2.1 Polymorphismen der MTHFR | 26 |
| 1.3.2.2 MTHFR 677 und 1298 und die Tumorigenese..... | 27 |
| 1.3.2.3 Weitere Polymorphismen im Homocysteinstoffwechsel..... | 28 |
| 2 ZIELSETZUNG | 29 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 30 |
| 3.1 PATIENTENKOLLEKTIV | 30 |
| 3.2 STATISTISCHE ANALYSE | 31 |
| 3.3 CHEMIKALIEN | 31 |
| 3.4 HERSTELLEN DER STAMMLÖSUNGEN | 34 |
| 3.5 ZELLKULTURARBEIT | 34 |
| 3.5.1 Fibroblastenlinien | 34 |
| 3.5.2 Auftauen und Einfrieren..... | 35 |
| 3.5.3 Passagieren mit Trypsin..... | 36 |
| 3.5.4 Neubauer-Zählkammer | 37 |
| 3.5.5 Aussäen in Well-Platten | 38 |
| 3.6 GLUTATHIONMESSUNG..... | 39 |
| 3.6.1 Vorbereitung zur Glutathionmessung..... | 39 |
| 3.6.2 Proteinmessung | 40 |
| 3.6.3 Glutathionmessung | 41 |
| 3.6.3.1 Messung von GSX..... | 41 |
| 3.6.3.2 Messung von GSH und GSSG | 43 |
| 3.7 H ₂ O ₂ -STRESS..... | 43 |
| 3.7.1 H ₂ O ₂ -Stress in unterschiedlichen Konzentrationen | 43 |
| 3.7.2 Messung von Glutathion bei H ₂ O ₂ -gestressten Zellen | 44 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.8 | VITALITÄTSMESSUNG MIT DEM ALAMAR BLUE ASSAY | 45 |
| 3.9 | PHYSIKALISCHE PRINZIPIEN DER EINGESETZTEN METHODEN..... | 46 |
| 3.9.1 | Fluoreszenzmessung der Reduktion von Alamar Blue..... | 46 |
| 3.9.2 | Spektralphotometrie | 47 |
| 4 | ERGEBNISSE | 48 |
| 4.1 | MTHFR c.1298A>C UND DAS ERKRANKUNGSALTER..... | 48 |
| 4.2 | ZELLKULTURANALYSE: GLUTATHION | 52 |
| 4.2.1 | Basalwerte des Glutathions..... | 52 |
| 4.2.2 | Glutathionkonzentrationen nach oxidativem Stress | 53 |
| 4.3 | ZELLKULTURANALYSE: VITALITÄT | 58 |
| 4.3.1 | Wildtypen | 59 |
| 4.3.2 | MTHFR c.1298CC..... | 59 |
| 4.3.3 | MTHFR KO-Zellen..... | 60 |
| 4.3.4 | CBS-Mutanten..... | 61 |
| 5 | DISKUSSION..... | 69 |
| 5.1 | HOMOCYSTEIN | 69 |
| 5.2 | GLUTATHION BEI NEURONEN | 70 |
| 5.3 | GLUTATHIONPEROXIDASE | 72 |
| 5.4 | METHODENKRITIK: ALAMAR BLUE | 73 |
| 5.5 | ERGEBNISKRITIK | 74 |
| 5.5.1 | C-Allel und das Erkrankungsalter..... | 74 |
| 5.5.2 | Vergleich der Quotienten GSSG/GSX..... | 75 |
| 5.5.3 | Besonderheit des Genotyps MTHFR c.1298CC..... | 75 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 77 |
| 7 | ANHANG | 79 |
| 7.1 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 79 |
| 7.2 | TABELLENVERZEICHNIS | 79 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 80 |
| 9 | DANKSAGUNG..... | 86 |
| 10 | LEBENS LAUF..... | 87 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| ACTH | Adrenokortikotropes Hormon |
| ALD | Adrenoleukodystrophie |
| ALMN | Adrenoleukomyeloneuropathie |
| AMN | Adrenomyeloneuropathie |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| ATP | Adenosin-5-triphosphat |
| Bcl | <i>B-cell lymphoma</i> - B-Zell-Lymphom |
| Bidest | bidestilliertes Wasser |
| CBS | Cystathionin- β -Synthase |
| CCALD | <i>childhood cerebral ALD</i> – kindliche zerebrale Adrenoleukodystrophie |
| CL | Cystathionin- γ -Lyase |
| COMT | Catechol-O-Methyl-Transferase |
| CT | Computertomographie |
| DMPO | 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonucleinsäure |
| DTNB | 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Folat | = Folsäure |
| γ -GT | γ -Glutamyltranspeptidase |
| GCI | <i>glial cytoplasmatic inclusions</i> – gliale zytoplasmatische Einschlüsse |
| GSX | Glutathion (gesamt) |
| GSH | Glutathion (reduziert) |
| GSSG | Glutathion (oxidiert) |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| L-Dopa | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| M | molar (Mol pro Liter) |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MSA | Multisystematrophie |
| MTHFR | Methylentetrahydrofolatreduktase |

| | |
|----------------------------------|---|
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADP | Nicotinamidadeninucleotidphosphat (oxidiert) |
| NADPH | Nicotinamidadeninucleotidphosphat (reduziert) |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumphosphat |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartatrezeptor |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| OPCA | olivo-ponto-zerebelläre Atrophie |
| P | Protein |
| PD | <i>Parkinson's disease</i> = Morbus Parkinson |
| PET | Positronenemissionstomographie |
| pH | negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> – phosphatgepufferte Salzlösung |
| ·R | Radikal |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> – Ribonucleinsäure |
| ROOH | Peroxide |
| ROS | <i>reactiv oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezies |
| SAM | S-Adenosyl-Methionin |
| SND | striatonigrale Degeneration |
| SPECT | <i>single photon emission computed tomography</i> – Single-Photon-Emissionscomputertomographie |
| THF | Tetrahydrofolat |
| TIA | Transitorische ischämische Attacke |
| TNB | 5-Thio-2-nitrobenzoesäure |
| UV-Licht | ultraviolettes Licht |
| VLCFA | <i>very long chain fatty acids</i> – überlangkettige Fettsäuren |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| · | Symbol für ein ungepaartes Elektron |

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegeneration ist ein wesentliches Kennzeichen epidemiologisch bedeutsamer Erkrankungen des Gehirns, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit und der Parkinson-Krankheit (Bains und Shaw, 1997).

Bei dem Vorgang der Neurodegeneration werden im Wesentlichen zwei Mechanismen unterschieden, die Nekrose und die Apoptose. Beide Vorgänge können als Konsequenz auf neuronalen Zelluntergang verstanden werden.

Der erste Mechanismus, die Nekrose, ist eine passive Form des Zelluntergangs als Folge einer Schädigung. Sie involviert eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes und einen schnellen Zusammenbruch der zellulären Homöostase durch Verlust der selektiven Membranpermeabilität, Organellschwellungen und Ruptur der Zellmembran.

Demgegenüber steht der zweite Mechanismus, die Apoptose. Hierbei handelt es sich um einen programmierten aktiven Zelltod, welcher eine ATP- und Proteinsynthese erfordert (Bonfoco et al., 1995).

Der Neuronenuntergang durch Apoptose erfolgt auch durch *in vivo* vorkommende sog. endogene Neurotoxine, wie z.B. den Neurotransmitter Glutamat. Diese Form der Exzitotoxizität beschreibt einen neuronalen Zelltod, der durch exzessive Aktivierung von Glutamatrezeptoren durch deren Agonisten erfolgt.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen wird eine leichte „chronische“ Exzitotoxizität angenommen, die sich kontinuierlich über die Zeit entwickelt. Ein weiterer sicherer Risikofaktor für die Neurodegeneration ist das Alter. Mögliche Mechanismen sind die mit zunehmendem Alter steigende Bildung von Oxidanzien und die abnehmende Funktion von Mitochondrien (Beal, 1992).

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Variante c.1298A>C (E429A) der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) das Erkrankungsalter der Alzheimer-Krankheit beeinflusst (Kölsch et al., 2004). Im klinisch-epidemiologischen Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Variante auch das Erkrankungsalter anderer neurodegenerativer Erkrankungen (Parkinson-Krankheit, Multisystematrophie, X-Adrenoleukodystrophie) beeinflusst. Im *in-vitro*-Teil dieser Arbeit

sollte der mögliche Einfluss der MTHFR-Aktivität auf die zelluläre Resistenz gegen oxidativen Stress untersucht werden.

1.1.1 M. Parkinson

Bei der Parkinson-Krankheit handelt es sich um eine langsam verlaufende progressive neurodegenerative Erkrankung, welche nach dem Londoner Arzt James P. Parkinson (1755-1824) benannt wurde. Es ist die häufigste neurologische Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters mit einer Prävalenz von 1% der über 60jährigen (Häufigkeitsgipfel: 58.-62. Lebensjahr). Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt 1,9:1.

Die Parkinson-Krankheit ist eine Störung des extrapyramidalen Systems, der Basalganglien, mit einem Überwiegen cholinergischer Reaktionen in Folge einer Degeneration neuromelaninreicher dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta*, die auf cholinerge Neurone im *Corpus striatum* hemmend einwirken, und einer Ablagerung von Lewy-Körperchen mit einem konsekutiven Verlust des Vorderhirndopamins. Die Lewy-Körperchen sind runde, mit Neurofilamenten angefüllte zytoplasmatische Einschlüsse, die hauptsächlich in der *Substantia nigra pars compacta* von Parkinson-Patienten gefunden werden können (Duffy und Tennyson, 1965).

Zur Entstehung der Parkinson-Krankheit existieren unterschiedliche, sich zum Teil überschneidende Hypothesen. Eine veränderte Aktivität der Mitochondrien und oxidativer Stress scheinen an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt zu sein (Di Monte, 1991).

Für die Entstehung oxidativen Stresses bei Parkinson-Patienten spricht die hohe Eisenkonzentration in der *Substantia nigra pars compacta* obduzierter Patienten. Aber auch der Metabolismus von Dopamin selbst durch Autooxidation oder enzymatischen Katabolismus könnte oxidativen Stress bedingen.

Zum einen entsteht durch die Autooxidation das toxische Semiquinon während der Bildung von Neuromelanin. In geringem Maße entsteht auch das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin durch die Oxidation von Dopamin durch die Monoaminoxidase (MAO). Durch die Desaminierung von Dopamin durch die MAO unter Beteiligung der Aldehyd-Dehydrogenase entsteht neben 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Homovanillinsäure auch H₂O₂. Dieses H₂O₂ kann durch die *Fenton*-Reaktion, die eisenabhängig ist, zu den

hoch toxischen Hydroxylradikalen umgewandelt werden. Hydroxylradikale können die Lipidperoxidation und den Zelltod induzieren (Jenner, 1993). Diese Ätiologie wird bei der primären idiopathischen Form der Parkinson-Krankheit diskutiert. Eine sekundäre bzw. symptomatische Parkinson-Krankheit entsteht als Folge von Zerebralsklerose, postenzephalitisch, toxisch oder medikamentös.

Alternativ kann Dopamin durch Methylierung über das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT), welches S-Adenosylmethionin (SAM) als Cosubstrat bzw. Methylgruppendonor nutzt, methyliert und damit inaktiviert werden (Volc, 2003).

Das Leitsymptom der Parkinson-Krankheit besteht aus einer für die Diagnose nicht obligaten Trias aus Akinese, Rigor und Tremor. Nach neueren Kriterien gilt die posturale Instabilität als weiteres Leitsymptom.

Die Therapie erfolgt durch Substitution von DOPA oder DOPA-Agonisten, durch Hemmung des DOPA-Abbaus (COMT-Inhibitoren) und/oder durch Anticholinergika, die die cholinerge Überaktivität der striatalen Zellen dämpfen. In manchen schweren Fällen erfolgt eine stereotaktische Operation zur Ausschaltung von Teilen des Pallidums oder des Thalamus.

1.1.2 Multisystematrophie

Die Multisystematrophie (MSA) mit Pandysautonomie wird auch progressive zentrale autonome Insuffizienz und *idiopathic orthostatic hypotension* genannt. Die Erstbeschreibung des klinischen und pathologischen Bildes der MSA mit autonomer Dysfunktion erfolgte durch die beiden Neurologen George Milton Shy und Albert Drager im Jahre 1960 (Shy und Drager, 1960). Die beiden Neurologen beschrieben zwei Patienten, die neben einer Parkinsonsymptomatik noch an Erektionsstörungen und orthostatischer Hypotension litten. Das Krankheitsbild nannten sie das Shy-Drager-Syndrom.

Neben dem Shy-Drager-Syndrom wurde noch die sporadische olivo-ponto-zerebelläre Atrophie (OPCA) und die striatonigrale Degeneration (SND) beschrieben, die heute alle als unterschiedliche klinische Ausprägungen der MSA zu verstehen sind (Lantos, 1997). Die MSA ist eine progrediente neurodegenerative Erkrankung unklarer Ätiologie. Sie tritt sporadisch im Erwachsenenalter mit einer Prävalenz von 4,4/100.000 bei einer Inzidenz von 3/100.000 auf. Somit ist die MSA eine seltene Erkrankung. Oft wird sie verkannt

oder falsch diagnostiziert. Etwa 10% der Patienten mit diagnostizierter Parkinson-Krankheit leiden an einer MSA (Quinn, 1989). Sowohl Männer als auch Frauen sind betroffen. Der Erkrankungsbeginn liegt meist um die 6. Lebensdekade. Die mediane Überlebensdauer nach Diagnosestellung beträgt neun Jahre (Wenning et al., 2000).

In der Klinik werden zwei Subtypen unterschieden. In etwa 80% der Fälle dominiert die Parkinsonsymptomatik. Diese Form wird als der MSA-P-Subtyp bezeichnet, welche durch ein meist L-DOPA-refraktäres Parkinson-Syndrom charakterisiert ist. Der MSA-C-Subtyp beschreibt Patienten mit einem Überwiegen der zerebellären Ataxie. Diese Form liegt in etwa 20% der Fälle vor (Gilman et al., 1998).

Ein Frühsymptom männlicher MSA-Patienten sind erektile Funktionsstörungen (Schulz et al., 1994). Das autonome Versagen bedeutet eine orthostatische Hypotonie, die häufig mit fehlender reflektorischer Tachykardie assoziiert ist.

Die Diagnose erfolgt nach Ausschluss von Differentialdiagnosen durch die klinisch-neurologische Untersuchung. Die Abgrenzung zur idiopathischen Parkinson-Krankheit geschieht aufgrund der raschen Progredienz und des Verlustes der Gehfähigkeit innerhalb von weniger als fünf Jahren bei der MSA ab Diagnosestellung sowie aufgrund des frühen autonomen Versagens. Klinisch haben MSA-Patienten – im Gegensatz zu Parkinson-Patienten – häufig eine bereits initial symmetrische Ausprägung der Parkinsonsymptome. In schwierigen Fällen kann zur Differenzierung zwischen M. Parkinson und der MSA das IBZM-SPECT hinzugezogen werden. I-123 IBZM ist ein D2-Rezeptorligand. Bei MSA-Patienten fehlen postsynaptische Dopaminrezeptoren. Parkinson-Patienten hingegen haben intakte postsynaptische Dopaminrezeptoren, aber defekte dopaminerge Neurone (Pirker und Brücke, 2004).

Neuropathologisch zeigt sich eine selektiv neuronale Multisystemdegeneration mit Ablagerung glialer zytoplasmatischer Einschlüsse in Oligodendrozyten (*glial cytoplasmatic inclusions, GCI*), die sich ubiquitin-, tau- und α -Synuklein-positiv darstellen.

Der Therapie der MSA liegt ein multimodaler Ansatz zugrunde (Wüllner und Klockgether, 2003). Die Parkinson-Symptomatik wird trotz der häufigen Refraktärität mit L-Dopa therapiert, weil zumindest zu Anfang in bis zu 30% eine Besserung eintritt. Bei der orthostatischen Hypotonie können eine salzreiche Ernährung, elastische Stützstrümpfe und medikamentös Fludrocortison und Ephedrin versucht werden. Für die

Therapie der Dranginkontinenz aufgrund der Detrusorhyperreflexie kommen Oxybutinin und eine intermittierende Selbstkatheterisierung in Betracht. Ergänzend eingesetzt werden u.a. die Logopädie und die Physiotherapie.

1.1.3 X-Adrenoleukodystrophie

Die Adrenoleukodystrophie (X-ALD), auch Siemerling-Creutzfeldt-Krankheit, M. Addison mit Hirnsklerose oder *melanodermic leukodystrophy* genannt, ist eine X-chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankung.

Bezman et al. (2001) schätzten die Häufigkeit der Hemizygoten in den USA auf mindestens 1:42.000 und die der Homozygoten und Heterozygoten zusammen auf 1:16.800 (Bezman et al., 2001).

Die erste Fallbeschreibung der X-ALD erfolgte durch die deutschen Neurologen E. Siemerling und H. G. Creutzfeldt im Jahre 1923. Im Jahre 1963 beschrieben A. Fanconi et al. von der Züricher Universitäts-Kinderklinik die X-ALD in ihrer Arbeit unter dem Titel „Morbus Addison mit Hirnsklerose im Kindesalter - ein hereditäres Syndrom mit X-chromosomaler Vererbung?“. Fanconi et al. definierten die ALD als „klar umrissenes, familiär auftretendes, vermutlich X-chromosomal-rezessiv vererbtes Krankheitsbild“.

Aufgrund des heterogenen klinischen Verlaufs werden mehrere Formen der X-ALD unterschieden. Am häufigsten sind zum einen die bereits in der Kindheit schnell progrediente Form CCALD (*childhood cerebral ALD*), zum anderen die sich im Erwachsenenalter manifestierende Adrenomyeloneuropathie (AMN). Die AMN lässt sich weiter differenzieren, in die Adrenoleukomyeloneuropathie (ALMN), die durch demyelinisierte Herde im ZNS charakterisiert ist und in die „reine“ Adrenomyeloneuropathie („*pure*“ AMN), die keine demyelinisierten Herde aufweist (Linnebank et al., 2006).

Die Ursache für die X-ALD liegt in einer Mutation des ABCD1-Gens, welches auf Chromosom Xq28 liegt. Es kodiert für ein Protein der peroxisomalen Membran, das für den Transport der überlangkettigen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*; VLCFA) nötig ist. Peroxisomen sind Zellorganellen, die u.a. für die Bildung und Reduktion von H₂O₂ verantwortlich sind. Biochemisch sind bei der X-ALD die VLCFA-Blutspiegel erhöht, weil die β -Oxidation der VLCFA in den Peroxisomen gestört ist. Dies nutzt man zur Diagnosestellung aus. VLCFA sind überlangkettige Fettsäuren C_{24:0}-C_{30:0}, die

normalerweise in jedem Gewebe vorkommen. Besonders hohe Konzentrationen findet man in Myelinlipiden und Erythrozyten-Sphingomyelin, die bei der X-ALD eine pathologische Zusammensetzung aufweisen. (Moser et al., 1984a; Singh et al., 1984; Chen et al., 1987).

Die Therapie der X-ALD gestaltet ist schwierig. Diätetische Maßnahmen mit einer C_{26:0}-Restriktion zeigten keinen klaren Nutzen. Eine Knochenmarkstransplantation erniedrigt zwar den C_{26:0}-Plasmaspiegel, kann aber das Fortschreiten der neurologischen Symptome nicht eindeutig aufhalten (Moser et al., 1984b).

1.2 Glutathion und oxidativer Stress bei Neurodegeneration

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte in einem biochemisch-experimentellen Ansatz *in vitro* untersucht werden, ob der Polymorphismus MTHFR c.1298A>C, dessen Einfluss auf das Erkrankungsalter von neurodegenerativen Erkrankungen im ersten Teil dieser Arbeit untersucht wird, die zelluläre Resistenz gegen oxidativen Stress beeinflusst.

1.2.1 Glutathion

Obwohl das Gehirn nur ca. 2% der Gesamtkörpermasse des Menschen ausmacht, verbraucht es ca. 20% des insgesamt vom menschlichen Organismus verbrauchten Sauerstoffs (Clarke und Sokoloff, 1999). Dabei fallen viele Oxidanzien an, die auf unterschiedliche Weise neutralisiert werden. Eine Substanz, die dem Organismus zur Neutralisation der oxidativen Stressfaktoren u.a. zur Verfügung steht, ist das Glutathion. Im Jahre 1921 isolierte Hopkins Glutathion aus Hefe und aus verschiedenen Säugetiergeweben (Quastel et al., 1923). Hopkins beschrieb das weiße, amorphe, leicht wasserlösliche Pulver, das Glutathion, mit der chemischen Formel C₈H₁₄O₅N₂S.

Glutathion ist ein Tripeptid (*γ-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin*), welches sowohl in Pflanzen als auch in Säugetieren weit verbreitet ist. Die Konzentrationen von Glutathion können je nach Gewebe und der damit verbundenen Funktion stark variieren: vom mikromolaren Bereich im Zellplasma bis zum millimolaren Bereich in Geweben wie der Leber. In Säugetierzellen kann es eine Konzentration bis zu 12 mmol/l erreichen (Wendel und Cikryt, 1980).

Auch ist der Spiegel des Glutathions nicht in jeder Zellart gleich. So haben beispielsweise Astrozyten höhere Glutathionspiegel als Neurone, sowohl in Kultur als auch *in vivo* (Dringen, 2000a).

Die Synthese von Glutathion erfordert Energie. Wie in der Abb. 2 zu sehen ist, entsteht Glutathion als Folge zweier ATP-verbrauchender enzymatischer Reaktionen. Aus Cystein und Glycin entsteht durch die Katalyse der γ -Glutamylcystein-Synthetase das Dipeptid γ -Glutamylcystein. In einem weiteren Schritt entsteht schließlich durch die Glutathionsynthetase das Glutathion.

Das Gleichgewicht zwischen zellulärer Synthese und Verbrauch wird durch die vom Endprodukt Glutathion ausgehende *Feedbackinhibition* auf die von der γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysierte Reaktion reguliert (Richman und Meister, 1975; Kaplowitz et al., 1996).

Glutathion existiert in zwei Formen: als reduziertes Glutathion (GSH) und als oxidiertes Glutathion (GSSG). Die Interkonvertibilität dieser beiden Zustände macht die Bedeutung von Glutathion aus und ermöglicht die Erfüllung vieler für den Stoffwechsel wichtigen Funktionen.

Die Reduktion von Oxidanzien ist wohl die wichtigste Funktion des Glutathions (Foyer et al., 1994; Arias und Jakoby, 1976; Baillie und Slatter, 1991). Die Abbildung 1 verdeutlicht die Funktion des Glutathions als Antioxidanz.

