

Analyse von Hyperhomocysteinämien und deren genetischer Ursachen
Etablierung einer Methode für die HPLC und Suche nach weiteren
Mutationen auf dem MTHFR-Gen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



von
Ingrid Lebert-Keiner

Frankfurt 2003

vom Fachbereich für Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann und Prof. Dr. W. Groß

Tag der Disputation: 24. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Allgemeine Einführung.....	1
1.2. Physiologie des Homocysteinstoffwechsels.....	2
1.3. Arterioskleroseentstehung und die Rolle von Homocystein	5
1.4. Gendefekte mit Auswirkung auf den Homocysteinstoffwechsel.....	9
1.4.1. Cystathionin- β -Synthase (CBS).....	9
1.4.2. Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR).....	10
1.5. Pathogene Wirkungen der Hyperhomocysteinämien.....	12
1.6. Klinische Bedeutung von Vitaminen im Homocysteinstoffwechsel.....	13
1.6.1. Folsäure.....	13
1.6.2. Vitamin B12.....	13
1.6.3. Vitamin B6.....	14
1.7. Die Therapie und Prophylaxe der Hyperhomocysteinämien.....	15
2. PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	17
3. MATERIAL	18
3.1. Chemikalien	18
3.2. Puffer und Medien.....	19
3.3. Enzyme und Kits.....	21
3.4. Geräte und Software	21
4. METHODEN	22
4.1. Proteinchemischer Teil (Teil A)	22
4.1.1. H P L C	22
4.1.1.1. Proben.....	22
4.1.1.2. Aufarbeitung von Homocysteinstandardwerten (nach Jacobsen) ³⁰	23
4.1.1.3. Darstellung von L-Homocystein-S-biman aus L-Homocystin (nach Jacobsen) ³⁰	23
4.1.1.4. Aufarbeitung von Homocysteinprobenwerten (nach Jacobsen) ³⁰	23
4.1.2. Homocystein E L I S A.....	24
4.1.2.1. Durchführung.....	24
4.1.2.2. Probengewinnung	25
4.1.2.3. Probenvorbereitung ³¹	25
4.1.2.4. Enzymimmunoassay ³¹	25
4.2. Molekularbiologischer Teil (Teil B).....	28
4.2.1. Auswahl der Patientenproben	28
4.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	28
4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	29
4.2.4. Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese	29

4.2.5.	TGGE PCRs.....	30
4.2.6.	TGGE-Apparatur und Polyacrylamidgele.....	31
4.2.7.	Senkrechte TGGE	31
4.2.8.	Parallele TGGE.....	31
4.2.9.	Silbernitratfärbung der Gele	32
4.2.10.	DNA-Extraktion aus PAA-Gelen und Vorbereitung für die Sequenzanalyse.....	33
4.2.11.	RFLP-Nachweis von Punktmutationen.....	33
4.2.12.	Lymphozytenisolierung nach Ficoll-Hypaque.....	34
4.2.13.	MTHFR-Aktivitätsbestimmung.....	34
5.	ERGEBNISSE	35
5.1.	Biochemischer Teil (Teil A)	35
5.1.1.	HPLC-MESSUNG.....	35
5.1.1.1.	Standardkurven von Homocystein.....	37
5.1.1.2.	Probenmessung von Homocystein.....	38
5.1.2.	E L I S A	39
5.1.2.1.	Kalibrationskurve/ Standardkurve	39
5.1.3.	Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA	40
5.1.4.	Auswertung Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA.....	42
5.2.	Molekularbiologischer Teil (Teil B)	43
5.2.1.	Beschreibung des MTHFR-Reduktase Kollektivs	43
5.2.2.	statistische Auswertung (Diagramme) der einzelnen Parameter.....	44
5.2.3.	Beschreibung der statistischen Diagramme nach den einzelnen Parametern.....	66
5.2.3.1.	Folsäure.....	66
5.2.3.2.	Vitamin B12.....	67
5.2.3.3.	Vitamin B6.....	67
5.2.3.4.	Alter / Geschlecht	68
5.2.3.5.	KHK -Status.....	69
5.2.3.6.	Hypertonie	70
5.2.3.7.	Diabetes	70
5.2.3.8.	Rauchen	70
5.2.3.9.	Übersicht der einzelnen kardiovaskulären Risikofaktoren.....	71
5.2.4.	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE)	72
5.2.4.1.	Primerberechnung.....	72
5.2.5.	Darstellung der gefundenen Mutationen auf dem MTHFR-Gen	79
5.2.5.1.	klinische Parameter der gefundenen Mutationen.....	81
5.2.5.2.	Beschreibung der klinischen Parameter der gefundenen Mutationen	81
5.2.5.3.	Agarosegeldarstellung des RFLP Nachweises von Punktmutationen.....	83
5.2.6.	Familienanamnese des Mutationsträgers mit der neuen Mutation (C-844-T) auf Exon 5	85
5.2.7.	Auswertung.....	86
6.	DISKUSSION	87
6.1.	Proteinchemischer Teil (Teil A)	87

6.2.	Molekularbiologischer Teil (Teil B)	88
6.2.1.	Korrelation und Signifikanz der einzelnen Kollektive.....	88
6.2.2.	Vergleich erhöhter Homocysteinwerte zwischen Luric Studie und Literatur	88
6.2.3.	Gegenüberstellung der neuen gefundenen Mutation auf Exon 5 (C-844-T) mit einer Familienstudie mit folgenden bekannten Mutationen [(A-28-T) auf Exon 1, (C-677-T) auf Exon 4, (A-1298-C) auf Exon 7 und (C-1615-T) auf Exon 9]	90
7.	ZUSAMMENFASSUNG	93
ANHANG.....		V
LITERATUR.....		VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....		VII
TABELLENVERZEICHNIS.....		VIII
VERÖFFENTLICHUNGEN.....		IX
DANKSAGUNG.....		X
LEBENS LAUF.....		XI
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....		XII

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
CBS	Cystathionin- β -Synthase
cDNA	komplementäre DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HPLC	High Performance Liquid Chromatografie
Lp	Lipoprotein
MOPS	3-N-(Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel Elektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
TG	Triglyceride
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt, Apoplex, und arterielle Verschlusskrankheit sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Sie stehen in der Mortalitätsstatistik noch vor den malignen Erkrankungen. Die Arteriosklerose ist aufgrund ihrer Häufigkeit und ihrer klinischen Folgen eine der bedeutendsten Erkrankungen der westlichen Industrienationen. Die koronare Herzkrankheit ist eine Folgekrankheit der Arteriosklerose.

In der Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) steht die Prävention durch Bekämpfung der Risikofaktoren im Vordergrund.

Eine Reihe von Risikofaktoren begünstigen das Auftreten einer KHK.

Bedeutend sind vor allem Nikotinabusus, Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen; aber auch der Diabetes mellitus, Hyperurikämie, Adipositas, Geschlecht, Alter und gewisse endogene Faktoren (Streß, psychische Belastung) stellen Risikofaktoren der Erkrankung dar. Heute geht man davon aus, daß die Entwicklung der Arteriosklerose multifaktorieller Genese ist.

In etwa 90 % der Fälle besteht ein statischer Zusammenhang zwischen der Gefäßerkrankung und den Risikofaktoren.

Tatsächlich sind alle Faktoren, die zu einer arteriosklerotischen Erkrankung führen, noch nicht geklärt. Dies zeigt, daß die Erkennung und Charakterisierung bislang unbekannter Risikofaktoren weiterhin eine wissenschaftliche Herausforderung darstellen.

Einer dieser Faktoren ist wohl die Hyperhomocysteinämie. Auf die pathobiochemische Bedeutung der Aminosäure Homocystein, die de Vigneaud 1932 als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels entdeckte, war man erstmals 1962 aufmerksam geworden. Damals beschrieben Carson¹ und Gerritsent² unabhängig voneinander die Krankheit Homocysteinurie, die durch einen marfanoiden Körperbau mit Hochwuchs und Arachnodaktylie, Linsenluxation, Osteoporose und geistige Retardierung gekennzeichnet ist und häufig schon im Kindesalter zu thromboembolischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall mit oft tödlichem Ausgang führt. Die Homocysteinkonzentration im Plasma liegt bei den Kranken mit bis zu 400 µmol/L^{3,4} weit über der von Gesunden, die etwa 10 µmol/L beträgt.

1969 machte Mc Cully bei der Obduktion von Kindern, die unterschiedliche Stoffwechseldefekte mit dem gemeinsamen Merkmal einer erhöhten Homocysteinausscheidung im Urin gehabt hatten, die Beobachtung, daß diese arteriosklerotische Gefäßveränderungen aufwiesen, wie man sie sonst nur bei älteren Individuen findet.

Damit hatte er als erster den Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Blut bzw. Urin und Arteriosklerose erkannt und veröffentlichte diese Erkenntnis 1975 als „homocysteine theory of arteriosclerosis“.⁵

Erst Mitte der 80er Jahre wurde, u. a. bedingt durch verbesserte und somit empfindlichere analytische Methoden, auch die moderate Hyperhomocysteinämie mit einem erhöhten Arterioskleroserisiko in Verbindung gebracht.

Den Durchbruch für die Anerkennung von Homocystein als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen brachte 1992 die Physicians Health Study.⁶ In einem Untersuchungskollektiv von 22071 nordamerikanischen Ärzten war hier ein dreifach erhöhtes Herzinfarktrisiko für diejenigen Personen gefunden worden, deren Homocysteinwerte über der 95. Perzentile der Gesamtheit lagen, was einer Konzentration von 15,9 µmol/L entsprach.

1.2. Physiologie des Homocysteinstoffwechsels

Homocystein (Abb. 1-1) ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die nicht an der Proteinsynthese beteiligt ist, sondern im menschlichen Organismus als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels vorkommt.

Sie ist toxisch und wird daher umgehend in Cystein umgewandelt oder zu Methionin remethyliert.

Die wichtigste bisher bekannte Aufgabe von Homocystein liegt in der Bereitstellung von Methylgruppen, einer wichtigen Funktion zur Bildung essentieller Aminosäuren.

Pro Tag werden in den Körperzellen eines Erwachsenen etwa 20 mmol Homocystein aus Methionin gebildet⁹ und normalerweise sofort weiter zu Cystathionin oder zurück zu Methionin umgebaut. Überschüssiges Homocystein wird aus den Zellen in das Blut exportiert, wo man einen Plasmaspiegel von etwa 10 µmol/L findet. 70 – 80 % des Plasma-Homocysteins sind an Plasmaproteine wie Albumin gebunden; 20 – 30% liegen als Homocystein- oder Homocystein-Cystein-Disulfide und ein geringer Anteil in freier Form vor.

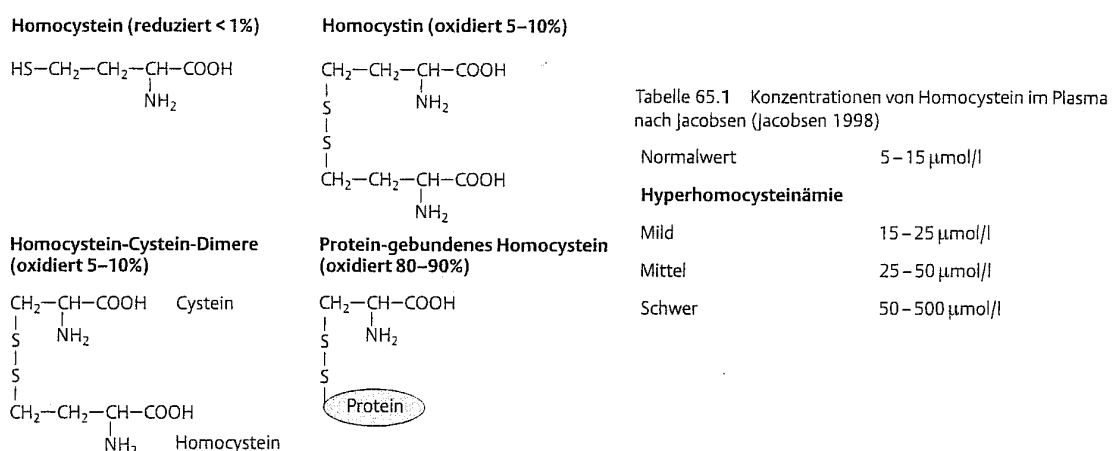


Abb. 1-1) Strukturformeln und Konzentrationen der Aminosäure Homocystein, Homocystin, Homocystein-Cystein-Dimere, Protein-gebundenes Homocystein

Methionin, die einzige Quelle von Homocystein, ist eine essentielle Aminosäure, von der ein Erwachsener etwa 2 g täglich mit der Nahrung (v.a. Fleisch) zu sich nimmt.¹⁰ Im Körper wird daraus S-Adenosyl-Methionin (SAM) gebildet, der wichtigste Methylgruppendonor in unserem Stoffwechsel. Wenn SAM seine Methylgruppe z. B. bei der Synthese von Nukleinsäuren und Neurotransmittern abgibt, entsteht Homocystein.

Im Stoffwechsel von Homocystein werden der Remethylierungsweg, mit dem Homocystein zu Methionin umgebaut wird, und der Transsulfurierungsweg, bei dem Cystein und Sulfat entstehen, unterschieden.

Die N(5),N(10)-methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist ein Enzym des Folsäurestoffwechsels und hat somit bei der folatabhängigen Remethylierung von Homocystein zu Methionin eine zwar indirekte aber wichtige Funktion.

Sie reduziert N(5),N(10)-methylentetrahydrofolat zu N(5)-methyltetrahydrofolat. N(5)-methyltetrahydrofolat ist ein wichtiger Methylgruppendonor. Seine Methylgruppe wird auf Homocystein übertragen, das damit dann zu Methionin umgewandelt wird.

Ein weiteres wichtiges Enzym für die Remethylierung zu Methionin ist die Methionin-Synthase (= 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyl-Transferase), die in allen Körperzellen vorkommt.^{4,11} Sie benötigt Folsäure und Vitamin B12 als Cosubstrat bzw. Cofaktor. Auch die Betain-Homocystein-Methyl-Transferase wandelt Homocystein unter Bildung von Dimethylglycin in Methionin um. Da diese Reaktion aber nur in der Leber stattfindet, und ihre Aktivität auch bei hohem Substratangebot kaum steigt, spielt sie im Homocysteinstoffwechsel eine untergeordnete Rolle.¹²

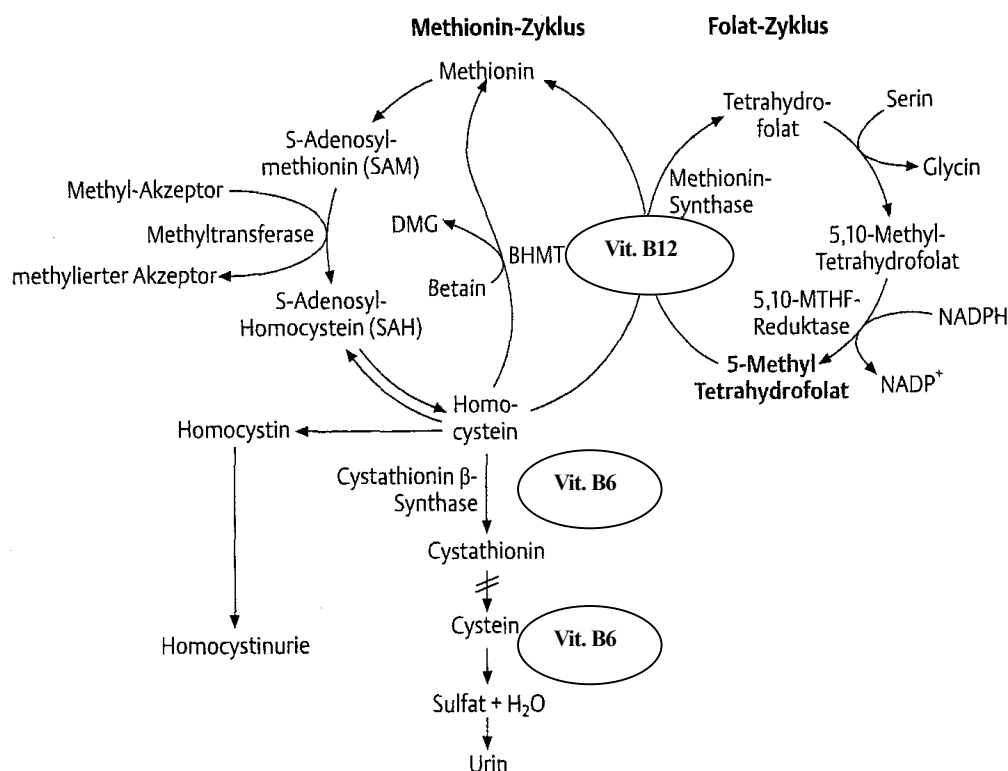


Abb. 1-2) Der Homocysteinstoffwechsel

Die mit der Nahrung aufgenommene essentielle Aminosäure Methionin wird mit ATP zu S-Adenylmethionin (SAM) umgewandelt, welches Substrat und Methylgruppen-Donator für die Methyltransferase ist (siehe Abb. 1-2.). Aus der Reaktion von SAM mit Methyltransferase entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), welches durch die SAH-Hydrolase zu Homocystein und Adenosin hydrolysiert wird.

Der irreversible Abbau von Homocystein zu Cystein wird Transsulfurierung genannt. Das aus dem Methionin-Zyklus entstehende Homocystein kann über die Vitamin-B6-abhängige Cystathionin- β -Synthase zu Cystathionin konvertiert werden. Cystathionin wird durch die ebenfalls Vitamin-B6-abhängige Cystathionase in die schwefelhaltige Aminosäure Cystein umgewandelt, die im katabolen Aminosäurestoffwechsel abgebaut werden kann. Der Abbau von Homocystein (Transsulfurierung) ist beschränkt auf bestimmte Gewebe wie Leber, Niere, Pankreas und Gehirn (Jacobson 1998).

Normalerweise findet die Metabolisierung von Homocystein zu etwa gleichen Teilen über den Weg der Remethylierung und der Transsulfurierung statt. Bei Methioninmangel steigt die Aktivität der Methionin-Synthase, so daß die essentielle Aminosäure Methionin vermehrt aus Homocystein regeneriert und dem Körper zur Verfügung gestellt wird.¹⁰ Die Transsulfurierung dient eher der Elimination von Homocystein aus dem Körper, da das dabei entstehende überschüssige Cystein zu Sulfat oxidiert und dann über die Nieren ausgeschieden werden kann.⁴

Die Ursache für eine erhöhte Homocysteinkonzentration im Blut sind aus den Stoffwechselvorgängen abzuleiten (Abb.1-2). Bekannt sind bisher eine genetisch bedingte Aktivitätsminderung der am Homocysteinmetabolismus beteiligten Enzyme (primäre Hyperhomocysteinämie), ein Mangel an den Cofaktoren Folsäure, Vitamin B12 und B6 und eine eingeschränkte Nierenfunktion (sekundäre Hyperhomocysteinämie). Die Bedeutung der Nierenfunktion für den Homocysteinspiegel ist darauf zurückzuführen, daß die Reaktion der Homocystein abbauenden Cystathionin- β -Synthase (CBS) hauptsächlich in der Niere stattfindet.⁴

1.3. Arterioskleroseentstehung und die Rolle von Homocystein

Die morphologischen Gefäßveränderungen bei der Arteriosklerose und deren histopathologischer Verlauf sind gut bekannt. Nicht vollständig geklärt ist aber die Pathogenese bzw. welche Faktoren die Entscheidenden für die Entstehung einer Arteriosklerose sind.

Als Grundmodell hat sich die „Response to injury“-Hypothese durchgesetzt. Diese besagt, daß am Anfang der Atherogenese eine Schädigung des Gefäßendothels durch mechanische, immunologische, toxische oder entzündliche Faktoren steht. In der Folge kommt es zur Akkumulation von Lipiden in der Gefäßintima mit Bildung von Schaumzellen und zur Immigration von Entzündungszellen aus dem Blut und glatten Muskelzellen aus der Media.

Das überschießende Wachstum der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und die Bildung von Grundsubstanz, die schließlich verkalkt, führen zur Entstehung arteriosklerotischer Plaques. An die veränderte Gefäßoberfläche lagern sich Thrombozyten an und bilden Thromben, die das Gefäßlumen weiter einengen. Am Ende entsteht der Gefäßverschluß durch Plaqueruptur, Thrombose oder Embolie.

Das „Response to injury –Modell integriert viele der bisher bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren, z.B. oxidiertes LDL oder neuerdings Chlamydien, als gefäßschädigende, Arteriosklerose auslösende Noxen. Man weiß heute, daß auch immunologische Reaktionen, Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) sowie monoklonales Wachstum bei der Entstehung und Progression der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen.

Die „homocysteine theory of arteriosclerosis“ von McCully⁵ besagt lediglich, daß die morphologischen Gefäßveränderungen bei Hyperhomocysteinämie denen altersbedingter oder sonstiger Arteriosklerose entsprechen. Der Mechanismus, über den Homocystein arteriosklerose-bzw. thrombosefördernd wirkt, ist aber noch weitgehend unbekannt.

Experimentell wurde eine direkt toxische Wirkung von Homocystein auf kultivierte Endothelzellen nachgewiesen, wahrscheinlich über die Bildung von H_2O_2 .⁵ Allerdings wurden für diese Versuche sehr hohe Dosen Homocystein verwendet, obwohl ja gerade auch die moderate Hyperhomocysteinämie als Arteriosklerose- Risikofaktor gilt.³

Mc Cully^{5,6} konnte zeigen, daß Homocystein die Oxidation von Lipiden und damit deren vermehrte Aufnahme in Makrophagen fördert. Bei hypercholesterinämischen Patienten fand er Homocystein-LDL-Aggregate, über die Homocystein möglicherweise in die Gefäßwand eingeschleust wird, wo es dann oxidative und andere Prozesse beeinflussen könnte. Mc Cully macht das Homocystein-Thiolacton, ein reaktives Intermediärprodukt, für die oxidative Wirkung von Homocystein verantwortlich, z.B. für intrazelluläre Radikalbildung, Oxidation von LDL oder abnorme Sulfurierung der Proteoglykane in der Grundsubstanz.

Es konnte gezeigt werden, daß Homocystein die Thrombomodulinexpression auf der Endotheloberfläche und die Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden Protein C hemmt und dadurch auch thrombogen wirkt.³

Außerdem soll es die Bindung von Lp(a) an Fibrin begünstigen, wodurch die plasminogenvermittelte Fibrinolyse behindert wird.⁷

Trotz dieser und zahlreicher weiterer Einzelergebnisse gibt es insgesamt noch keine schlüssige Vorstellung darüber, wie erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Blut die Entstehung und Progression der Arteriosklerose beeinflussen.

Das Eingreifen von Homocystein in die Pathogenese der verschiedenen Gefäßerkrankungen wird deshalb kontrovers diskutiert.

Es ist unklar, ob eine erhöhte Homocysteinplasmakonzentration per se Gefäßerkrankungen induzieren kann oder ob Homocystein in die Pathogenese bereits induzierter Gefäßschädigungen eingreift und deren Progression fördert. Die primären Schädigungen im Gefäßsystem würden hierbei nicht durch Homocystein, sondern durch andere Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Bewegungsmangel etc. induziert werden.¹⁸

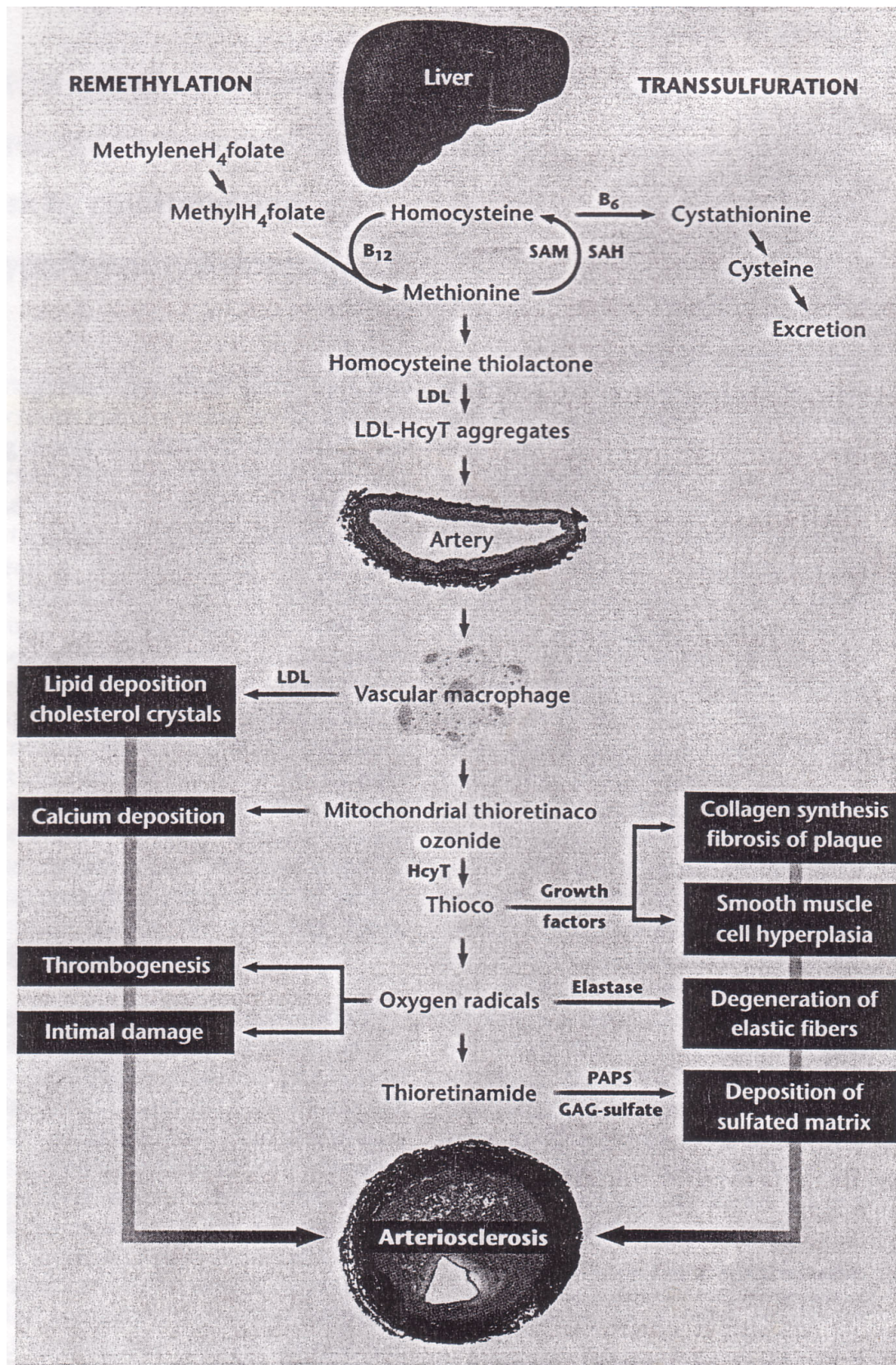


Abb. 1-3) Die Arterioskleroseentstehung von Homocystein

Pathogenese der Arteriosklerose (siehe Abbildung 1.3) ⁸:

Die Remethylierung und Transsulfurierung (Abbau von Homocystein) finden beide in der Leber statt (siehe Abb. 1-3). Genetisch, toxisch, hormonell oder ernährungsbedingt kann eine reduzierte Remethylierung oder eine reduzierte Transsulfurierung zu einer Überproduktion von Homocysteinthiolacton, von Methionin ausgehend, führen.

Vitamin B12 und Folsäure aktivieren die Remethylierung von Homocystein zu Methionin. Vitamin B6 aktiviert die irreversible Transsulfurierung von Homocystein zu Cystein und seinen Metaboliten. Ein Überangebot von Homocysteinthiolacton wandelt LDL zu LDL- Homocysteinthiolactonaggregaten um, die im Blut transportiert werden und von Makrophagen aufgenommen werden.

Schaumzellen setzen Lipide und Cholesterol frei, die sich in Form von Plaques einlagern.

Auch Homocysteinthiolacton wird von den Schaumzellen freigesetzt und erleichtert die Umwandlung von „Thioretinaco ozonide“ der Mitochondrien zu „Thioco“, welche zu glatter Muskelzellhyperplasie und Fibrose führt.

Untersuchungen ergaben, daß synthetische Derivate vom Homocysteinthiolacton bekannt sind.

Die Ergebnisse dieser neuen Theorie besagen, daß die synthetischen Derivate Thioretinamide, Thioretinaco und Thioco in die oxidative Phosphorylierung und in die Wachstumskontrolle eingreifen.

Eine konsequente Überproduktion von Sauerstoffradikalen verursacht einen Intimaschaden, oxidiert Thioretinamid zu Glucosaminyglykansulfaten, aktiviert die Elastase, induziert Thrombose, erhöht die Calciumeinlagerung und bildet die arteriosklerotischen pathologischen Plaques.

1.4. Gendefekte mit Auswirkung auf den Homocysteinstoffwechsel

Klinische Bedeutung haben hauptsächlich Mutationen der beiden Gene, die die Cystathionin- β -Synthase und die Methylenetetrahydrofolatreduktase codieren (Abbildung 1.4). Andere seltene Gendefekte mit Auswirkung auf die Homocysteinkonzentration im Blut betreffen Enzyme des Vitamin-B12-Stoffwechsels.³

1.4.1. Cystathionin- β -Synthase (CBS)

Die CBS ist ein Enzym des Transsulfurierungsweges. Wie aus Abbildung 1-2 zu entnehmen ist, reichern sich bei einem Enzymmangel Homocystein und Methionin an, während die Cysteinkonzentration vermindert ist.¹³ Das Gen für dieses Enzym liegt auf Chromosom 21. Bisher sind 17 verschiedene Mutationen beschrieben worden,¹⁴ die in Abhängigkeit von der Residualaktivität des Enzyms und der daraus resultierenden Homocysteinkonzentration unterschiedlich schwer ausgeprägte Krankheitsbilder zur Folge haben.

Der homozygot vererbte schwere Enzymmangel ist Ursache für die klassische Homocysteinurie, die mit einer Prävalenz von 1: 332 000⁹ auftritt und meist schon in jungen Jahren zum Tode führt.

Ob auch der heterozygot vererbte CBS-Defekt, der mit einer Häufigkeit von 0,3 % in der Gesamtbevölkerung gefunden wird, klinische Bedeutung hat, ist umstritten.^{14,6} Die Homocysteinwerte sind dabei lediglich postprandial bzw. nach oraler Methioningabe erhöht, nicht aber im Nüchternblut, da der Transsulfurierungsweg und damit die CBS nur bei hohen Methioninspiegeln aktiviert wird. Als Methionin –Belastungstest macht man sich diesen Umstand diagnostisch zunutze. Bei einem positiven Testergebnis spricht man von PML (post-methionine load)-Hyperhomocysteinämie¹⁵.

Da die CBS Vitamin B6 abhängig ist, versucht man therapeutisch den Enzymmangel durch Vitamin B6 – Substitution zu kompensieren.

Es ist bekannt, daß es unter den Patienten mit klassischer Homocysteinurie Vitamin B6 –Responder und Nonresponder gibt, je nachdem, ob sich ihr Homocysteinspiegel durch Vitaminsubstitution senken läßt oder nicht. Das Ansprechen auf Vitamin B6 scheint genetisch verankert zu sein, also vom Mutationstyp abzuhängen.^{16,13} Die Vitamin Responder, etwa die Hälfte der Betroffenen,^{10,13} haben eine mildere Symptomatik und sind außerdem durch Vitamingabe therapierbar, so daß ihre Prognose besser ist als die der Nonresponder¹⁰.

1.4.2. Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR)

Das Gen für das Enzym MTHFR liegt auf Chromosom 1p36.3 und besteht aus 11 Exonbereichen (siehe Abb. 1-4 und Abb. 1-5). Menschliche und andere eukaryotische MTHFRs sind dimere Enzyme. Diese Homodimere bestehen aus Untereinheiten von 77 kDa. Das Enzym MTHFR besteht aus einer N-terminalen Domäne von 40 kDa und einer C-terminalen Domäne von 37 kDa.

Die katalytische Domäne der MTHFR liegt im N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser Bereich entspricht Exon 1 bis Exon 6 des MTHFR-Gens. Hier liegen die Bindungsstellen für das Substrat, für FAD und NADPH. Die regulatorische Domäne der MTHFR liegt im C-terminalen Bereich des Proteins und entspricht Exon 7 bis Exon 11 des MTHFR-Gens. Hier wird der allosterische Inhibitor S-adenosylmethionin (AdoMet) gebunden. Diese Domäne ist für die Enzymaktivität der MTHFR zuständig.

E. coli MTHFR ist ein tetrameres Enzym. Seine Struktur ist hinreichend bekannt (siehe Abb. 1-5).

Die MTHFR ist ein Enzym des Folsäurestoffwechsels und hat somit bei der folatabhängigen Remethylierung von Homocystein zu Methionin eine zwar indirekte aber wichtige Funktion. Sie reduziert N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolat zu N(5)-methyltetrahydrofolat. N(5)-methyltetrahydrofolat ist ein wichtiger Methylgruppendonor. Seine Methylgruppe wird auf Homocystein übertragen, das damit dann zu Methionin umgewandelt wird. MTHFR ist ein Flavoprotein und bindet FAD (Flavinadenindinucleotid). Die Reaktion von MTHFR ist FAD und NADPH (Nicotinamadenindinucleotidphosphat) abhängig.

Beim genetisch bedingten Enzymmangel lassen sich schwere und leichte Formen unterscheiden. Für den schweren MTHFR-Mangel, bei dem die restliche Enzymaktivität nur 0 - 20% beträgt, kennt man bisher neun Mutationen.¹⁴ Er tritt selten auf, ruft dann aber die schwerste Form der Homocysteinurie hervor.¹⁷ Große epidemiologische Bedeutung hat dagegen die thermolabile Variante der MTHFR, die erstmals von Kang et al. beschrieben wurde. 1995 wiesen Frosst et al.¹⁴ die dafür verantwortliche Punktmutation nach (C677T), durch die im Enzym die Aminosäure Alanin durch Valin ersetzt wird. Dieser in rezessivem Erbgang weitergegebene Gendefekt bewirkt eine Verminderung der Enzymaktivität um mehr als die Hälfte,¹⁷ was sich in moderat erhöhten Homocysteinwerten äußert. Mit einer Prävalenz in der Gesamtbevölkerung von 4 – 10 % soll er die häufigste genetisch bedingte Ursache der milden Hyperhomocysteinämie sein.³ Seine Verbreitung ist regional sehr unterschiedlich und schwankt zwischen 1,4 und 15 %.³ Kluijtmans et al.¹⁴ errechneten für homozygote Träger der thermolabilen MTHFR-Variante ein dreifach erhöhtes Risiko, bereits in jungen Jahren eine arteriosklerotische Gefäßerkrankung zu entwickeln.

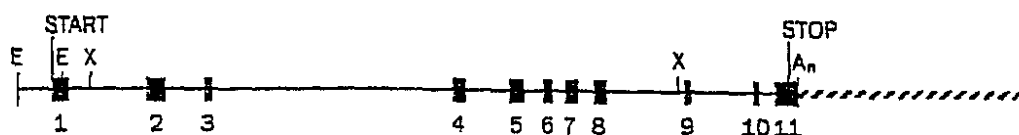


Abb. 1-4) MTHFR-Gen mit allen 11 Exonbereichen (P. Goyette et al.: Gene structure of human MTHFR)

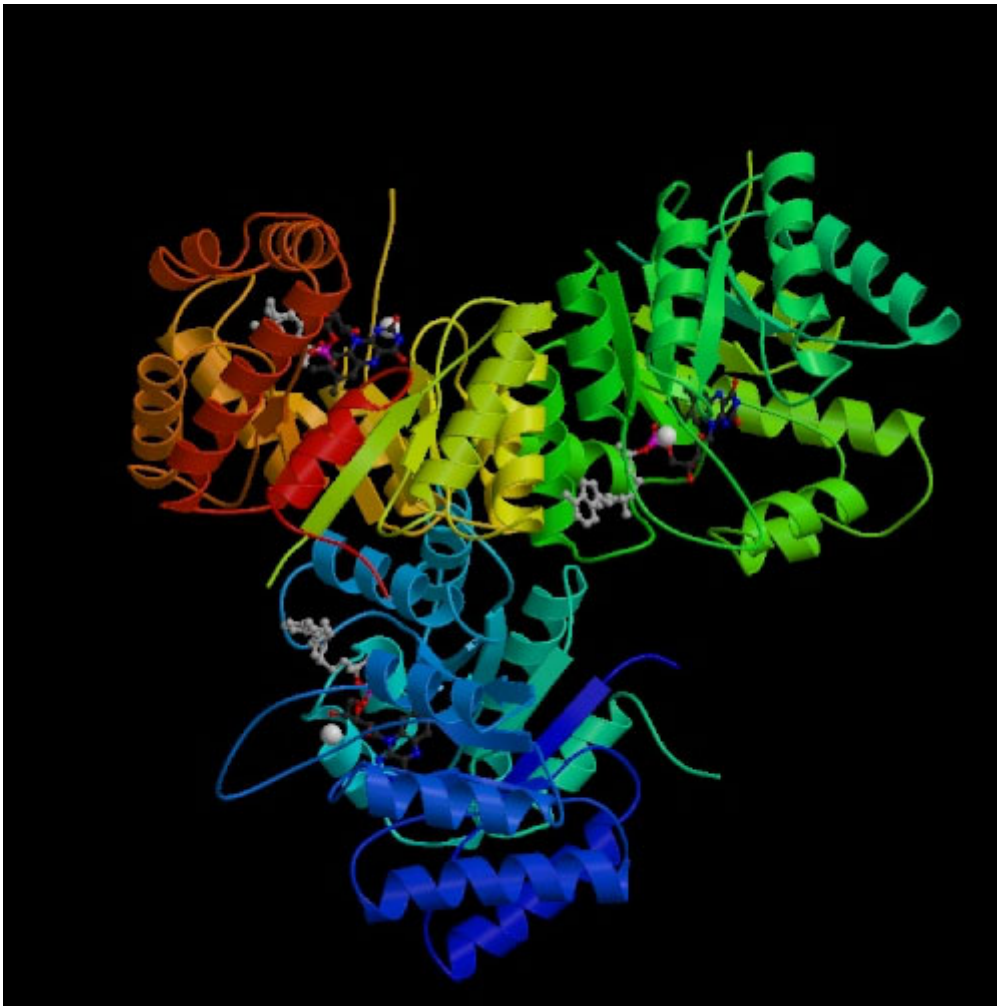


Abb. 1-5) Escherichia coli MTHFR: Tetramer besteht aus den drei Ketten A,B,C und die vierte Kette A' steht senkrecht zu der Kette A. ($\beta\alpha\alpha$ -Struktur)

1.5. Pathogene Wirkungen der Hyperhomocysteinämien

Während die pathogene Wirkung der schweren Hyperhomocysteinämien schon lange bekannt ist, hat die milde Form (13-25 $\mu\text{mol/l}$) erst in den letzten Jahren das Interesse des Kliniklers gefunden.

