

Verdieping van de kennis van het een-koolstof(1C-)metabolisme

Y.M. Smulders, D.E.C. Smith, R.M. Kok, A.M.W. Spijkerman, C. Jakobs, C.D.A. Stehouwer

Hyperhomocysteinemie is een bekende risicodeterminant voor hart- en vaatziekten. Het is onduidelijk of homocysteïne zelf direct vasculaire schade veroorzaakt. Homocysteïne is namelijk slechts een van vele componenten in een complex metabool netwerk: het een-koolstof(1C-)metabolisme. Het beschreven onderzoek richt zich op andere, deels aan homocysteïne gerelateerde componenten van het 1C-metabolisme. In dit artikel worden S-adenosylhomocysteïne (SAH), S-adenosylmethionine (SAM), DNA-methylering en folaatmetabolisme besproken. Het onderzoeksveld staat in de kinderschoenen. Nieuw ontwikkelde analytische technieken kunnen hun weg in toegepast wetenschappelijk onderzoek vinden.

NHS-projectnummer 2001T44

Prof. dr. Y.M. Smulders, afdeling Inwendige Geneeskunde en Institute for Cardiovascular Research (IcaR-VU), VU medisch centrum, Amsterdam.

MSc D.E.C. Smith, ing. R.M. Kok, Metabool Laboratorium, afdeling Klinische Chemie, VU medisch centrum, Amsterdam.

Dr. A.M.W. Spijkerman, Instituut voor Extramuraal Geneeskundig Onderzoek (EMGO), VU medisch centrum, Amsterdam.

Prof. dr. C. Jakobs, Institute for Cardiovascular Research (IcaR-VU) en Metabool Laboratorium, afdeling Klinische Chemie, VU medisch centrum, Amsterdam.

Prof. dr. C.D.A. Stehouwer, afdeling Inwendige Geneeskunde, Academisch Ziekenhuis Maastricht.

Een verhoogd homocysteïne is een aangetoonde cardiovasculaire risicodeterminant. Voor elke 3 $\mu\text{mol/l}$ stijging van de homocysteïneconcentratie neemt het relatieve risico op coronaire aandoeningen toe met 11% en het risico op een herseninfarct met 19%.¹ Het is onzeker of homocysteïne zelf de oorzaak van dit verhoogde risico is of slechts een ‘innocent bystander’. Een evident pathobiologisch mechanisme is namelijk nog niet gevonden en recente interventietrials hebben vooralsnog geen nut van homocysteïneverlagende therapie aangetoond.²⁻⁴ Een alternatieve verklaring is dat hyperhomocysteinemie zelf niet schadelijk is, maar uiting is van een verstoord cellulair een-koolstof(1C-)metabolisme.

Het 1C-metabolisme is geïllustreerd in figuur 1. Homocysteïne wordt gevormd doordat het aminozuur methionine een methylgroep afstaat in een van de vele bestaande transmethyleringsreacties. Het hierdoor gevormde homocysteïne kan worden afgebroken tot cysteïne of kan een methylgroep terugkrijgen om opnieuw tot methionine te worden gevormd. De transmethyleringsreacties zijn dermate belangrijk voor het organisme dat het van belang is dat voldoende homocysteïne wordt teruggevormd tot methionine. Een centrale rol hierbij wordt ingenomen door folaat.

