

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen
Abteilung für Pharmakologie und experimentelle Therapie
Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Genfrequenzen und Enzymaktivität der
S-Adenosylhomocystein-Hydrolase in einer kroatischen
Population**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martina Akua Sitsofe Thomas, geb. Tete
aus Stuttgart

2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. D. Kloor
2. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Kömpf

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bisheriger Kenntnisstand.....	1
1.2	Eigene Fragestellung.....	9
2	Untersuchungsgut und Methoden	10
2.1	Untersuchungsgut.....	10
2.2	Aufbereitung der Proben.....	10
2.3	Stärkegelelektrophorese.....	11
2.3.1	Zusammensetzung, Herstellung und Laufbedingungen des Stärkegels.....	11
2.4	Funktioneller Nachweis der SAH-Hydrolase.....	13
2.4.1	Nachweis über S-Adenosyl-L-Homocystein.....	14
2.4.1.1	Zymogrammtechnik.....	16
2.4.1.2	Photometrische Messung der Enzymaktivität mit S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat.....	16
2.5	Proteinbestimmung.....	19
2.6	Berechnung und Statistik.....	20
3	Ergebnisse	23
2.3	Zymogramm der SAH-Hydrolase.....	23
3.2	Populationsgenetik.....	24
3.3	Stumme Gene.....	26
3.4	Ladungsunabhängige Aktivität der erythrozytären SAH-Hydrolase.....	28
3.5	Durchschnittliche Proteinkonzentration in der Stichprobe.....	30
3.6	Photometrische Messung der Enzymaktivität mit S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat.....	30
4	Diskussion	32
4.1	Morphologie und Lage der Banden im Zymogramm.....	33
4.2	Populationsgenetik.....	35

4.3	Stumme Gene.....	35
4.4	Ladungsunabhängige Aktivität der erythrozytären SAH-Hydrolase.....	39
4.5	Durchschnittliche Proteinkonzentration der SAH-Hydrolase in der Stichprobe.....	40
4.6	Enzymaktivitätsmessung mittels Spektralphotometrie und S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat.....	40
5	Zusammenfassung.....	43
6	Literaturverzeichnis.....	44

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua _{dest.}	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine)
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CAF	Celluloseacetatfolie
cm	Zentimeter
d	Küvettschichtdicke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Erys	Erythrozyten
g	Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ O _{bidest.}	Wasser, zweifach destilliert
KD	Kilo Dalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KPP	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimol
MTT	Monotetrazoliumsalz
NaCl	Natriumchlorid
NAD/NAD ⁺ /NADH	Nikotinamiddinukleotid
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
NP	Nukleosidphosphorylase
p.a.	pro analysi
RBC	rote Blutkörperchen (red blood cells)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAHH	S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SGE	Stärkegelelektrophorese
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit = Einheit der Enzymaktivität
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
V	Volt
w/v	weight per volume
XOD	Xanthinoxidase

1 Einleitung

1.1 Bisheriger Kenntnisstand

Das Enzym S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (SAH-Hydrolase, EC 3.3.1.1) ist primär ein zytoplasmatisches Enzym, und katalysiert die reversible Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein (SAH) zu Adenosin und L-Homocystein (DE LA HABA und CANTONI, 1959).

Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion liegt mit einer Gleichgewichtskonstanten von $K_{eq}=10^{-6}$ weit auf der Seite der Synthese von SAH, aber da Adenosin und L-Homocystein unter physiologischen Bedingungen durch weiteren Metabolismus aus dem Gleichgewicht entfernt werden, überwiegt die Hydrolyse (Abb. 1).

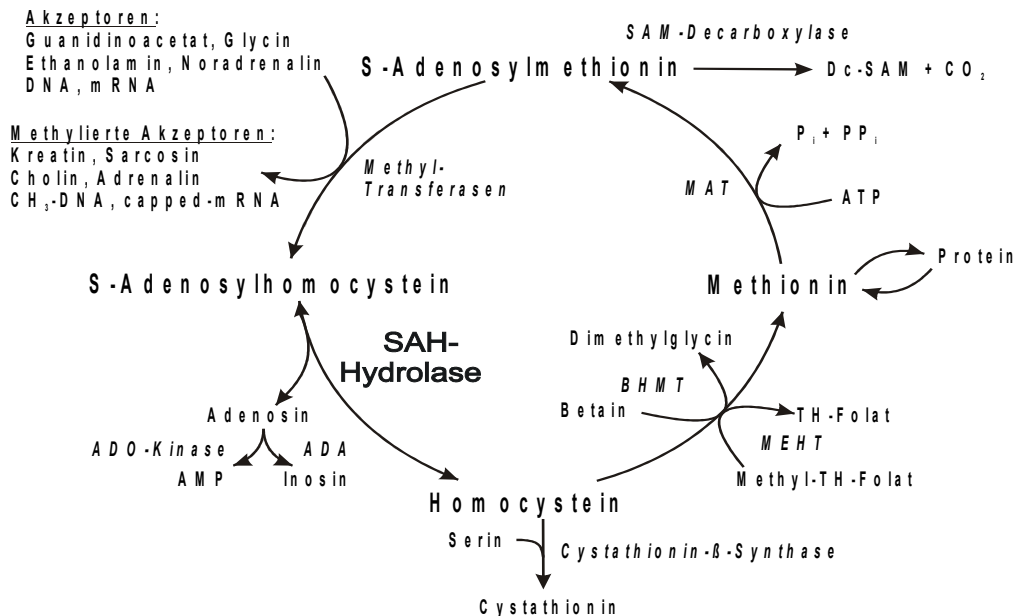


Abb. 1: Überblick über den intrazellulären SAM und SAH Metabolismus.

TH-Folat: Tetrahydrofolat; METH: 5-Methyl-Tetrahydrofolat-
Homocystein S-Methyltransferase; SAM: S-Adenosylmethionin;
MAT: L-Methionin S-Adosyltransferase; BHMT: Betain-Homo-
Cystein S-Methyltransferase; ADO-Kinase: Adenosinkinase;
ADA: Adenosindesaminase

Die Familie der SAH-Hydrolase ist in Eukaryonten ubiquitär verbreitet.

Das Enzym wurde in verschiedenen Spezies untersucht, im niederen Eukaryonten Hefe, in Pflanzen und Vertebraten (KNUDSEN und YALL, 1972; GURANOWSKI und PAWELKIEWICZ, 1977; KAWALLECK *et al.*, 1992; TREZZINI *et al.*, 1993; GURANOWSKI und JAKUBOWSKI, 1987).

In Vertebraten untersuchte man das Enzym in den unterschiedlichsten Spezies und Organen (FINKELSTEIN und HARRIS, 1975; UELAND *et al.*, 1979; MAGNUSON *et al.*, 1983). So konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase in der Leber, dem Pankreas und den Nieren am höchsten ist. Mittlere Aktivitäten weisen Milz und Hoden auf. Die geringste Aktivität zeigen Herz und Gehirn.

SHIMIZU *et al.* (1984) zeigten, dass SAH-hydrolysierende Enzyme ebenso unter Prokaryonten verbreitet sind. Die SAH-Hydrolase ist eines der Proteine, deren Aminosäuresequenz mit 65% Homologie einen der höchsten Konservierungsgrade zwischen Prokaryonten und Mensch besitzt (SGANGA *et al.*, 1992).

Die Aminosäuresequenz der SAH-Hydrolase der Ratte stimmt zu 97% mit der Sequenz des menschlichen Enzyms überein (COULTER-KARIS und HERSHFIELD, 1989; CREEDON *et al.*, 1994).

Die Hauptaufgabe der SAH-Hydrolase ist die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und L-Homocystein (DE LA HABA und CANTONI, 1959) und ist in Vertebraten der einzig bekannte SAH-Abbauweg (CANTONI und CHIANG, 1980).

In Mikroorganismen kann SAH durch die SAH-Nukleosidase und das S-Ribosylhomocystein-Spaltungsenzym umgesetzt werden (WALKER und DUERRE, 1975; JAKUBOWSKI und GURANOWSKI, 1981).

Die DNA-Sequenz des Cistrons der SAH-Hydrolase besteht aus 1299 Nukleotiden, und sie kodiert für eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 47660 Dalton (COULTER-KARIS und HERSHFIELD, 1989).

Bei Säugetieren liegt die SAH-Hydrolase ausschließlich als Quadrimer mit einem Molekulargewicht von 180-200 KD vor (DØSKLAND und UELAND, 1982).

Jede Untereinheit setzt sich aus 431 Aminosäuren zusammen (GOMI *et al.*, 1989) und hat je ein Molekül NAD⁺ fest gebunden, welches am Katalysekreislauf beteiligt ist.

Die vier Untereinheiten der SAH-Hydrolase sind strukturell gleich aufgebaut (YONGBO *et al.*, 1999) und spielen im Stoffwechsel als Tetramer alle die gleiche Rolle (GOMI *et al.*, 1985). Sie sind jedoch kristallographisch voneinander unabhängig (YONGBO *et al.*, 1999).

Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der SAH-Hydrolase wurden 1999 von HU *et al.* aufgeklärt. Sie fanden heraus, dass eine Untereinheit der SAH-Hydrolase aus der katalytischen Domäne (Aminosäure 1 bis 181 und 352 bis 402), der NAD⁺-Bindungsdomäne (Aminosäure 182 bis 351) und der c-terminalen Domäne (Aminosäure 403-431) besteht.

HERSHFIELD und FRANCKE (1982) lokalisierten den Genort der menschlichen SAH-Hydrolase auf Chromosom 20, indem sie Zellhybride aus humanen Zellen und Zellen des chinesischen Hamsters bildeten.

MOHANDAS *et al.* (1984) konnten die Lage des Genortes der SAH-Hydrolase präzisieren. Der Genort der SAH-Hydrolase liegt auf dem langen Arm von Chromosom 20, in der Region cen→q13.1, in der Nachbarschaft des Genortes der Adenosindesaminase (q13.1→qter).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass diese beiden gekoppelten Enzymkodierenden Gene von einem gemeinsamen evolutionären Vorläufer abstammen.

Nach der Sequenzierung beider Gene stellte sich aber heraus, dass es keinerlei Homologien zwischen den beiden Enzymen gibt.

BISSBORT *et al.* (1983) zeigten bei der Untersuchung einer süddeutschen Population, dass die SAH-Hydrolase humaner Erythrozyten einen genetischen Polymorphismus aufweist.

Die Bestimmung erfolgte durch Stärkegelelektrophorese und anschließende enzymatische Färbemethoden.

Es wurden zwei autosomal kodominante Allele: SAH-Hydrolase *1 (SAHH *1) und SAH-Hydrolase*2 (SAHH*2) gefunden (BISSBORT *et al.*, 1983).

Demzufolge kann die SAH-Hydrolase in menschlichen Erythrozyten drei verschiedene Phänotypen aufweisen: SAH-Hydrolase 1-1 (SAHH 1-1), SAH-Hydrolase 2-2 (SAHH 2-2) und SAH-Hydrolase 2-1 (SAHH 2-1).

SAHH*1 und SAHH*2 weisen Genfrequenzen von 0.96 beziehungsweise 0.04 auf (BISSBORT *et al.*, 1983).

Danach erfolgten weitere populationsgenetische Untersuchungen in einer japanischen, italienischen, britischen und westdeutschen Population, siehe Tabelle 1 (BISSBORT *et al.*, 1983; AKIYAMA *et al.*, 1984; SCHEIL und BORNER, 1985; CORBO *et al.*, 1987; SCOZZARI *et al.*, 1987; ARREDONDO *et al.*, 1989). Wie Tab. 1 zeigt, kommt bei Europäern noch ein weiteres Allel, SAHH*3, vor, das sich phänotypisch bei Heterozygoten als langsam wanderndes Bandenmuster manifestiert.

In allen untersuchten Populationen kommt das Allel SAHH*1 am häufigsten vor. Hinweise auf ein stummes Allel am SAHH-Locus fehlen.