Sie kommt bei 5-7 % der Bevölkerung vor und ihre Auswirkungen treten erst in der 3. und 4. Lebensdekade in Erscheinung.¹⁸

Patienten mit der homozygoten Form der thermolabilen MTHFR haben signifikant erhöhte, Patienten mit der heterozygoten Form immerhin geringfügig oder mäßig erhöhte Homocysteinspiegel. Das Ausmaß der Hyperhomocysteinämien hängt dabei anscheinend auch stark von der Höhe des Spiegels an Folsäure ab.

Bei den schweren Hyperhomocysteinämien z.B. bei der klassischen Homocysteinurie kommt es aufgrund einer oder verschiedener Mutationen zu einem Mangel an Cystathionin- β -Synthase oder an Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) und somit zu einer Störung des Homocysteinestoffwechsels. Diese Defekte verhindern die Umwandlung von Homocystein zu Methionin oder Cystein. Folglich entstehen hier Hyperhomocysteinämien.

Die bei der Homocysteinurie stark erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Blut werden ursächlich für die sich bereits im Jugendalter entwickelnden kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen verantwortlich gemacht.

Klinisch wirkt sich die Homocysteinurie in einer schweren psychomotorischen und geistigen Retardierung, Linsenluxation, Myopie, Skelettveränderung, Störungen der Thrombozytenaggregation und Entwicklung einer „aggressiven“ Arteriosklerose aus.

Viel häufiger jedoch ist die milde und mittlere Hyperhomocysteinämie, die mit einer Häufigkeit von 0,4 – 1,5% vorkommt. Bereits leicht erhöhte Plasmakonzentrationen von Homocystein scheinen mit einem erhöhten Risiko an Thrombosen und kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen verbunden zu sein.

Homocysteinkonzentrationen über 15 $\mu\text{mol/l}$ werden bei 20 – 30 % der Patienten mit arteriosklerotischen Gefäßveränderungen festgestellt.

Eine milde Hyperhomocysteinämie ist sehr oft assoziiert mit erniedrigten Folsäurewerten im Serum oder in Erythrozyten, Vitamin B12-Mangel, Nierenfunktionsstörungen und einem Polymorphismus des MTHFR-Gens (C-677-T), der in Gegenwart eines erniedrigten Folatstatus zu einem Anstieg der Homocysteinkonzentration im Blut führt.

Ungefähr 12% der weißen Bevölkerung weisen eine Störung der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) auf. Im Gegensatz zum Wildtyp (keine Mutation) weisen Menschen, die homozygot für diese Mutation sind, eine im Durchschnitt um 3,5 $\mu\text{mol/l}$ erhöhte Plasmahomocysteinkonzentration auf.¹⁹

1.6. Klinische Bedeutung von Vitaminen im Homocysteinstoffwechsel

Im Stoffwechsel von Homocystein spielen die Vitamine Folsäure, B12 und B6 eine große Rolle (siehe Abb. 1-2). Selhub et al.²⁰ die Untersuchungen an 1160 Mitgliedern der Framingham-Studie durchführten, machten für zwei Drittel der gefundenen Hyperhomocysteinämiefälle einen Mangel an einen oder mehreren dieser Vitamine verantwortlich.

1.6.1. Folsäure

Die Folsäure ist für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin als Methylgruppendifferent notwendig. Auf die Homocysteinkonzentration im Blut hat sie unter den drei Vitaminen den stärksten Einfluß.^{21,20,22} Dabei scheinen die bisher als normal angesehenen Serumkonzentrationen bzw. die von der WHO empfohlene tägliche Einnahmemenge (RDA = recommended daily allowance) von 200 µg nicht auszureichen, um den Homocysteinspiegel im Normbereich zu halten.²⁰ In seiner Metaanalyse aus 27 Studien ermittelten Boushey et al.²¹ einen Tagesbedarf von 400 µg.

Hinsichtlich der Bedeutung des Vitamins Folsäure für die Hyperhomocysteinämie sind zwei Aspekte wichtig:

Erstens ist ein Mangel an diesen Raffinationsprozessen gegenüber empfindlichen Vitaminen in der Bevölkerung mit etwa 50 % sehr verbreitet, was dazu geführt hat, daß in Amerika Nahrungsmittel mit Folsäure angereichert werden, weil ein Folatmangel auch Neuralrohrdefekte bei Neugeborenen verursachen kann.^{21,23}

Zweitens gibt die Folsäure bei Vorliegen der thermolabilen Variante der MTHFR den Ausschlag, ob dieser Gendefekt phänotypisch überhaupt manifest wird. MTHFR-Homozygote, deren Folsäurespiegel hoch ist, haben trotz einer um 50 % verminderten Enzymaktivität normale Homocysteinwerte. Sie sind dafür allerdings auf eine höhere Folatzufuhr angewiesen als die Normalbevölkerung.²⁴

1.6.2. Vitamin B12

Vitamin B12 dient ebenfalls bei der Remethylierung als Cofaktor. Die Abhängigkeit der Homocysteinkonzentration vom Vitamin B12 Spiegel im Blut ist aber nicht so ausgeprägt wie die von der Folsäure.^{21,20,22}

Hauptursache eines Vitamin B12 Mangels ist die atrophische Gastritis und der damit verbundene Mangel an Intrinsic-Faktor, der für die Resorption von Vitamin B12 im Dünndarm nötig ist. Besonders ältere Menschen sind hiervon betroffen.

1.6.3. Vitamin B6

Vitamin B6 ist Cofaktor bei der Transsulfurierung, durch die Homocystein zu Cystein abgebaut wird. Seine Bedeutung für die klassische Homocysteinurie ist groß, da das Ansprechen auf Vitamin B6 –Substitution der entscheidende prognostische Faktor ist.

Bei der moderaten Hyperhomocysteinämie ist Vitamin B6 wohl nur für die postprandiale Form, die mit dem Methionin - Belastungstest nachgewiesen wird, wichtig.^{3,22}

Selhub et al.²⁰ fanden allerdings auch bei der Nüchtern –Hyperhomocysteinämie einen starken Einfluß von Vitamin B6.

Hier könnte es epidemiologisch wichtig sein, daß Nikotin ein Vitamin B6 Antagonist ist,⁶ und Rauchen deshalb zu erhöhten Homocysteinwerten beitragen könnte.

1.7. Die Therapie und Prophylaxe der Hyperhomocysteinämien

Die Behandlung erhöhter Homocysteinwerte spielt eine wichtige Rolle für die Entstehung und Progression der Arteriosklerose.

Die Therapie der Hyperhomocysteinämie gleich welcher Ursache erfolgt mit den Vitaminen Folsäure, B12 und B6. Bei den genetisch bedingten Enzymdefekten sollen durch die Gabe von Cofaktoren der Enzymmangel kompensiert bzw. durch Substitution von bestimmten Substanzen andere, Homocystein abbauende Stoffwechselwege aktiviert werden.

Die Behandlung der homozygot vererbten klassischen Homocysteinurie (CBS-Defekt) erfolgt deshalb mit Vitamin B6. Patienten mit der Vitamin B6 –refraktären Form der Homocysteinurie erhalten zusätzlich Betain und Folsäure und müssen außerdem methioninhaltige Lebensmittel meiden. Ob der heterozygot vererbte CBS-Defekt bzw. die PML-Hyperhomocysteinämie überhaupt therapiert werden müssen, ist noch unklar, empfohlen werden jedoch im Augenblick 100 mg Vitamin B6 als Tagesdosis.²²

Mit Folsäure können die Genträger der thermolabilen Variante der MTHFR und Dialysepatienten erfolgreich behandelt werden. Die derzeit üblichen Dosen liegen zwischen 400 µg²¹ und 5 mg^{4,10} pro Tag.

In einer plazebokontrollierten Studie zur Therapie der moderaten Hyperhomocysteinämie untersuchten Ubbink et al.,²² welche Wirkung die Vitamine Folsäure, B12 und B6 einzeln oder in Kombination auf die Homocysteinkonzentration im Blut haben. Sie substituierten dazu sechs Wochen lang je 20 hyperhomocysteinämische Personen mit täglich einer Tablette Plazebo, Folsäure (0,65 mg), Vitamin B12 (0,4 mg), Vitamin B6 (12,2 mg) oder einer Kombination aus allen drei Vitaminen. Es zeigte sich, daß die Kombinationstherapie die Homocysteinkonzentration am effektivsten (bei 50 % der Untersuchten) senkte. Die Einnahme von Folsäure allein war aber fast ebenso wirksam (Senkung bei 42 %), während die Monotherapie mit Vitamin B12 oder B6 nur wenig oder keinen Einfluß auf den Plasmaspiegel von Homocystein hatte.

Die Autoren raten deshalb für die Behandlung der moderaten Hyperhomocysteinämie zu einer Kombinationstherapie von Folsäure und Vitamin B12, wobei das Vitamin Folsäure die homocysteinwirksame Substanz ist, während Vitamin B12 wegen seiner Wechselwirkungen mit dem Folathaushalt gegeben wird.

So ist einerseits Vitamin B12 notwendig, um die Folsäure in ihre wirksame Form Tetrahydrofolsäure umzuwandeln, weswegen ein Vitamin B12-Mangel zu einem sekundären Folsäuremangel führt.

Andererseits birgt die isolierte Folatsubstitution die Gefahr, daß die hämatologische Manifestation eines Vitamin B12-Mangels (perniziöse Anämie) verschleiert und dieser in der Folge nicht erkannt wird.

Als Tagesdosis werden von Ubbink et al.²² 650 µg Folat (3,25fache RDA) und 400 µg Vitamin B12 (200fache RDA) – eine Dosis, die einen Mangel an Intrinsic-Faktor kompensiert - empfohlen.

Die Normalisierung der Homocysteinwerte nach Beginn der Substitutionstherapie erfolgt rasch. Ubbink et al.²² substituierten ihre Probanden sechs Wochen lang.

Es ist aber zu bedenken, daß Vitamin B12 ein „Speichervitamin“ ist, dessen Mangel zwar erst spät manifest wird, dann aber auf eine schwerwiegende Verarmung des Körpers an diesem Stoff hinweist. Bei einem Vitamin B12 – Defizit ist also über einen längeren Zeitraum zu substituieren.

Ist ein Gendefekt Ursache der Hyperhomocysteinämie müssen die Vitamine lebenslang eingenommen werden, um die Homocysteinkonzentration im Normbereich zu halten.

Das wichtigste Vitamin für die Prophylaxe der Hyperhomocysteinämie in der Allgemeinbevölkerung ist die Folsäure. 1996 wurde auch ein von Homocystein unabhängiger Zusammenhang zwischen Folatmangel und KHK-Mortalität festgestellt,²³ was die epidemiologische Bedeutung einer ausreichenden Versorgung der Bevölkerung mit diesem Vitamin bestätigt.

Es gibt drei Ansatzpunkte, wie einem Folsäuredefizit vorgebeugt werden kann:

Eine Möglichkeit ist die Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Folsäure, wie sie in den USA schon praktiziert wird.^{21,6,23} Die Folataufnahme wird dadurch um maximal 100 µg pro Tag gesteigert,²⁶ was einem Viertel der benötigten Menge entspricht (vgl. 1.5.1).

Desweiteren können Vitamine als Tabletten in kalkulierbarer Dosis und optimal resorbierbarer Darreichungsform zugeführt werden.

Natürlich kann die Folsäureaufnahme auch durch bestimmte Nahrungsmittel gesteigert werden. Wichtig sind dabei frisches Obst und Gemüse, da das Vitamin hitzeempfindlich ist und bei der Aufbereitung vieler Lebensmittel zerstört wird.⁶ Boushey et al.²¹ kamen beim Vergleich dieser drei Möglichkeiten zu dem Schluß, daß die Anreicherung von Lebensmitteln mit Folsäure die potenziell größte Wirkung hat, weil damit die gesamte Bevölkerung erreicht werden kann.

Die Prophylaxe und Therapie der Hyperhomocysteinämie mit Vitaminen ist billig und nebenwirkungsarm. Es fehlt allerdings noch der Nachweis, daß die damit erreichte Senkung des Homocysteinspiegels das Risiko, eine Arteriosklerose zu entwickeln, tatsächlich vermindert.

2. Problemstellung und Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren haben mehrere große Studien wie z.B. die Physicians Health Study²⁷ (1992) und das European Concerted Action Project (1997) den Zusammenhang zwischen moderat erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Blut und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen belegt. Sie haben zudem gezeigt, daß der Einfluß von Homocystein unabhängig von dem anderer Risikofaktoren ist. Eine Hyperhomocysteinämie soll für fast 10 % der Fälle koronarer Herzkrankheit verantwortlich sein.²⁷

Die Homocysteinbestimmung hat nun in die diagnostischen Maßnahmen, die bei Verdacht auf Arteriosklerose durchgeführt werden, Eingang gefunden.

Mit der Zielsetzung, ein zuverlässiges und standardisiertes Verfahren für die Routinediagnostik bereitzustellen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Homocystein im Blut etabliert.

Es folgte weiterhin ein Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA. Dieser Enzymimmunoassay wird ebenfalls zur quantitativen Bestimmung von Homocystein im Blut eingesetzt.

Die wichtigste Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Suche nach neuen genetischen Mutationen auf dem MTHFR-Gen mittels Probenscreening von Patienten mit Hyperhomocysteinämien. Die katalytische Domäne der MTHFR liegt im N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser Bereich entspricht Exon 1 bis Exon 6 des MTHFR-Gens.

Anhand von 300 Proben aus der LURIC-Studie wurde für jeden Exonbereich das Mutationsscreening durchgeführt. LURIC steht für **L**Udwigshafener **R**isikofaktor- und **C**ardiovaskuläre Gesundheits-Studie.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist das Erkennen neuer Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere solchen die zum Herzinfarkt führen. Das Screening erfolgte mit Hilfe der PCR, der Restriktionsanalyse und der Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE). Die TGGE ist eine Methode, mit der unbekannte Punktmutationen nachgewiesen werden können. Sie wurde zunächst anhand der zwei schon bekannten Mutationen an den cDNA-Positionen [C-677-T] auf Exon 4 und an [A-1298-C] auf Exon 7 etabliert. Diese beiden Mutationen treten sehr häufig auf und haben klinische Auswirkungen. Danach wurde diese Methode auch auf unbekannte Mutationen angewandt.

Falls eine neue Mutation gefunden werden sollte, war die nächste Aufgabe, eine Familienanamnese durchzuführen und die gefundene Mutation mit der gemessenen MTHFR-Aktivität zu bestätigen.

3. Material

3.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
100 bp DNA Längenstandard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Agarose, Ultra Pure	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Ammoniumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Amylalkohol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethyldichlorosilan Lösung	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Essigsäure, 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd, 37%	Merck, Darmstadt
Glycerol, Ultra Pure	ICN Biomedicals, Eschwege
Harnstoff	Applichem, Darmstadt
HPLC-grade methanol	Fisher Scientific
HPLC-grade water	Millipore, Bedford MA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Homocystin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Monobrombiman	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N,N'-Methylenbisacrylamid	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Na ₂ EDTA (2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plättchen	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Perchlorsäure	Fisher Scientific
PBS, 1x	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Tris	US Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA
Triton X-100	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Tween 20 (Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.2. Puffer und Medien

Puffer	Herstellung
10x TBE-Puffer	0,9 M Tris Borsäure 0,02 M EDTA 108 g Tris, 55 g Borsäure und 9,3 g Na ₂ EDTA (2H ₂ O) auf 1 l ddH ₂ O auffüllen, pH 8,3
50x TAE-Puffer	2 M Tris-acetat 0,1 M EDTA 242 g Tris und 37,3 g Na ₂ EDTA (2H ₂ O) in 900 ml ddH ₂ O lösen, 57,1 ml Essigsäure zugeben und auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 8,5 einstellen. Lagerung bei RT.
Diffusions-Puffer	0,5 M Natriumacetat 10 mM Magnesiumacetat 1 mM EDTA pH 8.0 0,1% SDS 8,2 g Natriumacetat/100 ml (1M), 2,45 g Magnesiumacetat/100 ml (10 mM) und 0,372 g EDTA/100 ml (10 mM) separat ansetzen und autoklavieren. 50 ml 1 M Natriumacetat, 10 ml 100 mM Magnesiumacetat, 10 ml 10 mM EDTA und 1 ml 10 % SDS (28,8 g/l) auf 100 ml ddH ₂ O auffüllen
50x ME-Puffer	1 M MOPS 50 mM EDTA pH 8.0 52,3 g MOPS, 4,65 g Na ₂ EDTA (2H ₂ O), 9 g NaOH auf 250 ml mit ddH ₂ O auffüllen, filtrieren.
Acrylamid Stock (30:0,5)	60 g Acrylamid und 1g N,N'-Methylenbisacrylamid auf 200 ml mit ddH ₂ O auffüllen
DR-Puffer	8 M Harnstoff 400mM MOPS 20 mM EDTA pH 8.0 0,01 % Bromphenolblau 0,01 % Xylencyanol 4,8 g Harnstoff in 4 ml 50x ME-Puffer und 2 ml ddH ₂ O lösen, mit 0,1 % Farbstofflösung und restlichem ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen.

Puffer	Herstellung
Farbmarker (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Sucrose (w/v) 4 g Sucrose, 2,5 mg Bromphenolblau und 2,5 mg Xylencyanol in 6 ml ddH ₂ O lösen und auf 10 ml mit ddH ₂ O auffüllen. Lagerung bei +4°C
10x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl pH 8.3 3,73 g KCl, 1,21 g Tris in 100 ml ddH ₂ O lösen, pH 8.3 einstellen, autoklavieren. Lagerung bei +4°C.
25 mM MgCl ₂	1,19 g MgCl ₂ in 500 ml ddH ₂ O lösen, Autoklavieren. Lagerung bei +4°C
Detergens-Puffer	50 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl pH 8.3 0,45 % Tween 20 0,45 % Nonidet P-40 3,73 g Kaliumchlorid, 0,24 g MgCl ₂ und 1,21 g Tris in 990 ml ddH ₂ O lösen, pH 8.3 einstellen, autoklavieren. 4,5 ml Tween 20 und 4,5 ml Nonidet P-40 zugeben. Lagerung bei +4°C.
10 % (w/v) APS	1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH ₂ O lösen. Alle 3 Tage frisch ansetzen.
40 % (v/v) Glycerol	40 ml Glycerol (99 %) in 60 ml ddH ₂ O lösen, autoklavieren
0,1 % (v/v) Triton	100 µl Triton X-100 in 100 ml ddH ₂ O lösen

3.3. Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Hersteller
Axis Homocystein EIA Kit	Axis Biochemicals ASA, Soltau
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
QIAamp Blood Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick tm Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Beverly, USA Boehringer Mannheim, Mannheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonuklease T ₁	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.4. Geräte und Software

Geräte und Software	Hersteller
Hewlett Packard 1050 HPLC	Hewlett Packard
Perkin Elmer 650-40 Fluorescence Spectrophotometer	Perkin Elmer
Perkin Elmer 150 Xenon Power Supply	Perkin Elmer
PCR Cycler Polychain II	Polygen, Langen
Peq Lab Biotechnologie GmbH, Cyclone 25	Peq Lab Biotechnologie
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf
Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese	QIAGEN GmbH, Hilden
Ultrazentrifuge Typ L8-70	Beckman Coulter, Kr
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
DNA Strider TM 1.0.1	Copyright by Christian Marck, Service de Biochemie – Departement de Biologie, Institut de Recherche Fondamentale, Commissariat a l'Energie Atomique – Frankreich
OLIGO Primer Analysis Software	Copyright 1992 Wojciech Rychlik, published by National Biosciences, Inc., Plymouth, MN, USA
POLAND Software	Copyright 1994 G.Steger

4. Methoden

4.1. Proteinchemischer Teil (Teil A)

4.1.1. H P L C

Die quantitativen Messungen von Homocystein wurden mit einer Hewlett Packard 1050 HPLC-Anlage durchgeführt. Die HPLC-Säule war eine C18-Reversed-Phase-Säule (Bischoff Chromatographiesäule RP-18 Waters-Spherisorb ODS2; 4,6 mm x 250mm; 5 µm-Partikel) und war 25 cm lang. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Perkin Elmer 650-40 Fluorescence Spectrophotometer bei einer Extinktionswellenlänge von 392nm und einer Emissionswellenlänge von 482nm gemessen. Die Peaks wurden mit einem Hewlett Packard Schreiber aufgezeichnet.

Eluent A war ein Essigsäurepuffer mit Methanolanteil (pH 3,4). Er bestand aus einem Verhältnis von Wasser : Methanol : Essigsäure (94,75 : 5,00 : 0,25). Der pH von 3,4 wurde mit 5,0 mol/L NaOH eingestellt. Eluent B war ein reiner (100%) Methanolpuffer. Vor jeder Messung wurden beide Fließmittel mit Helium entgast.

Das Gradientenprogramm begann mit 100 % Eluent A, reduzierte diesen in einigen Schritten auf 0 % Eluent A und kehrte innerhalb von 15 Minuten wieder zu 100 % Eluent A und 0 % Eluent B zurück.

Die Programmierung für die Eluenten setzte sich wie folgt zusammen:

0-1 min 0% B; 1-3 min 0-10% B; 3-9 min 10-15 % B; 9-10 min 15-100% B; 10-11 min 100 % B; 11-12 min 100-0% B; and 12-15 min 0 % B.

Es wurden jeweils 20 µl von der Standardlösung oder von der Probenlösung mit einer Hamiltonspritze manuell eingespritzt.

Die Flußrate betrug 1,0 ml/ min und die Laufzeit 20 Minuten.

4.1.1.1. Proben

Die Proben erhielten wir aus dem Nordwestkrankenhaus (Prof. Thomas) in Frankfurt.

Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen, möglichst schnell auf Eis gelegt und innerhalb einer Stunde bei 4000 U/min mit einer Heraeus-Zentrifuge 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde sofort abpipettiert und bei -70°C eingefroren.

4.1.1.2. Aufarbeitung von Homocysteinstandardwerten (nach Jacobsen)³⁰

Zuerst wurde mit dem Reduzierungsmittel Natriumborhydrid Homocystein in zwei Homocysteine gespalten und das noch an Albumin gebundene Homocystein freigesetzt. Nun konnte das freie Homocystein der Messung zugänglich gemacht werden.

In der zweiten Reaktion, der Derivatisierungsreaktion, erfolgte die Umsetzung des Homocysteins mittels Monobrombiman in ein fluoreszierendes Produkt.

4.1.1.3. Darstellung von L-Homocystein-S-biman aus L-Homocystin (nach Jacobsen)³⁰

0,2 ml von 0,25 mmol/L L-Homocystin in 1,00 mmol/L Natrium-EDTA (pH 7,0) wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 0,10 mL von 2,00 mmol/L Monobrombiman in 1,00 mmol/L Natrium-EDTA (pH 7,0), 0,70 mL von 14,3 mmol/L Ammoniumbicarbonat, welches 1,43 mmol/L Natrium-EDTA (pH 8) enthält und 0,05 mL von 0,26 mol/L Natriumborhydrid in 0,05 mol/L Tris-HCL (pH 8,5) inkubiert.

Um überschüssiges Monobrombiman zu entfernen, wurde 5,0 mmol/L Natrium-EDTA (pH 6) zugefügt und 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Der Überstand, der L-Homocysteinbiman enthielt, wurde mit 0,10 mL 1,74 mol/L Essigsäure angesäuert und bei – 20°C eingefroren oder sofort weiterbearbeitet.

Es wurden Standardwerte von 62,5 µmol/L, 125 µmol/L und 250 µmol/L Homocystein hergestellt und daraus eine Eichkurve berechnet.

4.1.1.4. Aufarbeitung von Homocysteinprobenwerten (nach Jacobsen)³⁰

Die Serumproben wurden mit 10 µl Wasser und 5 µl Amylalkohol versetzt und danach gut geschüttelt.

Natriumborhydrid (35 µl von 1,43 mol/L Reagenz in 0,10 mol/L Natriumhydroxid) wurde jedem Probenröhrchen zugefügt und gut gemischt.

Nachdem Salzsäure (35 µL von 1,0 mol/L) zugefügt und die Proben erneut gemischt worden sind, fügten wir 50 µl von 10,0 mmol/L Monobrombiman in 4,0 mmol/L Natrium-EDTA (pH 7) hinzu.

Die Röhrchen wurden verschlossen, gemischt und auf 42°C erhitzt für 12 Minuten.

Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt worden sind, wurde 50 µl von 1,5 mol/L Perchlorsäure zugefügt, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

Zuerst wurden die ausgefällten Proteine (weißer Niederschlag) abzentrifugiert, danach wurde der saure klare Überstand auf pH 4 mit 25 µl von 2,00 mol/L Tris eingestellt. Nach kurzem Mischen und erneutem Zentrifugieren konnte nun gemessen werden.

4.1.2. Homocystein E L I S A

4.1.2.1. Durchführung

Der Axis Homocystein Test³¹ ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Homocysteins im Blut. Der Axis Homocystein Test mißt nur das L-Homocystein und nicht das D-Homocystein. Alle Proteine des menschlichen Körpers sind aus L-Aminosäuren aufgebaut.

In einem dem Immunoassay vorgeschalteten Schritt wird zunächst das proteingebundene Homocystein zum freien Homocystein reduziert und enzymatisch zum S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgesetzt. Das Enzym ist spezifisch für die im Blut vorkommende L-Form des Homocysteins (siehe Abb. 4-1).

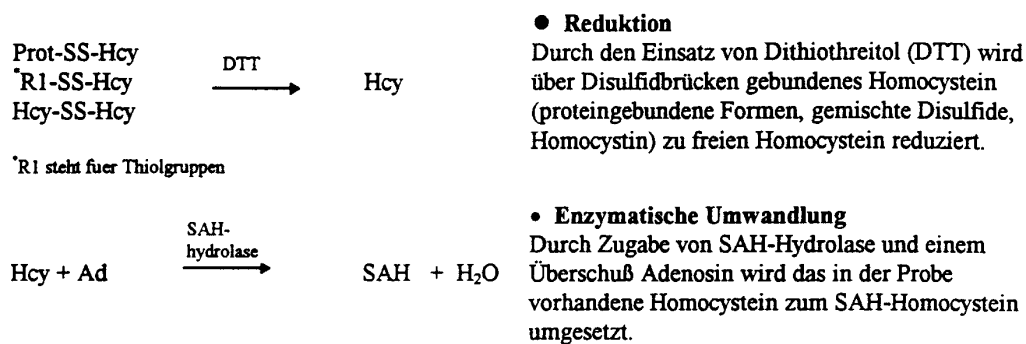


Abb. 4-1) Der Axis Homocystein Test in zwei Schritten

Im anschließenden Solid-Phase Enzymimmunoassay konkurrieren das SAH aus der Probe und an der Mikrotiterplatte gebundenes SAH um die Bindungsstellen eines monoklonalen anti-SAH-Antikörpers. Nach Entfernen des überschüssigen anti-SAH-Antikörpers wird ein zweiter mit Meerettichperoxidase (HRP) markierter Kaninchen-anti Maus-Antikörper hinzugegeben.

Die Peroxidaseaktivität wird nach der Substratzugabe spektrophotometrisch bestimmt. Die gemessene Absorption ist umgekehrt proportional zur Homocysteinkonzentration in der Probe.

4.1.2.2. Probengewinnung

Es wird empfohlen EDTA-Plasma für die Blutabnahme zu verwenden. Citrat-Plasma oder Serumproben (Gel-Röhrchen) können ebenfalls eingesetzt werden. Fluorid Plasma kann falsch niedrige Werte hervorrufen und sollte deshalb nicht verwendet werden. In den roten Blutkörperchen findet auch nach der Probennahme noch eine Synthese von Homocystein statt. Es ist daher wichtig, Plasma und Serum innerhalb von einer Stunde abzutrennen. Bis zur Abtrennung sollte die Probe gekühlt gelagert werden. Die Aufnahme proteinreicher Nahrung kann zu erhöhten Homocysteinwerten führen und sollte den Abend vor dem Tag der Probennahme vermieden werden. Eine sorgfältige und standardisierte Probennahme ist aufgrund der obengenannten Faktoren von entscheidender Bedeutung für die Analytik. Aufgetaute Proben müssen vor dem Testansatz sorgfältig gemischt werden. Proben sind im Kühlschrank zwei Monate und bei -20°C mehrere Jahre stabil.

4.1.2.3. Probenvorbereitung³¹

- Herstellen der Probenvorbereitungslösung für 10 Proben
Die Probenvorbereitungslösung muß unmittelbar vor Testbeginn jeweils frisch angesetzt werden:
4,5 ml Reagenz A (braun), 0,25 ml Reagenz B (weiss) und 0,25ml Reagenz C (weiss) mischen.
- Kalibrator, Proben und Kontrollen in Plastikröhrchen wie folgt verdünnen:
25 μl Kalibrator/Probe/Kontrolle + 500 μl Probenvorbereitungslösung sorgfältig mischen
30 Minuten bei 37°C inkubieren. Während der Inkubation die Röhrchen verschließen oder mit Paraffin abdecken. Ohne Abkühlen der Proben sofort mit Schritt 3 fortfahren.
- 500 μl Reagenz D (orange) zugeben. Sorgfältig mischen. 15 Minuten bei $18-25^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
- 500 μl Reagenz E (rot) zugeben. Sorgfältig mischen. 5 Minuten bei $18-25^{\circ}\text{C}$ inkubieren.

4.1.2.4. Enzymimmunoassay³¹

- 25 μl der verdünnten Kalibratoren, Proben und Kontrollen aus Schritt 4 in die Mikrotiterstreifenvertiefungen pipettieren.
- 200 μl Reagenz F (grün) in jede Vertiefung pipettieren. 30 Minuten bei $18-25^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
- Mit 3 x 400 μl verdünnten Waschpuffer waschen.
- 100 μl Reagenz G (blau) in jede Vertiefung pipettieren. 20 Minuten bei $18 - 25^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
- Mit 3 x 400 μl verdünnten Waschpuffer waschen.
- 100 μl Reagenz H (Violett) in jede Vertiefung pipettieren. 10 Minuten bei $18 - 25^{\circ}\text{C}$ inkubieren.
- 100 μl Reagenz S (Gelb) in jede Vertiefung pipettieren.
- Mikrotiterplatte schütteln und innerhalb von 15 Minuten bei 450nm photometrisch messen.

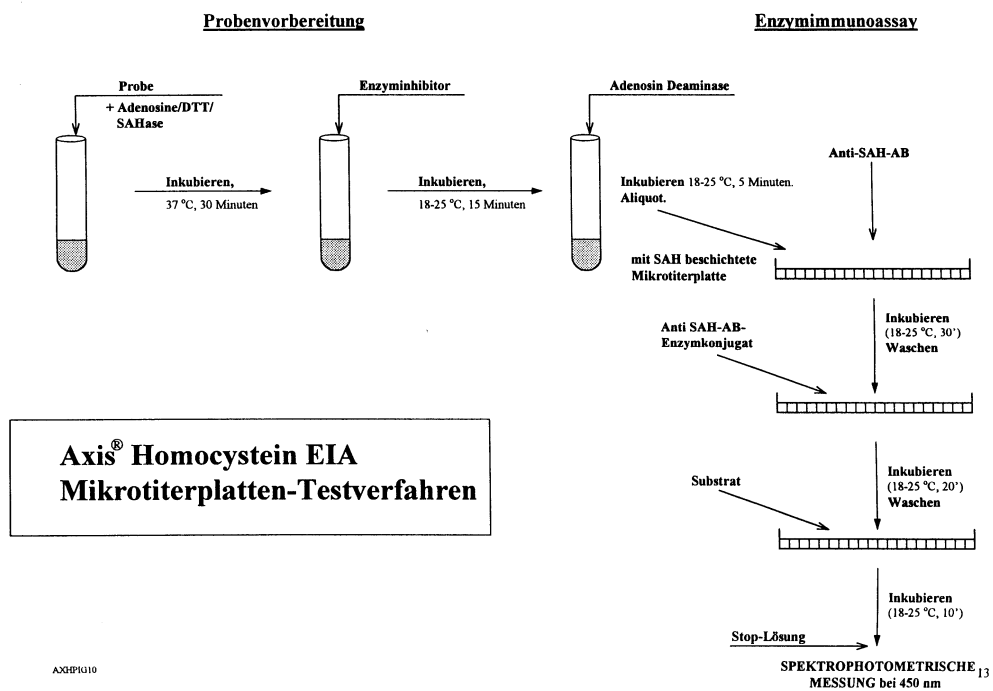


Abb. 4-2) Axis Homocystein ELISA Test

4 Testkomponenten

Axis® Homocystein EIA				AXH00001
Produkt-bezeichnung	Farbcode	Inhalt	Format	Volumen
Reagenz A Assay Puffer	Braun	Phosphatpuffer, 0.09% NaN ₃	Gebrauchsfertig.	54 mL
Reagenz B Adenosin/DTT	Weiss	Adenosin, Dithiothreitol, Zitronensäure.	Gebrauchsfertig.	3,5 mL
Reagenz C SAH-Hydrolase	Weiss	Rinder S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase, Tris-Puffer/Glycerin, Methylparaben.	Gebrauchsfertig.	3,5 mL
Reagenz D Enzyminhibitor	Orange	0,15% Merthiolat in Phosphatpuffer.	Gebrauchsfertig. Dunkle Flasche.	55 mL
Reagenz E Adenosine deaminase	Rot	Adenosine Deaminase, Phosphatpuffer, BSA, 0.09% NaN ₃ , Phenolfarbstoff-rot.	Gebrauchsfertig. Rot gefärbt.	55 mL
Reagenz F Primärantikörper	Grün	Monoklonaler Maus-anti-S-Adenosyl-Homocystein Antikörper, 0.01% Merthiolat.	Gebrauchsfertig.	25 mL
Reagenz G Enzymkonjugat	Blau	Anti-Maus-Antikörper Enzymkonjugat, Meerrettichperoxidase, BSA, Konservierungsmittel, blauer Farbstoff.	Gebrauchsfertig. Blau gefärbt.	15 mL
Reagenz H Substratlösung	Violett	TMB+ (Tetramethylbenzidin).	Gebrauchsfertig. Dunkle Flasche.	15 mL
Reagenz S Stop-Lösung	Gelb	0,8 M Schwefelsäure.	Gebrauchsfertig.	20 mL
Waschpuffer	Schwarz	Phosphatpuffer, Tween 20, BSA, 0.01% Merthiolat.	10fach konzentriert. Vor Gebrauch 1:10 verdünnen.	60 mL
Kalibratoren	Weiss	S-Adenosyl-Homocystein 2 - 4 - 8 - 15 - 30 - 50 µmol/L in Assay Puffer.	Gebrauchsfertig.	6 x 1.5 mL
Mikrotiter-streifen		Mit S-Adenosylhomocystein beschichtet.	Gebrauchsfertig.	12 x 8 Vertiefungen

Axis® Homocystein EIA Kontrollen			AXH00101
Kontrollen	Verdünnte Serumproben humanen Ursprungs, Phosphatpuffer, 0.09% NaN ₃ , 3 Konzentrationsber.: niedrig, mittel, hoch	Gebrauchsfertig	3 x 1.5 mL

Axis® Homocystein EIA Waschpuffer			AXH00102
Waschpuffer	Phosphatpuffer, Tween 20, BSA, 0.01% Merthiolat	10 fach konzentriert. Vor Gebrauch 1:10 verdünnen	1000 mL

Abb. 4-3) Testkomponenten für Axis Homocystein ELISA Test

4.2. Molekularbiologischer Teil (Teil B)

Nach Etablierung der Methode auf der TGGE werden erst die zwei bekannten Mutationen auf Exon 4 (C-677-T) und auf Exon 7 (A-1298-C) nachgewiesen. Erst als diese schon bekannten Mutationen eindeutig zu identifizieren und sicher nachzuweisen waren, wurde nach neuen Mutationen gesucht. Da die katalytische Domäne des Enzyms zwischen Exon 1 und Exon 6 liegt, ist dieser für das Mutationsscreening der in Frage kommende Untersuchungsbereich.

Für jedes Exon wurden nun Primer entwickelt, die entsprechende PCR etabliert und der Nachweis mit der TGGE durchgeführt. Alle sechs Exonbereiche werden nun über drei Kollektive an jedem Probanden gemessen; das ergibt 1800 Probenwerte.

Die Probenwerte lassen sich nun aufgrund unterschiedlicher Homocystein- und Folsäurewerte in drei Kollektive einteilen.

