

Aus dem
Forschungsbereich klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Juniorprofessor Dr. rer. med. Rima Obeid

Einfluss des Homocystein-Stoffwechsels auf neurodegenerative Erkrankungen: Homocystein- und Methylierungsstatus bei Patienten mit Morbus Parkinson

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2010

vorgelegt von:
Achim Albert Schadt
geboren am 04. Juni 1980
in Heilbronn

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung – Summary	4
2. Einleitung	6
Homocystein (Hcy) und neurologische Erkrankungen	6
<i>Geschichtlicher Überblick</i>	6
<i>Chemie und Biochemie des Hcy</i>	7
<i>S-Adenosylmethionin (SAM) – biochemische Bedeutung</i>	8
<i>Folat, Vitamin B6, Vitamin B12 und deren Rolle im Hcy-Stoffwechsel</i>	9
<i>Homocystein – Formen und in-vivo-Verteilung</i>	11
Hyperhomocysteinämie (HHcy)	12
<i>Definition</i>	12
<i>Faktoren</i>	12
<i>Pathophysiologie</i>	13
<i>Neurotoxizität</i>	14
Morbus Parkinson (Parkinson’s Disease, PD)	16
<i>Erstbeschreibung, Symptome, Klassifikation</i>	16
<i>Neurophysiologie, Dopamin</i>	17
<i>Neuropathologie, Pathophysiologie und Ätiopathogenese</i>	22
<i>Pharmakologische Therapie des M. Parkinson</i>	26
<i>Homocystein und M. Parkinson</i>	28
α-Synuclein	30
Amyloid β-Precursor-Protein (APP)	31
Fragestellung	32

3. Material und Methodik	33
Probanden, Material / Proben	33
<i>Probandenrekrutierung, Probengewinnung, Datenerhebung</i>	33
<i>Ein- / Ausschlusskriterien für Probanden, Übersicht</i>	33
<i>Präanalytik</i>	35
Methodik	36
<i>Klinische Methodik</i>	36
Parkinson Scores	36
<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Teil III (UPDRS III)</i>	36
<i>Hoehn & Yahr (HY)</i>	36
Demenz Scores	37
<i>Mini-Mental-Status-Examination (MMSE)</i>	37
<i>DemTect (DT)</i>	37
Depressions Score	38
<i>Beck's Depressions Index (BDI)</i>	38
Bildgebende Verfahren	39
<i>Transkranieller Ultraschall</i>	39
<i>Laborchemische Methodik</i>	41
Messung der Metaboliten des Homocysteinstoffwechsels im Blutserum	41
<i>Homocystein, Cystathionin (Cys) und Methylmalonylsäure (MMA)</i>	41
<i>S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosylhomocystein (SAH)</i>	44
Messung der Vitamine im Blutserum	46
<i>Folat und Cobalamin (Vitamin B12)</i>	46
<i>Messung von Holo-Transcobalamin (Holo-TC)</i>	46
<i>Pyridoxal-5-phosphat (Vitamin B6)</i>	47
Messung von Proteinen im Thrombozytenextrakt und EDTA-Blut	48
<i>α-Synuclein in Thrombozytenextrakt</i>	48
<i>Amyloid-Precursor-Protein (APP) in Thrombozytenextrakt</i>	48
<i>β-Amyloid im EDTA-Plasma</i>	49
Messung von Standardwerten im Blut	50
<i>Kreatinin</i>	50
<i>Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), γ Glutamyltransferase (γ-GT)</i>	50
<i>C-reaktives Protein (CRP)</i>	50
Statistik	51

4. Ergebnisse	52
<i>Blut- und Thrombozyten-Parameter der Gesamtstudie</i>	52
<i>Biomarker nach Therapiegruppen</i>	53
<i>Vitamin B 6, SAM/SAH-Quotient und β-Amyloid bezogen auf DT-Scores</i>	55
<i>Backward Regression: Rückschluss auf DT-Score über SAM/SAH-Quotient</i>	57
<i>Signifikante Rangreihenkorrelationen der ermittelten Werte</i>	58
<i>Negative Beziehung zwischen Plasma-SAH und Thrombozyten-APP, sowie Plasma-SAM und Thrombozyten-α-Synuclein</i>	61
<i>Plasma-tHcy, -SAH, und SAM/SAH-Quotient, sowie B 6 und Folat bezogen auf Plasma-β-Amyloid</i>	62
<i>Echogene Fläche der substantia nigra: relevante Variablen</i>	63
5. Diskussion	64
6. Literaturverzeichnis	70
7. Publikation – Dank	81
8. Lebenslauf	83
Anhang	84

1. Zusammenfassung – Summary

Einleitung: M. Parkinson und die Alzheimer-Demenz gehören zu den häufigsten Erkrankungen im Alter. Bei beiden können Symptome der jeweils anderen Erkrankung auftreten, was eine in Teilen gemeinsame Pathophysiologie vermuten lässt. Bei Parkinson-Patienten tritt oft eine Hyperhomocysteinämie (HHcy) auf, die als Risikofaktor für den Verlauf und das sekundäre „Outcome“ gilt. Mit dieser Arbeit wurde die These überprüft, ob das Gesamthomocystein (tHcy) und der Methylierungsstatus Einfluss auf neurodegenerative Proteine haben.

Material und Methoden: Blut von 87 Parkinson-Patienten wurde auf tHcy, Methylmalonylsäure, Vitamin B6, Vitamin B 12, Folat, S-Adenosin-Methionin (SAM), S-Adenosyl-Homocystein (SAH) und β -Amyloid getestet. Thrombozyten wurden von 45 Patienten isoliert und für α -Synuclein- und Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Assays aufbereitet. Die Substantia nigra wurde in einer Untergruppe von 58 Patienten mit transcraniellem Ultraschall vermessen.

Ergebnisse: Bei den Patienten wurden erhöhte t-Hcy-Konzentrationen festgestellt (median = 14,8 $\mu\text{mol/L}$). Dies konnte nicht mit der L-Dopa-Therapie erklärt werden. Die B-Vitaminstatus zeigten kein allgemeines Defizit, aber die Werte waren mit der HHcy negativ korreliert. tHcy im Serum ($\beta = -0,276$; $p < 0,01$) und Kreatinin im Serum ($\beta = -0,422$; $p < 0,01$) waren signifikante Prädiktoren des SAM/SAH-Quotienten. Negative Korrelationen wurden zwischen SAH und APP in Thrombozyten gefunden, außerdem zwischen SAM und α -Synuclein. Der SAM/SAH-Quotient war signifikante Determinante des DemTect ($\beta = 0,612$; $p = 0,004$). Die Gesamtfläche der Substantia nigra war mit den MMA-Konzentrationen positiv korreliert ($r = 0,31$; $p = 0,029$).

Schlussfolgerung: Diese Studie hat gezeigt, dass bei Patienten mit M. Parkinson die Marker der Neurodegeneration (APP, α -Synuclein) vom zellulären Methylierungsstatus (SAM, SAH) abhängen. Bessere kognitive Leistung hing mit höherem Methylierungspotential (SAM/SAH-Quotient) zusammen. Der B-Vitaminstatus, der den Methylierungsstatus beeinflusst, steht im Zusammenhang mit der Neurodegeneration. Folgestudien können den Effekt der B-Vitamin-Supplementierung, eventuell auch der Zuführung von SAM auf APP und α -Synuclein bei Parkinson-Patienten untersuchen.

*Homocysteine-pathway's influence on neurodegenerative diseases:
Status of Homocysteine and Methylation in Patients with Parkinson's disease*

Background: Among age-related morbidities, Parkinson and Alzheimer diseases are the most common. A mutual pathophysiology is suggested, as many PD might develop dementia and many AD might show movement disorders. Hyperhomocysteinemia (HHcy) is common in PD and considered to be a risk factor for progression and secondary outcome of the disease. The hypothesis was tested that total homocysteine (tHcy), or methylation status in PD patients might be related to neurodegenerative proteins.

Subjects and methods: 87 patients with PD were included. Blood samples were tested for tHcy, methylmalonic acid, vitamin B12, B6, folate, S-adenosyl methionine, S-adenosyl homocysteine, and amyloid- β . Platelets extracts of 45 patients were prepared for amyloid precursor protein (APP) and α -Synuclein assays. In a subset of 58 patients, the area of the substantia nigra was measured by transcranial Sonography.

Results: Elevated concentrations of tHcy were observed in our patients (median = 14,8 μ mol/L). This was not explained by L-dopa treatment. B-vitamins' concentrations indicated no frank deficiency, but their levels showed negative relation to HHcy. Serum tHcy (beta = -0,276; p < 0,01) and serum creatinine (beta = -0,422; p < 0,01) were significant predictors of plasma SAM/SAH ratio. Negative correlations were found between SAH and platelets APP as well as SAM and α -Synuclein. SAM/SAH ratio was a significant determinant for DemTect (beta= 0.612, p=0.004). The total area of the substantia nigra correlated positively with levels of MMA (r=0.31, p=0.029).

Conclusion: This study showed that markers of neurodegeneration (APP, α -Synuclein) in patients with PD are related to markers of cellular methylation status (SAM, SAH). Better cognitive function in PD patients was related to higher methylation potential (SAM/SAH ratio). B-vitamine-status influencing methylation-status is related to neurodegeneration. Further studies might investigate the effect of B-vitamine or even SAM-supplement on APP and α -Synuclein in PD patients.

2. Einleitung und Fragestellung

Homocystein (Hcy)

Geschichtlicher Überblick

Die bereits in den 1930er Jahren von BUTZ und DE VIGNEAUD [22] als Teil des Methionin-Stoffwechsels beschriebene Aminosäure Homocystein (Hcy), wurde in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts im Urin geistig retardierter Kinder isoliert [26, 52]. Im Jahr 1964 brachten MUDD et al. [118] die Homocysteinurie und massiv erhöhte Homocysteinspiegel im Plasma mit einem genetischen Defekt des Enzyms Cystathionin- β -Synthetase (CBS) in Verbindung, das den Abbau von Homocystein (Hcy) zu Cystathionin (Cys) ermöglicht. Bei diesen Patienten wurden auch häufig arteriosklerotische und thromboembolische Veränderungen noch vor dem dreißigsten Lebensjahr beschrieben, in einem Viertel der Fälle mit tödlichem Ausgang [53, 148]. MCCULLY zeigte 1969 [113], dass die Pathologie der Gefäße bei hohen Blut-Hcy-Spiegeln eine Proliferation der glatten Muskulatur, fortschreitende arterielle Stenosen und hämostatische Veränderungen umfasst. Atherosklerose und thromboembolische Ereignisse treten auf. Epidemiologische Studien in der Gesamtbevölkerung zeigten, dass milde bis moderat erhöhtes Hcy im Plasma (Hcy > 14 $\mu\text{mol/l}$) mit Gefäßveränderungen, Geburtskomplikationen und Neuralrohr- und anderen Defekten bei Neugeborenen einhergeht. Weiterhin werden verschiedene neuropsychiatrischen Erkrankungen, kognitiven Beeinträchtigungen und insgesamt eine erhöhte Mortalität mit Hcy in Verbindung gebracht [150]. Prospektive Studien belegen die bedeutende Rolle der Hyperhomocysteinämie (HHcy) in der Ätiologie des M. Alzheimer. Die Hcy-Plasmakonzentration ist ein bedeutender Prädiktor für die Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit im Alter [55]. Die HHcy ist außerdem signifikant mit dem Risiko für die vaskuläre Demenz und die milde kognitive Störung (mild cognitive impair, MCI) assoziiert [138]. Bei Patienten mit Schlaganfall (Stroke) wird sehr oft eine HHcy festgestellt [1]. Psychiatrische Erkrankungen, speziell Depressionen, beruhen vor allem auf einem gestörten Monoaminstoffwechsel. Ein mangelhafter Methylierungsstatus, der mit HHcy einhergeht, kann in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen [139].

Chemie und Biochemie des Homocystein

Hcy ist mit einem Molekulargewicht von 135 Dalton ein eher kleines Molekül. Die nicht-proteinbildende Aminosäure ist schwefelhaltig und schwer wasserlöslich. Sie wird nicht diätisch zugeführt und tritt nur als Zwischenprodukt im Stoffwechsel von Methionin auf [117]. Methionin (Meth) ist eine essentielle Aminosäure, die über die Nahrung aus tierischem Eiweiß zugeführt wird und eine wichtige Rolle als Methylgruppendonator spielt. Durch einen Remethylierungsvorgang kann Methionin auch aus Hcy (Salvage-Pathway) aufgebaut werden. Cys ist ein Nebenprodukt des Abbaus von Hcy (Transsulfurierungs-Weg) durch Kondensation von Hcy und Serin. Abb. 2.1 zeigt die Summenformeln der genannten Moleküle.

Homocystein	$\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{) COOH}$
Methionin	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{) COOH}$
Cystathionin	$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)CH-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{) COOH}$

Abbildung 2.1: Summenformeln

Hcy ist die Schnittstelle der drei Bestandteile des Methionin-Stoffwechsels:

Aus der Nahrung gewonnenes Methionin wird zu S-Adenosylmethionin (SAM) aktiviert, wobei Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht wird. SAM ist Methyl-donator für eine Reihe wichtiger zellulärer Reaktionen (Synthese von Phospholipiden, Nucleinsäuren, Aminosäuren, Neurotransmittern etc.) und wird bei der Übertragung der Methylgruppe (Transmethylierung) zu S-Adosylhomocystein (SAH) umgewandelt. In einem reversiblen Hydrolyse-Vorgang, katalysiert durch SAH-Hydrolase, entsteht daraus Hcy. Hcy wird nun entweder durch Remethylierung zu Meth aufgebaut oder durch Transsulfurierung abgebaut [116]. Zur Remethylierung werden das Enzym Methionin-Synthetase (MS, EC 2.1.1.13) und der Co-Faktor Cobalamin (Vitamin B 12) in seiner aktivierten Form (Methylcobalamin) benötigt. 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) überträgt dabei eine Methylgruppe auf das Enzym MS, das diese wiederum auf Hcy überträgt und dadurch Meth entsteht. 5-MTHF wird dann zu Tetrahydrofolat (THF) umgewandelt. THF ist zur Purinsynthese und damit zur DNA-Produktion notwendig. Bei der Umwandlung von Serin zu Glycin durch die

Serinhydroxymethyltransferase wird THF zu 5,10-MTHF aufgebaut, das mit 5,10-MTHF-Reduktase zu 5-MTHF reduziert wird und somit wieder dem Remethylierungsweg zur Verfügung steht [116]. SAM hemmt diesen Schritt [100].

In Leber und Nierenparenchym besteht eine weitere Möglichkeit zur Hcy-Remethylierung: Das Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) bewerkstelligt dies bei gleichzeitiger Umwandlung von Betain in Dimethylglycin.

Der Abbau des Homocysteins geschieht durch Transsulfurierung. Dabei wird Cys durch CBS (EC 4.4.1.1) aus Hcy und Serin hergestellt, Vitamin B 6 (Pyridoxal-5-Phosphat) ist Coenzym für CBS, die CBS- vermittelte Reaktion wird durch SAM verstärkt [45, 151]. Die Cystathionase spaltet dann α -Ketobutyrat ab, so dass Cystein entsteht. Auch hier ist Vitamin B6 Coenzym. Im Gegensatz zur ubiquitären Remethylierung findet die Transsulfurierung, allerdings nur in der Leber, den Nieren, dem Dünndarm und Pankreas statt [45]. Aus Cystein können Pyruvate, Sulfate und Taurine entstehen, unter anderem kann Cystein auch in Glutathion umgewandelt werden, der wichtigsten Antioxidans des menschlichen Körpers.

S-Adenosylmethionin (SAM) – biochemische Bedeutung, Regulatorfunktion

SAM ist als universeller Methylgruppendonator im menschlichen Körper unverzichtbar. Es wurde 1952 von CANTONI [23] entdeckt und wird in den letzten Jahren auch als Medikament eingesetzt, z.B. zur Therapie der Depression [20], bei bi- und unipolaren Störungen [25] und in Kombination mit anderen Wirkstoffen auch bei M. Parkinson [38]. Methylgruppen werden durch viele verschiedene SAM-abhängige Methyltransferasen auf DNA, RNA, Proteine, Polysaccharide, Lipide, Glycin, Katecholamine und weitere Moleküle übertragen. Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit sind die SAM-abhängige Verstoffwechslung von Dopamin, L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und die Regulation des Methionin-Stoffwechsels durch SAM. Dopamin wird im Gehirn SAM-abhängig mit Hilfe der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut. Um zur Vanillinmandelsäure als Endprodukt zu gelangen, sind zwei Schritte nötig, entweder wird zuerst COMT aktiv und anschließend die Monoaminoxidase (MAO) oder umgekehrt. Außerhalb des Gehirns wird auch L-DOPA durch COMT zu 3-Ortho-Methyl-DOPA (3-O-MD) verstoffwechselt, insbesondere dann, wenn die Aminosäure-(acid)decarboxylase

(AAD), wie häufig bei der Parkinson-Therapie, gehemmt wird. L-DOPA steigert dabei den SAM-SAH-turnover um das 4-5fache [19]. SAM wirkt im Methionin-Stoffwechsel als Feedback-Aktivator bzw. Inhibitor. SAM inhibiert im Bereich der Remethylierung das Enzym 5,10-MTHF-Reduktase und damit die Umwandlung von 5,10-MTHF zu 5-MTHF (Methyltetrahydrofolat). Aktiviert wird dagegen die CBS und damit die Umwandlung von Homocystein zu Cystathionin, dem ersten Schritt der Transsulfurierung. Insgesamt werden SAM und SAH mit geringer Toleranz reguliert. Das Ansteigen des Verhältnisses SAH/SAM kann die DNA-Methylierung und damit die Genexpression beeinträchtigen [116].

Folat, Vitamin B 6, Vitamin B 12 und deren Rolle im Hcy-Stoffwechsel

Die Vitamine B 6, B 12 und Folat sind für den Hcy-Stoffwechsel unverzichtbar [24, 162], ebenso eine Reihe von Schlüsselenzymen [117] (siehe Abb. 2.2). Ist Folat in der Form 5-MTHF übermäßig vorhanden, wird mehr Methionin aus Hcy remethyliert und die Bildung von SAM wird gesteigert sein, das seinerseits über einen Rückkopplungsmechanismus das Enzym MTHFR hemmt und damit die Produktion einschränkt. Ein Mangel an Folat dagegen führt, da weniger remethyliert wird, zu einem erhöhten Anfall von Hcy, woraus eine ausgleichende Erhöhung des SAH resultiert [24]. Umgekehrt führt auch ein Hcy-Anstieg zum SAH-Anstieg. Der Mangel an Vitamin B 12 wirkt sich über die Methioninsynthetase weniger stark auf das Hcy aus, so lange der Transsulfurierungsweg nicht beeinträchtigt ist [151]. Zwei wichtige Enzyme des Transsulfurierungsweges, CBS und CS, sind Vitamin B 6- (Pyridoxalphosphat)-abhängig. Im Vitaminmangelzustand führt das zu vermindertem Hcy-Abbau und kann so zur Erhöhung des Hcy-Spiegels im Plasma führen.

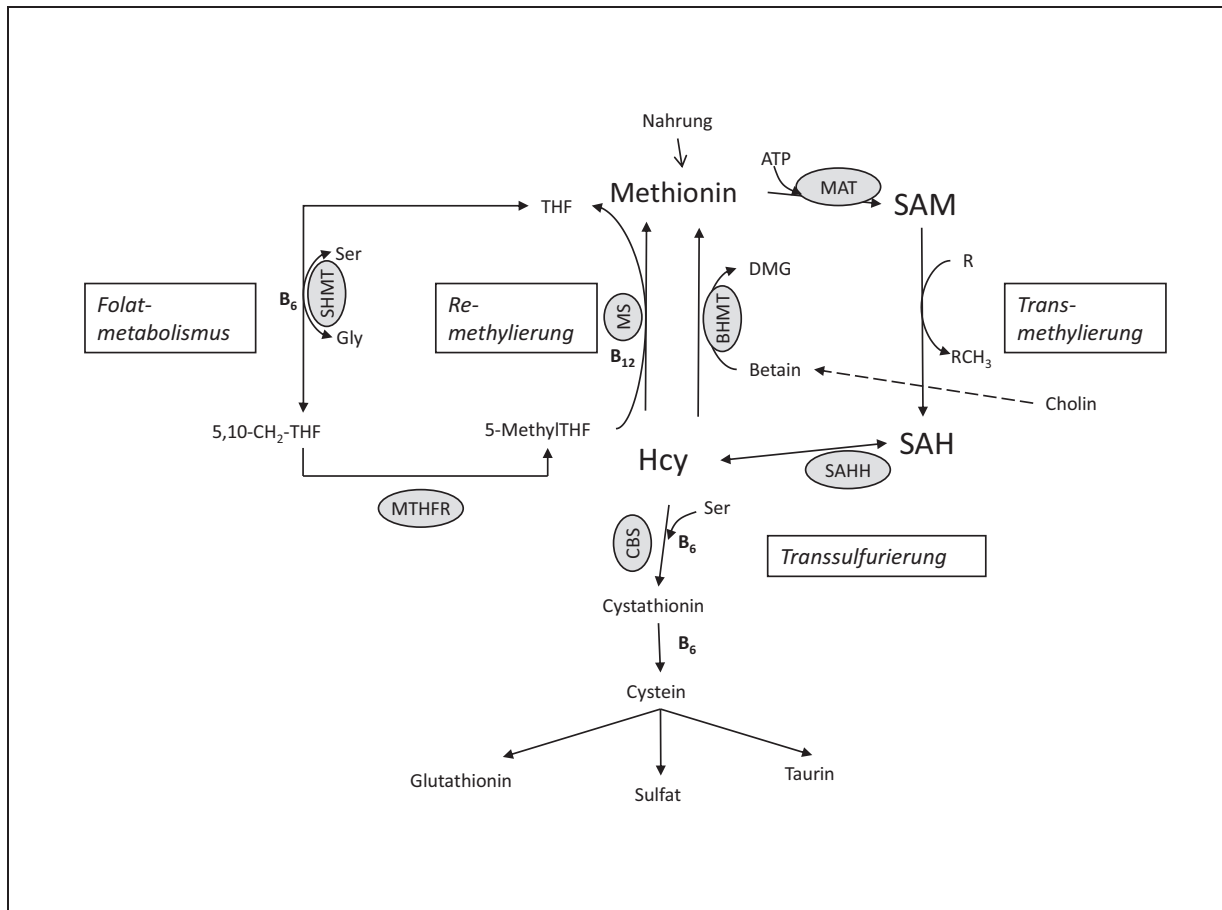


Abbildung 2.2: Homocystein-Stoffwechsel, schematisch: SAM als Methylgruppendonator, sowie die Vitamin B₆- und B₁₂-abhängigen Ab- und Wiederaufbauwege. BHMT: Betain-Homocystein-Methyltransferase; CBS: Cystathionin-β-Synthase; DHF: Dihydrofolat; DMG: Dimethylglycin; Gly: Glycin; Hcy: Homocystein; MAT: Methioninadenosyltransferase; MTHFR, 5,10 Methylene-tetrahydrofolatereduktase; MS: Methioninsynthase; SAH: S-Adenosylhomocystein; SAHH: S-Adenosylhomocysteinhydrolase; SAM: S-Adenosylmethionin; Ser: Serin; SHMT: Serinhydroxymethyltransferase; THF: Tetrahydrofolat; ATP: Adenosintriphosphat; B₆: Vitamin B₆; B₁₂: Vitamin B₁₂; R: Methylakzeptor

Homocystein – Formen und in-vivo-Verteilung

Hcy ist als freies Einzelmolekül instabil und bei neutralem pH schlecht löslich [60]. Als freie Thiolform ist Hcy im Plasma nur in Spuren nachzuweisen, der Großteil wird als Disulfid-Komplex mit Proteinen, vor allem Albumin, vorgefunden, in denen Hcy an (-SH) Gruppen bindet [168]. MANSOOR et al. fanden 1992 [110] sowohl symmetrische (Hcy-Hcy) als auch gemischte Disulfide, z.B. mit Cystein (siehe Abb. 2.3). Als normale Konzentration des freien Hcy im Plasma werden nur 1-2 % des gesamten Hcys ($< 12 \mu\text{mol/L}$) angesehen. Zur Messung des Gesamt-Homocysteins wird durch Reduktoren das Hcy aus den Disulfid-Bindungen herausgelöst.

<i>Reduziert</i>		
Homocystein (freie Form)	1-2%	$\begin{array}{c} \text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<i>Oxidiert</i>		
Symmetrische Disulfide (Homocystein)	5-10%	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Gemischte Disulfide		
Proteingebundenes Homocystein	80-90%	$\begin{array}{c} \text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-Protein} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Cystein-Homocystein	5-10%	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{OOC-CH-CH}_2\text{-S} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

Abbildung 2.3 Bestandteile des Gesamt-Plasma-Homocysteins (tHcy): zur Messung des tHcy werden die oxidierten Formen reduziert und das Hcy aus den Disulfid-Bindungen herausgelöst

Hyperhomocysteinämie (HHcy)

Tabelle 2.1: Empfohlene Definition der HHcy nach KANG [94] und GRAHAM [57]

Gesamt-Homocystein im Plasma in $\mu\text{mol/L}$

normal	2 – 12
milde / moderate HHcy	15 – 30
intermediäre HHcy	30 – 100
schwere HHcy	> 100

Die beeinflussenden Faktoren für eine HHcy können in genetische, also angeborene und erworbene Faktoren eingeteilt werden. Zu den genetischen Faktoren zählen Mutationen, die zu einem Mangel an Cystathionin- β -Synthetase führen. Dadurch ist der Transsulfurierungsweg des Hcy-Stoffwechsels gestört, was zu Homocysteinämie und Homocysteinurie führt [98]. Auf molekularer Ebene konnten GUTTORMSEN et al. [61] die Mutationen T833C und G919A als ursächlich identifizieren. Weiterhin konnten sie feststellen, dass homozygote Träger, meist aufgrund thromboembolischer Ereignisse, selten älter als vierzig Jahre wurden, heterozygote dagegen bei ausreichendem Vitamin B Angebot symptomfrei waren. Der Remethylierungsweg des Hcy-Stoffwechsels kann ebenfalls als Folge von Mutationen gestört sein. Vollständige [56] oder teilweise [48] Inaktivität des Enzyms 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) verhindert die Umwandlung von 5,10-MTHF zu 5-MTHF und unterbricht damit den Vorgang. Durch verminderte Verfügbarkeit von Methylcobalamin kann die Aktivität der Methionin-Synthetase eingeschränkt sein [179]. Ist die Reduktion von Hydroxycobalamin im Cytosol eingeschränkt, folgt daraus eine geringere Synthese von Methyl- und Adenosylcobalamin, was die Spiegel von Hcy und MMA ansteigen lässt.