Tabelle 1: SAH-Hydrolase-Phänotypen und Genfrequenzen in den untersuchten Populationen

Population	Phänotypen,n							Allelfrequenzen			Referenzen
	total	1-1	2-2	3-3	2-1	3-1	3-2	SAHH*1	SAHH*2	SAHH*3	
Italien:	386	361	0	0	18	7	0	0.968	0.023	0.009	
Rom	248	232	0	0	12	4	0	0.968	0.024	0.008	Corbo <i>et al.</i> , (1987)
L`Aquila	138	129	0	0	6	3	0	0.967	0.022	0.011	"
Latium	374	352	1	0	16	5	0	0.969	0.024	0.007	Scozzari <i>et al.</i> , (1987)
Sardinien	93	88	0	0	2	3	0	0.973	0.011	0.016	"
Süddeutschland	114	105	0	0	9	0	0	0.961	0.039	0	Bissbort <i>et al.</i> , (1983)
Westdeutschland	647	611	2	0	27	6	1	0.970	0.025	0.005	Scheil und Borner (1985)
Japan	214	195	1	0	18	0	0	0.953	0.047	0	Akiyama <i>et al.</i> , (1984)
Großbritannien	166	156	0	0	8	2	0	0.970	0.024	0.006	Arredondo <i>et al.</i> , (1989)

Punktmutationen, die zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führen, können sich phänotypisch als Krankheiten manifestieren, die das Individuum selbst betreffen (Mutation mit dominanter Wirkung), oder bei denen es als Träger fungiert (Mutation mit rezessiver Wirkung). So verursacht ein Gendefekt bei rezessivem Erbgang erst bei den homozygoten Nachkommen ein bestimmtes Krankheitsbild.

Die Bedeutung der SAH-Hydrolase für den Stoffwechsel der Zelle lässt sich daran erkennen, dass Lebewesen, denen das SAH-Hydrolase-Gen fehlte, wie der homozygoten non-agouti Maus, nicht lebensfähig sind (MILLER *et al.*, 1994).

Umso bemerkenswerter war der Fallbericht von BARIC *et al.* (2004) über einen jungen kroatischen Patienten mit verminderter SAH-Hydrolase-Aktivität (<10%). Bei dem Patienten handelt es sich um den ersten Sohn phänotypisch unauffälliger, nicht blutsverwandter Eltern. Von Geburt an, bis zum Erreichen des fünften Lebensmonats, war die psychomotorische Entwicklung des Kindes verlangsamt. Danach kam die psychomotorische Entwicklung zum Stillstand und schließlich wurden Rückschritte beobachtet. Der Junge war deutlich hypoton. Die klinisch-chemischen Untersuchungen zeigten erhöhte Werte für die Kreatinkinase und die Transaminasen im Serum, eine verlängerte Prothrombinzeit und ein niedriges Albumin. In der Leberbiopsie fand sich eine mild verlaufende Hepatitis und nur spärlich vorhandenes raues endoplasmatisches Retikulum. Anfängliche Studien im Alter von acht Monaten zeigten eine andauernde Hypermethioninämie ohne gleichzeitige Tyrosinerhöhung. Das Gesamthomocystein im Plasma war für ein Kind nur leicht erhöht. Gegenüber dem Mittelwert des Referenzbereichs waren die Werte für SAM 30-fach und für SAH 150-fach erhöht. Die Aktivität der SAH-Hydrolase betrug nur drei Prozent der Kontrollwerte aus der Leber und fünf bis zehn Prozent von den in Erythrozyten und Fibroblasten gemessenen Kontrollwerten. In einem Extrakt aus kultivierten Fibroblasten des Patienten konnte kein löslicher Inhibitor der SAH-Hydrolase nachgewiesen werden.

Vor Einsetzen der Behandlung fanden sich bei dem Patienten niedrige Konzentrationen an Phosphatidylcholin und Cholin sowie eine Erhöhung von

Guanidinoacetat, Betain, Dimethylglycin und Cystationin. Die DNA der Leukozyten war hypermethyliert. In der Kernspintomographie des Gehirns zeigte sich eine Atrophie der weißen Substanz und eine extrem langsame Myelinisierung.

Im Alter von 12,8 Monaten wurde der Enzymdefekt entdeckt. Molekulare Analysen ergaben zwei verschiedene Mutationen im vierten Exon des SAH-Hydrolase-Gens. Von der Mutter stammt ein Stopcodon an Position 112: TGG ► TGA, vom Vater die Punktmutation Tyrosin zu Cystein an Position 143: TAC ► TGC.

Dem heutigen Kenntnisstand zufolge wurde bisher in keinen anderen biochemischen Untersuchungen ähnliche Abweichungen berichtet.

GAULL *et al.* (1981) berichteten eine isolierte Hypermethioninämie bei einem Mädchen. Das klinische Bild und die histopathologischen Befunde gleichen denen des kroatischen Jungen: Myopathie, retardierte psychomotorische Entwicklung, milde hepatische Dysfunktion und stark erhöhte Werte der Kreatinkinase. Die hepatische Methionin-Adenosyltransferase- (MAT)-Aktivität war bei dem Mädchen nicht erniedrigt, was einen MAT I/III-Mangel ausschließt.

GAULL *et al.* (1981) untersuchten weder den Plasmagehalt an SAM noch an SAH und sie postulierten keinen spezifischen Enzymmangel bei ihrer Patientin. Aber es deutet alles darauf hin, dass die Patientin ebenfalls an einem SAH-Hydrolase-Mangel litt.

Phänotypisch waren bei dem kroatischen Patienten hauptsächlich die Muskulatur, die Leber und das Gehirn betroffen. Dies äußerte sich in einer langsamen progressiv-destruktiven Myopathie und der mild verlaufenden Form einer chronischen Hepatitis.

Der Junge wurde einer Therapie unterzogen. Es handelte sich dabei um eine Methioninreduzierte Diät, bei gleichzeitiger Substitution von Phosphatidylcholin und später auch Kreatinmonohydrat.

Infolge der Therapie kam es zu der erwünschten Abnahme von SAH, SAM und Methionin. Klinisch äußerte sich der Therapieerfolg in einer Zunahme der Muskelkraft und der geistigen Ansprechbarkeit.

Genanalysen der beiden Mutationen zeigten, dass die mütterliche Mutation zu einem signifikant verkürzten Protein führt. Die väterliche Punktmutation wurde unter 130 Kontrollallelen kein weiteres Mal gefunden.

Die Ergebnisse der biochemischen Studien und die Mutationsanalyse des SAH-Hydrolase-Gens beweisen, dass der Patient an einem autosomal rezessiv vererbten „**primären SAH-Hydrolase-Mangel**“ leidet.

CLARKE und BANFIELD (2001) listeten 39, im Säugetier bekannte, SAM-abhängige Methyltransferasen auf.

Diese Enzyme werden praktisch mehr oder weniger stark durch SAH gehemmt. Diese Großzahl an metabolischen Veränderungen deutet an, dass die Pathophysiologie des SAH-Hydrolase-Mangels extrem komplex ist.

1.2 Eigene Fragestellung

Die Genfrequenzen der SAH-Hydrolase wurden in verschiedenen Populationen bestimmt. In Populationen aus Deutschland, Japan, Italien und Großbritannien fanden sich überwiegend einheitliche Ergebnisse für die Verteilung der Phänotypen SAHH 1-1; 2-1; 2-2; 3-1 und 3-2.

BARIC *et al.* berichteten 2004 über einen einjährigen kroatischen Jungen mit nachgewiesener Reduktion der SAH-Hydrolase-Enzymaktivität, dessen Eltern phänotypisch unauffällig sind. Dies ist der erste bekannte Fall eines primären SAH-Hydrolase-Mangels.

Genanalysen ergaben zwei verschiedene Mutationen im vierten Exon des SAH-Hydrolase-Gens. Von der Mutter stammt ein Stopcodon, vom Vater eine Punktmutation.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Klärung, ob es in der kroatischen Bevölkerung eine Häufung von Defektallelen gibt.

Dafür wurde in einer Stichprobe von 237 Blutproben nichtverwandter kroatischer Individuen aus dem Raum Zagreb mit biochemisch-humangenetischen Methoden die SAH-Hydrolase-Phänotypen bestimmt.

Mit der Genzählmethode wurden die Genfrequenzen der gefundenen Allele berechnet.

Da die Familie mittlerweile einen weiteren Sohn bekommen hat, wurde der SAH-Hydrolase-Phänotyp beider Kinder mit untersucht.

2 Untersuchungsgut und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Bei dieser Studie zur Bestimmung der Genfrequenzen der SAH-Hydrolase-Allele handelt es sich um eine Kooperation mit dem Krankenhauszentrum von Zagreb. Die Proben wurden in diesem Zentrum gewonnen und anonymisiert an unser Labor übersandt. Untersucht wurden 237 Blutproben nichtverwandter kroatischer Individuen, sowie die Blutprobe des kroatischen Jungen, der an einer nachgewiesenen verminderten Aktivität der SAH-Hydrolase leidet und die Blutprobe seines Bruders.

Bei den Proben handelte es sich um das Sediment roter Blutkörperchen (RBC-Sediment) aus EDTA-Blut, das zwei Mal mit 0,9 % NaCl gewaschen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Trockeneis gelagert ins Pharmakologische und Toxikologische Institut der Universität Tübingen gebracht wurde.

2.2 Aufbereitung der Proben

Das Erythrozytensediment wurde mittels Ultraschall hämolysiert und durch Behandlung mit Toluol destromatisiert. Es wurden 300 μl des RBC-Sediments mit 20 μl Dithiotreitol (17 mM, Serva) und 100 μl Toluol (Merck) in einem Reagenzgefäß beschallt und anschließend bei 10 000 U/min zentrifugiert. Das Toluol bindet dabei die hydrophoben Teile der Zellmembran mit den nicht gelösten Proteinanteilen in Form eines Pellets. Somit enthält das Hämolysat nur die sich in Lösung befindlichen Proteine. Das Hämolysat wurde bei -20°C aufbewahrt und zum Teil im Labor des humangenetischen Institutes bei Herrn Prof. Dr. Kömpf und zum Teil im Labor des pharmakologischen Institutes bei Frau Priv. Doz. Dr. Kloor hergestellt.

2.3 Stärkegelelektrophorese

Smithies beschrieb 1955 erstmals die horizontale Stärkegelelektrophorese (SGE). Dabei bildet hydrolysierte Kartoffelstärke die Trägermatrix. Es ist eine etablierte Methode zur Trennung von Proteingemischen. Das Stärkegel wird hergestellt, indem die hydrolysierte Kartoffelstärke unter Rühren in einem Puffer aufgekocht wird. Dabei entsteht aus der Stärke und dem Puffer ein kolloidales Sol. Dieses wird auf eine Kühlplatte gegossen. Während des Abkühlens vernetzen sich die Amylopektin-Ketten zu einem halbfesten Gel, der sogenannten Trägermatrix. Die Proben werden in kleine Taschen des Gels eingebracht, die vorher durch das Auflegen eines Probenkammes im Stärkegel geformt wurden. Damit die Proteinmoleküle im Gel wandern, lässt man mit Hilfe einer Gleichstromquelle Strom durch das Gel fließen, der durch die Pufferionen des verwendeten Puffers gebildet wird. Da Proteine definierte isoelektrische Punkte besitzen, wandern sie, in Abhängigkeit des pH-Wertes des Puffers, in Richtung Anode oder Kathode. Die Nettoladung und die jeweilige Größe des Proteins sind entscheidend für die Geschwindigkeit, mit der es in der Trägermatrix wandert. Proteine, die gegenüber dem pH-Wert des Puffers einen basischen isoelektrischen Punkt haben und somit eine positive Ladung tragen, wandern dabei in Richtung Kathode. Proteine mit saurem isoelektrischen Punkt und negativer Ladung wandern in Richtung Anode. Mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese lassen sich somit Proteingemische gut voneinander trennen.