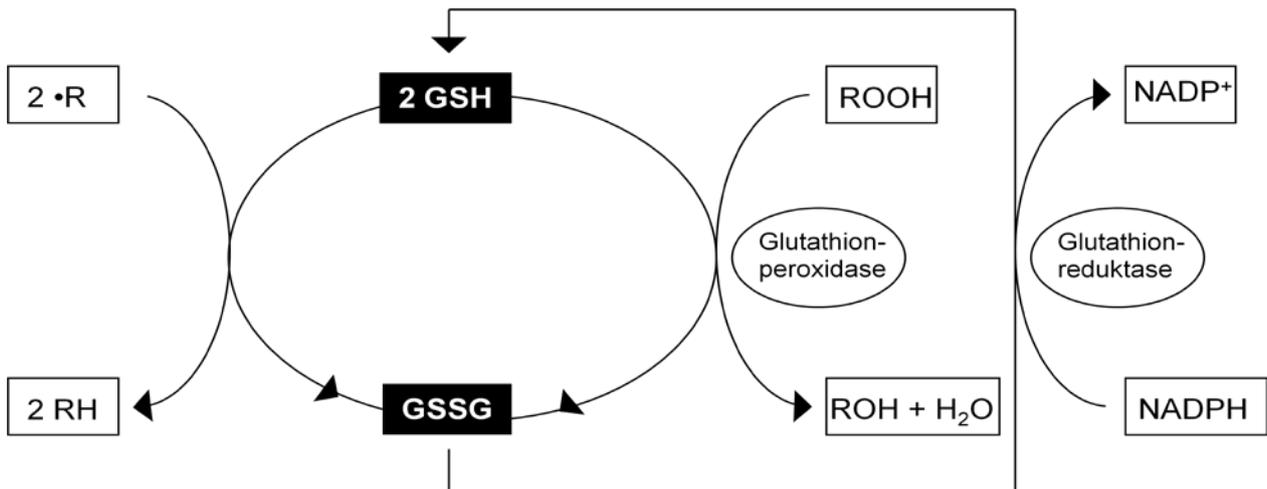


Abbildung 1: Metabolismus des Glutathions.

GSH = Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion, ·R = Radikal

Auf eine nichtenzymatische Weise kommt es zu einer Reaktion von Glutathion mit Radikalen (·R). Dabei werden zwei Moleküle Glutathion in das Glutathiondisulfid GSSG überführt. Das GSSG wird über das Flavoenzym Glutathionreduktase regeneriert, das NADPH als Cofaktor benutzt. Dabei werden Reduktionsäquivalente von NADPH zu GSSG transferiert. Durch die Glutathionperoxidase wird die Reduktion von Peroxiden (ROOH) mit dem Glutathion als essentiellm Elektronendonator katalysiert. Glutathion wird auf diese Weise regeneriert.

Die Aufrechterhaltung des Thiol-Redoxpotentials in Zellen durch Bewahrung der Sulfhydrylgruppen von zytosolischen Proteinen in ihrer reduzierten Form ist eine weitere Funktion des Glutathions.

Auch bei der Regulation der Apoptose scheint das Glutathion beteiligt zu sein. Hall (1999) zeigte, dass Störungen der mitochondrialen Permeabilität während der Apoptose möglicherweise durch verändertes intrazelluläres Redoxpotential reguliert werden.

Eine Störung dieser Glutathionhomöostase kann zu oxidativem Stress führen oder aus ihm resultieren und in neurodegenerativen Erkrankungen münden. In der Folge vermindert sich die Funktion des Glutathions als einem wichtigen intrazellulären Antioxidanz, und der Schutz gegen eine Vielfalt an unterschiedlichen oxidativen Stressfaktoren ist nicht mehr gegeben.

1.2.2 Oxidativer Stress unter dem Aspekt der Neurodegeneration

1.2.2.1 Allgemeines

Während eines oxidativen Stoffwechsels entstehen kontinuierlich Oxidanzien. Diese sind anorganischer (Superoxidradikalanione, Hydrogenperoxide, Hydroxylradikale) und organischer (Alkoxy- und Peroxylradikale) Natur. Würden die Oxidanzien nicht neutralisiert werden, käme es zu Schädigungen der Zelle durch DNA-Strangbrüche, Lipidperoxidation und Proteinmodifikation (Schulz et al., 2000).

Das Gehirn scheint besonders vulnerabel für Oxidanzien zu sein. Es besitzt nämlich viele Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, die für die Lipidperoxidation anfällig sind. Ferner besitzt das Gehirn nur wenige bis mäßige Spiegel an den oxidativen Stress bewältigenden Enzymen wie beispielsweise der Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, verglichen beispielsweise mit der Niere oder der Leber (Cooper, 1997).

1.2.2.2 Entstehung des oxidativen Stresses

Oxidativer Stress entsteht im Gehirn auf vielfältige Weise. Zum einen stellen Metabolisierungsvorgänge in Mitochondrien einen möglichen Ursprungsort für Oxidanzien dar, zum anderen fallen diese durch Reaktionen der Enzyme NO-Synthase, Xanthinoxidase, Monoaminoxidase, der P-450-Enzyme und im Arachidonsäuremetabolismus an. Aufgrund des hohen Metabolismus der Neurone kommt es zu einer verhältnismäßig hohen Grundbelastung an oxidativen Faktoren. Gesunde Neuronen besitzen viele Abwehrmechanismen gegenüber dem oxidativen Stress wie beispielsweise die Superoxiddismutase, Katalase, GSH-Peroxidase, GSH-S-Transferase, α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Glutathionreduktase und das Glutathion. Unter normalen physiologischen Bedingungen können Zellen die anfallenden Oxidanzien neutralisieren.

Oxidativer Stress beschreibt hingegen einen Zustand, bei dem die zellulären antioxidativen Abwehrmechanismen nicht mehr in der Lage sind, den Spiegel an Oxidanzien unter einer toxischen Schwelle zu halten. Dies kann zu einem Anstieg an Oxidanzien, einem Verlust an Antioxidanzien oder beidem führen (Referenzen in 5.5.3).

1.2.2.3 Verhalten des Glutathions beim oxidativen Stress

Der Verlust an Glutathion und der oxidative Schaden können zur Apoptose der Zellen führen (Sato et al., 1995). Li et al. (1997) zeigten, dass ein Abfall an Glutathion die Aktivierung der neuronalen 12-Lipoxygenase triggert, die zur Produktion von Peroxiden, zum Calciumeinstrom und zum endgültigen Zelltod führt. Diese Beobachtung bestätigten Wüllner et al. (1999), indem sie zeigten, dass ein direkter Mangel an mitochondrialem und zytoplasmatischem Glutathion in einem Anstieg der Oxidanzien, einer Störung des mitochondrialen transmembranösen Potentials und einem schnellen Verlust der Mitochondrienfunktion resultiert.

Eine neue Erkenntnisse bringende Arbeit zum oxidativen Stress und dem Glutathionsystem bei Neuronen legte die Arbeitsgruppe um Kussmaul et al. (1999) vor. Wie oben beschrieben, führt oxidativer Stress zu einer schnellen Oxidation von Glutathion. Astrozyten und Neurone bedienen sich beide des Glutathions als Antioxidanz, nutzen aber unterschiedliche Vorstufen des Glutathions. Bei Neuronen limitiert nur die Verfügbarkeit an Cystein den Spiegel an Glutathion (Desagher et al., 1996), (s.a. Diskussion).

In den Astrozyten hingegen reduziert die Inhibition von Katalase nur wenig die *Clearance* von H_2O_2 , so lange das Glutathionsystem funktioniert. Werden hingegen beide an der Neutralisation von Peroxiden beteiligten Enzyme – Katalase und Glutathionperoxidase – neutralisiert, so wird die Neutralisationsmöglichkeit in Astrozyten beeinträchtigt. Diese Beobachtung aus der Arbeit von Kussmaul et al. zeigt, dass das Glutathionsystem in den Astrozyten die Katalasefunktion in Bezug auf H_2O_2 übernehmen kann. Weil Katalase nur nicht-organisches H_2O_2 als Substrat benutzt, reicht das Glutathion zur Detoxifikation aus.

Dringen et al. (2000b) fanden in ihrer Arbeit heraus, dass eine Kokultur von Neuronen und Astrozyten dazu führt, dass der Vorläufer von Cystein von den Astrozyten an die Neurone zur Verfügung gestellt wird, was das neuronale Glutathionsystem und damit die Abwehr gegen den oxidativen Stress deutlich verbessert.

1.2.2.4 Oxidativer Stress am Beispiel des M. Parkinson

Oxidativer Stress spielt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige pathophysiologische Rolle. So zeigte beispielsweise Jenner (2003), dass oxidativer Stress bei der Parkinson-Krankheit zu der Kaskade beiträgt, die zum Untergang von Dopaminzellen führt. Der Spiegel an oxidativen Stressfaktoren in der *Substantia nigra pars compacta* ist bei Parkinsonerkrankten erhöht.

Die genaue Beteiligung des oxidativen Stresses in der Degeneration der Zellen in der *Substantia nigra* ist noch nicht geklärt. Das Vorhandensein von Neuromelanin in den dopaminergen Zellen lässt eine Autooxidation von Dopamin und eine Polymerisation vermuten, durch die Radikale gebildet werden (Graham, 1978; Fahn, 1997; Weiner, 2000). Der Dopaminabbau durch die Monoaminoxidase hebt den oxidativen Spiegel durch Generation von H_2O_2 an, diese Reaktion bringt höhere Spiegel an oxidiertem Glutathion hervor (Spina und Cohen, 1988). Normalerweise wird das entstandene H_2O_2 durch Katalase oder die Glutathionperoxidase unter Verwendung des Glutathions als Cosubstrat inaktiviert. Das Kompartiment der Katalase ist das Peroxisom. Das H_2O_2 entsteht auf zweierlei Weise. Zum einen kann es direkt durch Enzyme gebildet werden. Zum anderen entsteht es durch die Katalyse von der Superoxiddismutase.



H_2O_2 kann weiter mit Fe^{2+} reagieren und so das hochreaktive und zytotoxische Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) über die sogenannte *Fenton*-Reaktion bilden. Die $\cdot\text{OH}$ -Bildung über die *Fenton*-Reaktion bildet die gemeinsame Endstrecke vieler Radikalinteraktionen.



Diese Reaktion unterhält sich von alleine, weil der Dopaminmangel, bedingt durch den Untergang von Dopaminneuronen, zu einem kompensatorischen Anstieg des Dopaminumsatzes führt, mit einer erhöhten Bildung an H_2O_2 und einer größeren antioxidativen Anforderung an das Glutathionsystem in den verbliebenen Neuronen. Belegt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass ein gesteigerter Dopaminumsatz mit einer erhöhten Bildung an oxidiertem Glutathion verbunden ist.

Dessen Bildung kann im Gegenzug mit Dopaminantagonisten verhindert werden (Spina und Cohen, 1989).

In einer Krankheit wie der Parkinson-Krankheit sind die Spiegel an reduziertem Glutathion vermindert, die Eisenspiegel vermehrt und der mitochondriale Komplex I geschädigt (Cassarino und Bennet, 1999).

In präklinischen Stadien dieser Erkrankung, in denen andere biochemische Veränderungen noch nicht nachgewiesen werden können, ist bereits eine Abnahme der Gesamtglutathionmenge in der *Substantia nigra* nachzuweisen.

Da Glutathion die Blut-Hirn-Schranke nicht oder kaum überschreiten kann, werden andere Behandlungsoptionen diskutiert, um die Hirnkonzentration an Glutathion zu steigern, wie Glutathionanaloga oder -vorstufen.

Das Glutathionanalogon YM 737 zeigte im Tierversuch, dass es durch eine Hemmung der Lipidperoxidation einen Schutz vor zerebraler Ischämie gewährt (Yamamoto et al., 1993). Weil zur Synthese von Glutathion Cystein nötig ist, ist die Synthese des Glutathions in Neuronen durch das Vorhandensein von Cystein limitiert. Deren Menge kann indirekt durch *Prodrugs* gesteigert werden. Zu beachten ist jedoch, dass Cystein an sich in höheren Konzentrationen toxisch für Neurone ist (Olney et al., 1990).

1.3 Homocystein

1.3.1 Metabolismus des Homocysteins

1.3.1.1 Allgemeines

Die Synthese des Glutathions erfordert das Vorhandensein von Homocystein. Homocystein, eine schwefelhaltige Aminosäure des Intermediärstoffwechsels, wurde im Jahre 1932 von de Vigneaud entdeckt. Er beschrieb das Homocystein als eine als Disulfid vorliegende und an Albumin gebundene und deswegen nur zum geringen Teil freie Aminosäure.

Frühe ausführliche Arbeiten zum Homocystein liegen von Frimpter vor. Bereits 1961 beschrieb er das Disulfid von L-Cystein und L-Homocystein im Urin von Patienten, die an Cystinurie litten. Im Jahre 1963 folgte eine weitere Arbeit von Frimpter, in der er sich mit dem Ursprung dieses Disulfids beschäftigte. Frimpter fand zusammenfassend heraus, dass dieses Disulfid in Spuren bei unterschiedlichen Stoffwechselstörungen nachweisbar ist. Weiter schlug Frimpter die Annahme vor, dass das Disulfid aus Homocystein und Cystein einen normalen Metaboliten bei Gesunden darstellt. Im Jahre 1963 präziserte Mudd im Rahmen der Synthese von S-Adenosyl-Methionin das Verhalten von Homocystein während der Elektrophorese.

Homocystein entsteht als schwefelhaltiges Intermediärprodukt aus der essentiellen Aminosäure Methionin. Unter Verbrauch von ATP und unter der Katalyse durch die Methionin-Adenosin-Methyltransferase wird über das Zwischenprodukt S-Adenosylhomocystein Homocystein gebildet (Abb. 2). Das Ausgangsprodukt Methionin entsteht wieder aus Homocystein, indem das letztere durch Aufnahme einer Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat remethyliert wird. Dieser Vorgang wird durch das Enzym Methioninsynthase katalysiert. Hierbei wird das Vitamin B₁₂ als Kofaktor benötigt.

Es existiert noch ein weiterer möglicher Metabolisierungsweg: Hierbei wird Homocystein durch das Enzym Cystathionin-β-Synthase mit Vitamin B₆ als Kofaktor zu Cystathionin umgewandelt. In einem weiteren Schritt katalysiert die Cystathionin-γ-Lyase die Bildung von Cystein aus Cystathionin. Auch hier wird das Vitamin B₆ als Kofaktor benötigt.

Aus Cystein und Glutamat wird durch die γ -Glutamylcysteinsynthetase unter ATP-Verbrauch das Zwischenprodukt γ -Glutamylcystein, aus welchem die Glutathionsynthetase unter erneutem ATP-Verbrauch und Glycinzufuhr das Glutathion bildet.

Die Ursachen für erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma werden im Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga (2003) dargestellt:

1. Alters- und Geschlechtsabhängigkeit: Mit dem Alter nimmt das Homocystein zu. Männer haben höhere Konzentrationen, möglicherweise wirkt das Östrogen bei prämenopausalen Frauen protektiv.
2. Genetisch determinierte Enzymdefekte: Die thermolabile Variante MTHFR c.677C>T findet sich bei 5-15% der Bevölkerung im homozygoten Zustand. Mangel an Folsäure führt bei ihren Trägern zu einer Homocysteinerhöhung um bis zu 25%. Weitere genetische Varianten mit erhöhten Homocysteinwerten sind Mutationen im CBS-Gen (Maleady et al., 2003).
3. Mangel an Vitaminen B₂, B₆, B₁₂ und Folat (Beitz et al., 2002)
4. Medikamente
5. Proliferative Erkrankungen: Psoriasis, akute lymphatische Leukämie, rheumatoide Arthritis
6. Schilddrüse: Hypo- und Hyperthyreose
7. Nierenfunktionsstörungen
8. Rauchen, Kaffee, Alkohol

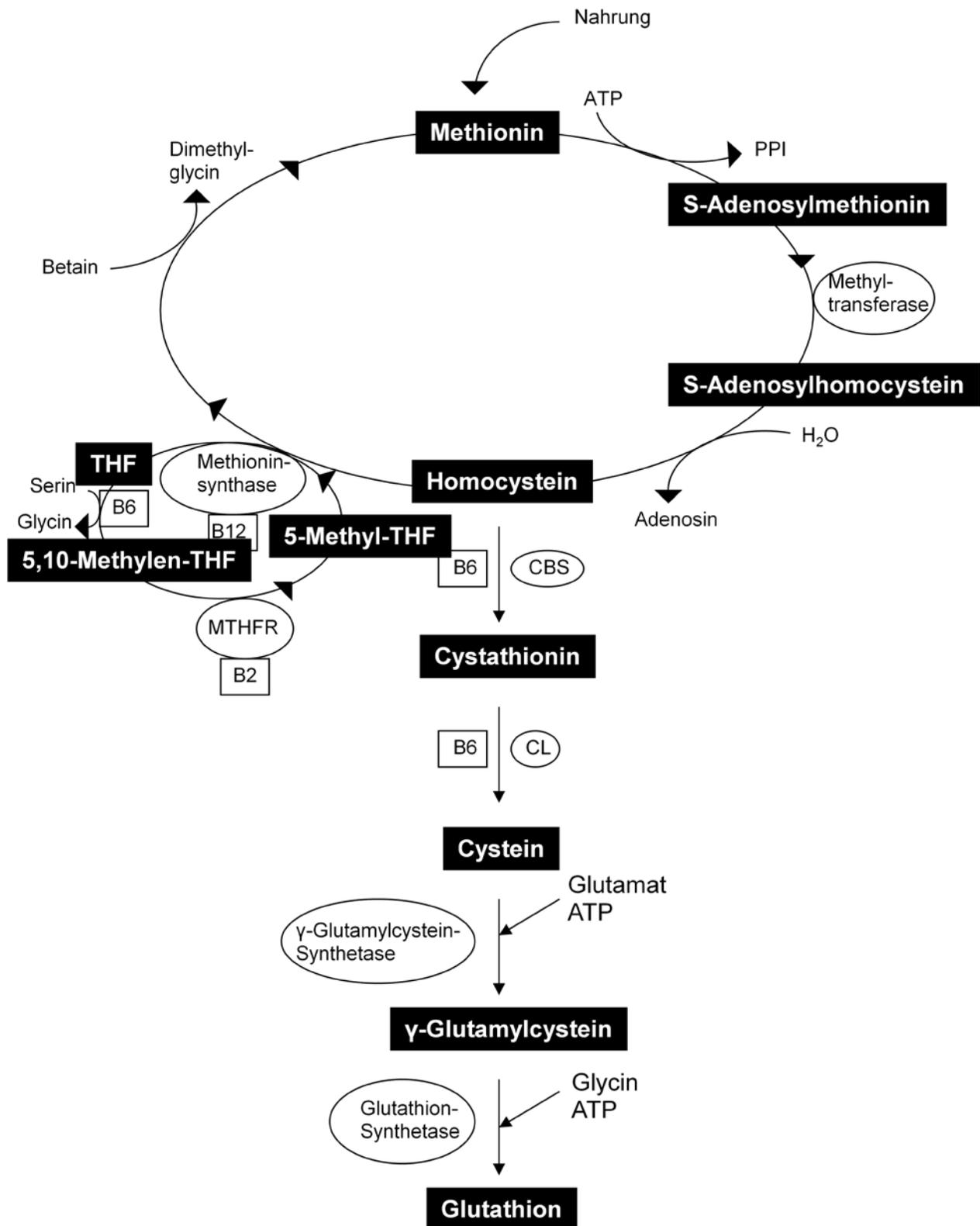


Abbildung 2: Homocysteinmetabolismus und Glutathionsynthese.

B2 = Vitamin B₂, B6 = Vitamin B₆, B12 = Vitamin B₁₂, MTHFR = Methylentetrahydrofolatreduktase, CBS = Cystathionin-β-Synthase, CL = Cystathionin-γ-Lyase, THF = Tetrahydrofolat.

1.3.1.2 Homocystein und Prokoagulation

Schon lange beschäftigt sich die Forschung mit den Ursachen der Zelldegeneration. Denam Harman stellte bereits im Jahre 1954 die Theorie der freien Radikale auf. Damit erklärte er den Alterungsprozess. Als therapeutische Konsequenz folgte damals die hochdosierte Supplementierung mit antioxidativen Vitaminen A, C und E. Um den Nutzen dieser Vitamingaben zu testen, wurden zahlreiche klinische Studien in den folgenden Jahren durchgeführt. Eine im Jahr 2001 im Lancet veröffentlichte Studie untersuchte den Benefit einer Vitamin-E-Supplementierung bei kardiovaskulär vorgeschädigten Patienten im Vergleich zu einer ASS-Supplementierung. Das Ergebnis zeigte, dass eine Vitamin E-Supplementierung keineswegs die ASS-Gabe ersetzen kann.

Weiter wurde untersucht, ob die Supplementierung der Vitamine der B-Gruppe durch Senkung des Homocysteins das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko reduzieren kann. Die Erwartungen wurden jedoch nicht erfüllt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Verbindung zwischen Homocystein und zerebrovaskulären Erkrankungen stärker zu sein scheint als zwischen Homocystein und den koronaren Herzerkrankungen. Zwischen 23% und 47% der Patienten mit zerebralen oder peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten hatten erhöhte Plasmahomocysteinspiegel (Francis, 1992).

Die Eigenständigkeit von Homocystein als ein Risikofaktor für prokoagulatorische Vorgänge wird schon lange angenommen (Wald et al., 1998; De Bree et al., 2002). Homocystein führt zu einer Schädigung des Endothels mit einer Stimulation inflammatorischer Prozesse der Gefäßwand. Ferner wird die Gerinnungskaskade bei gleichzeitiger Hemmung der Fibrinolyse aktiviert. Eindrucksvoll zeigten Durand et al. (2001), dass eine Hyperhomocysteinämie ein prokoagulatorisches Milieu bei gleichzeitigem Verlust der antithrombotischen Endothelfunktion induziert.

1.3.1.3 Wirkung des Homocysteins an Neurotransmitter-Rezeptoren

Lipton et al. (1997) untersuchten die Rolle des Homocysteins am N-Methyl-D-Aspartatrezeptor (NMDA-Rezeptor). Sie zeigten, dass Homocystein sowohl als Agonist an der Glutamatbindungsregion als auch als partieller Antagonist an der Glycinbindungsregion des Rezeptors agieren kann. Bei normalen Glycinkonzentrationen wirkt Homocystein als ein partieller Antagonist und inhibiert so die NMDA-Rezeptor-

vermittelte Aktivität. Als Agonist ist Homocystein ein potentielles Exzitotoxin. Lipton et al. zeigten weiter, dass sich die Agonistenfunktion des Homocysteins an der Glutamatbindungsstelle des NMDA-Rezeptors bei normalen Glycinkonzentrationen nur dann durchsetzt, wenn Homocystein millimolare Konzentrationen erreicht. Unter normalen Bedingungen nämlich liegt die Homocysteinkonzentration im mikromolaren Bereich.

1.3.1.4 Variabilität des Homocysteinspiegels

Die Bildung von Homocystein erfolgt intrazellulär v.a. in der Leber. Über einen nicht näher charakterisierten zellulären Exporter gelangt das Homocystein ins Blut und somit in den Liquor und Urin. Störungen im Stoffwechsel von Homocystein führen zur Erhöhung des Homocysteinspiegels. Sowohl für Erwachsene als auch für Kinder werden bei Männern und Frauen Durchschnittswerte von 5-15 μM an totalem Plasmahomocystein als Normalwerte angesehen (Bostom et al., 1999).