4.2.1. Auswahl der Patientenproben

302 Personen mit unterschiedlich hohen Homocystein- und Folsäurewerten wurden in drei Kollektive eingeteilt. Die Personen wurden aus der Luric-Studie (Dr. Winkelmann) aus einem gesamten Probenkollektiv von 1500 Patienten ausgewählt. Die Auswahl wurde ausschließlich bezüglich der Homocystein- und Folsäurewerte getroffen. Weitere Angaben wie Alter, Geschlecht, KHK-Status, Hypertonie, Diabetes, Rauchverhalten, Vitamin B6 und Vitamin B12 Werte wurden genannt, blieben aber für die Auswahl der Kollektive unberücksichtigt. Das Kollektiv bestand aus 122 weiblichen und 180 männlichen Patienten.

4.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt einen dreistufigen enzymatisch gesteuerten thermischen Prozess dar, der zyklisch ($n < 40$) wiederholt wird. Der erste Reaktionsschritt besteht aus einem thermischen Schmelzen der doppelsträngigen DNA in zwei DNA-Einzelstränge (Denaturierung). Bei dieser Methode wird mit einer Temperatur von ca. 94°C gearbeitet. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, so daß für zwei sich im Reaktionsgemisch befindliche Oligonukleotide (Primer) stringente Hybridisierungsbedingungen herrschen (Annealing). Die Länge der Oligonukleotide sollte sich zwischen 15 und 30 bp bewegen. Die Schmelztemperatur, die der Annealingtemperatur entspricht, läßt sich anhand folgender Formeln in °C berechnen:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log [J^{+}]) + 0,41 (\text{Fraktion G} + \text{C}) - 600/L$$

$[J^{+}]$ = Konzentration von monovalenten Kationen (meist 50-60 mM)

L = Länge der Primer

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{Fraktion G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{Fraktion A} + \text{T})$$

Die Annealingtemperatur beträgt bei dieser Arbeit 59°C.

Der abschließende Reaktionsschritt, bei dem unter Verwendung einer Polymerase aus den einzelsträngigen DNA's doppelsträngige DNA produziert wird, bezeichnet man als Elongation oder Extension. Es wurde hier bei einer Temperatur von 72°C gearbeitet.

4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Für ein 1,5 %iges Standard-Gel wurde die Agarose mit 300ml 1x TBE-Pufferlösung im Mikrowellenofen bis zum Auflösen aufgekocht. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie mit 0,5 µg/ml Ethiumbromid versetzt und blasenfrei in ein mit einem Probestaschenkamm versehenen und zuvor durch Klebestreifen abgedichteten Elektrophoresetray gegossen.

Um ein gleichmäßiges Auspolymerisieren der Agarose zu gewährleisten, wurde das Gel 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann noch mal für 10 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Die PCR-Produkte wurden vor dem Beladen der Auftragstaschen mit Auftragspuffer (20%) versetzt. Pro Gelelektrophorese wurde zur Längenbestimmung der PCR-Produkte ein 100 bp bzw. 123 bp Längenstandard aufgetragen. In Abhängigkeit zur Gelgröße wurden die Proben bei einer Stromspannung von 80 V –120V innerhalb von zwei Stunden aufgetrennt. Mit Hilfe einer UV-Handlampe (312nm) konnte der Lauf der DNA während der Elektrophorese durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethiumbromids verfolgt werden.

4.2.4. Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese

Erstellen von Schmelzkurven doppelsträngiger DNA

Für die Mutationsanalyse in Temperatur Gradienten Gelen eignen sich ausschließlich DNA-Fragmente mit reversibler Schmelzeigenschaft. Inwieweit ein Stück doppelsträngiger DNA (oder RNA) beim Erhitzen reversibel denaturiert, ist abhängig von der Anzahl und Beschaffenheit partieller Schmelzdomänen des Fragments. Diese lassen sich an Hand der Basenzusammensetzung der Nukleinsäure theoretisch kalkulieren und in einem Schmelzdiagramm graphisch darstellen. Die Entwicklung einer hierfür geeigneten Software (Poland) geht auf Gerhard Steger, Abteilung Biophysik der Universität Düsseldorf, zurück (Steger 1994). Poland ist ein Anwendungsprogramm basierend auf den von D. Poland erstellten Algorithmen zur thermischen Denaturierung doppelsträngiger Nukleinsäuren (Poland 1974).

Hiermit wurden optimierte DNA Fragmente konstruiert, deren Längen zwischen 200 und 500 bp lagen, und die über mindestens zwei separate Schmelzdomänen verfügten. Sequenzen, die per se keine deutliche Partiiellierung in mehrere Denaturierungsbereiche zeigten, wurden durch eine über PCR angefügte GC-reiche Nukleotidsequenz von 20 bp stabilisiert. (s.a. Primersequenzen im Ergebnisteil). Der GC-Überhang an einem der beiden Enden des TGGE-Fragmentes stellt eine künstliche Domäne mit hoher Schmelztemperatur dar, die bewirkt, daß andere Bereiche zu einem früheren Zeitpunkt denaturieren. Der Doppelstrang wird währenddessen an dem GC-reichen 5 oder 3 Ende noch zusammengehalten; dadurch ist der Denaturierungsprozess reversibel. Das theoretisch kalkulierte Schmelzverhalten wurde an Hand einer senkrechten Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese anschließend experimentell überprüft.²⁸

4.2.5. TGGE PCRs

Die MTHFR cDNA wurde im Bereich von Exon 1 bis Exon 6 in sechs Einzelreaktionen unter Verwendung überlappender Primerpaare amplifiziert. Die Primersequenzen und deren Positionen sind in Tab. 5.4. angegeben. Die Primer für Exon 4 wurden in ihrer Originalsequenz aus einer bekannten Arbeit übernommen.

Das Design aller übrigen Primer erfolgte mit Hilfe einer Software (OLIGO Primer Analysis Software, Copyright 1992 Wojciech Rychlik, published by National Biosciences, Inc. Plymouth, MN, USA). Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg D) synthetisiert, über HPLC gereinigt und in lyophilisierter Form bezogen. Vor der Erstverwendung wurden sie in einer Stammkonzentration von 100pmol/μl in sterilem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Die PCR-Reaktionen hatten ein Gesamtvolumen von 50 μl, darin enthalten waren: 0,3-0,5 μg genomische DNA, 60 pM Oligonukleotid Primer, 50mM KCL, 10mM Tris-HCL, pH 8,3 , 1,5mM Mgcl₂, 25 % Detergens-Puffer (50 mM KCL, 2,5 mM Mgcl₂, 10mM Tris-HCL pH 8,3, 0,45% Tween 20, 0,45% Nonidet P-40), 200 μM je dNTP und 1,5 Units Taq DNA -Polymerase (Amersham Pharmacia, Freiburg, D). Die PCR-Bedingungen variierten je nach Temperatur-Optimum des betreffenden Primerpaares. Folgende Temperatur-Zyklen wurden verwendet:

PCR Fragment	Exonbereiche 1,2,3,4,5,6
Denaturieren	94°C, 1 Min
Primer-Hybridisierung	59°C, 1 Min
Extension	72°C, 3 Min
Anzahl der Zyklen	30

Alle PCR Reaktionen wurden durch Hot Start (95°C, 3 Minuten) initiiert und anschließend wurde bei 80°C die Taq DNA-Polymerase zugegeben. Der letzte Extensionsschritt jeder PCR wurde um 10 Minuten verlängert. Generell wurde eine Negativ-Kontrolle als Kontaminationstest bei den Amplifikationen mitgeführt.²⁸

4.2.6. TGGE-Apparatur und Polyacrylamidgele

Für die Temperatur Gradienten Gele wurde die Apparatur der Firma Qiagen (Hilden, D) benutzt. Es handelt sich dabei um eine Flachbett-Elektrophoresekammer mit zwei angeschlossenen unabhängigen Wasserheizbädern. Die Gele wurden auf Trägerfolien gegossen. (210x213 mm Gelbond PAG Film, FMC Corporation, USA), die über eine dünne Schicht von 0,1% Triton mit der Heizplatte in Kontakt waren. Die Überbrückung zu den Pufferkammern mit 1xME-Puffer (20mM Mops, 1mM EDTA, pH 8.0) fand mit einer Doppellage Filzstoff statt. Die Gele wurden zusätzlich mit einer Lage Saran-Verpackungsfolie gegen Evaporation geschützt.

45 ml einer 8 %igen Polyacrylamidgellösung (8 M Harnstoff) wurden in folgender Zusammensetzung hergestellt: 80 g/l Acrylamid mit einem Acrylamid: N,N- Methylenebisacrylamid Verhältnis von 30: 0,5, 480g/l Harnstoff, 20 mM Mops pH 8,0, 1mM EDTA, und 20g/l Glycerol. Als Polymerisationsstarter wurden 136µl APS (10 %) und 75µl Temed verwendet. Die Polymerisationszeit betrug 1 Stunde.²⁸

4.2.7. Senkrechte TGGE

Der Temperaturgradient von 20°C bis 60°C verlief senkrecht zur Laufrichtung der DNA. 40µl PCR-Produkt wurde mit 20 µl 10xPuffer (200 mmol/L MOPS, pH 8,0, 10mmol/L EDTA, 0,5g/l Bromphenolblau, 0,5g /l Xylen Cyanol FF) gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Über die gesamte Gelbreite wurde eine Probe aufgetragen. Im Vorlauf der Elektrophorese wurde die Heizplatte zunächst auf 10°C gekühlt. Nachdem die Probe eine kurze Strecke (etwa 30 Minuten, 17 V/cm = 1 cm) in das Gel gelaufen war, wurde der Strom abgeschaltet und die Platte mit dem obengenannten Temperaturgradienten senkrecht zur Laufrichtung beheizt. Nach Erreichen der entsprechenden Temperaturen wurde die Elektrophorese ein zweites Mal gestartet und für ca. 1,5 Stunden (15V/cm, <30mA) fortgesetzt. Die Gele wurden anschließend mit Silbernitrat gefärbt.²⁸

4.2.8. Parallele TGGE

Zur gleichzeitigen Analyse von bis zu 24 PCR Proben wurde der Temperaturgradient parallel zur Laufrichtung ausgerichtet. 4 µl des PCR Produkts wurden mit 4 µl eines denaturierenden Puffers (DR-Puffer) (8mmol/L Harnstoff, 400 mmol/L MOPS, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 0,1 g/l Bromphenolblau, 0,1 g/l Xylen Xyanol FF) gemischt. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 95°C erhitzt (Denaturieren der DNA) und anschließend 15 Minuten bei 50°C (Renaturieren der DNA) inkubiert. Dann erst wurden 6 µl der Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei eingestellten Temperaturgradienten nach Auftrag der Proben sofort gestartet.

Der Temperaturgradient reichte von 30°C bzw. 35°C bis 50°C, bzw. 55°C, abhängig von dem jeweilig zu untersuchenden DNA Fragment. Die Laufzeiten variierten in Abhängigkeit von den Längen der untersuchten Fragmente zwischen 3 und 4,5 h. Eine Silbernitratfärbung der Gele wurde durchgeführt.²⁸

4.2.9. Silbernitratfärbung der Gele

Schritte	Lösung	Zeit
Waschen	10% Ethanol absolut, 0,5% Essigsäure	15 Min
Färben	1 g/l AgNO ₃	10 Min
Waschen	dd H ₂ O	3 x 20 Sek
Entwickeln	15 g/l NaOH, 4 ml/l 37% Formaldehyd, 0,1 g/l NaBH ₄	10 – 20 Min
Fixieren	7,5 g/l NaCO ₃	15 Min

Abb. 4-4) Silberfärbung nach Qiagen, TGGE Handbuch

4.2.10. DNA-Extraktion aus PAA-Gelen und Vorbereitung für die Sequenzanalyse

Homoduplexbanden der mutationstragenden DNA Fragmente wurden aus den gefärbten Gelen, die in diesem Fall nicht fixiert worden waren, ausgeschnitten, abgewogen und in 2 Volumen Diffusionspuffer (0,5mol/L Ammonium Acetat, 10mmol/L Magnesium Acetat, 1mmol/L EDTA, pH 8.0, 1g/l SDS) 20 Minuten bei 60°C und nachfolgend 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach Anleitung (QIAEX II Polyacralamidgel Extraktion Kit, Qiagen, Hilden) gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 20 µl sterilem Wasser eluiert und ein Aliquot von 10 µl in eine anschließende Reamplifizierungsreaktion mit 2,5 Units Pfu DNA-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) eingesetzt. Die PCR Zyklen der zuvor angewandten PCR-Regime für das jeweilige MTHFR cDNA Fragment wurden beibehalten. Für die PCR Reaktion wurde der 10x Reaktionspuffer [200 mM Tris-HCL (pH 8.0), 20 mM MgCl₂, 100mM KCl, 60MM (NH₄)₂SO₄, 1% Triton X-100, 100 mg/ml Nuklease-freies BSA] des Enzyms-Herstellers verwendet, je 30 pmol Oligonukleotid-Primer und eine Nukleotidkonzentration von 200 µM pro dNTP. Die erhaltenen Amplifikate wurden erneut über eine Gelelektrophorese (20g/l Agarose Gel Extraktion) und anschließend in 1/10 Volumen 3M Natriumacetat + 2,5 Volumen Ethanol (absolut) gefällt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kits der Firma Amersham Life Science (Braunschweig,D) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer. Die Reaktionsprodukte wurden in einem ALF DNA Sequencer (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) analysiert.²⁸

4.2.11. RFLP-Nachweis von Punktmutationen

Die in der TGGE identifizierten und anschließend sequenzierten Mutationen wurden durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Detektion verifiziert.

Das Prinzip der RFLP-Detektion ist einfach: Man verdaut die zu untersuchende DNA mit einem für die Mutationsstelle spezifischen Restriktionsenzym. Der entsprechende PCR-Ansatz wird dann mittels Agarosegel sichtbar gemacht. Anhand der sich ergebenden Banden erkennt man, wo das Enzym geschnitten hat.

Die zunächst bekannte Mutation auf Exon 4 (C-677-T) wurde in zahlreichen Proben wiedererkannt und mit Hilfe des Restriktionsenzym *Hinf*I [G/ANTC] bestätigt. Pro Ansatz wurden 1µl NEB-Puffer, 8 µl PCR-Produkt und 1µl Restriktionsenzym *Hinf*I benötigt. 1 µl NEB-Puffer werden mit 8 µl PCR-Produkt gemischt und in die Mischung wird das Enzym *Hinf*I gegeben. Danach wird der Ansatz bei 37°C im Wasserbad 3h lang oder über Nacht verdaut. Am nächsten Tag werden die Proben auf ein 3% Agarosegel aufgetragen und ausgewertet.

10 µl PCR-Produkt werden mit 2,5 µl Auftragspuffer gemischt. Von diesem Ansatz werden 10 µl pro Bande aufgetragen. Die erste Bande wird mit einem 100 bp Längenmarker belegt.

Eine weitere bekannte Mutation auf Exon 7 (A-1298-C) wird mit dem Restriktionsenzym *Mbo* II nachgewiesen. Die neugefundene Mutation auf Exon 5 (C-844-T) wird mit dem Restriktionsenzym *Mae* III [GTNAC] bestätigt.

Der Ansatz besteht aus 8 µl PCR-Produkt, 10 µl NEB Puffer und 2 µl Restriktionsenzym *Mae* III und wird bei 55°C 1h lang im Wasserbad erhitzt. Die Auswertung erfolgt wie oben mit einem 3% Agarosegel.²⁸

4.2.12. Lymphozytenisolierung nach Ficoll-Hypaque

Zuerst werden die abgenommenen Blutproben bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert und zwar 10 Minuten lang bei 4°C. Danach wird das Serum in verschraubbare Röhrchen mit einem sterilen Schlürfer unter dem Laminar Flow abgesert. Als nächstes wird das dunkle Blut in die Falcon-Röhrchen gekippt. Die Röhrchen, in denen das Blut als erstes enthalten war, werden zweimal mit PBS ausgespült. Die Falconröhrchen, die jetzt das Blut enthalten, werden auf 20 ml mit PBS aufgefüllt. Danach wird eine Ficoll-Lösung von 20ml in ein sauberes Falcon-Röhrchen vorgelegt. Danach wird die Ficoll-Lösung unter dem Laminar Flow ganz langsam mit Blut überschichtet. Das Röhrchen wird dann sofort in die Zentrifuge gestellt und bei 1.500 Umdrehungen 30 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Als Ergebnis muß sich eine weiße Schicht in der Mitte bilden, welche den Leukozytenring darstellt. Diese weiße Schicht wird nun mit einem Schlürfer abgenommen und in ein leeres Falconröhrchen überführt. Jetzt wird wieder mit PBS auf 40ml aufgefüllt und erneut bei 1.500 Umdrehungen 10 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Schritt dient dazu, die Leukozyten zu waschen. Der Überstand wird danach verworfen und das Pellet sollte jetzt nur noch aus weißen Leukozyten bestehen. Nun wird 1 ml Kochsalzlösung (0,9%) daraufpipettiert, resuspendiert, gemischt und in ein Kryoröhrchen überführt. In diesem kleinen Röhrchen wird das Pellet nun bei – 20°C eingefroren.

4.2.13. MTHFR-Aktivitätsbestimmung

Voraussetzung für eine MTHFR-Aktivitätsbestimmung ist eine Lymphozytenisolierung, denn bisher wird in den isolierten Lymphozyten die MTHFR-Aktivität gemessen.

Methylentetrahydrofolatreduktase katalysiert die Reduktion von N⁵,N¹⁰- Methylentetrahydrofolat zu N⁵ – Methyltetrahydrofolat. Weil dieses Substrat instabil ist und spontan in Formaldehyd und Tetrahydrofolat zerfällt, ist die gebräuchlichste Methode, um die katalytische Aktivität des Enzyms zu bestimmen, die Messung der Oxidation von [¹⁴C] N⁵-methyltetrahydrofolat zu N⁵, N¹⁰-methylentetrahydrofolat und die quantitative Bestimmung von [¹⁴C] Formaldehyd, welches von dem Produkt abgespalten wird.

[C¹⁴] Formaldehyd wird durch Komplexierung mit Dimedon aufgefangen und mit Toluol extrahiert.

Erst jetzt kann die Radioaktivität des [C¹⁴] Formaldehyd gemessen werden.

Dieser Bericht ²⁹ beschreibt eine sehr empfindliche radioaktive Messung, die direkt die Reduktion von N⁵, N¹⁰-methylentetrahydrofolat mißt. Das radiomarkierte Substrat [¹⁴C] N⁵,N¹⁰-methylentetrahydrofolat entsteht bei der Reaktion von [C¹⁴] Formaldehyd mit Tetrahydrofolat. Die Stabilität des radiomarkierten Substrates ist nur bei einer Lagerung von –80°C in einem Puffer von pH 9,5 für einige Monate gewährleistet.

Diese Methode²⁹ ist einfach, sehr empfindlich und mißt direkt die Reduktion von N⁵,N¹⁰-methylentetrahydrofolat zu N⁵-methyltetrahydrofolat, welche den physiologisch aktiven Stoffwechsel von Methylentetrahydrofolatreduktase darstellt.

5. Ergebnisse

5.1. Biochemischer Teil (Teil A)

5.1.1. HPLC-MESSUNG

Zur Quantifizierung von Homocystein wurde zunächst die Methode von Jacobsen, der mit dem Fluoreszenzreagenz Bromobiman (siehe Abb. 5-3) arbeitet, auf unserer HPLC-Anlage etabliert. Mit einem abgewandelten Eluenten-Gradienten-System und einer anderen HPLC-Säule erreichten wir die Darstellung von Homocystein (siehe Abb. 5-1 und Abb. 5-2).

In der quantitativen HPLC wird die Peakfläche oder die Peakhöhe als Maß für die Substanzmasse benutzt. Man erkennt deutlich, daß bei ungenügender Auflösung bis zur Grundlinie ($R=1,00$) und bei ungleich großen Peaks die Peakhöhenmethode die bessere Alternative ist. Folglich wurde hier nach der Peakhöhenmethode ausgewertet.

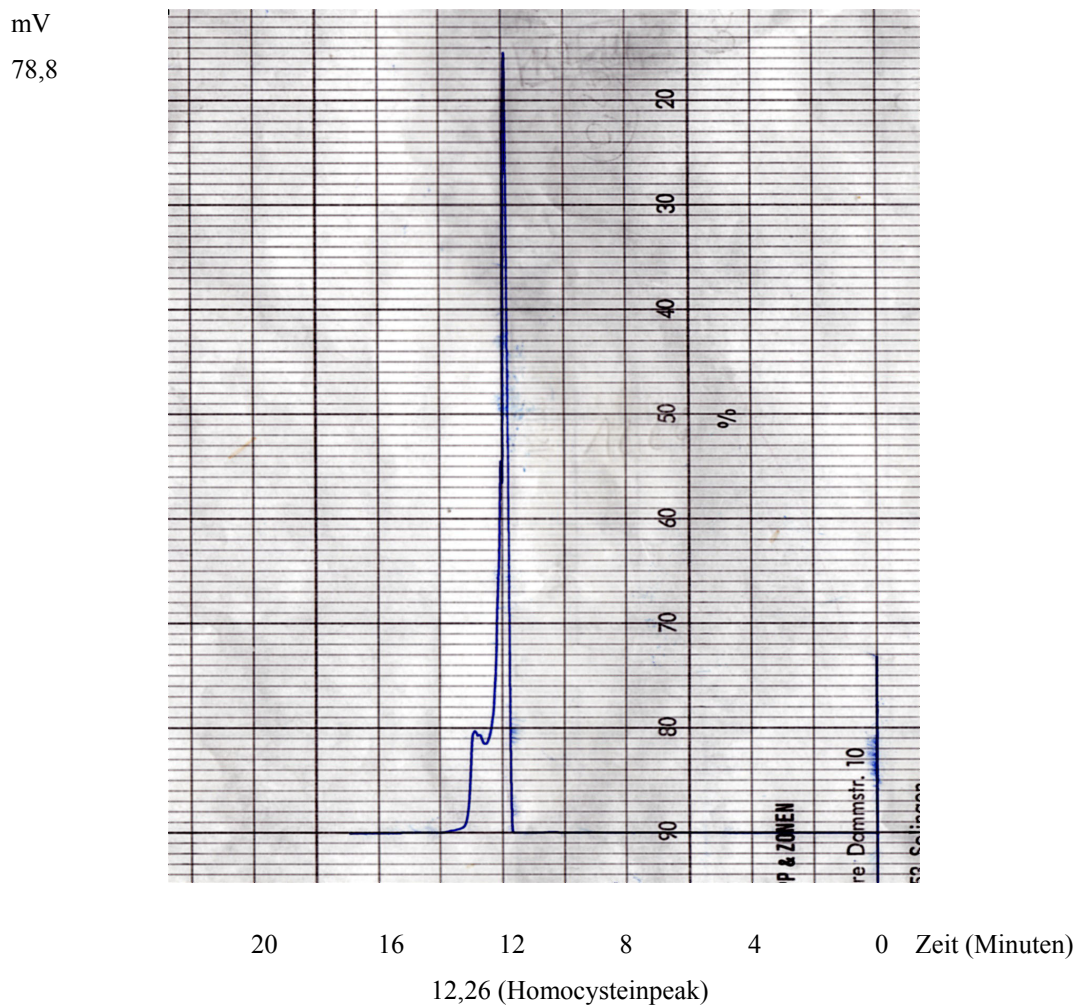


Abb. 5-1) HPLC-Chromatogramm von einem Standardhomocysteinpeak

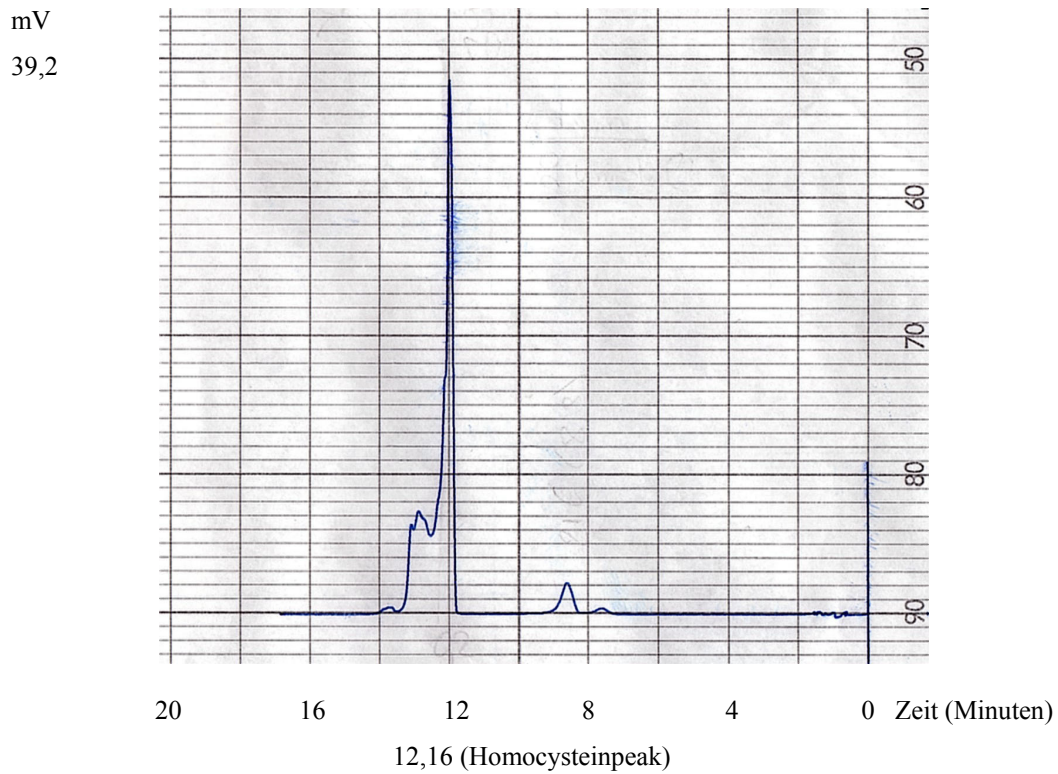


Abb. 5-2) HPLC-Chromatogramm von einem Probenhomocysteinpeak

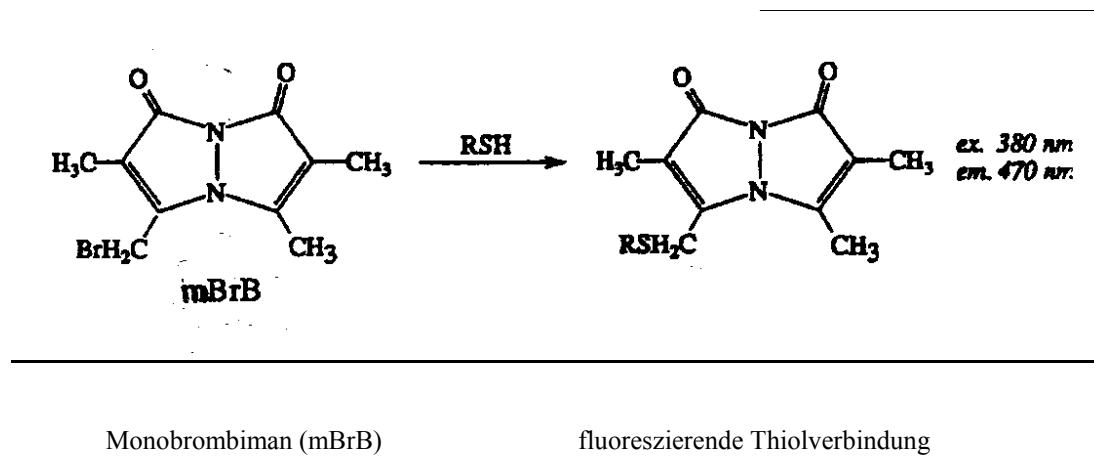


Abb. 5-3) Reaktion des Fluoreszenzreagenzes Monobrombiman mit Thiolverbindungen (Homocystein)

5.1.1.1. Standardkurven von Homocystein

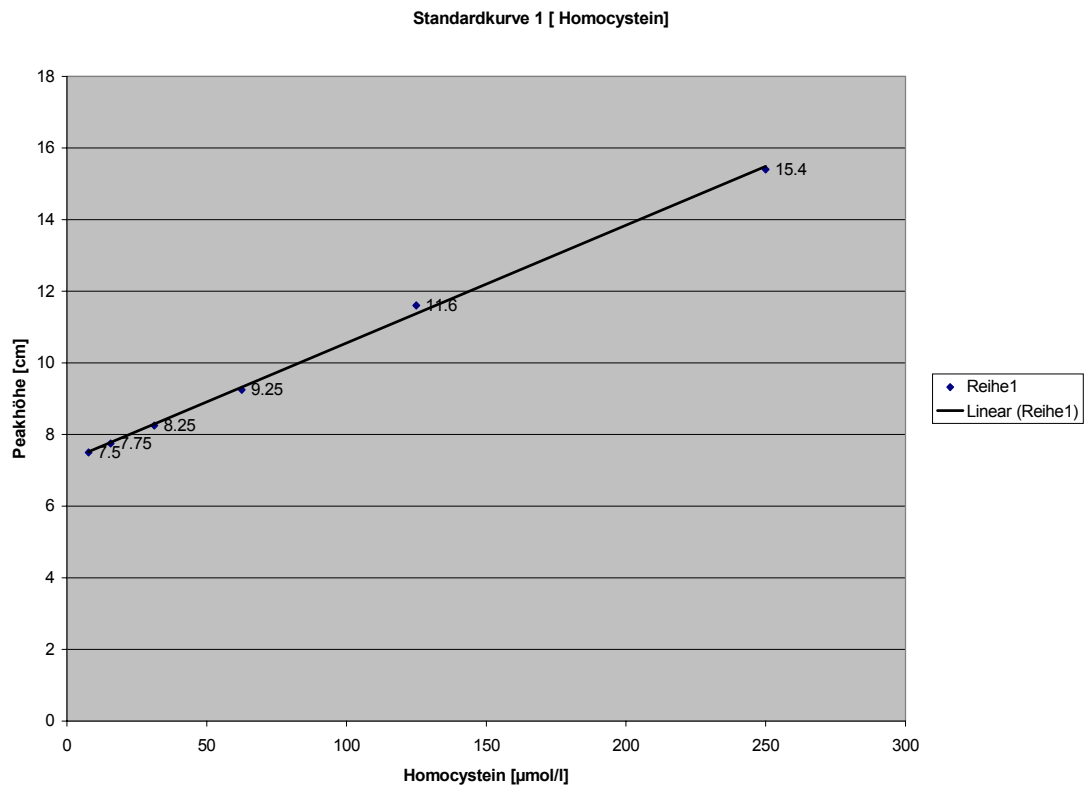


Abb. 5-4) Standardkurve 1 von Homocystein

X-Achse: Konzentrationsbereich von Homocystein zwischen 0 und 300 μmol/l

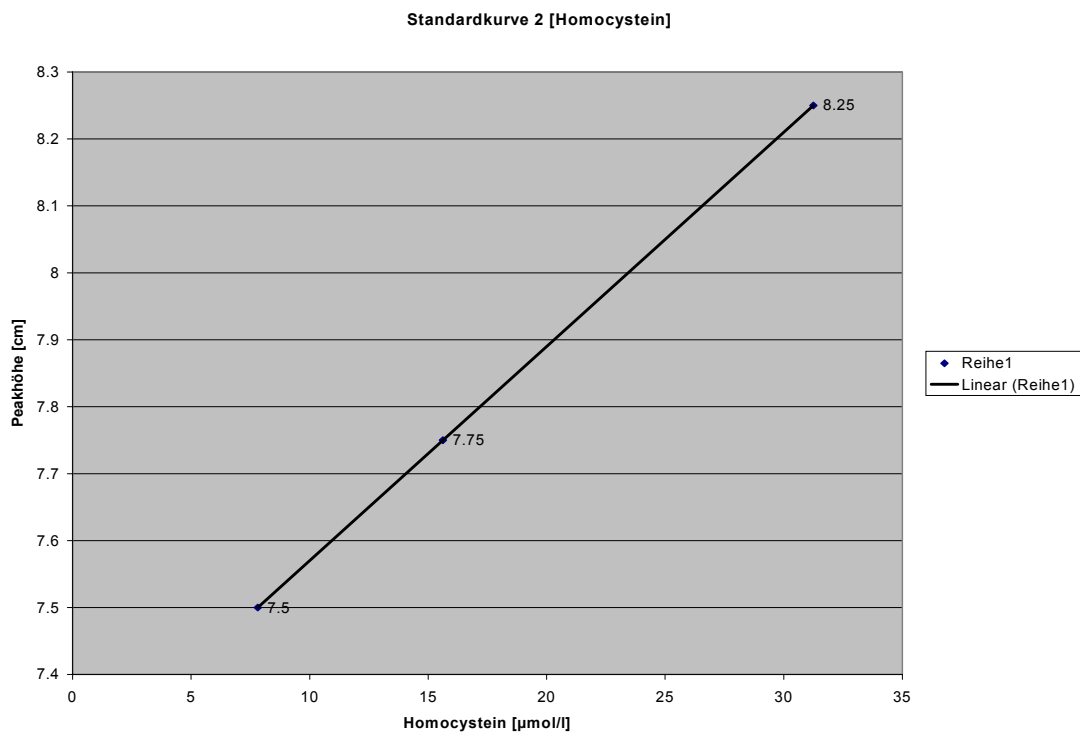


Abb. 5-5) Standardkurve 2 von Homocystein

X-Achse: Konzentrationsbereich von Homocystein zwischen 0 und 35 μmol/l

5.1.1.2. Probenmessung von Homocystein

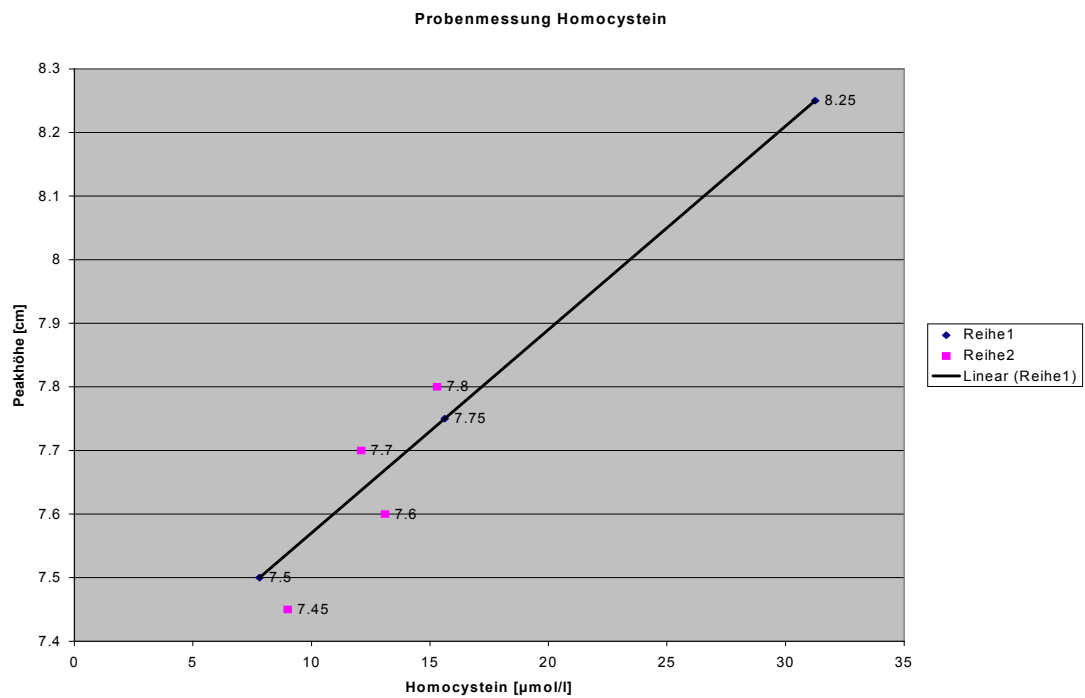


Abb. 5-6) Probenmessung von Homocystein
X-Achse: Konzentrationsbereich von Homocystein zwischen
0 und 35 µmol/l

Auswertung:

Mit Hilfe der Peakhöhe der einzelnen Homocysteinproben und der Standardkurve konnte man die jeweilige Homocysteinkonzentration aus obiger Zeichnung (Abb. 5-6) ablesen. Die Konzentrationen der restlichen Homocysteinproben wurden genauso ermittelt.

5.1.2. ELISA

Eine zweite Methode, um Homocystein in-vitro zu bestimmen, stellt der Axis Homocystein Test dar.

Der Axis Homocystein Test ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung des Homocysteins im humanen Plasma oder Serum.