Zu den erworbenen Faktoren einer HHcy gehören in erster Linie eine eingeschränkte Nierenfunktion [66, 71], der Mangel an Vitaminen der B-Gruppe, auch aufgrund von Medikamenten (Folatantagonisten, Antiepileptika etc.) [175], das männliche Geschlecht [157], Frauen nach der Menopause [62] und Umweltfaktoren bzw. so genannte „Lifestyle-Factors“, wie Rauchen [12], Alkoholismus [149], Kaffee [122] oder auch eine vegetarische Diät [72].

Pathophysiologie der HHcy

Die pathologische Wirkung einer moderaten HHcy wurden besonders für vaskuläre Erkrankungen, namentlich der Atherosklerose, untersucht, nachdem MCCULLY 1975 [114] die Hypothese eines Zusammenhanges gestellt hatte. Möglicherweise stellen vaskuläre Veränderungen auch einen Faktor bei Schwangerschaftskomplikationen wie z.B. der Präeklampsie dar [69]. CARSON und NEILL vermuteten 1962 [26], außer der geistigen Retardierung, auch eine Verbindung zwischen der HHcy und Skelettdeformationen, im Rahmen der Osteoporose-Forschung wurden die Annahmen in jüngerer Zeit wieder aufgenommen [115, 172]. Schon früh waren auch Hinweise vorhanden, dass die HHcy ein Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer oder M. Parkinson ist [138]. Außer der neurotoxischen Wirkung sind hier natürlich auch vaskuläre Störungen von Bedeutung. In mehreren Arbeiten wurde beschrieben, dass auch bei der Carcinogenese im Alter B-Vitaminmangel und HHcy beteiligt sein können [4, 29, 178].

Die pathologischen Vorgänge an Endothelzellen werden durch mehrere Mechanismen erklärt: HHcy führt zur Dysfunktion der Endothelzellen, unter anderem, weil durch Autooxidation Wasserstoffperoxid entsteht [37], was kritisch ist, weil im kardiovaskulären System der Transsulfurierungsweg nicht existiert [28]. HHcy schränkt auch die Bioverfügbarkeit von Stickstoff ein, eines wichtigen endogenen Vasorelaxans [169]. PODDAR et al. stellten [132] eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Cytokinen und dadurch eine erhöhte Rekrutierung von Leukozyten am verletzten Endothel fest. HHcy kann eine Dysfunktion der glatten Muskulatur in Gefäßen durch erhöhte Zellproliferation verursachen [165]. Arachidonsäure wird vermehrt aus Thrombozyten freigesetzt. Dies führt über weitere Mediatoren zur vermehrten Entstehung und zur Erhaltung von Thromben [156]. Hcy beeinträchtigt in-vitro die Freisetzung von Heparan aus Endothelzellen [121]. Im Knochenstoffwechsel scheint Hcy durch oxidativen Stress die Aktivität der Osteoklasten positiv zu beeinflussen [68, 96]. Hohes Serum-Hcy, der damit häufig verbundene verminderte SAH/SAM-Quotient und das dadurch eingeschränkte Methylierungspotential führt sowohl zu einer DNA-Hypomethylierung, als auch der fehlerhaften Integration von Uracil in die DNA und somit zu einer gestörten Genexpression und Brüchen im DNA-Strang [29, 85].

Neurotoxizität: HHcy wirkt toxisch im Zentralnervensystem

Für neurodegenerative Erkrankungen spielt die neurotoxische Wirkung von Hcy eine besondere Rolle, ebenso tragen die oben beschriebenen systemischen pathologischen Abläufe durch Ischämie des ZNS und neuronale Hypoxie zu neuropsychiatrischen Symptomen bei. Insgesamt gleichen sich die Erklärungsansätze für die schädigende Wirkung auf systemischer oder ZNS-Ebene. Es wird angenommen, dass diese Schädigung von Nervenzellen auf fünf pathologischen Vorgängen basiert, die Hcy bewirkt oder begünstigt: Oxidativer Stress, vermindertes Methylierungspotential, excitotoxische Effekte, Interaktionen mit Entzündungsmediatoren und die Homocysteinylierung von Proteinen.

Dass HHcy neurologische Fehlfunktionen durch oxidativen Stress hervorruft, kann über die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), oxidative Deaktivierung von NO und Lipidperoxidation erklärt werden [86]. Typische ROS-Moleküle und die Antioxidantien des Körpers zeigt Abbildung 2.4. Hcy wird oft als Marker für oxidativen Stress gesehen. Besonders Neuronen reagieren sensibel auf oxidativen Stress, in Kombination mit vaskulären Störungen scheint dies eine wichtige Rolle unter anderem beim M. Parkinson und M. Alzheimer zu spielen [7, 67].

<u>Oxidantien (toxische Radikale, reaktive Sauerstoffspezies)</u>			
O ₂	Superoxid-Radikal-Anion	ONOOH	Peroxynitrit
OH	Hydroxyl-Radikal	NO	Stickstoffmonoxid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid		
<u>Antioxidantien (Enzyme des Glutathion-Systems, weitere spezifisch antioxidative Enzyme)</u>			
Glutathion-Peroxidase:	2 GSH	+ H ₂ O ₂	→ GSSG + 2H ₂ O
Glutathion-Disulfid-Reduktase:	GSSG	+ NADPH + H ⁺	→ 2 GSH + NADP ⁺
Superoxid-Dismutase:	O ₂	+ O ₂ + 2H ⁺	→ H ₂ O ₂ + O ₂
Katalase:	H ₂ O ₂	+ H ₂ O ₂	→ O ₂ + 2H ₂ O
Peroxidase:	H ₂ O ₂	+ SH ₂	→ 2 SH ₂ + S _{Ox}

Abbildung 2.4 Oxidantien und Antioxidantien im Stoffwechsel dopaminergener Neurone: GSH: reduziertes Glutathion; GSSG: oxidiertes Glutathion; NADP: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; S_{Ox}: oxidiertes Substrat

Die HHcy beeinflusst direkt den SAM-Stoffwechsel und damit das Methylierungspotential des Körpers, wodurch auch die Transmethylierungsvorgänge im Gehirn beeinflusst werden. Eine verminderte Verfügbarkeit von übertragbaren Methylgruppen in Form von SAM bewirkt die Hypomethylierung der DNA, was beispielsweise die Expression des Presenilin-codierenden Gens verändert [49]. Ein weiteres Beispiel ist das gesteigerte Risiko bei SAM-Mangel eine Demenz vom Alzheimer-Typ zu entwickeln. Ohne SAM kann die Proteinphosphatase 2A (PP2A) nicht methyliert werden, die das tau-Protein effizient dephosphoryliert und so abbaut [170]. Homocysteinschwefelsäure und Homocysteinsäure, die durch Oxidation entstehen, wirken excitotoxisch auf eine Reihe von Subtypen der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Glutamatrezeptoren [128]. Dabei strömt vermehrt Calcium in die Zelle, was Apoptose oder eine Änderung der Signaltransduktion bewirkt [101]. Inflammatorischen Abläufen wird ein bedeutender pathophysiologischer Anteil an den neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Alzheimer, M. Parkinson und Multipler Sklerose, zugesprochen. Hcy interagiert mit bestimmten inflammatorischen Markern [107]. JAKUBOWSKI konnte in mehreren Arbeiten [82-84] Anhaltspunkte finden, dass in-vitro Hcy-thiolactone mit Proteinen reagiert, die dadurch geschädigt wurden. CBS- oder MS-Inaktivität, durch Mutation oder Vitaminmangel (Folat, B 6, B 12), begünstigt diesen Effekt.

Morbus Parkinson (M. Parkinson, Parkinson's disease, PD)

Erstbeschreibung, Symptome, Klassifikation

In der Monographie "An essay on the Shaking Palsy" beschrieb der Arzt James Parkinson (1755-1824) im Jahre 1817 erstmals den Symptomkomplex der "Schüttellähmung", heute bekannt als M. Parkinson [131]. Dieser Komplex umfasst vier Kardinalsymptome: Hypokinesie, Rigor, Tremor und posturale Instabilität [32]. Dementsprechend wird je nach Ausprägung der Symptome in Subtypen eingeteilt: den hypokinetisch-rigiden, den tremordominanten und den Äquivalenztyp, wenn die Symptome gleich stark ausgeprägt sind. Hinzu kommt die Feststellung, ob nur eine, eine verstärkt oder beide Körperseiten betroffen sind. Zum klinischen Bild zählen außerdem ein kleinschrittiges Gangbild, eine gebeugte Körperhaltung, Mikrographie, Hypophonie und Hypomimie (siehe Abb. 2.5).

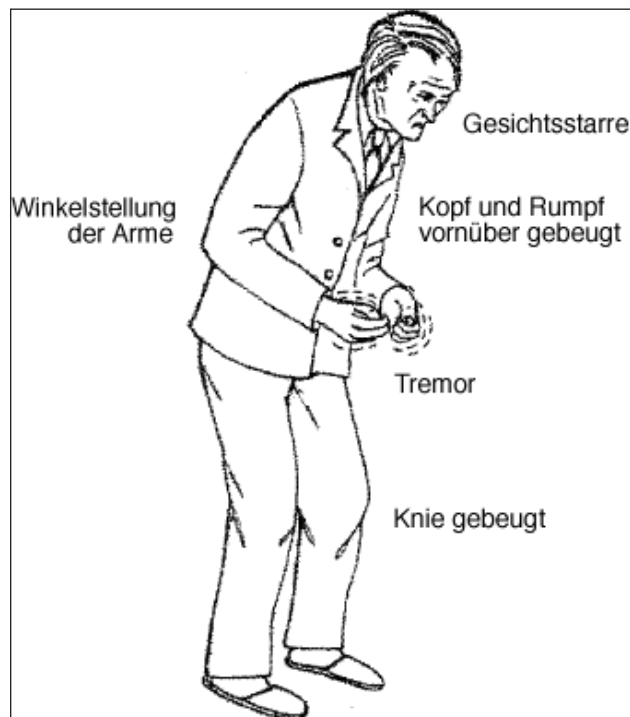


Abbildung 2.5 Typisches Erscheinungsbild eines Parkinson-Patienten

Da weitere dopaminerge und nicht-dopaminerge Gehirnregionen betroffen sind, beschränkt sich die Symptomatik nicht auf das motorische System [73, 87]: Dementielle Störungen oder manifeste Depressionen treten bei ungefähr 20-28% [2]

bzw. 40% der PD-Patienten auf, letztere teilweise noch vor Beginn der Kardinalsymptome [133]. Vom idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS), dessen Ätiopathogenese noch nicht vollständig geklärt ist, sind hereditäre Formen und sekundäre Parkinsonsyndrome abzugrenzen. Das IPS macht ca. 80% der Erkrankungen aus, die hereditären Formen 10-15%. Die sekundären Syndrome haben metabolische, vaskuläre, traumatische, toxische, infektiöse und medikamentöse Ursachen [109]. Die Diagnose erfolgt klinisch nach bildgebender Differentialdiagnostik (z.B. zum Ausschluss der Multisystematrophie) und auch durch therapeutisch-diagnostische L-DOPA-Gabe.

Neurophysiologie, Dopamin

Die Basalganglien sind ein funktionell verbundenes System neuronaler Kerngebiete, die zwischen Cortex und Thalamus liegen und Kontroll- und Modifizierungsinstanz für motorische, assoziative und limbische Informationen bilden [92] (siehe Abb. 2.6).

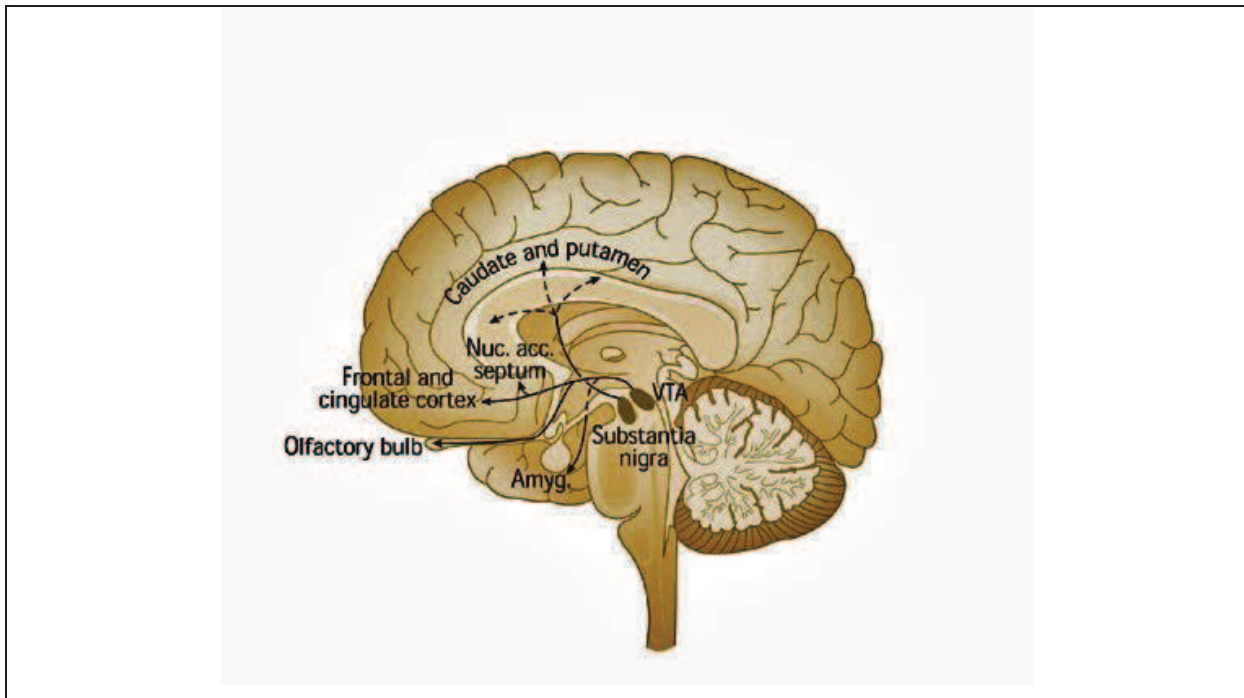


Abbildung 2.6 Basalganglien[11]: Amyg.: Corpus amygdaloideum; Nuc. acc.: Nucleus accumbens; VTA: ventrales tegmentales Areal; Olfactory bulb: Bulbus olfactorius; Caudate: Nucleus caudatus; Cingulate cortex: Gyrus cinguli

Funktionell gehört unter anderen Strukturen auch die Substantia nigra, bestehend aus pars compacta, pars lateralis und pars reticulata zu diesem System. Der Impuls für eine Bewegung wird aus dem limbischen System über den präfrontalen Cortex zum Kleinhirn und den Basalganglien geleitet. Während das Kleinhirn für die Feinabstimmung zuständig ist, verstärken oder schwächen die Basalganglien die Bewegungsabläufe. Im Thalamus werden beide Instanzen vereint und zum motorischen Cortex zur Ausführung über das pyramidale System weitergeleitet [76, 130]. Die Basalganglien werden, vereinfacht dargestellt, aus kortikalen Feldern durch exzitatorische Neurotransmitter (Glutamat, Aspartat) im Striatum erregt. Zwei entgegengerichtete Abläufe regeln, wie viel inhibitorischer Neurotransmitter (γ -Aminobuttersäure, GABA) im Thalamus ausgeschüttet wird, der seinerseits Einfluss auf die Aktivität des motorischen Cortex nimmt. Weitere Modulationen finden in dieser Schleife unter anderem durch dopaminerge Zuströme aus der Substantia nigra pars compacta/lateralis ins Striatum statt [134]. Die dopaminergen Zuströme aktivieren beide der oben beschriebenen konkurrierenden Abläufe. Im physiologischen Zustand besteht ein Gleichgewicht in diesem weitaus komplexeren Regelsystem. Abbildung 2.7 zeigt schematisch die pathophysiologischen Abläufe innerhalb der Basalganglien bei Patienten mit M. Parkinson.

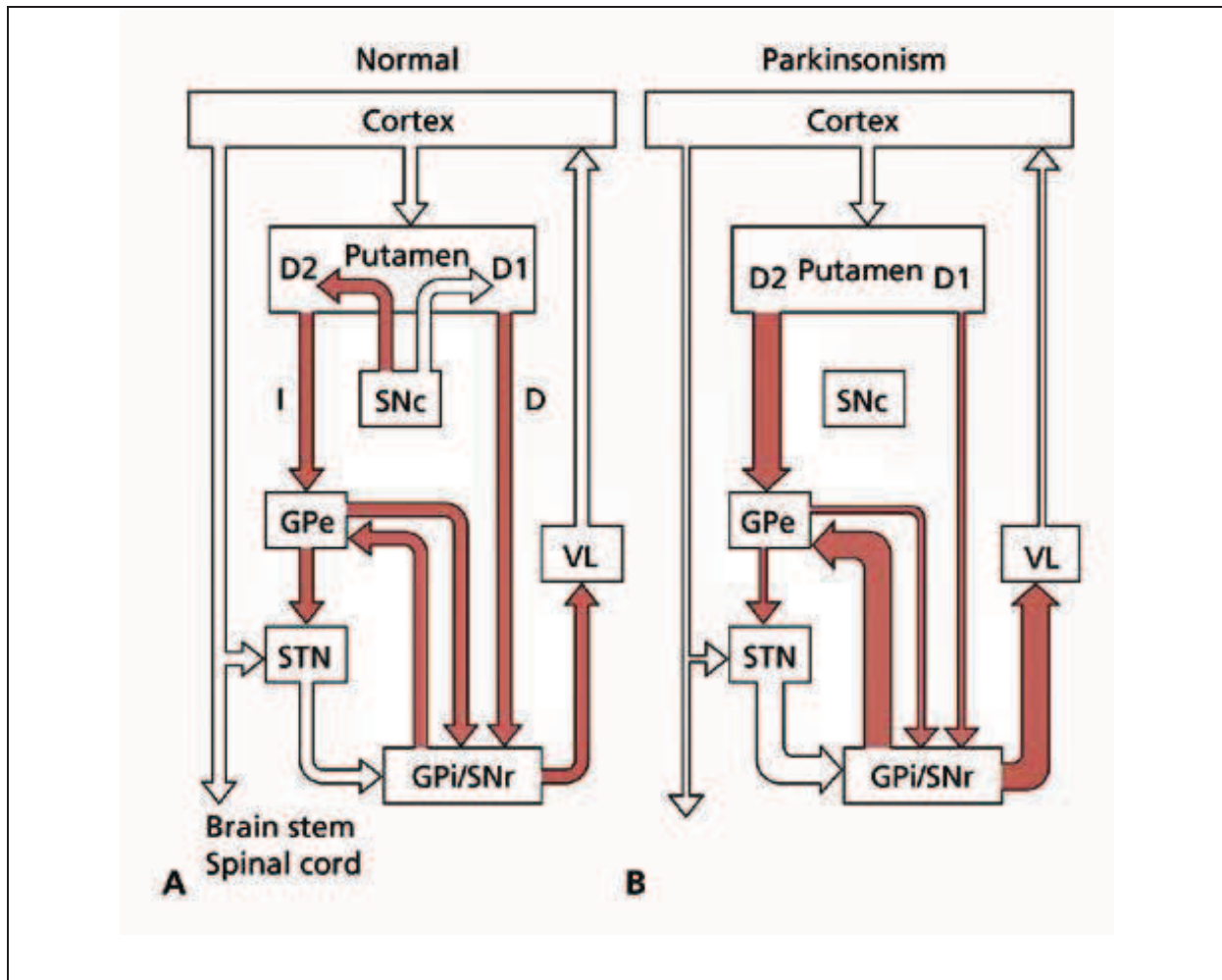


Abbildung 2.7 Pathophysiologie der Basalganglien bei M. Parkinson [43]: **A**, Dopamin aus der Substantia nigra pars compacta innerviert das Neo-Striatum mit einem Mechanismus, der über einen „direkten“ und einen „indirekten“ Signalweg wirkt. Dopamin inhibiert die striatalen Neurone über D2 Rezeptoren, die zum indirekten Weg gehören. Von diesen striatalen gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Neuronen gehen inhibitorische Fasern zum Globus pallidus externa (GPe) aus; vom GPe aus gehen GABAerge inhibitorische Fasern zum Ncl. subthalamicus (STN); der STN gibt glutamaterge exzitatorische Fasern zum Globus pallidus interna (GPi) ab; der GPi sendet GABAerge inhibitorische Signale an den ventrolateralen (VL) und ventral anterioren Kern des Thalamus. Der Effekt des Dopamins über den "indirekten" Weg ist die Inhibition des tonisch aktiven GPi. Andererseits wirkt Dopamin exzitatorische über D1 Rezeptoren, auf die striatalen Neurone des "direkten Signalwegs". Inhibitorische Fasern dieser striatalen GABAergen Neurone führen direkt zum GPi. Der Effekt des Dopamins über den "direkten" Weg ist die Inhibition des tonisch aktiven GPi. Folglich wird der GPi über beide Wege durch Dopamin inhibiert, das über das Striatum wirkt. **B**, Beim M. Parkinson, bei dem durch die Degeneration der Neuronen der Substantia nigra pars compacta ein Mangel an striatalem Dopamin entsteht, ist der Gesamteffekt eine Steigerung der Aktivität des GPi, sowohl durch den "direkten", als auch durch den "indirekten" Transduktionsweg. Das führte zu Versuchen die Wirkung des Dopaminmangels durch chirurgische Eingriffe im Bereich der STN und des GPi zu mindern. SNc—Substantia nigra pars compacta; SNr—Substantia nigra pars reticulata. (modifiziert von Wichmann et al.)

Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter, der in mehreren Schritten aus L-Phenylalanin gebildet wird. In der Leber entsteht aus L-Phenylalanin L-Tyrosin, das die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und dann in dopaminergen Neuronen zu L-Dihydroxyphenylalanin (Levodopa, L-DOPA) hydrolysiert wird. Dabei ist das Enzym Tyrosinhydroxylase der geschwindigkeitsbestimmende Katalysator. Die DOPA-Decarboxylase katalysiert dann die Umwandlung zu Dopamin, das wiederum gewebeabhängig zu Noradrenalin und Adrenalin weiter umgesetzt werden kann [33] (Siehe Abb. 2.8).

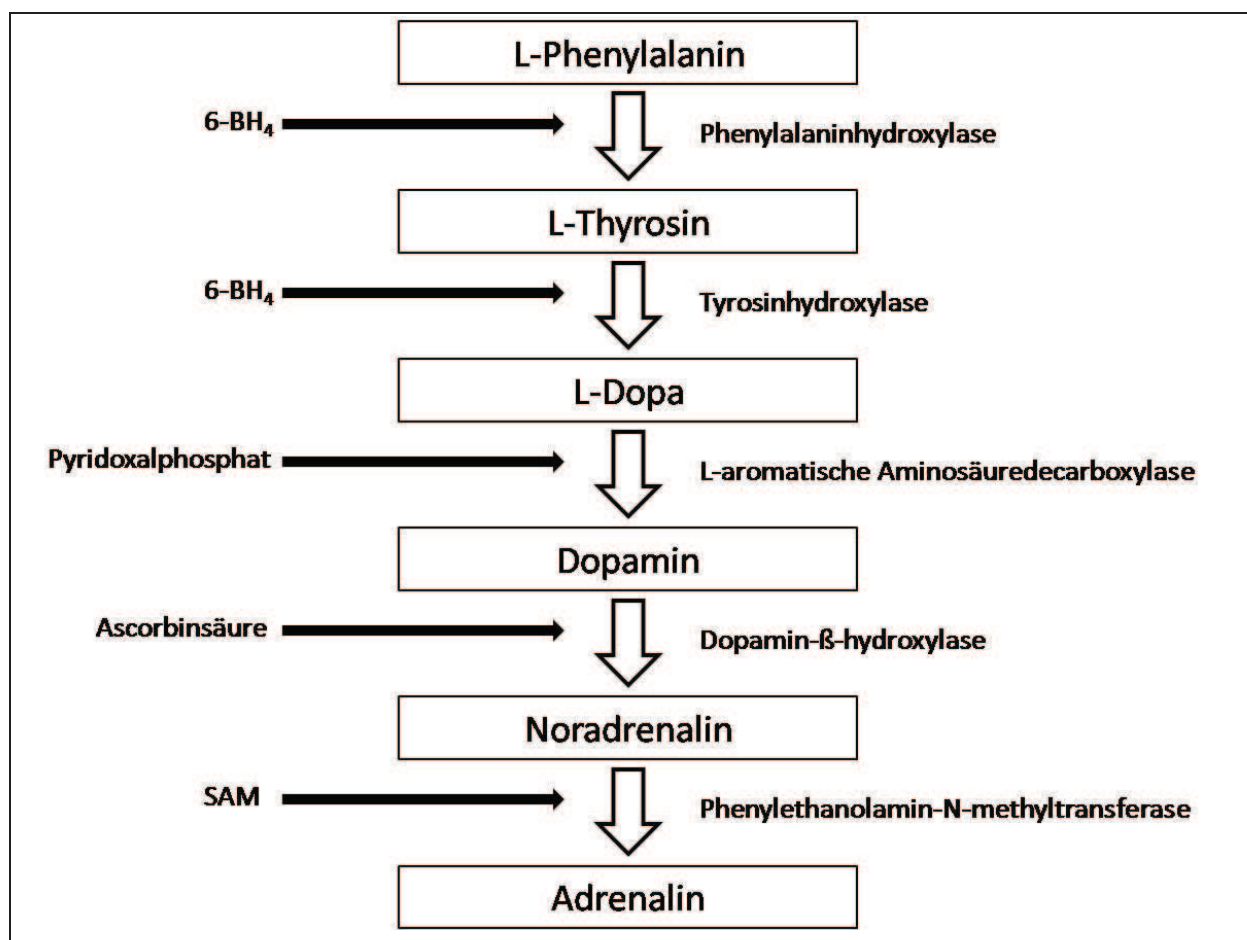


Abbildung 2.8 Biosynthese der Katecholamine [58]: L-Tyrosin wird durch Phenylalaninhydroxylase (PAH) in L-Phenylalanin umgewandelt, dabei ist O₂ Substrat und 6-Tetrahydrobiopterin (6BH₄) als Cofaktor, letzteres ist Vitamin B6 und SAM-abhängig. L-Tyrosin wird von TH zu L-Dopa oxidiert, das von der L-aromatischen Aminosäuredecarboxylase zu Dopamin konvertiert wird. Die Oxidation durch Dopamin-β-Hydroxylase führt zu Noradrenalin. Schließlich katalysiert Phenylethanolamin-N-Methyltransferase Adrenalin aus Noradrenalin mit Hilfe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM).