Die bei Erwachsenen bekannte Erhöhung der Homocysteinspiegel liegt meist im Bereich 15-50 μM und wird als Hyperhomocysteinämie bezeichnet. Die Ursachen für Homocysteinerhöhungen sind vielfältig (s.a. 1.3.1.1).

Es gibt zum einen unbeeinflussbare Faktoren wie das Geschlecht, das Alter oder genetische Polymorphismen, die auch zu einer Variabilität des Homocysteinspiegels führen.

Die Erniedrigung der Homocysteinkonzentration geschieht vor allem durch das Schlüsselenzym Cystathionin- β -Synthase (CBS), welche Homocystein Vitamin-B₆-abhängig in das Cystathionin überführt (s. Abb. 2). Ein Mangel an CBS führt zu einem Anstieg des Homocysteins und einem erhöhtem Risiko für Gefäßerkrankungen (Wilcken, 1997).

Bei der klassischen autosomal-rezessiv vererbaren Homocystinurie dominieren Symptome wie Atherosklerose, Thromboembolien, psychomotorische Retardierung, Dislokationen der Augenlinse und skelettale Abnormalitäten.

Zum anderen gibt es beeinflussbare Faktoren, wie den Vitaminmangel. Dieser Faktor ist der häufigste, der zu einer Erhöhung der Homocysteinwerte führt. Gründe für eine Vitaminmangelversorgung sind vielfältig. Diese kann sowohl aus einer verminderter Zufuhr oder verminderter Aufnahme im Magen-Darm-Trakt als auch aus dem

vermehrten Verbrauch resultieren oder durch Wechselwirkungen bedingt sein. Einseitige Ernährungsgewohnheiten, Alkoholabusus oder die Einnahme bestimmter Medikamente können ebenfalls zu einer Vitaminmangelversorgung führen.

Eine Substitutionstherapie mit Folat, Vitamin B₆ und B₁₂ kann den Risikofaktor Homocystein wirkungsvoll, nebenwirkungsarm und kostengünstig mindern und so zur kardiovaskulären Prophylaxe effektiv beitragen.

1.3.2 Polymorphismen: MTHFR c.677C>T, c.1298A>C

1.3.2.1 Polymorphismen der MTHFR

Das menschliche Enzym MTHFR (MTHFR; Enzym Kommission 1.5.1.20) befindet sich auf dem Chromosom 1p36.3 (Goyette et al., 1994).

MTHFR reduziert NADPH-abhängig und irreversibel 5,10-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF, welches ein Kohlenstofflieferant bei der Remethylierung von Homocystein zu Methionin darstellt.

Es existieren vier Transkriptionsweisen von MTHFR, die in ihren ersten Exonen differieren (Hombberger et al., 2000).

Am Beispiel des MTHFR-Polymorphismus MTHFR c.677C>T (Alanin>Valin) werden die klinischen Auswirkungen beschrieben:

In Mitteleuropa sind ca. 5-15% der Bevölkerung homozygote Träger der sogenannten thermolabilen MTHFR-Variante c.677TT (Klerk et al., 2002). Im Rahmen der Identifizierung von neun Mutationen des MTHFR-Gens berechneten Frosst et al. (1995) eine Allelfrequenz dieser C zu T Substitution des Nukleotids 677 mit 0,38. Diese Substitution bedeutet, dass die homozygoten Mutationsträger nur eine 30%-ige Enzymaktivität besitzen. Jacques et al. (1996) zeigten, dass es zu einer Homocysteinerhöhung im Plasma bei diesen Mutationsträgern um ca. 25% kommt, sobald die Folsäurezufuhr niedrig ist. Heterozygote Träger dieser Mutation haben eine 65%-ige Restaktivität des MTHFR-Enzyms. Frosst et al. (1995) schlugen die homozygote Variante MTFHR c.677C>T als wichtigen Risikofaktor für vaskuläre Insulte vor.

Diese Vermutung wurde durch die Studie von Linnebank et al. (2005a) verifiziert, in der gezeigt wurde, dass der folatsensitive Polymorphismus MTHFR c.677C>T im homozygoten Zustand mit einem früheren Einsetzen von Schlaganfällen bei Patienten jünger als 60 Jahre und bei Patienten mit einem Schlaganfall ungeklärter Ätiologie assoziiert ist.

Sogenannte Lifestyle-Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie und Hypercholesterinämie sind bei Kindern - im Gegensatz zu Erwachsenen - von untergeordneter Bedeutung. Aus diesem Grund untersuchten Prengler et al. (2001) in einer weiteren klinischen Studie mit 118 Kindern mit Schlaganfällen und TIA-Episoden die Auswirkungen des homozygoten Zustandes der thermolabilen Variante des MTHFR-Gens (c.677C>T) als potentiellen Risikofaktor für Hyperhomocysteinämie, arterielle und venöse Verschlusskrankheiten.

Kinder mit homozygoten MTHFR-Variante hatten einen signifikanten Anstieg der PlasmahomocysteinKonzentration verglichen mit Heterozygoten oder Homozygoten für das Wildtypallel. Bei den Homozygoten lag das totale Plasmahomocystein durchschnittlich bei 11.4 µmol/l bei einer Variabilität von 6.3 bis 101.4 µmol/l. Das sehr hohe Plasmahomocystein von 101.4 µmol/l des einen homozygoten Patienten fiel bei Folatsubstitution auf 23.3 µmol/l.

1.3.2.2 MTHFR 677 und 1298 und die Tumorigenese

Die Beteiligung der Polymorphismen MTHFR c.677C>T und c.1298A>C an der Tumorigenese mehrerer humaner Karzinome wird ebenfalls diskutiert. Matsuo et al. (2001) untersuchten die Verbindung zwischen folat- und methioninmetabolisierenden Enzymen und der Anfälligkeit gegenüber malignen Lymphomen. Sie fanden u.a. heraus, dass die beiden Polymorphismen der MTHFR, die c.677C>T und c.1298A>C, welche eine intrazelluläre Anhäufung an 5,10-Methylentetrahydrofolat bedingen und in einem geringeren Vorkommen an DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren, zu einer geringeren Anfälligkeit für maligne Lymphome führen.

Weitere Arbeiten beschreiben hingegen das gehäufte Auftreten von Neuralrohrdefekten, koronaren und zerebrovaskulären Erkrankungen, der kolorektalen Karzinogenese, venösen thrombembolischen Ereignissen, dem Endometriumkarzinom und der

lymphoblastischen Leukämie bei Vorhandensein der beiden Polymorphismen c.677C>T und c.1298A>C auf (Ma et al., 1997; Estellar et al., 1997, Skibola et al., 1999).

1.3.2.3 Weitere Polymorphismen im Homocysteinstoffwechsel

Im Gegensatz zu den beschriebenen Polymorphismen scheint der funktionelle Polymorphismus der Methioninsynthase (MS) c.2576A>G (D919G) den Homocystein- und Folatmetabolismus günstig zu beeinflussen, indem es eine protektive Funktion gegenüber onkologischen, neurodegenerativen und vaskulären Erkrankungen ausübt. Die Methioninsynthase katalysiert die Remethylierung von Homocystein zu Methionin. Mit einer Allelfrequenz von 15-20% (G-Allel) in der Normalbevölkerung kommt der *Missense*-Dimorphismus MS c.2756A>G vor. Das Vorhandensein des G-Allels scheint einen niedrigeren Spiegel an Homocystein und somit einen protektiven Effekt gegenüber kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen sowie der Alzheimer-Erkrankung zu bedingen (Hyndman et al., 2000).

Linnebank et al. (2005b) untersuchten ein klinisch gesundes Patientenkollektiv, in dem sich herausstellte, dass die Prävalenz des G-Allels signifikant höher bei älteren als bei jüngeren Patienten war. Dadurch stützten sie die These, dass MS c.2576 A>G günstig für ein klinisch krankheitsfreies Leben ist.

Eine andere Untersuchung von Linnebank et al. (2004a) zeigte, dass der Polymorphismus eine protektive Funktion gegenüber der Entwicklung von primären Lymphomen des zentralen Nervensystems ausübt. Die biochemischen Auswirkungen des Polymorphismus MS c.2576A>G auf den Verbrauch von Folsäure und die Synthese von Methionin und S-Adenosylmethionin (SAM) sind bisher nicht hinreichend untersucht worden.

2 Zielsetzung

Die *Missense*-Variante c.1298A>C (E429A) des Gens 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) beeinflusst früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe zufolge das Erkrankungsalter der Alzheimer-Krankheit. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte in einem genetisch-epidemiologischen Ansatz untersucht werden, ob dieser Polymorphismus auch das Erkrankungsalter anderer neurodegenerativer Krankheiten beeinflusst: Parkinson-Krankheit, X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD) und Multisystematrophie (MSA). Für diese Untersuchung standen DNA-Proben von bereits klinisch charakterisierten Patientenkollektiven zur Verfügung (Parkinson-Krankheit: n= 556, X-ALD: n= 70, MSA: n= 97).

Es wird angenommen, dass oxidativer Stress ein relevanter Faktor in der Pathologie neurodegenerativer Krankheiten ist. Der zweite Teil der Arbeit sollte in einem biochemisch-experimentellen Ansatz *in vitro* untersuchen, ob der Polymorphismus MTHFR c.1298A>C die zelluläre Resistenz gegenüber oxidativem Stress beeinflusst. Hierfür standen jeweils mehrere Linien kultivierter Fibroblasten mit unterschiedlichen MTHFR-Genotypen zur Verfügung: c.1298AA = Wildtyp, MTHFR c.1298CC, MTHFR-defiziente Zellen (KO) mit geringer Restaktivität und CBS-defiziente Zellen.

3 Material und Methoden

Sowohl die klinisch-epidemiologischen Untersuchungen als auch die Experimente wurden an der Neurologischen Klinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Sigmund-Freud-Str. 25, Bonn, durchgeführt. Die fotografischen Aufnahmen der Fibroblastenlinien ermöglichte freundlicherweise die LIFE & BRAIN GmbH, Biomedizinische & Neurowissenschaftliche Technologie-Plattform, Bonn.

3.1 Patientenkollektiv

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter von Patienten mit drei neurodegenerativen Erkrankungen (M. Parkinson, Multisystematrophie, X-Adrenoleukodystrophie) untersucht. Hierfür standen cDNA-Proben von klinisch bereits charakterisierten Patienten zur Verfügung, die alle kaukasischen Ursprungs waren. Alle Patienten oder ihre gesetzlichen Betreuer gaben ihr schriftliches Einverständnis für die genetische Analyse. Das Erkrankungsalter (*age of onset*) wurde bei der ersten klinischen Untersuchung als das Alter bestimmt, bei dem zum ersten Mal die Symptome durch den Patienten selber oder durch die persönliche Umgebung erkannt wurden.

Die Gruppe der Patienten mit der Parkinson-Erkrankung umfasste in der Stichprobe PD1 n=342 Patienten mit einem mittleren Erkrankungsalter von 59±9 Jahren (100 weibliche Patienten), in der Stichprobe PD2 n=214 Patienten mit einem mittleren Erkrankungsalter von 51±13 Jahren (42% weibliches Geschlecht).

Eingeschlossen in die Stichprobe der Patienten mit Multisystematrophie waren n=97 Betroffene aus Bonn und aus England, die ein mittleres Erkrankungsalter von 58±11 Jahren aufwiesen (52 weibliche und 45 männliche Patienten).

Hinsichtlich der X-Adrenoleukodystrophie wurden n=70 Patienten mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 27±11 Jahren untersucht (53 männliche und 17 weibliche Patienten, die symptomatische Genträgerinnen waren).

3.2 Statistische Analyse

Die Verteilung der MTHFR c.1298A>C Genotypen innerhalb der unterschiedlichen Patientenkollektive (Parkinson-Erkrankung, Multisystematrophie, X-Adrenoleukodystrophie) wurde unter Verwendung des χ^2 -Tests (p-Werte wurden gemäß des Post-hoc-Tests nach Bonferroni korrigiert) verglichen.

Die Kaplan-Meier Analyse und ANOVA wurden benutzt, um das Erkrankungsalter in den einzelnen Patientenkollektiven abhängig von den unterschiedlichen Genotypen (AA, AC, CC) zu vergleichen. Im Folgenden wurde zunächst der homozygote Genotyp bestimmt, der den stärksten Effekt in der Bonferroni-Korrektur der ANOVA zeigte. Dieser Genotyp wurde schließlich explorativ mit den beiden anderen Genotypen verglichen.

Zur statistischen Berechnung der unterschiedlichen Konzentrationen von reduziertem, oxidierten und Gesamtglutathion bzw. der Vitalität wurde der T-Test verwendet.

Alle Unterschiede wurden auf Signifikanz geprüft. Werte $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.3 Chemikalien

| | |
|---|---|
| <i>Alamar Blue</i> | BioSource International, Camarillo, USA |
| DMEM: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> High Glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin | The cell culture company, PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| DMSO: Dimethylsulfoxid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| FCSa: aktives fötales Kälberserum | The cell culture company, PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| FCSi: inaktives fötales Kälberserum | The cell culture company, PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| PBS: Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (1x) ohne Calcium und Magnesium | The cell culture company, PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| Penicillin und Streptomycin | The cell culture company, PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| RMPI-Medium 1640 (1x) | Biochrom AG, Berlin |

Der Lowry Assay mit dem Sigma Kit der Firma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, enthält:

| |
|-------------------------------------|
| BSA: <i>Bovine serum albumin</i> |
| <i>Folin&Ciocalteu's Phenol</i> |
| <i>Lowry reagent solution</i> |
| 0,5 M Natronlauge (NaOH) |

Für den *Glutathion Assay* wurde Folgendes angesetzt:

| |
|--|
| DTNB: 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, Ellmans Reagenz |
| Glutathionpuffer aus 1 mM EDTA und 100 mM Natriumphosphat (Mischung aus Na ₂ HPO ₄ und NaH ₂ PO ₄ bis pH 7,5 erreicht wird) |
| Glutathion-Reduktase (Enzym) als Suspension in Ammoniumsulfatlösung |
| GSSG: oxidiertes Glutathion |
| NADPH: Nicotinamidadeninucleotidphosphat |
| SSA: 1%-ige 5-Sulfosalicylsäure |
| 0,2 M TRIS |
| Vinylpyridin |

Geräte und Utensilien:

| | |
|--|--|
| Brutschrank: 5% CO ₂ , 37°C | Nuaire IR Autoflow, CO ₂ -Water-Jacketed Incubator, Zapf Instruments, Sarstedt, Nümbrecht |
| Eppendorfgefäße Reagiergefäß 1,5 ml | Sarstedt, Nümbrecht |

| | |
|---|--|
| <i>Falcons</i> 15 ml | Cellstar, Greiner bio-one GmbH |
| Fluoreszenzplattenlesegerät | SpectraMAX Gemini, Molecular Devices |
| <i>Kryotubes</i> 1,8 ml | Cryoware, Cryogenic Vials, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA |
| Kulturflaschen 250 ml, 75 cm ² | Cellstar, Greiner bio-one GmbH |
| Mehrkanalpipette | Eppendorf 300 |
| Mikroskop | AXIOVERT 25 von der Firma ZEISS |
| Mikroskop des „Life & Brain“ | AXIOVERT 40 CFL von der Firma Zeiss |
| <i>Mini-Shaker</i> | MS 1 Minishaker, IKA |
| Neubauerzählkammer 0,0025 mm ² , Tiefe 0,100 mm | Firma Brand |
| Pipette | Handy Step, Firma Brand |
| Pipette | Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG |
| Pipetten 5, 10 und 25 ml | Costar stripette, Corning Incorporated, NY, USA |
| Pipettenspitzen | Biosphere Filter Tips Eppendorf/ Gilson, Sarstedt, Nürmbrecht |
| Plattenlesegerät | <i>Microplate Reader Optimax, Molecular Devices, USA</i> |
| Sterilbank | Hera Safe, Heraeus Instruments |
| Sterilbank | Nuaire Biological Safety Cabinets, class II, Zapf Instruments, Sarstedt |
| Stickstoffbehälter –196°C | TEC 2000, System Monitor, MVE XLC 511, Bio Medical Division, Chart Industries Inc. |
| Tiefgefriertruhe –86°C | Hera freeze, Heraeus, Kendro Laboratory Products |
| Waage | Sartorius (BP 2100) AG Göttingen |
| Wasserbad 37°C | Firma Köttermann |
| Wellplatten | Cellstar, Greiner bio-one GmbH |

| | |
|----------------------------|--|
| TC-Plate, 6 Well, 96 Well | |
| Zellschaber | Costar Cell Scraper, Corning Incorporated, NY, USA |
| Zentrifuge Biofuge primo R | Heraeus, Kendro Laboratory Products |
| Zentrifuge Megafuge 1.OR | Kendro Laboratory Products |

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) oder von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.4 Herstellen der Stammlösungen

Die verschiedenen Experimente habe ich unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Die Stammlösungen für die Zellkulturarbeit habe ich unter sterilen Bedingungen in der Werkbank hergestellt. Bei weiteren Arbeitsschritten während der Zellkulturopflege wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Die Pflege der Zellkulturen erfolgte mit einem Medium aus DMEM, 20% FCSa und 1% Penicillin/ Streptomycin-Gemisch.

Das Einfriermedium bestand aus RMPI, 50% FCSi und 10% DMSO.

Die 1%-SSA-Lösung wurde aus 40 ml Aqua bidest. und 10 ml 5%-SSA-Lösung hergestellt.

3.5 Zellkulturarbeit

3.5.1 Fibroblastenlinien

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Versuche mit 12 humanen Fibroblastenlinien durchgeführt, die von Herrn PD Dr. Michael Linnebank, früher Neurologie Bonn, aktuell Universitätsspital Zürich, zur Verfügung gestellt worden waren: Wildtypen (c.1298AA; ID 274, 277, 278), Zellen mit homozygotem Allelstatus für die Variante (c.1298CC; ID 273, 275, 280), MTHFR-defiziente Zellen mit geringer Restaktivität unter 5% (ID 657, 928, 1015) und Zellen mit einem CBS-Defekt und Restaktivität unter 5% (ID 1069, 1111, 1135).

Hervorzuheben ist bei der Zelllinienauswahl, dass die Zelllinie 657 mit einem MTHFR-Defekt eine sogenannte km-Variante ist, die eine Restaktivität des Enzyms von unter 20% aufweist.

3.5.2 Auftauen und Einfrieren

Zum Auftauen habe ich die bei -86°C in der Gefriertruhe oder die bei -196°C im flüssigen Stickstoff eingefrorenen 1-ml-*Kryotubes* mit den *Pellets* schnellstmöglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, um die Toxizität des Einfriermediums zu minimieren. Anschließend pipettierte ich den kompletten Inhalt ins 15-ml-*Falcon-Tube* und füllte das *Falcon* mit 9 ml DMEM-Medium, das durch entsprechende Zusätze aus 10% FCSa und 1% Penicillin/ Streptomycin bestand, auf. Nach der nun stattfindenden Zentrifugation (5 Minuten, 1500 Umdrehungen) saugte ich das Medium ab und fügte 10 ml frisches Medium ins *Falcon* hinzu. Es folgte eine gründliche Resuspension. Im Anschluss wurden die Zellen in einer Kulturflasche von 75 cm^2 ausgesät.

Zum Einfrieren spülte ich nach einer Passage mit Trypsin (s.u.) die Kulturflaschenwand gründlich mit dem Medium aus der Kulturflasche ab und überführte den Inhalt, also Fibroblasten und Medium, in ein 15-ml-*Falcon*. Es folgte die Zentrifugation von 5 Minuten Dauer bei 1500 Umdrehungen. Nachdem ich den Überstand abgesaugt hatte, fügte ich dem *Pellet* 1 ml Einfriermedium, bestehend aus RMPI, 50% FCSi und 10% DMSO, bei. Resuspendiert habe ich den Inhalt in ein 1-ml-*Kryotube* überführt und sofort aufs Eis gestellt. Die einzelnen *Kryotubes* wurden bei -86°C in der Gefriertruhe eingefroren.

Fibroblasten können auf diese Weise für ca. 9 Monate in der Tiefgefriertruhe gelagert werden. Friert man die Zellen im flüssigen Stickstoff bei -196°C ein, so beträgt die Lagerungsdauer bis zu 5 Jahren.



Abbildung 3: Fibroblasten bei einer Konfluenz von 50%.

Balken = 100 μm .

3.5.3 Passagieren mit Trypsin

Fibroblasten wachsen in Kulturflaschen als Monolayerkulturen. Die Subkultivierung adhärenter Zellen erforderte den Gebrauch von Trypsin. Nachdem ich das alte Medium aus der Kulturflasche entfernt hatte, wusch ich die Zellen mit 8-10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Geringe Spuren von serumhaltigem Medium hätten die Wirkung von Trypsin beeinträchtigen können. PBS habe ich verworfen und die Zellen mit 2 ml auf 37°C vorgewärmter Trypsinlösung 10 Minuten lang im Brutschrank behandelt.

Unter dem Mikroskop konnte man nach dieser Zeit fast alle Zellen, von der Unterlage abgelöst und abgerundet, in der Trypsinierungslösung schwimmend sehen. Mittels einer 10 ml Pipette spülte ich die noch lose anhaftenden Zellen mit 8 ml frischem Medium ab, fing diese in einem 15-ml-*Falcon* auf und resuspendierte sie anschließend. Es folgte die Zentrifugation von 5 Minuten Dauer bei 1500 Umdrehungen. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und die Zellen im *Falcon* mit 10 ml frischem Medium resuspendiert.

Je nach gewünschter Verdünnung (1:2 bis 1:5) gab ich entsprechende Mengen der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche und füllte diese mit frischem Medium auf jeweils 10 ml Gesamtvolumen auf.

Fibroblasten in Kulturflaschen benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Wechsel des Mediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Lauf der Zeit zerfallen. Zur Mediuernerneuerung und zur Subkultivierung betragen die Intervalle je nach Zelllinie bei einem beispielhaften 1:3-Split ungefähr 4 Tage.

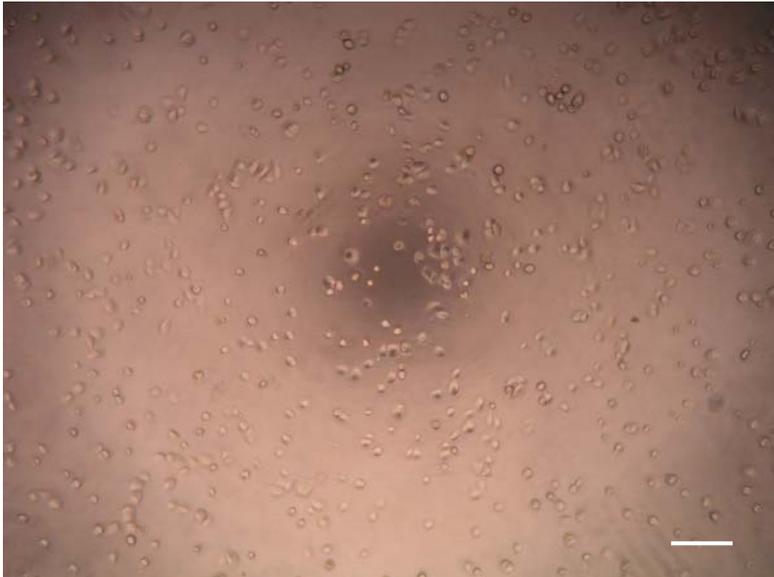


Abbildung 4: Fibroblasten bei 50x-Vergrößerung nach Trypsinisierung.