2.3.1 Zusammensetzung, Herstellung und Laufbedingungen des Stärkegels

Die Stärke (Biomol) wird mit dem Gel-Puffer suspendiert und in einem Kolben im Wasserbad unter ständigem Rühren erhitzt. Nach ca. 45-60 Minuten bildet sich ein kolloidales Sol, das auf die Kühlplatte gegossen wird. Die Kühlplatte wurde zuvor mit einer Plastikfolie bespannt und dann mit einem Rahmen und einem Kamm versehen. Wenn das Gel nach etwa einer Stunde erstarrt ist, werden der Rahmen und der Kamm vorsichtig entfernt. In die durch den Kamm

entstandenen Taschen pipettiert man die zu untersuchenden Proben. Der Brückenpuffer wird in einen Puffertank gegeben. Dieser besteht aus zwei Kammern, die über ein dickes Filterpapier miteinander verbunden sind. Die vordere Kammer ist ebenfalls über ein Filterpapier mit der Trägermatrix verbunden, in der hinteren Kammer befindet sich die Elektrode. Vor dem Lauf wird das Stärkegel mit Plastikfolie abgedeckt, um während der Elektrophorese einem Wasserverlust vorzubeugen. Wenn die Trennung der Proteine durch die Elektrophorese erfolgt ist, schneidet man die Teile, die man verwenden will, aus dem Stärkegel aus. Die ausgeschnittenen Stärkeblöcke kann man durch erneutes Schneiden in horizontaler Richtung in 2mm dicke Scheiben schneiden. Auf diesen Scheiben kann man durch Zymogrammfarbung die Proteine sichtbar machen. Die Stärkegelelektrophorese wurde im Labor des humangenetischen Institutes bei Herrn Prof. Dr. Kömpf durchgeführt.

Zusammensetzung des Stärkegels

Brückenpuffer:	0,2 M Tris (Medac) 0,15 M Histidin-HCL pH 7,8 (Biomol)
Gelpuffer:	30 mM Tris (Medac) 22 mM Histidin-HCL pH 7,8 (Biomol)
Stärkekonzentration im Gel:	14 % (w/v)
Probenapplikation:	10 cm kathodisch
Kühltemperatur:	4°C
Spannungsabfall:	7 V / cm
Laufzeit:	16 h

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden wie oben beschrieben aufbereitet. Das Hämolyolat enthält somit nur noch die in Lösung befindlichen Proteine, da das Toluol die hydrophoben Teile der Zellmembran mit den nicht gelösten Proteinanteilen in Form eines Pellets bindet.

In der Elektrophorese kam pro Probe 100µl stromafreies Hämolyolat zum Einsatz, das zu gleichen Teilen mit 100µl Sephadexgel gemischt wurde.

Für jede Probe wurden davon dann je 100µl pro Stärkegel-Tasche pipettiert.

<u>Sephadexgel</u>		<u>Hersteller / Art</u>
Saccharose:	40% (w/v)	Merck / D(+) Saccharose
Sephadex G 200 in H ₂ O _{bidest.} :	5% (w/v)	Pharmacia / G 200

2.4 Funktioneller Nachweis der SAH-Hydrolase

Durch einen funktionellen Nachweis kann man die SAH-Hydrolase sichtbar machen. Dabei macht man sich die Aktivität der SAH-Hydrolase zunutze.

Die enzymatischen Tests verfügen über eine hohe Spezifität und Effektivität. Das Zymogramm macht das gesuchte Protein über eine Farbstoffreaktion sichtbar, während andere Proteine nur selten oder überhaupt nicht detektiert werden.

Meistens sind mehrere Reaktionen nacheinander gekoppelt und am Ende steht die Farbstoffbildung (Abb. 2).

2.4.1 Nachweis über S-Adenosyl-L-Homocystein

Der Nachweis der SAH-Hydrolase mit S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) als Substrat erfolgt über Adenosin und die folgenden Stoffwechselprodukte des Purinribonukleotidabbaus. Am Ende steht dann die Farbstoffreaktion.

- (1) Die SAH-Hydrolase hydrolysiert das Substrat S-Adenosyl-L-Homocystein zu Adenosin und Homocystein.
- (2) Unter Abspaltung von NH_3 wird Adenosin dann durch die Adenosin-Desaminase (ADA) zu Inosin hydrolysiert.
- (3) Die Nukleosid-Phosphorylase (NP) katalysiert die Reaktion von Inosin mit Phosphat zu Hypoxanthin und Ribose-1-Phosphat.
- (4) Das entstandene Hypoxanthin wird unter Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Xanthin-Oxidase (XOD) zu Xanthin und weiter zu Harnsäure abgebaut.
- (5) Außer O_2 dienen u. a. auch Tetrazoliumsalze als Elektronenakzeptor der Xanthinoxidase-katalysierten Reaktion. Mit Hilfe des Elektronenüberträgers Meldola-Blau, wird das Tetrazoliumsalz MTT zu unlöslichem Formazan reduziert.

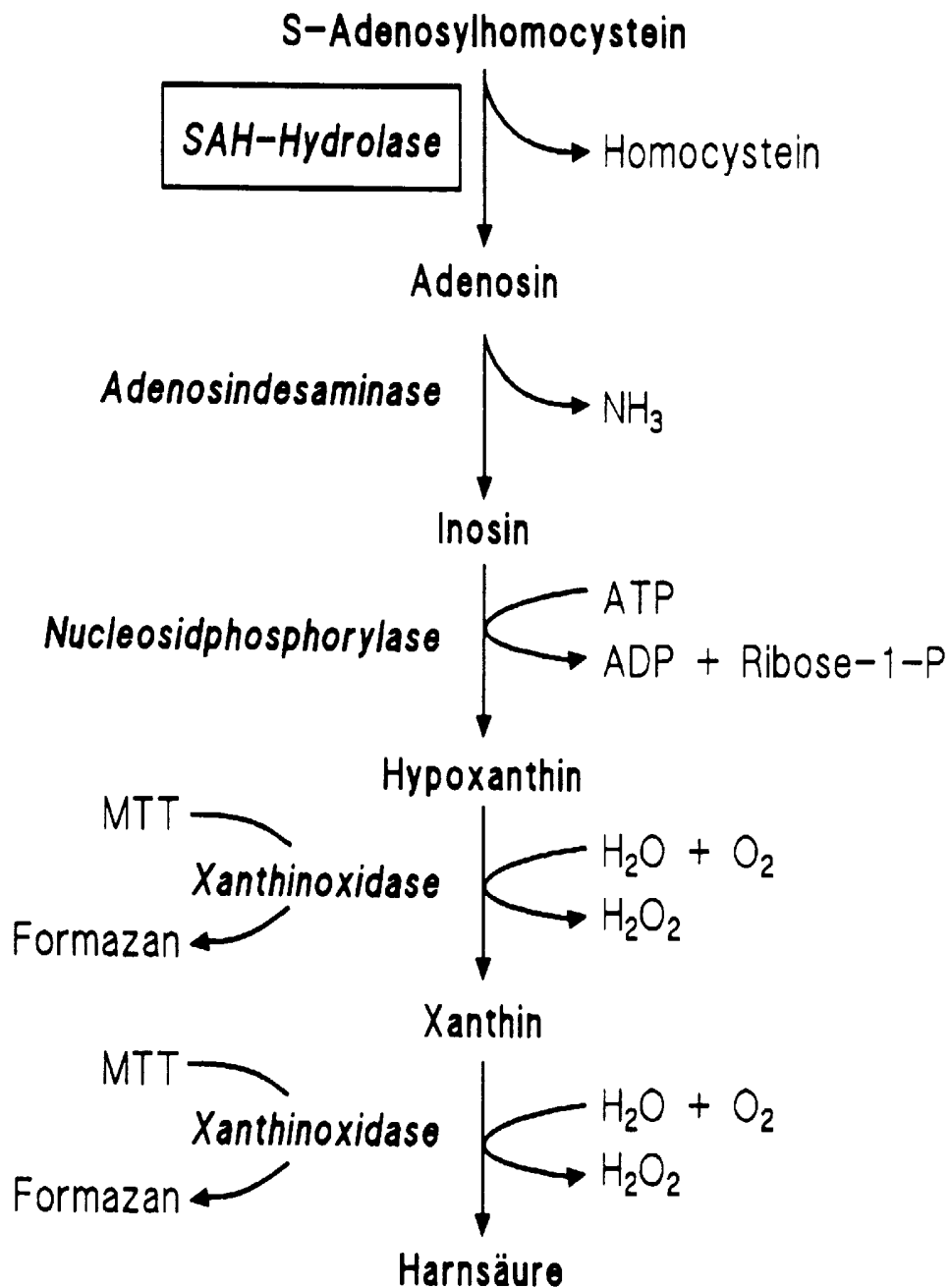


Abb. 2: Indirekter Nachweis der SAH-Hydrolase über den Abbau des Substrats SAH.

ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; NH³: Ammoniak; P: Phosphat; MTT: Monotetrazoliumsalz.

2.4.1.1 Zymogrammtechnik

Zur Sichtbarmachung der SAH-Hydrolase nach der Stärkegelelektrophorese wird die Zymogrammtechnik angewandt. Dabei wird die Inkubationslösung in Cellulose-Acetat-Folie (Schleicher&Schuell) aufgenommen und luftblasenfrei auf die Gelschnittfläche aufgebracht. Nach der Inkubation von 90 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurde die Cellulose-Acetat-Folie (CAF) mit Leitungswasser gespült und bei 4 °C aufbewahrt.

Die CAF konnte am nächsten Tag gescannt werden.

Inkubationslösung:

Inkubationsansatz		Hersteller
MTT	100 µl (5 mg/ml)	Biomol
Meldola-Blau	20 µl (2 mg/ml)	Boehringer Mannheim
ADA	20 µl (from calf intestine: 10mg/ml)	Roche
NP	20 µl (from calf spleen: 18,7 U/mg)	Roche
XOD	20 µl (from cow milk: 20 U/169,5 mg)	Roche
SAH	200 µl (1 mM)	Sigma
K-Phosphat-Puffer (KPP) pH 7,0		

2.4.1.2 Photometrische Messung der Enzymaktivität mit S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat

Um eine Aussage über die SAH-Hydrolase-Aktivität in der kroatischen Population machen zu können, wurde in den Blutproben die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase bestimmt.

Mit Hilfe eines photometrischen Tests kann man unter Anwendung der Absorptionsphotometrie den Substratumsatz eines Enzyms beurteilen. Zur Messung der Enzymaktivität der SAH-Hydrolase misst man die Bildung des Farbstoffkomplexes Formazan bei einer Wellenlänge von 578 nm, der durch die katalytische Funktion des Enzyms entsteht (Abb. 2). Der Küvettenpuffer wurde

mit Gelatine versetzt, da Formazan in wässrigen Medien ausfällt und sich absetzt.

Prinzip der Enzymaktivitätsmessung

Enzyme sind Biokatalysatoren. Sie beschleunigen chemische Reaktionen, ohne dabei deren Gleichgewicht zu verschieben. Wenn die notwendigen Reaktionsbedingungen vorhanden sind, sind Enzyme auch außerhalb der intakten Zelle funktionsfähig. Die Enzymaktivität dient als Maß für die katalytische Wirkung eines Enzyms. Dabei handelt es sich um die pro Zeiteinheit umgesetzte Substratmenge, die nach dem Système International d' Unités in Katal gemessen wird und welche die Internationale Einheit Unit (U) ersetzt.

Ein Katal ist die Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde und Liter umsetzt. Ein Unit entspricht der Enzymmenge, die 1µM Substrat pro Minute umsetzt:

$$1 \text{ Katal} = \frac{1 \text{ Mol Substrat}}{1 \text{ Sekunde}} \qquad 1 \text{ Katal} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$$

Durch diese definierten Einheiten ist es möglich, quantitative Vergleiche anzustellen.

Dabei kommen photometrische Methoden zum Einsatz. Um quantitativ vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, müssen die Versuchsbedingungen, unter denen die Messungen ablaufen, definiert werden. Betroffen sind die Temperatur, der pH-Wert des Puffers, die verwendeten Pufferionen, die Substratkonzentrationen, die Enzymkonzentrationen und eventuell vorhandene Aktivatoren oder Inhibitoren des Enzyms.