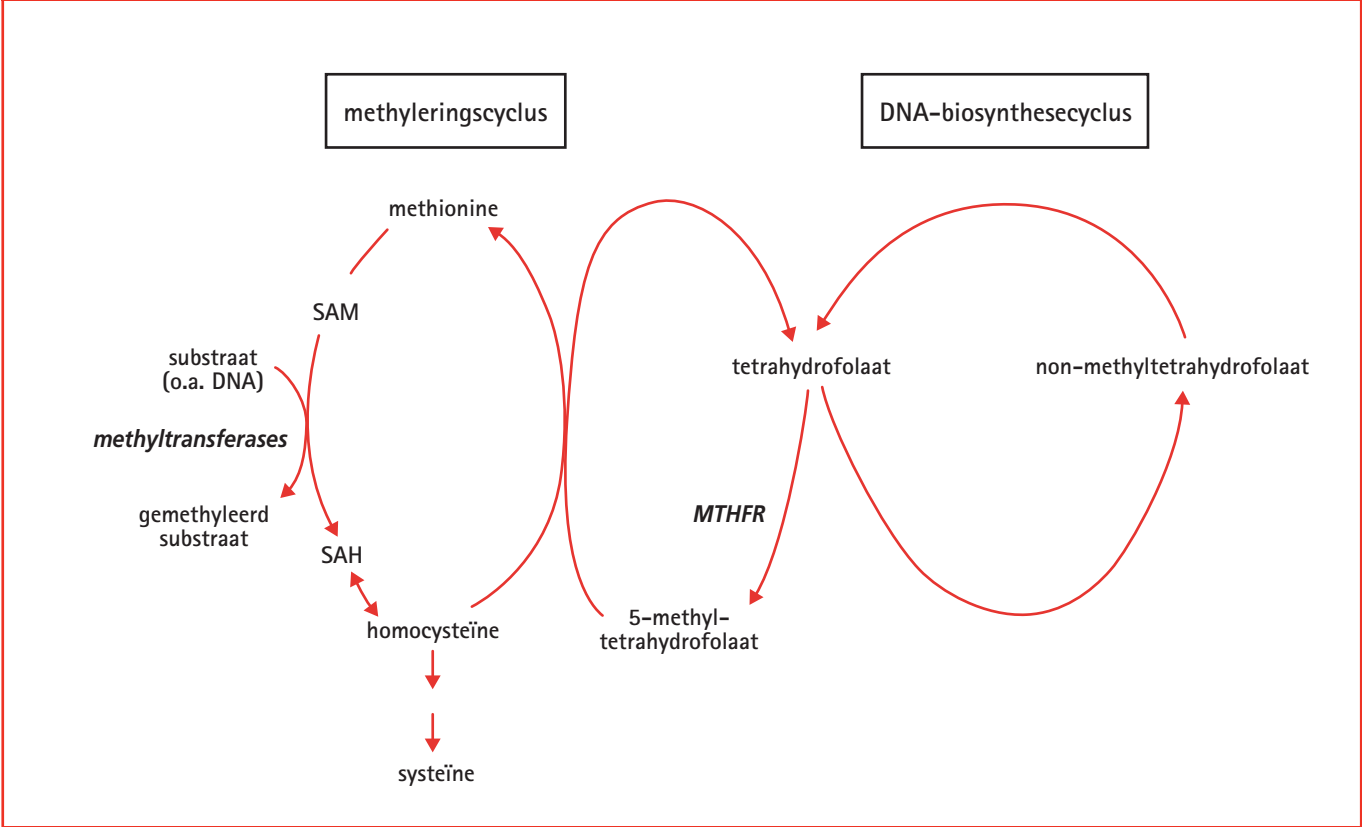
Folaat heeft een unieke functie, namelijk het uitdelen van 1C-groepen aan diverse doelmoleculen. Om die functies te kunnen vervullen bestaat cellulair folaat in verschillende vormen. Methylfolaat bijvoorbeeld doneert een methylgroep aan homocysteïne, waarbij vitamine B₁₂ een belangrijke cofactor is. Andere folaatvormen, bijvoorbeeld methyleen- en formylfolaat spelen een rol bij de opbouw van DNA en RNA. Het *foliumzuur* is een synthetisch provitamine, dat na absorptie nog reductie en 1C-substitutie moet ondergaan alvorens het biologische functies kan uitoefenen.

De complexiteit van het 1C-metabolisme en de veelheid aan functies die het heeft, roept de vraag op of we ons bij het onderzoek naar hart- en vaatziekten terecht hoofdzakelijk alleen op

Figuur 1.

Intracellulair 1C-metabolisme.

Methionine wordt via S-adenosylmethionine (SAM) omgevormd tot S-adenosylhomocysteïne (SAH). De overgang van SAM naar SAH gaat gepaard met het doneren van een methylgroep aan een veelheid van verschillende doelmoleculen, waaronder DNA. Het resulterende SAH wordt verder gemetaboliseerd tot homocysteïne. Homocysteïne kan vervolgens via de transsulfureringsroute worden afgebroken tot cysteïne (cofactor: vitamine B₆), of kan via de remethyleringsroute weer teruggevormd worden tot methionine (cofactor: vitamine B₁₂). In de remethyleringsroute is gereduceerd methylfolaat de methylgroepdonor. Via een tussenstap kan het folaat 'gerecycled' worden tot methylfolaat, waarbij onder andere de activiteit van het enzym methyleen-tetrahydrofolaatreductase (MTHFR) van belang is. Alternatief kan het folaat, in de vorm van gereduceerde 'non-methylfolaten' (met name methenyl- en formyltetrahydrofolaat) worden ingezet om 1C-groepen te doneren in het belang van DNA-synthese.