5.1.2.1. Kalibrationskurve/ Standardkurve

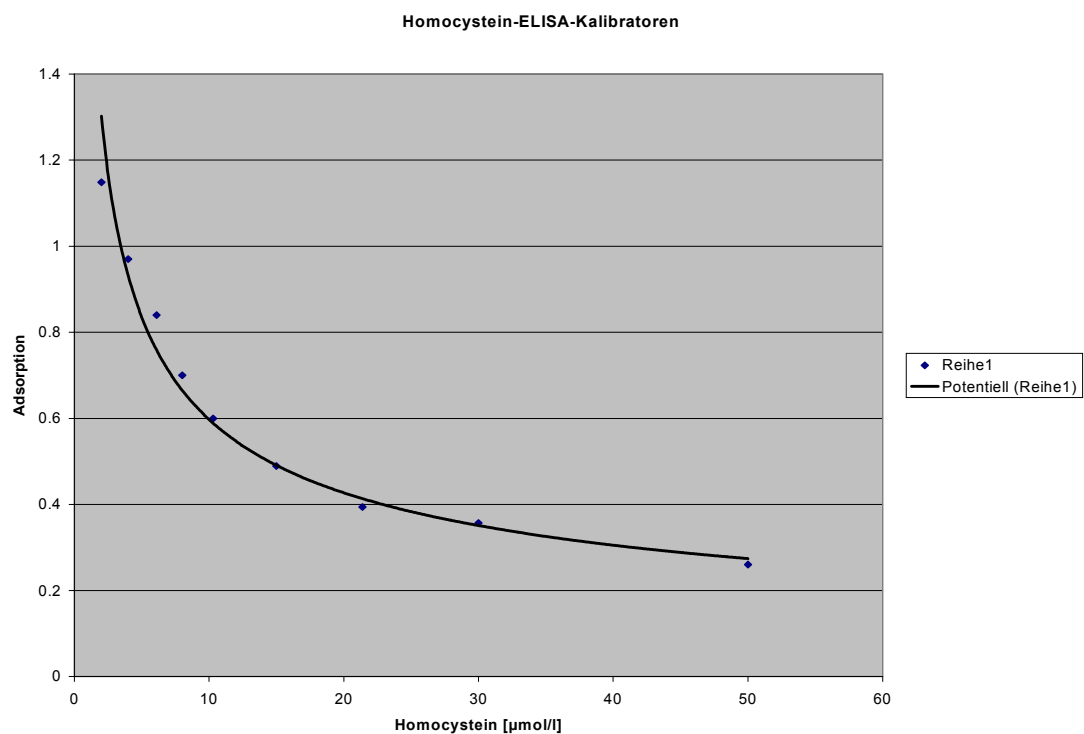


Abb. 5-7) Standardkurve (Kalibrationskurve) vom ELISA

Auswertung:

Die Kontrollwerte liegen annähernd auf einer Standardkurve.

Die Standardkurve wird durch eine Exponentialfunktion beschrieben.

Probenwerte:

Die Probenwerte sind unter Kapitel 5.1.3. Methodenvergleich aufgeführt.

5.1.3. Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA

vorgegebene Werte aus der Luric-Studie	HPLC gemessene Werte	ELISA gemessene Werte
14,5	-	12,7
12,5	-	8,2
9,7	-	8,7
12,2	-	7,9
13,5	-	11,0
15,9	-	12,1
15,5	-	16,5
7,7	-	7,9
15,2	-	10,5
16,5	-	11,5
7,5	-	5,6
15,6	13,5	13,3
13,1	11,0	11,1
8,8	11,0	9,1
8,5	10,5	6,7
9,7	8,0	6,8
10	8,0	6,6
2,5	3,5	1,3
6,6	8,5	7,0
15,3	17,0	14,6
9	6,0	8,4
10,2	8,0	9,7
12,1	14,0	10,0
Mittelwerte		
11,40	9,92	9,44

- Der Mittelwert des ELISA ist um 4,77 % geringer als der HPLC Mittelwert.
- Der Korrelationskoeffizient zwischen den HPLC und ELISA Werten beträgt 0,85587.

Tab. 5-1) Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA

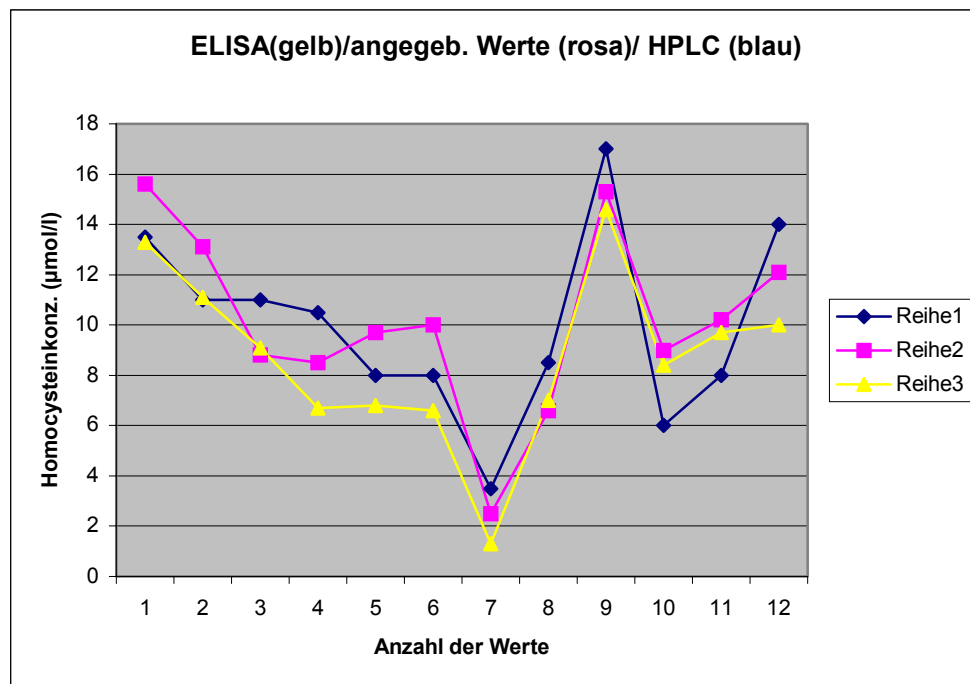


Abb. 5-8) Methodenvergleich zwischen HPLC, ELISA und vorgegebenen Werten

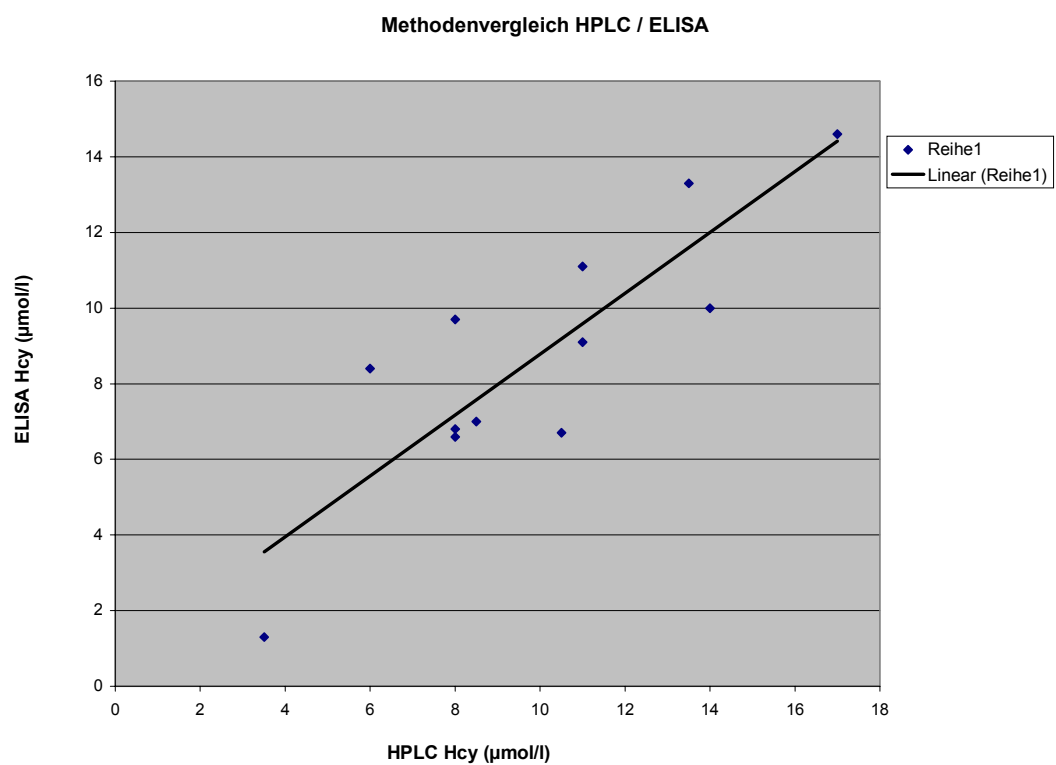


Abb. 5-9) Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA

5.1.4. Auswertung Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA

Die HPLC- Messung von Homocystein ist im Vergleich zum Homocystein ELISA aufwendiger, komplizierter und empfindlicher.

Der Homocystein ELISA Kit ist wesentlich einfacher und schneller durchzuführen als eine HPLC- Messung. Ein weiterer Vorteil ist der hohe Probendurchlauf beim ELISA. Als Nachteil lassen sich die hohen Kosten für einen ELISA Kit anführen. Trotzdem werden oft ELISAs routinemäßig im Labor eingesetzt.

Die Homocysteinkonzentrationen der angegebenen Werte und der HPLC-Werte lagen meist über denen der ELISA-Werte. Die ELISA-Werte waren somit am niedrigsten. Dies wird auch durch die oben ausgerechneten Mittelwerte der einzelnen Methoden bestätigt.

Bei der hier vorliegenden Arbeit sind die Werte vom ELISA Kit um 4,77 % niedriger als die Werte bei der HPLC-Messung.

Diesen Unterschied reflektiert der Mangel von Homocysteinstandardisierungen.

Der beobachtete Unterschied zwischen den Methoden könnte auch das Ergebnis aus der Reinheit der benutzten Chemikalien und der Zubereitung der Kalibratoren sein.

Der Methodenvergleich HPLC / ELISA ergibt einen Korrelationskoeffizienten von 0,85587.

Die Steigung der Regressionsgeraden des Methodenvergleichs beträgt 0,8048.

(siehe Tab. 5-1, Abb. 5-8 und Abb. 5-9)

In der Literatur³² sind die Werte bei der HPLC – Messung generell um 5-10 % höher als wie beim ELISA.

Somit liegen die Messergebnisse der hier vorliegenden Arbeit im Bereich der Abweichungen, die von der Literatur genannt werden.

5.2. Molekularbiologischer Teil (Teil B)

5.2.1. Beschreibung des MTHFR-Reduktase Kollektivs

Das für die Exonbereiche 1 bis 6 etablierte Mutationsscreening ließ sich mit der Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) erfolgreich durchführen, wobei für jeden Exonbereich 300 Proben aus der Luric-Studie durchgemessen worden sind.

Die Luric-Studie wird im Klinikum in Ludwigshafen von Dr. Winkelmann betreut. Wir erhielten bis jetzt an die 1000 Proben.

Für jeden Probenwert erhielten wir Angaben über Geschlecht, Geburtsdatum, Größe, Gewicht, KHK Status, Hypertonie, Diabetes mellitus, Homocysteinspiegel, Vitamin B6 und Vitamin B12 Werte, Folsäurewerte und Angaben über schon vorhandene Mutationen auf Exon 4 und Exon 7.

Nach eingehender Betrachtung ließen sich nun drei Kollektive mit unterschiedlichen Homocystein-/und Folsäurewerten ermitteln, welche dann durchgescreent wurden.

Das erste Kollektiv erfaßte Homocysteinwerte, welche größer als 16 µmol/l sind und zwar unabhängig von Folsäurewerten.

Das zweite Kollektiv enthielt Homocysteinwerte, welche größer als 10 µmol/l sind und Folsäurewerte, welche ebenfalls größer als 10 µmol/l sind.

Das dritte Kollektiv war das größte und enthielt die übrigen Werte, welche negativ auf schon bekannte Mutationen auf Exon 4 und Exon 7 waren. Dieses Kollektiv wurde hier zunächst betrachtet und enthält etwa für jeden Exonbereich 200 Proben (siehe Tab. 5-2).

Kollektiv	Patienten (Anzahl)	Bedingungen	Homocyst. (Mittelwerte)	Folsäure (Mittelwerte)	Vit. B6 (Mittelwerte)	Vit. B12 (Mittelwerte)	KHK Status	Diabet. (Anzahl)	Hypert. (Anzahl)	Raucher (Anzahl)
			[µmol/l]	[nmol/l]	[ng/ml]	[pmol/l]				
1.	46	Hcy > 16	20,15	5,73	10,42	334,0	25	11	31	26
2.	56	Hcy > 10 und Folsäure > 10	13,35	11,3	18,27	452,5	36	10	33	30
3.	200	übrige Werte	12,98	8,96	11,37	367,68	105	32	124	142

Tab. 5-2) klinische Parameter der drei untersuchten Kollektive des MTHFR Reduktase Kollektivs

Aus der Tabelle 5-2 läßt sich entnehmen, daß das erste Kollektiv mit den höchsten Homocysteinwerten auch gleichfalls über die niedrigsten Folsäurewerte, Vitamin B6 und Vitamin B12 Werte verfügt.

Generell kann man sagen, daß von jedem Kollektiv mindestens die Hälfte der Patienten mit einem erhöhten KHK-Status, mit Bluthochdruck und Rauchen vorbelastet sind.

Beim dritten Kollektiv sind etwa dreiviertel der Patienten mit Bluthochdruck und Rauchen vorbelastet. Hier wurden auch alle Mutationen gefunden.

5.2.2. statistische Auswertung (Diagramme) der einzelnen Parameter

Einteilung in die jeweiligen Kollektive

Einteilung der drei untersuchten Kollektive:

- 1. Kollektiv:** Beschreibung siehe vorne
Vergleich von Homocysteinwerten mit dem Folsäurewert,
Vitamin B12 Wert, Vitamin B6 Wert, KHK-Status und dem Alter
- 2. Kollektiv:** Beschreibung siehe vorne
Vergleich von Homocysteinwerten mit dem Folsäurewert,
Vitamin B12 Wert, Vitamin B6 Wert, KHK-Status und dem Alter
- 3. Kollektiv:** Beschreibung siehe vorne
Vergleich von Homocysteinwerten mit dem Folsäurewert,
Vitamin B12 Wert, Vitamin B6 Wert, KHK-Status und dem Alter

Patienten mit Exon 4 Mutationen (homozygote und heterozygote Mutationen):

Vergleich von Homocysteinwerten mit dem Folsäurewert,
Vitamin B12 Wert, Vitamin B6 Wert, KHK-Status und dem Alter

Patienten mit keinen Mutationen:

Vergleich von Homocysteinwerten mit dem Folsäurewert,
Vitamin B12 Wert, Vitamin B6 Wert, KHK-Status und dem Alter

Referenzkollektiv:

Patienten mit einem KHK-Status von 0 und 1 (keine Koronarerkrankung)
Vergleich von Homocysteinwerten mit dem Folsäurewert,
Vitamin B12 Wert, Vitamin B6 Wert und dem Alter

Vergleich von 1. Kollektiv, 2. Kollektiv und 3. Kollektiv

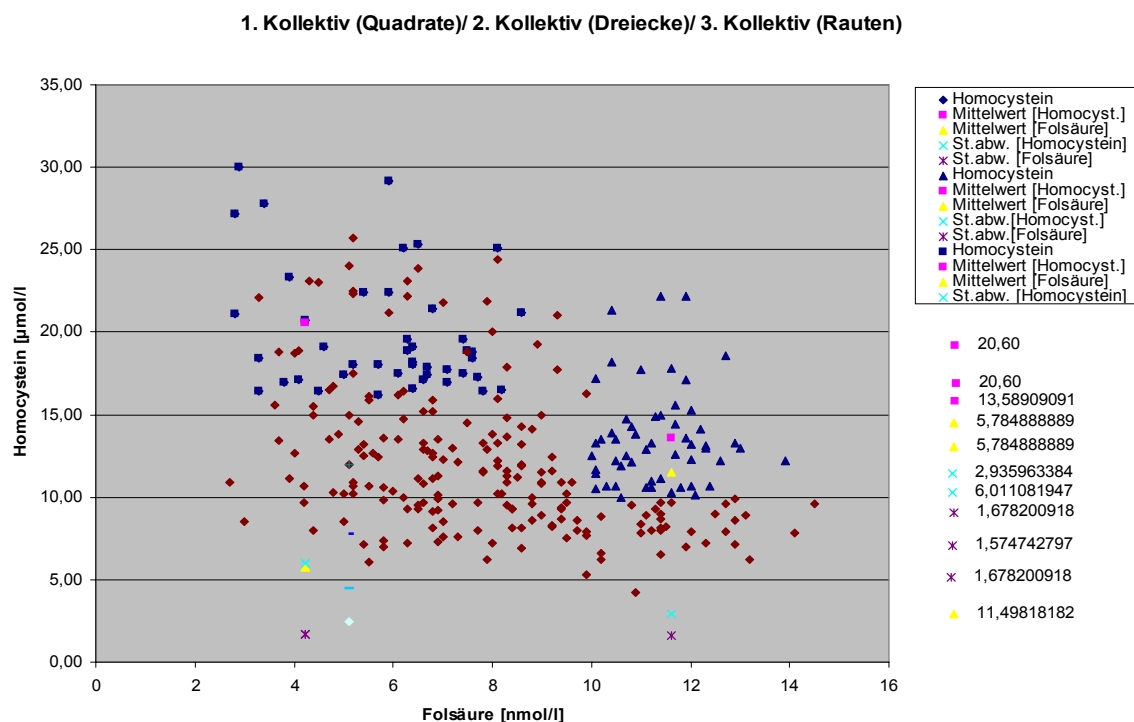


Abb. 5-10) 1., 2. und 3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure

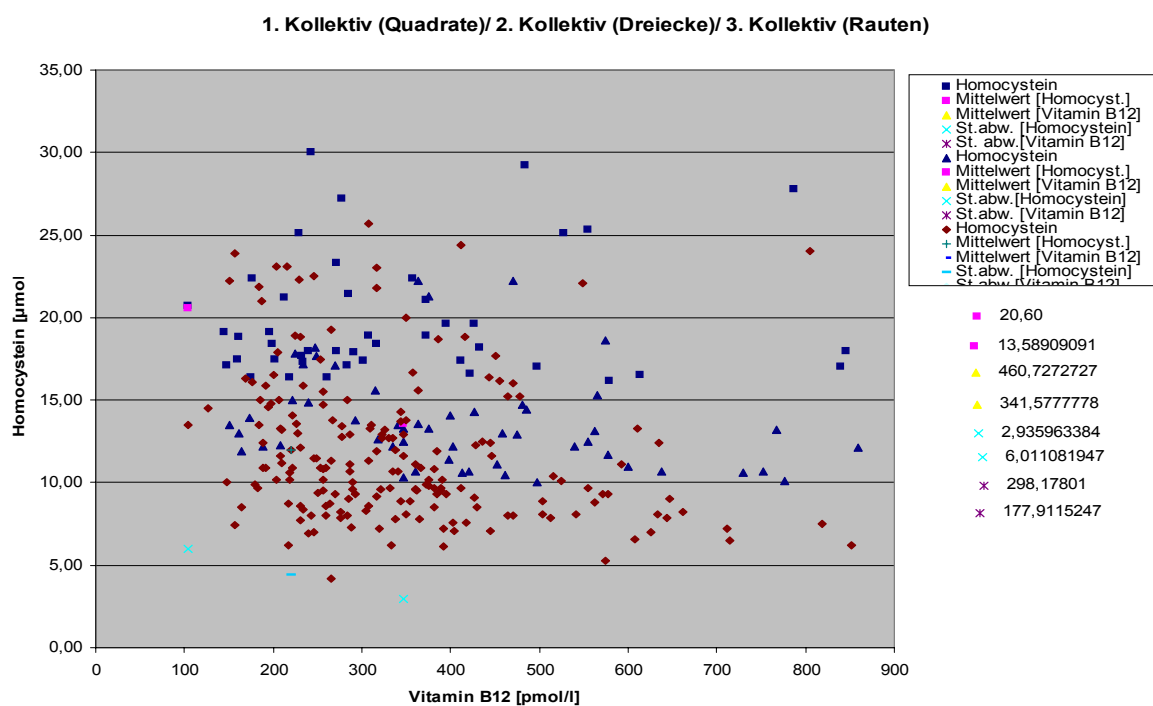


Abb. 5-11) 1., 2. und 3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12

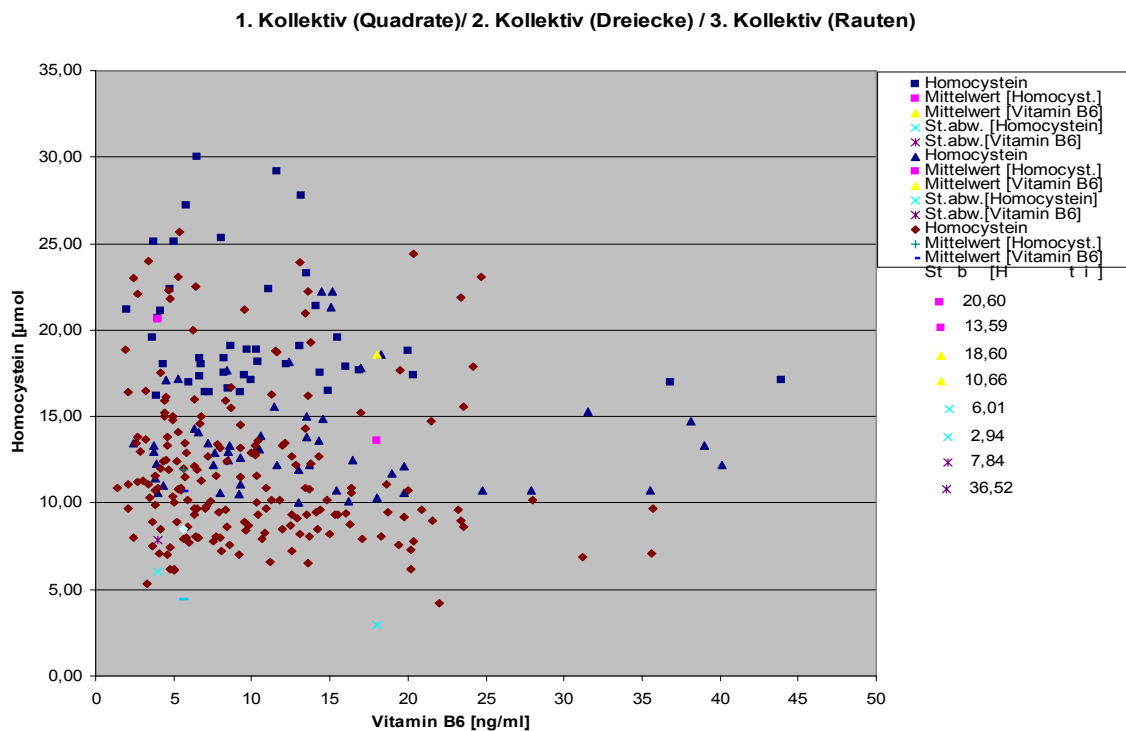


Abb. 5-12) 1., 2. und 3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6

Erklärung:

Den höchsten durchschnittlichen Homocysteinwert der drei Kollektive besitzt natürlich das 1. Kollektiv mit einem Wert von 20,60 µmol/l. Die Standardabweichung ist mit 6,01 relativ hoch. Das 2. Kollektiv hat dann nur noch einen Wert von 13,59 µmol/l, welcher um 34% niedriger ist als beim 1. Kollektiv. Das 3. Kollektiv weist einen Wert auf, der fast um die Hälfte, d.h. um 42% niedriger ist als beim 1. Kollektiv. Er beträgt 11,96 µmol/l. Hier wurden alle Mutationen gefunden, deshalb ist das 3. Kollektiv auch mit Abstand das wichtigste.

Das 1. Kollektiv hat den niedrigsten Folsäurewert von 5,78 nmol/l. Danach folgt das 3. Kollektiv mit 7,73 nmol/l. Das 2. Kollektiv hat den höchsten Folsäurewert von 11,5 nmol/l, weil hier die Folsäurewerte > 10 nmol/l sein mußten als Bedingung für das Kollektiv.

Die Vitamin B12 Werte verhalten sich genauso wie die Folsäurewerte in Bezug auf die drei Kollektive. Den niedrigsten Vitamin B12 Wert der drei Kollektive weist wieder das 1. Kollektiv auf und zwar mit 341,58 pmol/l. Danach folgt das 3. Kollektiv mit 352,22 pmol/l. Das 2. Kollektiv hat auch hier den höchsten Vitamin B12 Wert mit 460,73 pmol/l.

Das 1. und das 3. Kollektiv hat einen Vitamin B6 Wert von 10,66 ng/ml und 10,67 ng/ml. Die Standardabweichung liegt jeweils bei 7,84 und 8,46. Das 2. Kollektiv hat hier von allen Kollektiven den höchsten Vitamin B6 Wert. Er beträgt 18,60 ng/ml. Außerdem ist hier auch die Standardabweichung von 36,52 außerordentlich hoch.

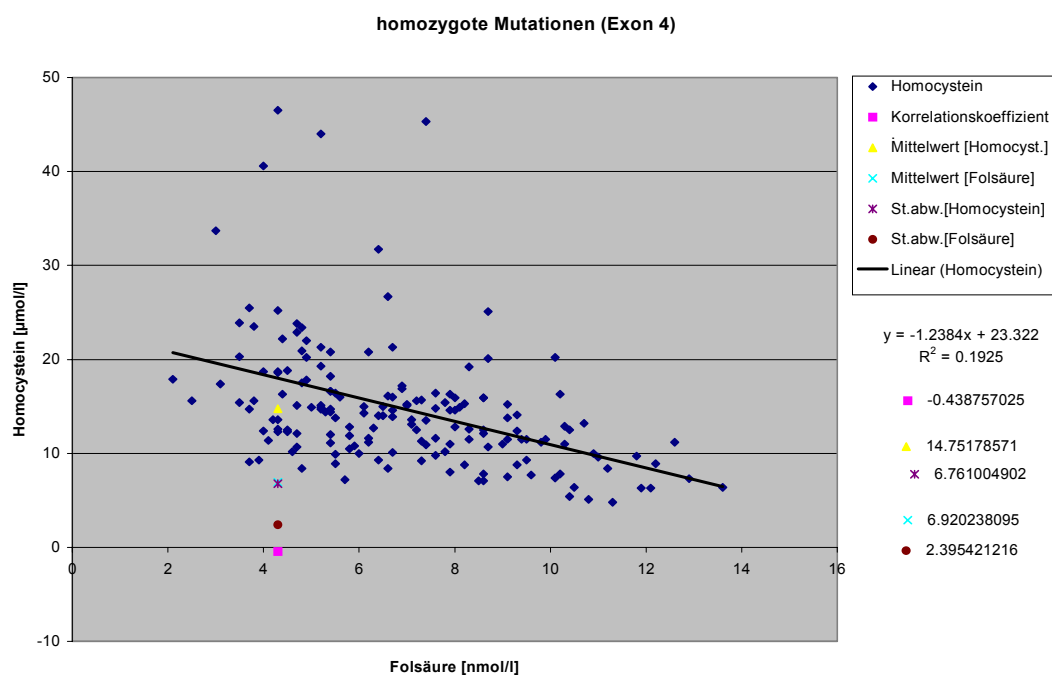
Homozygote Mutationen

Abb. 5-13) homozygote Mutationen: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure

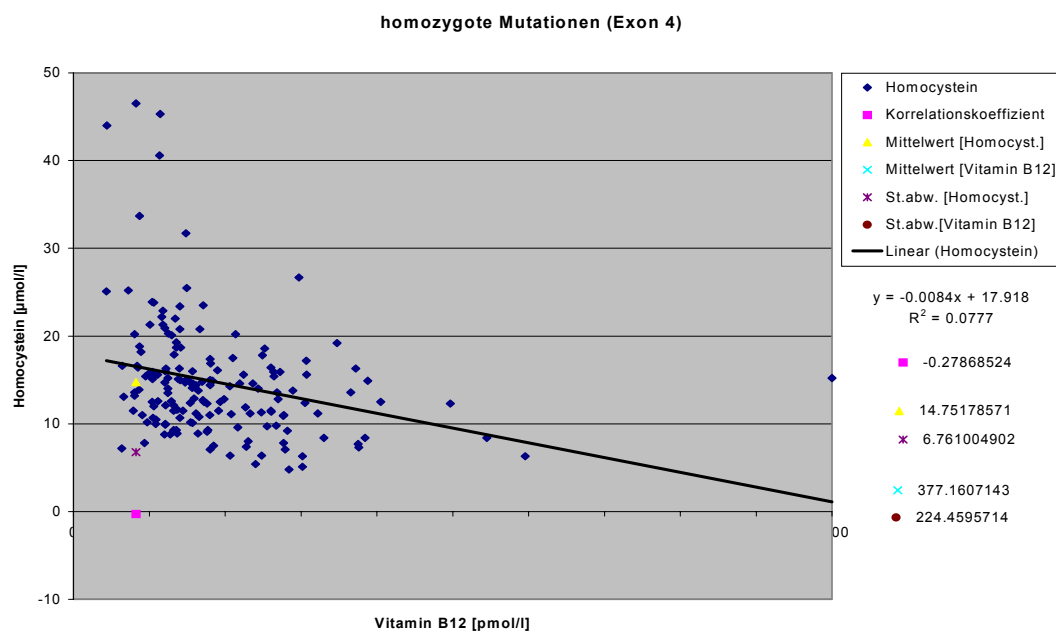


Abb. 5-14) homozygote Mutationen: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12

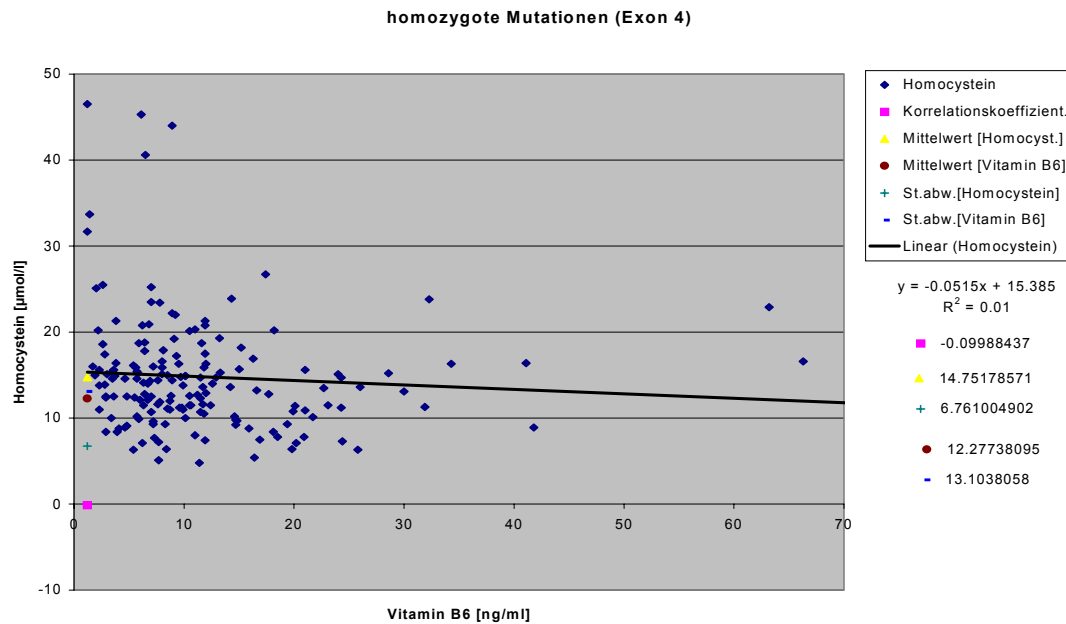


Abb. 5-15) homozygote Mutationen: Vergleich zwischen Homocystein und VitaminB6

Erklärung:

Wie zu erwarten, ist bei den homozygoten Mutationen der durchschnittliche Homocysteinwert mit $14,75 \mu\text{mol/l}$ am höchsten (Tab. 5-3). Auch die Standardabweichung ist mit $6,76$ relativ hoch. Dementsprechend ist natürlich auch der durchschnittliche Folsäurewert mit $6,92 \text{ nmol/l}$ am niedrigsten. Eine Standardabweichung von $2,39$ liegt im normalen Bereich.

Bei den homozygoten Mutationen liegt der Vitamin B12 Wert bei $377,16 \text{ pmol/l}$.

Der durchschnittliche Mittelwert von Vitamin B6 beträgt bei den homozygoten Mutationen $12,28 \text{ ng/ml}$.

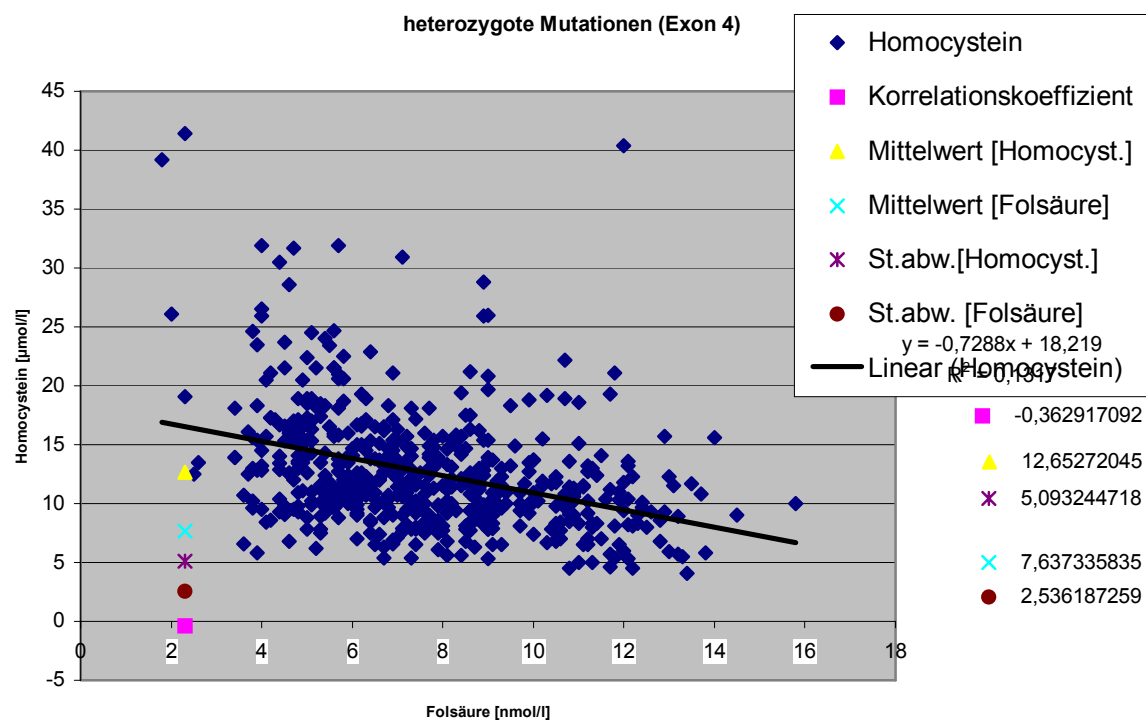
Heterozygote Mutationen

Abb. 5-16) heterozygote Mutationen: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure

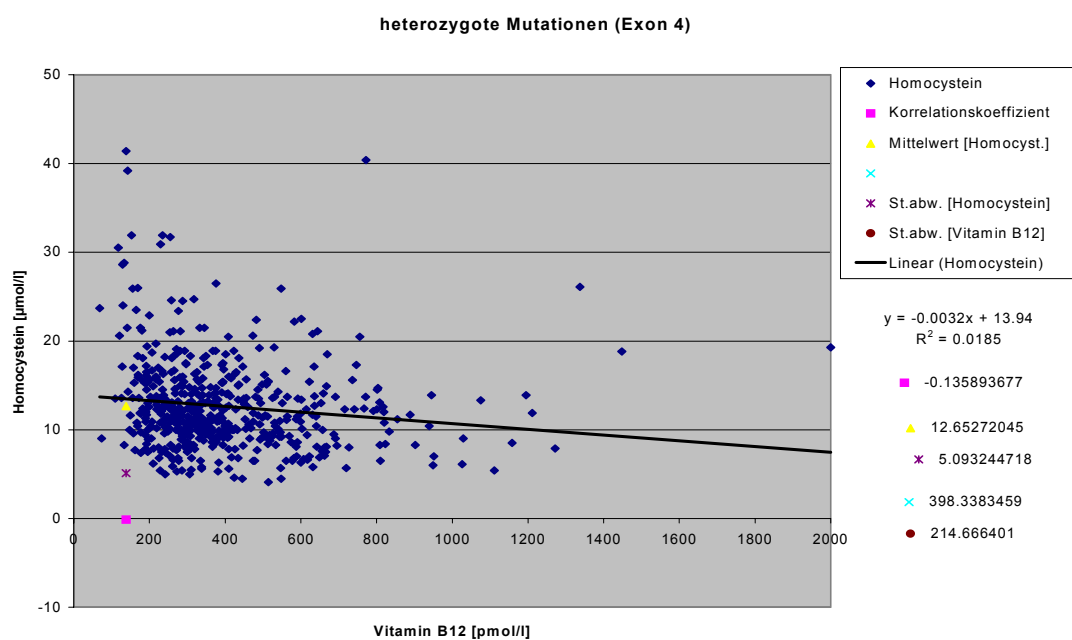


Abb. 5-17) heterozygote Mutationen: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12

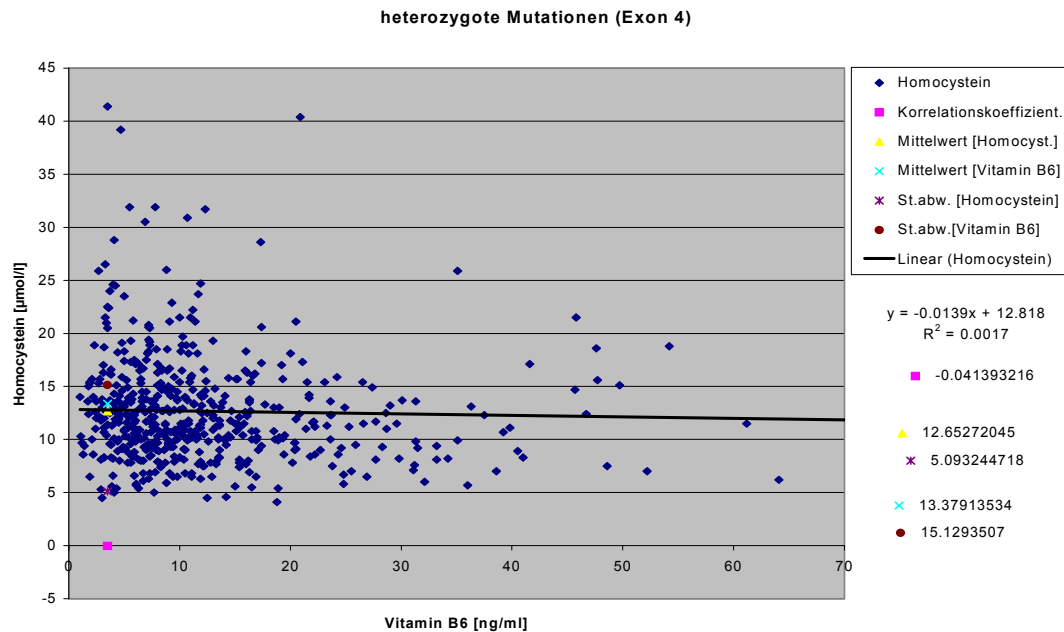


Abb. 5-18) heterozygote Mutationen: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6

Erklärung:

Bei den heterozygoten Mutationen liegt der durchschnittliche Homocysteinwert bei $12,65 \mu\text{mol/l}$. Damit ist der Wert um 15 % niedriger als bei den homozygoten Mutationen. Die Standardabweichung liegt auch hier mit 5,09 relativ hoch. Der durchschnittliche Folsäurewert der heterozygoten Mutationen liegt bei $7,64 \text{ nmol/l}$, und ist damit um 10 % höher als bei den homozygoten Mutationen. Die Standardabweichung von 2,54 liegt im normalen Bereich

Bei den heterozygoten Mutationen liegt der durchschnittliche Vitamin B12 Wert bei $398,34 \text{ pmol/l}$.