Balken = 200 µm.

3.5.4 Neubauer-Zählkammer

Für weitere Versuche und die Auswertung war es wichtig, dass eine gleiche Anzahl an Fibroblasten in den Zellkulturflaschen ausgesät wurde. Dazu bediente ich mich der Neubauer-Zählkammer.

Zunächst reinigte ich die Oberfläche der Zählkammer und das Deckglas mit 70%igem Ethanol. Das Deckglas wurde anschließend leicht angefeuchtet und auf die Zählkammer gelegt, bis sogenannte Newtonringe die richtig eingestellte Tiefe der Zählkammer von 0,1 mm anzeigten.

Nach der Passage mit Trypsin (s.o.) und der Zentrifugation entnahm ich 10 µl der Zellsuspension mit einer 10 µl Pipette. Durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer wurde die Suspension durch Kapillarkräfte in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer gesaugt.

Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung von vier großen Quadraten (bestehend aus 4x4 kleinen Quadraten), die Mittelwertbildung und die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter. Dazu führte ich eine Multiplikation des Mittelwertes mit 10^4 durch und erhielt auf diese Weise die Zellzahl pro Milliliter. Die Gesamtzellzahl errechnete ich durch Multiplikation der Zellzahl pro Milliliter mit dem Volumen der Zellsuspension, ggf. unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors.



Abbildung 5: Fibroblast bei 200x-Vergrößerung.

Balken = 50 μm .

3.5.5 Aussäen in Well-Platten

Für die nachfolgenden Messungen des Glutathions und des Proteingehalts wie auch für den H_2O_2 -Stress und die sich daraus ergebenden Messungen säte ich die Zellen je nach Versuchsanordnung in 6-Well-Platten bzw. in 96-Well-Platten aus. Für die 6-Well-Platte wählte ich eine Zellkonzentration von 200.000 Zellen pro Well, während ich für die 96-Well-Platte 15.000 Zellen pro Well aussäte.

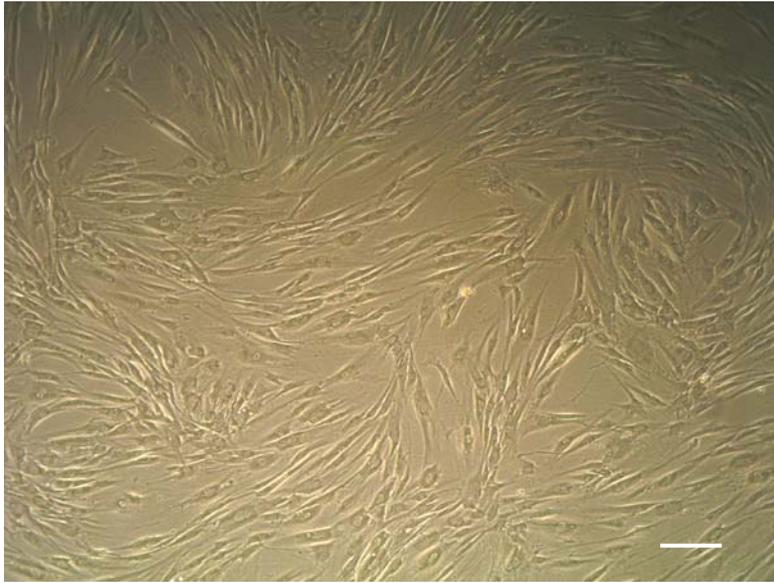


Abbildung 6: Fibroblasten während der Wachstumsphase.

Balken = 200 μm .

3.6 Glutathionmessung

3.6.1 Vorbereitung zur Glutathionmessung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Glutathiongehalt in Zellen vor und nach dem H_2O_2 -Stress miteinander zu vergleichen, um eine Aussage über deren Resistenz treffen zu können.

Zu Beginn stand die Messung des Glutathions von ungestressten Zellen. Dazu säte ich 6-Well-Platten à 200.000 Zellen pro Well aus und kultivierte diese im Brutschrank bis zur vollständigen Konfluenz. Nachdem ich das Medium aus den Wells abgezogen hatte, wusch ich die Zellen mit jeweils 2 ml PBS. PBS wurde verworfen. Zur Lyse der Zellen wurden nun in jedes Well 300 μl SSA hinzugefügt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach erfolgreicher Zelllyse wurden die restlichen Zellen unter Zuhilfenahme des Zellschabers von der Wand der Well-Platte losgelöst. Der gesamte Inhalt eines jeden Wells, also die Zellen und die 300 μl SSA, überführte ich jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß.

Die anschließende 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C brachte eine Zweiphasentrennung der Zellsuspension in einen Überstand (Zelllysat)

und in ein *Pellet* (Proteine). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das *Pellet* in 50 µl einer 0,5 M Natronlauge (NaOH) aufgelöst wurde. Sowohl der Überstand (für die Glutathionmessung) als auch das *Pellet* (für die Proteinmessung) wurden bei -86°C in der Gefriertruhe eingefroren.

3.6.2 Proteinmessung

Parallel zur Glutathionbestimmung erfolgte die Proteinbestimmung, um später beide miteinander in Relation setzen zu können. Hierzu verwendete ich den *Lowry Assay* mit dem *Sigma Kit* (Lowry et al., 1951). Alle Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers angefertigt.

Die in 50 µl einer 0,5 M NaOH-Lösung eingefrorenen Proteinsedimente (6 Reaktionsgefäße pro 6-Well-Platte) wurden aufgetaut. Nach Angaben des Herstellers wurde die BSA-Lösung (*Protein Standard Solution*) mit 400 µg/ml durch Zugabe von 5 ml *Aqua bidest.* hergestellt. Auf einem *Minishaker* wurde die BSA-Lösung gründlich gemischt.

Durch Zugabe der entsprechenden Mikroliter der BSA-Lösung und der *Aqua bidest.* zu jeweils einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bereitete ich sechs Reaktionsgefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen vor. Die Konzentrationen der in dieser Weise angefertigten Standards betragen 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml bei jeweils einer Gesamtmenge von 200 µl Inhalt pro Reaktionsgefäß.

Von den sechs eingefrorenen Proteinsedimenten entnahm ich jeweils 10 µl und mischte sie in einem neuen Reaktionsgefäß mit 190 µl *Aqua bidest.*

Nun wurden die Proben und die Standards mit jeweils 200 µl farbloser *Lowry reagent solution* gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nachdem ich zu den Proben und den Standards jeweils 100 µl grün-gelber *Folin & Ciocalteu's* Phenol-Lösung hinzugefügt hatte, ließ ich die Reaktionsgefäße für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen.

Innerhalb der folgenden 30 Minuten pipettierte ich die Standards und die Proben in Triplets à 150µl pro Well auf eine 96 -Well-Platte. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wurde im Anschluss die Konzentration mit dem Plattenlesegerät *Microplate Reader Optimax* gemessen (s.u.).

3.6.3 Glutathionmessung

3.6.3.1 Messung von GSX

Für die Messung des basalen Glutathions wurde ein in unserem Labor etablierter *Glutathion Assay benutzt, welcher die Chemikalien und Dosierungen des Glutathion Assay Kits* der Firma Cayman Chemical Company, Catalog No. 703002, USA verwendet. Hierbei wird die Gesamtglutathionmenge gemessen, d.h. die Summe aus den reduzierten und oxidierten Formen (GSH + 2GSSG).

Prinzip: Das Glutathion wurde durch eine enzymatische Recyclingmethode bestimmt, welche die Glutathionreduktase für die Quantifizierung des Glutathions (GSX) verwendet. Die Sulfhydryl-Gruppe des Glutathions reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, Ellmans Reagenz) und produziert eine gelbfarbene 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB). Das gemischte Disulfid, GSTNB (Mischprodukt zwischen GSX und TNB), das begleitend gebildet wird, wird durch die Glutathionreduktase reduziert, um das GSX zu recyceln und mehr TNB zu produzieren.

Die Menge des anfallenden TNB ist direkt proportional zu dieser Recycling-Reaktion, die wiederum direkt proportional zu der Konzentration an GSX in der Probe ist. Durch Messungen der Adsorption von TNB bei 412 nm lässt sich die Menge an GSX in der Probe sehr genau bestimmen. GSX kann leicht zu dem Disulfid-Dimer GSSG oxidiert werden. Das oxidierte Glutathion, GSSG, entsteht während der Reduktion von Wasserperoxid durch die Glutathionperoxidase. GSSG wird durch die Glutathionreduktase zum GSX reduziert.

Es ist vor allem die reduzierte Form, die hauptsächlich in Zellen vorkommt.

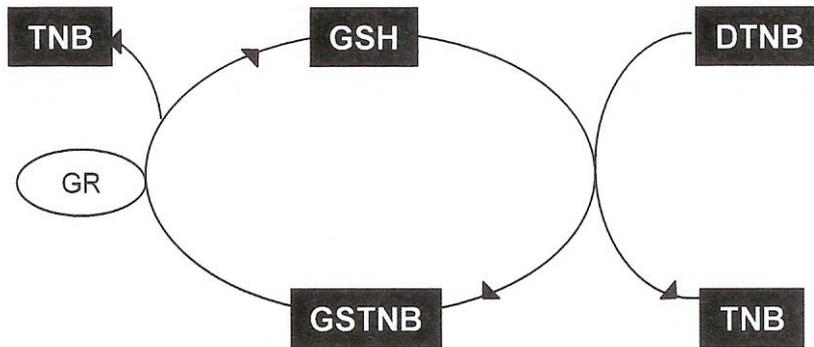


Abbildung 7: Prinzip des Glutathionassays.

Die Sulfhydryl-Gruppe des Glutathions (GSH) reagiert mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB). Es entsteht 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB). Begleitend wird das gemischte Disulfid GSTNB gebildet, welches durch die Glutathionreduktase (GR) wieder zu GSH reduziert wird. Parallel entsteht zusätzlich TNB.

Die Vorbereitung der Lösungen erfolgte nach Herstellerangaben.

Die sich bei -86°C befindlichen Proben, d.h. die Überstände der in 1%iger SSA-Lösung lysierten Zellen, habe ich auf Eis gestellt. Für die Herstellung der Standards verwendete ich Verdünnungen der GSSG-Standards. Das GSSG stand als $500\ \mu\text{M}$ Stocklösung zur Verfügung. Hiervon entnahm ich $200\ \mu\text{l}$ GSSG und vermischte sie mit $1,8\ \text{ml}$ 1% SSA, sodass eine $50\ \mu\text{M}$ GSSG-Lösung entstand. Für den Versuch benötigte ich Endkonzentrationen der GSSG-Standards von $3\ \mu\text{M}$, $4\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $7,5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $15\ \mu\text{M}$ und $20\ \mu\text{M}$ und stellte diese mit der jeweiligen Verdünnung durch 1% SSA her.

Das Endvolumen der GSSG-Standards betrug jeweils $1\ \text{ml}$. Alle Standards wurden auf Eis gestellt.

Für den Versuch benötigte ich eine 96-Well-Platte, die ebenfalls auf Eis während der Vorbereitung für die Messung gekühlt wurde. Pro 96-Well-Platte konnte ich die Messung für drei Zelllinien durchführen. Mit einer Mehrkanalpipette legte ich in jedes Well $90\ \mu\text{l}$ Glutathionpuffer vor. Anschließend wurden die Standards und die Proben in Triplets à $10\ \mu\text{l}$ pro Well auf der 96-Well-Platte verteilt.

Für die Reaktionslösung benötigte ich ein 15-ml-Falcon , in das ich $8900\ \mu\text{l}$ Glutathionpuffer, $288\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ DTNB, $384\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ NADPH und $30\ \mu\text{l}$ Glutathion-Reduktase hinzufügte. Die Glutathion-Reduktase wurde der Reaktionslösung durch Invertieren direkt vor der Messung beigefügt. Danach fügte ich sofort in jedes Well 100

µl der Reaktionslösung mit der Mehrkanalpipette hinein. Sofort im Anschluss startete ich den Messvorgang mit dem Plattenlesegerät *Microplate Reader Optimax*.

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 412 nm. Für die Kinetik wurden 10 Messpunkte im Abstand von je 30 sec gewählt bei einer ungefähren Gesamtmesszeit von 5 Minuten.

3.6.3.2 Messung von GSH und GSSG

Pro Zelllinie und Versuch wurden für die Messung von oxidiertem (GSSG) und reduziertem (GSH) Glutathion jeweils sechs Proben benötigt. Hierzu wurden die vorbereiteten und bei -86°C für die Glutathionmessung eingefrorenen Proben wieder aufgetaut.

Von den Proben (Überstände der Versuche aus 3.4.1) entnahm ich jeweils 32,5 µl und mischte sie mit weiteren 32,5 µl von den jeweiligen Standards in einem separaten Reaktionsgefäß. Für die Standardreihe wählte ich die gleichen Standardkonzentrationen wie in den Versuchen zur Messung des basalen Glutathions (s. 3.4.3.1).

In alle Reaktionsgefäße fügte ich jeweils 1,25 µl Vinylpyridin und 12,5 µl 0,2 M TRIS hinzu. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten.

In einer 96-Well-Platte legte ich anschließend in jedes Well 90 µl vom Glutathionpuffer vor. In Triplets verteilte ich nun jeweils 10 µl der jeweiligen Suspension aus dem jeweiligen Reaktionsgefäß auf der Well-Platte.

Der weitere Versuchsablauf folgte der unter 3.4.3.1 beschriebenen Vorgehensweise.

Die durch *Optimax* berechneten Werte ergaben die Werte für das oxidierte Glutathion. Durch Subtraktion von der Gesamtgluthionmenge (GSX) erhielt man die Werte für das reduzierte Glutathion.

3.7 H₂O₂-Stress

3.7.1 H₂O₂-Stress in unterschiedlichen Konzentrationen

Bei jedem der drei nacheinander durchgeführten Wiederholungsversuche wurden für jede der zwölf Zelllinien je drei 96-Well-Platten à 15.000 Zellen pro Well ausgesät und im Brutschrank bei 37°C bis zur vollständiger Konfluenz inkubiert. Zusammen ergab das 108 96-Well-Platten.

Insgesamt wurden für die Statistik 7.392 Einzelwerte ausgewertet (s.a. Kapitel 4 Ergebnisse).

Nachdem der basale Glutathion- und Proteingehalt bestimmt worden war, begann ich die nächste Versuchsreihe – den oxidativen Stress. Hierzu bediente ich mich einer H_2O_2 -Lösung als oxidativen Faktor.

Der für den Versuch benötigter 10 mM H_2O_2 -Ansatz wurde aus 40 μl 30%- H_2O_2 -Lösung und 35.960 μl *Aqua bidest.* hergestellt.

Die 96-Well-Platte wurde in je zwei Spalten für Kontrollen, 10 μM -, 50 μM -, 100 μM -, 250 μM - und 500 μM - H_2O_2 -Stress aufgeteilt.

Um die gewünschten Konzentrationen an H_2O_2 bei gleichem Gesamtvolumen in den jeweiligen Wells zu erreichen, entnahm ich den Wells eine bestimmte Menge an Medium und fügte dafür die gleiche Menge des 10 mM- H_2O_2 -Ansatzes hinzu.

Beispielsweise wurde für die 10 μM Konzentration in den Wells der Spalten 3 -4 je 1 μl aus jedem Well entnommen und 1 μl aus dem H_2O_2 -Ansatz hinzugesetzt, während ich für die 500 μM Konzentration in den Wells der Spalten 11 -12 50 μl an Medium abzog und 50 μl an Ansatz hinzufügte.

Inkubiert wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde der H_2O_2 -Stress beendet, indem ich die H_2O_2 -Lösung in den einzelnen Wells entfernte und 100 μl Medium ergänzte.

Bei den ersten zwölf der insgesamt 36 96-Well-Platten wurde die Vitalität mit *Alamar Blue* sofort im Anschluss gemessen, indem ich jedem Well 10 μl *Alamar Blue* zufügte und nach zwei Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 die Fluoreszenz maß. Die restlichen 24 Platten wurden in der gleichen Art und Weise nach 24 bzw. nach 48 h behandelt (s.a. 3.6)

3.7.2 Messung von Glutathion bei H_2O_2 -gestressten Zellen

Um eine abschließende Aussage über die Auswirkungen des oxidativen Stresses bei diesen Zellen treffen zu können, bestimmte ich zunächst den Glutathiongehalt der Zellen direkt, d.h. 30 Min., nach dem oxidativen Stress. Später folgte bei diesen Zellen die Vitalitätsmessung mit dem Alamar Blue Assay (s.u.).

Für dieses Experiment kultivierte ich 6-Well-Platten mit 200.000 Zellen pro Well. Für den Versuch benötigte ich eine 10 μM - H_2O_2 -Lösung, die ich aus 8990 μl *Aqua bidest.* und 10 μl 30%-iger H_2O_2 -Lösung herstellte. Anschließend saugte ich jeweils 100 μl von den Wells ab.

Nun folgte der H_2O_2 -Stress mit einer Endkonzentration von 500 μM H_2O_2 pro Well. Hierzu wurden 100 μl der 10 μM - H_2O_2 -Lösung den Wells zugefügt. Die Inkubation betrug 30 Minuten.

Anschließend wurde das Medium allen Wells entzogen und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgte die Zentrifugation bei 15.000 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 4°C. Der Überstand wurde verworfen.

Auf der verbliebenen Platte wurde in jedes Well 300 μl 1%-iger SSA-Lösung zur Lyse der Zellen zugesetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mithilfe eines Zellschabers gewann ich das anheftende Zellmaterial.

In einem gemeinsamen Reaktionsgefäß wurde das abzentrifugierte *Pellet* mit 300 μl abgeschabtem Zellmaterial gemischt und erneut einer Zentrifugation von 13.000 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang bei 4°C zugeführt.

Den Überstand (Zellysat) überführte ich in ein neues Reaktionsgefäß und fror es bei -86°C ein. Es diente im weiteren Prozedere der Messung von GSX, GSH und GSSG (Verfahren s.o.).

Das *Pellet* (Proteine) wurde in 50 μl einer 0,5 M NaOH aufgelöst und ebenfalls bei -86°C eingefroren. Es diente der Proteinmessung (Verfahren s.o.).

Darüber hinaus führte ich zur genaueren Vergleichbarkeit noch eine zusätzliche Versuchsreihe durch: Zunächst wurden die vier Zelllinien in o.g. Versuchsanordnung dem oxidativen Stress ausgesetzt und anschließend wurde – dem Vitalitätsversuch äquivalent - nach 2, 24 und 48 h der Gehalt an GSX, GSH und GSSG gemessen (Verfahren s.o.).

3.8 Vitalitätsmessung mit dem *Alamar Blue Assay*

Zur Messung des Zellwachstums stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Ein Antigen, das in proliferierenden Zellen, nicht aber in nicht proliferierenden Zellen gebildet wird, wird benutzt, die DNA-Synthese gemessen oder aber der reduzierte

Zustand des Zellmilieus untersucht. Um den reduzierten Zustand der Umgebung der Zelle zu untersuchen, gibt es mehrere Methoden.

Eine davon ist der *Alamar Blue Assay*.

Der *Alamar Blue Assay* der Firma Biosource International, Camarillo, CA, USA, ist ein einfach durchzuführender Assay, um quantitativ die Zellproliferation und somit die Vitalität zu messen. *Alamar Blue* ist ein sicherer, ungiftiger, wasserlöslicher Stoff, welcher in seiner oxidierten Form als blauer, nicht fluoreszierender Farbstoff vorliegt. In seiner reduzierten Form ist *Alamar Blue* rot und fluoreszierend.

Um die Vitalität der Fibroblasten nach dem H₂O₂-Stress quantitativ zu erfassen, wurden 10 µl in jedes Well der 96-Well-Platte hinzugefügt und 2h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. *Alamar Blue* wandelte sich von seiner nicht-fluoreszierenden blauen Form in seine fluoreszierende rote Form um. Diese Umwandlung wurde fluorimetrisch im *Spectramax Gemini* Fluoreszenzplattenlesegerät (*Molecular Devices*) bei einer Anregung von 544 nm und einer Emission von 590 nm Wellenlänge analysiert (Ahmed et al., 1994).

3.9 Physikalische Prinzipien der eingesetzten Methoden

3.9.1 Fluoreszenzmessung der Reduktion von *Alamar Blue*

Das Zellinnere der proliferierenden Zellen wird stärker reduziert als das von nicht proliferierenden Zellen. Besonders die Quotienten von NADPH/ NADP, FADH/ FAD, FMNH/FMN und NADH/NAD steigen während der Zellproliferation. *Alamar Blue*, das durch die o.g. Komponenten reduziert werden kann, kann zur Quantifizierung der Proliferation benutzt werden. Dessen Reduktion wird durch einen messbaren Farbumschlag begleitet.

Das Redox-Potential von *Alamar Blue* ist +380 mV bei pH 7,0 und 25°C. Deshalb kann *Alamar Blue* durch NADPH (E_o = -320 mV), FADH (E_o = -220 mV), FMNH (E_o = -210 mV), NADH (E_o = -320 mV) und durch die Zytochrome (E_o = -290 mV bis +80 mV) reduziert werden. Weil *Alamar Blue* durch Zytochrome reduziert werden kann, ist *Alamar Blue* ein Elektronenakzeptor für molekularen Sauerstoff. Wenn *Alamar Blue* Elektronen von den o.g. Komponenten akzeptiert, verändert es seinen oxidierten *indigo* blauen nicht fluoreszierenden in einen reduzierten pinkfarbenen fluoreszierenden Zustand.

Für die Reduktion von *Alamar Blue* ist das Zellinnere, nicht nur die Zellumgebung, nötig.

Es gibt prinzipiell zwei Wege, um die Reduktion von *Alamar Blue* zu messen: 1. durch spektrophotometrische Messung der Absorption oder 2. durch Messung der Fluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit wurde die zweite Methode gewählt. Hierbei wurden die Proben durch Licht mit der Wellenlänge von 544 nm (empfohlene Wellenlänge: 530-560 nm) angeregt und die Emission bei 590 nm gemessen.

Die erhaltenen Daten beschreiben die Intensitätseinheiten der Emission, die als Funktion der Inkubationszeit zu verstehen sind.

3.9.2 Spektralphotometrie

Die Proteinbestimmung und die Messung des Gesamtglutathions, der oxidierten und reduzierten Form vor und nach dem H₂O₂-Stress erfolgte spektralphotometrisch. Eingesetzt wurde das Plattenlesegerät und das Spektralphotometer Typ *Microplate Reader Optimax*.

Die Spektralphotometrie wird zur Konzentrationsbestimmung von Substanzen genutzt, die sich in wässrigen Lösungen befinden. Das Prinzip besteht in der Messung der Lichtabschwächung, welche von den Eigenschaften der Substanz und der gewählten Wellenlänge abhängt. Diese Lichtabschwächung wird Extinktion genannt.

Unter Verwendung des *Lambert-Beerschen-Gesetzes* $E = \epsilon \times c \times d$ lässt sich aus der gemessenen Extinktion E und des jeweiligen stoffspezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ die Konzentration c der detektierten Substanz berechnen.