homocysteïne hebben gericht. Van enkele moleculen in de nabijheid van homocysteïne, zoals S-adenosylmethionine (SAM) en S-adenosylhomocysteïne (SAH), is gesuggereerd dat deze een sterke invloed op hart- en vaatziekte hebben.⁵ Ook een laag folaat zelf lijkt, onafhankelijk van homocysteïne, een risicodeterminant te zijn.^{6,7}

De kennis over het 1C-metabolisme is nog erg fragmentarisch, onder andere omdat het ontbreekt aan goede analytische instrumenten. Het doel van het onderzoek was om deze instrumenten te ontwikkelen en een begin te maken met het onderzoeken van de rol van componenten van het 1C-metabolisme bij het ontstaan van hart- en vaatziekten.

Methoden

Voor de ontwikkeling van nieuwe analytische methoden is gebruikgemaakt van vloeistofchromatografie (LC) in combinatie met massaspectrometrie (MS). Hierbij worden stoffen gescheiden met chromatografie en vervolgens gemeten op basis van hun

gewicht met tandem-massaspectrometrie (MS/MS). Het voert te ver om deze precieze, maar zeer complexe methodiek in detail te bespreken.

De ontwikkelde meetmethoden zijn gebruikt voor analyses in diverse onderzoeken, waarvan wij er enkele zullen bespreken. In de eerste plaats is hierbij gebruikgemaakt van gezonde vrijwilligers, met name in het kader van validatie van de meetmethoden. Voorts zijn monsters geanalyseerd van de Hoornstudie, een bevolkingsonderzoek in Noord-Holland met een sterke nadruk op gestoord glucosemetabolisme en de epidemiologie van hart- en vaatziekten.⁸

Resultaten

Analytische methoden

Als eerste is een LC-MS/MS-methode ontwikkeld voor de bepaling van SAM en SAH, zowel in plasma als in erythrocyten.⁹ SAM en SAH (zie figuur 1) spelen een belangrijke regulatoire rol in de methyleringscapaciteit.

De grootste uitdaging bestond uit het ontwikkelen van een meetmethode voor de diverse cellulaire folaatverbindingen.¹⁰ Wisselende molecuulgewichten en stabiliteit van de diverse folaatverbindingen vormden hierbij obstakels. Uiteindelijk lukte het de groepen folaatverbindingen die men vanuit fysiologisch opzicht wil kunnen onderscheiden, te stabiliseren in zowel plasma-, erythrocyten- als leukocytenmonsters. Hierdoor kunnen de volgende folaatgroepen van elkaar worden onderscheiden: gereduceerd methylfolaat, gereduceerd non-methylfolaat en foliumzuur.¹⁰

Tenslotte is ruim aandacht besteed aan een methode om de adequaatheid van de methyleringscyclus te meten. Immers, een centraal doel van het 1C-metabolisme is het mogelijk maken van de vele transmethyleringsreacties, en het ligt voor de hand te meten hoe effectief dit proces verloopt. Hiertoe is een LC-MS/MS-methode ontwikkeld die de totale methyleringsgraad van DNA meet. DNA-methylering bestaat in feite uit methylering van cytosine-basen en speelt een belangrijke rol in regulatie van genexpressie (zogenoemde 'epigenetische regulatie'¹¹). Wij zijn erin geslaagd ook hiervoor een LC-MS/MS-methode te ontwikkelen.¹²

S-adenosylmethionine en S-adenosylhomocysteïne

In een eerste onderzoek vonden wij dat plasmaconcentraties van SAM en SAH niet gerelateerd waren aan de B-vitaminestatus. Wel bestond er een negatieve correlatie tussen homocysteïne en de SAM/SAH-ratio, die wordt beschouwd als een belangrijke determinant van de methyleringscapaciteit.¹³ Later onderzoek suggereerde dat SAM bij niet-diabetische personen, blijkens een geringere intimamediadikte, een beschermende invloed heeft op het vaatstelsel.¹⁴ Ook de vaatfunctie leek positief te worden beïnvloed door SAM.⁸ Beide onderzoeken ondersteunen de hypothese dat een adequate methyleringscapaciteit van belang is voor de vasculaire functie en de structuur. Ten slotte is onderzoek gedaan naar de rol van SAM en SAH bij het ontstaan van een verstoord 1C-metabolisme bij nierfalen, waaruit naar voren kwam dat de verhoogde SAH-concentraties mogelijk een centrale rol spelen bij deze metabole ontregeling.¹⁵