Er ist um 5,6 % höher als wie bei den homozygoten Mutationen.

Der durchschnittliche Mittelwert von Vitamin B6 beträgt bei den heterozygoten Mutationen $13,38 \text{ ng/ml}$.

Er ist gegenüber den homozygoten Mutationen leicht erhöht.

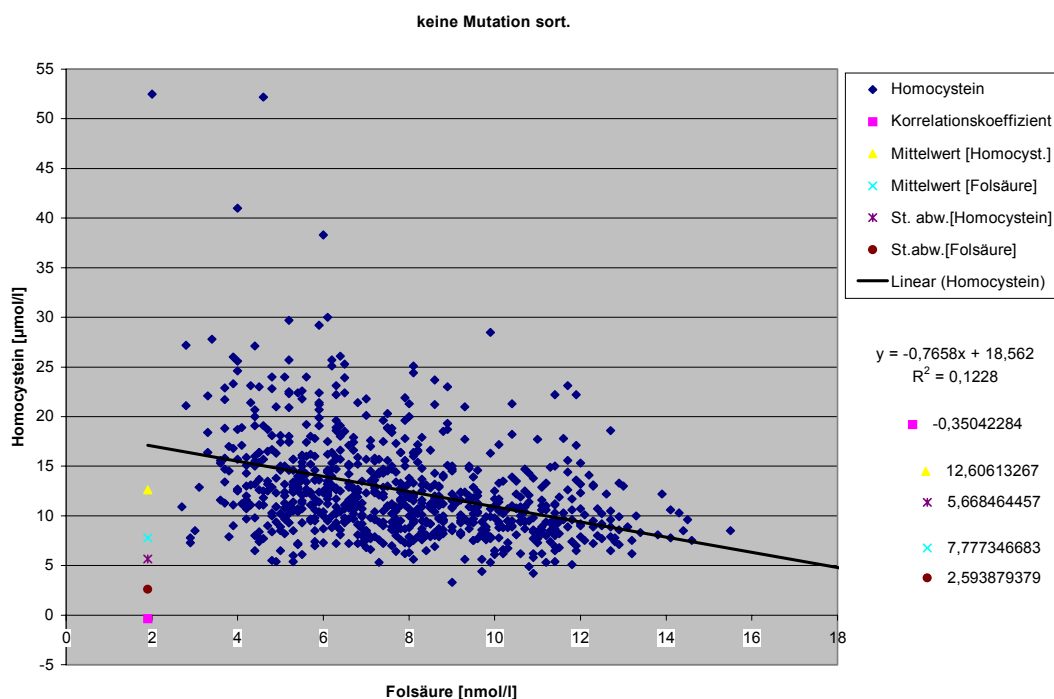
Kollektive mit keinen Mutationen

Abb. 5-19) keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure

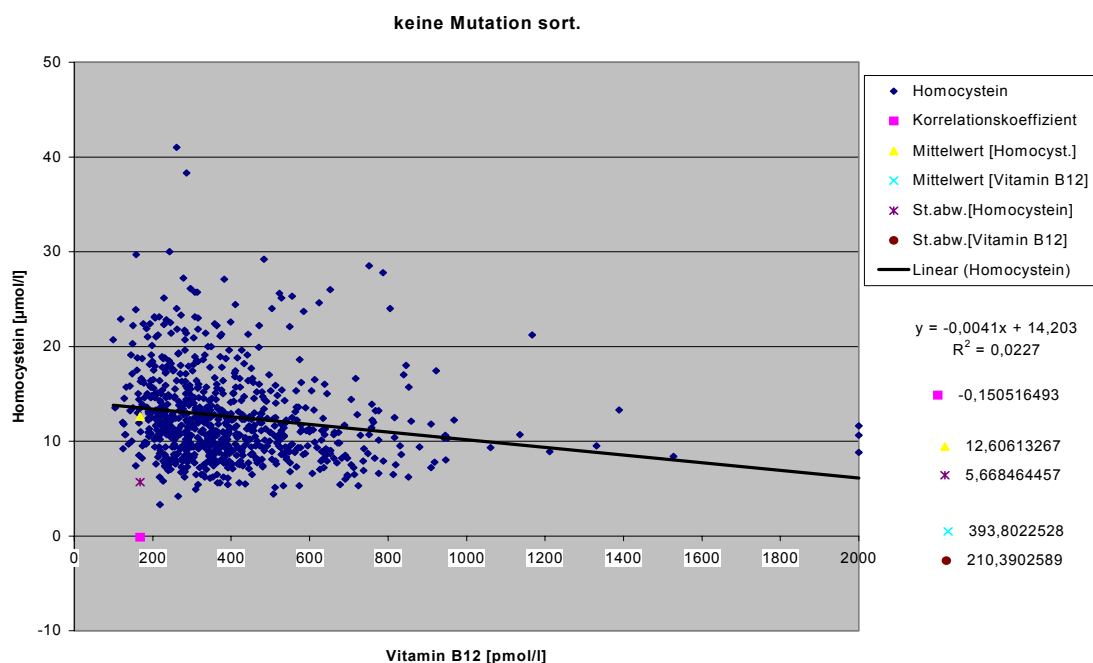


Abb. 5-20) keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12

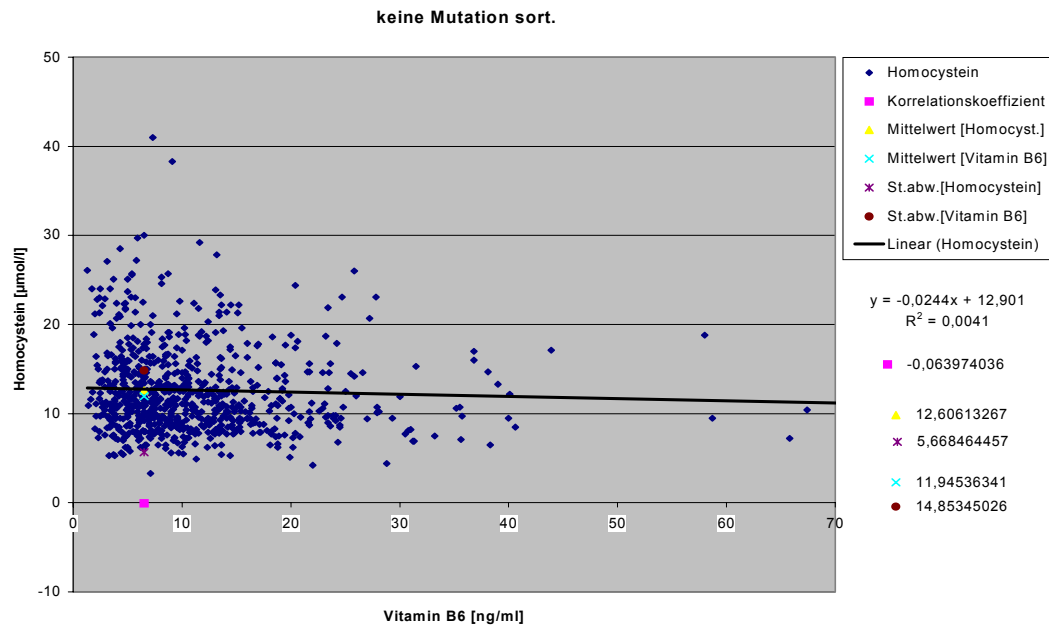


Abb. 5-21) keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6

Erklärung:

Das Kollektiv mit keinen Mutationen hat einen durchschnittlichen Homocysteinwert von 12,6 µmol/l und einen durchschnittlichen Folsäurewert von 7,8 nmol/l. Diese Werte entsprechen etwa denen der heterozygoten Mutationen.

Der Vitamin B12 Wert liegt bei 393,8 pmol/l.

Das Kollektiv mit keinen Mutationen hat hier den niedrigsten Vitamin B6 Wert, einen Wert von 11,95 ng/ml.

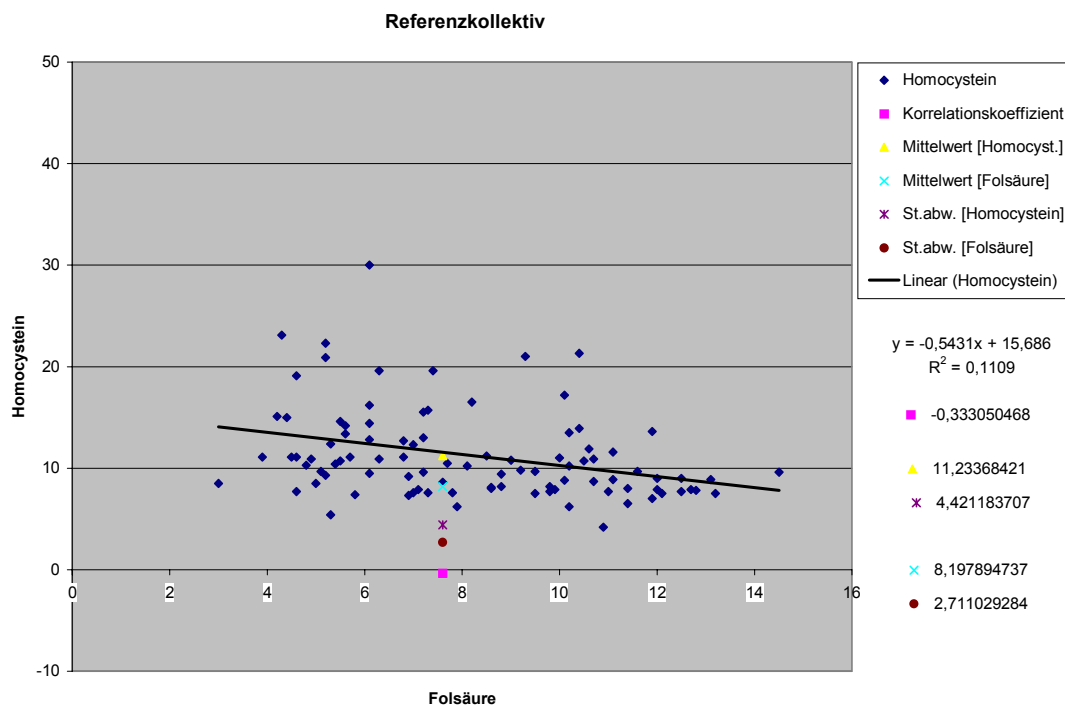
Referenzkollektiv

Abb. 5-22) Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure

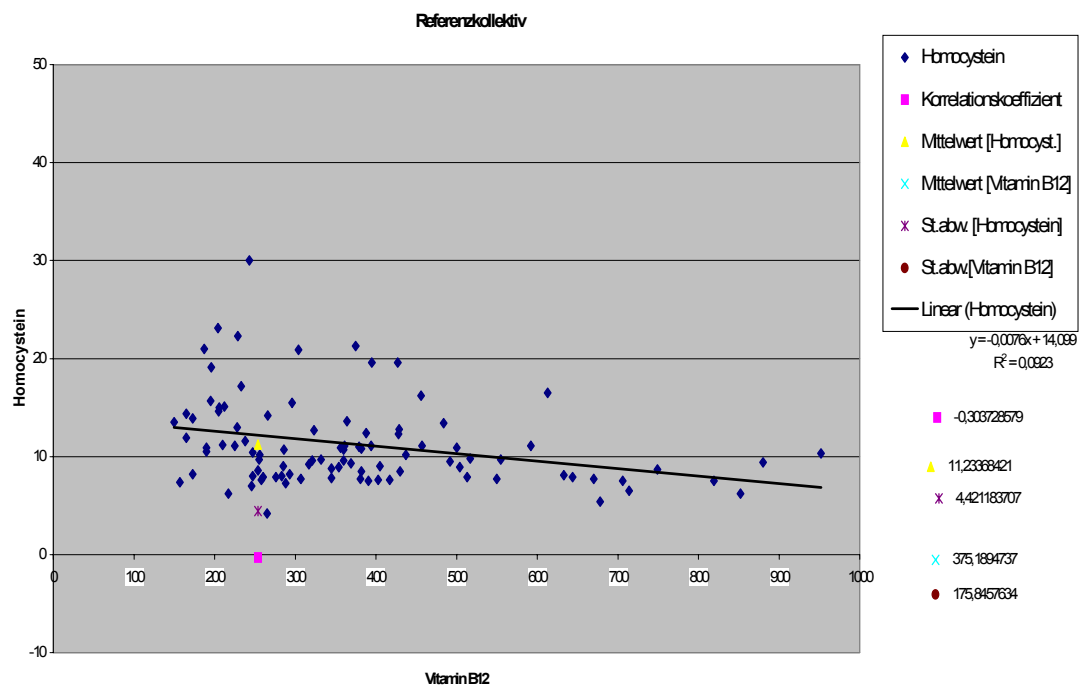


Abb. 5-23) Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12

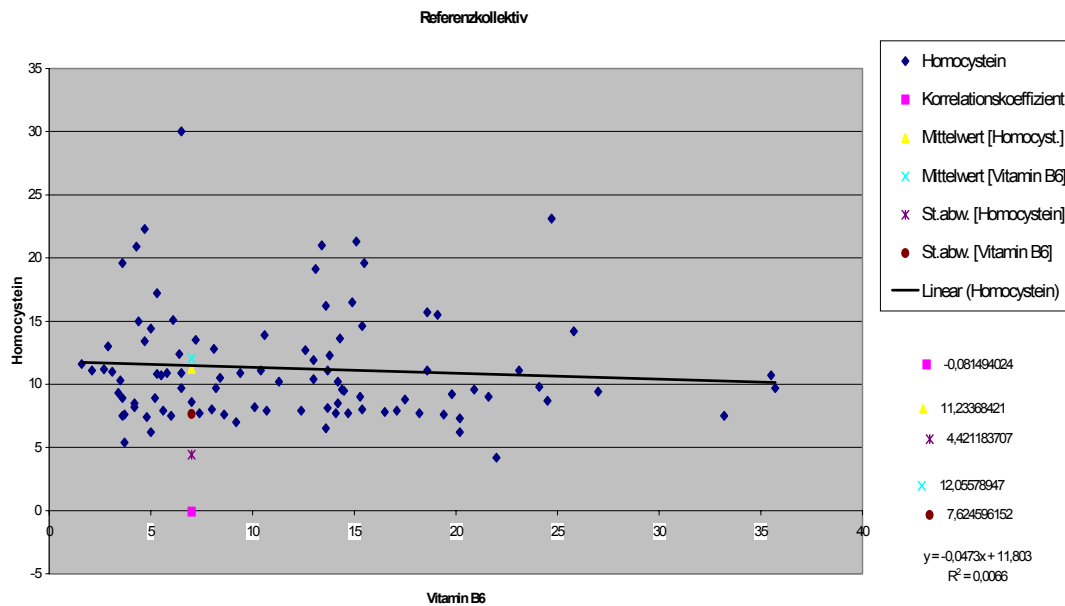


Abb. 5-24) Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6

Erklärung:

Das Referenzkollektiv hat natürlich den niedrigsten durchschnittlichen Homocysteinwert von 11,23 $\mu\text{mol/l}$. Die Standardabweichung ist hier mit 4,42 auch am niedrigsten. Demzufolge ist der durchschnittliche Folsäurewert von 8,19 nmol/l hier am höchsten.

Nur beim Referenzkollektiv ist der Vitamin B12 Wert am niedrigsten. Er liegt bei 375,19 pmol/l . Auch die Standardabweichung ist mit 175,85 am geringsten.

Das Referenzkollektiv hat einen Vitamin B6 Wert, der leicht unter dem der homozygoten Mutationen liegt. Er beträgt 12,06 ng/ml .

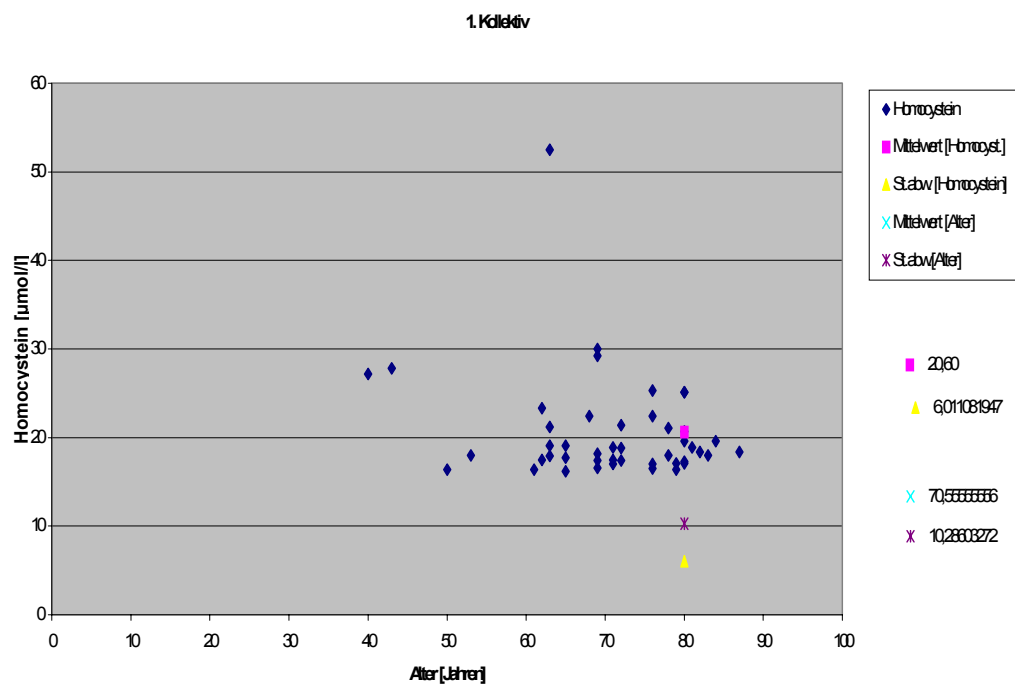
1. Kollektiv: Vergleich von Homocystein mit dem Alter und dem KHK- Status

Abb. 5-25) 1. Kollektiv: Vergleich von Homocystein und dem Alter

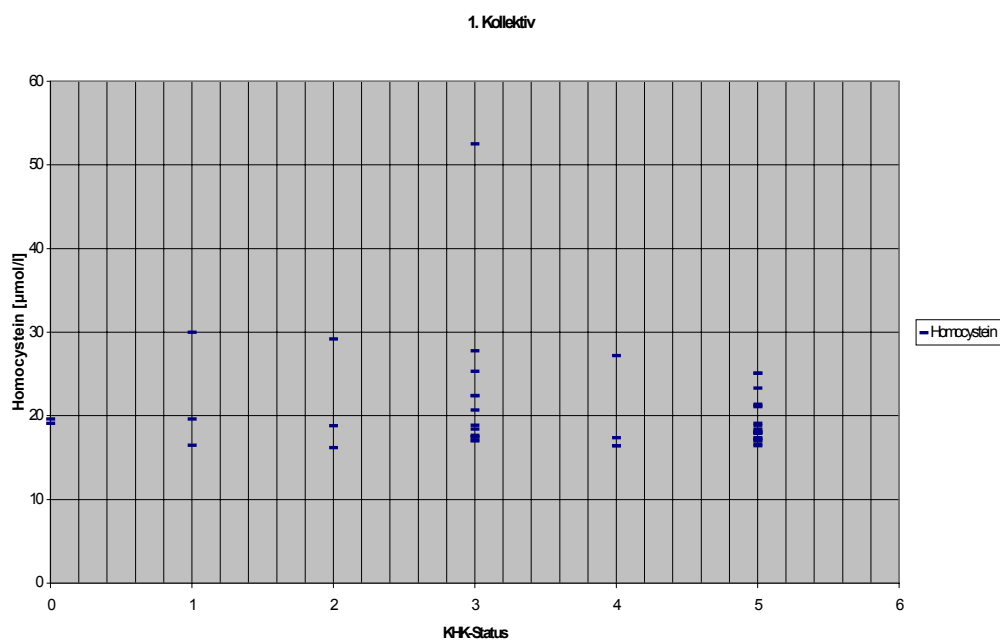


Abb. 5-26) 1. Kollektiv: Vergleich von Homocystein und dem KHK-Status

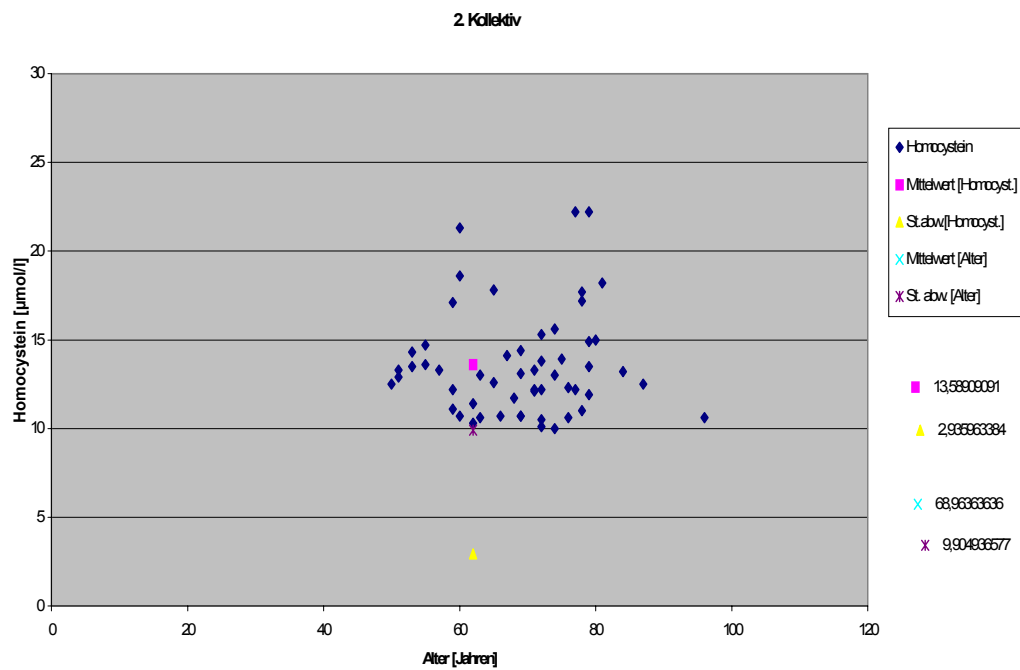
2. Kollektiv: Vergleich von Homocystein mit dem Alter und KHK- Status

Abb. 5-27) 2. Kollektiv: Vergleich von Homocystein und dem Alter

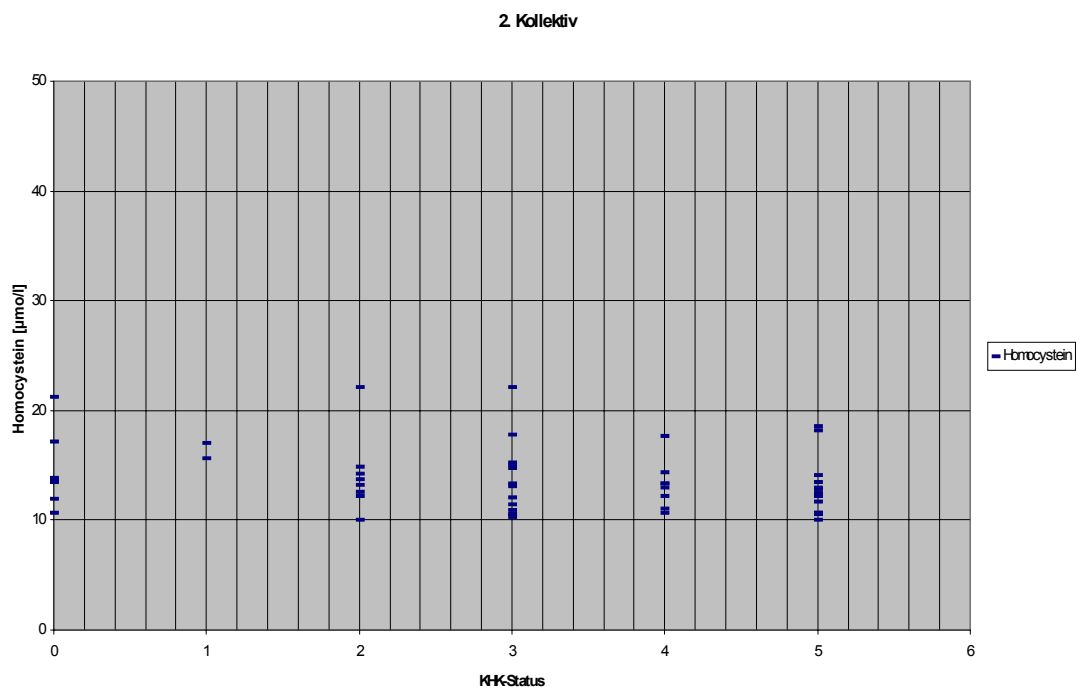


Abb. 5-28) 2. Kollektiv: Vergleich von Homocystein und dem KHK-Status

3. Kollektiv: Vergleich von Homocystein mit dem Alter und KHK- Status

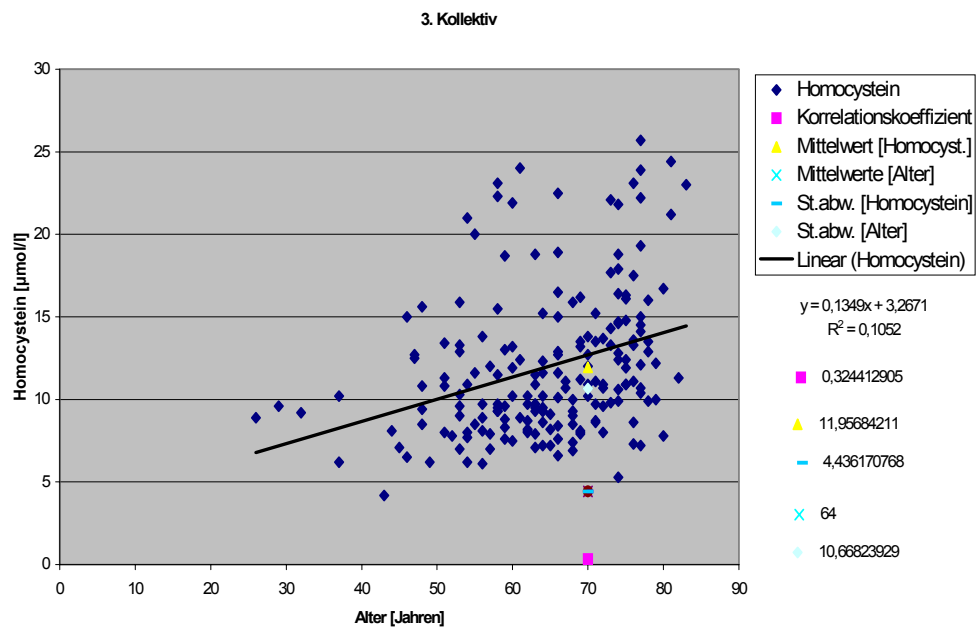


Abb. 5-29) 3.Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und dem Alter

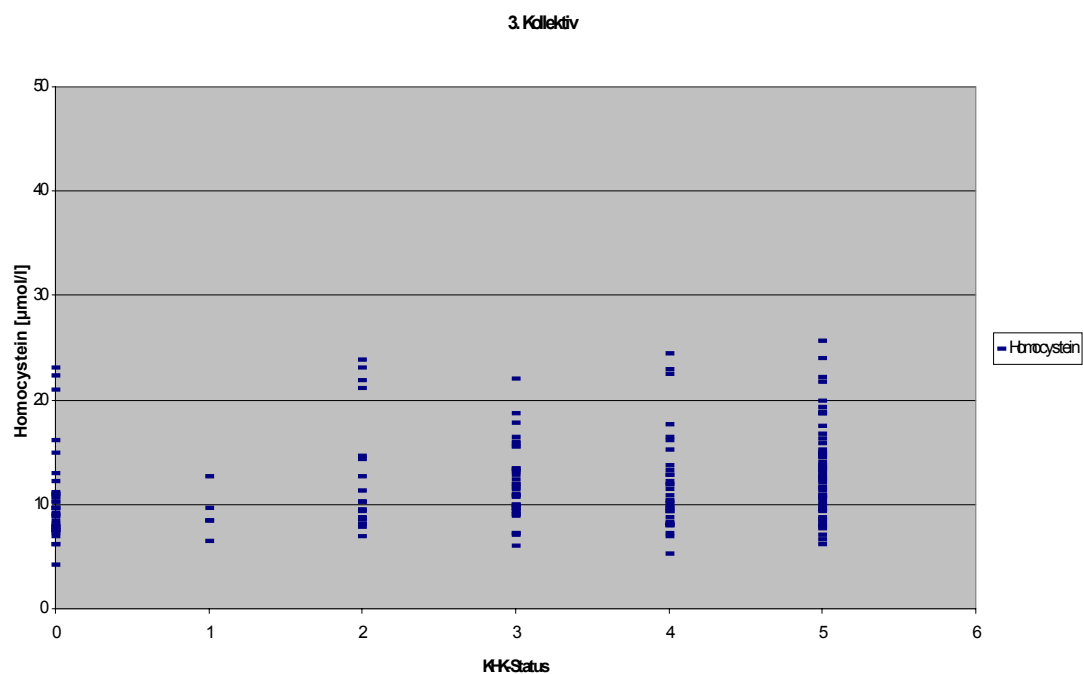


Abb. 5-30) 3. Kollektiv: Vergleich von Homocystein und dem KHK-Status

Erklärung:

Im gleichen Maß wie der Homocysteinwert vom ersten zum dritten Kollektiv fast um die Hälfte abnimmt, sinkt auch der Mittelwert des Alters. Das heißt je höher der durchschnittliche Homocysteinwert, desto höher auch das durchschnittliche Alter (siehe auch Tab. 5-3).

Die Standardabweichung des mittleren Alters der drei Kollektive liegt ca. immer um den Wert 10. Das heißt hier liegt eine sehr große Streuung der Mittelwerte vor, dementsprechend ist auch hier die Signifikanz sehr hoch, was bedeutet das die Mittelwerte hier signifikant sehr unterschiedlich sind.

Die Homocysteinwerte des 1. Kollektivs liegen bei ca. 30 $\mu\text{mol/l}$. Die meisten Werte liegen bei den KHK Stufen 3 und 5. Die Werte nehmen minimal von Stufe 1 bis zur Stufe 5 hin ab. Also genau umgekehrt wie bei den homo- und heterozygoten Mutationen. Der Höchstwert liegt bei Stufe 3. Er beträgt 52 $\mu\text{mol/l}$ und stellt hiermit auch eine Abweichung dar.

Das 2. Kollektiv hat die niedrigsten Werte von den drei Kollektiven. Die Werte sind relativ gleichmäßig verteilt. Die KHK-Stufen 2 und 3 besitzen die höchsten Werte, die bei 22,5 $\mu\text{mol/l}$ liegen. Die Stufen 1,4 und 5 liegen bei niedrigeren Werten zwischen 18 und 19 $\mu\text{mol/l}$.

Das 3. Kollektiv besitzt Homocysteinwerte zwischen 20 und 30 $\mu\text{mol/l}$. Der Höchstwert liegt bei 27,5 $\mu\text{mol/l}$ bei der Stufe 5. Die Werte nehmen gleichmäßig von Stufe 5 bis Stufe 3 ab, bei Stufe 2 steigt der Wert nochmals leicht an und sinkt dann bei Stufe 1 auf 13 $\mu\text{mol/l}$ ab.

Homozygote Mutationen: Vergleich von Homocystein mit dem Alter und KHK- Status

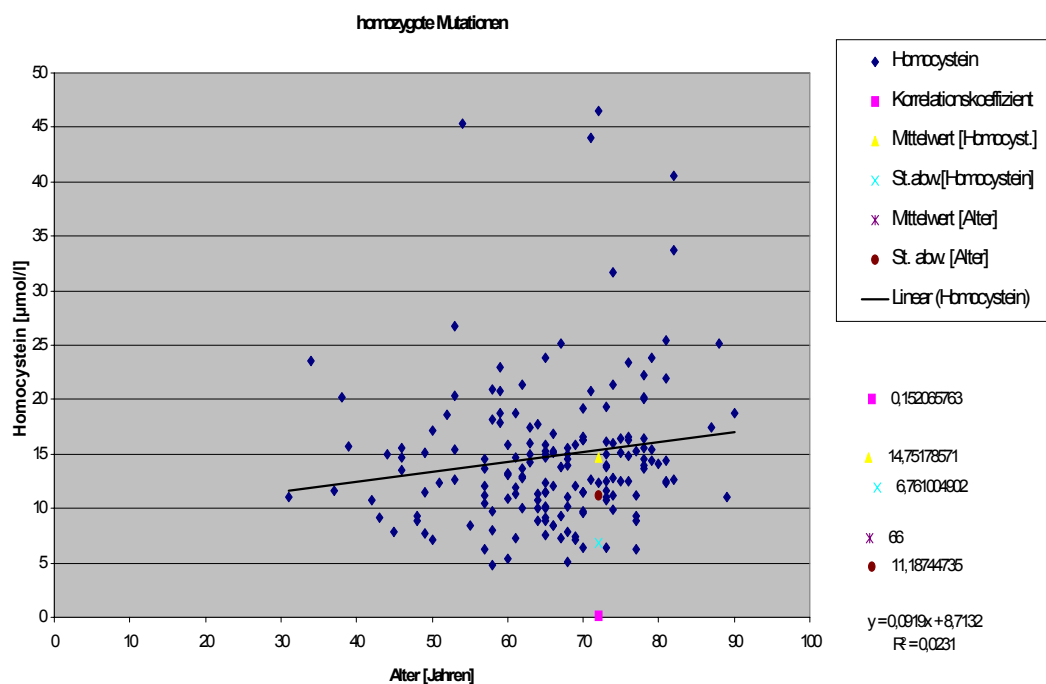


Abb. 5-31) homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem Alter

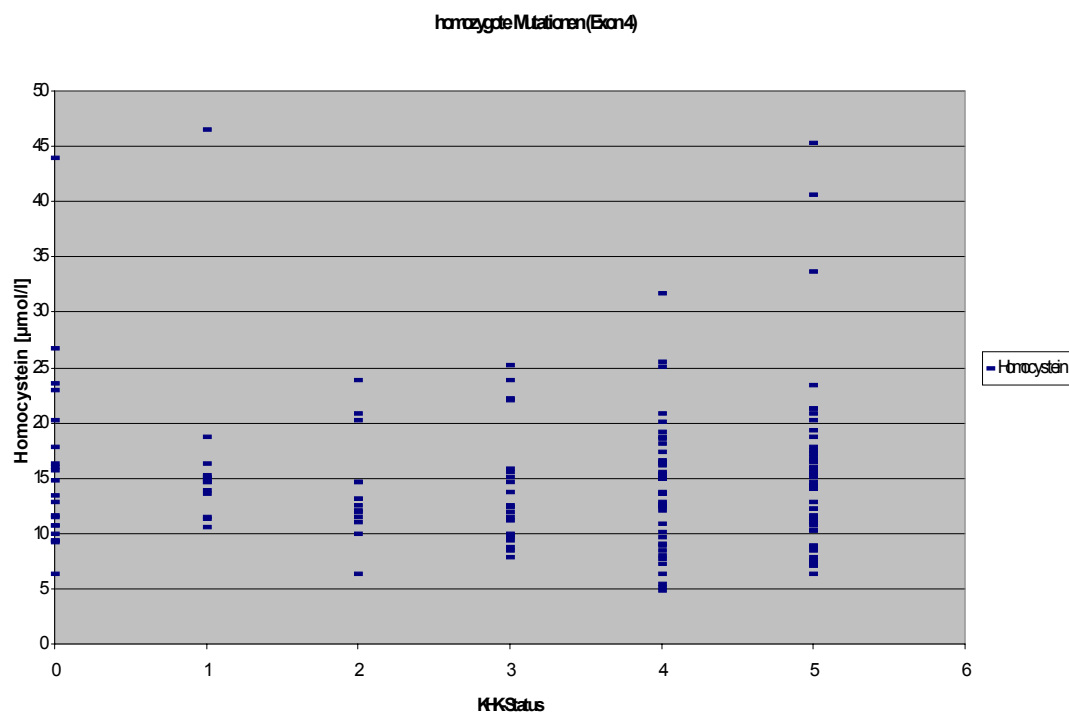


Abb. 5-32) homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status

Erklärung:

Kollektive der homozygoten, heterozygoten und „keine“ Mutationen weisen das gleiche durchschnittliche Alter von 66 Jahren auf mit einer Standardabweichung, die zwischen 10 und 11 liegt. D.h. das Alter ist hier unabhängig von der Art der Mutation.