Ansatz des Küvettenpuffers:

KPP	50 mM pH 7		
Gelatine	1,4 mg/ ml H ₂ O _{bidest}	14	%

Test-Ansatz für eine 1 ml Küvette:

		<u>Konzentration</u>
MTT	89,50 µl	100 µM
Meldola-Blau	4,84 µl	
ADA (1:20 verdünnt mit 50 mM KPP ph 7)	8,95 µl	1 U
NP	7,10 µl	0,8 U
XOD	4,00 µl	0,8 U
SAH	80,00 µl	80 µM
Küvettenpuffer (50 mM KPP ph 7)	780,90 µl	
Erys/Probe (Hämolyt)	25,00 µl	

Der Test-Ansatz wurde wie folgt zubereitet:

Die Hilfsenzyme ADA (Boehringer Mannheim), NP (SIGMA) und XOD (Roche) wurden an jedem Messtag frisch angesetzt und bis zum Zeitpunkt der Inkubation auf Eis gelagert.

Gelatine (Merck), MTT (SERVA), Puffer und Meldola-Blau (Boehringer Mannheim) wurden, hier als Kit bezeichnet, ebenfalls zusammen angesetzt und bis zum Zeitpunkt der Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Der Kit wurde nicht länger als zwei Tage verwendet.

Das Hämolyt wurde nach dem Auftauen gevortext, und dann zwei Minuten lang bei 14 000 rpm zentrifugiert.

Vor Messung der Proben wurden jeweils Hilfsenzyme, Kit und Hämolyt in definierten Volumina zusammen in ein Eppendorfgefäß gegeben. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert, wobei der Ansatz alle fünf Minuten gevortext wurde. Das Ansatzvolumen im Eppendorfgefäß betrug 1840 µl. Dieser Ansatz wurde nach der Inkubation zu gleichen Teilen auf zwei Küvetten verteilt. Probenküvette und Leerküvette enthielten kurz vor der Messung somit je 920 µl. Die Küvetten wurden in die dafür vorgesehenen Halterungen des Photometers (HITACHI U-3000 Spectrophotometer) eingesetzt. Zum Starten der Reaktion wurde in die

Probenküvette 80 µl SAH (SIGMA) zugegeben, während in der Referenzküvette das fehlende Volumen durch Zugabe von 80 µl 50 mM KPP pH7 ausgeglichen wurde.

Das Gesamtvolumen in jeder Küvette betrug somit 1000 µl. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 Minuten. Die Ergebnisse wurden alle 60 Sekunden ausgedruckt.

Auswertung der Messdaten:

Die Auswertung der Messdaten erfolgte manuell aus denen durch das Photometer erstellten Diagramme.

Dabei wurde aus den Kurven der Diagramme über dem linearen Abschnitt die Extinktionsdifferenz ΔE über 10 min ermittelt. Dieser Wert wurde dann einheitlich auf 30 Minuten umgerechnet.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Aus diesen Daten erfolgte dann die Berechnung des SAH-Umsatzes pro Minute und pro mg Protein.

Die Proben wurden mehrmals gemessen und dann der Mittelwert berechnet.

2.5 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet, bei der Rinderserumalbumin (BSA) als Standard dient.

Durch Ankopplung des Farbstoffes Coomassie-Blau an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm.

Als Eichreihe wurden jeweils 100 µl Aliquots zu 10, 30, 50, 80, 100, 150 und 200 µg BSA/ml eingesetzt.

Der Bio-Rad Protein Assay wurde 1:6 mit $H_2O_{bidest.}$ zu einer Farbstoff-Lösung verdünnt.

Jeweils 5 µl Hämolyat wurden mit 5 ml $Aqua_{dest.}$ gemischt. 20 µl dieser Verdünnung wurden erneut mit 80 µl $Aqua_{dest.}$ vermischt. Diese 100 µl wurden

mit 900 µl Farbstoff-Lösung gemischt. Daraus ergab sich eine Endverdünnung von 1:5 000.

100 µl H₂O_{bidest.}, als Leerwert, sowie jeweils 100 µl der Eichreihe wurden ebenfalls mit 900 µl Farbstoff-Lösung vermischt. Alle Lösungen inkubierten 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.

In eine Mikrotiterplatte wurden jeweils 200 µl der Lösungen und 200 µl H₂O_{bidest.} pipettiert. Die 200 µl H₂O_{bidest.} ohne Farbstoff-Lösung dienten dabei der Testkontrolle. Die Proteinkonzentration wurde anschließend photometrisch in einem Elisa Reader (DYNATECH Mr 50000) bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt.

Dabei wurde jede Probe mehrmals gemessen und dann der Mittelwert verwendet.

2.6 Berechnung und Statistik

Mittelwert und Standardabweichung

Alle Daten werden als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) ± Standardabweichung des Mittelwertes (s) angegeben. Die Daten wurden entweder durch den Student-t-Test oder den Alternative-t-Test mittels des Computerprogramms InStat analysiert.

Auswertung der populationsgenetischen Ergebnisse

Die Allelfrequenzen aus der kroatischen Stichprobe wurden mit Hilfe der Genzählmethode ermittelt und geprüft, ob die beobachteten Genotyphäufigkeiten einer Hardy-Weinberg-Verteilung gehorchen.

Die Genfrequenzen, die beobachteten und erwarteten Genotypfrequenzen, die Hardy-Weinberg-Wahrscheinlichkeit und die genotypischen Vergleiche zwischen den Populationen wurden unter Verwendung des GENEPOP Programms (Version 3.1.d) nach dem exakten Fisher-Test von Herrn Prof. J. Tomiuk, Institut für Humangenetik, berechnet.

Auswertung der Daten nach photometrischer Bestimmung der Proben

Aus den Kurven der Diagramme wurde über dem linearen Abschnitt die Extinktionsdifferenz ΔE über 10 min ermittelt. Dieser Wert wurde dann einheitlich auf 30 Minuten umgerechnet. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte durch das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$\Delta E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Der molare Extinktionskoeffizient der Harnsäure ($\varepsilon = 13 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) und die Schichtdicke der Küvette $d=1\text{cm}$ sind bekannte Größen. Demzufolge kann die Konzentrationsänderung (c) direkt aus der Extinktionsänderung berechnet werden:

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} \quad (2)$$

Setzt man für ε und d die unter diesen Versuchsbedingungen geltenden numerischen Werte ein, ergibt sich die Gleichung:

$$c = \frac{\Delta E \cdot \mu\text{mol}}{13 \text{ cm}^2 \cdot 1 \text{ cm}} = \frac{\Delta E}{13} \cdot \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \quad (3)$$

Die Extinktionsänderung (ΔE) pro min wird in Gleichung (3) eingesetzt, somit wird c in $[\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}]$ angegeben. Die spezifische Aktivität des Enzyms wird dann wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}} = \frac{\Delta c \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}}}{\text{Proteinkonzentration} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} \quad (4)$$

Die Proteinkonzentration des RBC-Sediments wurde bestimmt und die in 50µl Hämolyat, d.h. in 1 ml Reaktionsansatz, enthaltene Proteinmenge berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Zymogramm der SAH-Hydrolase

Die Darstellung der SAH-Hydrolase-Phänotypen nach Auftrennung in einem Stärkegel bei pH 7,8 gibt Abb. 3 wieder.

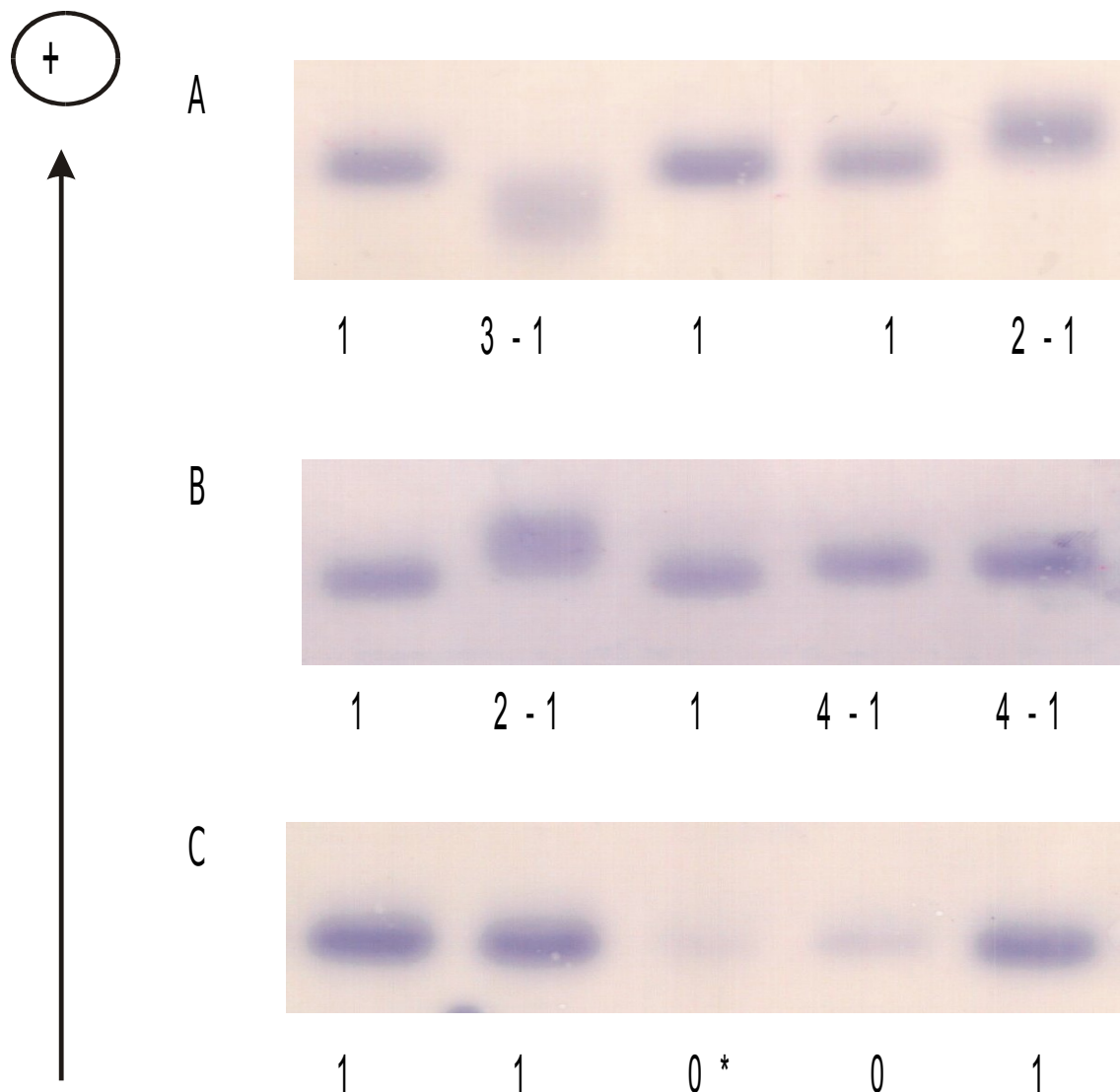


Abb. 3 Zymogramm häufiger und seltener Phänotypen nach Auftrennung in der horizontalen Stärkegelelektrophorese (SGE) bei pH 7,8.

* Probe des Indexpatienten von Baric

Die homozygoten Phänotypen SAHH 1 weisen eine einzelne Bande auf. Ihre elektrophoretische Position kann aus dem Diagramm entnommen werden. Die heterozygoten Phänotypen SAHH 2-1 und SAHH 3-1 zeichnen sich durch eine breite Bande aus, die einem Fünfbandenmuster entspricht. Die Banden des Phänotyps SAHH 2-1 liegen anodisch von der Position des SAHH 1 Phänotyps, diejenigen des Phänotyps SAHH 3 dagegen kathodal von SAHH 1.

Der in dieser Arbeit erstmals beschriebene Phänotyp 4-1 zeichnet sich durch eine leicht verbreiterte Bande aus, die zwischen den Banden der Phänotypen SAHH 1 und SAHH 2-1 liegt.

3.2 Populationsgenetik

In dieser Studie wurden 237 unverwandte kroatische Individuen untersucht.

Die Allelfrequenzen der Stichprobe wurden mit Hilfe der Genzählmethode ermittelt (Tab. 2).

Die Ergebnisse wurden mit Fisher`s exact test (2.6) berechnet. Die beobachteten Phänotypenhäufigkeiten stimmen mit den Erwartungswerten ($P=0,1283 > P_{\alpha}=0,05$) unter Hardy-Weinberg-Bedingungen gut überein (Tabelle 2).