Gespeichert wird Dopamin durch den vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT) in synaptischen Vesikeln, die sich auf einen Nervenimpuls hin in den synaptischen Spalt entleeren [79]. Der Dopamintransporter (DAT) nimmt das Dopamin aus dem synaptischen Spalt wieder auf und stellt es entweder der erneuten vesikulären Speicherung oder dem enzymatischen Abbau zur Verfügung [160]. Der Abbau erfolgt im ZNS intrazellulär oder extrazellulär in benachbarten Gliazellen über die Typ B Monoaminoxidase (MAO-B) und die Katecholamin-O-Methyl-Transferase (COMT). Intrazellulär greift zunächst die MAO-B an, es entsteht das Zwischenprodukt 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), extrazellulär wirkt COMT zuerst, es entsteht 3-Methoxytyramin (Abb. 2.9). Endprodukt ist die Vanillinmandelsäure, die über die Nieren ausgeschieden wird [78].

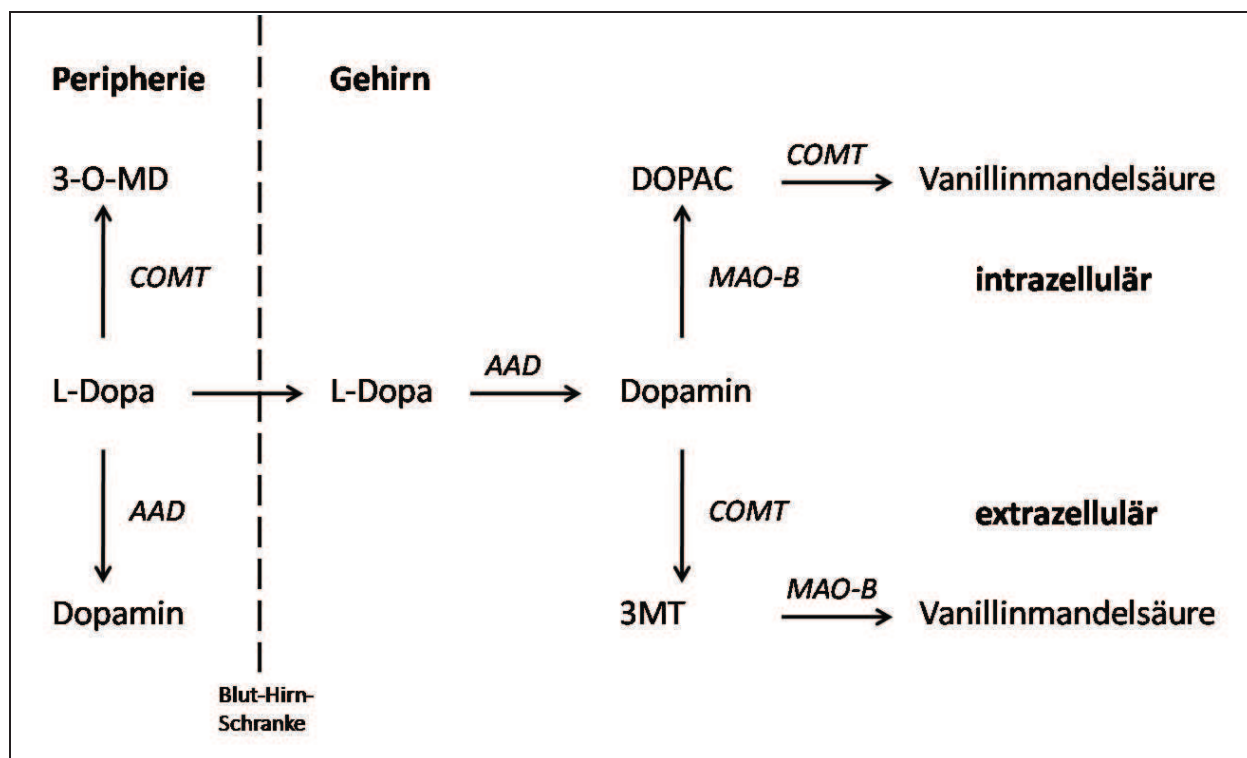


Abbildung 2.9 Stoffwechsel von L-Dopa nach Applikation und Dopamin-Abbau: Peripher wird L-Dopa entweder von der Katecholamin-O-Transferase (COMT) zu 3-O-Methyldopa umgewandelt, oder von der Aminosäuredecarboxylase (AAD) zu Dopamin. Im Gehirn wirkt zunächst die AAD. Das entstandene Dopamin wird dann intrazellulär durch Monoaminoxidase B (MAO-B) zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und anschließend durch die COMT in das Endprodukt Vanillinmandelsäure umgewandelt. Extrazellulär greifen die Enzyme in umgekehrter Reihenfolge an: COMT baut zu 3-Methoxytyramin (3MT) um, danach MAO-B zu Vanillinmandelsäure.

Neuropathologisches Hauptkriterium des M. Parkinson ist eine Degeneration der dopaminergen Neurone in pars compacta und pars lateralis der Substantia nigra [75] (Abb. 2.10).

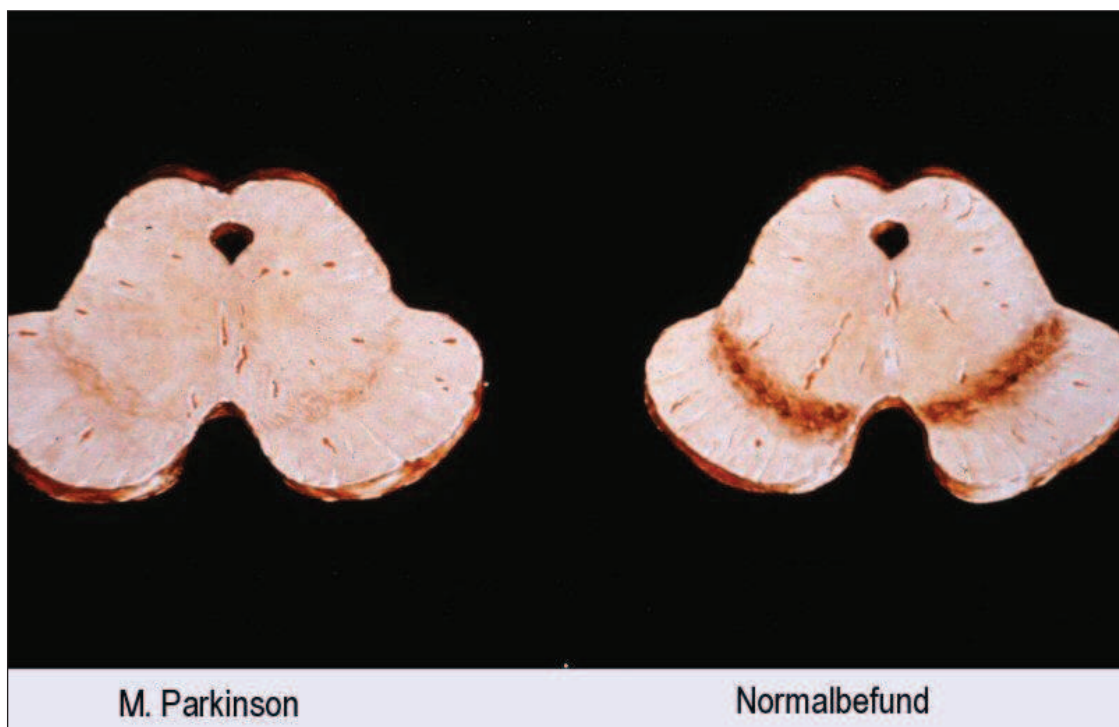


Abbildung 2.10 Substantia nigra Degeneration im makropathologischen Schnitt

Erste Symptome treten bei 50-70% degenerierter Neurone auf [13]. Abhängig vom Ort der Degeneration und dessen Projektion auf das Striatum sind die Symptome eher motorisch (Projektion zum Putamen) oder dementiell (Projektion zum N. caudatus) [35, 142]. Durch das verminderte Dopamin-Aufkommen fällt der ausgleichende Effekt im Regelkreis der dopaminergen Beeinflussung des GABAergen Effekts auf Thalamus und Cortex weg. Dadurch wird mehr GABA im Thalamus ausgeschüttet, wodurch die glutamaterge Aktivierung des Cortex gehemmt wird. Folge daraus ist die mangelnde Verstärkung kortikaler Bewegungsmuster und mangelnde Umsetzung der willkürlichen Motorik [16]. Da beim M. Parkinson auch Störungen in anderen Transmittersystemen vorliegen [87], wird diskutiert ob der Dopaminmangel möglicherweise für die Degeneration nicht-dopaminergener Neurone

mitverantwortlich sein kann [73]. Das Ausmaß der dementiellen und depressiven Symptome ist beispielsweise mit dem Noradrenalinmangel eng verknüpft [87].

Weiteres neuropathologisches Kriterium sind die bereits oben erwähnten LEWY-Körperchen. Diese 1912 nach F.H. LEWY benannten eosinophilen Einschlusskörperchen befinden sich im Zytoplasma der betroffenen Neurone. Sie haben einen dichten, zentralen Kern umgeben von filamentartigen Strukturen und werden als neuropathologischer Marker für Zytoskelettveränderungen angesehen [40] (Abb. 2.11). Die biochemischen Aspekte werden im Kapitel über β -Amyloid und α -Synuclein besprochen.

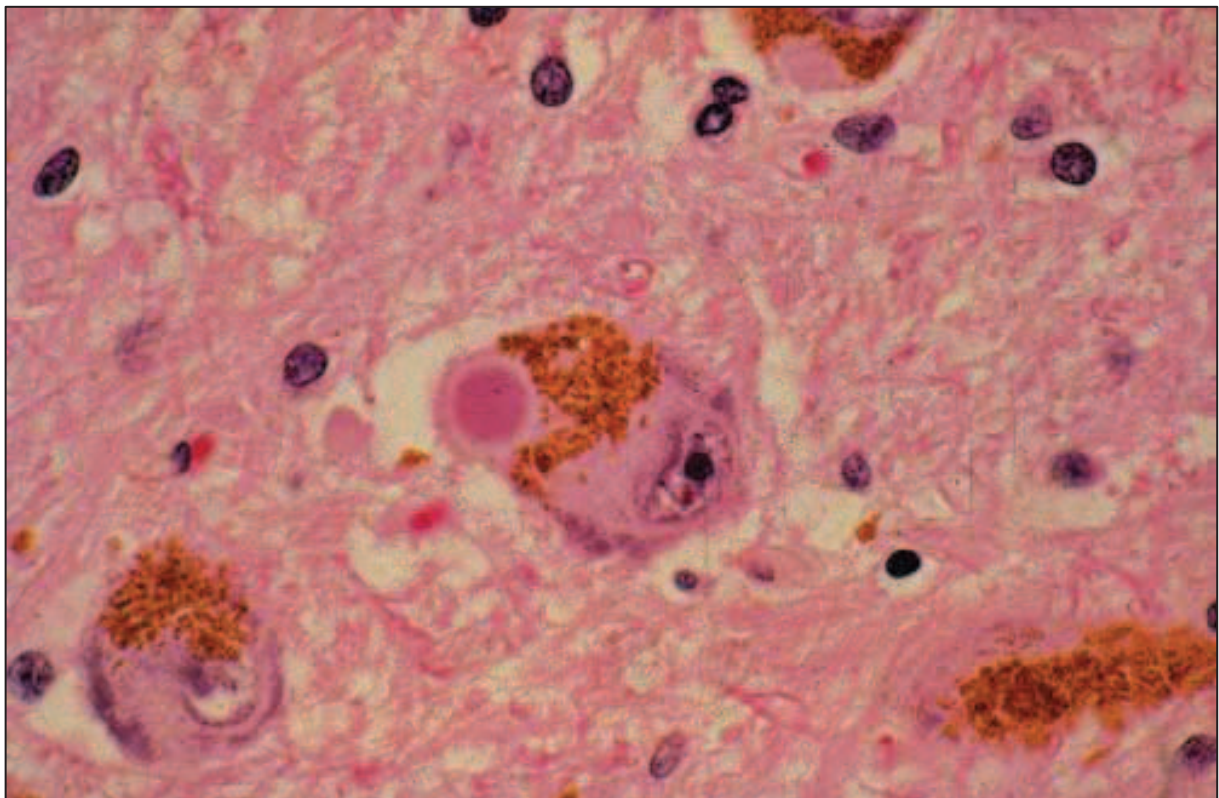


Abbildung 2.11: Lewy Bodies in einem pigmentierten Neuron der Substantia nigra [14]: Die cytoplasmatischen Einschlüsse (nach Färbung mit Periodic acid-Schiff (Perjodsäure und Schiff'scher Reagenz) (PAS) und Anwendung von Ubiquitin- und alpha-Synuclein-Antikörpern) sind von einem Vorhof umgeben und werden als typisches Merkmal des klassischen M. Parkinson erachtet.

Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass das idiopathische Parkinson-Syndrom am ehesten durch drei Faktoren entsteht: altersbedingte Veränderungen, genetische Prädisposition und Umweltfaktoren [153, 176]. Verwandte von Parkinson-Patienten haben ein zweifach erhöhtes Risiko, an der Krankheit zu erkranken, daher scheint ein genetischer Einfluss wahrscheinlich zu sein [64, 173]. Durch diese Faktoren werden pathologische Mechanismen aktiviert oder unterstützt, die schließlich zum Absterben der dopaminergen Zellen führt. Dazu zählen der oxidative Stress, die mitochondriale Dysfunktion, außerdem weitere Pathomechanismen wie z.B. inflammatorische Prozesse, die als vermutlich reaktiv, aber die Progression der Krankheit unterstützend, beschrieben werden [105]. In Abbildung 2.12 sind diese Faktoren übersichtlich dargestellt.

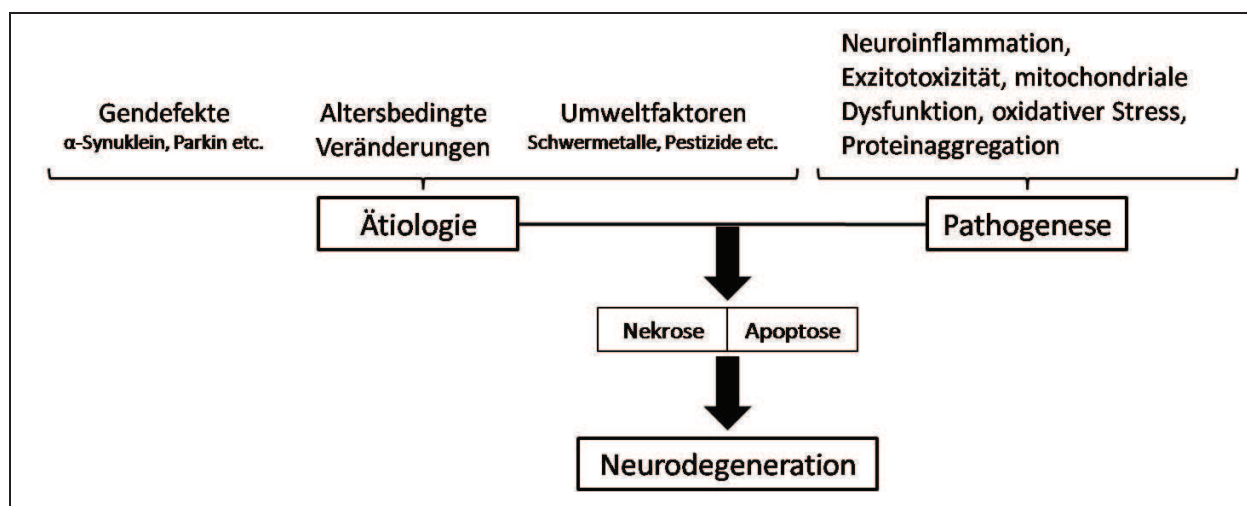


Abbildung 2.12 Hypothesen zur Ätiopathogenese des idiopathischen M. Parkinson (modifiziert nach [146])

Zentraler Mechanismus in der Pathogenese des M. Parkinson ist allem Anschein nach der oxidative Stress [91, 152]. Die reaktiven Sauerstoffspezies ändern und beeinflussen durch ihre hohe Reaktivität die mikrobiologischen Vorgänge der Zelle. Der Mechanismus wurde bereits im Abschnitt „Neurotoxizität der HHcy“ beschrieben. Oxidativer Stress ist ein Missverhältnis zwischen Oxidantien und körpereigener Antioxidantien [91].

In komplexem Zusammenhang mit dem oxidativen Stress steht die mitochondriale Dysfunktion, die erstmals 1976 bzw. 1982 in Verbindung mit der Degeneration

dopaminergem Neurone gebracht wurde. Damals löste das Gift MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) akute Parkinson-Syndrome bei Drogenkonsumenten aus, die es als Beimischung zu Heroincocktails inkorporiert hatten [106]. Dabei schädigen Sauerstoffradikale offenbar mitochondriale Proteinkomplexe, die bei Fehlfunktion entlang der Atmungskette ihrerseits wiederum zu einem erhöhten Anfall an hochreaktiven Sauerstoffradikalen führen. Das dadurch nicht gebildete ATP hat ein Energiedefizit in der Zelle zur Folge, ein *circulus vitiosus*, der zur Zelldegeneration führen kann. Besonders empfindlich für diesen Mechanismus sind offenbar Mitochondrien an Nervenendigungen [147, 154].

Pharmakologische Therapie des M. Parkinson

Für die Therapie des M. Parkinson stehen, wie Tabelle 2.2 auf der Folgeseite zeigt, eine Reihe von Präparaten zur Verfügung. Durch das Prodrug L-DOPA wird das fehlende Dopamin ersetzt, in fester Kombination mit einem Decarboxylase-Hemmer (DDI), teilweise in Dreierkombination mit einem Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer (COMT-I). Alternativ oder zusätzlich zu L-DOPA zeigen Agonisten am Dopamin-Rezeptor und MAO-(Monoaminoxidase)-B-Inhibitoren Wirkung. Altersgrenze in der aktuellen Therapieempfehlung ist das (biologische) 70. Lebensjahr. Vorher wird zu Beginn der Behandlung eine Monotherapie mit Dopamin-Agonisten empfohlen, danach direkt L-DOPA. Unabhängig vom Alter wird der Einsatz von L-DOPA so lange wie möglich hinausgezögert, um den Therapiespielraum offen zu halten. Die weiteren Wirkstoffe werden symptomspezifisch ergänzt. Neurochirurgisch steht die tiefe Hirnstimulation, in der Regel am Nucleus subthalamicus, zur Verfügung. Dieser Eingriff ist bei nachlassender pharmakologischer Therapierbarkeit indiziert. Bei ausgeprägten Einzelsymptomen werden auch NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Antagonisten und Anticholinergika eingesetzt. Antidementiva und Antidepressiva spielen bei einer Komorbidität von bis zu 40% eine weitere wichtige Rolle (entsprechend den derzeit aktuellsten Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie vom Oktober 2005 und [146]).

Tabelle 2.2: Medikamente zur Therapie des M. Parkinson

Dopamin-Agonisten:

Ergot-Derivate:

Bromocriptin:	Pravidel [®]
Pergolid:	Parkotil[®]
Dihydroergocryptin:	Almirid [®]
Cabergolin:	Cabaseril[®]

Non-Ergot-Derivate:

Ropinirol:	Requip[®]
Pramipexol:	Sifrol[®]
Rotigotin:	Neupro[®]
Piripeditil:	Clarium[®]

Indirekte Agonisten (Amantadine):

PK-Merz[®]

L-Dopa:

Kombination mit Benserazid (DI): **Madopar[®]**

Kombination mit Carbidopa (DI): **Nacom[®]**, Isicom[®], Striaton[®]

Kombination mit Carbidopa (DI) und Entacapone (COMT-I): **Stalevo[®]**

COMT-Inhibitoren:

Entacapon (**Comtess[®]**)

Tolcapon (Tasmar[®])

Anticholinergika:

Biperiden (**Akineton[®]**)

Trihexyphenidyl (Artane[®])

Metixen (Tremarit[®])

MAO-B-Hemmer:

Selegelin (Antiparkin[®], Deprenyl[®], **Movergan[®]**)

Rasagilin (**Azilect[®]**)

Budipin (monoaminerg, antimuskarinerg):

Budipinhydrochlorid (**Parkinsan[®]**)

DI: Decarboxylase-Inhibitor; COMT-I: Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitoren. Die bei den Patienten der vorliegenden Arbeit verwendeten Medikamente sind fett gedruckt. Wirkstoffe und Präparate sind eine exemplarische Auswahl der einzelnen Strategien.

Homocystein und M. Parkinson

Mehrfach wurde über erhöhte Plasma-Hcy-Spiegel bei Patienten mit M. Parkinson berichtet [15, 180]. Erklärt wird der Anstieg durch den oft verminderten Folat- und Vitamin-B12-Status der Patienten, genetische Beeinflussung des Hcy-Metabolismus [180] oder die Pharmakotherapie der Krankheit mit L-DOPA [15, 102, 103]. L-DOPA wird größtenteils durch COMT methyliert, SAM liefert die dazu benötigten Methylgruppen. Aus SAM wird dabei SAH, aus SAH entsteht anschließend Hcy. Das Methylierungspotential, ausgedrückt im SAM/SAH-Quotient sinkt also, der Hcy-Spiegel steigt. Die HHcy bei L-DOPA-therapierten Patienten entsteht vermutlich durch das Zusammenspiel mehrerer Mechanismen. Der exzessive Metabolismus des L-DOPA über COMT, wie oben beschrieben. Bei Folat- und B12-Mangel, sowie bei genetisch bedingten Enzymdysfunktionen (z.B. MS, MTHFR) ist die Zahl der verfügbaren Methylgruppen zusätzlich vermindert. Der Transsulfurierungsweg kann durch Vitamin B6-Mangel, genetisch bedingte CBS-Fehlfunktion und fehlende Aktivierung durch SAM behindert sein [123]. Die Erschöpfung des Methylgruppen-, speziell des SAM-Pools und der gleichzeitige Anstieg von SAH und Hcy fördern die neurodegenerativen Prozesse im Tiermodell [108]. Aktuelle Untersuchungen wiesen in der substantia nigra von PD-Patienten, ebenso wie in der Schale von Lewy-Bodies, das homocystein-induzierte Endoplasmatische Retikulum-Protein (Herp) in aufregulierter Form nach [158]. Bei alkoholabhängigen Patienten konnte im Zusammenhang mit deren HHcy eine erhöhte Aktivität der Promoter-DNA am α -Synuclein-Gen nachgewiesen werden [17]. Die Aussagen zur Wirkung von COMT-I auf die Hcy-Plasmakonzentration sind uneinheitlich [104, 171], auch wird berichtet, dass das tHcy zwar sinkt, möglicherweise aber alternative Stoffwechselwege neurotoxische Substanzen hervorbringen [119].

Eine ausreichende Versorgung der mit L-DOPA behandelten PD-Patienten mit Folat und B12 wirkt sich senkend auf Hcy aus [103, 137]. Offenbar erhöhen Folatmangel und HHcy die Empfindlichkeit dopaminerger Neurone gegenüber toxische Umwelteinflüsse [39]. Aufgrund der bekannten Komorbiditäten und der bekannten Eigenschaft von Hcy als Risikofaktor z.B. für vaskuläre Erkrankungen, ist es, auch ohne Nachweis kausaler Zusammenhänge, sinnvoll, den Hcy-Plasmaspiegel zu bestimmen und durch Vitaminsubstitution zu kontrollieren. Wie bereits erwähnt sind Demenz und Depression sehr häufig bei Parkinson-Patienten anzutreffen, Patienten

mit einem Hcy > 14 µmol/l zeigten dabei eine schlechtere kognitive Leistung und waren depressiver [125]. Eine stärkere Progression der Erkrankung war ebenfalls nicht auszuschließen. Zusätzlich besteht ein erhöhtes Risiko für die Koronare Herzkrankheit [143] und cerebrovaskuläre Ereignisse. Für eine präventive Beeinflussung der Hcy-Konzentration spricht auch die Tatsache, dass HHcy ein Risikofaktor für Hüftfrakturen darstellt [115, 144, 172] und diese bei Parkinson-Patienten sehr häufig sind [3].

Einige Studien konnten keine Beziehung zwischen Hcy- und Vitaminstatus und dem Auftreten oder klinischen Verlauf der PD feststellen [124]. Diese besitzen aber eingeschränkte Aussagekraft, da die Probandenzahlen gering und die Beobachtungszeit sehr kurz war. Ob Hcy eine kausale Rolle bei der Entstehung des M. Parkinson spielt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Es kann ebenso eine Sekundärerkrankung, oder auf Parkinson-Medikamente rückführbar sein.

α -Synuclein

1988 wurden von MAROTEAUX et al. [111] ein Proteine aus dem präsynaptischen Neuron isoliert und Synuclein genannt. Bestandteile der Amyloid-Plaques bei Patienten mit M. Alzheimer wurden später als Synucleine identifiziert [167]. Dem 140 Aminosäuren langen Protein wurde der Name α -Synuclein zugeordnet, das humane Ortholog eines 14 kD schweren Phosphoneuroproteins, isoliert aus Ratten und Rindern, das ebenfalls zu den Synucleinen gehört, wurde zu β -Synuclein [81]. Die Aufgaben dieser beiden Synucleine liegen vermutlich zum einen im Bereich der präsynaptischen Vesikel, deren gerichteter Transport durch Reorganisation des Cytoskeletts erreicht wird zum anderen im Bereich membranärer Prozesse [31, 89]. MAROTEAUX und SCHELLER hatten 1991 [112] vermutet, dass außerdem die Ausschüttung und die Wiederverwertung der Vesikel beeinflusst wird. Neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Parkinson zeigen Akkumulationen von α -Synuclein in den Plaques bzw. Lewy-Bodies und Lewy-Neuriten [80], weshalb dieses Protein Gegenstand weiterer Projekte war. Als Mutationen auf dem α -Synuclein-Genlocus (A30P und A53T) bei Patienten mit der seltenen familiären Form des M. Parkinson entdeckt und als ursächlich erachtet wurden [135], wurde diese Hypothese bekräftigt. Wodurch die Akkumulation ausgelöst wird ist bisher unbekannt. Diskutiert werden ein abnormer intrazellulärer Proteintransport, Störungen des axonalen Flusses und begünstigende Faktoren, wie z.B. oxidativer Stress [63]. Was zum neuronalen Zelltod führt ist ebenfalls unbekannt. Möglicherweise wirken die α -Synuclein-Filamente sogar neuroprotektiv [47, 164]. Dagegen vermuten neuere Quellen, dass kleinste α -Synuclein-Aggregate, die von der Nervenzelle bekämpft, aber nicht aus der Peripherie zum Zentrum geschafft werden können, zum Verkümmern der Signaltransduktion des betreffenden Dendriten führt. Entsprechende Hinweise wurden bei Patienten mit Lewy-Body-Demenz gefunden [99]. Offenbar ist α -Synuclein auch ein Inhibitor der Tyrosinhydroxylase, die L-Tyrosin in L-DOPA umwandelt und damit die Dopamin-Produktion vermindert [6].