4 Ergebnisse

4.1 MTHFR c.1298A>C und das Erkrankungsalter

Das Erkrankungsalter der unterschiedlichen Stichproben an Patienten, unterteilt durch die MTHFR c.1298A>C Genotypen, ist in der Tabelle 1 gezeigt. Als erstes wurden ANOVA und die Kaplan-Meier Analyse in Bezug auf alle drei Genotypen (AA, AC, CC; df=2) durchgeführt.

Durch frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C das Erkrankungsalter der Alzheimer-Krankheit beeinflusst (Linnebank et al., 2004b).

| Probe | MTHFR c.1298AA | MTHFR c.1298 AC | MTHFR c.1298 CC | ANOVA df=2 | Kaplan- Meier df=2 | ANOVA df=1 | Kaplan- Meier df=1 |
|----------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| PD1 (n=342) | 57±9 (0.50) | 60±10 (0.41) | 61±10 (0.09) | F=2.1; p=0.126 | log rank=7.23; p=0.007 | F=4.7; p=0.030** | log rank 6.0; p=0.014** |
| PD2 (n=214) | 52±12 (0.42) | 51±14 (0.52) | 58±13 (0.06) | F=1.5; p=0.222 | log rank 3.46; p=1.774 | F=2.7; p=0.101* | log rank 3.5; p=0.063* |
| MSA (n=97) | 57±12 (0.45) | 55±10 (0.34) | 64±9 (0.21) | F=5.1; p=0.008 | log rank 7.37; p=0.025 | F=9.9; p=0.002* | log rank 5.6; p=0.018* |
| ALD (n=70) | 27±9 (0.37) | 35±15 (0.51) | 18±9 (0.11) | F=3.4; p=0.041 | log rank 9.42; p=0.009 | F=4.6; p=0.035** | log rank 6.64; p=0.010** |

Tabelle 1: Erkrankungsalter in den Patientenstichproben, unterteilt durch die MTHFR c.1298A>C Genotypen.

PD = Morbus Parkinson, MSA = Multisystematrophie, ALD = Adrenoleukodystrophie

*Genotyp CC versus Genotyp AA/AC, **Genotyp AA versus Genotyp AC/CC.

Danach wurde explorativ jeweils der homozygote Genotyp, der in der Bonferroni-Korrektur der ANOVA den stärksten Effekt zeigte, mit den beiden anderen Genotypen verglichen. Das Erkrankungsalter lag später bei Parkinson-Patienten mit den Genotypen AC oder CC (Probe 1; log rank 6.0; $p=0.014$; Abbildung 8) bzw. CC (Probe 2, log rank 3.5; $p=0,063$ als Tendenz; Abbildung 9), bei MSA-Patienten mit dem CC-Genotyp (log rank 5.6; $p=0,018$; Abbildung 10) und bei X-ALD-Patienten mit den Genotypen AC oder CC (log rank 6.6; $p=0.010$; Abbildung 11).

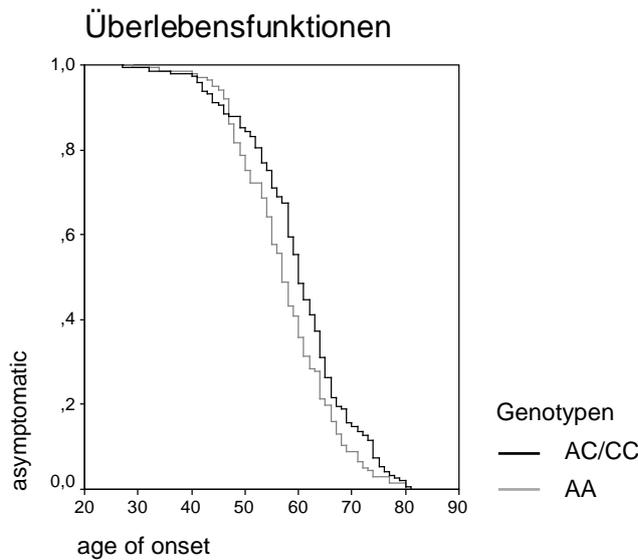


Abbildung 8: Einfluss der *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Parkinsonpatienten in der Patientenstichprobe PD1.

Die Patientenstichprobe PD1 umfasste $n=342$ Parkinson-Patienten mit den Genotypen AA, AC und CC. Parkinson-Patienten mit dem Genotyp AA zeigten einen früheren Erkrankungsbeginn (im Durchschnitt bei 57 ± 9 Jahren) im Vergleich zu Patienten mit den Genotypen AC/CC (im Durchschnitt bei 60 ± 10 Jahren). PD = Morbus Parkinson, *age of onset* = Erkrankungsbeginn

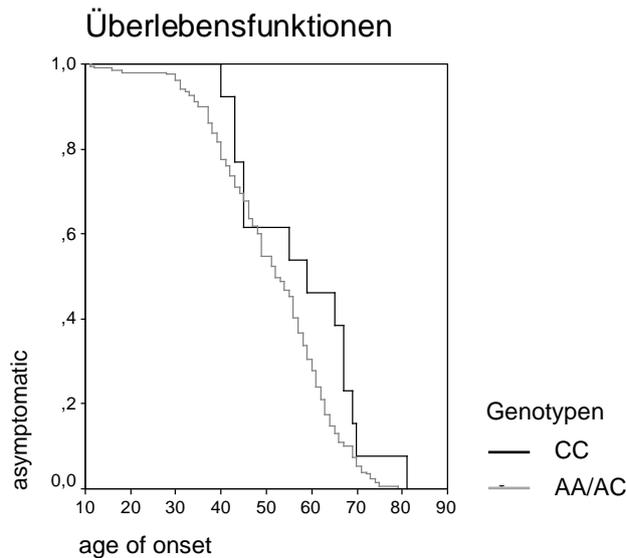


Abbildung 9: Einfluss der *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Parkinsonpatienten in der Patientenstichprobe PD2.

Die Patientenstichprobe PD2 umfasste n=214 Parkinson-Patienten mit den Genotypen AA, AC und CC. Parkinson-Patienten mit den Genotypen AA/AC erkrankten früher (im Durchschnitt bei 52±1 Jahren) als Patienten mit dem Genotyp CC, bei denen das Erkrankungsalter im Durchschnitt bei 58±13 Jahren lag. PD = Morbus Parkinson, *age of onset* = Erkrankungsbeginn

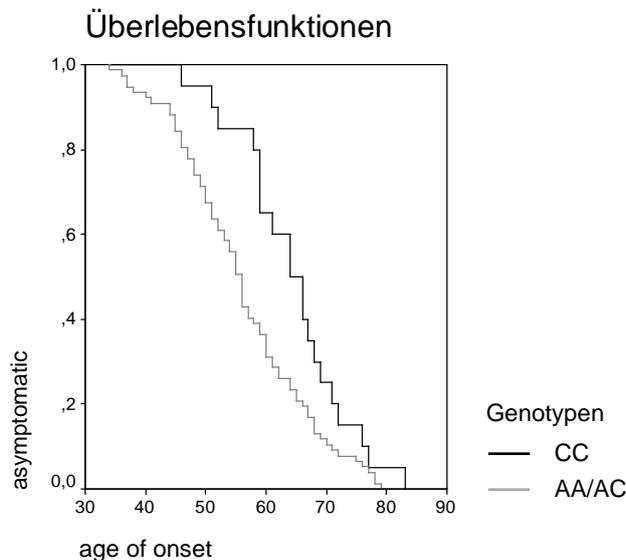


Abbildung 10: Einfluss der *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Patienten mit Multisystematrophie.

Die Patientenstichprobe MSA umfasste n=97 MSA-Patienten mit den Genotypen AA, AC und CC. MSA-Patienten mit den Genotypen AA/AC erkrankten früher (im Durchschnitt bei 56±11 Jahren) als Patienten mit dem Genotyp CC (durchschnittlich bei 64±9 Jahren). MSA = Multisystematrophie, *age of onset* = Erkrankungsbeginn

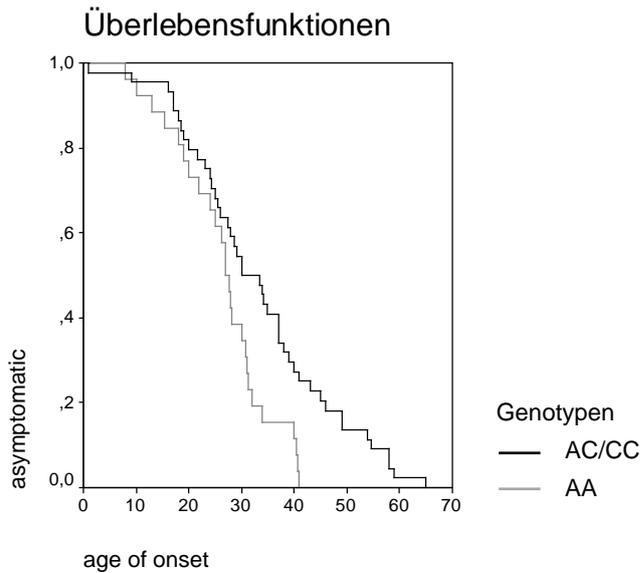


Abbildung 11: Einfluss der *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Patienten mit Adrenoleukodystrophie.

Die Patientenstichprobe ALD umfasste n=70 ALD-Patienten mit den Genotypen AA, AC und CC. ALD-Patienten mit dem Genotyp AA erkrankten früher (im Durchschnitt bei 27 ± 9 Jahren) als Patienten mit den Genotypen AC/CC (durchschnittlich bei 33 ± 14 Jahren).

ALD = Adrenoleukodystrophie, *age of onset* = Erkrankungsbeginn

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das C-Allel einen protektiven Effekt vermitteln könnte oder im Kopplungsungleichgewicht mit einem anderen protektiven Faktor steht.

Folgende Hypothesen sollten geprüft werden:

1. Gehen die MTHFR c.1298CC Zellen mit einem höheren Gesamtglutathionspiegel einher als die CBS-Zellen? (CBS-Defizienz sollte die Cysteinsynthese limitieren).
2. Haben die MTHFR c.1298CC Zellen weniger oxidativen Stress bzw. können besser mit diesem umgehen? (d.h. haben sie eine größere Vitalität und/oder behalten sie mehr reduziertes Glutathion?)

4.2 Zellkulturanalyse: Glutathion

4.2.1 Basalwerte des Glutathions

Die Basalwerte des Glutathions sind in Tabelle 2 dargestellt. Diese Basiswerte wurden als Ausgangswerte bestimmt, um diese später mit den Werten nach dem oxidativen Stress vergleichen zu können. Auch hier wurden die Unterschiede auf Signifikanz geprüft ($p < 0.05$ wurde als signifikant bewertet).

| | Wildtyp | MTHFR c.1298CC | MTHFR def = KO | CBS def |
|----------|-----------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| GSX | 1.00±0.61 | 0.48±0.07 F=4.3; p=0.056 | 0.94±0.29 F=0.2; p=0.655 | 0.71±0.24 F=2.7; p=0.110 |
| GSSG | 1.00±0.63 | 0.61±0.18 F=2.03; p=0.173 | 1.06±0.04 F=0.1; p=0.732 | 1.05±0.37 F=0.087; p=0.771 |
| GSH | 1.00±0.62 | 0.47±0.04 F=4.4; p=0.053 | 0.94±0.31 F=0.2; p=0.624 | 0.68±0.26 F=3.1; p=0.090 |
| GSSG/GSX | 0.05±0.08 | 0.06±0.01 F=6.4; p=0.022 | 0.06±0.01 F=9.1; p=0.005 | 0.07±0.01 F=44; p<0.001 |

Tabelle 2: Basalwerte des Glutathions.

Def=Mutante.

Jede einzelne der drei Zelllinien pro Genotyp wurde analysiert, die Ergebnisse wurden gepoolt. Für jede Zelllinie wurden drei unabhängige Analysen in 6-Well-Platten durchgeführt, so dass insgesamt 48 Ergebnisse für einen Wert gepoolt wurden.

Bei den Wildtypen 1298 AA wurden GSX, GSSG und GSH als 1.00 festgesetzt. Die Ergebnisse der anderen drei Zelllinien sind zu verstehen als relative Mengen bezogen

auf die Wildtypenergebnisse, mit welchen sie in der statistischen Analyse verglichen wurden. Nur für das Verhältnis GSSG/GSX wurde das exakte Verhältnis von jeder Zelllinie (0.05 für die Wildtypzellen) zur besseren Veranschaulichung vorgegeben.

Bei den MTHFR c.1298CC Zellen fielen bei der basalen Glutathionmessung die niedrigsten Spiegel an GSX, GSH und GSSG aller untersuchten Zelllinien auf. Die oben gestellte erste Hypothese scheint in Frage gestellt (s.a. Diskussion).

Die MTHFR-Mutanten, im Folgenden als MTHFR KO bezeichnet, hatten hingegen den höchsten Gesamtglutathionspiegel. Das Verhältnis GSSG/GSX (0.06 ± 0.01 ; $F=9.1$; $p=0.005$) ist dem der MTHFR c.1298CC Zellen ähnlich. Die Hypothese bei den MTHFR KO wäre im Folgenden, ob diese besser mit dem oxidativen Stress aufgrund des hohen Glutathionspiegels zurecht kommen und eine größere Vitalität zeigen.

Die CBS-Mutanten haben den höchsten Quotienten an oxidiertem zu Gesamtglutathion aller untersuchten Zelllinien.

4.2.2 Glutathionkonzentrationen nach oxidativem Stress

Zusätzlich zu den Basalwerten des Glutathions wurde der Effekt an exogen erzeugtem oxidativen Stress auf Glutathion durch Inkubation mit 500 μM H_2O_2 für 30 Minuten gemessen. Die entsprechenden Werte, jeweils bezogen auf die Basiswerte der entsprechenden Zelllinien, wurden mit gleichermaßen behandelten Wildtypzellen verglichen.

Im Vergleich zu den Wildtypzellen (1.00 ± 0.26) war das Gesamtglutathion nach oxidativem Stress höher bei den MTHFR c.1298CC Zellen (1.64 ± 0.88 ; $F=9.6$; $p=0.004$) und bei den CBS-Mutanten (1.36 ± 0.56 ; $F=5.5$; $p=0.025$), jedoch niedriger bei den MTHFR KO-Zellen (0.69 ± 0.58) (s. Abb. 13)

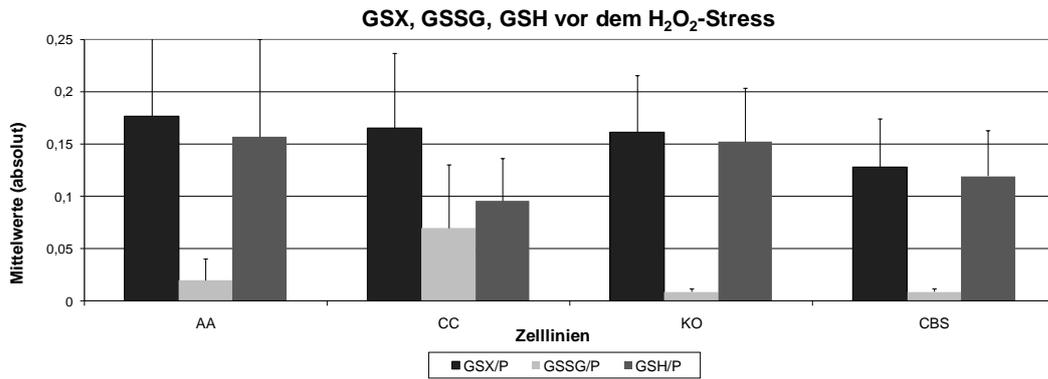


Abbildung 12: Basalwerte von GSX, GSSG, GSH.

Vor dem H₂O₂-Stress wurden in den untersuchten Fibroblastenlinien die Basalkonzentrationen von Glutathion (GSX) sowie der oxidierten (GSSG) und reduzierten (GSH) Form des Glutathions bestimmt. Die bestimmten Werte sind in der Tab. 2 aufgeführt.

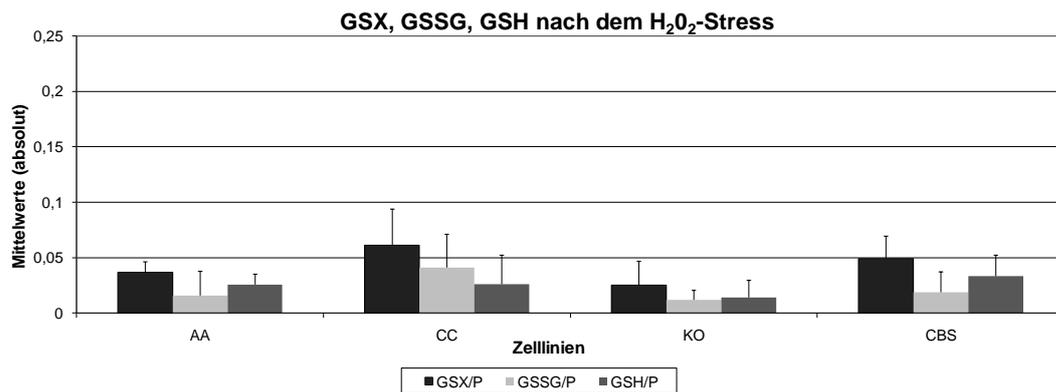


Abbildung 13: Konzentrationen von GSX, GSSG, GSH nach H₂O₂-Stress (nach 30 Min.).

30 Minuten nach dem H₂O₂-Stress wurden erneut die Konzentrationen von Gesamtglutathion (GSX), der oxidierten (GSSG) und der reduzierten (GSH) Form bestimmt (s. Tab. 3).

Jedoch war das Verhältnis von oxidiertem zu Gesamtglutathion signifikant höher bei den MTHFR c.1298CC Zellen (0.62 ± 0.17) als auch bei den MTHFR KO-Zellen (0.51 ± 0.19) im Vergleich zu den Wildtypzellen (0.30 ± 0.18), während es keinen signifikanten Unterschied bei den CBS-Mutanten gab.

Wie erwartet, war das Verhältnis von oxidiertem zu Gesamtglutathion nach der H₂O₂-Inkubation im Vergleich mit nicht gestressten Zellen (Tabelle 2) wesentlich angestiegen.

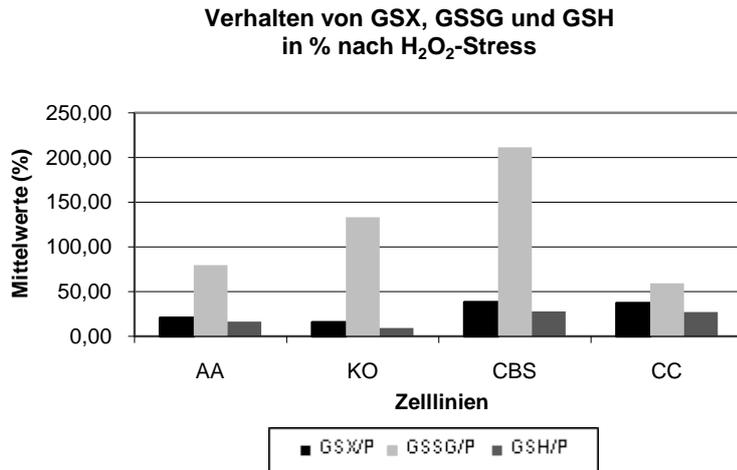


Abbildung 14: Prozentuale Darstellung des Glutathions nach oxidativem Stress.

| | Wildtyp | MTHFR c.1298CC | MTHFR def | CBS def |
|----------|-----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| GSX | 1.00±0.26 | 1.64±0.88 F=9.6; p=0.004 | 0.69±0.58 F=4.2; p=0.048 | 1.36±0.56 F=5.5; p=0.025 |
| GSSG | 1.00±0.33 | 2.56±1.9 F=7.8; p=0.009 | 0.73±0.53 F=0.5; p=0.503 | 1.19±1.13 F=0.2; p=0.688 |
| GSH | 1.00±0.36 | 1.04±1.02 F<0.1; p=0.940 | 0.56±0.60 F=5.9; p=0.023 | 1.32±0.72 F=2.0; p=0.163 |
| GSSG/GSX | 0.30±0.18 | 0.62±0.17 F=25.7; p<0.001 | 0.51±0.19 F=9.0; p=0.006 | 0.34±0.28 F=0.3; p=0.614 |

Tabelle 3: Glutathion nach der Inkubation mit H₂O₂.

Auch hier wurde das GSX, GSSG und GSH als 1.00 festgesetzt und so ein besserer Vergleich mit den anderen Zelllinien ermöglicht. Der Quotient GSSG/GSX betrug 0.30 ± 0.18.

Sowohl die MTHFR c.1298CC Zellen als auch die CBS-Mutanten hatten ein höheres Gesamtglutathion als die Wildtypen. Das oxidierte Glutathion bei den MTHFR c.1298CC Zellen hatte den höchsten Wert aller Zelllinien und war mehr als doppelt so hoch als bei den Wildtypen. Das Verhältnis GSSG/GSX war hier signifikant höher im Vergleich zu den Wildtypen. Die MTHFR c.1298CC Zellen scheinen besser als die Wildtypen mit dem oxidativen Stress zurecht zu kommen, da sie mehr Gesamtglutathion nach dem Stress behalten.

Die MTHFR KO-Zellen hatten den niedrigsten Spiegel an oxidiertem und reduziertem Glutathion und somit in der Folge an Gesamtglutathion.

Die CBS-Mutanten zeichneten sich durch einen höheren Gehalt an Gesamtglutathion als die Wildtypen aus. Trotz der somit erhöhten Menge an oxidiertem und reduziertem Glutathion gab es bei dem Quotienten GSSG/GSX keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtypen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen das Verhalten von Glutathion 30 Min. nach exogen erzeugtem oxidativen Stress. Zusätzlich dazu wurden Messungen von GSX, GSSG und GSH 2h, 24h und 48h nach oxidativem Stress durchgeführt. Die folgenden Graphen zeigen die auf die Stunde 0 normierten Daten.

Bei den Wildtypen und den MTHFR KO-Zellen liegt die Gesamtglutathionmenge zum Zeitpunkt 2h nach oxidativem Stress am niedrigsten und steigt bis 48h auf das Doppelte des 2h-Wertes an, erreicht jedoch bei diesen beiden Zelllinien nie den Ausgangswert. Der Anteil an GSH ist bei den MTHFR KO-Zellen im Verhältnis zum Ausgangswert am niedrigsten im Vergleich zu allen vier Zelllinien.

Anders verhält es sich bei den CBS-Zellen und den MTHFR c.1298CC-Zellen. Bei beiden steigt der Gesamtglutathionspiegel kontinuierlich bis 48h nach dem oxidativen Stress an. Ebenso steigt bei beiden der Anteil an GSH an.