Cellulaire folaatfracties

In circulerend plasma bestaat folaat vrijwel exclusief uit gereduceerd methylfolaat. Een uitzondering hierop treedt op bij gebruik van foliumzuursupplementen, waarbij ongemetaboliseerd foliumzuur (dat geen fysiologische functie vervult) in plasma kan worden gevonden.^{16,17} In rode bloedcellen daarentegen wordt bij ongeveer 20% van gezonde personen accumulatie van significante hoeveelheden non-methylfolaten gevonden. Het blijkt dat accumulatie van non-methylfolaten vooral afhankelijk is van een polymorfisme in het enzym methyleentetrahydrofolaatreductase (MTHFR).¹⁰ Daarnaast is aangetoond dat naarmate de totale folaatstatus toeneemt, het aandeel non-methylfolaten stijgt.¹⁸ De klinische relevantie van deze bevindingen is nog onduidelijk. Aangezien de metabole functie van methylfolaat (omvorming van homocysteïne tot methionine) een geheel andere is dan die van non-methylfolaat (aanlevering van DNA- en RNA-bouwste-

nen), is een belangrijke rol in de humane cellulaire (patho)fysiologie goed mogelijk.

Ten slotte bleek het met deze meettechniek mogelijk een oude hypothese (de 'methyl-trap-hypothese') omtrent het ontstaan van DNA-synthesestoornissen bij vitamine-B₁₂-deficiëntie te ondersteunen.¹⁹ Deze hypothese verklaart het ontstaan van DNA-synthesestoornissen uit een veranderde cellulaire folaatstofwisseling, maar dit kon bij mensen nimmer eerder aangetoond worden.

DNA-methylering

Bij gezonde vrijwilligers bleek de methyleringsgraad van DNA uit leukocyten zich binnen nauwe grenzen te bevinden.¹² Opmerkelijk was dat folaat en homocysteïne geen relatie vertoonden met de DNA-methyleringsstatus. Wel bleek een interactie te bestaan tussen DNA-methylering, leeftijd en hetzelfde MTHFR-genotype dat ook een veranderde folaatfractieverdeling in erythrocyten geeft. De DNA-methyleringsgraad nam af met de leeftijd, maar dit effect bleek alleen significant bij vrijwilligers met het MTHFR 677TT-genotype (12-15% van de bevolking).¹² Al eerder werd verondersteld dat afnemende DNA-methylering een rol speelt bij verouderingsziekten, waaronder cardiovasculaire aandoeningen, maar dat dit samenhangt met dit genetische polymorfisme is niet eerder beschreven.

Discussie en conclusie

De beschreven onderzoekslijn heeft als thema de rol van 1C-metabolisme bij het ontstaan van hart- en vaatziekten. De focus komt hierbij op andere moleculen dan homocysteïne te liggen. Zo ondersteunen de onderzoeken een rol voor SAM en SAH. In hoeverre de cellulaire verdeling van folaatfracties samenhangt met ziekte wordt onderzocht. Wat betreft de associatie tussen globale DNA-methylering en cardiovasculaire ziekte suggereren de eerste onderzoeken een verband,²⁰ maar ook dit dient nader te worden uitgezocht. Niet alleen de associatie met ziekte is van belang, ook de determinanten van bovengenoemde variabelen dienen nader te worden bestudeerd. Inmiddels zijn erythrocyt-folaatfracties en DNA-methylering in enkele observationele cohortstudies en interventiestudies gemeten. Uit deze gegevens worden veel nieuwe data met betrekking tot determinanten en ziekteassociaties verwacht.

Indien het verdere onderzoek bevestigt dat genoemde variabelen samenhangen met hart- en vaatziekten, dan zal een volgende stap zijn deze variabelen proberen te beïnvloeden met farmacologische of voedingsinterventies. Het toedienen van B-vitaminen is hierbij een voor de hand liggende, maar niet de enige optie. Het is bijvoorbeeld nog maar de vraag of B-vitaminesuppletie de DNA-methyleringsgraad zal verhogen. Zo heeft recent onderzoek van onze groep aangetoond dat behandeling met B-vitaminen bijvoorbeeld niet in staat is om de plasmaconcentratie van een andere aan homocysteïne gerelateerde cardiovasculaire risicofactor, asymmetrisch dimethylarginine (ADMA), te verlagen, terwijl men dit op grond van het ADMA-metabolisme wel zou kunnen verwachten.²¹ Recente interventieonderzoeken hebben geen positief kortetermijneffect van hoge doses B-vitaminen op hart-