Amyloid- β -Precursor-Protein (APP) und β -Amyloid

Amyloid- β ($A\beta$) ist ein 39 – 43 Aminosäuren großes Peptid, das nach sequentieller Trennung aus dem transmembranen Glykoprotein Amyloid-Precursor-Protein (APP) entsteht. Die häufigsten Isoformen haben 40 bzw. 42 Aminosäuren ($A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$). $A\beta_{40}$ wird von beiden am meisten angetroffen, $A\beta_{42}$ dagegen neigt mehr zur Fibrillenbildung und ist somit eher in krankhaftem Gewebe anzutreffen [181]. Im Mausmodell steigert β -Amyloid die Anreicherung von α -Synuclein [41]. β -Amyloid reichert sich unter anderem beim M. Alzheimer in Plaques an, bei M. Parkinson in Lewy-Bodies und Lewy-Neuriten. Bei den Lewy-Body Krankheiten, wie z.B. der Demenz vom Lewy-Body Typ, scheinen sich interessanterweise beide Krankheitsbilder zu überschneiden [88]. Einen Überblick gibt Abb. 2.13.

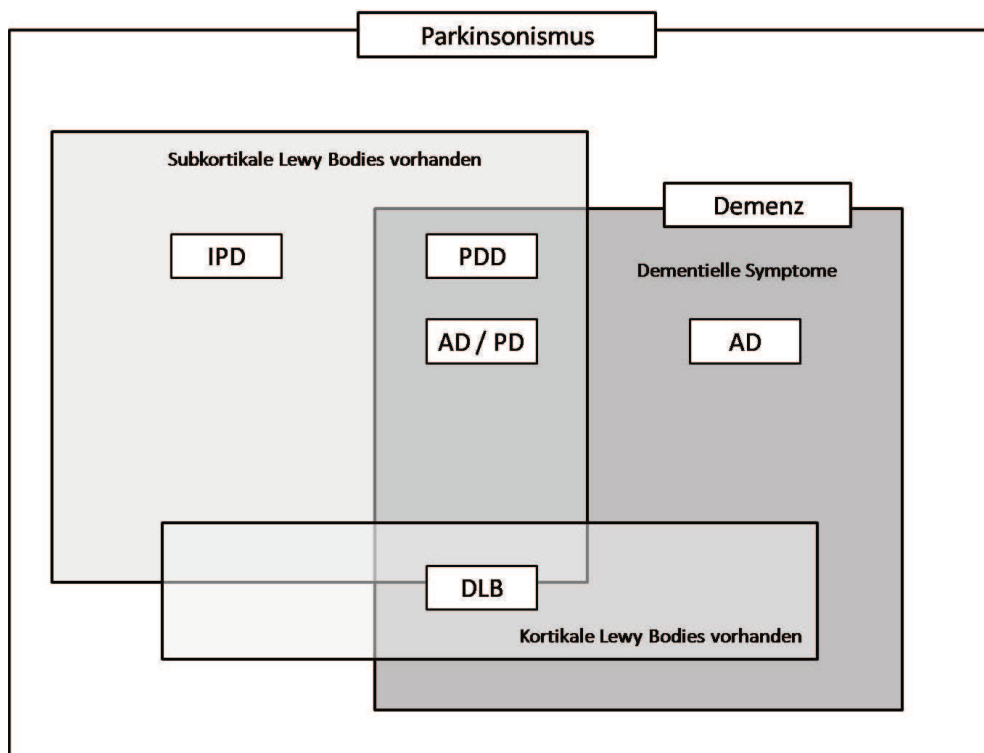


Abbildung 2.13: Erkrankungen mit Vorkommen von Lewy-Bodies: Die meisten Fälle von Demenz, bei denen Parkinson-Symptome auftreten, sind auf den idiopathischen M. Parkinson (IPD, idiopathic Parkinson's disease), M. Alzheimer (AD, Alzheimer's disease) und Demenz vom Lewy Body-Typ (DLB) oder eine Kombination dieser zurückzuführen. Diese Grafik zeigt die Beziehungen zwischen diesen Erscheinungsformen. 20% bis 30% der IPD-Patienten haben eine Demenz [2], 15 – 25% der AD-Patienten motorische Defizite [50]. Die meisten mit IPD assoziierten Fälle entstehen vermutlich eher durch die IPD selbst, als durch eine Überlagerung einer Alzheimer Pathologie oder kortikaler Lewy-Bodies. Der Symptomkomplex ist subkortikal und weitgehend abgrenzbar vom Erscheinungsbild der AD. PDD: Parkinson's Disease with Dementia, Demenz bei M. Parkinson

Fragestellung

Die häufigsten sporadischen Formen der Alzheimer-Demenz und des M. Parkinson zeigen pathologische Akkumulationen von β -Amyloid und α -Synuclein in Lewy Bodies bzw. Lewy Body ähnlichen Inklusionen. Dies lässt vermuten, dass bei der Entstehung ähnliche oder gleiche pathologische Bedingungen vorherrschen. Die neurotoxische Potenz der HHcy ist bekannt [138], das vermehrte Vorkommen von endothelialen Zellkörpern und die vermehrte Vaskularisation [44] erhöhen vermutlich die Vulnerabilität gegenüber Neurotoxinen. Der Methylierungsstatus ist eng mit dem Hcy-Stoffwechsel verbunden und wird durch B-Vitamine beeinflusst. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die beim M. Parkinson gegebenen metabolischen Bedingungen und ihre beeinflussenden Faktoren, die Neurodegeneration begünstigen können. Als Pathomechanismus kommt möglicherweise die gesteigerte Akkumulation von Proteinmarkern wie β -Amyloid und α -Synuclein in Betracht. Thrombozyten haben eine ausreichende Ähnlichkeit mit Neuronen, um als Model zu dienen [34], daher isolieren wir die Proteinfraction aus den Thrombozyten und testen auf APP und α -Synuclein. Darüber hinaus untersuchen wir den Zusammenhang zwischen den Blutparametern und der echogenen Fläche der Substantia nigra im transcraniellen Ultraschall.

3. Material und Methodik

Probanden, Material / Proben

Probandenrekrutierung, Probengewinnung, Datenerhebung

Die Probanden sind Patienten der Parkinson-Ambulanz der neurologischen Poliklinik an der Universitätsklinik des Saarlandes oder stationäre Patienten der neurologischen Klinik. Die unten angeführten Tests wurden als Teil der ambulanten oder stationären Diagnostik durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte zur Routinediagnostik, die Patienten wurden über die zusätzlichen laborchemischen Untersuchungen zu wissenschaftlichen Zwecken informiert und stimmten diesen schriftlich zu.

Zur Diagnostik wurde entnommen (jeweils in Monovetten[®] der Fa. Sarstedt):

4,7 ml Blut auf Lithium-Heparin zur Routinediagnostik (Kreatinin, Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), γ -GT (Glutamyltransferase), C-reaktives Protein (CRP)); 2,7 ml Blut auf EDTA zur SAH/SAM und Vitamin B6 Bestimmung; 5 ml Blut auf Citrat zur Isolierung der Thrombozyten; 4,7 ml Blut in trockener Monovette zur Bestimmung von Hcy, Cys, MMA, Vitamin B12, holoTC, Amyloid- $\beta_{(1-42)}$ und Folat.

Ein- / Ausschlusskriterien für Probanden, Übersicht

Einschlusskriterium war die Diagnose idiopathischer M. Parkinson. Klinische Ausschlusskriterien waren sekundäre Parkinsonsyndrome, Multisystematrophien und weitere Differentialdiagnosen des idiopathischen M. Parkinson. Vom laborchemischen Gesichtspunkt her wurden Patienten ausgeschlossen, die eine akute Entzündung aufwiesen (CRP > 10 mg/l), niereninsuffizient waren (Kreatinin > 2 μ mol/l), die innerhalb der letzten drei Monate einen Hirn- oder Myokardinfarkt erlitten hatten oder regelmäßig Folat, Vitamin B6 und/oder B12 einnahmen.

An der Studie nahmen zwischen September 2007 und Mai 2008 insgesamt 91 an M. Parkinson erkrankte Patienten teil, vier davon konnten aufgrund der

Ausschlußkriterien nicht berücksichtigt werden. Die verbliebenen 87 waren im Median 68 Jahre alt, bei 49 (56,3%) Probanden wurde die Diagnose vor mehr als 5 Jahren gestellt. Die mediane kognitive Leistungsfähigkeit lag in der MMSE bei 28 Punkten und im DemTect bei 14. Der mediane UPDRS III war 26. 38 Patienten (43,7%) zeigten zum Untersuchungszeitpunkt das Symptom Tremor. 33 Patienten (38%) waren männlich, 30 (34,5%) rauchten. An Diabetes mellitus waren 11 (12,6%) erkrankt. Zusätzlich zur Parkinson-Therapie waren 30 Patienten (34,5%) mit Antidepressiva eingestellt, 9 (10,3%) nahmen Antidementiva. 58 Patienten (66,7%) wurden mit L-Dopa therapiert, 35 (40,2%) der Gesamtheit bekamen dies in Kombination mit Carbidopa. L-Dopa kombiniert mit COMT-Inhibitor bekamen 32 Patienten (36,8%). MAO-Inhibitoren wurden bei 14 (16,1%) eingesetzt. Für Rauchen, Antidepressiva, MAO-Inhibitoren oder Diabetes mellitus konnte kein Effekt auf die tHcy-Konzentration oder verwandte Marker festgestellt werden. Tabelle 4.1 zeigt die klinischen Daten in der Übersicht.

Tabelle 3.1: Hauptmerkmale der Studienpopulation (n = 87)

Alter, Jahre*	68 (54-78)
Erkrankungsdauer, Jahre*	5 (0-12)
MMSE, Score*	28 (22-30)
DemTect, Score*	14 (7-18)
UPDRS III, Score*	26 (12-49)
Männlich, n (%)	33 (38%)
Aktuell mit Tremor, n (%)	38 (43,7%)
Raucher, n (%)	30 (34,5%)
Diabetes mellitus, n (%)	11 (12,6%)
Dopaminagonist, n (%)	63 (72%)
L-Dopa, n (%)	58 (66,7%)
Carbidopa, n (%)	35 (40,2%)
MAO-Inhibitor, n (%)	14 (16,1%)
Erkrankungsdauer > 5 Jahre, n (%)	49 (56,3%)
L-Dopa plus COMT-Inhibitor, n (%)	32 (36,8%)
Antidepressiva, n (%)	30 (34,5%)
Antidementiva, n (%)	9 (10,3%)

* Median (10. – 90. Perzentile), oder prozentuale Angaben bezogen auf die Gesamtpopulation

Präanalytik

EDTA-Blut und Serum-Gel wurden auf Eis gelagert und innerhalb von 45 Minuten abzentrifugiert (2000g/10 min), abgetrennt und aliquotiert. Einer EDTA-Plasma-Probe (500 µl) wurde für die SAH/SAM-Messung 50 µl Essigsäure 1 N zugefügt. Alle Proben wurden anschließend bei – 70°C gelagert. Das Citrat-Blut wurde umgehend bei niedriger Umdrehungszahl (200g/10 min) zellschonend zentrifugiert, um das thrombozytenreiche Plasma gewinnen zu können. Die Thrombozyten wurden zweimal mit kalter PBS (Phospahte-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und anschließend bei -70°C eingefroren.

Methodik

Klinische Methodik

Bei den Probanden wurde bereits im Vorfeld ein idiopathischer M. Parkinson diagnostiziert, die Diagnose leitliniengerecht gesichert und entsprechend therapiert. Die klinischen Tests wurden immer von derselben Person durchgeführt.

Parkinson Scores

Parkinson Scores ordnen anhand unterschiedlicher Merkmale der aktuellen Krankheitssituation einen bestimmten Punktwert zu. Dadurch soll der Progress und der Therapieverlauf quantifiziert werden.

Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Teil III (UPDRS III)

Die UPDRS wurde 1987 [42] sowohl für Diagnostik, als auch für Therapieplanung und -kontrolle des M. Parkinson entwickelt. Prognostische Aussagen können damit nicht gemacht werden. Zur Kontrolle wird routinemäßig nur der dritte Teil des UPDRS bestimmt, der die motorischen Fähigkeiten des Patienten untersucht. Die geringst mögliche Punktzahl im dritten Teil ist 0, die höchste 108. Die anderen fünf Teile beschäftigen sich mit der psychischen und kognitiven Situation, der Lebensqualität, mit Komplikationen, dem Ausbreitungsmuster etc. und werden nur zu Beginn und dann in größeren Abständen erhoben. Die Reliabilität des UPDRS wird im Gesamten für exzellent [155] oder gut [140] erachtet.

Hoehn & Yahr (HY)

Die Skala nach Hoehn & Yahr [74] teilt die Progression des M. Parkinson in fünf Stadien ein. Den größten Einfluss auf Zuordnung hat dabei das Krankheitsmerkmal posturale Instabilität, die beiden weiteren Merkmale körperliche Einschränkung und

Behinderung fließen in geringerem Umfang ein. Nicht-motorische Probleme bleiben unbeachtet. Für die Stadien 2 - 4 sind Validität und Reliabilität weitgehend gegeben, allerdings nur für die nicht-modifizierte Version. Weiterhin muss die Nicht-Linearität bei der Auswertung beachtet werden [54].

Demenz Scores

Demenz Scores versuchen, Hinweise auf eine Demenz zu finden bzw. eine manifeste Demenz zu quantifizieren und Progress und Therapie zu überwachen. Dabei werden verschiedene kognitive Fähigkeiten abgefragt, wie z.B. die Merk- und Rechenfähigkeit.

Mini-Mental-Status (MMSE, MMST)

Der Test besteht aus 30 Fragen und Aufgaben, die von einem Untersucher gestellt werden. Sie geben Aufschluss über die Orientierung, Aufmerksamkeit und Rechenfähigkeit, Merkfähigkeit, Erinnerungsfähigkeit, Sprache und visuell-konstruktive Fähigkeiten. Die höchste zu erreichende Punktzahl ist 30, die niedrigste 0. Weniger als 10 Punkte sind hinweisend für eine schwere Demenz, weniger als 20 auf eine mittelschwere Demenz. Unterhalb von 24 – 26 Punkten besteht ein pathologisches kognitives Defizit [46]. In einer Literaturstudie von 1993 wird die Reliabilität als zufriedenstellend bewertet [163]. In einer Studie von 1982 wurden die Sensitivität mit 87% und die Spezifität mit 82% zur Erkennung von Demenz und Verwirrtheit festgestellt. Somit ist der MMSE als alleiniges Instrument zur Diagnosestellung nicht ausreichend [5].

DemTect (DT)

Der Untersucher fragt im DT (DemTect = Demenz-Detektion) in 5 Aufgaben das verbale Gedächtnis, die Wortflüssigkeit, die intellektuelle Flexibilität und die Aufmerksamkeit ab. Visuell-konstruktive Fähigkeiten werden nicht getestet. Die

Rohdaten werden in Testdaten überführt, validiert für Probanden jünger oder älter als 60 Lebensjahre. Bemerkenswert hoch sind Sensitivität (97%) und Spezifität (93%), besonders auch bei beginnenden kognitiven Einschränkungen. Minimal können 0 Punkte, maximal 18 erreicht werden. Punktwerte < 8 begründen einen Demenzverdacht, 9 – 12 sprechen für eine milde kognitive Beeinträchtigung und Werte > 12 sind als angemessene kognitive Leistung anzusehen. Das prämorbid intellektuelle Niveau des Probanden muss bei der Bewertung der Testergebnisse berücksichtigt werden [93].

Depressions Score

Beck's Depressions Inventory (BDI)

Der Proband beantwortet selbstständig Fragen zu 21 Symptomen einer klinischen Depression, die Antworten sind in vier Antwortstufen intensitätsskaliert. Der minimale Score beträgt 0, der maximale 63. In der Normalbevölkerung gelten Scores über 21 als Depression, bei bereits klinisch diagnostizierten Patienten werden 0 – 9 Punkte als minimale, 10 – 16 als milde, 17 – 29 als moderate und Werte zwischen 30 und 63 als schwere Depression gewertet [8, 9, 65]. Die Reliabilität wird als hoch, die Validität als belegt eingestuft [141].

Bildgebende Verfahren

Transcranielle Sonographie (TCS)

Die Pars squamosa des Scheitelbeins (Os temporalis), vor dem Ohr und oberhalb des Jochbeins (Os zygomaticum) gelegen, ist in der Regel ausreichend dünn, um als Schallfenster dienen zu können. Intrakranielle Strukturen wie das Ventrikelsystem, die Basalganglien und der Hirnstamm sind im B-Mode abgrenzbar (siehe Abb. 3.1). Im gesunden Gehirn kann die Substantia nigra normalerweise nicht, oder nur weniger echoreich, abgegrenzt werden. Finden jedoch degenerative Veränderungen, wie z.B. bei der Parkinson'schen Erkrankung statt, ist im transversalen Schnitt im mesencephalen Hirnstamm neben den Nuclei ruber und Raphe und dem Aquädukt, auch die Substantia nigra ganz oder teilweise als hyperechogene Struktur abgrenzbar. Diese Tatsache kann zur Diagnostik bei M. Parkinson genutzt werden [177, 182].

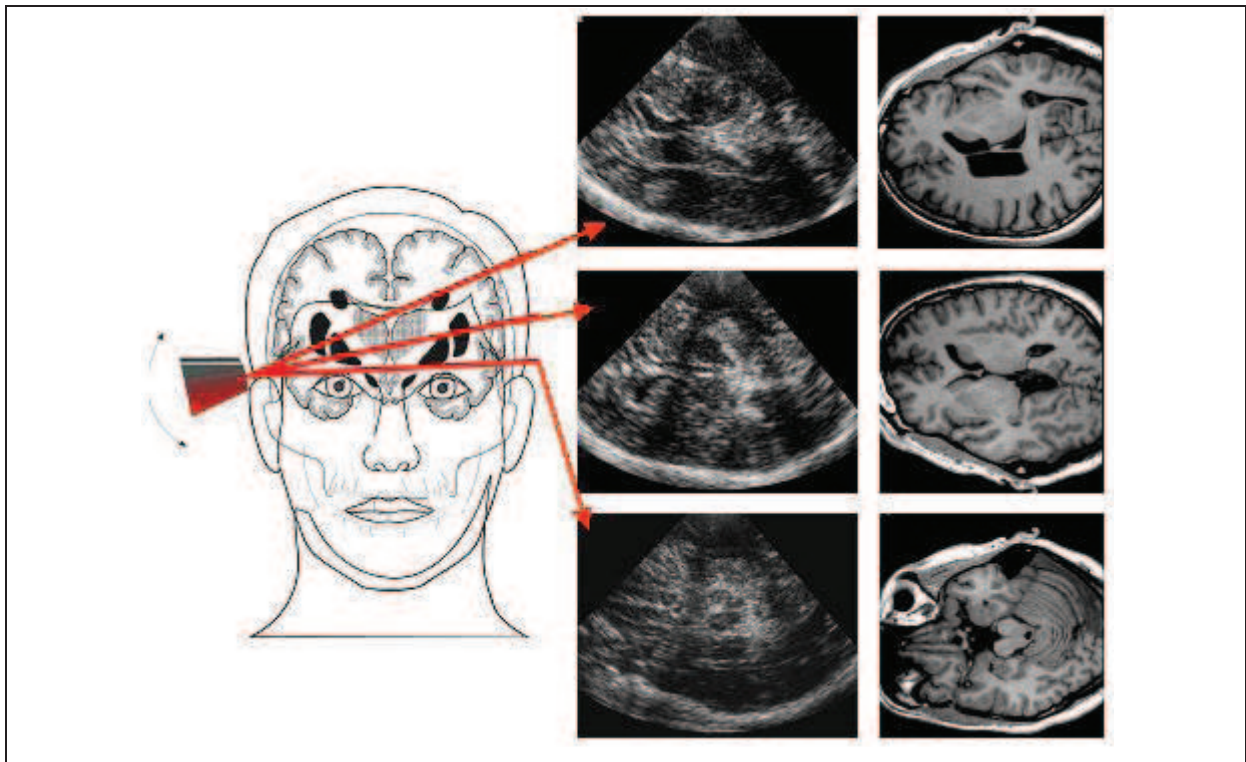


Abbildung 3.1: Verschiedene Schnittebenen der Hirnparenchymsonographie durch das temporale Schallfenster. Rechts die entsprechenden kernspintomographischen Schnitte.

Die Darstellbarkeit der Substantia nigra korreliert mit dem Schweregrad und der Dauer der Erkrankung. Die erhöhte Echogenität wird auf eine Gliose als Folge der Degeneration zurückgeführt [10]. Die hyperechogenen Strukturen werden auf dem Monitor mit dem Cursor umfahren und dann planimetrisch die Fläche errechnet. Für diese Studie wurde ein Farbduplexdopplersonographiergerät vom Typ Sonoline Antares der Firma Siemens verwendet, das mit einem Schallkopf ausgestattet war, der mit einer Sendeleistung von 2,5 MHz auf eine Penetrationstiefe von 14 cm und eine Empfangsempfindlichkeit von 55 dB eingestellt war. Die Untersuchung wurde von einer medizinisch-technischen Assistentin für Funktionsdiagnostik (MTA-F) und einem Neurologen durchgeführt. Mögliche Ergebnisse waren die Nichtdurchführbarkeit der Untersuchung mangels Schallfenster, die Nichtdarstellbarkeit der Strukturen trotz vorhandenem Schallfenster und schließlich die Flächenangabe in cm^2 (siehe Abb. 3.2). Da diese Variable semi-quantitativ ist, wurden die Ergebnisse stratifiziert: echogenes Areal $> 0,22 \text{ cm}^2$ ($n = 27$), $\leq 0,22 \text{ cm}^2$ ($n = 24$) und ohne Ergebnis, d.h. Befund nicht verwertbar ($n = 8$).

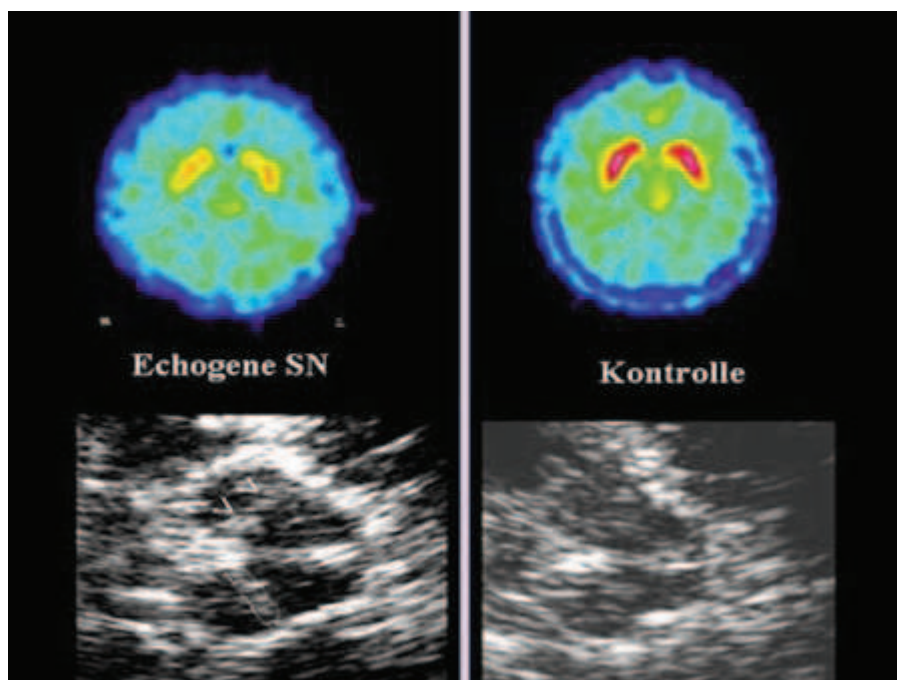


Abbildung 3.2: Echogene Substantia nigra in der transtranziellen Sonographie mit Pfeilen gekennzeichnet bzw. umrandet (unten links) und gesunde Kontrolle (unten rechts). Oben die entsprechenden Bilder in der Fluordopa-Positronen-Emissions-Tomographie (Fluordopa-PET).

Messung der Metaboliten des Homocysteinstoffwechsels im Blutserum

Messung von Homocystein (Hcy), Cystathionin (Cys) und Methylmalonylsäure (MMA)

Die Bestimmung von Hcy, Cys und MMA wird mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (Gas Chromatography – Massspectrometry (GC/MS)) durchgeführt. Die Methode von STABLER et al. [161] wurde für unsere Zwecke modifiziert. Zunächst werden gasförmige Derivate der Moleküle hergestellt, die dann gaschromatographisch getrennt werden. Die Konzentration wird massenspektrometrisch festgestellt. Hcy und Cys können gleichzeitig gemessen werden. In der Probe befinden sich deshalb deuterierte Formen von Hcy und Cys bzw. MMA als Interne Standards (IS). Zur Ionisation wird die Elektronenstoßionisation (EI, Electron Impact) genutzt. Bei dieser Energieübertragung entstehen Ionen oder Ionenfragmente nach einem substanzspezifischen Muster. Diese werden in einem Analysator aufgetrennt, ein Detektor erfasst die Anzahl und setzt sie in ein Signal um, das der Gesamt-Ionenzahl einer bestimmten Masse proportional ist. Die Kurve des Massenspektrogramms ist dann die Funktion Masse/Ladung. Die Konzentration des Stoffes in der Probe wird mit Hilfe der bekannten Konzentration der deuterierten Form in der Probe errechnet.

Geräte und Reagenzien:

- Gaschromatograph/Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies[®] (Typ 6890N).
- Poly-Prep Chromatography Columns der Firma Bio-Rad[®].
- Anionisches Resin der Firma Bio-Rad[®].
- Derivatisierung: N-methyl-butyldimethylsilyl-Tri-fluoroacetamid (MBDSTFA) der Firma Machery and Nagel[®].
- Interne Standards:
Hcy: DL-Homocystein(3,3,3',3',4,4,4',4',D-8)
Arbeitskonzentration: 110,544 mg/l = 400 µmol/l.
Cys: DL-(2-amino-2-carboxyethyl)Homocystein = DL-Cystathionin

Arbeitskonzentration: 1,78 mg/l = 7,86 µmol/l.