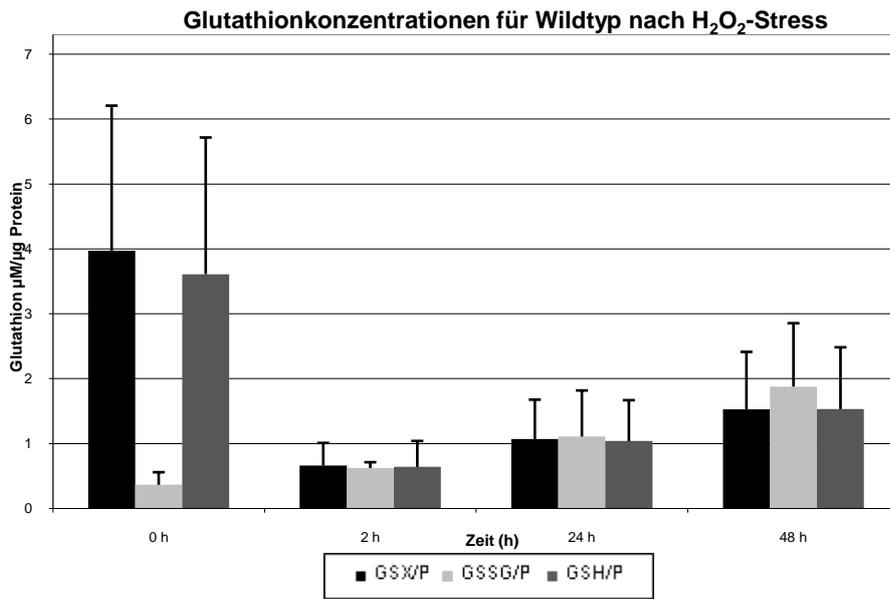


Abbildung 15: Glutathionkonzentrationen für Wildtyp nach Stress.

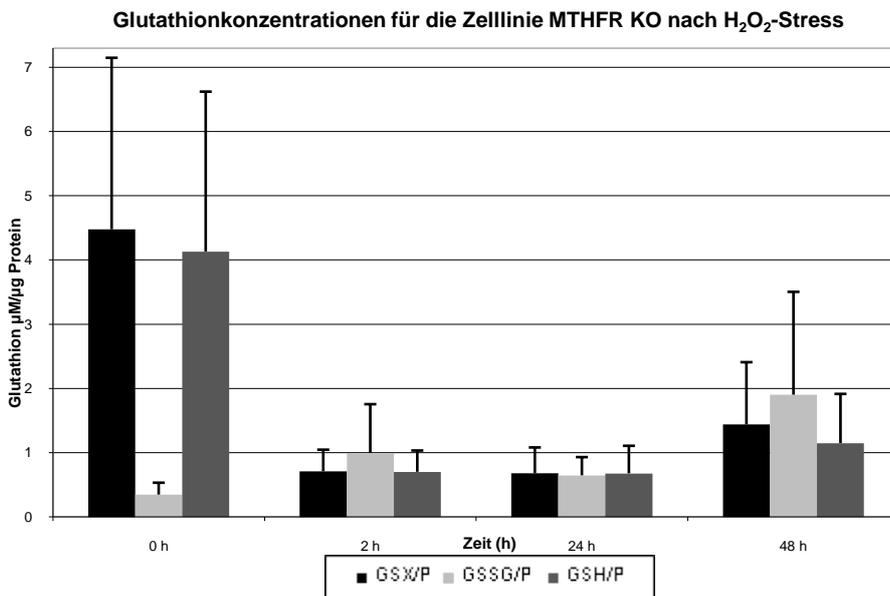


Abbildung 16: Glutathionkonzentrationen für den Genotyp MTHFR KO nach Stress.

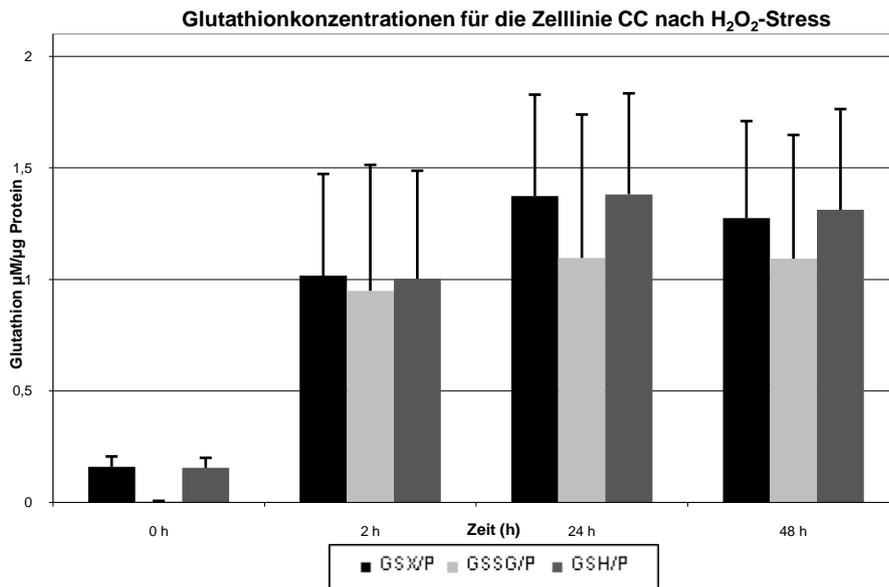


Abbildung 17: Glutathionkonzentrationen für den Genotyp CC nach Stress.

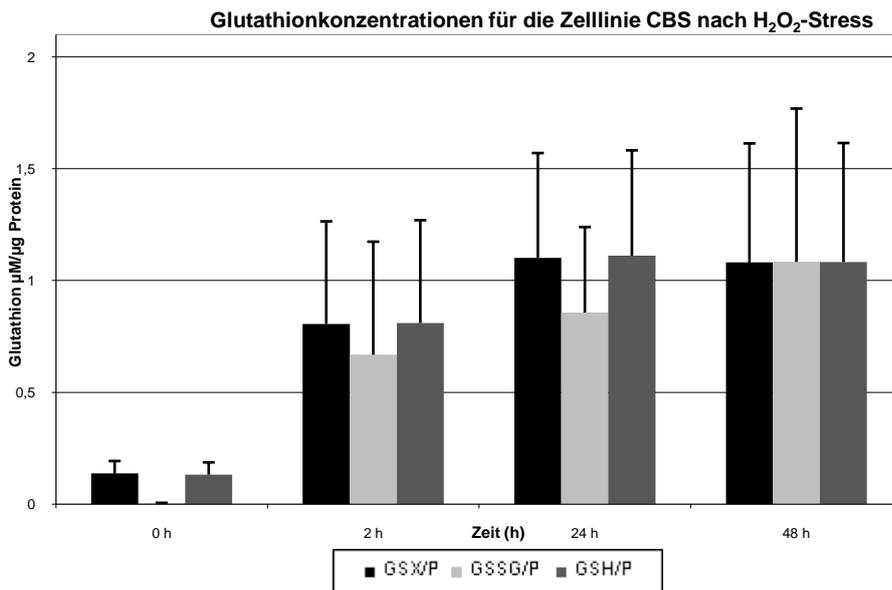


Abbildung 18: Glutathionkonzentrationen für den Genotyp CBS nach Stress.

4.3 Zellkulturanalyse: Vitalität

Nachdem der basale Spiegel an Glutathion und der Glutathiongehalt nach dem oxidativen Stress bestimmt worden waren, erfolgte die Bestimmung der Vitalität als Ausdruck der noch vorhandenen vitalen Zellanzahl nach dem H₂O₂-Stress. Jede Zelllinie wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an H₂O₂ inkubiert. Nach 2h, 24h und 48h

wurde die Vitalität gemessen. Die Inkubation erfolgte in 96-Well-Patten, für jede Versuchsbedingung wurden 32-48 Wells untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurde die Vitalität von jedem Zelltyp bei 0 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 als 1.00 festgesetzt.

4.3.1 Wildtypen

Bei den Wildtypen 1298AA fiel die Zellvitalität 2 Stunden nach der H_2O_2 -Inkubation von $100\% \pm 16\%$ bei 0 $\mu\text{mol/l}$ mit steigender H_2O_2 -Konzentration kontinuierlich ab, bis sie bei der höchsten gewählten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ bei $66\% \pm 17\%$ lag.

In der zweiten Messung 24 Stunden nach der H_2O_2 -Exposition verhielt sich der Zellvitalitätsabfall ähnlich. Auch hier lag die Zellvitalität bei beispielsweise 10 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 bei noch $93\% \pm 19\%$, während sie bei der gewählten Endkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ $66\% \pm 24\%$ betrug.

In der dritten Messung 48 Stunden nach der H_2O_2 -Exposition hatten die Wildtypzellen bei der Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 jedoch eine um ca. 15% niedrigere Zellvitalität als bei den Messungen 2 und 24 Stunden nach der Exposition ($57\% \pm 39\%$). Bei der höchsten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ war der Unterschied noch signifikanter. Hier zeigte sich ein Abfall der Zellvitalität um ca. 47% von ca. 66% bei den 2- und 24-Stunden-Messungen auf $35\% \pm 30\%$.

Die folgenden Abbildungen zeigen die absoluten Vitalitätswerte, die folgenden Tabellen die prozentualen. Der in den Tabellen gezeigte durchgeführte T-Test (T) ist zu verstehen als ein Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen/ Wildtyp-Zellen unter gleichen Inkubationsbedingungen (s. Tab. 4-6)

4.3.2 MTHFR c.1298CC

Der Genotyp MTHFR c.1298CC, repräsentiert durch die Zelllinien 273, 275, 280, hatte 2 Stunden nach der H_2O_2 -Exposition im Vergleich zu den Wildtypen keinen Zellvitalitätsabfall mit steigender H_2O_2 -Konzentration. Während beispielsweise die Wildtypen bei 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 eine Zellvitalität von $76\% \pm 20\%$ aufwiesen, hatten die MTHFR c.1298CC Zellen eine Zellvitalität von $94\% \pm 15\%$ ($T=8.15$; $p<0.001$). Bei 250 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 betrug die Vitalität bei den MTHFR c.1298CC Zellen noch weiterhin $93\% \pm 21\%$ ($T=6.91$; $p<0.001$), während die Wildtypen eine Zellvitalität von $73\% \pm 18\%$

aufwiesen. Erst bei der höchsten gewählten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ entsprach die Vitalität von den MTHFR c.1298CC Zellen ($64\% \pm 17\%$, $T=0.672$; $p=0.632$) ungefähr der der Wildtypen mit $66\% \pm 17\%$.

In der zweiten Messung, 24 Stunden nach Exposition, hatten die MTHFR c.1298CC Zellen bis zur Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ebenfalls keinen Vitalitätsabfall im Vergleich zu den Wildtypen. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 betrug die Vitalität von den MTHFR c.1298CC Zellen $82\% \pm 12\%$ ($T=0.02$; $p=0.983$). Bei der Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 zeigte die Zellvitalität nach 24h keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Genotypen MTHFR c.1298CC und Wildtyp, jedoch nach 48h: $111\% \pm 64\%$ bei MTHFR c.1298CC ($T=7.60$; $p<0.001$), $57\% \pm 39\%$ bei den Wildtyp-Zellen.

Bei der Endkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 hatten die MTHFR c.1298CC Zellen mit $73\% \pm 41\%$ ($T=7,86$; $p<0.001$) den zweithöchsten Wert nach den MTHFR KO-Zellen ($78\% \pm 28\%$, $T=10,9$; $p<0.001$).

4.3.3 MTHFR KO-Zellen

Die MTHFR KO-Zellen (657, 928, 1015) hatten 2 Stunden nach der H_2O_2 -Exposition die höchste Zellvitalität bei der höchsten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ($76\% \pm 32\%$, $T=2.83$; $p=0.005$). Bei der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 zeigten sie eine Vitalität von $112\% \pm 55\%$ ($T=4.35$; $p<0.001$) und markierten somit den höchsten Wert bei dieser Konzentration zwischen allen Zellliniengruppen.

In der zweiten Messung 24 Stunden nach Exposition hatten sie bei der höchsten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ fast die gleiche Zellvitalität ($65\% \pm 21\%$, $T=0.35$; $p=0.727$) wie die Wildtypen mit $66\% \pm 24\%$. Bei der Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 war es die höchste Zellvitalität aller Zellliniengruppen ($83\% \pm 38\%$, $T=1.70$; $p=0.091$).

Die dritte Messung 48 Stunden nach Exposition zeigte bei der höchsten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 den höchsten Wert an Zellvitalität aller vier Zellliniengruppen bei dieser Konzentration ($78\% \pm 28\%$, $T=10.9$; $p<0.001$). Im Vergleich zu den Messungen 24 Stunden nach dem H_2O_2 -Stress ist die Vitalität in allen gewählten Konzentrationen in der 48-Stunden-Messung deutlich gestiegen. Die Zellen scheinen sich von dem oxidativen Stress erholt zu haben.

Der Vergleich zwischen den Wildtypen und den MTHFR KO-Mutanten für die höchste gewählte H₂O₂-Konzentration zeigt deutlich die höhere Vitalität bei den MTHFR KO-Zellen 48h nach oxidativem Stress.

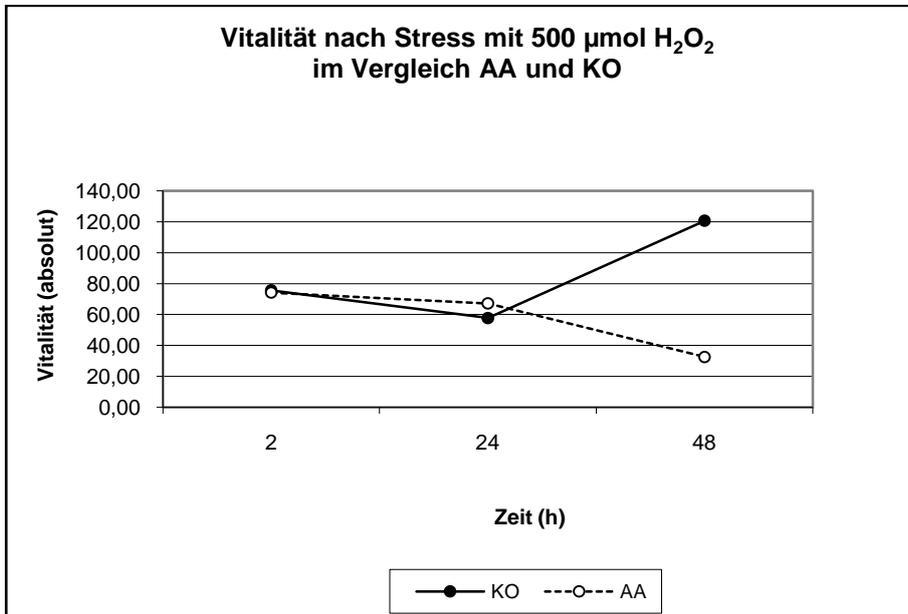


Abbildung 19: Vitalitätsvergleich zwischen den Genotypen AA und MTHFR KO.

4.3.4 CBS-Mutanten

In der ersten Messung, 2 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂, reagierten die CBS-Mutanten (1069, 1111, 1135) im Gegensatz zu den anderen Zellliniengruppen bereits signifikant in den niedrigen Konzentrationen: Bereits bei 10 µmol/l H₂O₂ betrug die Vitalität bei diesen Zellen 89% ± 16% und war der der Wildtypen in der Größenordnung ähnlich. Bei steigenden Konzentrationen fiel die Vitalität weiter ab und war vergleichbar mit dem Vitalitätsabfall bei den Wildtypen.

Die zweite Messung 24 Stunden nach Inkubation zeigte auch hier eine ähnliche Vitalitätsabnahme wie die der Wildtypen. Bei 500 µmol/l H₂O₂ lag die Vitalität bei 62% ± 19% (T=0,86; p=0.390).

Die dritte Messung der Vitalität 48 Stunden nach der Exposition zeigte besonders in den beiden höchsten Konzentrationen den stärksten Vitalitätsabfall aller Zellliniengruppen. Während bei 100 µmol/l H₂O₂ die Vitalität noch 63% ± 42% betrug (T=1.65; p=0.101), lag die Vitalität bei 250 µmol/l H₂O₂ bereits bei nur 28% ± 22% (T=4.80; p<0.001). Bei 500 µmol/l H₂O₂ lebten nur noch 15% ± 13% der Zellen (T=4.35; p<0.001).

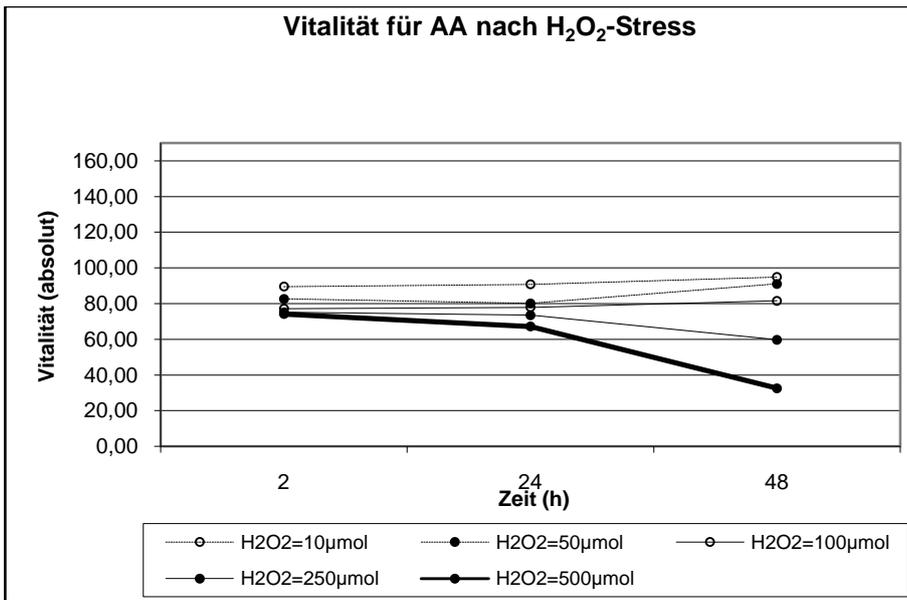


Abbildung 20: Vitalität (absolut) für den Genotyp AA nach oxidativem Stress.

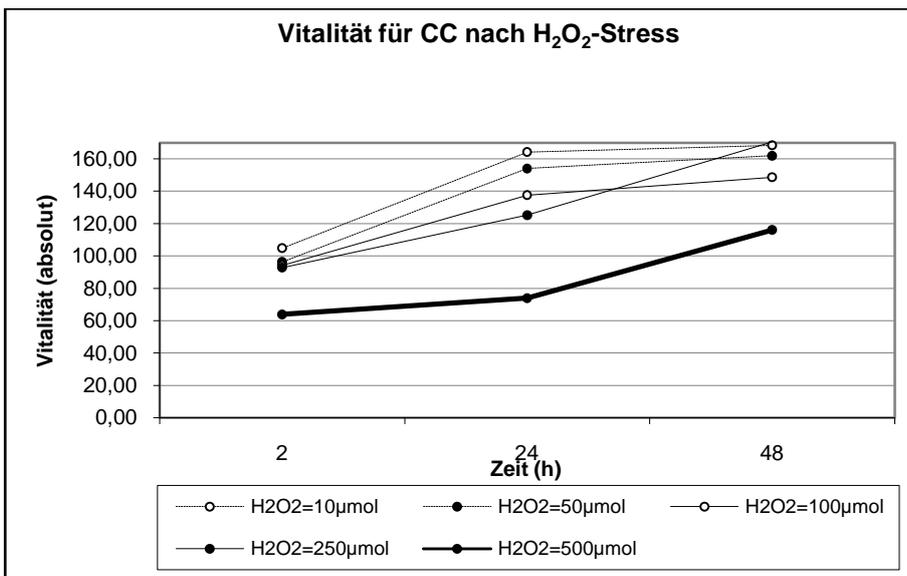


Abbildung 21: Vitalität (absolut) für den Genotyp CC nach oxidativem Stress.

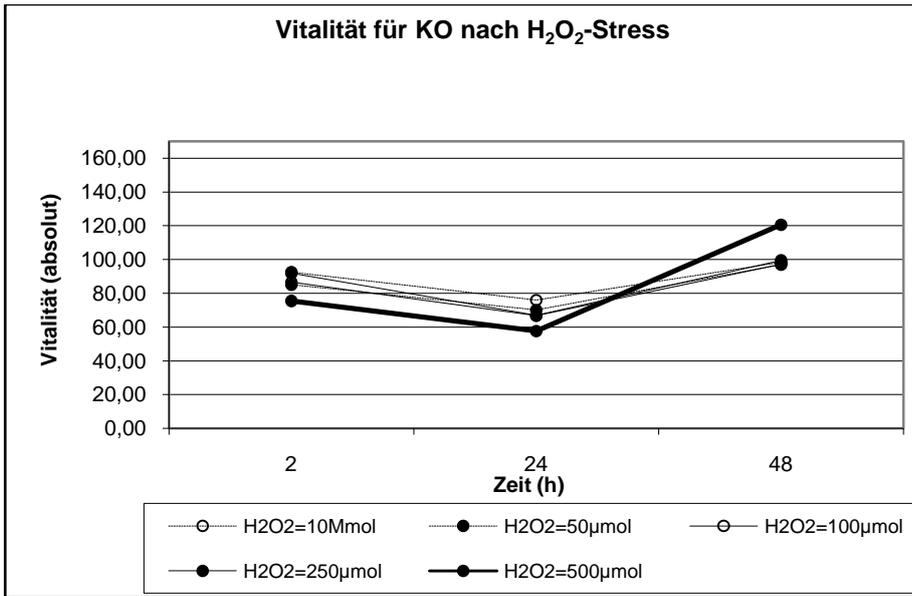


Abbildung 22: Vitalität (absolut) für MTHFR KO nach oxidativem Stress.

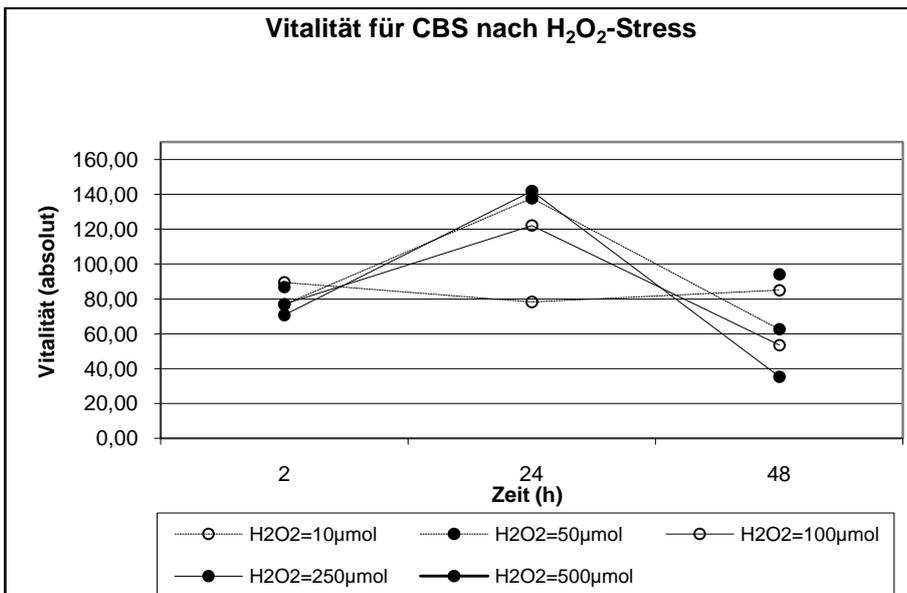


Abbildung 23: Vitalität (absolut) für den Genotyp CBS nach oxidativem Stress.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigenden Konzentrationen an H₂O₂ und mit steigender Zeit nach Exposition zum oxidativen Stress sowohl die MTHFR KO-Zellen als auch die MTHFR c.1298CC-Zellen einen Vorteil gegenüber den Wildtypzellen haben. Im Gegensatz dazu zeigten die CBS-Mutanten einen niedrigeren Widerstand gegenüber dem oxidativem Stress (Tab. 4-6, Abb. 20-22).