25 Tabelle 2: Verteilung der SAH-Hydrolase-Phänotypen in der kroatischen Stichprobe

Stichprobe	Genotypen							
	1-1	2-1	3-1	4-1	0-1	0-3	andere	total
Beobachtete Werte	210	15	2	7	2	1	0	237
Erwartete Werte	209,80	14,14	2,83	6,60	2,83	0,02	0,78	237,00

Tabelle 3: Allelfrequenzen in der kroatischen Stichprobe

Genfrequenzen				
SAHH*1	SAHH*2	SAHH*3	SAHH*4	SAHH*0
0,941	0,032	0,006	0,015	0,006

Tab. 2 und 3: Die erwarteten Werte der Genotypen und die Genfrequenzen wurden mit dem Programm Genepop Version 3.2d gemäß dem exakten Fisher Test errechnet.

3.3 Stumme Gene

Bei stummen Genen, bzw. 0-Allelen handelt es sich um Gene, deren Produkt nicht nachweisbar ist (RITTER, 1989). Dies kann verschiedene Ursachen haben. So wird zum Beispiel das Protein synthetisiert, weist jedoch keine Aktivität mehr auf, oder aber das Protein wird überhaupt nicht gebildet (z.B. bei größeren Deletionen, Spleißmutationen u.a.).

Stumme Gene äußern sich in Form von Enzym- oder Proteindefizienzen.

Die Zymogrammtechnik hilft bei der Identifizierung sogenannter stummer Gene. Die genetisch-biochemische Analyse solcher stummen Erbanlagen in Kombination mit normalen Allelen erfolgt mit Hilfe der Densitometrie (Kombination von Elektrophorese und Photometrie).

Die semi-quantitative Auswertung der Zymogramme erfolgt, indem die densitometrische Dichte einer Bande in Bezug zum Proteingehalt der entsprechenden Probe gesetzt wird.

Die densitometrische Bestimmung der Proben erfolgte mit dem Computerprogramm TINA (Version 2.09a), das für jede Bande die zugehörige Enzymaktivität in densitometrischen Einheiten ermittelte. Für jede Probe wurden 50 µl Hämolytats eingesetzt. Der sich in diesen 50 µl Hämolytats befindliche Proteingehalt, unterscheidet sich dabei für jede Probe. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, rechnet man die densitometrischen Einheiten auf 1 mg pro Probe enthaltenem Protein um.

Für die genaue Quantifizierung der heterozygoten Phänotypen mit einem stummen Allel, wurden die Ergebnisse derjenigen Proben miteinander verglichen, deren Banden auf derselben CAF lagen.

Somit wurden jeweils nur Proben miteinander verglichen, die denselben Laufbedingungen in der Stärkegelelektrophorese und den gleichen äußeren Einflussfaktoren bei der Zymogrammtechnik ausgesetzt waren.

Die Verteilung der Aktivitäten in der Stichprobe entspricht der Hypothese einer standardisierten Normalverteilung. Die Werte wurden als signifikant angesehen, wenn $P < P_z$ (einseitiger Test: $\alpha = 0,05$) war, und der entsprechende Proteingehalt nicht außerhalb des Signifikanzniveaus P_z ($\alpha = 0,05$) lag. Aus genotypischer Sicht wurden die Werte als heterozygot für ein stummes SAH-Hydrolase 0-Allel interpretiert, wenn ihre Anteile $< 50\%$ des standardisierten Mittelwertes betragen.

Die Heterozygoten für SAHH*0 zeigten in der Regel nur 30-40% der SAH-Hydrolase-Aktivität des entsprechenden SAH-Hydrolase Phänotyps auf.

Auch die Untersuchung des Hämolysates des von BARIC *et al.* (2004) beschriebenen Jungen, zeigte in der densitometrischen Untersuchung entsprechende Auffälligkeiten.

Die elektrophoretische Position der SAHH-Bande stimmte zwar mit der Position des SAH-Hydrolase Phänotyps 1 überein; die densitometrisch bestimmte Enzymaktivität, die auf Basis der Proteinkonzentration berechnet wurde, zeigte nur 7,5% der Enzymaktivität des Genotyps SAH-Hydrolase 1-1.

BARIC *et al.* (2004) bezeichneten diesen SAH-Hydrolase-Phänotyp als 0* (Abb. 3 C).

Die Bande seines Bruders besitzt elektrophoretisch ebenfalls die Position des Phänotyps SAH-Hydrolase 1. Densitometrisch beträgt auch seine SAH-Hydrolase-Aktivität nur 10% der normalen SAH-Hydrolase-Aktivität. Dies deutet ebenfalls auf einen SAH-Hydrolase-Mangel bei diesem Jungen hin (Abb. 3 C).

Die elektrophoretischen Ergebnisse zeigen bei beiden Probanden eine sichtbare Restaktivität der SAHH in den roten Blutkörperchen, so dass man davon ausgehen kann, dass die vom Vater stammende Mutation zu keiner kompletten Defizienz der SAH-Hydrolase führt.

Die Frequenz des SAH-Hydrolase-0*-Allels in dieser Population ergibt unter Verwendung von Genepop 3.3 0,6 %.

Hieraus ist die erwartete Prävalenz für homozygote Individuen mit SAH-Hydrolase-Mangel ungefähr 1: 30 000.

3.4 Ladungsunabhängige Aktivität der erythrozytären SAH- Hydrolase

Um die Aktivität der erythrozytären SAHH zwischen den Phänotypen zu vergleichen, wurden nur Proben herangezogen, die sich auf derselben CAF befanden. In den Tabellen 4 und 5 sind die Ergebnisse exemplarisch für zwei Zymogramme dargestellt.

Dabei wurden die jeweiligen densitometrischen Einheiten pro mg eingesetztem Proteingehalt je Probe berechnet.

Aus diesen für die einzelnen Phänotypen gemessenen Werten errechnet sich der durchschnittliche Wert mit Standardabweichung für alle Proben innerhalb der CAF.

Die Ergebnisse der Densitometrie lassen keine unterschiedlichen Aktivitäten der untersuchten Genprodukte in Abhängigkeit ihrer Ladungsvariabilität erkennen. Untersuchungen der Hämolysate zeigen, dass alle SAH-Hydrolase-Phänotypen gleiche Aktivitäten aufweisen.

Die gewonnenen Ergebnisse werden zur Qualitätsprüfung der Ergebnisse, die von der photometrischen Messung der SAH-Hydrolase-Aktivität geliefert werden, herangezogen.



Tabelle 4 und 5: Übersicht über die densitometrisch gemessenen Werte der Bandenmuster pro mg eingesetztem Proteingehalt der einzelnen Proben/Phänotypen sowie den Mittelwert mit Standardabweichung der Proben innerhalb eines Zymogramms.

Tabelle 4

Genotypen der SAHH auf Zymogramm 1	1-1	1-1	1-1	3-1	1-1	1-1	1-1	2-1	1-1	1-1	1-1	Mittelwert ± Standardabweichung
Densitometrische Einheiten/mg Proteingehalt	14,6	23,4	15,3	18,7	18,2	20,6	29,2	27,8	20,3	17,6	22,2	20,7 ± 4,5

Tabelle 5

Genotypen der SAHH auf Zymogramm 2	1-1	1-1	4-1	4-1	4-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	Mittelwert ± Standardabweichung
Densitometrische Einheiten/mg Proteingehalt	21,6	16,3	20,4	23,8	21,4	26,5	20,0	21,6	18,1	15,5	17,9	20,3 ± 3,1

3.5 Durchschnittliche Proteinkonzentration der SAH-Hydrolase in der Stichprobe

Aus den Mittelwerten der Proteinkonzentrationen der nach Bradford bestimmten Hämolysate, ergab sich wiederum ein Mittelwert für die durchschnittliche Proteinkonzentration der gesamten Stichprobe. Dieser beträgt $310 \pm 3,0$ mg/ml. Die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen innerhalb der einzelnen Phänotypengruppen weichen mit Ausnahme der SAHH-Phänotypen 4-1, nicht signifikant von diesem Durchschnittswert der gesamten Population ab. Eine Übersicht über die durchschnittliche Proteinkonzentration der einzelnen Phänotypen zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Übersicht über die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen mit Standardabweichung in den einzelnen Phänotypengruppen und in der Gesamtpopulation.

*p < 0,009

Phänotypen SAHH	Durchschnittliche Proteinkonzentration ± Standardabweichung mg/ml
1-1	308,4 ± 3
2-1	318,5 ± 11,7
3-1	340,1 ± 9,9
4-1	352,5 ± 10,6*
alle	310,7 ± 2,9

3.6 Photometrische Messung der Enzymaktivität mit S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat

Das Ziel der Enzymaktivitätsmessung mittels Spektralphotometrie bestand darin, eine quantitative Methode zur Messung der Aktivität der SAH-Hydrolase in Hämolysaten zu etablieren. Bei dieser Methode wurde der gebildete Farbstoff Formazan bei einer Wellenlänge von 576 nm gemessen. Die Methode ist

gegenüber der Stärkegelelektrophorese mit anschließender Zymogrammfarbung schneller durchführbar und liefert quantitative Ergebnisse. In Vorversuchen wurden die optimalen Inkubationsbedingungen und Messzeiten für die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität in Hämolysaten ermittelt.

Jede Probe wurde zu verschiedenen Zeitpunkten unter gleichen Versuchbedingungen mehrmals bestimmt. Aus den Ergebnissen wurde anschließend der Mittelwert der SAH-Hydrolase-Aktivität errechnet.

In Tabelle 7 sind repräsentativ die Messwerte von Proben dargestellt, die zu verschiedenen Zeiten bestimmt wurden.

Tab. 7: Extinktionswerte $\Delta E_{30\text{min}} \cdot 10^{-4}$ von verschiedenen Proben und Phänotypen nach Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Phänotyp	Meßzeitpunkt 1	Meßzeitpunkt 2	Meßzeitpunkt 3
SAHH 1-1	215	83	56
"	271	150	190
"	182	237	413
SAHH 0-1	124	37	111
SAHH 2-1	296	195	273
"	75	140	303
SAHH 4-1	125	24	103
"	107	60	-

Wie aus Tab. 7 hervorgeht, weisen die photometrischen Messungen innerhalb einer Probe sehr große Schwankungen auf, dass sich die Methode der photometrischen Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität aus Hämolysat als unbrauchbar herausstellt. Deshalb wurde auf eine weitere Berechnung und Darstellung der Enzymaktivitäten innerhalb der einzelnen Phänotypengruppen verzichtet.

4 Diskussion

Das Enzym S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (SAH-Hydrolase, EC 3.3.1.1) katalysiert die reversible Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein (SAH) zu Adenosin und L-Homocystein (DE LA HABA und CANTONI, 1959).

Auch wenn das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion weit auf der Seite der Synthese von SAH liegt, überwiegt unter physiologischen Bedingungen die Hydrolyse, da Adenosin und L-Homocystein durch weitere Enzyme aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden.

SAH ist sowohl ein Produkt als auch ein Inhibitor aller S-Adenosylmethionin-abhängigen Transmethylierungsreaktionen. S-Adenosylmethionin (SAM) besitzt als aktivierter Methylgruppendonator (CANTONI und SCARANO, 1954) ein hohes Potential Methylgruppen zu übertragen. Der durch SAM-abhängige Methyltransferasen katalysierte Umbau spielt in vielen biologischen Prozessen eine sehr große Rolle. Er ist ebenso wichtig wie die Phosphorylierung (CANTONI, 1975). Dabei wird eine aktivierte Methylgruppe von SAM auf verschiedene Makro- und Mikromoleküle übertragen.

Um den SAH-Spiegel im Gewebe niedrig zu halten, ist die schnelle Umwandlung von SAH von großer Bedeutung. Da die SAH-Hydrolase als einziges Enzym in Eukaryonten den Abbau von SAH katalysiert (CANTONI und CHIANG, 1980), reguliert die SAH-Hydrolase über ihre Aktivität indirekt alle SAM-abhängigen Methyltransferasen und stellt damit den wichtigsten Rückkopplungsmechanismus dar (DEGUCHI und BARCHAS, 1971; PUGH *et al.*, 1977; HASOBE *et al.*, 1989).