Die Verteilung der KHK Schweregrade nimmt bei den homozygoten Mutationen gleichmäßig (exponentiell) von Stufe 5 bis Stufe 1 ab. Der Höchstwert von der KHK Stufe 5 liegt bei 45,5 $\mu\text{mol/l}$, der von Stufe 4 bei 32,5 $\mu\text{mol/l}$, von Stufe 3 bei 25,5 $\mu\text{mol/l}$, von Stufe 2 bei 24 $\mu\text{mol/l}$ und von Stufe 1 bei 19 $\mu\text{mol/l}$.

Man erkennt sehr gut, daß schwere Mutationen (homozygote) auch höhere Werte bei den einzelnen Stufen aufweisen. Der Wert bei Stufe 5 ist deutlich erhöht gegenüber dem Wert bei den heterozygoten Mutationen.

Heterozygote Mutationen: Vergleich von Homocystein mit dem Alter und KHK- Status

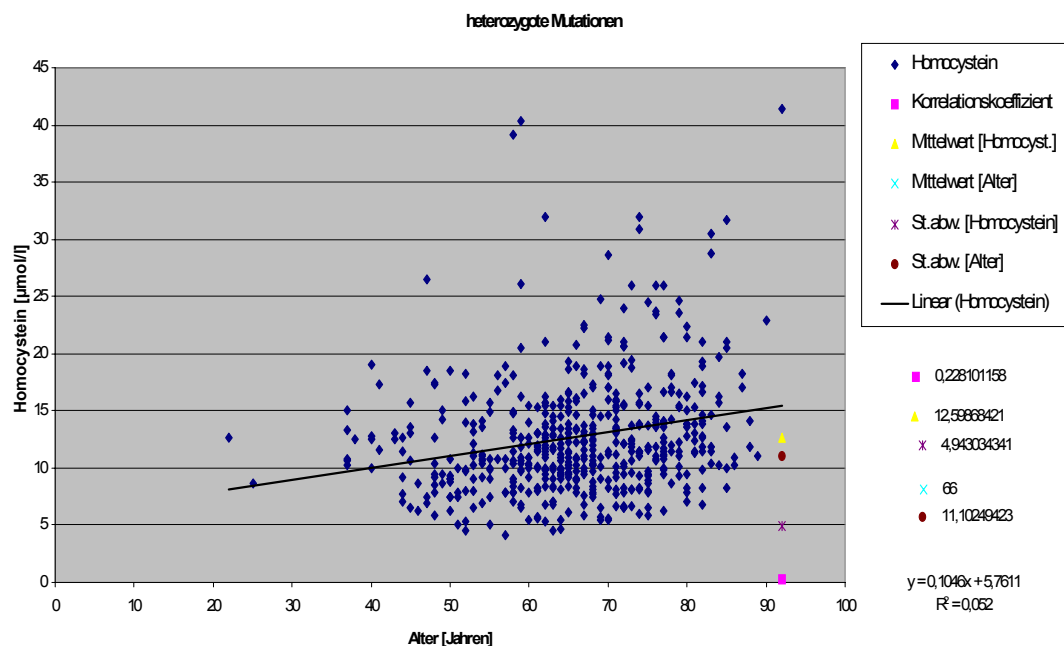


Abb. 5-33) heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem Alter

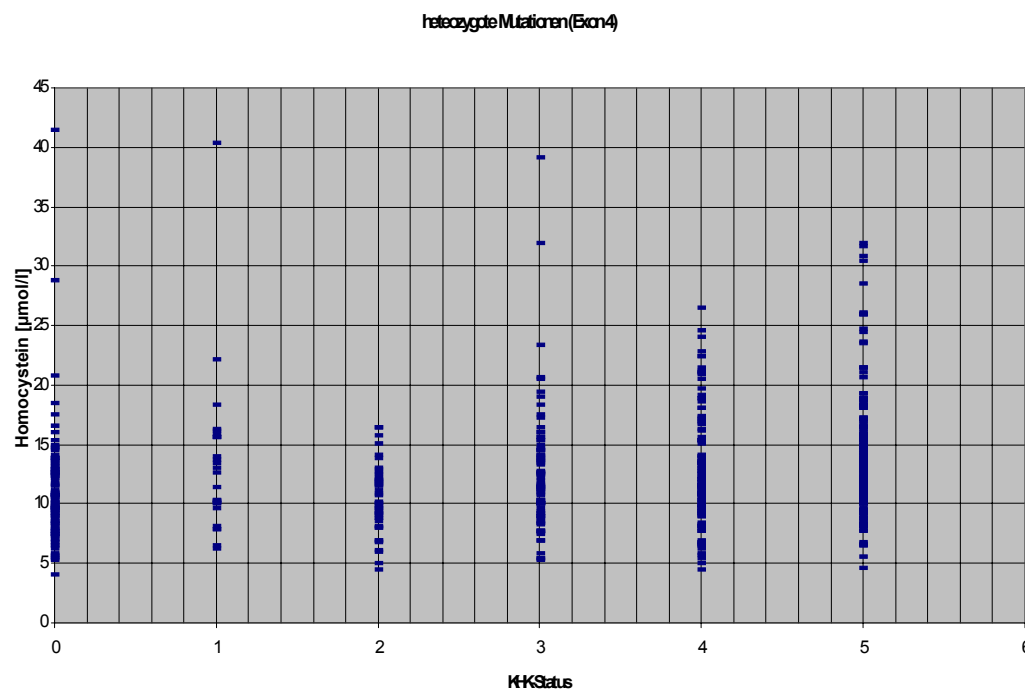


Abb. 5-34) heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status

Erklärung:

Kollektive der homozygoten, heterozygoten und „keine“ Mutationen weisen das gleiche durchschnittliche Alter von 66 Jahren auf mit einer Standardabweichung, die zwischen 10 und 11 liegt. D.h. das Alter ist hier unabhängig von der Art der Mutation.

Bei den heterozygoten Mutationen erkennt man auch eine gleichmäßige Verteilung der KHK Schweregrade, die von Stufe 5 bis Stufe 2 abnimmt, bei Stufe 1 aber wieder ansteigt. Hier liegt der höchste Wert der Stufe 5 bei 32,5 $\mu\text{mol/l}$, der von Stufe 4 bei 27 $\mu\text{mol/l}$, von Stufe 3 bei 23,5 $\mu\text{mol/l}$ und von Stufe 2 bei 17 $\mu\text{mol/l}$. Zwei Abweichungen sind bei Stufe 3 zu erkennen. Diese liegen bei 32 $\mu\text{mol/l}$ und 39 $\mu\text{mol/l}$ Homocystein.

Leichtere Mutationen (heterozygote) haben bei jeder KHK Stufe auch niedrigere Werte im Vergleich zu den homozygoten Mutationen.

Kollektive ohne Mutationen: Vergleich von Homocystein mit dem Alter und KHK- Status

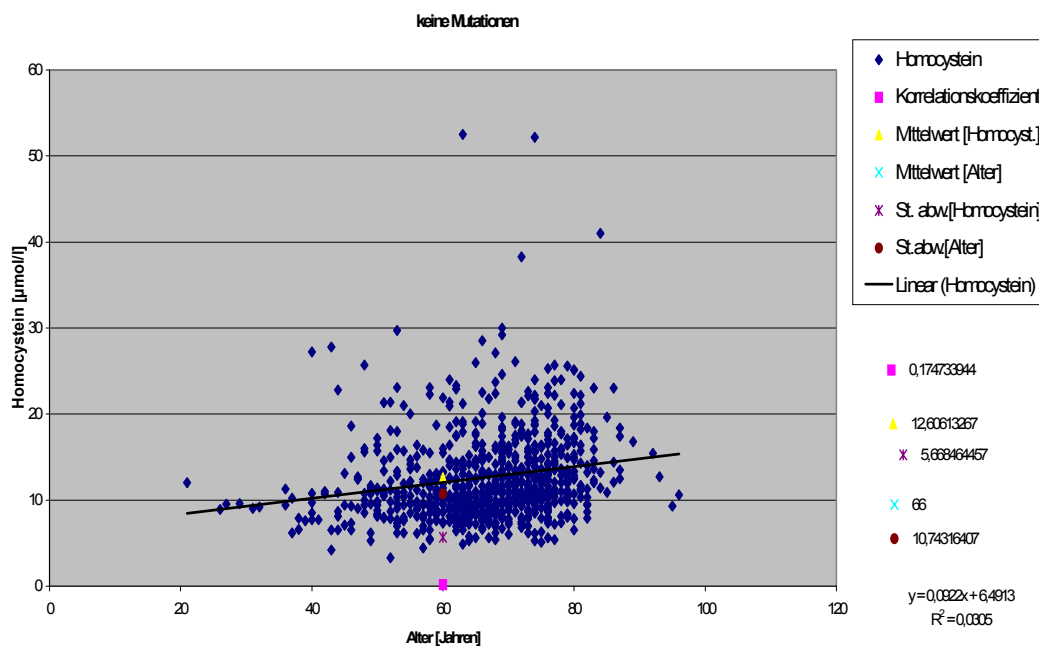


Abb. 5-35) keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem Alter

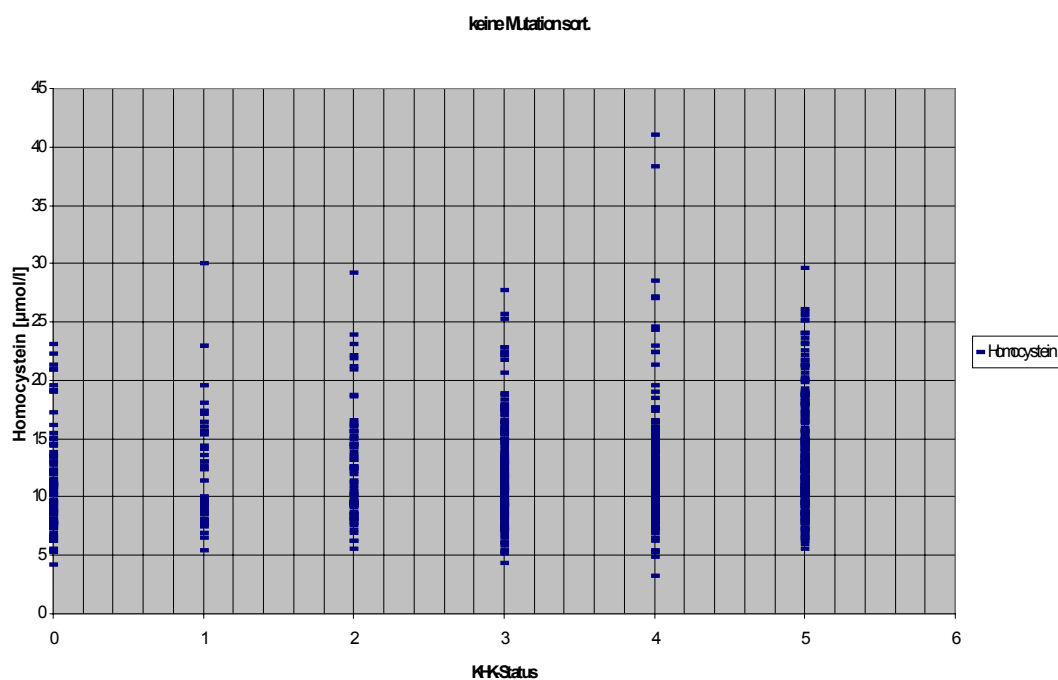


Abb. 5-36) keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status

Erklärung:

Kollektive der homozygoten, heterozygoten und „keine“ Mutationen weisen das gleiche durchschnittliche Alter von 66 Jahren auf mit einer Standardabweichung, die zwischen 10 und 11 liegt. D.h. das Alter ist hier unabhängig von der Art der Mutation.

Das Kollektiv, welches gar keine Mutationen aufweist, hat eine fast gleichmäßige Verteilung der einzelnen KHK-Stufen, d.h. die Werte liegen annähernd alle auf der gleichen Höhe, sie variieren nur zwischen 27 und 30 $\mu\text{mol/l}$.

Die Werte der KHK-Einteilung nehmen minimal von Stufe 5 bis Stufe 3 ab, und steigen dann wieder minimal von Stufe 3 bis Stufe 1. Die Differenz beträgt jeweils immer nur 3 $\mu\text{mol/l}$. Zwei Abweichungen sind auch hier zu erkennen. Bei Stufe 4 liegen die höchsten Werte bei 38 und 41,5 $\mu\text{mol/l}$.

Referenzkollektiv: Vergleich von Homocystein mit dem Alter

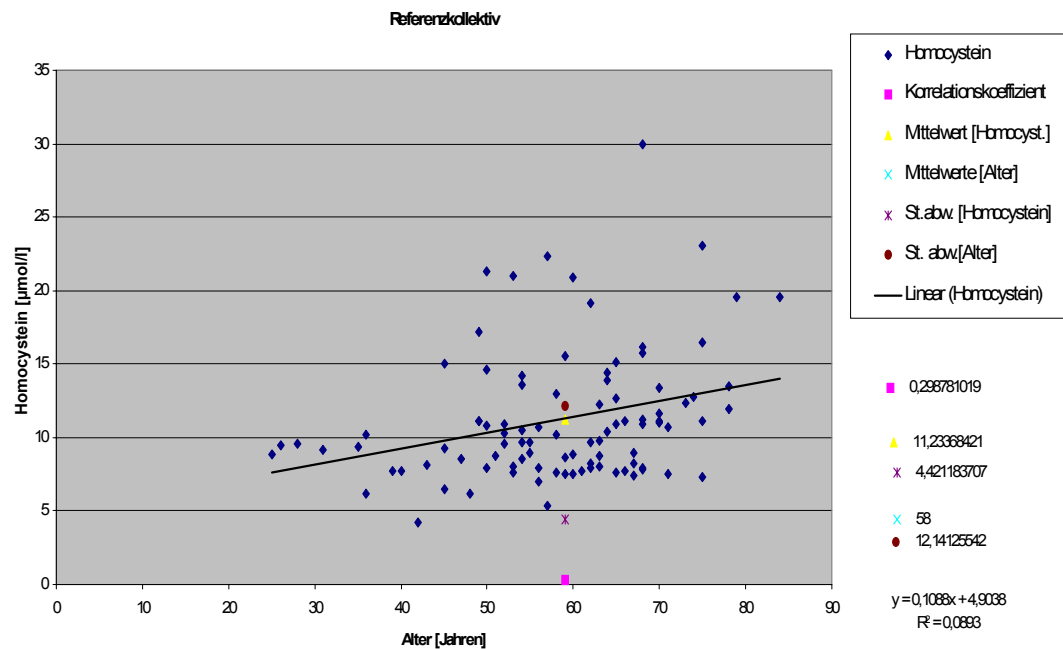


Abb. 5-37) Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und dem Alter

Erklärung:

Erst das Referenzkollektiv bringt den niedrigsten Wert eines Durchschnittsalters von 58 Jahren. Auch der mittlere Homocysteinwert ist hier mit 11,23 µmol/l am niedrigsten. Es zeigt sich also wieder, je niedriger der Homocysteinwert, desto niedriger auch das Durchschnittsalter.

5.2.3. Beschreibung der statistischen Diagramme nach den einzelnen Parametern

5.2.3.1. Folsäure

Wie zu erwarten, ist bei den homozygoten Mutationen der durchschnittliche Homocysteinwert mit $14,75 \mu\text{mol/l}$ am höchsten (Tab. 5-3). Auch die Standardabweichung ist mit 6,76 relativ hoch. Dementsprechend ist natürlich auch der durchschnittliche Folsäurewert mit $6,92 \text{ nmol/l}$ am niedrigsten. Eine Standardabweichung von 2,39 liegt im normalen Bereich.

Bei den heterozygoten Mutationen liegt der durchschnittliche Homocysteinwert bei $12,65 \mu\text{mol/l}$. Damit ist der Wert um 15 % niedriger als bei den homozygoten Mutationen. Die Standardabweichung liegt auch hier mit 5,09 relativ hoch. Der durchschnittliche Folsäurewert der heterozygoten Mutationen liegt bei $7,64 \text{ nmol/l}$, und ist damit um 10 % höher als bei den homozygoten Mutationen. Die Standardabweichung von 2,54 liegt im normalen Bereich. Das Referenzkollektiv hat natürlich den niedrigsten durchschnittlichen Homocysteinwert von $11,23 \mu\text{mol/l}$. Die Standardabweichung ist hier mit 4,42 auch am niedrigsten. Demzufolge ist der durchschnittliche Folsäurewert von $8,19 \text{ nmol/l}$ hier am höchsten. Das Kollektiv mit keinen Mutationen hat einen durchschnittlichen Homocysteinwert von $12,6 \mu\text{mol/l}$ und einen durchschnittlichen Folsäurewert von $7,8 \text{ nmol/l}$. Diese Werte entsprechen etwa denen der heterozygoten Mutationen. Den höchsten durchschnittlichen Homocysteinwert der drei Kollektive besitzt natürlich das 1. Kollektiv mit einem Wert von $20,60 \mu\text{mol/l}$. Die Standardabweichung ist mit 6.01 relativ hoch. Das 2. Kollektiv hat dann nur noch einen Wert von $13,59 \mu\text{mol/l}$, welcher um 34% niedriger ist als beim 1. Kollektiv. Das 3. Kollektiv weist einen Wert auf , der fast um die Hälfte, d.h. um 42% niedriger ist als beim 1. Kollektiv. Er beträgt $11,96 \mu\text{mol/l}$. Hier wurden alle Mutationen gefunden, deshalb ist das 3. Kollektiv auch mit Abstand das wichtigste. Das 1. Kollektiv hat den niedrigsten Folsäurewert von $5,78 \text{ nmol/l}$. Danach folgt das 3. Kollektiv mit $7,73 \text{ nmol/l}$. Das 2. Kollektiv hat den höchsten Folsäurewert von $11,5 \text{ nmol/l}$, weil hier die Folsäurewerte $> 10 \text{ nmol/l}$ sein mußten als Bedingung für das Kollektiv.

Bei allen Kollektiven konnte zwischen Folsäure und Homocystein keine Korrelation festgestellt werden. Es ergab sich lediglich ein negativer Korrelationskoeffizient für alle Kollektive. Der Korrelationskoeffizient des homozygoten Kollektivs beträgt $K = -0,4388$, für das heterozygote Kollektiv beträgt er $K = -0,3629$, für das Kollektiv mit keinen Mutationen ist er $K = -0,3504$ und für das Referenzkollektiv beträgt er $K = -0,33305$.

Die Signifikanz von Folsäure/ Homocystein beträgt für das 1. Kollektiv $p = 2,47218 * 10^{-27}$, für das 2. Kollektiv $p = 1,10169 * 10^{-5}$ und für das 3. Kollektiv $p = 2,88174 * 10^{-26}$. Das Referenzkollektiv hat eine Signifikanz von $p = 5,17174 * 10^{-8}$, für das Kollektiv mit den homozygoten Mutationen ist $p = 8,75972 * 10^{-36}$ und für das Kollektiv mit den heterozygoten Mutationen beträgt $p = 6,7545 * 10^{-78}$. Die Signifikanz der Mittelwerte (Folsäure/ Homocystein) war also bei allen Kollektiven kleiner als $p = 0,0001$. D.h. die Mittelwerte von Folsäure und Homocystein sind also bedeutend unterschiedlich.

5.2.3.2. Vitamin B12

Die Vitamin B12 Werte verhalten sich genauso wie die Folsäurewerte in bezug auf die drei Kollektive. Den niedrigsten Vitamin B12 Wert der drei Kollektive weist wieder das 1. Kollektiv auf und zwar mit 341,58 pmol/l. Danach folgt das 3. Kollektiv mit 352,22 pmol/l. Das 2. Kollektiv hat auch hier den höchsten Vitamin B 12 Wert mit 460,73 pmol/l. Bei den homozygoten Mutationen liegt der Vitamin B12 Wert bei 377,16 pmol/l. Bei den heterozygoten Mutationen liegt dieser Wert um 5,6 % höher und zwar bei 398,34 pmol/l. Aber auch bei dem Kollektiv mit keinen Mutationen liegt der Wert bei 393,8 pmol/l. Nur beim Referenzkollektiv ist der Vitamin B12 Wert am niedrigsten. Er liegt bei 375,19 pmol/l. Auch die Standardabweichung ist mit 175,85 am geringsten.

Bei allen Kollektiven konnte auch hier zwischen Vitamin B12 und Homocystein keine Korrelation festgestellt werden. Es ergab sich lediglich ein negativer Korrelationskoeffizient für alle Kollektive. Der Korrelationskoeffizient beträgt für das homozygote Kollektiv $K = -0,2787$, für das heterozygote Kollektiv $K = -0,1359$, für das Kollektiv mit keinen Mutationen $K = -0,30372$ und für das Referenzkollektiv $K = -0,30372$. Die Signifikanz der Mittelwerte (Vitamin B12 und Homocystein) war bei allen Kollektiven kleiner als $p = 0,0001$. Nur bei dem Kollektiv mit den heterozygoten Mutationen betrug die Signifikanz $p=0$. D.h. in bezug auf das Verhältnis Vitamin B12 und Homocystein sind beide Mittelwerte aller Kollektive signifikant unterschiedlich. Bei dem Kollektiv mit den heterozygoten Mutationen sind die Mittelwerte zwar auch unterschiedlich, aber nicht mehr so bedeutend als wie bei den anderen Kollektiven.

5.2.3.3. Vitamin B6

Das 1. und das 3. Kollektiv hat einen Vitamin B6 Wert von 10,66 ng/ml und 10,67 ng/ml. Die Standardabweichung liegt jeweils bei 7,84 und 8,46. Das 2. Kollektiv hat hier von allen Kollektiven den höchsten Vitamin B6 Wert. Er beträgt 18,60 ng/ml. Außerdem ist hier auch die Standardabweichung von 36,52 außerordentlich hoch. Bei den homozygoten Mutationen beträgt der durchschnittliche Mittelwert von Vitamin B6 12,28 ng/ml, bei den heterozygoten 13,38 ng/ml. Hier ist er leicht erhöht. Das Referenzkollektiv hat einen Vitamin B6 Wert, der leicht unter dem der homozygoten Mutationen liegt. Er beträgt 12,06 ng/ml. Das Kollektiv mit keinen Mutationen hat hier den niedrigsten Vitamin B6 Wert, einen Wert von 11,95 ng/ml.

Bei allen Kollektiven konnte auch hier zwischen Vitamin B6 und Homocystein keine Korrelation festgestellt werden. Es ergab sich lediglich ein negativer Korrelationskoeffizient für alle Kollektive. Der Korrelationskoeffizient beträgt für das homozygote Kollektiv $K = -0,0998$, für das heterozygote Kollektiv $K = -0,04139$, für das Kollektiv mit keinen Mutationen $K = -0,06397$ und für das Referenzkollektiv $K = -0,08149$.

Hier sind zum ersten mal nicht alle Mittelwerte der Kollektive signifikant. Nur das homozygote Kollektiv und das 1. Kollektiv sind signifikant unterschiedlich. Die Signifikanz beträgt für das homozygote Kollektiv $p=0,03082$, wobei die Signifikanz hier nicht sehr stark ausgeprägt ist. Das 1. Kollektiv hat eine Signifikanz von $p < 0,0001$, diese ist sehr ausgeprägt. Die beiden Mittelwerte des heterozygoten Kollektivs, des Referenzkollektiv und des 2. und 3. Kollektivs sind nicht signifikant unterschiedlich, d. h. sie sind signifikant gleich.

5.2.3.4. Alter / Geschlecht

Im gleichen Maß wie der Homocysteinwert vom ersten zum dritten Kollektiv fast um die Hälfte abnimmt, sinkt auch der Mittelwert des Alters. Das heißt je höher der durchschnittliche Homocysteinwert, desto höher auch das durchschnittliche Alter (siehe auch Tab. 5-3).

Die Standardabweichung des mittleren Alters der drei Kollektive liegt ca. immer um den Wert 10. Das heißt hier liegt eine sehr große Streuung der Mittelwerte vor, dementsprechend ist auch hier die Signifikanz sehr hoch, was bedeutet das die Mittelwerte hier signifikant sehr unterschiedlich sind. Kollektive der homozygoten, heterozygoten und „keine“ Mutationen weisen das gleiche durchschnittliche Alter von 66 Jahren auf mit einer Standardabweichung, die zwischen 10 und 11 liegt. D.h. das Alter ist hier unabhängig von der Art der Mutation. Erst das Referenzkollektiv bringt den niedrigsten Wert eines Durchschnittsalters von 58 Jahren. Auch der mittlere Homocysteinwert ist hier mit 11,23 $\mu\text{mol/l}$ am niedrigsten. Es zeigt sich also wieder, je niedriger der Homocysteinwert, desto niedriger auch das Durchschnittsalter.

Bei allen Kollektiven konnte zwischen dem Alter und Homocystein ebenfalls keine Korrelation festgestellt werden. Es ergab sich hier jedoch ein positiver Korrelationskoeffizient für alle Kollektive. Der Korrelationskoeffizient beträgt für das homozygote Kollektiv $K = 0,15206$, für das heterozygote Kollektiv $K = 0,2281$, für das Kollektiv mit keinen Mutationen $= 0,1747$ und für das Referenzkollektiv $K = 0,29878$.

Das Referenzkollektiv, das 1. Kollektiv und das 2. Kollektiv haben eine Signifikanz von $p < 0,0001$. Das homozygote, das heterozygote Kollektiv und das 3. Kollektiv haben eine Signifikanz von 0. In bezug auf das Alter/Homocystein verhalten sich also alle untersuchten Kollektive signifikant unterschiedlich. D.h. alle beiden Mittelwerte der Kollektive sind bedeutend unterschiedlich.

Damit erwies sich das Alter als signifikanter Einflussfaktor.

Auch das Geschlecht hatte Einfluß auf die Homocysteinkonzentration. Die Werte waren bei den Frauen durchschnittlich um 12 % (Patientenkollektiv) bzw. 20 % (Referenzkollektiv) niedriger als bei den Männern.

5.2.3.5. KHK -Status

Die Verteilung der KHK Schweregrade nimmt bei den homozygoten Mutationen gleichmäßig (exponentiell) von Stufe 5 bis Stufe 1 ab. Der Höchstwert von der KHK Stufe 5 liegt bei 45,5 $\mu\text{mol/l}$, der von Stufe 4 bei 32,5 $\mu\text{mol/l}$, von Stufe 3 bei 25,5 $\mu\text{mol/l}$, von Stufe 2 bei 24 $\mu\text{mol/l}$ und von Stufe 1 bei 19 $\mu\text{mol/l}$.

Bei den heterozygoten Mutationen erkennt man auch eine gleichmäßige Verteilung der KHK Schweregrade, die von Stufe 5 bis Stufe 2 abnimmt, bei Stufe 1 aber wieder ansteigt. Hier liegt der höchste Wert der Stufe 5 bei 32,5 $\mu\text{mol/l}$, der von Stufe 4 bei 27 $\mu\text{mol/l}$, von Stufe 3 bei 23,5 $\mu\text{mol/l}$ und von Stufe 2 bei 17 $\mu\text{mol/l}$. Zwei Abweichungen sind bei Stufe 3 zu erkennen. Diese liegen bei 32 $\mu\text{mol/l}$ und 39 $\mu\text{mol/l}$ Homocystein. Man erkennt sehr gut, daß schwere Mutationen (homozygote) auch höhere Werte bei den einzelnen Stufen aufweisen. Der Wert bei Stufe 5 ist deutlich erhöht gegenüber dem Wert bei den heterozygoten Mutationen. Leichtere Mutationen (heterozygote) haben bei jeder KHK Stufe auch niedrigere Werte im Vergleich zu den homozygoten Mutationen.

Das Kollektiv, welches gar keine Mutationen aufweist, hat eine fast gleichmäßige Verteilung der einzelnen KHK-Stufen, d.h. die Werte liegen annähernd alle auf der gleichen Höhe, sie variieren nur zwischen 27 und 30 $\mu\text{mol/l}$.

Die Werte der KHK-Einteilung nehmen minimal von Stufe 5 bis Stufe 3 ab, und steigen dann wieder minimal von Stufe 3 bis Stufe 1. Die Differenz beträgt jeweils immer nur 3 $\mu\text{mol/l}$. Zwei Abweichungen sind auch hier zu erkennen. Bei Stufe 4 liegen die höchsten Werte bei 38 und 41,5 $\mu\text{mol/l}$.

Die Homocysteinwerte des 1. Kollektivs liegen bei ca. 30 $\mu\text{mol/l}$. Die meisten Werte liegen bei den KHK Stufen 3 und 5. Die Werte nehmen minimal von Stufe 1 bis zur Stufe 5 hin ab. Also genau umgekehrt wie bei den homo- und heterozygoten Mutationen. Der Höchstwert liegt bei Stufe 3. Er beträgt 52 $\mu\text{mol/l}$ und stellt hiermit auch eine Abweichung dar.

Das 2. Kollektiv hat die niedrigsten Werte von den drei Kollektiven. Die Werte sind relativ gleichmäßig verteilt. Die KHK-Stufen 2 und 3 besitzen die höchsten Werte, die bei 22,5 $\mu\text{mol/l}$ liegen. Die Stufen 1,4 und 5 liegen bei niedrigeren Werten zwischen 18 und 19 $\mu\text{mol/l}$.

Das 3. Kollektiv besitzt Homocysteinwerte zwischen 20 und 30 $\mu\text{mol/l}$. Der Höchstwert liegt bei 27,5 $\mu\text{mol/l}$ bei der Stufe 5. Die Werte nehmen gleichmäßig von Stufe 5 bis Stufe 3 ab, bei Stufe 2 steigt der Wert nochmals leicht an und sinkt dann bei Stufe 1 auf 13 $\mu\text{mol/l}$ ab.

5.2.3.6. Hypertonie

Mit Hilfe der Tabelle 5-3 erkennt man deutlich, daß die Kollektive mit den höchsten Homocysteinspiegeln wie zum Beispiel das Kollektiv mit den homozygoten Mutationen und das 1. Kollektiv über den höchsten Prozentsatz an Bluthochdruckpatienten verfügen.

Das 1. Kollektiv hat einen Prozentsatz von 67,39% Hypertoniepatienten. Danach folgt das Kollektiv mit den homozygoten Mutationen, hier liegt der Prozentsatz bei 64,28%. Dann kommt das 3. und 2. Kollektiv mit Werten von 61,17% und 60,71%. Erst jetzt kommt das Kollektiv mit den heterozygoten Mutationen mit 58,16%. Das Referenzkollektiv mit den niedrigsten Homocysteinspiegeln hat folglich auch den geringsten Prozentsatz von 50,23% an Bluthochdruckpatienten. D.h. fast jeder Patient mit erhöhten Homocysteinspiegeln ist gleichzeitig auch Hypertoniker.

5.2.3.7. Diabetes

Wie Tabelle 5-3 zeigt, hat den höchsten Prozentwert an Diabetespatienten hier wieder das 1. Kollektiv mit einem Wert von 23,91%. D.h. hier erkrankt maximal jeder vierte Patient an Diabetes. Danach folgt das 2. Kollektiv mit einem Wert von 21,43%. Jetzt schließt sich daran das Kollektiv mit den heterozygoten Mutationen an mit einem Wert von 19,32%. Erst nach dem 3. Kollektiv mit einem Wert von 16,49% folgt das Kollektiv mit den homozygoten Mutationen mit einem Wert von nur 13,29%. D.h. jeder vierte oder fünfte Patient mit erhöhten Homocysteinspiegeln ist auch an Diabetes erkrankt.

5.2.3.8. Rauchen

Das dritte Kollektiv verfügt über den höchsten Anteil an Rauchern mit einem Wert von 69,68% (siehe Tab. 5-3). Hier wurden auch alle Mutationen gefunden. Danach folgt das Kollektiv mit den heterozygoten Mutationen mit einem Wert von 65,10%. Gleich danach schließt sich das Kollektiv mit den homozygoten Mutationen an mit einem Wert von 64,28%. Das 1. und 2. Kollektiv liegt bei Werten von 56,52 und 57,14%.

Man kann also nun eine starke Assoziation der Homocysteinkonzentration mit dem Rauchen feststellen. Die Homocysteinkonzentration stieg dabei fast proportional mit der Anzahl der täglich konsumierten Zigaretten an. Dies belegt auch die Hordaland Homocystein Studie.³³

5.2.3.9. Übersicht der einzelnen kardiovaskulären Risikofaktoren

	Homozyg. Mutation	Heterozyg. Mutation	keine Mutat.	Referenz- kollektiv	1. Kollektiv	2. Kollektiv	3. Kollektiv
Patienten ges.	168	533	799	95	46	56	188
Homocystein [µmol/l][Mittelwert]	14.75	12.65	12.6	11.23	20.6	13.59	11.96
Bluthochdruck [%]	108 64.28%	310 58.16%	468 58.27%	48 50.23%	31 67.39%	34 60.71%	115 61.17%
Diab. mell. [%]	22 13.29%	103 19.32%	131 16.40%	5 5.26%	11 23.91%	12 21.43%	31 16.49%
Rauchen [%]	108 64.28%	347 65.10%	512 64.08%	50 52.63%	26 56.52%	32 57.14%	131 69.68%
Geschlecht 1 (männl.)	115	376	567	55	29	40	104
Geschlecht 2 (weibl.)	53	157	232	40	17	16	84
Alter (Männer) [MW]	66	66	66	58	70.55	68.97	64
Alter (Frauen) [MW]	66	66	66	59	70.57	69.1	65

Tab. 5-3) Kardiovaskuläre Risikofaktoren

5.2.4. Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE)

Anhand von 300 Proben aus der LURIC-Studie wurde für jeden Exonbereich das Mutationsscreening durchgeführt.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist das Erkennen neuer Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere die zum Herzinfarkt führen.

Das Screening erfolgte mit Hilfe der PCR, der Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) und der Restriktionsanalyse.

5.2.4.1. Primerberechnung

Die TGGE nutzt Unterschiede in den Schmelzpunkten doppelsträngiger DNA zu deren Auftrennung (Gotoh und Tagashira 1981, Riesner et. Al. 1991). Auf Grund partieller Denaturierung einzelner Sequenzabschnitte von Amplifikaten in einem Temperatur Gradienten Gel ist es möglich, einzelne Basenunterschiede in DNA-Fragmenten von einer Größe bis maximal 500 Basenpaare sichtbar zu machen. Insgesamt wurde die MTHFR DNA in 6 Teilbereiche (Exon 1 bis 6) amplifiziert. Alle TGGE-Fragmente wurden als überlappende PCR-Fragmente konstruiert. Die Größe der einzelnen Fragmente lag zwischen 111 und 455 Basenpaaren.

Das theoretisch erwartete Denaturierungsverhalten der einzelnen Fragmente wurde mit Hilfe einer PC-Software berechnet. Die von Gerhard Steger entwickelte Poland-Software simuliert die Konformationsänderung doppelsträngiger Nukleinsäuren in einem linearen Temperaturgradienten. In Abbildung 5-38 ist eine Denaturierungskurve am Beispiel des Exon 7 dargestellt. Das Temperaturprofil dieses Fragments weist drei diskrete Schmelzdomänen auf. Optimale TGGE-Fragmente sollten über mindestens drei Schmelzdomänen verfügen, um eine, auch als kontinuierlich bezeichnete, Denaturierung zu ermöglichen. Diese Form der Hitzedenaturierung ist reversibel (Sheffield et al.1989). Reversibilität der Denaturierung ist Voraussetzung für die erfolgreiche TGGE-Analytik eines Amplifikates.

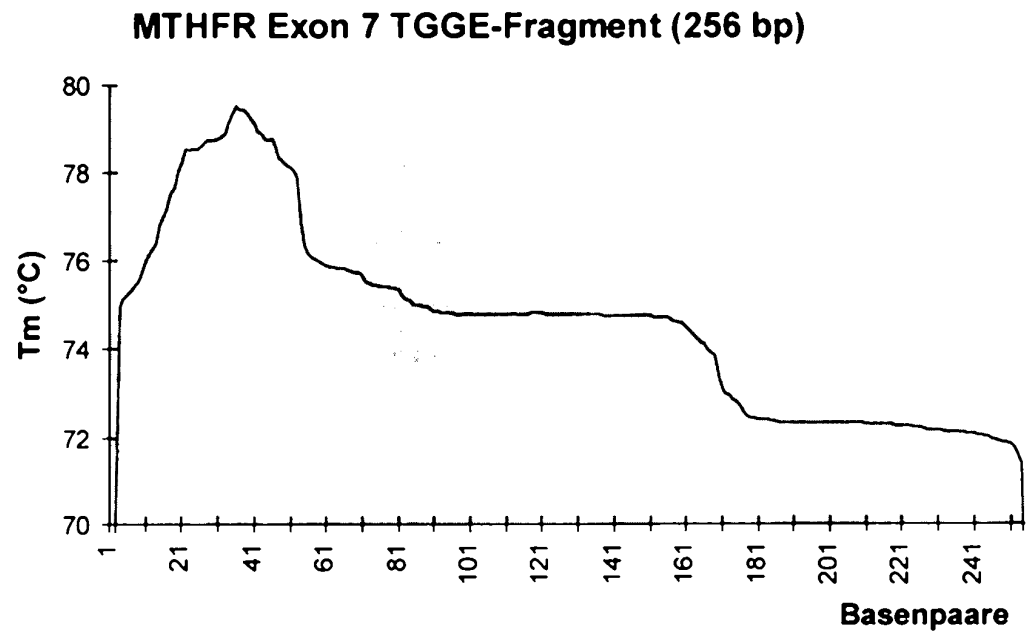


Abb. 5-38) Denaturierungsprofil von Exon 7

Zuerst wurden die bekannten Mutationen auf Exon 4 und Exon 7 durchgescreent, um die Empfindlichkeit der Methode (TGGE) zu überprüfen. Danach wurden die Exonbereiche 1 bis 6 auf neue Mutationen hin untersucht.