MMA: DL-Methylmalonylsäure

Arbeitskonzentration: 4 mg/l = 33,03 nmol/l.

- Reduktionsmittel: 1,4-Dithiotritol (C₄H₁₀O₂S₂, DTT) der Firma Roth[®],
Arbeitskonzentration: 10 mg/ml in 1N; NaOH.
- Acetonitril, Methanol, Essigsäure und Chromatographenwasser (HPLC Grade) der Firma Merck[®].
- Concentrator (Typ 5301) der Firma Eppendorf[®].

Zur Vorbereitung der Messung von Hcy/Cys wurde anionisches Resin mit 1N:HCl und Methanol vorgewaschen und bei 60°C für 4 Stunden getrocknet, pro Säule 100 mg Resin. 200 µl Serum wurden mit 30 µl DTT (30 mg / 1mL 1N NaOH), 30 µl IS Hcy 1:3 und 30 µl IS Cys 1:2 versetzt und bei 42°C 30 Minuten zur Reduktion inkubiert. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Festphase mit 1 ml Methanol und 3 ml Wasser gespült. Nach dem Auftragen wurde die Probe dreimal mit 3 ml Wasser gewaschen, anschließend einmal mit 3 ml Methanol. Die Elution erfolgte mit 1,1 ml 0,4N Essigsäure/Methanol-Mischung. Getrocknet wurden die Proben für etwa 3 Stunden bei 60°C im Concentrator. Den getrockneten Proben wurden 30 µl Acetonitril und MBDSTFA im Verhältnis 2:1 hinzugefügt und für fünf Minuten bei 440 Watt in die Mikrowelle gestellt. Danach konnte das GC/MS-Gerät beladen werden. Autosampler, Chromatograph und Massenspektrometer führten die Analyse vollautomatisch durch. Die MMA-Prozedur unterschied sich nur in der Zugabe von 25 µl IS MMA, das Waschen wurde einmal mit Wasser und dreimal mit 0,01 N Essigsäure/Methanol-Mischung durchgeführt, die Elution mit 1,1 ml einer Mischung aus Essigsäure/Methanol und 1N:HCl im Verhältnis 9:1. Die Geräteeinstellungen wurden abgeändert.

Berechnet wird die Konzentration als Quotient aus dem Integral des Peaks der Probenkurve und dem Integral des Peaks der Standardkurve, multipliziert mit folgenden Standardkonzentrationsfaktoren:

	<u>Einheit</u>	<u>Standardfaktor</u>
Hcy	µmol/l	39,2
Cys	µmol/l	1000
MMA	nmol/l	4087,5

Formel zur Konzentrationsbestimmung im Analyt:

$$\text{Konzentration}_{\text{Analyt}} = [\text{Peakintegral}_{\text{Analyt}} / \text{Peakintegral}_{\text{Standard}}] \times \text{Konzentration}_{\text{Standard}}$$

Geräteeinstellung des Gaschromatographen:

Ofentemperatur:	Min: 80°C	Max: 310°C
Einlasstemperatur:	230°C	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Flussgeschwindigkeit:	1ml/min	
Retentionszeit:	für MMA	~ 9 min
	für Hcy	13,1 min
	für Cys	17,1 min

Zur Qualitätskontrolle wurden in jeder Messreihe Poolseren mitgemessen und der Coefficient of variation (Variationskoeffizient, CV%) ermittelt:

$$\text{CV\%} = [\text{Standardabweichung}_{\text{Messwerte}} / \text{Mittelwert}_{\text{Messwerte}}] \times 100$$

Für die Messungen ergaben sich folgende CV%-Werte:

	Level	CV%
Hcy	12 µmol/l	4%
Cys	560 nmol/l	4,3%
MMA	300 nmol/l	5%

Messung von S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosylhomocystein (SAH)

SAH und SAM werden simultan mit einer modifizierten Flüssigkeitschromatographie(LC)-Tandem-Massenspektrometrie(MS)-Methode (stable-isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method) nach GELLEKINK et al. [51] bestimmt. Die Proben werden mit deuterierten SAH und SAM als Internen Standards versehen und dann je beide Stoffe über eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) aus der Probe extrahiert und in geeignete Vials eluiert. Dann kann die vollautomatische Bearbeitung im oben genannten HPLC-Tandem-MS-Verfahren gestartet werden. Die Menge der einzelnen chromatographisch aufgetrennten Moleküle wird dabei massenspektrometrisch mit dem Tandem-Massenspektrometrie-Prozedur bestimmt: Zwei Analysatoren werden hintereinander geschaltet. Zwischen den beiden Geräten wird den Ionen in einer Kollisionskammer weitere Energie zugeführt, sodass diese in noch kleinere, typische Ionen zerfallen, die wiederum vom Detektor gemessen werden. Anhand der Referenzwerte der Internen Standards kann nun die Konzentration als Integral der Masse-Ladungs-Kurve des Massenspektrogramms im definierten Bereich berechnet werden.

Geräte und Reagenzien:

- Eppendorf Zentrifuge 5810 R
- Säulen zur SPE: BondElut[®] PBA der Firma Varian, an deren Kieselsäure-Oberfläche Phenylboronsäure kovalent gebunden ist, Straight Barrel Cartridge, 100 mg 1 ml.
- SAH und SAM der Firma Sigma
- Interner Standard (3 mM für ²H₃-SAM und 0,8 mM für ¹³C₅-SAH)
- LC und Tandem-MS: Alliance[®] HT 2795 HPLC der Firma Waters mit Micromass Quattro Micro API Tandem Massenspektrometer
Berechnung der Konzentration: Software QuanLynx.
- Pufferlösung: 20 mM Ammonium(NH₄)-acetat-Lösung, pH 7,4
mobile Phase: Acetat/H₂O-Lösung, pH 2,636
Probenneutralisierung: 1 M NH₃-Lösung

Die Säulen wurden fünf Mal mit mobiler Phase und dann fünf Mal mit Puffer jeweils 1 Minute bei 500 g gespült. Parallel dazu wurde der SAM-Stock 1:2 und der SAH-Stock 1:25 verdünnt und auf dieser Grundlage eine Kalibratorreihe erstellt. Der Ausgangskalibrator (200/48) bestand aus 17,8 µl SAH 1:25, 20 µl SAM 1:2 und 1162,2 µl Puffer. 600 µl dieser Lösung wurden mit 600 µl Puffer vermischt, so dass die nächste Kalibratorstufe 100/24 entstand. Ebenso wurden Kalibratoren 50/12 und 25/6 hergestellt. Der Kalibrator 0 war 1200 µl Puffer. Die High Control setzte sich zusammen aus 14,9 µl SAH 1:25, 20 µl SAM 1:2 und 1465,1 µl Puffer. 400 µl davon gemischt mit 1200 µl Puffer ergaben die Low Control. Dann wurden 400 µl der einzelnen Kalibratoren in neue Reaktionsgefäße übertragen, ebenso 400 µl der Proben. Den Proben wurde dann zur Neutralisierung 40 µl 1 M NH₃ hinzugefügt, der Kalibratorreihe jeweils dieselbe Menge Puffer. Abschließend wurde der gesamten Messreihe noch je 25 µl IS beigemischt. So vorbereitet wurden die Proben aufgetragen und bei 250 g / 2 min. abzentrifugiert, daran anschließend zweimal mit 1 ml Puffer für eine Minute bei 500 g gespült und schließlich mit dreimal 350 µl mobiler Phase für zwei Minuten bei 250 g eluiert. Die Vials konnten dann bei -20°C eingefroren werden oder direkt in den HPLC/Tandem-MS-Automat zur Messung eingespeist werden.

Geräteeinstellung:

Fluss	0,3 ml/min
Probenvolumen:	20 µl
Retentionszeit:	SAM 1 min
	SAH 1,8 min
Laufzeit/Probe:	3 min
CV:	< 7 %

Messung der Vitamine im Blutserum

Messung von Folat und Cobalamin (Vitamin B₁₂)

Die Konzentrationen der beiden Vitamine wurden maschinell mit ADVIA Centaur[®] System von Bayer durchgeführt. Das Nachweisverfahren beruht auf Chemilumineszenz markierter Antigene oder Antikörper. Nachdem die Vitamine aus ihrer Proteinbindung herausgelöst worden sind, werden die Proteine durch markierte Teilchen ersetzt. Vitamin B₁₂ bindet durch eine begrenzte Menge intrinsic factor, der in der Festphase vorhanden ist, an mit Acridiniumester markiertes Vitamin B₁₂. Die Signalstärke des markierten B₁₂ ist proportional zum B₁₂ in der Probe. Folat bindet durch eine bestimmte Menge folat-bindendes Protein, das mit Biotin markiert ist, an Avidin-markiertes Folat. Hier ist die Stärke des Signals antiproportional zur Menge an Folat in der Probe.

Messung von Holo-Transcobalamin (HoloTC)

Vitamin B12 ist im Körper im Wesentlichen an zwei Proteine gebunden: Haptocorrin (80%), und Transcobalamin (20%). Der Komplex aus Transcobalamin und Vitamin B12 wird Holo-Transcobalamin (Holo-TC) genannt und stellt die aktive, für alle Zellen verfügbare Form des Vitamin B12 dar. An Haptocorrin gebundenes Vitamin B12 ist nur Zellen der Leber und des Retikuloendothelialen Systems (RES) zugänglich, da nur hier die spezifischen Rezeptoren vorhanden sind. Holo-TC ist der sensitivste Wert für einen Mangelzustand im Vitamin B12-Stoffwechsel [70]. Die Bestimmung der Konzentration im Serum erfolgte mit einem immunologischen Verfahren (Mikropartikel-Enzym-Immunoassay, MEIA) nach BRADY et al. [18] mit dem AxSYM Analyser der Fa. Abbott[®]. Dabei bilden Holo-TC spezifische Antikörper, die an Latex-Mikropartikeln fixiert sind, Antigen-Antikörper-Komplexe. In einem zweiten Schritt werden die Antigen-Antikörper-Komplexe farblich markiert, sodass aus der Intensität der Fluoreszenz, die proportional zur Konzentration ist, letztere errechnet werden kann.

Messung von Pyridoxal-5-phosphat (Vitamin B₆)

Die Bestimmung der Konzentration wurde mit Hilfe eines Kits der Fa. Immundiagnostik[®], dem HPLChromatograph Gynkotec Modell 480 und dem Fluoreszenzdetektor RF-10AXL der Fa. Shimadzu durchgeführt. Entsprechend dem Herstellerprotokoll, erfolgte nach einem Fällungsschritt zur Abtrennung höhermolekularer Substanzen, die Derivatisierung mit dem Reagenz des Kits, bevor die Proben eingespeist werden. Das HPLC-Verfahren ist isokratisch. Die Auswertung des Vorgangs erfolgt mit der „externer Standard-Methode“ nach der Integration der Peak-Werte.

Messung von Proteinen in Thrombozytenextrakt und EDTA-Blut

Die Gesamtproteinmenge im Zellextrakt wurde mit Hilfe der Bicinchionic Acid Solution von Sigma[®] (4% CuSO₄x5H₂O) und der Standardkurve des BSA (bovines Serumalbumin gemessen).

Messung von α -Synuclein in Thrombozytenextrakt

Die kurz nach der Blutentnahme isolierten Thrombozyten wurden mit dem Cell Extraction Buffer (10 mM Tris (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 0,1% SDS (Natriumdocecylsulfat), 0,5% deoxycholat) behandelt, dem Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und ein Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics[®]) beigemischt wurden, um die Proteine aus den Zellen zu lösen. Der Vorgang wurde auf Eis ausgeführt und dauerte 30 min, dabei wurde in 10-Minuten-Intervallen mit dem Vortex[™] durchmischt. Das BioSource[®] Immunoassay Kit für humanes α -Synuclein (Cat #KHB0061) ist ein Festphase Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Über eine spezifische zweifache Antigen-Antikörper-Reaktion wird das α -Synuclein, unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus, farblich markiert. Die Intensität dieser Färbung ist proportional zur Konzentration im Medium. Erfasst wird die Intensität mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät anhand der Absorption bei 450 nm.

Messung von Amyloid-Precursor-Protein (APP) in Thrombozytenextrakt

Zur Messung von APP in Thrombozyten wurde das APP ELISA Kit der Firma BIOMOL verwendet. Entsprechend der „Procedure for Extraction of Proteins From Cells“ des Hersteller wurden die Proteine aus den isolierten Thrombozyten extrahiert und die Proteinmenge bestimmt. Mit dem klaren Lysat wurde dann das Assay-Protocol des Herstellers durchgeführt. In einer ersten Reaktion wird der N-terminale Teil des humanen APP gebunden, der Detektions-Antikörper bindet dann am N-terminale Teil des Amyloid- β -Peptids. Dabei werden unter anderen die in

Thrombozyten vorkommenden Isoformen APP770 und APP751 [136] erkannt. Das farbige Produkt dieser Methode ist direkt proportional zur Konzentration des humanen APP in der Probe. Die Absorption wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

Messung von β -Amyloid₍₁₋₄₂₎ im EDTA-Plasma

β -Amyloid₍₁₋₄₂₎ wurde im Plasma mit dem High Sensitivity Protocol β -Amyloid₍₁₋₄₂₎-Immunoassays (INNOGENETICS®) gemessen. Innotest® ist ein Festphase Enzym Immunoassay, das heißt monoklonale Antikörper sind auf der Festphase befestigt und binden die gesuchten Antikörper. Diese Antigen-Antikörper-Bindung wird von Peroxidase-markiertem Streptavidin erkannt und färbt sich nach Behandlung mit Substratlösung blau. Die Absorption wird bei 450 nm ausgelesen werden.

Messung von Standardwerten im Blut

Messung von Kreatinin

Kreatinin bildet in alkalischen Medien mit Pikrinsäure eine gelb-orangene Verbindung (Jaffé-Reaktion). Die farbliche Intensität des Komplexes kann photometrisch gemessen werden und ist proportional zur Konzentration des Kreatinins in der Probe. Die Analyse wurde mit Geräten und Material der Firma Roche Diagnostics durchgeführt.

Messung von ASAT, ALAT, γ -GT

Die Bestimmung der Leberenzyme wurde nach den aktuellen Empfehlungen der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) bei 37°C mit Pyridoxalphosphat-Zusatz vorgenommen (ASAT, ALAT) oder liquid (γ -GT). Das Prinzip der Messmethode ist kinetisch-photometrisch, es wird vom Umsatz NAD^+/NADH auf das vorhanden Enzyme geschlossen.

Messung von CRP

CRP wird mittels immunologischer Turbidimetrie/Nephelometrie bestimmt. Nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion des CRP kommt es zu einer typischen Veränderung der Absorption (Turbidimetrie) bzw. des Streulichts (Nephelometrie) eines Licht- oder Laserstrahls in einer Suspension.

Statistik

Die statistische Auswertung führten wir mit Hilfe der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durch. Soweit nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse als Mediane (10.-90. Perzentile) dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen erfolgte mit dem ANOVA-Test und den post-hoc Tamhane-Tests. Für Tests, die Normalverteilung erfordern, wurden die Daten logarithmisch transformiert. Um die Mediane zwischen zwei Gruppen zu vergleichen wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen. Korrelationen zwischen verschiedenen Variablen wurden mit dem Spearman-Test überprüft. Mit der Backward Regression Analyse versuchten wir unabhängige Variablen zu finden, die in dieser Population eine Vorhersage des DemTect-Scores und der SAM/SAH-Quotienten erlauben. Als signifikant wurden p-Werte unter 0,05 erachtet.

4. Ergebnisse

Blut- und Thrombozyten-Parameter der Gesamtstudie

Wie in früheren Untersuchungen [127], zeigte sich in den Blut-Parametern dieser Gruppe von Parkinson-Patienten ein im Median erhöhtes tHcy (14,8 µmol/L). Ebenfalls konnten wir einen relativ geringen medianen Vitamin B12-Spiegel (236 pmol/L) und niedriges medianes holoTC (< 36 pmol/L), bei relativ hohem medianen MMA (261nmol/L) feststellen, wie Tabelle 4.1 zeigt.

Tabelle 4.1: Konzentrationen von Blut- und Thrombozyten-Parametern

<i>Parameter</i>	<i>Normwerte</i>	<i>Median (10.-90. Perzentile)</i>
tHcy, µmol/L	< 12	14,8 (9,4-23,2)
Cystathionin, nmol/L	< 300	260 (158-693)
MMA, nmol/L	< 270	261 (170-884)
Folat, nmol/L	> 7	19,0 (8,9-38,1)
Vitamin B12, pmol/L	> 156	236 (152-355)
HoloTC, pmol/L	> 50	43 (22-96)
Vitamin B6, nmol/L	> 16	43,7 (15,7-121,0)
SAH im Plasma, nmol/L		13,6 (9,8-28,3)
SAM im Plasma, nmol/L		124 (93-173)
SAM/SAH Quotient im Plasma		8,7 (5,5-13,3)
α-Synuclein in Thrombozyten, µg/L*		20,5 (11,8-36,1)
APP in Thrombozyten, µg/L *		20,6 (1,4-39,4)
Amyloid β im Plasma, ng/L		26,9 (24,0-29,6)
Kreatinin, µmol/L		88,4 (61,9-114,9)

* Werte bezogen auf das Gesamtprotein des Zellextrakts

Biomarker nach Therapiegruppen

Tabelle 4.2 zeigt die biochemischen Parameter der gesamten Studienpopulation und die der einzelnen Therapiegruppen. Biochemische Hinweise auf einen Vitamin B12-Mangel wie eine HoloTC Konzentration < 36 pmol/L und eine MMA-Konzentration > 271 nmol/L hatten 15 % der Patienten. 14 % hatten einen niedrigen Vitamin B6-Status (< 16 nmol/L) und 1 % hatten ein erniedrigtes Serumfolat (< 7 nmol/L). Entsprechend den aktuellen Therapie-Empfehlungen [97] waren Patienten, die mit Agonisten behandelt wurden jünger, als solche, die L-Dopa oder L-Dopa und Agonist kombiniert erhielten (medianes Alter 61 Jahre gegenüber 74 und 69 Jahre). So verhielt es sich auch mit der Erkrankungsdauer, die beim Agonisten-Regimen median 2,5 Jahre betrug und bei Patienten, die mit L-Dopa plus Agonisten therapiert wurden, mit medianen 8 Jahren deutlich länger war.

Interessant ist, dass die höchsten Plasma-SAH-Werte in der Gruppe derer Patienten gemessen wurde, die L-Dopa alleine einnahmen, die niedrigsten dagegen in der Gruppe, die nur einen Agonisten einnahmen (median 17,2 nmol/L gegenüber 12,7 nmol/L). Die Tatsache, dass die höchsten SAH-, MMA- und tHcy-Konzentrationen, sowie die geringsten HoloTC-Werte und SAM/SAH-Quotienten bei L-Dopa-therapierten Patienten gemessen wurden, kann sehr wahrscheinlich durch das Alter der Patienten erklärt werden: Nach Berücksichtigung von Alter und Erkrankungsdauer bei der Bewertung der p-Werte, konnten keine Signifikanzen mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 4.2: Biomarker im Blut der Gesamtgruppe und bei verschiedenen Therapie-Regimen ^a

Variable	Normwerte	Gesamt n = 87	Agonist n = 28	L-Dopa n = 20	L-Dopa plus Agonist n = 35	p _{ANOVA} ^e	p _{post-hoc}
Alter, Jahre		68 (54-78)	61 (52-69)	74 (62-80) ^c	69 (56-79) ^d	< 0,001	^c < 0,001; ^d 0,004
Erkrankungsdauer, Jahre		5 (0-12)	2,5 (0-10)	4 (0-15)	8 (3-15) ^d	< 0,001	^d 0,001
DemTect, Score	> 13	14 (7-18)	15,5 (10,9-18,0)	13,0 (3,0-18,0)	12,5 (7,0-17,5)	0,092	
tHcy, µmol/L	< 12	14,8 (9,4-23,2)	13,3 (7,6-19,3)	16,4 (11,0-23,5)	15,4 (10,5-24,6)	0,047	
Cys, nmol/L	< 300	260 (158-693)	238 (162-744)	234 (157-1134)	277 (144-802)	0,780	
MMA, nmol/L	< 270	261 (170-884)	218 (148-06)	337 (196-815) ^c	283 (170-1179)	0,032	^c 0,029; ^d 0,050
Folat, nmol/L	> 7	19,0 (8,9-38,1)	20,7 (10,8-42,4)	21,2 (12,7-45,9)	15,7 (7,8-32,3)	0,094	
Vitamin B12, pmol/L	> 156	236 (152-355)	253 (148-321)	239 (152-470)	235 (149-384)	0,932	
HoloTC, pmol/L	> 50	43 (22-96)	44 (23-78)	35 (20-192)	48 (23-97)	0,867	
Vitamin B6, nmol/L	> 16	43,7 (15,7-121)	52,4 (29,5-127)	49,5 (11,1-119,4)	34,0 (10,8-149,7) ^d	0,019	^d 0,017
SAH im Plasma, nmol/L		13,6 (9,8-28,3)	12,7 (8,5-16,5)	17,2 (11,3-32,9) ^c	13,7 (10,0-26,2)	0,005	^c 0,008
SAM im Plasma, nmol/L		124 (93-173)	124 (96-171)	133 (96-204)	122 (87-168)	0,394	
SAM/SAH Quotient im Plasma		8,7 (5,5-13,3)	9,9 (6,0-15,0)	7,8 (5,5-11,4) ^c	8,4 (5,4-11,2) ^d	0,005	^c 0,012; ^d 0,026
Substantia nigra, echogene Fläche (cm ²)		0,23 (0,13-0,48)	0,24 (0,13-9,0)	0,47 (0,15-10,0)	0,27 (0,12-0,52)	0,079	
α-Synuclein in Thrombozyten ^b , µg/L		20,5 (11,8-36,1)	25,1 (14,3-57,5)	20,6 (10,4-33,0)	20,4 (12,3-32,6)	0,173	
APP in Thrombozyten ^b , µg/L		700 (48-31340)	595 (17-1374)	551 (190-1360)	741 (0-1418)	0,289	
Plasma Amyloid β, pg/L		26,9 (24-29,6)	25,8 (23,7-28,7)	25,7 (23,5-31,1)	27,8 (24,8-29,7)	0,705	
Kreatinin, µmol/L	< 106	88,4 (61,9-114,9)	0,9 (0,7-1,1)	0,95 (0,7-1,5)	1,0 (0,7-1,27)	0,180	

^a Angegeben sind Mediane (10. – 90. Perzentile). Vier Patienten erhielten keine der in der Tabelle genannten Therapieregimen. ^b bezogen auf das Gesamtzellprotein.

^c _{post-hoc}-Werte: ^c signifikant bezogen auf Agonist-Regime (reine L-Dopa-Therapie). ^d signifikant bezogen auf Agonist-Regime (L-Dopa plus Agonist-Therapie). ^e Nach Alter und Erkrankungsdauer bereinigte p_{ANOVA}-Werte waren nicht signifikant.

Vitamin B 6, SAM/SAH-Quotient und β -Amyloid bezogen auf DT-Scores

Bezogen auf die mit DemTect gemessenen kognitiven Leistungen der Probanden konnte eine signifikante positive Assoziation zwischen dem Score, der Plasma-Konzentration von Vitamin B6 und dem SAM/SAH-Quotienten im Plasma hergestellt werden. Die Daten bezogen auf den MMSE-Score bestätigten dies und werden daher nicht gezeigt. Wie Abbildung 4.1 zeigt, hatten Probanden mit altersgemäßer kognitiver Funktion (DemTect > 12) verglichen mit Probanden mit reduzierter kognitiver Leistung (DemTect < 9) signifikant höhere Vitamin B6-Konzentrationen im Plasma (Median 48,4 nmol/L zu 26,1 nmol/L) und einen höheren SAM/SAH-Quotienten (Median 9,0 zu 6,7). Darüber hinaus, so zeigt Abbildung 4.2, waren die DemTect-Scores negativ korreliert mit dem Plasma- β -Amyloid-Spiegel ($r = -0,45$; $p < 0,001$).