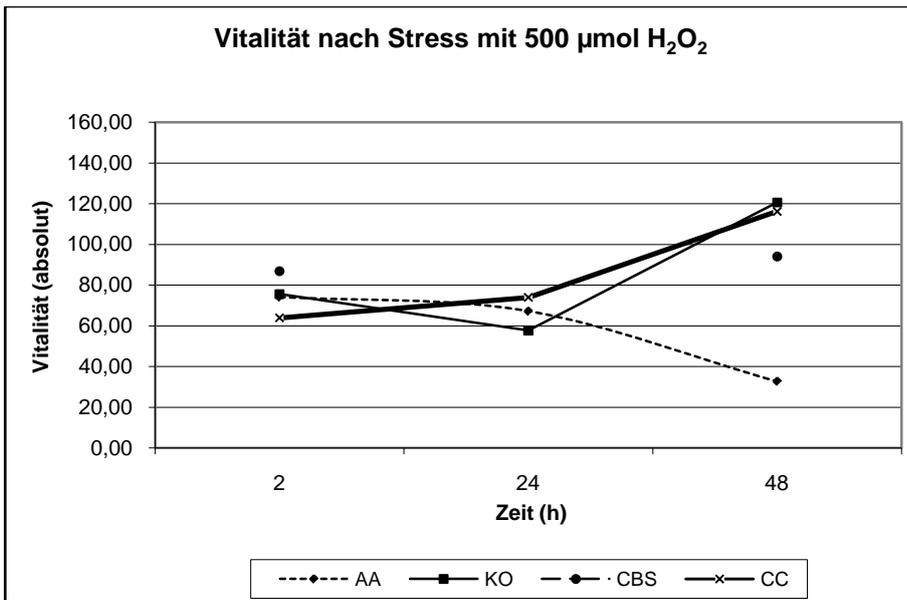


Abbildung 24: Vergleich der Vitalität der Zelllinien bei 500 µmol H₂O₂.

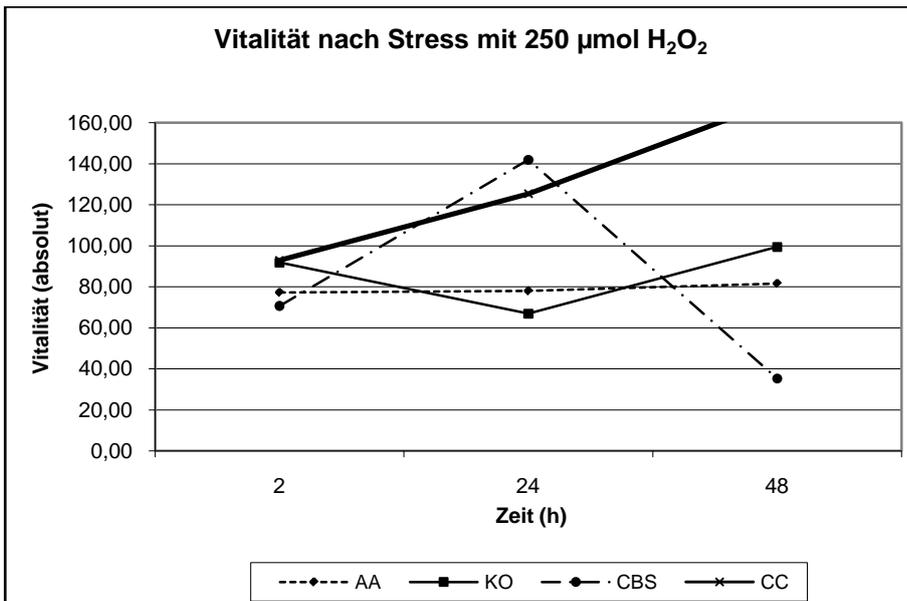


Abbildung 25: Vergleich der Vitalität der Zelllinien bei 250 µmol H₂O₂.

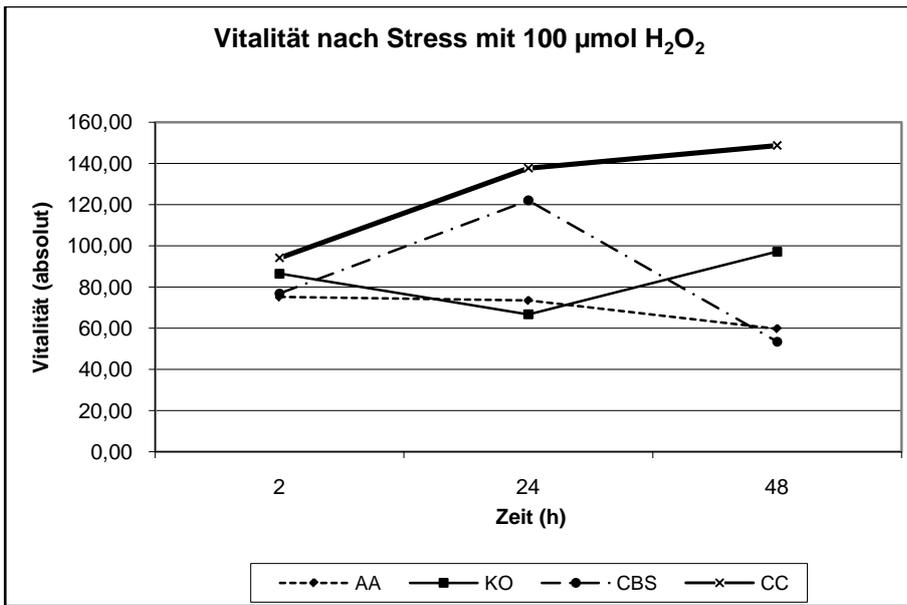


Abbildung 26: Vergleich der Vitalität der Zelllinien bei 100 µmol H₂O₂.

| H ₂ O ₂ (μmol/l) | Wildtyp | MTHFR c.1298CC | MTHFR def | CBS def |
|--|-----------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 1.00±0.16 | 1.00±0.12 | 1.00±0.32 | 1.00±0.14 |
| 10 | 0.90±0.13 | 1.05±0.21 T=6.97; p<0.001 | 0.96±0.30 T=2.36; p=0.019 | 0.89±0.16 T=0.44; p=0.666 |
| 50 | 0.82±0.19 | 0.96±0.19 T=5.71; p<0.001 | 0.90±0.28 T=2.86; p=0.004 | 0.78±0.26 T=1.26; p=0.209 |
| 100 | 0.76±0.20 | 0.94±0.15 T=8.15; p<0.001 | 1.12±0.55 T=4.35; p<0.001 | 0.72±0.09 T=1.34; p=0.181 |
| 250 | 0.73±0.18 | 0.93±0.21 T=6.91; p<0.001 | 0.87±0.34 T=3.85; p<0.001 | 0.72±0.07 T=0.94; p=0.346 |
| 500 | 0.66±0.17 | 0.64±0.17 T=0.672; p=0.632 | 0.76±0.32 T=2.83; p=0.005 | 0.68±0.19 T=0.46; p=0.649 |

Tabelle 4: Zellvitalität 2h nach der H₂O₂ Inkubation.

T-test, df=2, def = Mutante

Für jeden Zeitpunkt wurde die Vitalität von jedem Zelltyp bei 0 μmol/l H₂O₂ als 1.00 festgesetzt.

T-Test: Vergleich mit Wildtyp-Zellen mit den gleichen Inkubationsbedingungen.

| H ₂ O ₂ (μmol/l) | Wildtyp | MTHFR c.1298CC | MTHFR def | CBS def |
|--|-----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 1.00±0.13 | 1.00±0.11 | 1.00±0.12 | 1.00±0.11 |
| 10 | 0.93±0.19 | 0.98±0.11 T=2.63; p=0.009 | 0.87±0.23 T=1.96; p=0.051 | 0.91±0.20 T=0.39; p=0.689 |
| 50 | 0.83±0.17 | 0.92±0.14 T=4.25; p<0.001 | 0.82±0.17 T=0.50; p=0.619 | 0.80±0.19 T=1.02; p=0.310 |
| 100 | 0.82±0.17 | 0.82±0.12 T=0.02; p=0.983 | 0.81±0.17 T=0.5; p=0.961 | 0.77±0.18 T=1.35; p=0.178 |
| 250 | 0.76±0.24 | 0.71±0.28 T=1.41; p=0.159 | 0.83±0.38 T=1.70; p=0.091 | 0.75±0.23 T=0.187 p=0.852 |
| 500 | 0.66±0.24 | 0.42±0.28 T=6.58; p<0.001 | 0.65±0.21 T=0.35; p=0.727 | 0.62±0.19 T=0.86; p=0.390 |

Tabelle 5: Zellvitalität 24h nach der H₂O₂ Inkubation.

| H ₂ O ₂ (μmol/l) | Wildtyp | MTHFR c.1298CC | MTHFR def | CBS def |
|--|-----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 1.00±0.19 | 1.00±0.36 | 1.00±0.27 | 1.00±0.31 |
| 10 | 0.96±0.20 | 1.06±0.25 T=3.30; p=0.001 | 0.93±0.29 T=0.94; p=0.349 | 0.84±0.55 T=2.08; p=0.039 |
| 50 | 0.93±0.31 | 1.01±0.23 T=2.12; p=0.035 | 0.90±0.26 T=0.78; p=0.435 | 0.67±0.46 T=4.32; p<0.001 |
| 100 | 0.75±0.38 | 0.92±0.23 T=3.90; p<0.001 | 0.89±0.29 T=3.23; p=0.001 | 0.63±0.42 T=1.65; p=0.101 |
| 250 | 0.57±0.39 | 1.11±0.64 T=7.60; p<0.001 | 0.93±0.32 T=7.37; p<0.001 | 0.28±0.22 T=4.80; p<0.001 |
| 500 | 0.35±0.30 | 0.73±0.41 T=7.86; p<0.001 | 0.78±0.28 T=10.9; p<0.001 | 0.15±0.13 T=4.35; p<0.001 |

Tabelle 6: Zellvitalität 48h nach der H₂O₂ Inkubation.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der im Homocysteinestoffwechsel wichtigen funktionellen *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C (E429A) auf das Erkrankungsalter bei M. Parkinson, multipler Systematrophie und X-Adrenoleukodystrophie sowie auf die neuronale Abwehr gegen oxidativen Stress zu untersuchen. Ein solcher Einfluss bei M. Alzheimer wurde bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass MTHFR c.1298A>C ein vielversprechender Kandidat auf der Suche nach Krankheitsveränderungen bei den neurodegenerativen Erkrankungen ist. Ein Einfluss auf die Glutathionsynthese und so auf die Abwehr gegen den oxidativen Stress könnte ein zugrunde liegender Mechanismus sein.

5.1 Homocystein

Oxidativer Stress spielt bei der Neurodegeneration eine pathophysiologische Rolle. Bains und Shaw zeigten im Jahre 1997, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Amyotropher Lateralsklerose, der Parkinson-Krankheit und der Alzheimer-Krankheit spielt. Bei diesen Erkrankungen kommt es zum Neuronenuntergang und zum Redoxungleichgewicht. Die gesunde Zelle hat eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um ihren Redoxstatus aufrechtzuerhalten. Dies sind antioxidative Moleküle wie u.a. das Glutathion und Thioredoxin, welche Thiole und Sulhydryle enthalten und Enzyme, wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase (Meister, 1988).

Aber auch die genetische Komponente spielt bei der Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle. In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass die *Missense*-Variante c.1298A>C des Gens MTHFR das Erkrankungsalter von Alzheimer-Patienten als auch von Parkinson-Patienten beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Zusammenhang zwischen einzelnen neurodegenerativen Erkrankungen und dem Glutathion als antioxidatives System in klinisch-epidemiologischen Studien und durch *in vitro* Analysen untersucht.

Für eine effiziente Synthese des antioxidativ wirksamen Glutathions ist das Vorhandensein von dem „Risikofaktor“ Homocystein nötig, dessen pathophysiologische

Rolle bereits bei anderen Erkrankungen, wie z.B. dem Apoplex, in der Literatur diskutiert wurde (Lindgren et al., 1995; Sacco et al., 1998; Kelly et al., 2002).

Die Menge des im Stoffwechsel anfallenden Homocysteins darf zum einen nicht zu gering ausfallen, da sonst beispielsweise das antioxidativ wirkende Glutathion nicht genügend synthetisiert werden kann (s. 5.2), zum anderen darf es jedoch eine kritische Schwelle nicht überschreiten, die zur Potenzierung der Neurodegeneration beitragen könnte. Neben der genetischen (s.o.) ist auch die diätetische Komponente beim Betrachten des Homocysteinspiegels zu bedenken. Wie oben beschrieben, entsteht Homocystein in der Folge zweier vitaminabhängiger Reaktionen. Zu geringes Vorhandensein an Vitaminen B₆, B₁₂ und Folsäure ist ebenfalls mit erhöhten Homocysteinspiegeln verbunden.

Die schwere Hyperhomocysteinämie mit Homocysteinspiegeln von über 100 µmol/l, bedingt durch genetische Defekte, führt oft bereits im Kindesalter zu thrombembolischen Ereignissen.

Kruman et al. (2000) zeigten in ihrer Arbeit, dass erhöhte Homocysteinspiegel das Risiko für Atherosklerose, Schlaganfall und wahrscheinlich auch die Alzheimer-Krankheit steigern. In Neuronen des *Hippocampus* der Ratte induzierte Homocystein den Vorgang der Apoptose. Erhöhte Homocysteinspiegel in *Nuclei* der Neuronen induzieren wahrscheinlich DNA-Strangbrüche durch Störung der DNA-Methylierung (Blount et al., 1997). Ferner kommt es zur Aktivierung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und NAD-Mangel. Dadurch zeigten Kruman et al., dass Homocystein die Vulnerabilität der Neuronen im *Hippocampus* gegenüber oxidativem Stress in der Zellkultur und *in vivo* steigerte und so möglicherweise zur Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen beiträgt.

5.2 Glutathion bei Neuronen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Höhe des oxidierten Glutathions in den Versuchen als Maß für die Abwehr der unterschiedlichen Zelllinien gegenüber dem oxidativen Stress genommen. Zu bedenken ist jedoch auch, dass die Höhe des Glutathions - vor dem exogen zugeführten oxidativen Stress - in den Zellen auch von ihren – intakten – Stoffwechselfvorgängen abhängt.

Die Höhe des Glutathionspiegels wird u.a. von Homocystein (50% der Glutathiongehalte in der Leber entstehen durch Transsulfurierung des Homocysteins) und auch von der Menge der Aminosäure Cystein bestimmt (Mosharov et al., 2000), (s. Abb. 2). Cystein entsteht aus Homocystein unter Katalyse der beiden Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CL). Kommt es zu einem Defekt dieser Enzyme, kann der Abbauweg des Homocysteins zu Glutathion nicht stattfinden. Es kommt zu einem Mangel an Cystein und in der Folge an Glutathion auf der einen Seite und zu einem Homocysteinüberschuss auf der anderen Seite. Da – wie oben beschrieben – Neurone überwiegend das Glutathionsystem zur Neutralisation von H_2O_2 benutzen, fehlt diesen bei genetischen Defekten der CBS oder CL das Glutathion zur Abwehr des oxidativen Stresses. In der Folge können neurodegenerative Vorgänge induziert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass gerade die CBS-Mutanten nach dem exogen zugeführten oxidativen Stress den stärksten Vitalitätsabfall aller untersuchten Zelllinien aufwiesen und somit am anfälligsten für oxidativen Stress sind. Der Grund liegt im geringerem Vorhandensein an Glutathion aufgrund ihrer CBS-Defizienz. Das Homocystein kann aufgrund fehlender CBS-Aktivität nicht zu Cystathionin und in der Folge nicht zu Glutathion abgebaut werden. Dieses wird im niedrigen Glutathionspiegel vor dem oxidativen Stress in den o.g. Versuchen bestätigt. Dem gegenüber steht jedoch das Ergebnis der Glutathionmessung nach dem oxidativen Stress. Hier zeigen CBS-Zellen 48h nach oxidativem Stress einen Zuwachs an GSX, GSSG und GSH. Ein möglicher Erklärungsversuch wäre, dass die Messung des Glutathions nicht unbedingt nur die vitalen Zellen einschließt.

Die Zellen mit MTHFR-Mutationen oder dem Polymorphismus c.1298A>C hingegen können Homocystein nicht bzw. weniger effektiv zu Methionin remethylieren, sondern „müssen“ es zu Glutathion abbauen. Diese Zellen zeigten eine bessere Resistenz gegen oxidativen Stress. Das Glutathion scheint die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. Diese Zellen hatten die höchste Vitalität 48h nach dem oxidativen Stress aller untersuchten Zelllinien und zeigten insbesondere einen Vitalitätsanstieg zwischen der 24-h-Messung und der 48-h-Messung. Zwar zeigen die Zellen einen Abfall an GSX, GSSG und GSH bis 48h nach dem oxidativen Stress im Vergleich zum Ausgangswert, das GSX hat jedoch vor dem oxidativen Stress einen viel höheren Ausgangswert als

beispielsweise die CBS-Zellen. Auch zu bedenken ist, dass bei der 48-h-Messung der Quotient GSSG/GSX im Vergleich zu anderen Zelllinien hoch ist.

Dieser *in vitro* nachgewiesene scheinbar schützende Effekt bei Vorhandensein des C-Allels widerspiegelt sich im klinisch-epidemiologischen Teil dieser Arbeit. Sowohl Parkinson-Patienten als auch MSA-Patienten erkrankten später bei Vorhandensein des C-Allels (s.a. 5.5.1). Anders scheint es sich bei dem T-Allel des MTHFR-Polymorphismus C677T zu verhalten. Die Arbeitsgruppe Lin et al. (2007) zeigte, dass Parkinson-Patienten, die Träger des T-Allels waren, früher erkrankten als Patienten ohne dieses Allel.

5.3 Glutathionperoxidase

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des exogen erzeugten oxidativen Stresses in Form von H_2O_2 auf die Zellen untersucht. Die Schutzmöglichkeiten der Zelle gegen den oxidativen Schaden durch H_2O_2 sind die Glutathionperoxidase und die Katalase. Die Glutathionperoxidase enthält ein Gemisch aus Selen und Cystein in ihrem katalytischen Zentrum. Sie reduziert H_2O_2 zu Wasser und die Lipidperoxide zu den korrespondierenden Alkoholen und verhindert die Inaktivierung von NO. Darüber hinaus erhält sie die antithrombotischen Effekte von dem endogenen NO-Donor, dem S-Nitrosoglutathion.

Die zweite Schutzmöglichkeit ist die Katalase. Sie neutralisiert ausschließlich H_2O_2 . Katalase hat eine niedrigere intrazelluläre Konzentration als die Glutathionperoxidase. Homocystein verhindert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression der Glutathionperoxidase. Zellkulturversuche konnten einen Rückgang der Aktivität der Glutathionperoxidase unter erhöhten Homocysteinwerten nachweisen. In der Folge kommt es zu einem Anstieg an oxidativen Stressfaktoren. Dadurch werden NO inaktiviert und die endotheliale Dysfunktion gefördert. Weiss et al. (2001) führten einen Tierversuch durch, in dem die Überexpression von Glutathionperoxidase-1 bei Mäusen mit einer Hyperhomocysteinämie die normale vasodilatatorische Funktion des Endotheliums wiederherstellte. Im Umkehrschluss soll die Reduzierung des Radikalfängers Glutathion über vermehrte Oxidation von NO dessen protektive Funktion verringern und so eine Endothelschädigung bewirken.

Dayal et al. (2002) zeigten in ihrer Arbeit, dass ein Mangel an der zellulären Glutathionperoxidase die Anfälligkeit für endotheliale Dysfunktion bei Mäusen mit moderater Hyperhomocysteinämie erhöht. Obwohl mindestens vier Isoformen der Glutathionperoxidase existieren, scheint die Glutathionperoxidase-1 die wichtigste zelluläre Isoform in den meisten Geweben zu sein (Arthur, 2000).

Zusammenfassen lässt sich Folgendes: Homocystein wird als ein kardiovaskulärer Risikofaktor angesehen, der die Wichtigkeit einer Hypercholesterinämie oder einer Hyperlipidämie hat. Eine pathologische Erhöhung der Homocysteinwerte ist wahrscheinlich am Vorgang der oxidativen Inaktivierung des vom Endothel stammenden NO beteiligt (Lentz, 2001). Autooxidation von Homocystein *in vitro* bringt oxidative Stressfaktoren hervor, wie z.B. H₂O₂ und Superoxide. Die Behandlung der kultivierten Zellen mit Homocystein vermindert die Bioverfügbarkeit von NO und steigert die Zytotoxizität durch H₂O₂ (Zhang et al., 2000).

5.4 Methodenkritik: *Alamar Blue*

Die Vitalität der Zellen in der vorliegenden Arbeit nach dem oxidativen Stress wurde mithilfe des *Alamar Blue*-Assays gemessen.

Ahmed et al. entwickelten 1994 diesen neuen nicht-radioaktiven Assay zur Überwachung der Proliferation der Lymphozyten.

Dieser *Alamar Blue*-Assay hatte sich als eine mit vielen Vorteilen verbundene Methode etabliert:

1. *Alamar Blue* wird vom Hersteller als eine für den sofortigen Gebrauch fertige Lösung, die bei 4°C stabil ist, geliefert.
2. *Alamar Blue* beeinflusst nicht die Vitalität der Zellen.
3. *Alamar Blue* ist für den Menschen nicht toxisch, was die Arbeit mit diesem Assay und die Entsorgung erleichtert.
4. Die Durchführung des Assays ist einfach, was die Fehlerquellen reduziert.

Mögliche Nachteile des *Alamar Blue*-Assays sind:

1. *Alamar Blue* kann nur in Medien verwendet werden, die 10% FCSa und Phenolrot enthalten.
2. Der vom Hersteller empfohlene Wellenlängenbereich ist relativ eng (530-560 nm).
3. Eine mögliche Begrenzung der Anwendung des *Alamar Blue*-Assays liegt in seiner Eigenschaft, dass der einmal stattgefundene Farbumschlag auch dann bestehen bleibt, wenn die Zellen aus dem Medium entfernt werden. Dies suggeriert, dass der Farbumschlag die Proliferation der Zellen, jedoch nicht unbedingt die Vitalität dieser, nachweist.

5.5 Ergebniskritik

5.5.1 C-Allel und das Erkrankungsalter

Das Erkrankungsalter der Patienten, die dieser Analyse im ersten Teil der Arbeit zugrunde gelegt wurden, war signifikant mit dem Vorhandensein des C-Allels assoziiert.