Alle Primer ließen sich gut berechnen, nur die Primer für Exon 3 nicht. Hier mußte man die erweiterte Sequenz (Exon 3 und die angrenzenden Introns) eingeben, weil die Sequenz für Exon 3 alleine zu kurz war.

Die Länge der Exonbereiche und die Primersequenzen sind folgender Tabelle zu entnehmen:

Exon	Länge [bp]	Primersequenzen
1	246 bp	1)5-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGT GTG GCT GCC TGC CCC CTG ATG CT-3
		2)5-CAC CAC CAC TCC CGC CTC CCA CCT TA-3
2	239 bp	1)5-TCC TGG AAC CTC TCT TCA GAA ACA AAC C-3
		2)5-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGA CCC AGA GTG TAG GGG AGT GCT GGC T-3
3	111 bp	1)5-AGT AGG GAA GGG CTC TCC AAT CCT-3
		2)5-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGA CCA GGA TGA TCC AGC CAC TCA CC-3
4	194 bp	1)5-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGA GTG GGG TGG AGG GAG CTT ATG-3
		2)5-CCT GAC TGT CAT CCC TAT TGG CAG-3
5	251 bp	1)5-CAG CAG CCG CCA CAG CCC CTC ATG TC-3
		2)5-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGT CCT CTG GGG ATC TCT GGG CCA CTG C-3
6	135 bp	1)5-TCC CTC TAG CCA ATC CCT TGT CT-3
		2)5-GCT CCC AAG AAC AAA GAT GTA TTT-3
7	181 bp	1)5-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGA CTG CCC TCT GTC AGG AGT GTG CC-3
		2)5-GGT CCC CAC TTC CAG CAT CAC TCA-3

Tab. 5-4) Die Länge der Exonbereiche und die Primersequenzen

An Hand einer senkrechten TGGE konnte das Denaturierungsverhalten jedes Fragmentes überprüft werden. Ließ sich kein reversibles Schmelzverhalten der DNA feststellen, wurde die PCR neu konstruiert. In den meisten Fällen jedoch konnte durch den Einbau eines GC-Überhanges am 3- oder 5 Ende des PCR-Fragmentes eine reversible Denaturierung der DNA erreicht werden.

Bei allen Exons (Exon 1 –5) außer Exon 6 wurde durch einen GC-reichen Überhang (20 Basenpaar GC Sequenz) am 5 Ende eines Primers eine Schmelzdomäne mit hoher Stabilität zusätzlich eingeführt. Gleichzeitig erhöht der GC-Überhang die Sensivität der Mutationsdetektion, da im Sequenzbereich, der die höchste Thermostabilität aufweist, die Möglichkeit der Erkennung einer Substitution nur gering ist. Durch Harnstoffzugabe im Gel wurde die Schmelztemperatur T_m der ds DNA vermindert (1M Harnstoff \approx - 2 °C).

Abbildungen 5-39 und 5-40 zeigen die senkrechte Auftrennung von Exon 1 und Exon 6. in einem Temperaturgradienten von 20°C bis 60°C. Der Übergang von doppelsträngiger (ds) in einzelsträngige (ss) DNA ist diskontinuierlich und weist auf ein reversibles Schmelzverhalten dieser Fragmente hin. Der typische S-förmige Verlauf der ds/ss DNA (Abb.5-39 und 5-40) ist kennzeichnend für eine reversible Denaturierung der dsDNA.

In der senkrechten TGGE läßt sich die Transition von dsDNA in ssDNA visuell über das gesamte Spektrum der intramolekularen Konformationsänderungen verfolgen:

Die ds DNA hat die höchste elektrophoretische Beweglichkeit. Sobald die erste Domäne des Moleküls denaturiert, wird die Wanderung im Gel verzögert. Die ds DNA tritt in die Phase partiell fortschreitender Denaturierung. Je weiter die Aufspaltung des Doppelstranges erfolgt, desto schlechter durchläuft das Molekül die Gelmatrix: die Transitionskurve nimmt eine sigmoide Form an. Ist die DNA schließlich komplett denaturiert, bricht die Transitionskurve ab, und die denaturierenden DNA Einzelstränge wandern kontinuierlich linear.

Die Berechnung der Schmelzkurve und die Überprüfung der reversiblen Denaturierung in einer senkrechten TGGE waren Voraussetzung für eine erfolgreiche Mutationsanalyse aller TGGE-Fragmente.



Abb. 5-39) Transitionskurve von Exon 1 (mit GC-Überhang) in einer senkrechten TGGE

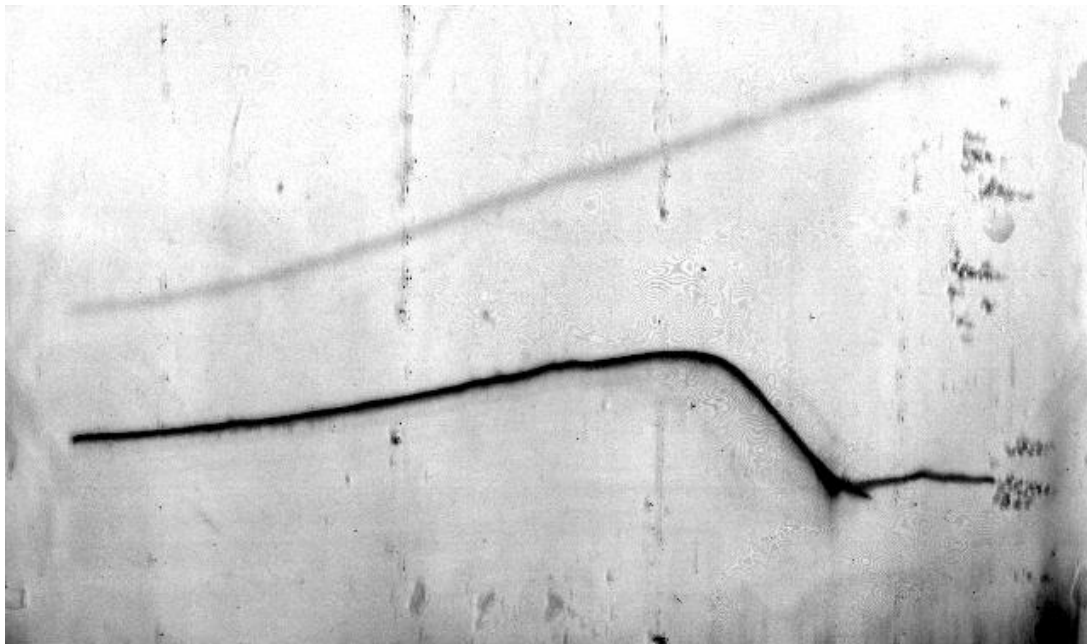


Abb. 5-40) Transitionskurve von Exon 6 (ohne GC-Überhang) in einer senkrechten TGGE

Abb. 5-41) Heteroduplexbanden von Exon 4 mit der (C-677-T) Mutation

Abb. 5-42) Homoduplexbanden von Exon 4 mit der (C-677-T) Mutation

Die Identifizierung heterozygoter Mutationsträger wird durch die Kombination der temperaturabhängigen Denaturierung in der TGGE mit konformationsabhängigen Laufveränderungen im Gel durch Heteroduplexanalyse erleichtert. Bei heterozygotem Genotyp können sich bei der Renaturierung der zuvor erhitzten (denaturierten) ds DNA sowohl komplementäre als auch mutationstragende und wildtypsequenzspezifische ssDNA wieder zusammenlagern. Diese Heterodublexmoleküle werden auf Grund der vorhandenen Fehlpaarung (mismatch) in der Gelmatrix zurückgehalten und erscheinen daher deutlich abgetrennt von den Homoduplexbanden.

Die senkrechte Laufeigenschaft einer DNA Probe (TGGE-Fragment) mit heterozygoter Mutation ist in Abbildung 5-41 dargestellt. In der senkrechten TGGE lassen sich vier Transitionskurven (Abb. 5-41) unterscheiden, die den Homo- und Heterodublex-Molekülen der DNA entsprechen.

In Abb 5-42 ist eine homozygote Mutation dargestellt. Sie weist nur zwei Transitionskurven auf.

Anschließend wurde das Proben-Screening in waagrechten (parallelen) TGGE-Gelen vorgenommen. Im Gegensatz zur senkrechten TGGE verläuft hier der Temperaturgradient parallel zur Laufrichtung der DNA. In parallelen Gelen können bis zu 24 Proben gleichzeitig analysiert werden. Der Temperaturgradient wurde über den Temperaturbereich von beginnender Denaturierung bis hin zum vollständigen Übergang in einzelsträngige DNA des untersuchten Fragmentes festgelegt. Dieser Temperaturbereich variierte zwischen 30°C, bzw 35°C und 50°C, bzw.55°C.

5.2.5. Darstellung der gefundenen Mutationen auf dem MTHFR-Gen

Mit Hilfe der TGGE und anschließender Sequenzierung konnten drei verschiedene Mutationen identifiziert werden:

Auf **Exon 4** ließ sich eine bekannte Mutation und zwar die [C-677-T] mit dem Basenaustausch Alanin gegen Valin an Patient 540 und Patient 786 feststellen. (siehe Abb. 5-43 und 5-44). Dies ließ sich auch durch eine Restriktionsanalyse mit dem bekannten Enzym HinfI bestätigen.

Abb.5-43 und 5-44: Heteroduplexanalyse von Exon 4 (C-677-T) in einer waagrechten TGGE

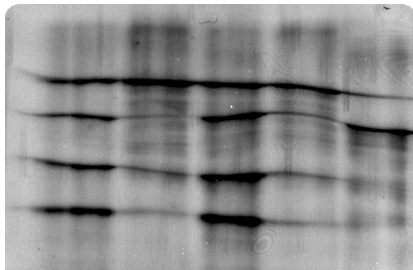


Abb. 5-43) Heteroduplexanalyse von Exon 4 (C-677-T)

- 1. + 3. Bande: heterozygote Mutation
- 2. + 4. Bande: Wildtyp (keine Mutation)
- 5. Bande: homozygote Mutation

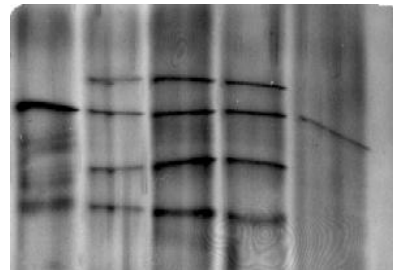


Abb. 5-44) Heteroduplexanalyse von Exon 4 (C-677-T))

- 1. + 5. Bande: homozygote Mutation
- 2. – 4. Bande: heterozygote Mutation

Auf **Exon 6** konnte eine stille Mutation mit dem Basenaustausch [T-1068-C] an zwei Patienten (an Patient 762 und 624) identifiziert werden (siehe Abb. 5-45).

Da die Aminosäure Serin (AGT-AGC) hierbei erhalten bleibt, waren weitere Untersuchungen nicht notwendig.

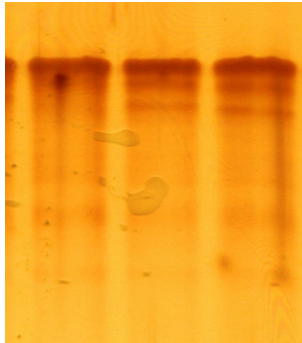


Abb. 5-45) stille Mutation (T-1068-C) auf Exon 6 in einer waagrechten TGGE: mittlere und rechte Bande

Auf **Exon 5** ließ sich eine interessante Mutation feststellen, die in der Literatur noch nicht beschrieben war. Auf dem Polyacrylamidgel erkannte man das typische Bandenmuster einer heterozygoten Mutation (siehe Abb. 5-46). Durch eine anschließende DNA-Isolierung und Sequenzierung erhielt man das Ergebnis. Am Patient 569 entsteht hier durch einen Basenaustausch [C-844-T] aus der Aminosäure Glutamin (CAG) ein *Stopcodon* (*TAG*).



Abb. 5-46) heterozygote Mutation (C-844-T) auf Exon 5 in einer waagrechten TGGE: linke Bande

5.2.5.1. klinische Parameter der gefundenen Mutationen

	Ge- schlecht (m/w)	ge- boren am	Größe in [cm]	Ge- wicht [KG]	KHK- Status	Homo- cystein [μmol/l]	Vit. B6 [ng/ml]	Vit. B12 [pmol/l]	Fol- säure [nmol/l]	Hyper- tonie [0 / 1]	Dia- betes [0 / 1]	Rau- cher [0 / 1]
Exon 6												
Pat.Nr.												
624	m	02.11.38	170	75	2	8.6	23.6	259	9.7	0	0	0
762	m	29.07.28	168	92	5	14.7	21.5	256	6.2	1	0	0
Exon 4												
Pat.Nr.												
540	m	29.04.36	168	93.5	4	12.9	5.8	287	5.3	1	0	0
786	m	29.08.39	172	87.5	5	18.8	58	416	7.5	1	0	1
Exon 5												
Pat.Nr.												
569	m	15.02.44	176	86	3	15.5	8.7	257	4.4	0	0	0

Tab. 5-5) klinische Parameter der gefundenen Mutationen

5.2.5.2. Beschreibung der klinischen Parameter der gefundenen Mutationen

Alter/ Geschlecht

Auffällig ist hier, daß nur männliche Patienten eine Mutation aufweisen.

Die meisten Patienten waren 60 –65 Jahre alt, so daß auch hier das Alter sehr maßgeblich ist.

Die Aussage, daß der Plasmahomocysteinspiegel bei Männern höher liegt als bei Frauen und daß er mit dem Alter ansteigt, belegt die Hordaland Homocystein Studie.³³

KHK

Die fünf Patienten mit der Mutation haben ganz unterschiedliche KHK-Werte, d.h. man kann nicht sagen, daß das Vorliegen einer Mutation auf einen hohen KHK-Wert schließen läßt.

Homocystein

Der Patient mit dem höchsten Homocysteinwert von 18,8 µmol/l besitzt eine Mutation auf Exon 4 und hat gleichfalls den höchsten KHK-Wert von 5. Der Patient mit dem niedrigsten Homocysteinwert von 8,6 µmol/l besitzt eine Mutation auf Exon 6 und hat auch den niedrigsten KHK-Wert von 2. Der Patient mit der neuen Mutation auf Exon 5 hat einen mittleren Homocysteinwert von 15,5 µmol/l und einen mittleren KHK-Wert von 3.

Folsäure

Der Patient mit der neuen Mutation auf Exon 5 hat den niedrigsten Folsäurewert von 4,4 nmol/l. Den höchsten Folsäurewert hatte der Patient 624 mit der Mutation auf Exon 6. Dieser Patient hatte gleichzeitig aber auch den niedrigsten Homocysteinwert, wie zu erwarten war.

Vitamin B12

Auch hier hat der Patient mit der neuen Mutation auf Exon 5 den niedrigsten Vitamin B12 Wert von 257 pmol/l. Der Patient mit dem höchsten Homocysteinwert von 18,8 µmol/l hat auch den höchsten Vitamin B12 Wert von 416 pmol/l.

Vitamin B6

Der Patient 786 mit dem höchsten Homocysteinwert von 18,8 µmol/l hat aber auch hier den höchsten Vitamin B6 Wert. Dieser Wert ist sehr außergewöhnlich und liegt bei 58 ng/ml. Den niedrigsten Vitamin B6 Wert hatte Patient 540 mit einem Wert von 5,8 ng/ml.

Hypertonie/ Diabetes/ Rauchen

Patient 569 mit der neuen Mutation auf Exon 5 und einem mittleren Homocysteinwert von 15,5 µmol/l hatte die niedrigsten Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin B6 Werte. Er hatte dafür aber weder Bluthochdruck noch Diabetes. Raucher war er auch nicht. D.h. er müßte klinisch mit Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin B6 therapiert werden.

Dagegen Patient 786 mit der Mutation auf Exon 4. Er hatte zwar den höchsten Homocysteinwert von 18,8 µmol/l. Er war Raucher und hatte Bluthochdruck. Seine Vitamin B6 und Vitamin B12 Werte waren hingegen sehr hoch, was doch sehr ungewöhnlich dafür war. Man könnte nun mutmaßen, das dieser Patient mit Vitaminen sehr gut therapiert wurde. Der niedrige Folsäurewert von 7,6 nmol/l ist für den hohen Homocysteinwert zu erklären

Patient 624 mit dem niedrigsten Homocysteinwert von 8,6 µmol/l war weder Raucher noch leidete er unter Bluthochdruck oder hatte Diabetes.

5.2.5.3. Agarosegeldarstellung des RFLP Nachweises von Punktmutationen

Etablierung einer neuen Suchmethode

Die neue gefundene Mutation (C-844-T) auf Exon 5 ließ sich durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Mae III bestätigen. Das Restriktionsenzym wurde mit Hilfe eines speziellen Restriktionsprogramms (Full Restriction Map) ermittelt. Dafür war nur die Eingabe der Exonsequenz und die berechneten Primer erforderlich. Das Enzym Mae III ist so konstruiert, daß es bei einer vorhandenen Mutation nicht schneidet. Eine Schnittstelle ergibt sich erst dann, wenn keine Mutation vorliegt (genau andersherum verhält sich das Restriktionsenzym HinfI beim Exon 4).

Mae III erkennt die Sequenz [/GTNAC] und erzeugt Fragmente mit 5'-kohäsiven Enden.

Es wurde eine PCR mit einer Annealingtemperatur von 62°C und einer Länge von 174 bp entwickelt. Der erste konzipierte Primer ist 5'-CCG GGC GCG CCG CGG CCC CGG CTG TCC AAG CTG GAG GTG TCA- 3' und der zweite Primer 5'-GTA GAA GTG GAG GCC TGG CAC C-3'. Der Ansatz für den Restriktionsverdau besteht aus 8µl PCR-Produkt, 10µl NEB-Puffer und 2µl Restriktionsenzym MAE III. Dieser wird nun über Nacht bei 55°C inkubiert. Man trägt nun am nächsten Tag diesen Ansatz auf ein 3% Agarosegel auf und erhält die entsprechenden Banden.

Beim Wildtyp (Patient ohne Mutation) schneidet das Restriktionsenzym Mae III, d.h. hier entsteht eine Schnittstelle.

Beim Mutationstyp schneidet das Enzym Mae III nicht, d.h. hier entsteht keine Schnittstelle.

Die Patienten ohne Mutation zeigen eine Bande bei 156 bp auf. Das Enzym hat hier geschnitten. Patienten mit der neuen Mutation weisen eine andere Basensequenz auf [GTNAT], das Enzym kann hier nicht schneiden. Folglich haben diese Patienten ihre Bande bei 174 bp. Da die Mutation heterozygot ist, liegt die zweite Bande bei 154 bp, weil hier das Enzym schneiden konnte. Damit haben die Patienten mit der Mutation zwei Banden (siehe Abb. 5-47).

Fazit: Entwicklung einer neuen Methode, um die Mutation (C-844-T) auf Exon 5 eindeutig nachzuweisen.

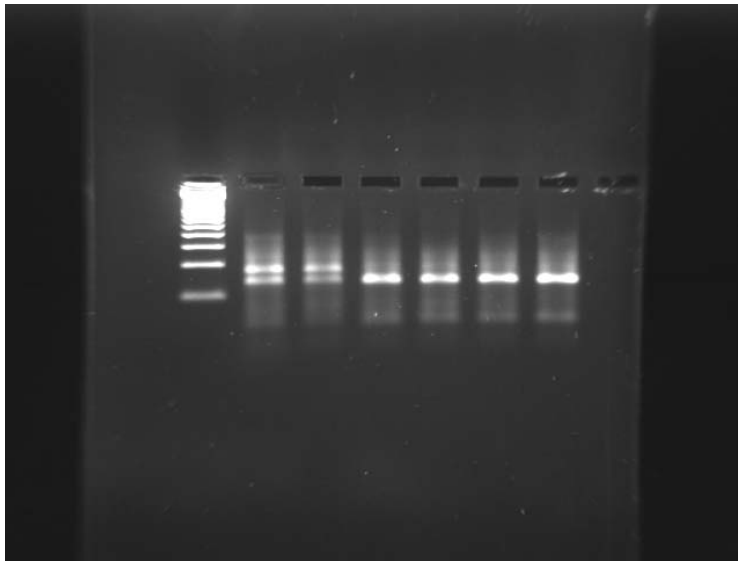


Abb. 5-47) Restriktionsanalyse der Familienmitglieder mit Mae III auf Agarosegel (Exon 5)

Bande 1: 100 Basenpaarmarker, **Bande 2:** Patient mit der Mutation, **Bande 3:** Bruder mit der Mutation **Bande 4:** Mutter ohne Mutation, **Bande 5:** Schwester ohne Mutation, **Bande 6:** Frau ohne Mutation, **Bande 7:** Tochter ohne Mutation

Die bekannte Mutation auf Exon 4 (C-677-T) ließ sich mit HinfI [G/ANTC] auf dem Agarosegel bestätigen (Beschreibung siehe Methodenteil), die auf Exon 7 (C-1298-T) mit Mbo II.

Bei der C-677-T Mutation auf Exon 4 entsteht durch die Mutation eine Schnittstelle. Das Restriktionsenzym HinfI schneidet an der Schnittstelle [G/ANTC]. Es entstehen zwei weitere Banden, die eine ist 186 bp lang, die andere 103 bp lang (siehe Agarosegelbild Abb. 5-48). Beim Wildtyp entsteht keine Schnittstelle. Hier erkennt man nur die eine ungeschnittene Bande, die bei 294 bp liegt.

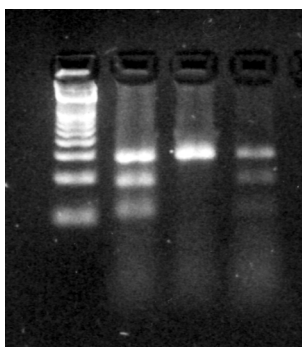


Abb. 5-48) Darstellung der bekannten Mutation auf Exon 4 (C-677-T) auf dem Agarosegel

- | | | |
|----|-------------------------------|------------------------------------|
| 1. | Reihe: Längenmarker | |
| 2. | Reihe: Patient mit Mutation: | 1. Bande: ungeschnitten bei 294 bp |
| | | 2. Bande: geschnitten bei 186 bp |
| | | 3. Bande: geschnitten bei 103 bp |
| 3. | Reihe: Patient ohne Mutation: | ungeschnittene Bande bei 294bp |

5.2.6. Familienanamnese des Mutationsträgers mit der neuen Mutation (C-844-T) auf Exon 5

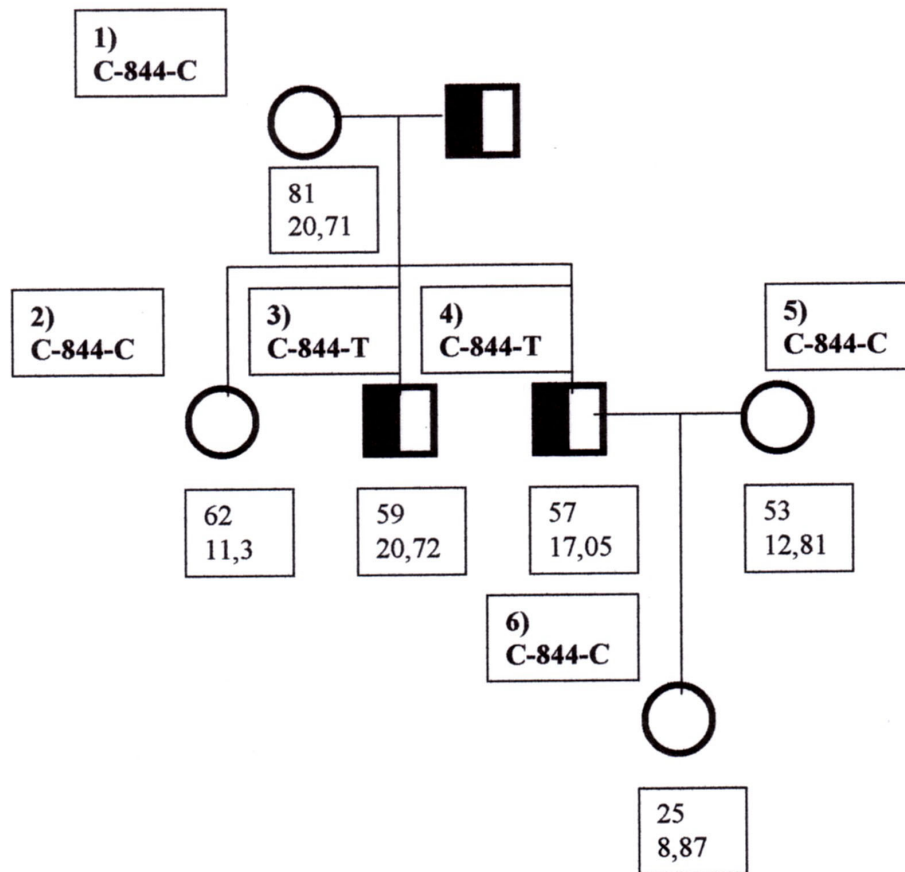


Abb. 5-49) Stammbaum der Familie mit dem Mutationsträger auf Exon 5 (C-844-T)

Kreise: weiblich; Quadrate: männlich; halb gefüllte Quadrate: heterozygote Mutationsträger

Angaben unter den Symbolen: Alter und Homocysteinwerte

Stammbaum der Familie	Alter	Geno- typ	MTHFR- Aktivität	Homo- cystein	Fols- säure	Vitamin B12	Lp (a)	LDL-C	HDL-C	Ges.C	TG
	[Jahre]	844	[nmol CH ₂ O/mg Protein/min]	[μmol/l]	[ng/ml]	[pg/ml]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]
Mutter	81	C-C	10.9	20.71	5	822	26.5	111.54	59.1	182.1	57.3
Schwester	62	C-C	12.5	11.3	6.6	447	3.02	110.96	50.9	195.8	169.7
Bruder	59	C-T	1.8	20.72	4.4	384	3.34	84.42	63.7	157.3	45.9
Mutat. träger	57	C-T	5.4	17.05	5.6	613	53.7	84.42	38.4	138.1	76.4
Frau	53	C-C	10.1	12.81	5.6	464	9.49	62.18	41.8	118.8	74.1
Tochter	25	C-C	9.5	8.87	4.8	1031	56.6				

Tab. 5-6) MTHFR-Aktivität, Homocysteinwerte und Lipidwerte der einzelnen Familienmitglieder

5.2.7. Auswertung

Von allen Familienmitgliedern wurde Blut abgenommen und dieses auf die entsprechenden Werte hin untersucht. Bei der Familienanamnese (siehe Abb. 5-49 und Tab. 5-6) ergab sich, daß der Bruder der Familie die gleiche Mutation an der Position C-844-T hat wie der Patient. Diese Erkenntnis schließt also weitgehend exogene Noxen aus. Beide Mutationsträger der neuen Mutation und die achtzigjährige Großmutter haben erhöhte Homocysteinwerte.

Der erhöhte Homocysteinspiegel der Großmutter ist altersbedingt aufgrund von reduzierter Vitaminzufuhr oder durch Vitaminresorptionsstörungen im Alter zu erklären. Würde man die fehlenden Vitaminedefizite ausgleichen, so würde sich auch automatisch der Homocysteinspiegel senken.

Die erhöhten Homocysteinspiegel der Brüder lassen sich durch die hier gefundene Mutation erklären. Durch die Mutation bedingt, sind auch die MTHFR-Aktivitäten reduziert. Der Mutationsträger besitzt eine MTHFR-Aktivität von 5,4 nmol CH₂O/mg Protein /min, sein Bruder eine deutlich kleinere MTHFR-Aktivität von 1,8 nmol CH₂O/mg Protein /min. Der Bruder mit der kleinsten MTHFR-Aktivität hat den höchsten Homocysteinwert und die geringsten Folsäure- und Vitamin B12-Werte. Folglich würde sich hier eine Therapie mit Folsäure und Vitamin B12 anbieten. Der Mutationsträger hat hingegen ein etwas besseren Folsäure und Vitamin B12 Wert, dafür aber einen sehr hohen Lpa-Wert von 53,7 mg/dl. Auch seine Tochter mit einem Alter von 25 Jahren hat einen erhöhten Wert von 56,6 mg/dl von Ihrem Vater geerbt.

Die Mutter und die Schwester des Mutationsträgers haben erhöhte Werte von LDL-C und Gesamtcholesterin und nur die Schwester hat auch erhöhte Werte von Triglyceriden. Also auch die Familienmitglieder des Mutationsträgers sind erheblich mit erhöhten Lipidwerten vorbelastet. Es würde sich also für jeden hier aus der Familie eine fett- und cholesterinarme Kost (Diät) anbieten, um weitere Risikofaktoren für eine Arteriosklerose auszuschließen.

6. Diskussion

6.1. Proteinchemischer Teil (Teil A)

Der Methodenvergleich HPLC / Elisa ergab, daß die Werte bei dem Elisa-Kit generell niedriger liegen als bei einer HPLC-Messung. Laut Literatur³² beträgt hier die Gleichung für die Regressionsgerade des Methodenvergleichs (HPLC/ ELISA): $y = 0.933x + 0,184$

Der Korrelationskoeffizient der Firma Axis Biochemicals ASA liegt bei 0,94 (Korrelationskoeffizient).

Der Korrelationskoeffizient aus dem Methodenvergleich der hier vorliegenden Arbeit liegt bei 0,85587, also etwas niedriger als der vorgegebene Wert. Er weicht um ca. 9 % von dem Literaturwert ab.

In der Literatur differieren die Homocysteinwerte zwischen den beiden Systemen um 5 –10 %. In der praktischen Arbeit betrug die Differenz der Homocysteinwerte des Methodenvergleichs 4,77 %, also entsprechend der vorgegebenen Literatur.

Wenn Homocystein in absehbarer Zeit als Parameter der Arteriosklerose- oder Thrombose-Diagnostik anerkannt wird, wird sich wohl der bei hohem Probenaufkommen leistungsfähigere Immunoassay durchsetzen. Im Augenblick sind jedoch die HPLC-Verfahren weit verbreitet und werden auch im Rahmen großer Untersuchungen wie z.B. der Framingham- Studie für die Messung von Homocystein verwendet.

6.2. Molekularbiologischer Teil (Teil B)

6.2.1. Korrelation und Signifikanz der einzelnen Kollektive

Bei jeder Art von **Korrelationsuntersuchungen** in den einzelnen Kollektiven (1. Kollektiv, 2. Kollektiv, 3. Kollektiv, homozygoten Kollektiv, heterozygoten Kollektiv und Referenzkollektiv) konnte zwischen Homocystein und Folsäure, zwischen Homocystein und Vitamin B12, zwischen Homocystein und Vitamin B6 und Homocystein und dem Alter keine Korrelation festgestellt werden. Die Korrelationen lagen alle unter $-0,5$ und $0,3$.

Einen negativen Korrelationskoeffizienten weisen die Parameter Homocystein/Folsäure, Homocystein/Vitamin B12 und Homocystein/Vitamin B6 auf. Einen positiven Korrelationskoeffizienten weisen Homocystein und das Alter auf. D.h. man kann nun schlußfolgern, daß die einzelnen Parameter sich nicht gegenseitig stark beeinflussen, sie sind nicht direkt abhängig voneinander. Die Stoffwechselwege sind nicht miteinander verknüpft.

Bei den **Signifikanzuntersuchungen** ergab sich, daß fast alle Mittelwerte der einzelnen Kollektive signifikant unterschiedlich sind. Die Mittelwerte aller Kollektive von Folsäure/Homocystein, Vitamin B12/Homocystein und das Alter/Homocystein sind signifikant unterschiedlich. Nur bei dem Vergleich Vitamin B6/Homocystein ist bei den meisten Kollektiven keine Signifikanz festgestellt worden. D. h. diese Mittelwerte sind annähernd gleich, sie sind nicht bedeutend unterschiedlich. Nur das 1. Kollektiv und das homozygote Kollektiv sind bei dem Vergleich der Mittelwerte Vitamin B6/Homocystein signifikant unterschiedlich. D. h. auch hier beeinflussen sich die einzelnen Parameter gegenseitig nicht sehr stark, sie sind nicht direkt abhängig voneinander.

6.2.2. Vergleich erhöhter Homocysteinwerte zwischen Luric Studie und Literatur

Ein Vergleich der Homocysteinwerte aus der Luric Studie und der in der Literatur³⁴ beschriebenen Werte ergibt größtenteils eine Übereinstimmung sowohl mit dem Referenzkollektiv als auch mit dem Patientenkollektiv (siehe Tab. 6-1). Das Patientenkollektiv aus der Literatur besitzt einen Plasmahomocysteinspiegel von $11,08 \pm 4,96 \mu\text{mol/l}$. Das Patientenkollektiv (3.Kollektiv) aus der Luric-Studie hat einen Plasmahomocysteinwert von $11,96 \mu\text{mol/l}$.

Das Referenzkollektiv weist in der Literatur einen Homocysteinwert von $9,79 \pm 3,05 \mu\text{mol/l}$ auf, in der Luric-Studie hat das Referenzkollektiv einen Wert von $11,23 \mu\text{mol/l}$. Der Vitamin B12 Wert des Patientenkollektivs aus der Literatur beträgt $266,1 \pm 122,5 \text{ pmol/l}$. Der Vitamin B12 Wert des Patientenkollektivs aus der Luric-Studie beträgt $352,22 \text{ pmol/l}$ (siehe Tab. 6-1).

Im Referenzkollektiv beträgt der Literaturwert $258,1 \pm 121,7 \text{ pmol/l}$ und in der Luric-Studie ist der Wert des Referenzkollektivs $375,19 \text{ pmol/l}$.

Der Folsäurespiegel entspricht sowohl im Patienten- als auch im Referenzkollektiv nicht. Im Vergleich zur Luric-Studie ist er in der Literatur jeweils um ca. $2 - 2,5 \text{ nmol/l}$ höher.

		Luric-Studie		Literatur	Abweichung
Homocystein	Patientenkollektiv	11,96	entspricht	11,08	$\pm 4,96$
Homocystein	Referenzkollektiv	11,23	entspricht	9,79	$\pm 3,05$
Vitamin B12	Patientenkollektiv	352,22	entspricht	266,1	$\pm 122,5$
Vitamin B12	Referenzkollektiv	375,19	entspricht	258,1	$\pm 121,7$
Folsäure	Patientenkollektiv		entspricht nicht		
Folsäure	Referenzkollektiv		entspricht nicht		

Tab. 6-1) Vergleich relevanter Werte zwischen Arbeit und Literatur

Die Aussage, daß der Plasmahomocysteinspiegel bei Männern höher liegt als bei Frauen und daß er mit dem Alter ansteigt, belegt die Hordaland Homocystein Studie.³³

- 6.2.3. Gegenüberstellung der neuen gefundenen Mutation auf Exon 5 (C-844-T) mit einer Familienstudie mit folgenden bekannten Mutationen [(A-28-T) auf Exon 1, (C-677-T) auf Exon 4, (A-1298-C) auf Exon 7 und (C-1615-T) auf Exon 9]

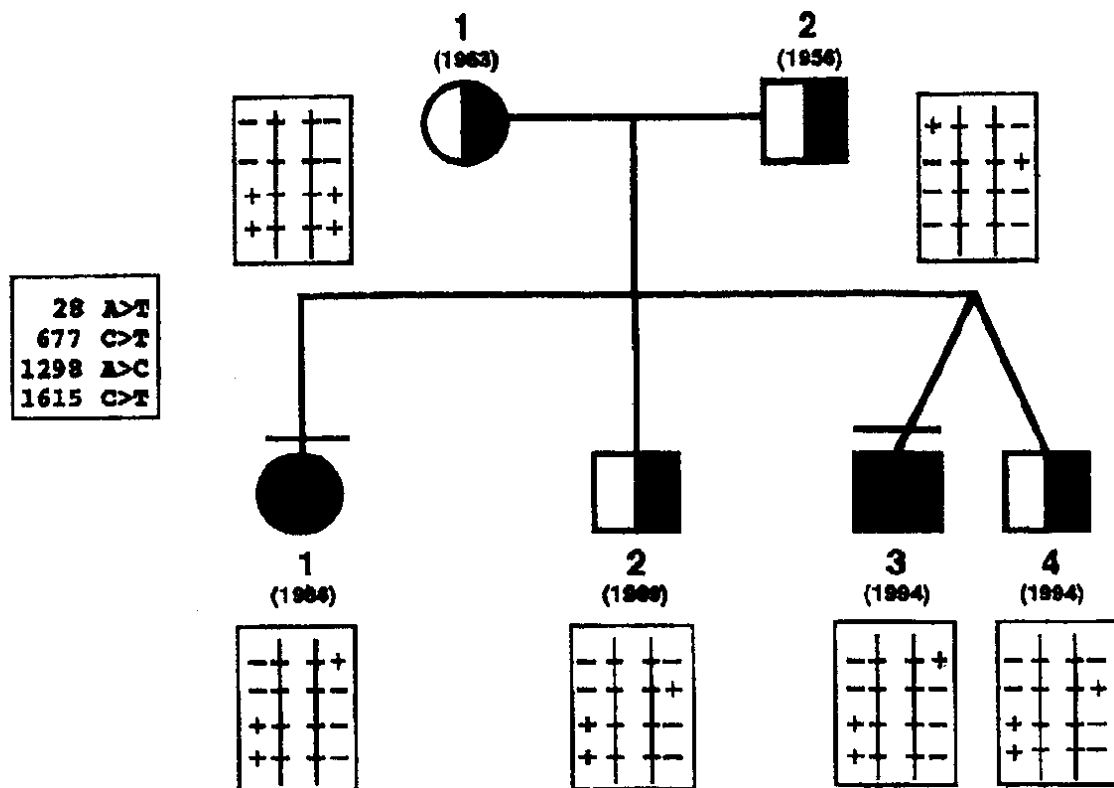


Abb. 6-1) Stammbaum der Familie mit den Mutationen bei den Eltern und Kindern

Die Familienstudie aus der Literatur³⁵ zeigt eine phänotypisch gesunde Mutter und einen phänotypisch kranken Vater ähnlich wie bei der eigenen gefundenen Mutation (siehe Abb. 6-1).