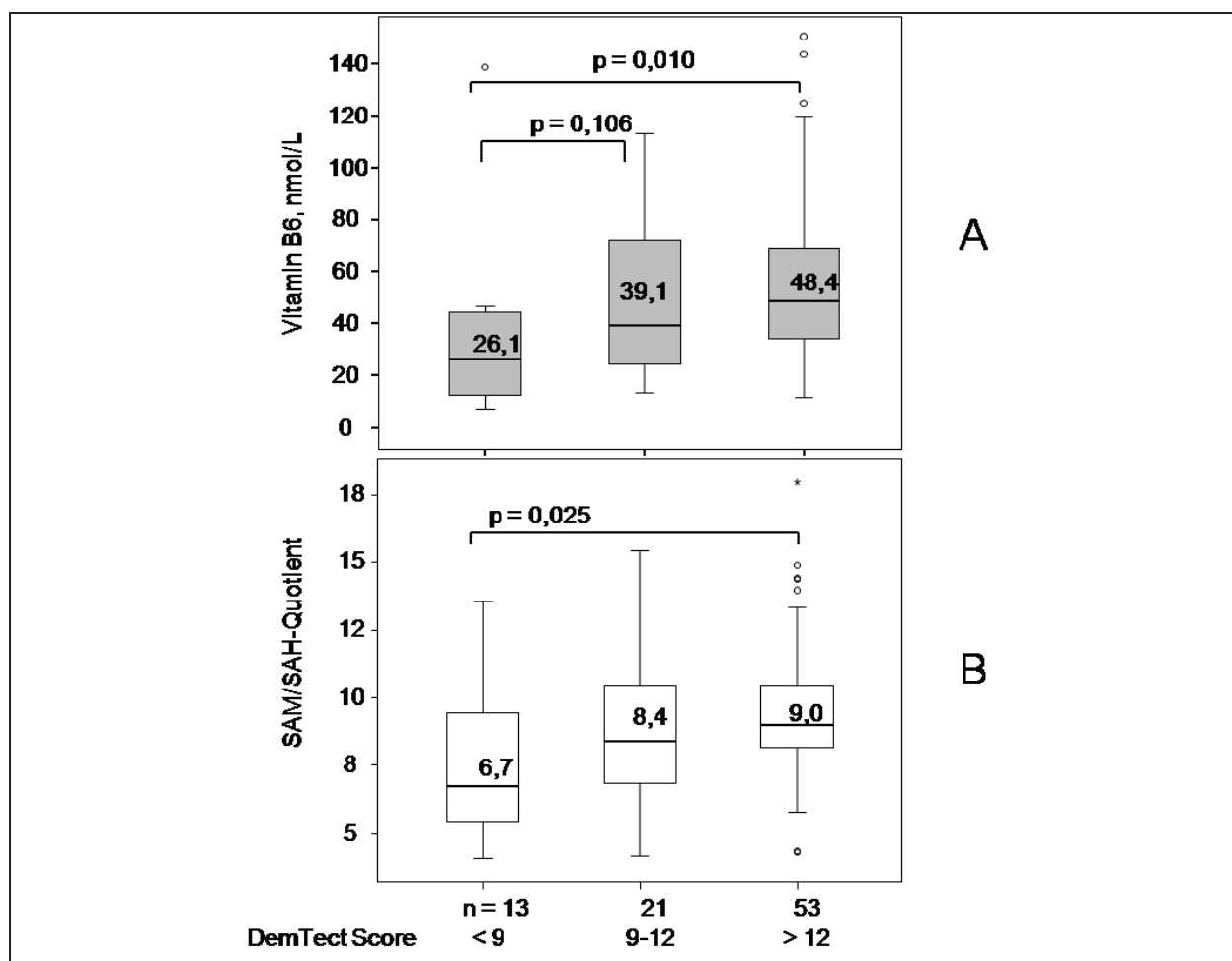


Abbildung 4.1: Vitamin B6 (A) und SAM/SAH-Quotient (B) bezogen auf Tertilen der DemTect Scores: median, 25.-75-Perzentile; verglichen mit der hohen DemTect-Tertile $p < 0,05$ (ANOVA- und Benferoni-Test); p-Werte im Vergleich der hohen mit der niedrigen Tertile blieben auch nach Einbeziehung von Alter, Krankheitsdauer und Therapie-Regimen signifikant (Vitamin B6: 0,013; SAM/SAH-Quotient: 0,024)

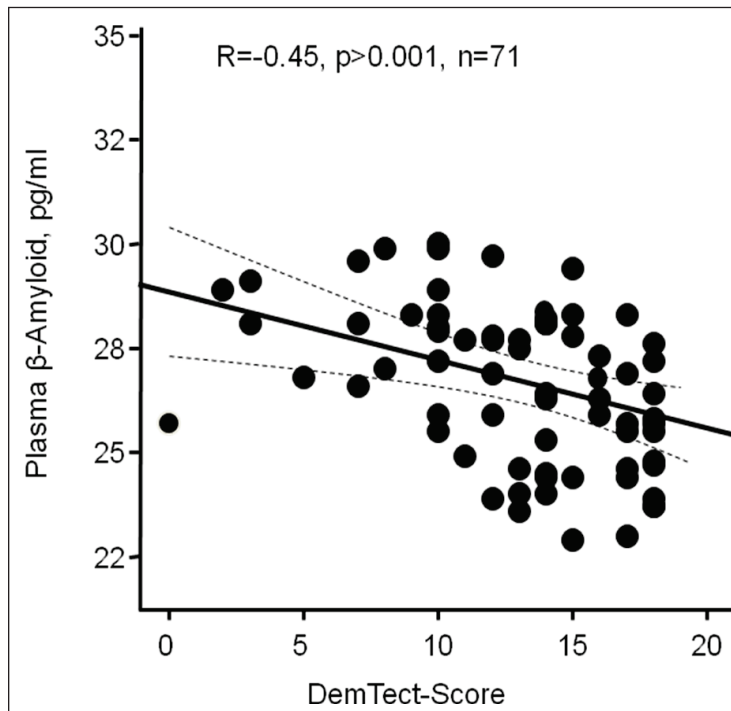


Abbildung 4.2: β -Amyloid im Plasma bezogen auf den DemTect-Score. Eine altersgemäÙe kognitive Leistung entspricht einem DemTect-Score von > 12.

Backward Regression: Rückschluss auf den DT-Score über den SAM/SAH-Quotient

Mit der Backward Regression Analysis bestimmten wir Faktoren, die möglicherweise die DemTect-Scores der Studienpatienten vorhersagen können. Der SAM/SAH-Quotient wurde als solcher identifiziert ($\beta = 0,612$; $p = 0,004$). Für die Berechnung des SAM/SAH-Quotienten erwiesen sich tHcy ($\beta = -0,276$; $p < 0,001$) und die Kreatinin-Konzentration im Serum ($\beta = 0,422$; $p = 0,001$) als signifikante Faktoren, wie Tabelle 4.3 verdeutlicht.

Tabelle 4.3: Backward Regression Analyse

Abhängige Variable DemTect Score (A)

<i>Getestete unabhängige Variablen</i>	<i>Ausgeschlossene Variablen</i>	<i>Variablen mit signifikantem Effekt</i>
tHcy	tHcy	
MMA	MMA	
Vitamin B12	Vitamin B12	
Vitamin B6	Vitamin B6	
Folat	Folat	
Erkrankungsdauer	Erkrankungsdauer	
L-Dopa Therapie	L-Dopa Therapie	
Plasma Amyloid- β	Plasma Amyloid- β	
Thrombozyten α -Synuclein	Thrombozyten α -Synuclein	
Alter	Alter	
Thrombozyten APP	Thrombozyten APP	
SAM/SAH Quotient	-	SAM/SAH Quotient $\beta = 0,612, p = 0,004$

Abhängige Variable SAM/SAH-Quotient (B)

<i>Getestete unabhängige Variablen</i>	<i>Ausgeschlossene Variablen</i>	<i>Variablen mit signifikantem Effekt</i>
MMA	MMA	
Vitamin B12	Vitamin B12	
Folat	Folat	
Vitamin B6	Vitamin B6	
Erkrankungsdauer	Erkrankungsdauer	
L-Dopa Therapie	L-Dopa Therapie	
Alter	Alter	
Kreatinin	-	Kreatinin ($\beta = -0,422, p = 0,001$)
tHcy	-	tHcy ($\beta = -0,276, p < 0,001$)

$^A R^2 = 0.29$; $^B R^2 = 0.41$. Eingeschlossen waren 87 Patienten mit M. Parkinson.

Signifikante Rangreihenkorrelationen der ermittelten Werte

Die Korrelationsstärke unter den einzelnen gemessenen Werten wurde mittels der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt (Tabelle 4.4). Dabei war zu sehen, dass Thrombozyten-APP negativ mit Plasma- β -Amyloid₍₁₋₄₂₎ korrelierte ($r = -0,36$; $p = 0,028$), letzteres dagegen aber positiv mit α -Synuclein in Thrombozyten ($r = 0,42$; $p = 0,005$). Zwischen APP und α -Synuclein, jeweils in Thrombozyten war ebenfalls eine negative Korrelation zu erkennen ($r = -0,35$; $p = 0,031$). Die vorher genannten Beziehungen sind in der Abbildung 4.3, im Anschluss an die Tabelle, genauer dargestellt. Die Plasmaspiegel von SAM und SAH waren stark korreliert ($r = 0,53$, $p < 0,001$).

Tabelle 4.4: Korrelationskoeffizienten nach Spearman Rho-Test

Parameter	Alter	Dauer	DT	MMSE	BDI	Hcy	SAH	SAM	SAM/SAH	Cys	MMA	Folat	B12	B6	HoloTC	A-β	APP	α-Syn
Alter		0,232	-0,338	-0,373		0,355	0,430		-0,429	0,314	0,405					0,233		
Dauer	0,232		-0,277	-0,214		0,232	0,253		-0,296	0,214	0,347			-0,248		0,236		
DT	-0,338	-0,277		0,677		-0,230	-0,216		0,312					0,284		-0,457		
MMSE	-0,373	-0,214	0,677		-0,252		-0,244		-0,269					0,293		-0,458		
BDI				-0,252										-0,289				
tHcy	0,355	0,232	-0,230				0,474		-0,462	0,394	0,556	-0,596		-0,452				
SAH	0,430	0,253	-0,216	-0,244		0,474		0,529	-0,756	0,366	0,286	-0,225						
SAM						0,529	0,529			0,311							-0,354	-0,290
SAM/SAH	-0,429	-0,296	0,312	-0,269							-0,256	0,306				-0,248		
Cys	0,314	0,214				0,394	0,366	0,311			0,262			-0,227				
MMA	0,405	0,347				0,556	0,286		-0,256	0,262		-0,372	-0,392	-0,269				
Folat						-0,596	-0,225		0,306		-0,372			0,614		-0,266		
B12											-0,392			0,237				
B6		-0,248	0,284	0,293	-0,289	-0,452				-0,227	-0,269	0,614	0,237			-0,272		
HoloTC																		
A-β	0,233	0,236	-0,457	-0,458					-0,248		-0,266			-0,272			-0,357	0,634
APP								-0,354								-0,357		0,634
α-Syn								-0,290									0,634	

Signifikanz < 0,05; Dauer: Zeit seit der Diagnose M. Parkinson; DT: DemTect; B12: Vitamin B12; B6: Vitamin B6; A-β: Amyloid-β im Plasma; APP: APP in Thrombozyten; α-Syn: α-Synuclein in Thrombozyten

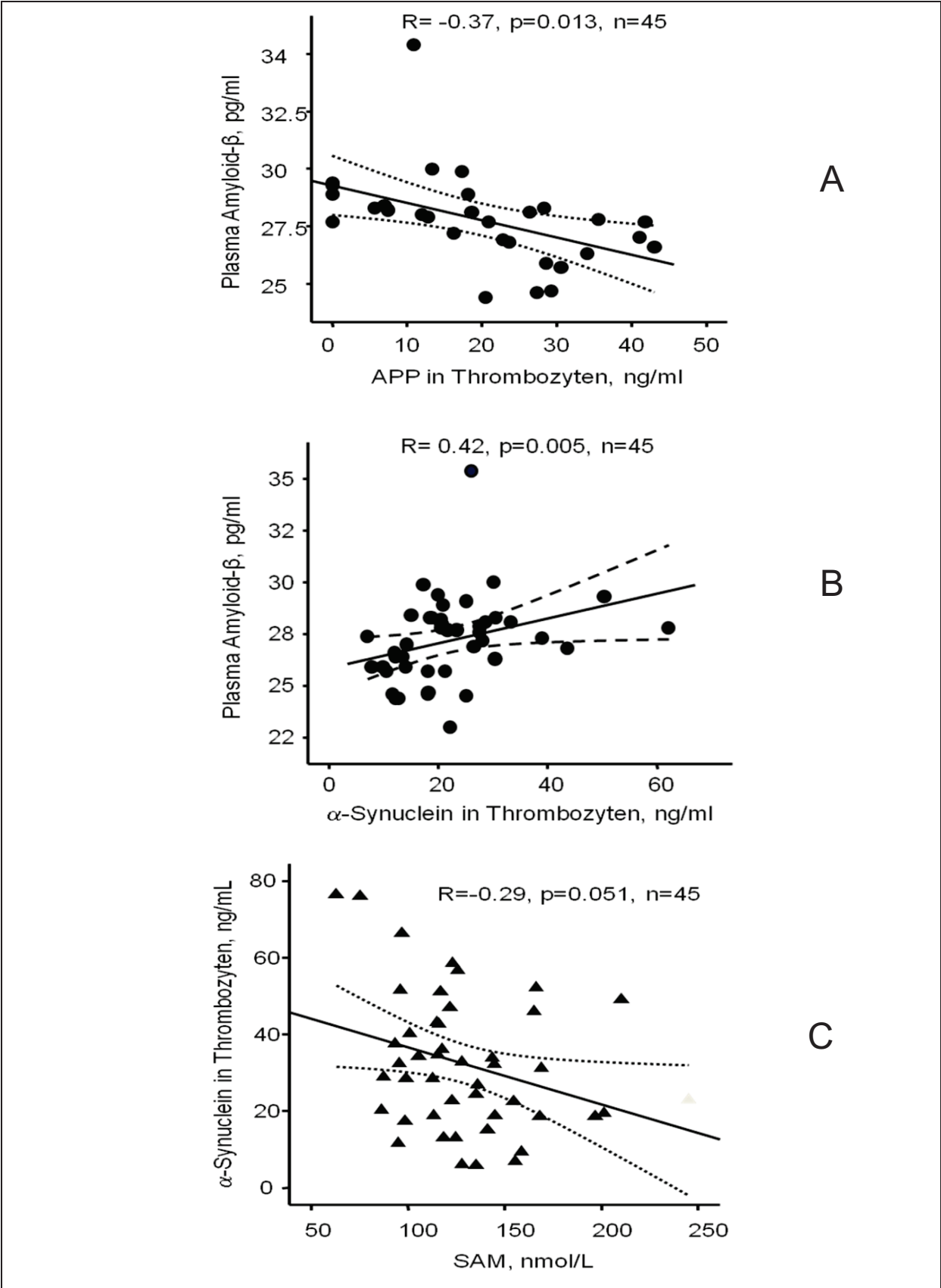


Abbildung 4.3: Korrelationen zwischen Plasma-Amyloid- β und APP in Thrombozyten (A), Plasma-Amyloid- β und α -Synuclein in Thrombozyten (B), sowie α -Synuclein in Thrombozyten und SAM (C). Messung in Plasma, bzw. Thrombozytenextrakt, bezogen auf das Gesamtzellprotein.

Negative Beziehung zwischen Plasma-SAH und Thrombozyten-APP, sowie Plasma-SAM und Thrombozyten- α -Synuclein

Abbildung 4.4 veranschaulicht die negative Beziehung zwischen SAH im Plasma und APP in Thrombozyten (Spearman Korrelationskoeffizient: $r = 0,41$, $p = 0,007$) und die ebenfalls negative Beziehung zwischen SAM und α -Synuclein in Thrombozyten ($r = -0,32$, $p = 0,033$).

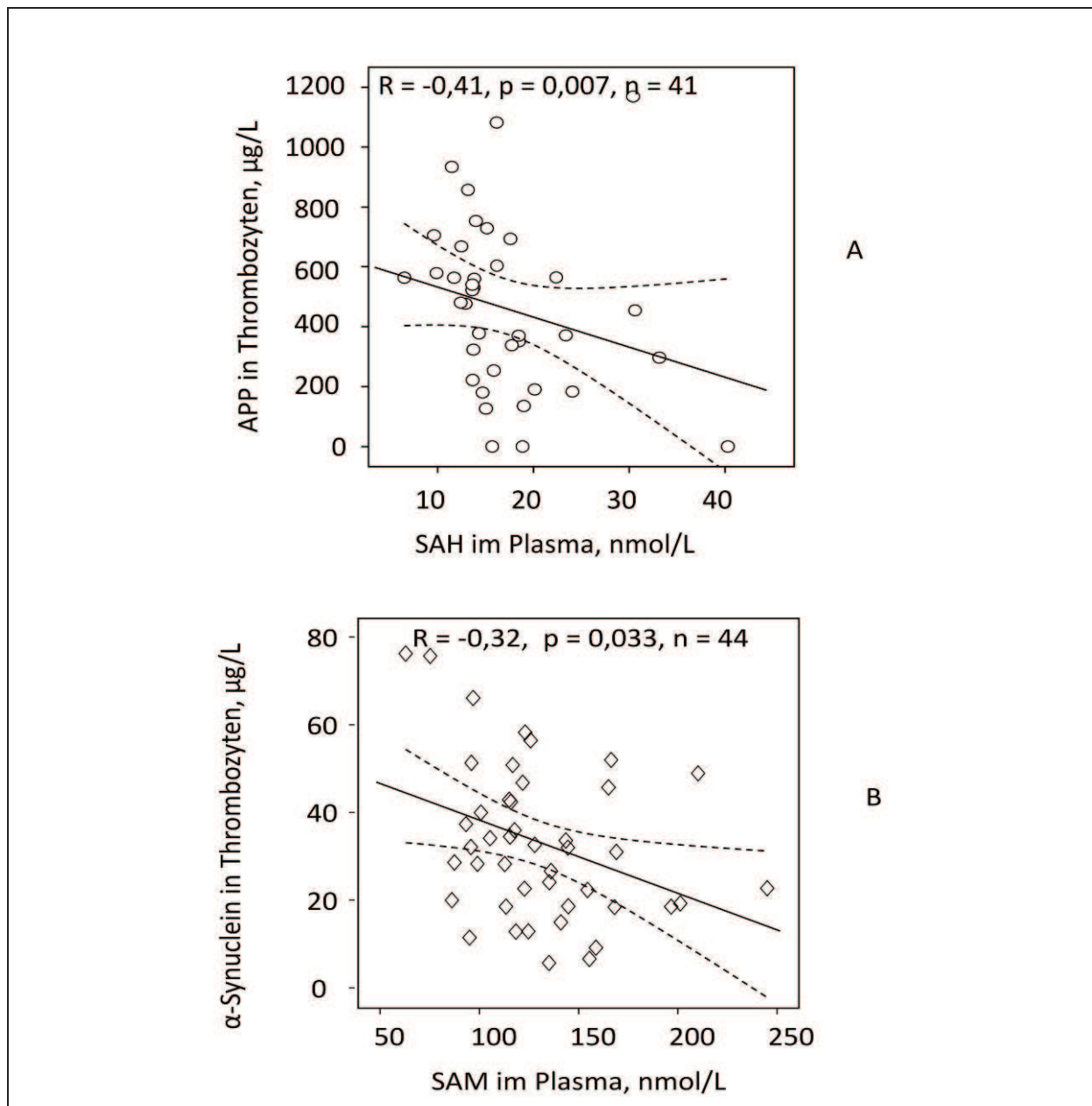


Abbildung 4.4: Korrelation zwischen den Konzentrationen von Plasma-SAH und Thrombozyten-APP (A), sowie zwischen Plasma-SAM und α -Synuclein in Thrombozyten (B). Daten erhoben in einer Teilgruppe von 45 Patienten mit M. Parkinson.

Plasma-tHcy, -SAH, und SAM/SAH-Quotient, sowie B 6 und Folat bezogen auf Plasma- β -Amyloid

Abbildung 4.5 präsentiert die Serumkonzentrationen von Folat und den Vitaminen B6 und B12, sowie Plasma-tHcy, -SAH und den SAM/SAH-Quotienten aufgeteilt nach den Tertilen des β -Amyloid₍₁₋₄₂₎ im Plasma. Im Vergleich der hohen und der niedrigen Tertile waren in der Hohen die tHcy- und SAH-Werte deutlich höher, die Werte von Folat, B6, B12 und SAM/SAH-Quotient dagegen deutlich niedriger als in der Tertile mit wenig β -Amyloid₍₁₋₄₂₎.

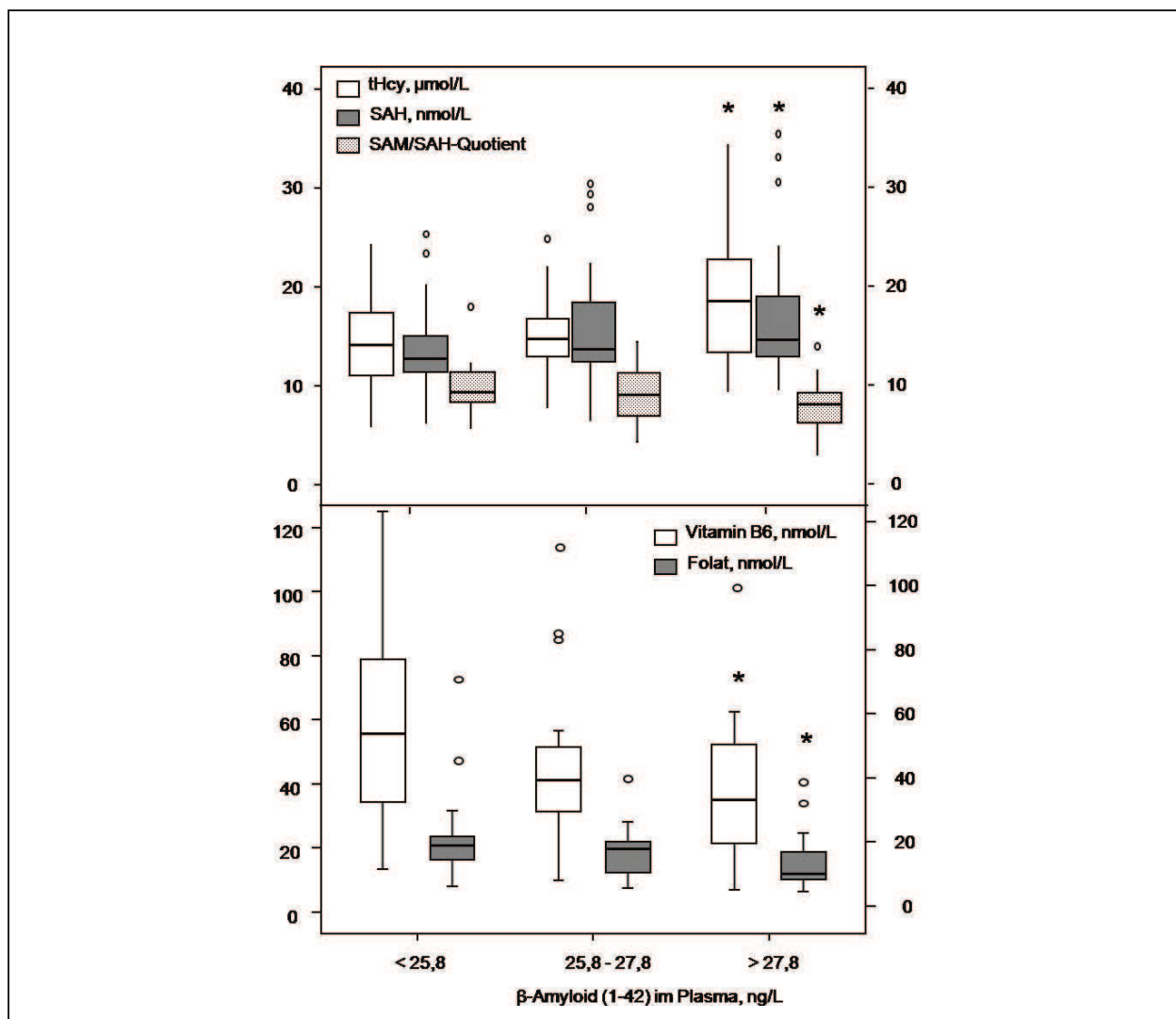


Abbildung 4.5: Konzentrationen von Vitaminen im Serum und Metaboliten im Plasma (Median, 25.-75. Perzentile) aufgetragen gegen β -Amyloid₍₁₋₄₂₎ im Plasma. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen der hohen und der niedrigen Tertile von β -Amyloid₍₁₋₄₂₎. Nach Einbeziehung von Alter, Krankheitsdauer und Therapie-Regimen waren die p-Werte für Folat und Vitamin B6 weiter signifikant ($p < 0,05$). Für tHcy ($p = 0,078$), SAH ($p = 0,114$) und SAM/SAH-Quotient ($p = 0,103$) ließen sich Tendenzen feststellen. Daten von 87 Patienten mit M. Parkinson.

Echogene Fläche der substantia nigra: relevante Variablen

Addierte man die Flächen der rechten und linken Substantia nigra zur Gesamtfläche, so korrelierte diese positiv mit der Plasmakonzentration von MMA, aber mit keinem anderen Marker des Vitamin B12-Status. Diese Beziehung blieb auch nach Einbezug von Alter und Erkrankungsdauer signifikant ($r = 0,49$, $p = 0,002$). Unter Berücksichtigung von Kreatinin stieg der p-Wert auf 0,036. Bei einer Untergruppe von 24 Patienten, bei denen sowohl thrombozytäres APP, als auch die Fläche der Substantia nigra verfügbar waren, konnten wir eine moderate Korrelation zwischen der Substantia nigra-Gesamtfläche und der Höhe des thrombozytären APPs nachweisen ($r = 0,42$, $p = 0,038$).

Tabelle 4.5: Relevante Variablen in Relation zur Echogene Fläche der Substantia nigra (n = 51)

Variable	Fläche sn $\leq 0,22 \text{ cm}^2$ n = 24	Fläche sn $> 0,22 \text{ cm}^2$ n = 27	p_{ANOVA}
Alter, Jahre	63 (9,0)	67 (8,3)	0,123
Erkrankungsdauer, Jahre	4,5 (4,4)	6,0 (7,4)	0,120
DemTect, Score	14 (3)	14 (5)	0,246
Kreatinin, $\mu\text{mol/L}$	81,6 (11,3)	91,8 (21,6)	0,099
tHcy, $\mu\text{mol/L}$	14,0 (3,2)	15,8 (10,8)	0,207
MMA, nmol/L^*	236 (107)	351 (544)	0,016*
Folat, nmol/L	19,2 (16,1)	17,9 (13,1)	0,614
HoloTC, pmol/L	47 (19)	48 (73)	0,676
Vitamin B12, pmol/L	232 (70)	251 (102)	0,385
Vitamin B6, nmol/L	51 (104)	46 (46)	0,616
SAM/SAH-Quotient	9,2 (2,1)	8,4 (2,5)	0,249
L-Dopamin plus Dopaminagonist, n (%)	8 (33)	13 (48)	
Dopaminagonist, n (%)	14 (58)	5 (18,5)	
L-Dopa, n (%)	2 (8)	9 (33)	

Daten sind geometrischer Mittelwert (SD, Standarddeviation). * $p = 0,036$ bei Einbezug von Kreatinin

5. Diskussion

Histopathologisch sind subkortikale Lewy-Bodies mit α -Synuclein-reichen Einschlüssen typisch für Patienten mit M. Parkinson [40]. Ein nicht geringer Anteil (20 – 28 %) weist im Verlauf dementielle Symptome auf [2], die mit β -Amyloid-Plaques vergesellschaftet sind. Umgekehrt sind für Demenzen vom Lewy-Body-Typ parkinsonähnliche Bewegungsstörungen typisch. Das Überlappen dieser Krankheitsbilder führte zu dem Verdacht, dass zwischen dem Vorkommen von β -Amyloid und α -Synuclein eine Verbindung besteht [167]. Da beide Proteine in Lewy-Bodies auftreten, liegt weiterhin die Vermutung nahe, dass ähnliche pathologische Rahmenbedingungen zur Akkumulation führen. Störungen im Methionin-Stoffwechsel und die dadurch verminderte Fähigkeit Methylierungsprozesse durchzuführen, ist vermutlich ein Bestandteil dieser pathologischen Bedingungen, die zur Neurodegeneration führen. Dies geschieht wahrscheinlich durch die vermehrte Expression von APP oder durch gesteigerte Hydrolyse von APP zu β -Amyloid [126, 159]. Die hier vorliegende Studie gibt Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen den beiden neurodegenerativen Proteinen APP und α -Synuclein und gängigen Plasmamarkern des Methylierungsstatus besteht.