Eingriffe in diesen Stoffwechsel galten bisher als gravierend. So waren Lebewesen wie die homozygote non-agouti Maus, der das SAH-Hydrolase-Gen fehlte, nicht lebensfähig (MILLER *et al.*, 1994).

Dennoch berichteten BARIC *et al.* 2004 über einen einjährigen kroatischen Jungen mit einer nachgewiesenen vererbten Reduktion der SAH-Hydrolase-Enzymaktivität. Dies ist der erste bekannte Fall eines primären SAH-Hydrolase-Mangels. Die in diesem Fall durchgeführten Genanalysen zeigten zwei verschiedene Mutationen, eine im väterlichen und eine im mütterlichen Allel des

SAH-Hydrolase-Gens. Aus diesem Grund ist die Frage nach der Häufigkeit von Defektallelen in der kroatischen Bevölkerung von besonderem Interesse. In dieser Arbeit wurden die Allelfrequenzen der SAHH in einer kroatischen Stichprobe untersucht.

4.1 Morphologie und Lage der Banden im Zymogramm

Untersucht wurde die SAHH aus Erythrozyten von 237 nichtverwandten, phänotypisch gesunden kroatischen Individuen, sowie aus Erythrozyten des von Baric *et al.* 2004 beschriebenen Jungen und seines Bruders. Die Proben wurden wie unter **2.2** beschrieben aufbereitet.

Der genetische Polymorphismus der SAH-Hydrolase in den roten Blutkörperchen des Menschen wurde schon in Populationen aus Japan, Großbritannien, Italien und Deutschland untersucht. Die Darstellung der Phänotypen in den einzelnen Populationen erfolgte mittels Stärkegelelektrophorese (SGE) und anschließender Zymogrammfärbung. Bisher wurden drei verschiedene Allele beschrieben, die autosomal kodominant vererbt werden. Diese Allele wurden als SAH-Hydrolase *1 (SAHH *1), SAH-Hydrolase*2 (SAHH*2) und SAH-Hydrolase*3 (SAHH*3) bezeichnet (BISSBORT *et al.*, 1983; SCOZZARI *et al.*, 1987; ARREDONDO *et al.*, 1989).

Für jede Probe zeigt sich nach SGE und Zymogrammfärbung ein dem Phänotyp entsprechendes Bandenmuster. Jedoch können unterschiedliche Aufbewahrungsbedingungen eine elektrophoretische Lageveränderung des Moleküls der SAH-Hydrolase 1 in Richtung Anode nach sich ziehen. Die dabei entstehende Bande gleicht der Bande des heterozygoten Phänotyps SAHH 2-1. Diese Veränderungen treten auf, wenn Hämolsat bei -20°C gelagert wird, oder wenn es längere Zeit bei 4°C gelagert und dann erneut untersucht wird. Diese Veränderungen sind darauf zurückzuführen, dass es bei der *in vitro* Lagerung der Proben zu Disulfidbrückenbindungen zwischen freien Sulphydrylgruppen des Enzyms SAH-Hydrolase 1 und oxidiertem Glutathion kommt. Dies kann vermieden werden, indem man das Hämolsat bei -80°C lagert, oder eine

Vorbehandlung des Hämolysats mit Mercaptoethanol erfolgt (CORBO *et al.*, 1987; SCOZZARI *et al.*, 1987). Eine Aussage über die Auswirkungen verschiedener Aufbewahrungsbedingungen auf die anderen Phänotypen der SAH-Hydrolase kann nicht getroffen werden, da dazu bisher noch keine Ergebnisse vorliegen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Hämolysate wurden bei -20°C gelagert. Um die Phänotypen in der kroatischen Population eindeutig bestimmen zu können, erfolgte eine Vorbehandlung der Hämolysate nach der von Rocha *et al.* 1988 beschriebenen Methode. Häufiges Auftauen wurde dabei vermieden. Verglichen und beurteilt wurden jeweils die Ergebnisse innerhalb eines Zymogramms, nicht zwischen verschiedenen Zymogrammen. Dies gewährleistet identische Vorbehandlungs- und Untersuchungsbedingungen der betrachteten Proben.

Dabei gleichen die gewonnenen Banden der einzelnen Phänotypen in Lage und Morphologie den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen aus Großbritannien, Deutschland, Italien und Japan (BISSBORT *et al.*, 1983; ARREDONDO *et al.*, 1989; CORBO *et al.*, 1987; SCOZZARI *et al.*, 1987; AKIYAMA *et al.*, 1984).

Die heterozygoten Phänotypen der SAH-Hydrolase (SAHH 2-1, SAHH 3-1) zeichnen sich im Vergleich zum homozygoten Phänotyp durch eine breitere Bande aus, die sich aus der Aufsummation von 5 diskreten Banden ergibt.

Dabei liegen die Heterotetrameren des Phänotyps SAHH 2-1 weiter anodal und die Heterotetrameren des SAHH 3-1 Phänotyps weiter kathodal als die Bande des SAHH 1 Phänotyps. Eine weitere Bande lag zwischen den Banden der Phänotypen SAHH 1 und SAHH 2-1. Dabei handelt es sich um einen neu gefundenen Phänotyp, der mit SAHH 4-1 bezeichnet wurde. Die Zuordnung der Phänotypen erfolgte nach der Einteilung von Bissbort *et al.* (1983) und Corbo *et al.* (1987).

4.2 Populationsgenetik

Das in allen untersuchten Populationen vorherrschende Allel ist SAHH*1. SAHH*2 und SAHH*3 treten mit relativ niedrigen Frequenzen auf. In den Populationen aus Deutschland (BISSBORT *et al.*, 1983), Dänemark (EIBERG *et al.*, 1985), Großbritannien (ARREDONDO *et al.*, 1989) und Italien (CORBO *et al.*, 1987; SCOZZARI *et al.*, 1987) gleichen sich die Genfrequenzen für SAHH*1, SAHH*2 und SAHH*3; Sie liegen bei 0,97; 0,025 und 0,006.

Die Untersuchung der kroatischen Proben ergab folgende Genfrequenzen für die SAH-Hydrolase: SAHH*1= 0,941; SAHH*2=0,032 und SAHH*3=0,006.

Beim Vergleich mit den anderen Populationen liegt auch hier ein genetischer Polymorphismus der SAHH mit multipler Allelie vor.

Der in der kroatischen Population neu gefundene Phänotyp SAHH 4-1 trat mit einer Frequenz von 3,5% auf. Dies entspricht einer Allelhäufigkeit für SAHH*4=0,015. Die in Kroatien beobachtete Verteilung der Genotypen befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

4.3 Stumme Gene

Ist die Leistung eines Gens nicht nachweisbar, wird es als stummes Gen oder als 0-Allel bezeichnet. Dabei kann das Genprodukt zwar vorhanden, aber inaktiv sein, oder es kann ganz fehlen. Stumme Gene manifestieren sich in heterozygoter Form als scheinbare, entgegengesetzte Homozygotie zwischen Elter und Kind, in homozygoter Form als Enzymdefizienz.

Da Baric *et al.* 2004 erstmals von einem kroatischen Jungen mit nachgewiesenem primärem SAH-Hydrolasemangel berichteten, wurde in dieser Arbeit die kroatische Population auf die Häufigkeit von 0-Allelen der SAH-Hydrolase untersucht.

Dies erfolgte durch die densitometrische Auswertung der Zymogramme nach SGE.

Anhand der Intensität der Banden sind Träger eines 0-Allels identifizierbar, wenn standardisierte Bedingungen hinsichtlich Probenaufbereitung, elektrophoretischer Auftrennung und Zymogrammtechnik für alle untersuchten Proben gewährleistet ist.

1. Alle Hämolysate wurden wie unter **4.1** beschrieben vorbehandelt.
2. Für die Berechnung wurden nur diejenigen Proben innerhalb einer Zymogrammfolie herangezogen, um gleiche Lagerungs- und Laufbedingungen zu gewährleisten.

Die Banden der Zymogramme wurden densitometrisch unter Verwendung des Computerprogramms TINA (Version 2.09a) erfasst.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die densitometrischen Einheiten, die von der Bande einer Probe geliefert wurden, in Bezug zu der eingesetzten gesamten Proteinmenge gesetzt. Dieser wurde für jedes Hämolysat einzeln bestimmt (BRADFORD, 1976).

Ausgehend von einer standardisierten Normalverteilung wurde eine Probe als 1-0 Genotyp interpretiert, wenn ihre SAHH-Aktivität im Verhältnis zu den Aktivitäten der ihr entsprechenden homozygoten Phänotypen auf derselben CAF < 50% des Durchschnittswertes betrug.

So konnten drei heterozygote Träger eines 0-Allels identifiziert werden. Zwei tragen den Genotyp SAHH 0-1 und einer den Genotyp SAHH 0-3.

Die erwartete bzw. die beobachtete Frequenz für Träger eines SAHH-0-Allels liegt somit in der kroatischen Population bei ca. 1 %.

Die erwartete Prävalenz für homozygote Individuen mit einer SAH-Hydrolase-Defizienz, liegt in der kroatischen Population bei 1:30 000.

Die Genfrequenz von SAHH*0 in der kroatischen Population beträgt $0,006 \pm 0,005$. Damit entspricht die Häufigkeit der 0-Allele in Kroatien dem von Ritter (1989) veröffentlichten Ergebnis, nach dem die Häufigkeit stummer Gene in zahlreichen Systemen um 0,5% liegt.

Im Durchschnitt zeigt die SAH-Hydrolase-Aktivität im Hämolysat der Träger eines SAH-Hydrolase-0-Allels in der densitometrischen Untersuchung auf Basis des Proteingehalts 30-40% der Aktivität des entsprechenden homozygoten SAH-Hydrolase-Phänotyps. Dennoch erscheinen die Träger phänotypisch unauffällig und gesund.

Das Hämolysat des von Baric *et al.* 2004 als SAHH 0* bezeichneten Jungen, zeigte in der densitometrischen Untersuchung nur 7,5% der Enzymaktivität des normalen SAHH 1-1 Phänotyps.

Damit entspricht der in dieser Studie gewonnene Wert den von Baric *et al.* (2004) veröffentlichten Daten, in denen die in roten Blutkörperchen gemessene SAH-Hydrolase-Aktivität des Jungen nur 5-10% der in diesen Zellen gemessenen Kontrollwerten beträgt. Auch in der Leber und den Fibroblasten des Jungen war die SAH-Hydrolase-Aktivität stark eingeschränkt.

Die Lage der Bande im Zymogramm entsprach dabei dem SAH-Hydrolase-Phänotyp 1.

Von Baric *et al.* (2004) durchgeführten Genanalysen zufolge, besitzt der Junge im SAH-Hydrolase-Gen zwei verschiedene Mutationen im vierten Exon: Ein Stopcodon im mütterlichen Allel und eine Punktmutation im väterlichen Allel. Die mütterliche Mutation führt zu einem signifikant verkürzten Protein, die Mutation im väterlichen Allel zu einem Enzym mit eingeschränkter Funktion.

Von Baric *et al.* wurde die väterliche Punktmutation in 130 Kontrollallelen nicht gefunden. Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung.

Bei der Untersuchung des Hämolysats seines Bruders zeigte sich in der densitometrischen Untersuchung ebenfalls eine Reduktion der SAH-Hydrolase-Aktivität. Diese betrug nur 10% der normalen SAH-Hydrolase-Aktivität, was ebenfalls auf einen SAH-Hydrolase-Mangel hindeutet. Auch seine Bande entsprach in Lage und Morphologie der Bande des SAH-Hydrolase 1 Phänotyps. Dies deutet darauf hin, dass die vom Vater stammende Punktmutation mit großer Wahrscheinlichkeit im SAHH*1-Allel liegt.

Eine Hemmung der SAH-Hydrolase führt in Zellkulturen zu einem erhöhten Gehalt an S-Adenosyl-L-Homocystein. Dadurch kommt eine Hemmung von Methylierungsreaktionen zustande, die sich auch toxisch auf die Zellen auswirken kann (KREDICH und MARTIN, 1977; KREDICH und HERSHFIELD, 1979; GREENBERG *et al.*, 1989; MILLER *et al.*, 1994; HERMES *et al.*, 2004).