Die Mutter (1) ist zwar hier genotypisch krank. Sie zeigt eine neue homozygote Mutation (C-1615-T) auf Exon 9 und eine weitere bekannte homozygote Mutation (A-1298-C) auf Exon 7.

Der Vater (2) trägt hier eine heterozygote Mutation (A-28-T) mit dem Stopcodon auf Exon 1 und ebenfalls eine weitere bekannte heterozygote Mutation (C-677-T) auf Exon 4.

Obwohl die Mutter zwei homozygote Mutationen trägt, ist sie phänotypisch gesund; d.h. sie hat klinisch und biochemisch normale Werte. Dies lässt sich dadurch erklären, daß diese Mutationen auf einem Exonabschnitt liegen, der nicht für die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich ist. Dennoch ist die MTHFR-Aktivität moderat reduziert. Der Plasmahomocysteinspiegel der Mutter liegt bei 15,6 µmol/l. Er liegt deutlich im Normalbereich. Die MTHFR-Aktivität liegt bei 2,3 nmol CH₂O/h per mg Protein. Sie ist moderat reduziert.

Beim Vater hingegen liegen beide heterozygote Mutationen in Exonbereichen, die für die katalytische Aktivität des Enzyms maßgeblich sind. Infolgedessen hat der Vater damit natürlich eine deutlich geringe MTHFR-Aktivität. Er hat starke biochemische Abnormalitäten, eine Hyperhomocysteinämie und einen geringen

Methylfolatstatus in den roten Blutzellen. Der Plasmahomocysteinspiegel liegt bei 54 $\mu\text{mol/l}$, er ist deutlich erhöht. Die MTHFR-Aktivität liegt bei 1,6 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$, sie ist deutlich erniedrigt. Ansonsten ist er aber klinisch gesund.

Zwei von den insgesamt vier Kindern der Familie tragen sowohl die heterozygote Mutation auf Exon 1 mit dem Stopcodon vom Vater als auch die heterozygote Mutation auf Exon 9 von der Mutter (siehe Abb. 6-1).

Diese beiden Kinder haben starke biochemische Abnormalitäten und sind sehr krank.

Die kranke Tochter (1) hat einen stark erhöhten Plasmahomocysteinspiegel von 84 $\mu\text{mol/l}$ und eine sehr geringe MTHFR-Aktivität von 0,65 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$.

Der kranke Sohn (3) hat ebenfalls einen stark erhöhten Plasmahomocysteinspiegel von 90 $\mu\text{mol/l}$ und eine sehr geringe MTHFR-Aktivität von 0,66 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$.

Die zwei anderen Kinder (2 und 4), die die Mutation vom Vater nicht geerbt haben, sind beide gesund und verfügen über biochemische Werte im Normalbereich.

Die Plasmahomocysteinspiegel beider gesunder Kinder sind leicht erhöht und liegen bei 21,1 $\mu\text{mol/l}$ und bei 26,9 $\mu\text{mol/l}$.

Die MTHFR-Aktivität ist um etwa 30 % reduziert und liegt bei 2,4 und 3,6 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$.

Alle vier Kinder tragen die heterozygote Mutation der Mutter auf Exon 9 und die bekannte Mutation (A-1298-C) in heterozygoter Form, die auch von der Mutter vererbt worden ist. Wohingegen nur zwei der Kinder (1 und 3) jeweils die Mutation mit dem Stopcodon vom Vater tragen (zwei „kranke“ Kinder) und die anderen zwei (2 und 4) die bekannte Mutation (C-677-T) auf Exon 4 vom Vater tragen (zwei „gesunde“ Kinder).

Beim Vergleich der Homocysteinwerte der neuen gefundenen heterozygoten Mutation (C-844-T) auf Exon 5 mit den Literaturwerten fällt auf, daß der Literaturhomocysteinwert von 54 $\mu\text{mol/l}$ (heterozygote Mutation mit Stopcodon auf Exon 1) deutlich höher liegt als der Homocysteinwert (17,05 $\mu\text{mol/l}$) des Indexpatienten der neuen gefundenen Mutation. Dies hat zum einen molekulare Ursachen (Exon 1 besitzt das Startcodon) und zum anderen besitzt der Träger der Mutation mit dem Stopcodon auf Exon 1 noch eine weitere bekannte heterozygote Mutation (C-677-T) auf Exon 4. Diese zwei Mutationen liegen beide auf Exonabschnitten, welche für die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich sind. Folglich addieren sie sich in der Wirkung. D.h. der Homocysteinspiegel ist deutlich erhöht und die MTHFR-Aktivität ist deutlich erniedrigt.

Vergleicht man die MTHFR-Aktivitäten, so erkennt man, daß der Literaturwert von 1,6 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$ hier deutlich geringer ausfällt als der MTHFR-Aktivitätswert der gefundenen Mutation auf Exon 5. Dieser liegt bei 5,4 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$. Vergleicht man nun weiter die Werte mit den kranken Kindern, so läßt sich erkennen, daß je mehr Mutationen in den entsprechenden katalytischen Exonabschnitten vorliegen, desto höher steigt der Homocysteinspiegel. Er liegt bei den erkrankten Kindern bei 84 und 90 $\mu\text{mol/l}$. Im Gegensatz dazu sinkt die MTHFR-Aktivität deutlich. Sie liegt dann nur noch bei 0,65 und 0,66 $\text{nmol CH}_2\text{O/h per mg Protein}$. Die Plasmafolatspiegel verhalten sich konträr zu den Homocysteinspiegeln.

Die Mutter mit einem Plasmahomocysteinspiegel von 15,6 $\mu\text{mol/l}$ hat einen Plasmafolatwert von 9,5 $\mu\text{g/l}$. Der Vater mit einem Plasmahomocysteinspiegel von 54 $\mu\text{mol/l}$ hat einen Plasmafolatwert von 3,6 $\mu\text{g/l}$. Die zwei kranken Kinder haben einen Plasmahomocysteinspiegel von 84 und 90 $\mu\text{mol/l}$ und dementsprechend einen Plasmafolatwert von 4,8 und 5,8 $\mu\text{g/l}$. Die zwei gesunden Kinder weisen einen Plasmahomocysteinspiegel von 21 und 26,9 $\mu\text{mol/l}$ auf und haben einen Plasmafolatwert von 7,6 und 6,4 $\mu\text{g/l}$.

Der Mutationsträger der gefundenen Mutation auf Exon 5 mit dem Plasmahomocysteinspiegel von 17,05 $\mu\text{mol/l}$ hat einen Folatwert von 5,6 ng/ml . Sein Bruder mit der gleichen Mutation auf Exon 5 hat einen Plasmahomocysteinspiegel von 20,72 $\mu\text{mol/l}$ und einen Folatwert von 4,4 ng/ml .

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß je höher der Plasmahomocysteinspiegel ist, desto niedriger ist der Folatwert. Das läßt sich sowohl für die Literaturwerte als auch für die eigene gefundene Mutation bestätigen.

7. Zusammenfassung

Die Hyperhomocysteinämie wird als unabhängiger Risikofaktor atherosklerotischer Gefäßerkrankungen angesehen. Viele Studien haben eine deutliche Korrelation zwischen Hyperhomocysteinämie, koronarer Herzkrankheit, cerebrovaskulären und peripheren thromboembolischen Erkrankungen aufgezeigt.

Aus diesem Grund hat natürlich die Homocysteinbestimmung in die diagnostischen Maßnahmen, die bei Verdacht auf Arteriosklerose durchgeführt werden, Eingang gefunden. Mit der Zielsetzung, ein zuverlässiges und standardisiertes Verfahren für die Routinediagnostik bereitzustellen, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine quantitative HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Blut etabliert. Weiterhin erfolgte auch eine Homocysteinbestimmung mit dem ELISA und im Anschluß daran ein Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA.

Der Methodenvergleich ergab, daß die ELISA-Homocysteinwerte immer um etwa 4,77% niedriger lagen als die HPLC-Homocysteinwerte. Dies bestätigte auch die Literatur. Die wichtigste Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit war allerdings die Suche nach einer neuen genetischen Mutation auf dem MTHFR-Gen mittels Probenscreening von Patienten mit Hyperhomocysteinämien. Die katalytische Domäne der MTHFR liegt im N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser Bereich entspricht Exon 1 bis Exon 6 des MTHFR-Gens. Folglich wurde für diese Exonbereiche 1,2,3,4,5 und 6 das Mutationsscreening etabliert. Dieses ließ sich mit der Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) erfolgreich durchführen, wobei für jeden Exonbereich 300 Proben aus der LURIC-Studie durchgemessen worden sind. LURIC steht für **L**Udwigshafener **R**isikofaktor- und **C**ardiovaskuläre Gesundheits-Studie. Das Ziel dieser Untersuchungen ist das Erkennen neuer Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere die zum Herzinfarkt führen. Für alle Probenwerte erhielten wir Angaben über Geschlecht, Geburtsdatum, Größe, Gewicht, KHK-Status, Hypertonie, Diabetes mellitus, Homocystein, Vitamin B6, Vitamin B12 und Folsäure. Nach eingehender Betrachtung ließen sich nun drei Kollektive mit unterschiedlichen Homocystein-/ Folsäurewerten ermitteln, welche dann durchgescreent wurden:

Das erste Kollektiv erfaßt Homocysteinwerte, welche größer als 16µmol/l sind und zwar unabhängig von den Folsäurewerten.

Das zweite Kollektiv enthält Homocysteinwerte, welche größer als 10µmol/l sind und Folsäurewerte, welche ebenfalls größer als 10 µmol/l sind.

Das dritte Kollektiv ist das größte und enthält die übrigen Werte, welche negativ auf schon bekannte Mutationen auf Exon 4 und Exon 7 sind. Dieses Kollektiv wurde hier zunächst betrachtet und enthält etwa für jeden Exonbereich 200 Proben.

Bei jeder Art von Korrelationsuntersuchungen in den einzelnen Kollektiven (1. Kollektiv, 2. Kollektiv, 3. Kollektiv, homozygotes Kollektiv, heterozygotes Kollektiv und Referenzkollektiv) konnte zwischen Homocystein und Folsäure, zwischen Homocystein und Vitamin B12, zwischen Homocystein und Vitamin B6 und Homocystein und dem Alter keine Korrelation festgestellt werden. Die Korrelationen lagen alle unter -0,5 und 0,3. Einen negativen Korrelationskoeffizienten weisen die Parameter Homocystein/Folsäure, Homocystein/Vitamin B12 und Homocystein/Vitamin B6 auf.

Einen positiven Korrelationskoeffizienten weisen Homocystein und das Alter auf.

Bei den Signifikanzuntersuchungen ergab sich, daß fast alle Mittelwerte der einzelnen Kollektive signifikant unterschiedlich sind.

Die Mittelwerte aller Kollektive von Folsäure/Homocystein, Vitamin B12/Homocystein und das Alter/Homocystein sind signifikant unterschiedlich

Nur bei dem Vergleich Vitamin B6/Homocystein ist bei den meisten Kollektiven keine Signifikanz festgestellt worden. D. h. diese Mittelwerte sind annähernd gleich, sie sind nicht bedeutend unterschiedlich.

Nur das 1. Kollektiv und das homozygote Kollektiv sind bei dem Vergleich der Mittelwerte Vitamin B6/Homocystein signifikant unterschiedlich.

Mit Hilfe der TGGE und anschließender Sequenzierung konnten drei verschiedene Mutationen identifiziert werden:

Auf Exon 4 ließ sich eine bekannte Mutation und zwar die (C-677-T) mit dem Basenaustausch Alanin gegen Valin an Patient 540 und Patient 786 feststellen. Dies ließ sich auch durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym HinfI bestätigen.

Auf Exon 6 konnte eine stille Mutation mit dem Basenaustausch (T-1068-C) an zwei Patienten (762 und 624) identifiziert werden. Die Aminosäure Serin bleibt hierbei erhalten (AGT-AGC).

Auf Exon 5 ließ sich eine interessante Mutation erkennen, welche weitere Messungen wie Enzymaktivität und Familienanamnesen erfordert.

Am Patient 569 entsteht hier durch einen Basenaustausch (C-844-T) aus der Aminosäure Glutamin (CAG) ein Stopcodon (TAG). Dies ließ sich weiterhin durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Mae III bestätigen. Erhöhte Homocysteinspiegel und reduzierte MTHFR-Aktivitäten erklären ebenfalls das Mutationsergebnis.

Auch die Familienanamnese ergab eine interessante Entdeckung. Die gleiche Mutation (C-844-T) vom Patienten 569 ließ sich auch bei seinem Bruder feststellen. Damit wurde die Mutation vererbt und ereignete sich nicht spontan.

Anhang

MTHFR cDNA

656 AA, Mw 74538 Da

gggtgtggctgcctgccccctgatgctccctgccccaccctgtgcagtagg AAC CCA GCC

Exon 1

10	ATG	GTG	AAC	GAA	GCC	AGA	GGA	AAC	AGC	AGC	CTC	AAC	CCC
1	MET	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Gly	Asn	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro
52	TGC	TTG	GAG	GGC	AGT	GCC	AGC	AGT	GGC	AGT	GAG	AGC	TCC
14	Cys	Leu	Glu	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Ser	Lys
94	GAT	AGT	TCG	AGA	TGT	TCC	ACC	CCG	GGC	CTG	GAC	CCT	GAG
28	Asp	Ser	Ser	Arg	Cys	Ser	Thr	Pro	Gly	Leu	Asp	Pro	Arg
136	CAT	GAG	AGA	CTC	CGG	GAG	AAG	ATG	AGG	CGG	CGA	TTG	GAA
42	His	Glu	Arg	Leu	Arg	Glu	Lys	MET	Arg	Arg	Arg	Leu	Ser
178	GGT	GAC	AAG	TGG	TTC	TCC	CTG	GAA	TTC	TTC	CCT	CCT	CGA
56	Gly	Asp	Lys	Trp	Phe	Ser	Leu	Glu	Phe	Phe	Pro	Pro	Arg

Exon 2

220	GCT	GAG	GGA	GCT	GTC	AAT	CTC	ATC	TCA	AGG	TTT	GAC	CGG
70	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Asn	Leu	Ile	Ser	Arg	Phe	Asp	Arg
80													
262	GCA	GCA	GGT	GGC	CCC	CTC	TAC	ATA	GAC	GTG	ACC	TGG	CAC
84	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Tyr	Ile	Asp	Val	Thr	Trp	His
304	GCA	GGT	GAC	CCT	GGC	TCA	GAC	AAG	GAG	ACC	TCC	TCC	ATG
98	Ala	Gly	Asp	Pro	Gly	Ser	Asp	Lys	Glu	Thr	Ser	Ser	MET
346	ATC	GCC	AGC	ACC	GCC	GTG	AAC	TAC	TGT	GGC	CTG	GAG	ACC
112	Ile	Ala	Ser	Thr	Ala	Val	Asn	Tyr	Cys	Gly	Leu	Glu	Thr
388	CTG	CAC	ATG	ACC	TGC	TGC	CGT	CAG	CGC	CTG	GAG	GAG	ATC
126	Leu	His	MET	Thr	Cys	Cys	Arg	Gln	Arg	Leu	Glu	Glu	Ile
430	GGC	CAT	CTG	CAC	AAA	GCT	AAG	CAG	CTG	GGC	CTG	AAG	AAC
140	Gly	His	Leu	His	Lys	Ala	Lys	Gln	Leu	Gly	Leu	Lys	Asn

Exon 3

472	ATG	GCG	CTG	CGG	GGA	GAC	CCA	ATA	GGT	GAC	CAG	TGG	GAA
154	MET	Ala	Leu	Arg	Gly	Asp	Pro	Ile	Gly	Asp	Gln	Trp	Glu
159													
514	GAG	GAG	GGA	GGC	TTC	AAC	TAC	GCA	GTG	GAC	CTG	GTG	AAG
168	Glu	Glu	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Lys
556	ATC	CGA	AGT	GAG	TTT	GGT	GAC	TAC	TTT	GAC	ATC	TGT	GTG
182	Ile	Arg	Ser	Glu	Phe	Gly	Asp	Tyr	Phe	Asp	Ile	Cys	Val

Exon 4

598	GGT	TAC	CCC	AAA	GGC	CAC	CCC	GAA	GCA	GGG	AGC	TTT	GAG
196	Gly	Tyr	Pro	Lys	Gly	His	Pro	Glu	Ala	Gly	Ser	Phe	Glu
196													

T(C-677-T) Mutation

640	GAC	CTG	AAG	CAC	TTG	AAG	GAG	AAG	GTG	TCT	GCG	GGA	GCC
210	Asp	Leu	Lys	His	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ser	Ala	Gly	Ala
Val													

682 TTC ATC ATC ACG CAG CTT TTC TTT GAG GCT GAC ACA TTC TTC
 224 Phe Ile Ile Thr Gln Leu Phe Phe Glu Ala Asp Thr Phe Phe

 724 CGC TTT GTG AAG GCA TGC ACC GAC ATG GGC ATC ACT TGC CCC
 238 Arg Phe Val Lys Ala Cys Thr Asp MET Gly Ile Thr Cys Pro
 | **Exon 5**
 766 ATC GTC CCC GGG ATC TTT CCC ATC CAG GGC TAC CAC TCC CTT
 252 Ile Val Pro Gly Ile Phe Pro Ile Gln Gly Tyr His Ser Leu
 261
 808 CGG CAG CTT GTG AAG CTG TCC AAG CTG GAG GTG CCA CAG GAG
 266 Arg Gln Leu Val Lys Leu Ser Lys Leu Glu Val Pro Gln Glu

 850 ATC AAG GAC GTG ATT GAG CCA ATC AAA GAC AAC GAT GCT GCC
 280 Ile Lys Asp Val Ile Glu Pro Ile Lys Asp Asn Asp Ala Ala

 892 ATC CGC AAC TAT GGC ATC GAG CTG GCC GTG AGC CTG TGC CAG
 294 Ile Arg Asn Tyr Gly Ile Glu Leu Ala Val Ser Leu Cys Gln

 934 GAG CTT CTG GCC AGT GGC TTG GTG CCA GGC CTC CAC TTC TAC
 308 Glu Leu Leu Ala Ser Gly Leu Val Pro Gly Leu His Phe Tyr

 976 ACC CTC AAC CGC GAG ATG GCT ACC ACA GAG GTG CTG AAG CGC
 322 Thr Leu Asn Arg Glu MET Ala Thr Thr Glu Val Leu Lys Arg
 | **Exon 6**
 1018 CTG GGG ATG TGG ACT GAG GAC CCC AGG CGT CCC CTA CCC TGG
 336 Leu Gly MET Trp Thr Glu Asp Pro Arg Arg Pro Leu Pro Trp
 345
 1060 GCT CTC AGT GCC CAC CCC AAG CGC CGA GAG GAA GAT GTA CGT
 350 Ala Leu Ser Ala His Pro Lys Arg Arg Glu Glu Asp Val Arg

 1102 CCC ATC TTC TGG GCC TCC AGA CCA AAG AGT TAC ATC TAC CGT
 364 Pro Ile Phe Trp Ala Ser Arg Pro Lys Ser Tyr Ile Tyr Arg
 | **Exon 7**
 1144 ACC CAG GAG TGG GAC GAG TTC CCT AAC GGC CGC TGG GGC AAT
 378 Thr Gln Glu Trp Asp Glu Phe Pro Asn Gly Arg Trp Gly Asn
 390
 1186 TCC TCT TCC CCT GCC TTT GGG GAG CTG AAG GAC TAC TAC CTC
 392 Ser Ser Ser Pro Ala Phe Gly Glu Leu Lys Asp Tyr Tyr Leu

 1228 TTC TAC CTG AAG AGC AAG TCC CCC AAG GAG GAG CTG CTG AAG
 406 Phe Tyr Leu Lys Ser Lys Ser Pro Lys Glu Glu Leu Leu Lys
C (A-1298-C) Mutation
 1270 ATG TGG GGG GAG GAG CTG ACC AGT ~~GAA~~ GCA AGT GTC TTT GAA
 420 Met Trp Gln Glu Glu Leu Thr Ser Glu Ala Ser Val Phe Glu
Ala
 1312 GTC TTT GTT CTT TAC CTC TCG GGA GAA CCA AAC CGG AAT GGT
 434 Val Phe Val Leu Tyr Leu Ser Gly Glu Pro Asn Arg Asn Gly
 | **Exon 8**
 1354 CAC AAA, GTG ACT TGC CTG CCC TGG AAC GAT GAG CCC CTG GCG
 448 His Lys Val Thr Cys Leu Pro Trp Asn Asp Glu Pro Leu Ala
 450
 1396 GCT GAG ACC AGC CTG CTG AAG GAG GAG CTG CTG CGG GTG AAC
 462 Ala Glu Thr Ser Leu Leu Lys Glu Glu Leu Leu Arg Val Asn

1438 CGC CAG GGC ATC CTC ACC ATC AAC TCA CAG CCC AAC ATC AAC
476 Arg Gln Gly Ile Leu Thr Ile Asn Ser Gln Pro Asn Ile Asn

1480 GGG AAG CCG TCC TCC GAC CCC ATC GTG GGC TGG GGC CCC AGC
490 Gly Lys Pro Ser Ser Asp Pro Ile Val Gly Trp Gly Pro Ser

| **Exon 9**

1522 GGG GGC TAT GTC TTC CAG AAG GCC TAC TTA GAG TTT TTC ACT
504 Gly Gly Tyr Val Phe Gln Lys Ala Tyr Leu Glu Phe Phe Thr

511

1564 TCC CGC GAG ACA GCG GAA GCA CTT CTG CAA GTG CTG AAG AAG
518 Ser Arg Glu Thr Ala Gly Ala Leu Leu Gln Val Leu Lys Lys

| **Exon 10**

1606 TAC GAG CTC CGG GTT AAT TAC CAC CTT GTC AAT GTG AAG GGT
532 Tyr Glu Leu Arg Val Asn Tyr His Leu Val Asn Val Lys Gly

545

1648 GAA AAC ATC ACC AAT GCC CCT GAA CTG CAG CCG AAT GCT GTC
546 Glu Asn Ile Thr Asn Ala Pro Glu Leu Gln Pro Asn Ala Val

1690 ACT TGG GGC ATC TTC CCT GGG CGA GAG ATC ATC CAG CCC ACC
560 Thr Trp Gly Ile Phe Pro Gly Arg Glu Ile Leu Gln Pro Thr

| **Exon 11**

1732 GTA GTG GAT CCC GTC AGC TTC ATG TTC TGG AAG GAC GAG GCC
574 Val Val Asp Pro Val Ser Phe MET Phe Trp Lys Asp Glu Ala

585

1774 TTT GCC CTG TGG ATT GAG CGG TGG GGA AAG CTG TAT GAG GAG
588 Phe Ala Leu Trp Ile Glu Arg Trp Gly Lys Leu Tyr Glu Glu

1816 GAG TCC CCG TCC CGC ACC ATC ATC CAG TAC ATC CAC GAC AAC
602 Glu Ser Pro Ser Arg Thr Ile Ile Gln Tyr Ile His Asp Asn

1858 TAC TTC CTG GTC AAC CTG GTG GAC AAT GAC TTC CCA CTG GAC
616 Tyr Phe Leu Val Asn Leu Val Asp Asn Asp Phe Pro Leu Asp

1900 AAC TGC CTC TGG CAG GTG GTG GAA GAC ACA TTG GAG CTT CTC
630 Asn Cys Leu Trp Gln Val Val Glu Asp Thr Leu Glu Leu Leu

1942 AAC AGG CCC ACC CAG AAT GCG AGA GAA ACG GAG GCT CCA TGA
644 Asn Arg Pro Thr Gln Asn Ala Arg Glu Thr Glu Ala Pro Stop

ccctgcgtcctgacgcctgcgttgagccactcctgtccccgccttcctcct

ccacagtgtgtcttctcttgggaactccactctccttcgtgtctctcccaccccg

gcctccactccccacctgacaatggcagctagactggagtgaggcttcaggct

cttcctggacctgagtcggccccacatgggAacctagtactctctgctctagcca

ggagtctgtgtctcttttgggtggggagcacttgetcctgcagaggac

Literatur

1. Carson, N.A., J. Neill, D.W.
Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch. Dis. Child. 37 (1962) 505-513
2. Gerritson, T., Vaughn, J.G., Waisman, H.A.
The identification of homocysteine in the urine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9 (1962) 493-496
3. Angelo, A. di, Selhub, J.
Homocysteine and thrombotic disease.
Blood 90 (1997) 1-11
4. Bostom, A.G., Lathrop, L.
Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes.
Kidney Int. 52 (1997) 10-20
5. McCully, K.S.
Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis.
Ann. Clin. Lab. Sci. 23 (1993) 477-493
6. McCully, K.S.
Homocysteine and vascular disease.
Nat. Med. 2 (1996) 386-389
7. Harpel, P.C., Chang, V.T., Borth, W.
Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 10193-10197
8. McCully, Kilmer S.
Homocysteine and vascular disease
Nature Medicine, Volume 2, Number 4 , April 1996
9. Fortin, L-J., Genest, J.
Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis.
Clin. Biochem. 28 (1995) 155-162
10. Malinow, M.R.
Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases (Frontiers in medicine).
J. Intern. Med. 236 (1994) 603-617
11. Ueland, P.M., Refsum, H., Stabler, S.P., Malinow, M. R., Andersson, A., Allen, R.H.
Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.
Clin. Chem. 39 (1993) 1764-1779

-
12. Jacobson, D.W.
Cardiovascular disorders (risk assessment).
Anal. Chem. 65 (1993) 367-373
 13. Wilcken, D.E.L., Wilcken, B., Dudman, N.P.B., Tyrell, P.A.
Homocystinuria – the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine.
N. Engl. J. Med. 309 (1983) 448-453
 14. Kluijtmans, L.A.J., van den Heuvel, L.P.W.J., Boers, G.H.J., Frosst, P., Stevens, E.M.B., van Oost, B.A., den Heijer, M., Trijbels, F.J.M., Rozen, R., Blom, H.J.
Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease.
Am. J. Hum. Genet. 58 (1996) 35-41
 15. Bostom, A.G., Jacques, P.F., Nadeau, M.R., Williams, R.R., Ellison, R.C., Selhub, J.
Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study.
Atherosclerosis 116 (1995) 147-151
 16. Shih, V.E., Fringer, J.M., Mandell, R., Kraus, J.P., Berry, G.T., Heidenreich, R.A., Korson, M.S., Levy, H.L., Ramesh, V.
A missense mutation (1278T) in the cystathionine β -synthase gene prevalent in pyridoxine-responsive homocystinuria and associated with mild clinical phenotype.
Am. J. Hum. Genet. 57 (1995) 34-39
 17. Goyette, P., Frosst, P., Rosenblatt, D.S., Rozen, R.
Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency.
Am. J. Hum. Genet. 56 (1995) 1052-1059
 18. Thomas, Prof. Dr. L.
Views and reviews, Aktuelle Labor-Information von Dade Behring 3/98
 19. Biesalski, H.K., Köhrle, J., Schümann, K.
Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe
Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen
Georg Thieme Verlag
 20. Selhub, J., Jacques, P.F., Wilson, P.W.F., Rush, D., Rosenberg, I.H.
Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population.
JAMA 270 (1993) 2693-2698

-
21. Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G.
A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease.
Probable benefits of increasing folic acid intakes.
JAMA 274 (1995) 1049-1057
 22. Ubbink, J.B., Vermaak, W.J.H., van der Merwe, A., Becker, P.J., Delport, R., Potgieter, H.C.
Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans.
J. Nutr. 124 (1994) 1927-1933
 23. Morrison, H.I., Schaubel, D., Desmeules, M., Wigle, D.T.
Serum folate and risk of total coronary heart disease.
JAMA 275 (1996) 1893-1896
 24. Jacques, P.F., Bostom, A.G., Williams, R.R., Ellison, R.S., Eckfeldt, J.H., Rosenberg, I.H., Selhub, J., Rozen, R.
Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.
Circulation 93 (1996) 7-9
 25. Joosten, E., Lesaffre, R., Riezler, R.
Are different reference intervals for methylmalonic acid and total homocysteine necessary in elderly people?
Eur. J. Haematol. 57 (1996) 222-226
 26. Stampfer, M.J., Rimm, E.B.
Folate and cardiovascular disease. Why we need a trial now.
JAMA 275 (1996) 1929-1930
 27. Stampfer, M.J., Malinow, M.R., Willett, W.C., Newcomer, L. M., Upson, B., Ullmann, D., Tishler, P.V., Hennekens, C.H.
A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians.
JAMA 268 (1992) 877-881
 28. Fisher, Eva
Struktur- Funktionsbeziehungen bei Apolipoproteinen:
Genetische Varianten am Apolipoprotein B-Lokus als Ursache atherogener
Hypercholesterinämien; Dissertation 2000
 29. Prem Sobti, Sheldon P. Rothenberg, Edward V. Quadros
Radioenzymatic assay for reductive catalysis of N⁵, N¹⁰ – methylenetetrahydrofolate by
methylenetetrahydrofolate reductase
J. Biochem. Biophys. Methods 46 (2000) 11-20

-
30. Donald W. Jacobsen et al.
Rapid HPLC Determination of total Homocysteine and other thiols in Serum and Plasma:
Sex Differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects
Clinical . Chemistry, Vol. 40, No. 6, 873-881 (1994)
 31. Axis Homocystein ELISA Packungsbeilage
Axis Biochemicals ASA
 32. Frank Frantzen, Arne Ludvig Faaren, Ingrid Alfheim, and Arne Kristian Nordhei
Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum.
Clinical Chemistry 44:2, Seite 311-316 (1998)
 33. Nygard, O, Vollset, S.E., Refsum, H, Stensfold, I.,
Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine
Study.
JAMA 274 (1995) 1526-1533
 34. Lalouschek, W.
Genetic and nongenetic factors influencing plasma homocysteine levels in patients with
ischemic cerebrovascular disease and in healthy control subjects.
J. Lab Clin Med, June 1999, Volume 133, Number 6
 35. Tonetti, C.
Impact of new mutations in the methylentetrahydrofolate reductase gene assessed on
biochemical phenotypes: A familial study:
J. Inherit. Metab. Diss 24 (2001) 833-842

Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Strukturformeln und Konzentrationen von Homocystein , Homocystin und Homocystein-Cystein- Dimere
- 1.2 Homocysteinstoffwechsel
- 1.3 Arterioskleroseentstehung durch Homocystein
- 1.4 MTHFR-Gen mit allen 11 Exonbereichen
- 1.5 Escherichia coli MTHFR
- 4.1 Der Axis Homocystein Test in zwei Schritten
- 4.2 Axis Homocystein ELISA Test
- 4.3 Testkomponenten für Axis Homocystein ELISA Test
- 4.4 Silberfärbung nach Qiagen, TGGE Handbuch
- 5.1 HPLC-Chromatogramm von einem Standardhomocysteinpeak
- 5.2 HPLC-Chromatogramm von einem Probenhomocysteinpeak
- 5.3 Reaktion des Fluoreszenzreagenzes Monobrombiman mit Thiolverbindungen
- 5.4 Standardkurve 1 von Homocystein
- 5.5 Standardkurve 2 von Homocystein
- 5.6 Probenmessung von Homocystein
- 5.7 Standardkurve (Kalibrationskurve) vom ELISA
- 5.8 Methodenvergleich zwischen HPLC,ELISA und vorgegebenen Werten
- 5.9 Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA
- 5.10 1., 2. und 3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure
- 5.11 1., 2. und 3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12
- 5.12 1., 2. und 3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6
- 5.13 homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure
- 5.14 homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12
- 5.15 homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6
- 5.16 heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure
- 5.17 heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12
- 5.18 heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und VitaminB6
- 5.19 keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure
- 5.20 keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12
- 5.21 keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6
- 5.22 Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Folsäure
- 5.23 Referenzkollektiv Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B12
- 5.24 Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Vitamin B6
- 5.25 1. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
- 5.26 1. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status

5.27	2. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
5.28	2. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status
5.29	3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
5.30	3. Kollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status
5.31	homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
5.32	homozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status
5.33	heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
5.34	heterozygote Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status
5.35	keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
5.36	keine Mutation: Vergleich zwischen Homocystein und dem KHK-Status
5.37	Referenzkollektiv: Vergleich zwischen Homocystein und Alter
5.38	Denaturierungsprofil von Exon 7
5.39	Transitionskurve von Exon 1 (mit GC-Überhang) in einer senkrechten TGGE
5.40	Transitionskurve von Exon 6 (ohne GC-Überhang) in einer senkrechten TGGE
5.41	Heteroduplexbanden von Exon 4 mit der (C-677-T) Mutation
5.42	Homoduplexbanden von Exon 4 mit der (C-677-T) Mutation
5.43	Heteroduplexanalyse von Exon 4 (C-677-T) in einer waagrechten TGGE
5.44	Heteroduplexanalyse von Exon 4 (C-677-T) in einer waagrechten TGGE
5.45	stille Mutation (T-1068-C) auf Exon 6 in einer waagrechten TGGE
5.46	Heterozygote Mutation (C-844-T) auf Exon 5 in einer waagrechten TGGE
5.47	Restriktionsanalyse der Familienmitglieder mit Mae III (Exon 5) auf Agarosegel
5.48	Darstellung der bekannten Mutation auf Exon 4 (C-677-T) auf dem Agarosegel
5.49	Stammbaum der Familie mit dem Mutationsträger auf Exon 5 (C-844-T)
6.1	Stammbaum der Familienstudie aus der Literatur

Tabellenverzeichnis

- 5.1. Methodenvergleich zwischen HPLC und ELISA
- 5.2. klinische Parameter der drei untersuchten Kollektive des MTHFR Reduktase Kollektivs
- 5.3. Kardiovaskuläre Risikofaktoren
- 5.4. Die Länge der Exonbereiche und die Primersequenzen
- 5.5. klinische Parameter der gefundenen Mutationen
- 5.6. MTHFR-Aktivität, Homocysteinwerte und Lipidwerte der einzelnen Familienmitglieder
- 6.1. Vergleich relevanter Werte zwischen Arbeit und Literatur

Veröffentlichungen

Zur Zeit in Bearbeitung

Danksagung

Meine Promotionstätigkeit wurde durch ein festes Arbeitsverhältnis im Labor für Angewandte Biochemie im Uniklinikum Frankfurt ermöglicht und finanziell unterstützt.

Diese so wichtige Voraussetzung verdanke ich Herrn Professor Werner Groß, in dessen Arbeitsgruppe ich die Arbeit durchführen durfte und der mir alle materiellen Voraussetzungen dafür zur Verfügung stellte und sich wohlwollend und unterstützend für den Verlauf der Promotion einsetzte.

Bei den HPLC- Messungen unterstützte mich Herr Michael Bender mit seinem fachlichen Rat und mit experimentellen Vorschlägen.

Für den molekularbiologischen Teil stand mir Frau Dr. Fisher mit Ihrem wissenschaftlichen Rat und Ihrer Fachkenntnis zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt auch der Familie des Mutationsträgers und Ihrem betreuenden Arzt, die sehr viel Verständnis für meine Arbeit aufbrachten und sich stets entgegenkommend zeigten.

Für praktische Tipps stand mir Herr Dr. Bauer zur Seite.

Ihm verdanke ich auch die Betreuung beim Schreiben und bei der Korrektur meiner Doktorarbeit, der mir mit zahlreichen Vorschlägen meist weiterhelfen konnte.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinem Mann, der mir beim Formatieren und Einscannen von Grafiken eine große Hilfe war.

Auch bei meinem Bruder möchte ich mich bedanken, der mich stets mit der entsprechenden Hard- und Software beim Schreiben der Arbeit unterstützte.

Zum Schluß möchte ich noch den zahlreichen MTAs für das Herstellen von PCR-Ansätzen und das gelegentliche Färben von TGGE-Gelen meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Name: Ingrid Lebert - Keiner
geboren: 29.08.1966 in Hanau
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

1986	Schulabschluß	Abitur an der Hohen Landesschule in Hanau
1989	PTA	Examen an der PTA-Schule in Frankfurt
1989 bis 1996	Studium	Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
1998	Promotion	Promotionsarbeit im Zentrum für Biologische Chemie, Abteilung Angewandte Biochemie, Prof. Dr. Groß mit dem Titel der Arbeit: Analyse von Hyperhomocysteinämien und deren genetischer Ursachen

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die im Fachbereich Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Analyse von Hyperhomocysteinämien und deren genetischer Ursachen:
„Etablierung einer Methode zur Homocysteinbestimmung für die HPLC
und Suche nach einer neuen genetischen Mutation auf dem MTHFR-Gen“

selbstständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen und den Betreuern bekannten verwendet habe.

Ich habe bislang an keiner in- oder ausländischen Fakultät, bzw. keinem anderen Fachbereich der Pharmazie ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, im August 2003