Die bei den M. Parkinson-Patienten dieser Studie gemessenen tHcy-Konzentrationen, waren vergleichbar mit denen früherer Studien [137, 183], allerdings aber auch deutlich höher, als die Werte von älteren Patienten vorausgegangener Studien, die nicht an M. Parkinson erkrankt waren [127]. Ähnlich angelegte Untersuchungen führten auch zu vergleichbaren Ergebnissen [143, 180]. Die Mehrheit der Patienten (76%) hatte einen tHcy-Wert von über 12 $\mu\text{mol/L}$, aber nur wenige davon hatten auch gleichzeitig einen Vitamin B12-Mangel (15%), einen Vitamin B6-Mangel (14%) und/oder einen Mangel an Folat (1%). Somit schied die allgemein anerkannte Erklärung für erhöhte tHcy-Werte, der Mangel an Vitaminen der B-Gruppe, als Ursache in diesem Fall aus. Desweiteren konnte daraus gefolgert werden, dass ein B-Vitaminstatus im Normalbereich nicht ausreicht, um den katabolen Stoffwechsel des tHcy bei Parkinson-Patienten zu steigern. Patienten, die nur mit L-Dopa behandelt wurden, hatten höhere Plasma-Konzentrationen von tHcy, MMA und SAH, als solche, die nur mit Agonisten oder mit einer Kombination aus Agonisten und L-Dopa therapiert wurden (Tabelle 4.4). Diese Tatsache konnte damit

erklärt werden, dass die Altersverteilung in den unterschiedlichen Therapiegruppen uneinheitlich war: Patienten mit L-Dopa-Regime waren älter und länger erkrankt. Da diese Unterschiede in den aktuellen Therapie-Leitlinien [97] begründet liegen, kann ein Matching aus ethischen Gründen keinen Aufschluss bringen. Keine der auffälligen Plasma-Konzentrationen von Vitaminen oder Metaboliten konnte mit der L-Dopa-Therapie in Verbindung gebracht werden, frühere Arbeiten hatten diesbezüglich andere Ergebnisse erbracht [120]. Ob COMT-Inhibitoren eine L-Dopa-induzierte HHcy vermeiden können ist umstritten [104, 129, 171]. Wie schon andere Arbeitsgruppen [137], fanden wir keine Hinweise darauf, dass COMT-Inhibitoren bei L-Dopa-therapierten Patienten SAM einsparen oder den tHcy-Spiegel senken können. Die zusätzliche Zufuhr von Vitamin B12 dagegen scheint bei eben diesen Patienten zu einer Verringerung des tHcy zu führen [103, 137].

Das Verhältnis von SAM zu SAH, ausgedrückt im SAM/SAH-Quotienten, konnte bei unseren Patienten prädiktiv am tHcy-Spiegel festgemacht werden. Aufgrund der positiven Korrelation von Plasma-SAM zu Plasma-SAH vermuten wir, dass die SAM-Konzentrationen im Plasma Folge des erhöhten SAH-Spiegels sind, der wiederum durch die hohen tHcy-Werte bedingt ist. Darüber hinaus war der SAM/SAH-Quotient ein wichtiger positiv-prädiktiver Faktor zur Vorhersage des DemTect-Scores von Parkinson-Patienten. Möglicherweise hängt die positive Auswirkung hoher SAM/SAH-Quotienten auf die kognitiven Leistungen, gemessen mit DemTect, damit zusammen, dass die ausreichende Versorgung mit Methylgruppen die Bildung von neurodegenerativen Proteinen unterdrückt und/oder deren Reparatur begünstigt.

Auch die suffiziente Versorgung mit Vitamin B6 scheint einen protektiven Einfluss auf die Patienten mit M. Parkinson zu haben, zumindest insofern, dass Vitamin B6-Spiegel und DemTect-Score positiv miteinander korrelieren, also Vitamin B6 offenbar dementielle Symptome mildern oder verhindern kann. Dieser protektive Effekt könnte durch die indirekt antioxidative und antineurotoxische Wirkung von Vitamin B6 erklärt werden: die Verminderung von tHcy und von oxidativem Stress unter Verbrauch von Vitamin B6 führt zur Verringerung des kognitiven Verfalls [95]. Bekannt ist, dass oxidativer Stress bei Parkinson-Patienten mit zunehmendem kognitiven Defizit einhergeht [90]. Vitamin B6 ist Co-Faktor bei der Transsulfurierung von tHcy in Cystein, das eine Vorstufe von Glutathion ist und bei guter Versorgung mit Vitamin B6 verstärkt gebildet werden kann. Bei diesem

Vorgang wird Hcy verbraucht, zum einen sinkt also das neurotoxische Potential, zum anderen ist Glutathion eines der wesentlichen antioxidativ wirksamen Moleküle in den dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten. Durch das Absenken des tHcy über die Transsulfurierung zu Cystein kann Vitamin B6 auch eine Verbesserung des SAM/SAH-Quotienten bewirken. Wie im Absatz oberhalb beschrieben, wirkt ein positiver Methylierungsstatus ebenfalls antidementiv. In dieser Studie zeigte sich eine starke Korrelation zwischen Vitamin B6 und Folat ($r = 0,60$, $p < 0,001$). Vitamin B6 ist offenbar in der Lage, den Methylierungsstatus und SAM/SAH-Quotienten über einen weiteren Mechanismus zu verbessern, durch den mehr aktives Folat für den Remethylierungsweg zur Verfügung gestellt wird. Auch bei diesem Vorgang wird neurotoxisches Hcy verbraucht. Zwei Enzyme, Serin-Hydroxymethyltransferase und Dihydrofolatreduktase, benötigen Vitamin B6 als Co-Faktor. Dihydrofolatreduktase katalysiert den Aufbau von Folat zu Dihydrofolat und in einem weiteren Schritt von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, der aktiven Form von Folsäure. Serin-Hydroxymethyltransferase katalysiert im Wesentlichen die Umwandlung von L-Serin in Glycin, sowie von 5,6,7,8-MTHF zu 5,10-MethylenTHF. Vitamin B6 scheint eine protektive Funktion für das Gehirn zu haben, indem es oxidativen Stress, neurotoxisches Hcy und Dopaminmangel verringert. Dadurch mindert es offenbar die degenerativen Vorgänge im Gehirn der Patienten.

Untersuchungen zeigen, dass die Plasmakonzentration von β -Amyloid(1-42) ein Marker für die Neurodegeneration ist [59]. Man geht davon aus, dass diese Proteine in den von Neurodegeneration betroffenen Neuronen produziert werden und später, über die Blut-Hirn-Schranke hinweg, ins Blut übertreten. Auch von den Thrombozyten weiß man, dass sie das APP hervorbringen und β -Amyloid herstellen können. Beide Zellarten, Neuronen und Thrombozyten, zeigen ähnliche Eigenschaften [21]: Thrombozyten speichern Neurotransmitter und setzen diese, gesteuert durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration, frei. Sie haben unter anderem auch Oberflächenproteine, die denen der Neuronen entsprechen und verlängern Plasmamembranprozesse, die Neuriten durch extrazelluläre Proteasen anpassen. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ist die Untersuchung von Gehirn-Proteinen, die in Thrombozyten exprimiert werden, eine interessante Möglichkeit krankheitsbedingte Veränderungen zu studieren. Aus den Messungen zu dieser Arbeit konnte eine inverse Korrelation zwischen β -Amyloid im Plasma und APP in

Thrombozyten abgeleitet werden ($r = -0,34$, $p = 0,028$). Dies lässt die Vermutung zu, dass Thrombozyten eine wichtige Quelle des β -Amyloid im Plasma sind.

An der Neurodegeneration bei Patienten mit M. Parkinson ist ein weiteres Protein, das α -Synuclein, beteiligt. Auch dieses Protein wird von Thrombozyten produziert. β -Amyloid und α -Synuclein können in neuronalen Zellen Co-Oligomere auf der Zellmembran bilden [166]. β -Amyloid begünstigt dabei die Aggregation und toxische Umwandlung von α -Synuclein auf der Zellmembran und ist damit vermutlich an der Pathogenese der Krankheit beteiligt. Innerhalb der Zelle erhöhen diese kanalverändernden Vorgänge die Akkumulation von Calcium. In unserer Studie war eine positive Korrelation zwischen β -Amyloid im Plasma und α -Synuclein in Thrombozyten nachweisbar. Dies führt zu der Vermutung, dass ein auf Gegenseitigkeit beruhender Mechanismus existiert, der entweder die Produktion der beiden Proteine steuert oder deren Katabolismus. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das fehlgefaltete, aggregierte Proteine an der Ubiquitinmarkierung erkennt und eliminiert, könnte ein möglicher Faktor sein. Die HHcy bei Parkinson-Patienten verursacht oxidativen Stress und kann durch den erhöhten Anfall an fehlerhaften Proteinen das UPS erschöpfen. Oligomere aus β -Amyloid und α -Synuclein können sich so ungestört bilden und ablagern. Außerdem beeinflusst die HHcy über Herp die Formation von β -Amyloid und und möglicherweise auch die neuroinflammatorischen Erscheinungen bei M. Parkinson [158].

Weiterhin kann bei vermindertem Methylierungsstatus der gestörte Phospholipidstoffwechsel ein Mechanismus sein, der zur Bildung und Ablagerung von β -Amyloid und α -Synuclein-Oligomeren führt. Ist Phosphatidylcholin, das methylierte Produkt von Phosphatidylethanolamin, nur in geringem Maße vorhanden, kann dies zur Folge haben, dass auch die Proteinkinase C (PKC) nur vermindert auftritt. Dies hat zur Folge, dass vermehrt APP in amyloidogenes β -Amyloid überführt wird [77]. Die negative Korrelation zwischen dem Methyl-Donator SAM im Plasma und APP in den Thrombozyten unterstützt die Hypothese, dass ein ausreichender SAM-Spiegel möglicherweise die Hydrolyse von APP zu β -Amyloid vermindert [27, 49, 145]. Die verminderte Expression des Presenilin I-Gens ist vermutlich die Ursache dieses Effekts.

In unseren Messreihen fiel eine inverse Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von SAM und der Konzentration von α -Synuclein in den Thrombozyten auf. Die Isoaspartylmethyltransferase, ein SAM-abhängiges Enzym,

das auch in Thrombozyten vorhanden ist [30], bewirkt die Wiederherstellung von Proteinen mit Isoaspartyl-Rest, die altersbedingt oder durch oxidativen Stress beschädigt wurden. Zu diesen Proteinen gehört auch das α -Synuclein. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass eine geringe SAM-Konzentration im Plasma mit einer erhöhten Retention von isoaspartylreichem α -Synuclein verbunden war. Das isoaspartylreiche α -Synuclein neigt zum Aggregieren und verursacht so die gestörte synaptische Übertragung im Organismus der betroffenen Tiere [174].

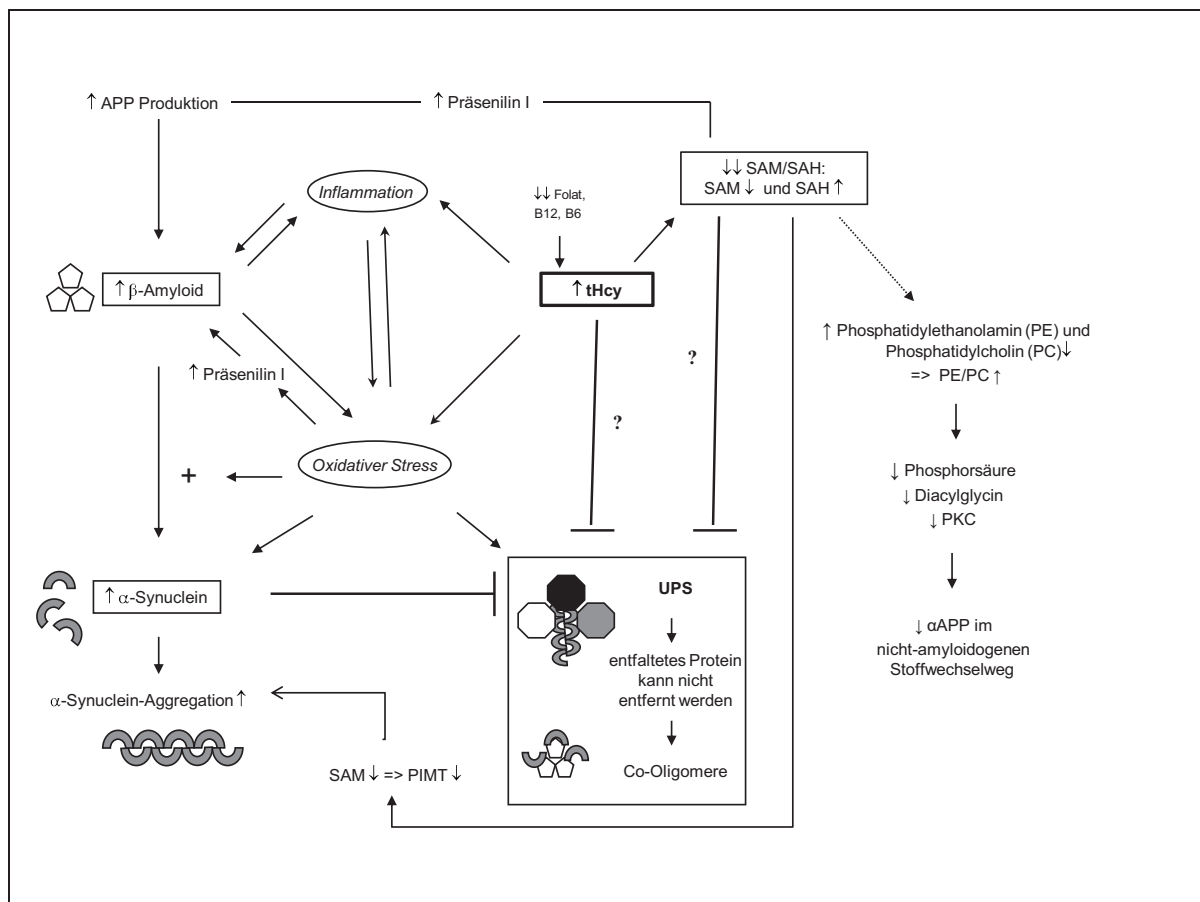


Abbildung 5.1: Zusammenfassende Darstellung der Beeinflussung von Entstehung und Ablagerung von α -Synuclein und β -Amyloid durch erhöhtes tHcy: Die Expression des Presenilin I-Gens wird erhöht, der nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg wird vermindert. Reparatursysteme wie das UPS werden gehemmt, weniger PIMT entsteht. PIMT: Isoaspartylmethyltransferase, Co-Oligomere: α -Synuclein und β -Amyloid, B12: Vitamin B12, B6: Vitamin B6

Weiterhin konnten wir eine positive Relation zwischen den Serumwerten der MMA und der mit Ultraschall bestimmten Fläche der Substantia nigra der Probanden aufzeigen. Da weder das Gesamt-Vitamin B12, noch das holoTC mit diesem Messwert korrelierte, schied der Vitamin B12-Status als Erklärung

für diese Beobachtung aus. In einer Tierstudie wurde gezeigt, dass MMA die Phosphorylierung von Proteinen des Cytoskeletts im Cortex von jungen Ratten vermutlich indirekt beeinflusst [36]. Die Wirkung von MMA auf dieses System konnte zum Teil durch die erhöhte Aktivität von Proteinphosphatase 2A erklärt werden. Hierzu sei auf die Methylmalonurie mit ihren Symptomen Lethargie, Wachstumsstörung, Erbrechen und Koma verwiesen, von der es eine Form gibt, die sich auf Vitamin B12-Gabe nicht bessert. Ausgehend von diesen Erkenntnissen nehmen wir an, dass der neurotoxische Effekt von Cobalamin-Mangel zumindest teilweise eher in der vermehrten Anreicherung von MMA, als im niedrigen Vitaminstatus begründet liegt.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie und dem aktuellen Wissensstand, ist, zur Vermeidung und Verminderung neurodegenerativer Komplikationen, die Optimierung des B-Vitamin-Haushalts als sinnvoll zu erachten. Eventuell sollte in diesem Zusammenhang auch der empfohlene Tagesbedarf, gerade für ältere Menschen, überdacht werden. Es empfiehlt sich, neben den gängigen Parametern auch die Bestimmung von HoloTC und evtl. auch MMA und Hcy vorzunehmen, besonders bei Risikogruppen, wie älteren Menschen, Vegetariern, Malabsorptionsgefährdeten, idiopathisch neurodegenerativ oder psychiatrisch Erkrankten etc.. Hcy- und Methylierungsstatus sollten durch Vitamin-Substitution und präventiv durch die Modifikation von Lifestylefaktoren, besonders der Ernährung und des Suchtverhaltens, positiv beeinflusst werden.

Behandlungsstudien können in Zukunft zeigen, auf welche Weise dies am besten geschieht und ob möglicherweise auch eine direkte Substitution von SAM sinnvoll sein kann.

6. Literaturverzeichnis

1. *Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis.* JAMA, 2002. **288**(16): p. 2015-22.
2. Aarsland, D., E. Tandberg, J.P. Larsen, and J.L. Cummings, *Frequency of dementia in Parkinson disease.* Arch Neurol, 1996. **53**(6): p. 538-42.
3. Aita, J.F., *Why patients with Parkinson's disease fall.* JAMA, 1982. **247**(4): p. 515-6.
4. Alonso-Aperte, E., M.P. Gonzalez, R. Poo-Prieto, and G. Varela-Moreiras, *Folate status and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in colorectal adenocarcinoma in humans.* Eur J Clin Nutr, 2008. **62**(2): p. 295-8.
5. Anthony, J.C., L. LeResche, U. Niaz, M.R. von Korff, and M.F. Folstein, *Limits of the 'Mini-Mental State' as a screening test for dementia and delirium among hospital patients.* Psychol Med, 1982. **12**(2): p. 397-408.
6. Baptista, M.J., C. O'Farrell, S. Daya, R. Ahmad, D.W. Miller, J. Hardy, M.J. Farrer, and M.R. Cookson, *Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines.* J Neurochem, 2003. **85**(4): p. 957-68.
7. Beal, M.F., *Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases.* Ann Neurol, 1995. **38**(3): p. 357-66.
8. Beck, A.T. and R.A. Steer, *Beck Depression Inventory (BDI).* 1987, San Antonio: The Psychological Corporation Inc.
9. Beck, A.T., C.H. Ward, M. Mendelson, J. Mock, and J. Erbaugh, *An inventory for measuring depression.* Arch Gen Psychiatry, 1961. **4**: p. 561-71.
10. Becker, G., J. Seufert, U. Bogdahn, H. Reichmann, and K. Reiners, *Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography.* Neurology, 1995. **45**(1): p. 182-4.
11. Benson, J., *Atlas of Clinical Gynecology: Urogynecology and Reconstructive Pelvic Surgery.* 2000: Current Medicine, Inc.
12. Bergmark, C., M.A. Mansoor, A. Svardal, and U. de Faire, *Redox status of plasma homocysteine and related aminothiols in smoking and nonsmoking young adults.* Clin Chem, 1997. **43**(10): p. 1997-9.
13. Bernheimer, H., W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, K. Jellinger, and F. Seitelberger, *Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations.* J Neurol Sci, 1973. **20**(4): p. 415-55.
14. Bird, T. and S. Sumi, *Lewy Bodies*, in *Atlas of Clinical Neurology*, R.N. Rosenberg, Editor. 2002, Current Medicine LLC.
15. Blandini, F., R. Fancellu, E. Martignoni, A. Mangiagalli, C. Pacchetti, A. Samuele, and G. Nappi, *Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease.* Clin Chem, 2001. **47**(6): p. 1102-4.
16. Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli, and E. Martignoni, *Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease.* Prog Neurobiol, 2000. **62**(1): p. 63-88.
17. Bonsch, D., B. Lenz, J. Kornhuber, and S. Bleich, *DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism.* Neuroreport, 2005. **16**(2): p. 167-70.
18. Brady, J., L. Wilson, L. McGregor, E. Valente, and L. Orning, *Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer.* Clin Chem, 2008. **54**(3): p. 567-73.
19. Brattstrom, L., *Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD.* Neurology, 2001. **56**(2): p. 281; author reply 281-2.

20. Bressa, G.M., *S-adenosyl-L-methionine (SAME) as antidepressant: meta-analysis of clinical studies*. Acta Neurol Scand Suppl, 1994. **154**: p. 7-14.
21. Bush, A.I. and R.E. Tanzi, *Alzheimer disease-related abnormalities of amyloid beta precursor protein isoforms in the platelet: the brain's delegate in the periphery?* Arch Neurol, 1998. **55**(9): p. 1179-80.
22. Butz, L. and V. du Vigneaud, *The formation of a homologue of Cystine by the decomposition of Methionine with sulfuric acid*. J Biol Chem, 1932. **99**: p. 135-42.
23. Cantoni, G., *The nature of the active Methyl donor formed enzymatically from L-Methionine and Adenosinetriphosphate*. J Am Chem Soc, 1952. **74**(11): p. 2942-43.
24. Carmel, R. and D.W. Jacobsen, *Homocysteine in health and disease*. 2001, Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press. xvi, 510 p.
25. Carney, M.W., T.K. Chary, T. Bottiglieri, and E.H. Reynolds, *The switch mechanism and the bipolar/unipolar dichotomy*. Br J Psychiatry, 1989. **154**: p. 48-51.
26. Carson, N.A. and D.W. Neill, *Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland*. Arch Dis Child, 1962. **37**: p. 505-13.
27. Chan, A. and T.B. Shea, *Folate deprivation increases presenilin expression, gamma-secretase activity, and Abeta levels in murine brain: potentiation by ApoE deficiency and alleviation by dietary S-adenosyl methionine*. J Neurochem, 2007. **102**(3): p. 753-60.
28. Chen, P., R. Poddar, E.V. Tipa, P.M. Dibello, C.D. Moravec, K. Robinson, R. Green, W.D. Kruger, T.A. Garrow, and D.W. Jacobsen, *Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease*. Adv Enzyme Regul, 1999. **39**: p. 93-109.
29. Choi, S.W. and S. Friso, *Interactions between folate and aging for carcinogenesis*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(10): p. 1151-7.
30. Clarke, S., *Protein carboxyl methyltransferases: two distinct classes of enzymes*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 479-506.
31. Colley, W.C., T.C. Sung, R. Roll, J. Jenco, S.M. Hammond, Y. Altshuller, D. Barsagi, A.J. Morris, and M.A. Frohman, *Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization*. Curr Biol, 1997. **7**(3): p. 191-201.
32. Conley, S.C. and J.T. Kirchner, *Parkinson's disease--the shaking palsy. Underlying factors, diagnostic considerations, and clinical course*. Postgrad Med, 1999. **106**(1): p. 39-42, 45-6, 49-50 passim.
33. Curzon, G., *The biochemistry of the basal ganglia and Parkinson's disease*. Postgrad Med J, 1977. **53**(626): p. 719-25.
34. Da Prada, M., A.M. Cesura, J.M. Launay, and J.G. Richards, *Platelets as a model for neurones?* Experientia, 1988. **44**(2): p. 115-26.
35. Damier, P., *New aspects in the pathophysiology of dyskinesia*. Salpetriere Deep Brain Stimulation Group. Adv Neurol, 1999. **80**: p. 611-7.
36. de Almeida, L.M., C. Funchal, L. Pelaez Pde, F.D. Pessutto, S.O. Loureiro, L. Vivian, M. Wajner, and R. Pessoa-Pureur, *Effect of propionic and methylmalonic acids on the in vitro phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during development*. Metab Brain Dis, 2003. **18**(3): p. 207-19.
37. de Groot, P.G., C. Willems, G.H. Boers, M.D. Gonsalves, W.G. van Aken, and J.A. van Mourik, *Endothelial cell dysfunction in homocystinuria*. Eur J Clin Invest, 1983. **13**(5): p. 405-10.
38. Di Rocco, A., J.D. Rogers, R. Brown, P. Werner, and T. Bottiglieri, *S-Adenosyl-Methionine improves depression in patients with Parkinson's disease in an open-label clinical trial*. Mov Disord, 2000. **15**(6): p. 1225-9.

39. Duan, W., B. Ladenheim, R.G. Cutler, Kruman, II, J.L. Cadet, and M.P. Mattson, *Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease*. J Neurochem, 2002. **80**(1): p. 101-10.
40. Duffy, P. and V. Tennyson, *Phase and Electron microscopic observations of Lewy Bodies and Melanin granules in the Substantia Nigra and Locus Caeruleus in Parkinson's Disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1965. **24**(3): p. 398-414.
41. Eliezer, D., E. Kutluay, R. Bussell, Jr., and G. Browne, *Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states*. J Mol Biol, 2001. **307**(4): p. 1061-73.
42. Fahn, S., R. Elton, and M.o.t.U.D. Committee, *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*, in *Recent Developments in Parkinson's Disease*, S. Fahn, C.D. Marsden, D.B. Calne, and M. Goldstein, Editors. 1987, Macmillan Health Care Information: Florham Park, New Jersey. p. 153-304.
43. Fahn, S., P. Greene, F. B., and S. Bressman, *Atlas of Clinical Neurology*, ed. R.N. Rosenberg. 2002: Current Medicine Group LLC.
44. Faucheux, B.A., A.M. Bonnet, Y. Agid, and E.C. Hirsch, *Blood vessels change in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease*. Lancet, 1999. **353**(9157): p. 981-2.
45. Finkelstein, J.D., *The metabolism of homocysteine: pathways and regulation*. Eur J Pediatr, 1998. **157 Suppl 2**: p. S40-4.
46. Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.
47. Forno, L.S., *Neuropathology of Parkinson's disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(3): p. 259-72.
48. Frosst, P., H.J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C.A. Sheppard, R.G. Matthews, G.J. Boers, M. den Heijer, L.A. Kluijtmans, L.P. van den Heuvel, and et al., *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 111-3.
49. Fuso, A., L. Seminara, R.A. Cavallaro, F. D'Anselmi, and S. Scarpa, *S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production*. Mol Cell Neurosci, 2005. **28**(1): p. 195-204.
50. Galasko, D., L.A. Hansen, R. Katzman, W. Wiederholt, E. Masliah, R. Terry, L.R. Hill, P. Lessin, and L.J. Thal, *Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias*. Arch Neurol, 1994. **51**(9): p. 888-95.
51. Gellekink, H., D. van Oppenraaij-Emmerzaal, A. van Rooij, E.A. Struys, M. den Heijer, and H.J. Blom, *Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma*. Clin Chem, 2005. **51**(8): p. 1487-92.
52. Gerritsen, T., J.G. Vaughn, and H.A. Waisman, *The identification of homocystine in the urine*. Biochem Biophys Res Commun, 1962. **9**: p. 493-6.
53. Gibson, J.B., N.A. Carson, and D.W. Neill, *Pathological Findings in Homocystinuria*. J Clin Pathol, 1964. **17**: p. 427-37.
54. Goetz, C.G., W. Poewe, O. Rascol, C. Sampaio, G.T. Stebbins, C. Counsell, N. Giladi, R.G. Holloway, C.G. Moore, G.K. Wenning, M.D. Yahr, and L. Seidl, *Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations*. Mov Disord, 2004. **19**(9): p. 1020-8.