Es zeigte sich, dass das Erkrankungsalter bei Alzheimer-Patienten mit dem Genotypen CC (bereits in früheren Publikationen gezeigt), bei Parkinson-Patienten mit den Genotypen AC oder CC, bei Patienten mit der MSA mit dem CC-Genotypen und für Patienten mit der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie mit den Genotypen AC oder CC später lag, das heißt, das C-Allel scheint mit einem späteren Erkrankungsalter verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen assoziiert.

Für die X-ALD wurde der Einfluss des MTHFR c.1298A>C Genotyps auf das Erkrankungsalter nur signifikant wirksam, wenn männliche X-ALD-Patienten (CCALD, „reine“ AMN und ALMN) mit symptomatischen Genträgerinnen in einer Gruppe gepoolt wurden. Deswegen war diese Gruppe klinisch sehr heterogen und Rückschlüsse in Bezug auf den Einfluss des MTHFR c.1298A>C Genotyps sind auf das Erkrankungsalter in dieser X-ALD-Probe schwer zu ziehen.

Es gab keine Beziehung des MTHFR c.677C>T Genotyps auf das Erkrankungsalter in irgendeiner Patientengruppe (nicht gezeigt).

5.5.2 Vergleich der Quotienten GSSG/GSX

Wie angenommen und erwartet, war das Verhältnis von oxidiertem zu Gesamtglutathion nach dem H₂O₂-Stress im Vergleich zu den nicht gestressten Zellen wesentlich angestiegen (s. Tab. 2 und Tab. 3).

Der niedrigste Anstieg war mit ca. 0.25 bei den Wildtypen zu verzeichnen, gefolgt von den CBS-Mutanten mit ca. 0.27. Die MTHFR KO-Zellen hatten einen Zuwachs des Quotienten um ca. 0.45.

Bei den MTHFR c.1298CC Zellen ist der Quotient signifikant um ca. 0.54 angestiegen, was – trotz der basal gemessenen niedrigsten Konzentrationen an GSX, GSSG, GSH – den höchsten Zuwachs aller untersuchten Zelllinien darstellt. Die zu Beginn in Frage gestellte Arbeitshypothese wurde hiermit bestätigt. Auch zeigen diese Zellen eine bessere Vitalität als die Wildtypen. Dies unterstreicht nochmal die Besonderheit des Genotyps MTHFR c.1298CC in seiner Abwehr gegen oxidativen Stress.

Die dieser Arbeit zugrunde gelegte Beschreibung des Quotienten GSSG/GSX wird in der Literatur als guter und sensitiver Parameter für zellulären oxidativen Stress angesehen (Toborek und Henning, 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Daten lassen annehmen, dass die Zellen mit MTHFR-Mangel oder Polymorphismus durch die niedrigere MTHFR-Aktivität mehr Homocystein zu Glutathion umsetzen können (Abb. 2) und so unter oxidativen Bedingungen mehr Glutathion zur Abwehr gegen oxidativen Stress bereitstellen können, sodass sich höhere Konzentrationen an oxidiertem Glutathion ergeben.

5.5.3 Besonderheit des Genotyps MTHFR c.1298CC

Die Ergebnisse zeigen die Besonderheit des Genotyps MTHFR c.1298CC auf: Dieser Genotyp hatte zwar einen niedrigen Spiegel an Gesamtglutathion und an dem Quotienten oxidiertes/ Gesamtglutathion, aber den höchsten Spiegel nach 30 Minuten Inkubation mit 500 µmol/l H₂O₂.

Der entscheidende Unterschied der Zellvitalität war 48 Stunden nach der Inkubation mit 500 µmol/l H₂O₂ zu beobachten: Hier hatte der Genotyp MTHFR c.1298CC eine Zellvitalität von 73% ± 41% Standardabweichung (T=7.86; p<0,001), also die doppelte Zellvitalität im Vergleich zu den Wildtyp-Fibroblasten MTHFR c.1298AA.

Auch die Messungen von GSX, GSSG und GSH nach oxidativem Stress zeigen einen Zuwachs aller drei Glutathionzustände. Somit scheint auch die zweite Hypothese bestätigt, die CC-Zellen scheinen besser mit oxidativem Stress umgehen zu können und zeigen eine größere Vitalität.

Schlussfolgernd zeigt diese Arbeit, dass die funktionelle Missense-Variante MTHFR c.1298A>C möglicherweise einen Einflussfaktor bei neurodegenerativen Krankheitsveränderungen darstellt. Eine Beeinflussung der Synthese des Glutathions und somit auch eine Beeinflussung des oxidativen Stresses könnte ein zugrunde liegender Mechanismus sein.

Bereits 1995 stellte Beal eine die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigende Hypothese auf, in der er die Rolle des oxidativen Stresses bei neurodegenerativen Erkrankungen deutete. Beal sprach von einer Art „chronischer“ Exzitotoxizität bei neurodegenerativen Erkrankungen, die den Krankheitsprogress kontinuierlich begleitet. Das energetische Ungleichgewicht bei diesen Erkrankungen ist zunächst klinisch nicht sichtbar. Erst das Überschreiten einer altersabhängigen Akkumulationsschwelle an Oxidantien und eine zeitgleich eintretende Funktionsabnahme der Mitochondrien führen zu einer klinischen Manifestation der neurodegenerativen Erkrankungen. Das späte klinische Erkrankungsalter der in dieser Arbeit u.a. untersuchten neurodegenerativen Erkrankungen M. Parkinson, MSA und X-ALD scheint Beals Hypothese zu bestätigen.

Eine Beeinflussung des durch Homocystein bedingten oxidativen Stresses und seiner Folgen bei der Neurodegeneration wiesen Perez-de-Arce et al. (2005) durch antioxidative Vorbehandlung ihrer Endothelzellen nach. Eine in den Grundzügen ähnliche Beeinflussung des oxidativen Stresses bei der *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C könnte möglicherweise in Zukunft therapeutische Optionen bieten.

Eine mögliche therapeutische Anwendung von Radikalfängern bei neurodegenerativen Erkrankungen wurde weiter oben bereits beschrieben.

6 Zusammenfassung

Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen spielt der Mechanismus des oxidativen Stresses eine pathophysiologische Rolle. Einer der Schutzfaktoren gegen den oxidativen Stress ist das Glutathion, für dessen Synthese das Homocystein entscheidend ist. In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass die *Missense*-Variante c.1298A>C (E429A) des Gens 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), die ein Enzym kodiert, welches in den Homocysteinmetabolismus involviert ist, das Erkrankungsalter von Patienten sowohl mit der Alzheimer-Erkrankung als auch von Patienten mit der Parkinson-Erkrankung beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse anhand einer zweiten Gruppe an Parkinsonpatienten bestätigt, darüber hinaus anhand einer Gruppe von Patienten mit der Multiple Systematrophie (MSA) und anhand einer Gruppe von Patienten mit der X-chromosomal vererbaren Adrenoleukodystrophie (X-ALD).

Die Arbeitshypothese lautete, dass die Variante MTHFR c.1298A>C einen grundlegenden Einfluss auf den klinischen Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen haben könnte. Um die Hypothese zu testen, dass ein Einfluss der MTHFR-Variante auf den oxidativen Stress diese Beobachtung erklären könnte, wurden menschliche kultivierte Fibroblasten von verschiedenen MTHFR-Genotypen (MTHFR c.1298AA = Wildtyp, MTHFR c.1298CC und MTHFR-defiziente Zellen mit alleiniger Restaktivität) mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen inkubiert und die Zellvitalität und der Glutathionspiegel gemessen.

Die Ergebnisse zeigten Folgendes: Zellen mit dem Genotyp MTHFR c.1298CC hatten einen niedrigen Spiegel an Gesamtglutathion und an dem Quotienten oxidiertes/ Gesamtglutathion, aber den höchsten Spiegel nach 30 Minuten Inkubation mit 500 µmol/l H₂O₂. Der entscheidende Unterschied der Zellvitalität war 48 h nach der Inkubation mit 500 µmol/l H₂O₂ zu beobachten: Hier zeigten die MTHFR c.1298AA Wildtyp-Fibroblasten eine Zellvitalität von 35% ± 30% Standardabweichung (in Bezug zu den nicht-H₂O₂-inkubierten Wildtypzellen) im Vergleich zu 78% ± 28% bei den MTHFR-defizienten KO-Zellen (T=10.9; p<0.001) und im Vergleich zu 73% ± 41% bei den MTHFR c.1298CC-Zellen (T=7.86; p<0,001).

Als Zusammenfassung lässt sich festhalten: Diese Ergebnisse zeigen, dass die funktionelle *Missense*-Variante MTHFR c.1298A>C ein evtl. Einflussfaktor bei der Suche nach Krankheitsveränderungen bei den neurodegenerativen Erkrankungen ist. Ein Einfluss auf die Glutathionsynthese und so auf die Abwehr gegen den oxidativen Stress könnte ein zugrunde liegender Mechanismus sein.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Metabolismus des Glutathions..... | 16 |
| Abbildung 2: Homocysteinmetabolismus und Glutathionsynthese..... | 23 |
| Abbildung 3: Fibroblasten bei einer Konfluenz von 50%..... | 36 |
| Abbildung 4: Fibroblasten bei 50x-Vergrößerung nach Trypsinisierung..... | 37 |
| Abbildung 5: Fibroblast bei 200x-Vergrößerung..... | 38 |
| Abbildung 6: Fibroblasten während der Wachstumsphase..... | 39 |
| Abbildung 7: Prinzip des Glutathionassays..... | 42 |
| Abbildung 8: Einfluss der <i>Missense</i> -Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Parkinsonpatienten in der Patientenstichprobe PD1..... | 49 |
| Abbildung 9: Einfluss der <i>Missense</i> -Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Parkinsonpatienten in der Patientenstichprobe PD2..... | 50 |
| Abbildung 10: Einfluss der <i>Missense</i> -Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Patienten mit Multisystematrophie..... | 50 |
| Abbildung 11: Einfluss der <i>Missense</i> -Variante MTHFR c.1298A>C auf das Erkrankungsalter bei Patienten mit Adrenoleukodystrophie..... | 51 |
| Abbildung 12: Basalwerte von GSX, GSSG, GSH..... | 54 |
| Abbildung 13: Konzentrationen von GSX, GSSG, GSH nach H ₂ O ₂ -Stress (nach 30 Min.)..... | 54 |
| Abbildung 14: Prozentuale Darstellung des Glutathions nach oxidativem Stress..... | 55 |
| Abbildung 15: Glutathionkonzentrationen für Wildtyp nach Stress..... | 57 |
| Abbildung 16: Glutathionkonzentrationen für den Genotyp MTHFR KO nach Stress..... | 57 |
| Abbildung 17: Glutathionkonzentrationen für den Genotyp CC nach Stress..... | 58 |
| Abbildung 18: Glutathionkonzentrationen für den Genotyp CBS nach Stress..... | 58 |
| Abbildung 19: Vitalitätsvergleich zwischen den Genotypen AA und MTHFR KO..... | 61 |
| Abbildung 20: Vitalität (absolut) für den Genotyp AA nach oxidativem Stress..... | 62 |
| Abbildung 21: Vitalität (absolut) für den Genotyp CC nach oxidativem Stress..... | 62 |
| Abbildung 22: Vitalität (absolut) für MTHFR KO nach oxidativem Stress..... | 63 |
| Abbildung 23: Vitalität (absolut) für den Genotyp CBS nach oxidativem Stress..... | 63 |
| Abbildung 24: Vergleich der Vitalität der Zelllinien bei 500 µmol H ₂ O ₂ | 64 |
| Abbildung 25: Vergleich der Vitalität der Zelllinien bei 250 µmol H ₂ O ₂ | 64 |
| Abbildung 26: Vergleich der Vitalität der Zelllinien bei 100 µmol H ₂ O ₂ | 65 |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Erkrankungsalter in den Patientenstichproben, unterteilt durch die MTHFR c.1298A>C Genotypen..... | 48 |
| Tabelle 2: Basalwerte des Glutathions..... | 52 |
| Tabelle 3: Glutathion nach der Inkubation mit H ₂ O ₂ | 55 |
| Tabelle 4: Zellvitalität 2h nach der H ₂ O ₂ Inkubation..... | 66 |
| Tabelle 5: Zellvitalität 24h nach der H ₂ O ₂ Inkubation..... | 67 |
| Tabelle 6: Zellvitalität 48h nach der H ₂ O ₂ Inkubation..... | 68 |

8 Literaturverzeichnis

Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non – radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to H3 – thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* 1994; 170: 211 – 224

Arias IM, Jakoby WB. *Glutathione: Metabolism and function*. New York: Raven Press, 1976

Arthur JR. The glutathione peroxidase. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 1825-1835

Baillie TA, Slatter JG. Glutathione: A vehicle for the transport of chemically reactive metabolites in vivo. *Acc. Chem. Res.* 1991; 24: 264-270

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

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 1992; 31: 119-130

Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 1995; 38: 357-366

Beitz R, Mensink GB, Fischer B, Thamm M. Vitamins-dietary intake and intake from dietary supplements in Germany. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: 539-545

Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, Kass NE, Moser HW. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann. Neurol.* 2001; 49: 512-517

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implication for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3290-3295

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7162-7166

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

Cassarino DS, Bennet JP Jr. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 1999; 29: 1-25

Chen WW, Watkins PA, Osumi T, Hashimoto T, Moser HW. Peroxisomal β -oxidation enzyme proteins in adrenoleukodystrophy: distinction between X-linked adrenoleukodystrophy and neonatal adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 1425-1428

Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999: 637-669

Cooper AJL. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Kunk LM, eds. *Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997: 1195-1230

- Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 1996-2002
- De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54: 599-618
- De Gaetano G. Low dose aspirin and Vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Groups of the Primary Prevention Project. *Lancet* 2001; 357: 89-95
- Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* 1996; 16: 2553-2562
- Di Monte DA. Mitochondrial DNA and Parkinson's disease. *Neurology* 1991; 41: 38-42
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 2000a; 62: 649-671
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 2000b; 267: 4912-4916
- Duffy PE, Tennyson VM. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus ceruleus in Parkinson' disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1965; 24: 398-414
- Durand P, Prost M, Loreau N, Luissier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; 81: 645-672
- Estellar M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2307-2311
- Fahn S. Levodopa-induced neurotoxicity. Does ist represent a problem for the treatment of Parkinson's disease? *CNS Drugs* 1997; 8: 376-393
- Fanconi A, Prader A, Isler W. Morbus Addison mit Hirnsklerose im Kindesalter-ein hereditäres Syndrom mit X-chromosomaler Vererbung? *Helv Pädiatr Acta* 1963; 18: 480-501
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 1994; 92: 696-717
- Francis RB. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function.* New York: Marcel Dekker Inc., 1992
- Frimpter GW. The disulfide of L-cysteine and L-Homocysteine in urine of patients with cystinuria. *J. Biol. Chem.* 1961; 236: 51
- Frimpter GW. Cystinuria: Metabolism of the disulfide of cysteine and homocysteine. *Journal of Clinical Investigation* 1963; 42: 1956-1964
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 1995; 10: 111-113
- Gilman S, Low PA, Quinn N, Albanese A, Ben-Shlomo Y, Fowler CJ. Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *J Auton Nerv Syst* 1998; 74: 189-192

- Goyette P, Summer JS, Milos R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200
- Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 633-643
- Hall AG. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999; 29: 238-245
- Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation biology. *J Gerontol.* 1954; 2: 6614-6636
- Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *European Journal of Human Genetics* 2000; 8: 725-729
- Hyndman ME, Bridge PJ, Warnica JW, Fick G, Parsons HG: Effect of heterozygosity for the methionine synthase 2756 A→G mutation on the risk for recurrent cardiovascular events. *Am J Cardiol* 2000; 86: 1144-1146
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg ICH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-9
- Jenner P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scan.* 1993; 87: 6-13
- Jenner P. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* 2003; 53: 26-38
- Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC, Kannan R, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M, Yi JR. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1996; 377: 267-273
- Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, Shih VE, Silveira S, Plomaritoglou A, Furie KL. Homocysteine, MTHFR 677C→T polymorphism, and risk of ischemic stroke. Results of a meta-analysis. *Neurology* 2002; 59: 529-536
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2002; 288: 2023-2031
- Kölsch H, Linnebank M, Lütjohann D, Jessen F, Wüllner U, Harbrecht U, Thelen KM, Kreis M, Hentschel F, Schulz A, von Bergmann K, Maier W, Heun R. Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 and AD, vascular dementia, and stroke. *Neurology* 2004; 63: 2255-2260
- Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix LR, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J of Neuroscience* 2000; 20: 6920-6926
- Kussmaul L, Hamprecht B, Dringen R. The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. *J. Neurochem.* 1999; 73: 1246-1253
- Lantos PL. Multiple system atrophy. *Brain Pathology* 1997; 7: 1293-1297
- Lentz SR. Homocysteine and cardiovascular physiology. In: Carmel R, Jacobsen DW, eds. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001: 441-450
- Li Y, Maher P and Schubert D. A role for 12-Lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* 1997; 19: 453-463

- Lin JJ, Yueh KC, Liu CS, Liu JT, Lin SZ. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism can influence age at onset of Parkinson's disease. *Acta Neurol Taiwan* 2007; 16: 150-157
- 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
- Linnebank M, Schmidt S, Kölsch H, Linnebank A, Heun R, Schmidt-Wolf IGH, Glasmacher A, Fliessbach K, Klockgether T, Schlegel U, Pels H. The methionine synthase polymorphism D919G alters susceptibility to primary central nervous system lymphoma. *British Journal of Cancer* 2004a; 90: 1969-1971
- Linnebank M, Linnebank A, Jeub M, Klockgether T, Wüllner U, Kölsch H, Heun R, Koch HG, Suormala T, Fowler B. Lack of Genetic Dispositions to Hyperhomocysteinemia in Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics* 2004b; 131: 101-102
- Linnebank M, Montenarh M, Kölsch H, Linnebank A, Schnez K, Schweichel D, Pohl C, Urbach H, Heun R, Harbrecht U, Klockgether T, Wüllner U. Common genetic variants of homocysteine metabolism in ischemic stroke: a case-control study. *European Journal of Neurology* 2005a; 12: 614-618
- Linnebank M, Fliessbach K, Kölsch H, Rietschel M, Wüllner U. The methionine synthase polymorphism c.2756 A→G (D919G) is relevant for disease-free longevity. *International Journal of Molecular Medicine* 2005b; 16: 759-761
- Linnebank M, Kemp S, Wanders RJA, Kleijer WJ, Klockgether T, Wüllner U. Methionine metabolism and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 2006; 66: 442-443
- 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. USA* 1997; 94: 5923-5928
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275
- Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997; 57: 1098-1102
- Maleady R, Ueland PM, Blom H, Whitehead AS, Refsum H, Daly LE, Vollset SE, Donohue C, Giesendorf B, Graham IM, Ulvik A, Zhang Y, Bjorke Monsen AL. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 63-70
- Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kondoh E, Maeda S. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood* 2001; 97: 3205-3209
- Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 17205-17208
- Moser HW, Moser AE, Singh I, O'Neill BP. Adrenoleukodystrophy: Survey of 303 cases: biochemistry, diagnosis and therapy. *Ann Neurol* 1984; 16: 628-641
- Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000; 39: 13005-13011
- Mudd SH. Activation of Methionine for Transmethylation. VI. Enzyme-bound tripolyphosphate as an intermediate in the reaction catalyzed by the methionine-activating enzyme of bakers' yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 1963; 238: 2156-2163

Olney JW, Zorumski C, Price MT, Labruyere J. L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 1990; 248: 596-599

Perez-de-Arce K, Foncea R, Leighton F. Reactive oxygen species mediates homocysteine-induced mitochondrial biogenesis in human endothelial cells: Modulation by antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 338: 1103-1109

Pirker W, Brücke Th. SPECT in der Diagnostik von Parkinson-Syndromen. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2004; 5: 9-20

Prengler M, Sturt N, Krywawych S, Surtees R, Liesner R, Kirkham F. Homozygous thermolabile variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a potential risk factor for hyperhomocysteinaemia, CVD, and stroke in childhood. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2001; 43: 220-225

Quastel JH, Stewart CP, Tunncliffe HE. *On Glutathione*. Cambridge: Biochemical Laboratory, 1923

Quinn N. Multiple system atrophy – the nature of the beast. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52: 78-89

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

Sacco RL, Roberts JK, Jacobs BS. Homocysteine as a risk factor for ischemic stroke: an epidemiological story in evolution. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 167-173

Sato N, Iwata S, Nakamura K, Hori T, Mori K, Yodoi J. Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J. Immunol.* 1995; 154: 3194-3203

Schulz JB, Klockgether T, Petersen D, Jauch M, Muller-Schauenburg W, Spieker S. Multiple system atrophy: natural history, MRI morphology, and dopamine receptor imaging with ^{123}I BZM-SPECT. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 1047-1056

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Minireview: Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 4904-4911

Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 614-620

Shy GM, Drager GA. A neurological syndrome associated with orthostatic hypotension: a clinical-pathological study. *Arch Neurol* 1960; 2: 511-527

Singh I, Moser AE, Goldfischer S, Moser HW. Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: Implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 4203-4207

Skibola CF, Smith MT, Kane L. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12810-12815

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

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

Stanger O, Hermann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M. Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein über den rationalen klinischen Umgang mit Homocystein, Folsäure und B-Vitaminen bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen – Richtlinien und Empfehlungen. *J Kardiol* 2003; 10: 190-199

Toborek M, Henning B. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 59: 60-65

Volc D. Morbus Parkinson – antiglutamaterger Zugang. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2003; 2: 50-51

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

Weiner WJ. Is levodopa toxic? *Arch Neurol* 2000; 57: 408-410

Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C, Loscalzo J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *PNAS* 2001; 98: 12503-12508

Wendel A, Cikryt P. The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS Lett.* 1980; 120: 209-211

Wenning GK, Puschban Z, Seppi K, Scherfler C. Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie der Multisystematrophie. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 2000; 151: 150-158

Wilcken DE, Wilcken B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J Inherit Metab Dis* 1997; 20: 295-300

Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann 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, Klockgether Th. Klinik und Therapie der Multisystematrophie. *Dtsch Ärztebl* 2003; 100: 408-415

Yamamoto M, Sakamoto N, Iwai A, Yatsugi S, Hidaka K, Noguchi K, Yuasa T. Protective actions of YM737, a new glutathione analog, against cerebral ischemia in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1993; 81: 221-232

Zhang X, Li H, Jim H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol.* 2000; 279: 671-678

9 Danksagung

Ich danke herzlichst Herrn Prof. Dr. med. Ullrich Wüllner für das freundliche Überlassen der Themenstellung zu dieser Arbeit, die sehr gute fachliche Betreuung sowie seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn PD Dr. med. Michael Linnebank (Universitätsspital Zürich) danke ich für die sehr gute Betreuung der Experimente, seine Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse und für die kritischen Diskussionen.

Bei den Mitarbeitern des neurobiologischen Labors der Klinik für Neurologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität und besonders bei Frau Sabine Proske-Schmitz möchte ich mich für die praktische und technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf diesem Weg immer begleitet und unterstützt haben und denen ich Vieles verdanke, was ich nicht in Worte fassen kann.