en vaatziekten laten zien, zodat behalve naar andere doseringen, andere doelpopulaties en andere behandeltermijnen ook naar alternatieve interventiemodaliteiten moet worden gekeken. Alleen zo wordt wetenschappelijk gezien recht gedaan aan het sterke, onafhankelijke risicovoorspellende effect van stoornissen in het IC-metabolise voor het ontstaan van hart- en vaatziekten. ■

Wat is er al bekend over dit onderwerp?

- Hyperhomocysteinemie voorspelt hart- en vaatziekten.
- Homocysteïne maakt deel uit van een complex metabool netwerk.

Wat dit onderzoek bijdraagt

- Diverse aan homocysteïne gerelateerde metabolieten kunnen nu goed worden gemeten.
- S-adenosylmethionine en S-adenosylhomocysteïne vertonen een relatie met vaatfunctie en beginnende atherosclerose.
- Een frequent voorkomend genetisch polymorfisme is van invloed op zowel cellulair folaatstofwisseling als op de relatie tussen leeftijd en DNA-methylering.

Literatuur

- 1 Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002; 288(16):2015-22.
- 2 Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, et al.; The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med*. 2006; 354(15):1567-77.
- 3 Bona KH, Njolstad I, Ueland PM, et al.; NORVIT Trial Investigators. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;354(15):1578-88.
- 4 Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(5): 565-75.
- 5 Loehrer FMT, Tschopl M, Angst CP, et al. Disturbed ratio of erythrocyte and plasma S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*. 2001;154(1):147-54.
- 6 Durga J, Bots ML, Schouten EG, et al. Low concentrations of folate, not hyperhomocysteinemia, are associated with carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis*. 2005;179(2):285-92.
- 7 Smulders YM, Stehouwer CD. Folate metabolism and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med*. 2005;5(2):87-97.
- 8 Spijkerman AMW, Smulders YM, Kostense PJ, et al. S-adenosylmethionine and 5-methyltetrahydrofolate are associated with endothelial function after controlling for confounding by homocysteine: The Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):778-84.
- 9 Struys EA, Jansen EEW, Meer K de, Jakobs C. Determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma and cerebrospinal fluid by stable-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2000;46(10):1650-56.
- 10 Smith DEC, Kok RM, Teerlink T, et al. Quantitative determination of the erythrocyte folate vitamers distribution by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(4):450-9.
- 11 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
- 12 Kok RM, Smith DEC, Spijkerman AM, et al. Global DNA methylation measured by liquid chromatography – tandem mass spectrometry: analytical technique, normal values and determinants in healthy subjects. 2007; submitted.
- 13 Becker A, Smulders YM, Teerlink T, et al. S-adenosylhomocysteine and the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine are not related to folate, cobalamin and vitamin B6 concentrations. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(1):17-25.
- 14 Becker A, Henry RMA, Kostense PJ, et al. Plasma homocysteine and S-adenosylmethionine in erythrocytes as determinants of carotid intima-media thickness: different effects in diabetic and non-diabetic individuals: The Hoorn Study. *Atherosclerosis*. 2003;169(2):323-30.
- 15 Stam F, Guldener C van, Wee PM ter, et al. Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(2):F215-23.
- 16 Kelly P, McPartlin J, Goggins M, et al. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *Am J Clin Nutr*. 1997;65:1790-5.
- 17 Kok RM, Smith DEC, Dainty JR, et al. 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to folate absorption and metabolism. *Anal Biochem*. 2004;326(2):129-38.
- 18 Smulders YM, Smith DEC, Kok RM, et al. Red blood cell folate vitamers distribution in healthy subjects is determined by the methyl-ene-tetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and by total folate status. *J Nutr Biochem*. 2007; in press.
- 19 Smulders YM, Smith DEC, Kok RM, et al. Cellular folate vitamers distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. *Br J Haematol*. 2006;132(5):623-9.
- 20 Castro R, Rivera I, Struys EA, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem*. 2003;49(8):1292-6.
- 21 Spoelstra-de Man AME, Teerlink T, Brouwer CB, et al. No effect of B vitamins on ADMA levels in patients at increased cardiovascular risk. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(5):495-501.