Mittlerweile sind mehr als 39 S-Adenosinmethionin-abhängige Methyltransferasen in Säugetieren bekannt (CLARKE und BANFIELD, 2001), die alle durch eine Erhöhung des S-Adenosyl-L-Homocystein mehr oder weniger stark gehemmt werden. Dies verdeutlicht die Komplexität der Folgen einer Störung im SAH-Metabolismus.

So berichteten Gellekink *et al.* 2004 von einem möglichen Zusammenhang zwischen hohen SAH- und SAM-Konzentrationen und/oder einem abnorm niedrigen SAM/SAH-Verhältnis und Erkrankungen des Gefäßsystems beim Menschen.

Mita *et al.* stellten 2001 einen Zusammenhang zwischen Defekten im SAH-Hydrolase-Gen und dem Auftreten von Epilepsie bei Mäusen fest.

MILLER *et al.* berichteten 1994, dass Mäuse mit einem kompletten Verlust des SAH-Hydrolase-Gens nicht lebensfähig sind.

Die Simulation im Rahmen von Tiermodellen bietet mehrere Schwierigkeiten. Zum einen scheint es möglich, dass von einem künstlich erzeugten Defekt im SAH-Hydrolase-Gen noch mehrere andere Gene mitbetroffen sind. Dann wäre es nicht möglich, nachfolgende Störungen dem alleinigen Ausfall der SAH-Hydrolase zuzuschreiben.

Zum anderen ließen sich in von Miller *et al.* 1994 erstellten Modellen mit Mäusen keine Tiere mit einem vollständigen Ausfall des SAH-Hydrolase-Gens anzüchten. Die Embryonen starben schon im Blastozystenstadium ab. Eine Behandlung von kultivierten Embryonen mit einem SAH-Hydrolase-Inhibitor oder mit Metaboliten, die den intrazellulären Gehalt an S-Adenosyl-L-Homocystein erhöhen, führte zu einer Hemmung des Zellwachstums. Dies scheint der Grund für das Absterben der Blastocysten noch vor deren Implantation zu sein. Mäuse, die heterozygot für ein SAH-Hydrolase-0-Allel

waren, zeigten eine Reduktion der SAH-Hydrolase-Aktivität, waren aber lebensfähig.

Die SAH-Hydrolase-Aktivität der heterozygoten Mäuse betrug zwischen 47-57% der in Hämolysaten, in der Leber und in der Milz gemessenen Aktivität.

Die Träger eines Defektallels in dieser Studie sind trotz eingeschränkter SAH-Hydrolase-Aktivität phänotypisch gesund, also 30-40% Restaktivität des Enzyms reichen aus, um eine Entwicklung zu gewährleisten, bei der keine klinisch auffälligen Einschränkungen im Gesundheitszustand auftreten.

Beim Menschen gibt es bisher nur einen bekannten Fall eines nachgewiesenen primären SAH-Hydrolase-Mangels (Baric *et al.*, 2004).

Blutanalysen des von Baric *et al.* (2004) beschriebenen Jungen zeigen neben vielen Auffälligkeiten vor allem eine 30fache Erhöhung von S-Adenosylmethionin, eine 150fache Erhöhung von S-Adenosyl-L-Homocystein und eine Hypermethioninämie. Mit einer SAH-Hydrolase-Restaktivität von 3-10% ist der menschliche Organismus zwar lebensfähig, weist aber erhebliche Defizite im Gesundheitszustand auf. Offensichtlich stellt nur die komplette Enzymdefizienz einen Letalfaktor dar.

Baric *et al.* (2004) berichten von einer Besserung der Symptome des SAH-Hydrolase-Mangels unter Therapie. Unter einer Methioninreduzierten Diät, der zusätzlichen Gabe von Phosphatidylcholin und der Gabe von Kreatinmonohydrat ist bei dem kroatischen Jungen eine Besserung der Symptomatik eingetreten.

4.4 Ladungsunabhängige Aktivität der erythrozytären SAH-Hydrolase

In von Ueland *et al.* (1982) veröffentlichten Untersuchungen zeigt die Säugetier-SAH-Hydrolase bei verschiedenen Spezies beinahe keine Unterschiede im Hinblick auf die molekulare Größe, die Zusammensetzung der Untereinheiten und die Ladung.

Die durchschnittlichen SAH-Hydrolase-Aktivitäten der homozygoten und heterozygoten Phänotypen in der kroatischen Population zeigen keine

signifikanten Unterschiede. Auch die Aktivität des Genproduktes SAHH*4 unterscheidet sich nicht wesentlich davon.

Da sich alle Genprodukte unabhängig von ihrer Ladungsvariabilität, nicht in der durchschnittlichen SAH-Hydrolase-Aktivität unterscheiden, können sie zur Qualitätsprüfung der durch die Photometrie ermittelten Ergebnisse für die durchschnittlichen quantitativen SAH-Hydrolase-Aktivitäten der einzelnen Phänotypengruppen heran gezogen werden.

4.5 Durchschnittliche Proteinkonzentration der SAH-Hydrolase in der Stichprobe

Die Bestimmung erfolgte nach einer von Bradford 1976 entwickelten Methode. Die durchschnittliche Proteinkonzentration für die gesamte Stichprobe beträgt $310 \pm 3,0$ mg/ml. Die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen innerhalb der einzelnen Phänotypengruppen weichen nicht signifikant von diesem Gesamtdurchschnittswert ab. Vergleicht man die Durchschnittswerte der einzelnen Phänotypen untereinander, sind nur die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen des Phänotyps SAHH 1-1 und 4-1 signifikant verschieden.

Da alle Proben gleich aufbewahrt, vorbereitet und gemessen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedliche Probenzahl den signifikanten Unterschied verursacht.

4.6 Enzymaktivitätsmessung mittels Spektralphotometrie und S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat

Ein Ziel der Enzymaktivitätsmessung mittels Spektralphotometrie war der Erhalt von quantitativen Ergebnissen für die Aktivität der SAH-Hydrolase in den Hämolysaten. Dabei ging es sowohl um die Messung der durchschnittlichen SAH-Hydrolase-Aktivitäten der Gesamtpopulation, als auch die, der einzelnen Phänotypen und der Träger eines stummen Allels.

Hierbei kam die in Abschnitt **2.4.1** beschriebene Reaktion zum Einsatz, unter Verwendung von S-Adenosyl-L-Homocystein als Substrat.

In Vorversuchen wurden die Versuchsbedingungen vor und während der Messung optimiert. Dabei wurde für die Messung die einzusetzende Menge an Hämolyt festgelegt, die Aufbereitung der Proben vor der Messung optimiert, die Hilfsenzyme entsprechend zusammengesetzt und separat auf Eis gelagert, die Ansätze für die Inkubationslösungen frisch zubereitet, die Inkubation des Versuchsansatzes unter regelmäßigem Durchmischen im Dunkeln durchgeführt, die Menge an zuzugebendem S-Adenosyl-L-Homocystein zum Starten der Reaktion bestimmt und die Dauer der Messung der Reaktion angepasst. Nach der Auswertung mehrerer Testläufe wurden die einzelnen Proben dann wie in **2.4.1.2** beschrieben photometrisch bestimmt. Bei den Mehrfachbestimmungen zeigten sich zwischen den Ergebnissen der einzelnen Proben derartige Schwankungen, dass eine Auswertung der Daten nicht möglich war, also sich der angewandte Versuchsansatz in der hier durchgeführten Form nicht eignet.

Da auf die exakte Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen vor und während der Messung geachtet wurde, könnte das Problem am wahrscheinlichsten mit der Lagerung und der Alterung der Proben zusammenhängen.

Da die Hämolytate mehrfach gemessen wurden, waren sie für unterschiedlich lange Zeiträume eingefroren und wurden mehrmaligen Auftau- und Einfrierprozessen unterzogen. Auch die Ergebnisse von Baric *et al.* (2004) für die SAH-Hydrolase-Aktivität im Hämolyt des kroatischen Jungen betragen nach dem erneuten Auftauen des Hämolytats nur noch 57-71% der in den Erstbestimmungen gemessenen Werten.

Das Auftauen scheint somit einen großen Einfluß auf die Aktivität der SAH-Hydrolase im Hämolyt zu haben. Davon waren alle Phänotypen in gleichem Maße betroffen.

Weitere Ursachen könnten in Zusammenhang mit der Herstellung des Hämolytats stehen. Wie in **2.2** beschrieben, wird bei der Herstellung des Hämolytats aus dem Sediment roter Blutkörperchen Toluol zum Emulgieren verwendet. Dadurch werden die lipophilen Teile der Zellmembran zusammen

mit den hydrophoben Proteinanteilen in Form eines Pellets gebunden, so dass das Hämolyolat nur noch die sich in Lösung befindlichen Proteine enthält. Es besteht die Möglichkeit, dass die in der Probe enthaltene SAH-Hydrolase durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren unterschiedlich stark am Pellet anhaftet. Dies würde ebenfalls zu Schwankungen bei der Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität führen.

Da bei der photometrischen Messung nur ein kleines Probenvolumen zum Einsatz kam, könnte der darin enthaltene Proteinanteil rein zufällig variieren. Durch ständiges Vortexen wurde zwar versucht, den Proteinanteil so gleichmäßig wie möglich in der Probe zu verteilen, die Menge des eingesetzten Volumens dagegen war nicht größer wählbar, da die Hämoglobinkonzentration die photometrische Bestimmung limitiert.

Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass das Hämolyolat in der Küvette sedimentiert ist, da die Aktivität der SAHH über 30 min gemessen wurde.

Die Spektralphotometrie erwies sich also für die Qualitätsprüfung der Densitometrie als ungeeignet.

Die Methode der Spektralphotometrie zur Messung der quantitativen SAH-Hydrolase-Aktivität scheint erst zuverlässig durchführbar, wenn ein Weg gefunden wird, die mit der Lagerung der Proben einhergehende Beeinträchtigung des Enzyms zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Der Verlust der SAH-Hydrolase-Aktivität galt bisher als mit dem Leben nicht vereinbar. Baric *et al.* berichteten 2004 erstmals von einem kroatischen Jungen mit primärem SAH-Hydrolase-Mangel, der von seinen Eltern zwei verschiedene Defektallele geerbt hat.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es in der kroatischen Bevölkerung eine Häufung von Defektallelen der SAH-Hydrolase gibt.

- Die Untersuchung einer Stichprobe von 237 unverwandten Kroaten aus Zagreb mittels SGE und anschließender Zymogrammfarbung ergab folgende Genfrequenzen: SAHH*1= 0,941; SAHH*2=0,032 und SAHH*3=0,006.

Zusätzlich wurde ein neuer Phänotyp der SAH-Hydrolase, SAHH 4-1, gefunden. Das Allel SAHH*4 tritt mit einer Genfrequenz von 0,015 auf.

Die Verteilung der SAHH-Genotypen befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

- Im beobachteten Kollektiv befanden sich drei phänotypisch gesunde Träger eines Defektallels, deren SAH-Hydrolase nur 30-40% der Aktivität ihres entsprechenden SAH-Hydrolase-Phänotyps zeigte. Die Frequenz stummer Allele, SAHH*0, in der kroatischen Population beträgt 0,6%.
- In der densitometrischen Untersuchung der Zymogramme auf Basis des Proteingehalts zeigten sich für die einzelnen Phänotypen keine Unterschiede in der SAH-Hydrolase-Aktivität.
- Die quantitative Enzymaktivität der SAH-Hydrolase konnte mittels Spektralphotometrie nicht bestimmt werden, da innerhalb der Ergebnisse der einzelnen Proben zu große Schwankungen auftraten.