55. Goodwin, J.S., J.M. Goodwin, and P.J. Garry, *Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population*. JAMA, 1983. **249**(21): p. 2917-21.
56. Goyette, P., P. Frosst, D.S. Rosenblatt, and R. Rozen, *Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(5): p. 1052-9.
57. Graham, I.M., L.E. Daly, H.M. Refsum, K. Robinson, L.E. Brattstrom, P.M. Ueland, R.J. Palma-Reis, G.H. Boers, R.G. Sheahan, B. Israelsson, C.S. Uiterwaal, R. Meleady, D. McMaster, P. Verhoef, J. Witteman, P. Rubba, H. Bellet, J.C. Wautrecht, H.W. de Valk, A.C. Sales Luis, F.M. Parrot-Rouland, K.S. Tan, I. Higgins, D. Garcon, G. Andria, and et al., *Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project*. JAMA, 1997. **277**(22): p. 1775-81.
58. Grando, S.A., M.R. Pittelkow, and K.U. Schallreuter, *Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(9): p. 1948-65.
59. Gurol, M.E., M.C. Irizarry, E.E. Smith, S. Raju, R. Diaz-Arrastia, T. Bottiglieri, J. Rosand, J.H. Growdon, and S.M. Greenberg, *Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy*. Neurology, 2006. **66**(1): p. 23-9.
60. Guttormsen, A.B., A.M. Mansoor, T. Fiskerstrand, P.M. Ueland, and H. Refsum, *Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading*. Clin Chem, 1993. **39**(7): p. 1390-7.
61. Guttormsen, A.B., P.M. Ueland, W.D. Kruger, C.E. Kim, L. Ose, I. Folling, and H. Refsum, *Disposition of homocysteine in subjects heterozygous for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: relationship between genotype and phenotype*. Am J Med Genet, 2001. **100**(3): p. 204-13.
62. Hak, A.E., K.H. Polderman, I.C. Westendorp, C. Jakobs, A. Hofman, J.C. Witteman, and C.D. Stehouwer, *Increased plasma homocysteine after menopause*. Atherosclerosis, 2000. **149**(1): p. 163-8.
63. Hashimoto, M., E. Rockenstein, L. Crews, and E. Masliah, *Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Neuromolecular Med, 2003. **4**(1-2): p. 21-36.
64. Hattori, N., *[Parkin gene: its mutations and function]*. Rinsho Shinkeigaku, 2002. **42**(11): p. 1077-81.
65. Hautzinger, M., M. Bailer, H. Worall, and F. Keller, *Beck-Depressions-Inventar (BDI)*. 1994, Bern: Huber.
66. Henning, B.F., R. Riezler, M. Tepel, K. Langer, H. Raidt, U. Graefe, and W. Zidek, *Evidence of altered homocysteine metabolism in chronic renal failure*. Nephron, 1999. **83**(4): p. 314-22.
67. Hensley, K., D.A. Butterfield, M. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J.F. Wu, R. Floyd, and J. Carney, *A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on the free radical generating capacity of the peptide: implications of "molecular shrapnel" for Alzheimer's disease*. Proc West Pharmacol Soc, 1995. **38**: p. 113-20.
68. Herrmann, M., T. Widmann, G. Colaianni, S. Colucci, A. Zallone, and W. Herrmann, *Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2348-53.
69. Herrmann, W., S. Isber, R. Obeid, M. Herrmann, and M. Jouma, *Concentrations of homocysteine, related metabolites and asymmetric dimethylarginine in preeclamptic women with poor nutritional status*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(10): p. 1139-46.

70. Herrmann, W., R. Obeid, H. Schorr, and J. Geisel, *Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(11): p. 1478-88.
71. Herrmann, W., S. Quast, M. Ullrich, H. Schultze, M. Bodis, and J. Geisel, *Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation*. Atherosclerosis, 1999. **144**(1): p. 91-101.
72. Herrmann, W., H. Schorr, K. Purschwitz, F. Rassoul, and V. Richter, *Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians*. Clin Chem, 2001. **47**(6): p. 1094-101.
73. Hirsch, E.C., G. Orioux, M.P. Muriel, C. Francois, and J. Feger, *Nondopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Adv Neurol, 2003. **91**: p. 29-37.
74. Hoehn, M. and M. Yahr, *Parkinsonism: onset, progression and mortality*. Neurology, 1967. **17**(5): p. 427-442.
75. Hornykiewicz, O., *[The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease.]*. Wien Klin Wochenschr, 1963. **75**: p. 309-12.
76. Hoshi, E., L. Tremblay, J. Feger, P.L. Carras, and P.L. Strick, *The cerebellum communicates with the basal ganglia*. Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1491-3.
77. Hung, A.Y., C. Haass, R.M. Nitsch, W.Q. Qiu, M. Citron, R.J. Wurtman, J.H. Growdon, and D.J. Selkoe, *Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(31): p. 22959-62.
78. Hutson, P.H. and G. Curzon, *Monitoring in vivo of transmitter metabolism by electrochemical methods*. Biochem J, 1983. **211**(1): p. 1-12.
79. Iversen, L., *Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S82-8.
80. Iwai, A., E. Masliah, M. Yoshimoto, N. Ge, L. Flanagan, H.A. de Silva, A. Kittel, and T. Saitoh, *The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system*. Neuron, 1995. **14**(2): p. 467-75.
81. Jakes, R., C.R. Harrington, M.G. Spillantini, M. Goedert, and A. Klug, *Characterisation of an antibody relevant to the neuropathology of Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1995. **9**(1): p. 47-51.
82. Jakubowski, H., *Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels*. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 1935-42.
83. Jakubowski, H., *Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels*. FASEB J, 1999. **13**(15): p. 2277-83.
84. Jakubowski, H., *Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 377S-381S.
85. Jamaluddin, M.S., X. Yang, and H. Wang, *Hyperhomocysteinemia, DNA methylation and vascular disease*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(12): p. 1660-6.
86. Jara-Prado, A., A. Ortega-Vazquez, L. Martinez-Ruano, C. Rios, and A. Santamaria, *Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition*. Neurotox Res, 2003. **5**(4): p. 237-43.
87. Jellinger, K.A., *Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway*. Mol Chem Neuropathol, 1991. **14**(3): p. 153-97.
88. Jellinger, K.A., *Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia*. Neurodegener Dis, 2008. **5**(3-4): p. 118-21.

89. Jenco, J.M., A. Rawlingson, B. Daniels, and A.J. Morris, *Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins*. *Biochemistry*, 1998. **37**(14): p. 4901-9.
90. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2003. **53 Suppl 3**: p. S26-36; discussion S36-8.
91. Jenner, P. and C.W. Olanow, *Understanding cell death in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 1998. **44**(3 Suppl 1): p. S72-84.
92. Joel, D. and I. Weiner, *The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum*. *Neuroscience*, 2000. **96**(3): p. 451-74.
93. Kalbe, E., J. Kessler, P. Calabrese, R. Smith, A.P. Passmore, M. Brand, and R. Bullock, *DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2004. **19**(2): p. 136-43.
94. Kang, S.S., P.W. Wong, and M.R. Malinow, *Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease*. *Annu Rev Nutr*, 1992. **12**: p. 279-98.
95. Kannan, K. and S.K. Jain, *Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H2O2-treated U937 monocytes*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(4): p. 423-8.
96. Koh, J.M., Y.S. Lee, Y.S. Kim, D.J. Kim, H.H. Kim, J.Y. Park, K.U. Lee, and G.S. Kim, *Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(7): p. 1003-11.
97. Kompetenznetz Parkinson: Oertel, W.H., K. Eggert, G. Deuschl, T. Gasser, G. Arnold, H. Baas, R. Dodel, H. Mehdorn, H. Przuntek, H. Reichmann, P. Riederer, S. Spieker, C. Trenkwalder, *Leitlinien für Ärzte - extrapyramidal-motorische Erkrankungen - Parkinson-Syndrome*. 2008, Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
98. Kozich, V., E. Kraus, R. de Franchis, B. Fowler, G.H. Boers, I. Graham, and J.P. Kraus, *Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: examination of cystathionine beta-synthase alleles at the molecular level*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(4): p. 623-9.
99. Kramer, M.L. and W.J. Schulz-Schaeffer, *Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies*. *J Neurosci*, 2007. **27**(6): p. 1405-10.
100. Krebs, H.A., R. Hems, and B. Tyler, *The regulation of folate and methionine metabolism*. *Biochem J*, 1976. **158**(2): p. 341-53.
101. Kruman, II, C. Culmsee, S.L. Chan, Y. Kruman, Z. Guo, L. Penix, and M.P. Mattson, *Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity*. *J Neurosci*, 2000. **20**(18): p. 6920-6.
102. Kuhn, W., T. Hummel, D. Voitalla, and T. Müller, *Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD*. *Neurology*, 2001. **56**: p. 281-282.
103. Lamberti, P., S. Zoccolella, E. Armenise, S.V. Lamberti, A. Fraddosio, M. de Mari, G. Iliceto, and P. Livrea, *Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated Parkinson's disease patients: effect of cobalamin and folate administration*. *Eur J Neurol*, 2005. **12**(5): p. 365-8.
104. Lamberti, P., S. Zoccolella, G. Iliceto, E. Armenise, A. Fraddosio, M. de Mari, and P. Livrea, *Effects of levodopa and COMT inhibitors on plasma homocysteine in Parkinson's disease patients*. *Mov Disord*, 2005. **20**(1): p. 69-72.
105. Langston, J.W., L.S. Forno, J. Tetrud, A.G. Reeves, J.A. Kaplan, and D. Karluk, *Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years*

- after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*, 1999. **46**(4): p. 598-605.
106. Langston, J.W. and J. Palfreman, *The Case of the frozen addicts [print]*. 1st ed. 1995, New York: Pantheon Books. ix, 309 p.
 107. Leblhuber, F., J. Walli, B. Widner, E. Artner-Dworzak, D. Fuchs, and K. Vrecko, *Homocysteine and B vitamins in dementia*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **73**(1): p. 127-8.
 108. Liu, X.X., K. Wilson, and C.G. Charlton, *Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa*. *Life Sci*, 2000. **66**(23): p. 2277-88.
 109. Manfredi, M., F. Stocchi, and L. Vacca, *Differential diagnosis of parkinsonism*. *J Neural Transm Suppl*, 1995. **45**: p. 1-9.
 110. Mansoor, M.A., A.M. Svardal, J. Schneede, and P.M. Ueland, *Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men*. *Clin Chem*, 1992. **38**(7): p. 1316-21.
 111. Maroteaux, L., J.T. Campanelli, and R.H. Scheller, *Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal*. *J Neurosci*, 1988. **8**(8): p. 2804-15.
 112. Maroteaux, L. and R.H. Scheller, *The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991. **11**(3-4): p. 335-43.
 113. McCully, K.S., *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*. *Am J Pathol*, 1969. **56**(1): p. 111-28.
 114. McCully, K.S. and R.B. Wilson, *Homocysteine theory of arteriosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1975. **22**(2): p. 215-27.
 115. McLean, R.R., P.F. Jacques, J. Selhub, K.L. Tucker, E.J. Samelson, K.E. Broe, M.T. Hannan, L.A. Cupples, and D.P. Kiel, *Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(20): p. 2042-9.
 116. Medina, M., J.L. Urdiales, and M.I. Amores-Sanchez, *Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(14): p. 3871-82.
 117. Miner, S.E., J. Evrovski, and D.E. Cole, *Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update*. *Clin Biochem*, 1997. **30**(3): p. 189-201.
 118. Mudd, S.H., J.D. Finkelstein, F. Irreverre, and L. Laster, *Homocystinuria: An Enzymatic Defect*. *Science*, 1964. **143**: p. 1443-5.
 119. Muller, T., *Role of homocysteine in the treatment of Parkinson's disease*. *Expert Rev Neurother*, 2008. **8**(6): p. 957-67.
 120. Muller, T., D. Voitalla, B. Hauptmann, B. Fowler, and W. Kuhn, *Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease*. *Neurosci Lett*, 2001. **308**(1): p. 54-6.
 121. Nishinaga, M., T. Ozawa, and K. Shimada, *Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(3): p. 1381-6.
 122. Nygard, O., H. Refsum, P.M. Ueland, I. Stensvold, J.E. Nordrehaug, G. Kvale, and S.E. Vollset, *Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **65**(1): p. 136-43.
 123. O'Suilleabhain, P. and R. Diaz-Arrastia, *Levodopa elevates homocysteine: is this a problem?* *Arch Neurol*, 2004. **61**(5): p. 633-4.
 124. O'Suilleabhain, P.E., R. Oberle, C. Bartis, R.B. Dewey, Jr., T. Bottiglieri, and R. Diaz-Arrastia, *Clinical course in Parkinson's disease with elevated homocysteine*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2006. **12**(2): p. 103-7.

125. O'Suilleabhain, P.E., V. Sung, C. Hernandez, L. Lacritz, R.B. Dewey, Jr., T. Bottiglieri, and R. Diaz-Arrastia, *Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations*. Arch Neurol, 2004. **61**(6): p. 865-8.
126. Obeid, R., M. Kasoha, J.P. Knapp, P. Kostopoulos, G. Becker, K. Fassbender, and W. Herrmann, *Folate and methylation status in relation to phosphorylated tau protein(181P) and beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid*. Clin Chem, 2007. **53**(6): p. 1129-36.
127. Obeid, R., H. Schorr, R. Eckert, and W. Herrmann, *Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers*. Clin Chem, 2004. **50**(1): p. 238-41.
128. Olney, J.W., *Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders*. Biol Psychiatry, 1989. **26**(5): p. 505-25.
129. Ostrem, J.L., G.A. Kang, I. Subramanian, M. Guarnieri, J. Hubble, A.L. Rabinowicz, and J. Bronstein, *The effect of entacapone on homocysteine levels in Parkinson disease*. Neurology, 2005. **64**(8): p. 1482.
130. Parent, A. and L.N. Hazrati, *Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry*. Brain Res Brain Res Rev, 1995. **20**(1): p. 128-54.
131. Parkinson, J., *An Essay on the Shaking Palsy*. 1817, Sherwood, Neely, and Jones: London.
132. Poddar, R., N. Sivasubramanian, P.M. DiBello, K. Robinson, and D.W. Jacobsen, *Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease*. Circulation, 2001. **103**(22): p. 2717-23.
133. Poewe, W. and E. Luginger, *Depression in Parkinson's disease: impediments to recognition and treatment options*. Neurology, 1999. **52**(7 Suppl 3): p. S2-6.
134. Pollack, A.E., *Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia*. Neurol Clin, 2001. **19**(3): p. 523-34, v.
135. Polymeropoulos, M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, and R.L. Nussbaum, *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
136. Ponte, P., P. Gonzalez-DeWhitt, J. Schilling, J. Miller, D. Hsu, B. Greenberg, K. Davis, W. Wallace, I. Lieberburg, and F. Fuller, *A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors*. Nature, 1988. **331**(6156): p. 525-7.
137. Postuma, R.B., A.J. Espay, C. Zadikoff, O. Suchowersky, W.R. Martin, A.L. Lafontaine, R. Ranawaya, R. Camicioli, and A.E. Lang, *Vitamins and entacapone in levodopa-induced hyperhomocysteinemia: a randomized controlled study*. Neurology, 2006. **66**(12): p. 1941-3.
138. Quadri, P., C. Fragiaco, R. Pezzati, E. Zanda, G. Forloni, M. Tettamanti, and U. Lucca, *Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(1): p. 114-22.
139. Reynolds, E.H., M.W. Carney, and B.K. Toone, *Methylation and mood*. Lancet, 1984. **2**(8396): p. 196-8.
140. Richards, M., K. Marder, L. Cote, and R. Mayeux, *Interrater reliability of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale motor examination*. Mov Disord, 1994. **9**(1): p. 89-91.
141. Richter, P., J. Werner, A. Heerlein, A. Kraus, and H. Sauer, *On the validity of the Beck Depression Inventory. A review*. Psychopathology, 1998. **31**(3): p. 160-8.

142. Rinne, J.O., J. Rummukainen, L. Paljarvi, and U.K. Rinne, *Dementia in Parkinson's disease is related to neuronal loss in the medial substantia nigra*. *Ann Neurol*, 1989. **26**(1): p. 47-50.
143. Rogers, J.D., A. Sanchez-Saffon, A.B. Frol, and R. Diaz-Arrastia, *Elevated plasma homocysteine levels in patients treated with levodopa: association with vascular disease*. *Arch Neurol*, 2003. **60**(1): p. 59-64.
144. Sato, Y., J. Iwamoto, T. Kanoko, and K. Satoh, *Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in elderly women with Parkinson's disease*. *Am J Med*, 2005. **118**(11): p. 1250-5.
145. Scarpa, S., A. Fusco, F. D'Anselmi, and R.A. Cavallaro, *Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease?* *FEBS Lett*, 2003. **541**(1-3): p. 145-8.
146. Schapira, A.H., *Present and future drug treatment for Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005. **76**(11): p. 1472-8.
147. Schapira, A.H., J.M. Cooper, D. Dexter, J.B. Clark, P. Jenner, and C.D. Marsden, *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 1990. **54**(3): p. 823-7.
148. Schimke, R.N., V.A. McKusick, T. Huang, and A.D. Pollack, *Homocystinuria. Studies of 20 Families with 38 Affected Members*. *JAMA*, 1965. **193**: p. 711-9.
149. Schneede, J., H. Refsum, and P.M. Ueland, *Biological and environmental determinants of plasma homocysteine*. *Semin Thromb Hemost*, 2000. **26**(3): p. 263-79.
150. Selhub, J., *Public health significance of elevated homocysteine*. *Food Nutr Bull*, 2008. **29**(2 Suppl): p. S116-25.
151. Selhub, J. and J.W. Miller, *The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine*. *Am J Clin Nutr*, 1992. **55**(1): p. 131-8.
152. Sherer, T.B., R. Betarbet, and J.T. Greenamyre, *Pathogenesis of Parkinson's disease*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001. **2**(5): p. 657-62.
153. Sherer, T.B., R. Betarbet, and J.T. Greenamyre, *Environment, mitochondria, and Parkinson's disease*. *Neuroscientist*, 2002. **8**(3): p. 192-7.
154. Sherer, T.B. and J.T. Greenamyre, *Oxidative damage in Parkinson's disease*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(5-6): p. 627-9.
155. Siderowf, A., M. McDermott, K. Kieburtz, K. Blindauer, S. Plumb, and I. Shoulson, *Test-retest reliability of the unified Parkinson's disease rating scale in patients with early Parkinson's disease: results from a multicenter clinical trial*. *Mov Disord*, 2002. **17**(4): p. 758-63.
156. Signorello, M.G., R. Pascale, and G. Leoncini, *Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets*. *Eur J Clin Invest*, 2002. **32**(4): p. 279-84.
157. Silberberg, J., R. Crooks, J. Fryer, J. Wlodarczyk, B. Nair, X.W. Guo, L.J. Xie, and N. Dudman, *Gender differences and other determinants of the rise in plasma homocysteine after L-methionine loading*. *Atherosclerosis*, 1997. **133**(1): p. 105-10.
158. Slodzinski, H., L.B. Moran, G.J. Michael, B. Wang, S. Novoselov, M.E. Cheetham, R.K. Pearce, and M.B. Graeber, *Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (herp) is up-regulated in parkinsonian substantia nigra and present in the core of Lewy bodies*. *Clin Neuropathol*, 2009. **28**(5): p. 333-43.
159. Sontag, E., C. Hladik, L. Montgomery, A. Luangpirom, I. Mudrak, E. Ogris, and C.L. White, 3rd, *Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. **63**(10): p. 1080-91.

160. Sotnikova, T.D., J.M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron, *Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2006. **5**(1): p. 45-56.
161. Stabler, S.P., J. Lindenbaum, D.G. Savage, and R.H. Allen, *Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency*. Blood, 1993. **81**(12): p. 3404-13.
162. Temple, M.E., A.B. Luzier, and D.J. Kazierad, *Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis*. Ann Pharmacother, 2000. **34**(1): p. 57-65.
163. Tombaugh, T.N. and N.J. McIntyre, *The mini-mental state examination: a comprehensive review*. J Am Geriatr Soc, 1992. **40**(9): p. 922-35.
164. Tompkins, M.M. and W.D. Hill, *Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death*. Brain Res, 1997. **775**(1-2): p. 24-9.
165. Tsai, J.C., M.A. Perrella, M. Yoshizumi, C.M. Hsieh, E. Haber, R. Schlegel, and M.E. Lee, *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6369-73.
166. Tsigelny, I.F., L. Crews, P. Desplats, G.M. Shaked, Y. Sharikov, H. Mizuno, B. Spencer, E. Rockenstein, M. Trejo, O. Platoshyn, J.X. Yuan, and E. Masliah, *Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases*. PLoS ONE, 2008. **3**(9): p. e3135.
167. Ueda, K., H. Fukushima, E. Masliah, Y. Xia, A. Iwai, M. Yoshimoto, D.A. Otero, J. Kondo, Y. Ihara, and T. Saitoh, *Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11282-6.
168. Ueland, P.M., *Homocysteine species as components of plasma redox thiol status*. Clin Chem, 1995. **41**(3): p. 340-2.
169. Upchurch, G.R., Jr., G.N. Welch, A.J. Fabian, J.E. Freedman, J.L. Johnson, J.F. Keaney, Jr., and J. Loscalzo, *Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17012-7.
170. Vafai, S.B. and J.B. Stock, *Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease*. FEBS Lett, 2002. **518**(1-3): p. 1-4.
171. Valkovic, P., J. Benetin, P. Blazicek, L. Valkovicova, K. Gmitterova, and P. Kukumberg, *Reduced plasma homocysteine levels in levodopa/entacapone treated Parkinson patients*. Parkinsonism Relat Disord, 2005. **11**(4): p. 253-6.
172. van Meurs, J.B., R.A. Dhonukshe-Rutten, S.M. Pluijm, M. van der Klift, R. de Jonge, J. Lindemans, L.C. de Groot, A. Hofman, J.C. Witteman, J.P. van Leeuwen, M.M. Breteler, P. Lips, H.A. Pols, and A.G. Uitterlinden, *Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture*. N Engl J Med, 2004. **350**(20): p. 2033-41.
173. Vieregge, P., H.J. Friedrich, A. Rohl, G. Ulm, and I. Heberlein, *[Multifactorial etiology of idiopathic Parkinson disease. A case-control study]*. Nervenarzt, 1994. **65**(6): p. 390-5.
174. Vigneswara, V., J.D. Lowenson, C.D. Powell, M. Thakur, K. Bailey, S. Clarke, D.E. Ray, and W.G. Carter, *Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32619-29.
175. Vilaseca, M.A., E. Monros, R. Artuch, C. Colome, C. Farre, C. Valls, E. Cardo, and M. Pineda, *Anti-epileptic drug treatment in children: hyperhomocysteinaemia, B-vitamins and the 677C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene*. Eur J Paediatr Neurol, 2000. **4**(6): p. 269-77.
176. von Bohlen und Halbach, O., A. Schober, and K. Krieglstein, *Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2004. **73**(3): p. 151-77.

177. Walter, U., C. Klein, R. Hilker, R. Benecke, P.P. Pramstaller, and D. Dressler, *Brain parenchyma sonography detects preclinical parkinsonism*. *Mov Disord*, 2004. **19**(12): p. 1445-9.
178. Wang, L., Q. Ke, W. Chen, J. Wang, Y. Tan, Y. Zhou, Z. Hua, W. Ding, J. Niu, J. Shen, Z. Zhang, X. Wang, Y. Xu, and H. Shen, *Polymorphisms of MTHFD, plasma homocysteine levels, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(8): p. 2526-32.
179. Watkins, D. and D.S. Rosenblatt, *Genetic heterogeneity among patients with methylcobalamin deficiency. Definition of two complementation groups, cblE and cblG*. *J Clin Invest*, 1988. **81**(6): p. 1690-4.
180. Yasui, K., H. Kowa, K. Nakaso, T. Takeshima, and K. Nakashima, *Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD*. *Neurology*, 2000. **55**(3): p. 437-40.
181. Yin, Y.I., B. Bassit, L. Zhu, X. Yang, C. Wang, and Y.M. Li, *{gamma}-Secretase Substrate Concentration Modulates the Abeta42/Abeta40 Ratio: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER DISEASE*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(32): p. 23639-44.
182. Zedde, M., A. Manca, G. Baule, and V. Agnetti, *Brain Parenchyma Sonography (BPS) of Substantia Nigra (SN) in Parkinson's disease*. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2005. **11**: p. 222.
183. Zoccolella, S., P. Lamberti, G. Iliceto, C. Diroma, E. Armenise, G. Defazio, S.V. Lamberti, A. Fraddosio, M. de Mari, and P. Livrea, *Plasma homocysteine levels in L-dopa-treated Parkinson's disease patients with cognitive dysfunctions*. *Clin Chem Lab Med*, 2005. **43**(10): p. 1107-10.

7. Publikation

Der auf dieser Dissertationsschrift basierende wissenschaftliche Artikel

„Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson’s disease“

wurde am 13. August 2009 online publiziert und erschien in der Oktober-Ausgabe 2009 des Journals „Clinical Chemistry“ der American Association of Clinical Chemistry.

(Clin Chem. 2009 Oct;55(10):1852-60. Epub 2009 Aug 13.)

Dank

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Herrmann, der sich als Doktorvater zur Verfügung stellte und dessen jahrelange wissenschaftliche Tätigkeit, auch und besonders im Bezug auf das Homocystein und seine Wirkungen im menschlichen Körper, die Grundlage zu dieser Arbeit legte.

Frau Dr. Rima Obeid bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, da sie die Konzeption, Durchführung und wissenschaftliche Aufarbeitung dieser Arbeit betreute und mit Rat und Tat jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Faßbender, Herrn PD Dr. Dillmann und Herrn Dr. Spiegel, sowie dem gesamten Team der neurologischen Poliklinik der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar für die Kooperation danken, besonders Frau Susanne Schmidt und Frau Viola Günther.

Für Hilfe und Unterstützung bei der Laborarbeit danke ich Frau Dr. Heike Schorr, Herrn Dr. Jean-Pierre Knapp, Frau Dr. Natascha Umanskaya, Frau Dipl. Biol. Susanne Kirsch, Frau Eva Raabe und den medizinisch-technischen Assistenten des Zentrallabors der Universitätskliniken des Saarlandes.

Meinen Eltern, die mir Studium und Promotion ermöglicht haben und die mich, wann immer möglich und nötig, tatkräftig unterstützt haben, möchte ich ganz besonders danken.