6 Literaturverzeichnis

1. Akiyama K, Nakamura S, Abe K (1984) Gene frequencies of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in a Japanese Population. *Hum Genet* **68**, 191-192.
2. Arnold G (1992) Subtyping des Faktor XIIIa in der Isoelektrischen Fokussierung. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Universität Tübingen.
3. Arredondo-Vega FX, Charlton JA, Edwards YH, Hopkinson DA, Whitehouse DB (1989) Isoenzyme and DNA analysis of human S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (AHCY). *Ann Hum Genet* **53**, 157-167.
4. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH (2004) S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *PNAS* **101**, 4234-4239.
5. Bissbort S, Bender K, Wienker TF, Grzeschick KH (1983) Genetics of Human S-adenosylhomocysteine hydrolase. A new polymorphism in man. *Hum Genet* **65**, 68-71.
6. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
7. Cantoni GL, Scarano E (1954) The formation of S-adenosylhomocysteine in enzymatic transmethylation reactions. *J Am Chem Soc* **76**, 4744.
8. Cantoni GL, Chiang PK (1980) The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. In "Natural sulfur compounds: novel biochemical and structural aspects". (Eds D Cavalli and GaZV Gaull) pp. 67-80. (Plenum Press: New York)
9. Clarke S, Banfield K (2001) S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In "Homocysteine and Health Disease ". (Eds R Carmel and D Jacobsen) pp. 63-78. (Cambridge University Press)

10. Corbo RM, Palmarino R, Schiattarella E, Giannini MA, Scacci R (1987) Polymorphism of S-adenosylhomocysteine hydrolase in Italy. *Hum Hered* **37**, 186-189.
11. Coulter-Karis DE, Hershfield MS (1989) Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Ann Hum Genet* **53**, 169-175.
12. Creedon KA, Rathod PK, Wellems TE (1994) Plasmodium falciparum S-adenosylhomocysteine hydrolase. cDNA identification, predicted protein sequence, and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 16364-16370.
13. De la Haba G, Cantoni G (1959) The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem* **234**, 606-608.
14. Døskeland SO, Ueland PM (1982) Comparison of some physiochemical and kinetic properties of S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine liver, bovine adrenal cortex and mouse liver. *Biochem Biophys Acta* **708**, 185-193.
15. Eiberg H, Mohr J (1985) Linkage data concerning the ADA-AHCY relationship. *Cytogenet Cell Genet* **40**, 622.
16. Finkelstein JD, Harris B (1975) Methionine metabolism in mammals: S-adenosylhomocysteine hydrolase in rat intestinal mucosa. *Arch Biochem Biophys* **171**, 282-286.
17. Gaull GE, Bender AN, Vulovic D, Tallan HH, Schaffner F (1981) Methioninemia and myopathy: a new disorder. *Ann Neurol* **9**, 423-432.
18. Gellekink H, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, Blom HJ (2004) Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *Hum Genet* **12**, 942-948.
19. Gomi T, Ishiguro Y, Fujioka M (1985) S-adenosylhomocysteinase from rat liver. Evidence for structurally identical and catalytically equivalent subunits. *J Biol Chem* **260**, 2789-2793.
20. Gomi T, Date T, Ogawa H, Fujioka M, Aksamit RR, Backlund PS, Cantoni GL (1989) Expression of rat liver S-adenosylhomocysteinase cDNA in *Escherichia coli* and mutagenesis at the putative NAD binding site. *J Biol Chem* **264**, 16138-16142.

21. Greenberg ML, Chaffee S, Hershfield MS (1989) Basis for resistance to 3-deazaaristeromycin, an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, in human B-lymphoblasts. *J Biol Chem* **264**, 795-803.
22. Guranowski A, Pawelkiewicz J (1977) Adenosylhomocysteinase from yellow lupin seeds. *Eur J Biochem* **80**, 517-523.
23. Guranowski A, Jakubowski H (1987) Adenosylhomocysteinase from Yellow Lupine. *Methods Enzymol* **143**, 430-434.
24. Hermes M, Osswald H, Mattar J, Kloor D (2004) Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp Cell Res* **294**, 325-334.
25. Hermes M (2004) Die Rolle der S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase bei der Regulation der DNA- und RNA-Methylierung sowie der Genexpression und Apoptose. Dissertation, Universität Tübingen.
26. Hershfield MS, Francke U (1982) The human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase are syntenic on chromosome 20. *Science* **216**, 739-742.
27. Jakubowski H, Guranowski A (1981) S-Adenosylhomocysteine hydrolase from yellow lupin seeds. Stoichiometry and reactions of the enzyme-adenosine complex. *Biochemistry* **20**, 6877-6881.
28. Katsunori A, Nakamura S, Abe K (1984) Gene frequencies of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in a Japanese population. *Hum Genet* **68**, 191-192.
29. Kawalleck P, Plesch G, Hahlbrock K, Somssich IE (1992) Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells of *Petroselinum crispum*. *PNAS* **89**, 4713-4717.
30. Kloor D, Fumic K, Attig S, Tete M, Osswald H, Baric I, Tomiuk J, Kömpf J (2004) Studies of S-adenosylhomocysteine-hydrolase polymorphism in a Croatian population. *J Hum Genet* **51**, 21-24.
31. Knudsen RC, Yall I (1972) Partial purification and characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *J of Bacteriology* **112**, 569-575.
32. Kredich NM, Hershfield MS (1979) Phospholipid methylation in macrophages is inhibited by chemotactic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 2450-2454.

33. Kredich NM, Martin DJ (1977) Role of S-adenosylhomocysteine in adenosine-mediated toxicity in cultured mouse T lymphoma cells. *Cell* **12**, 931-938.
34. Lüttke A (2003) Einfluss des Kofaktors NAD⁺/NADH der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase auf die Adenosinbindung. Med. Dissertation, Universität Tübingen.
35. Magnuson NS, Decker DM, Perryman LE (1983) S-adenosylhomocysteine hydrolase activity in horses, *Equus caballus*, with severe combined immunodeficiency. *Comp Biochem Physiol* **75 B**, 113-117.
36. Miller MW, Duhl DM, Winkes BM, Arredondo-Vega F, Saxon PJ, Wolff GL, Epstein CJ, Hershfield MS, Barsh GS (1994) The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ancy) gene. *EMBO J* **13**, 1806-1816.
37. Mita T, Kawazu I, Hirano H, Ohmori O, Janjua N, Shibata K (2001) E1 mice epilepsy shows genetic polymorphism for S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Neurochem Int* **38**, 349-357.
38. Mohandas T, Sparkes RS, Suh EJ, Hershfield MS (1984) Regional localization of the human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase (cen→q 131) and adenosine deaminase (q 131→qter) on chromosome 20. *Hum Genet* **66**, 292-295.
39. Petroktistis F (1998) Charakterisierung der SAH-Hydrolase Aktivität in Richtung der Synthese. Med. Dissertation, Tübingen.
40. Prasad SS, Starr TV, Rose AM (1993) Molecular characterization in the dpy-14 region identifies the adenosylhomocysteine hydrolase gene in *Caenorhabditis elegans*. *Genome* **36**, 57-65.
41. Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* **86**, 248-249.
42. Richter S (1995) Strukturerefordernisse von Adenosin-Analoga für die Bindung an hochgereinigte S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase. Med. Dissertation, Universität Tübingen.
43. Ritter H (1989) Entwicklung des Menschen. In „Biologie des Menschen“. (Mörke KD, Betz E und Mergenthaler W). (Quelle&Meyer Verlag: Heidelberg, Wiesbaden)
44. Rocha J, Amorim A, Kömpf J, Ritter H (1988) Demonstration of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Polymorphism by Means of Isoelectric Focusing. *Ärztl Lab* **34**, 283-284.

45. Scheil HG, Borner E (1985) S-Adenosylhomocysteinhydrolase-Phänotypen und Genfrequenzen in einer westdeutschen Population. *Ärztl Lab* **31**, 157-158.
46. Scozzari R, Sellitto D, Tassone F, Cerroni L, Aliquo MC (1987) Family and population studies of SAHH and ADA polymorphisms. A possible pitfall in the ascertainment of SAHH electrophoretic phenotypes. *Ann Hum Genet* **51**, 295-302.
47. Sganga MW, Aksamit RR, Cantoni GL, Bauer CE (1986) Mutational and nucleotide sequence analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Rhodobacter capsulatus*. *PNAS* **89**, 6328-6332.
48. Shimizu S, Shiozaki S, Ohshiro T, Yamada H (1984) Occurrence of S-adenosylhomocysteine hydrolase in prokaryote cells. *Eur J Biochem* **141**, 385-392.
49. Smithies O (1955) Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in serum proteins of normal human adults. *Biochemical J* **61**, 629-641.
50. Strauß K (2000) Charakterisierung einer 5'-Nucleotidase aus der Rattenniere. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Universität Tübingen.
51. Trezzini GF, Horrichs A, Somssich IE (1993) Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Mol Biol* **21**, 385-389.
52. Ueland PM, Berge RK, Sæbø J, Farstad M (1979) S-adenosylhomocysteine hydrolase in human and rat liver is localized to the cytosol fraction of the tissue homogenate. *FEBS Letters* **101**, 184-186.
53. Ueland PM (1982) Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Rev* **34**, 223-253.
54. Walker RD, Duerre JA (1975) S-adenosylhomocysteine metabolism in various species. *Can J Biochem* **53**, 312-319.
55. Wolfe MS, Borchardt RT (1991) S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase as a Target for Antiviral Chemotherapy. *J Med Chem* **34**, 1521-1530.
56. Yongbo H, Junichi K, Yafei H, Tomoharu G, Hirofumi O, Yoshimi T, Motoji F, Fusao T (1999) Crystal structure of s-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry* **38**, 8323-8333.

Danksagung

- Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Doris Kloor. Nicht nur für die Bereitstellung des Themas und die geduldige Einweisung in die Arbeitstechniken, sondern auch für die optimale Betreuung, die uneingeschränkte Unterstützung und die stete Bereitschaft zu Beratung und Gespräch.
- Herrn Prof. Dr. Kömpf danke ich sehr für seine geduldige Hilfe beim Erlernen von Arbeitstechniken, die Bereitstellung von Daten und seine stete Bereitschaft zu Denkanstößen bei der Datenauswertung.
- Ich danke Frau Dr. Fumic und dem Krankenhauszentrum von Zagreb für die freundliche Kooperation.
- Liebe Renate, ich danke Dir für Deine Hilfe und Deinen unermüdlichen Einsatz bei allen Fragen, Problemen und Arbeitstechniken im Labor und für die gute Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Proben.
- Liebe Marina, ein riesengroßes Dankeschön an Dich, für die Hilfe rund um den Computer und Deine zahlreichen wertvollen Tipps bei der Gestaltung.
- Liebe Doris, Renate, Marina und Frau Delabar. Vielen Dank für die tolle Atmosphäre im Labor! Es wird mir eine schöne und unvergessliche Zeit bleiben.
- Herrn Sebastian Attig danke ich für die Hilfe und die gute Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Proben.
- Herrn Prof. Dr. Oßwald und allen anderen Mitarbeitern des pharmakologischen Institutes danke ich für die angenehme Zeit während der Durchführung meiner Doktorarbeit.
- An dieser Stelle möchte ich mich auch von ganzem Herzen bei meiner ganzen Familie bedanken. Mama und Paps, ohne Euch wäre dies alles nie möglich gewesen. Ihr habt mich immer ermutigt und an mich geglaubt. Ich liebe Euch und danke Euch von Herzen.
- Othniel, Du bist der beste Bruder, den man sich nur wünschen kann!
- Sarah, Andrea und Sole, Ihr habt immer daran geglaubt, dass diese Arbeit fertig wird. Ich danke Euch so sehr für Eure kostbare Freundschaft.
- Lieber Hermann, mein Doktor m.c., Danke für Deine Hilfe, Deine Liebe und dafür, dass Du so stolz auf mich bist! - Psalm 40, 6 + Psalm 30, 13 -

Lebenslauf

Name: Thomas, geb. Tete
Vorname: Martina Akua Sitsofe
Geburtsort: Stuttgart
Geburtstag: 01. April 1981

Schulischer Werdegang:

1987-1991 Silcherschule Fellbach, -Grundschule-
1991-2000 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Fellbach,
Abitur Juni 2000

Studium:

Seit 2000 Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 2002 Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
August 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
in Tübingen
Seit Februar 2005 Promotion bei Frau Priv. Doz. Dr. Doris Kloor,
Abt. Pharmakologie und Experimentelle
Therapie, am Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der Universität Tübingen
mit dem Thema: „Genfrequenzen und
Enzymaktivität der S-Adenosyl-L-
homocystein-Hydrolase in einer
kroatischen Population“
April 2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
In Tübingen
01. Juni 2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
in Stuttgart