

Atmungsketten-Defekte in bezüglich der Parkinsonschen
Krankheit divergenten monozygoten Zwillingen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexander Maßen
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die wachsende Bedeutung der Alterserkrankungen	2
2.2	Die Parkinsonsche Krankheit	2
2.3	Parkinson - Eine mitochondriale Erkrankung?	3
2.4	Besonderheiten der mitochondrialen Genetik erklären bestimmte Aspekte der Parkinsonschen Krankheit	5
2.5	Ziel der Arbeit	7
3	Material und Methoden	9
3.1	Patienten	9
3.2	Allgemeine Zellkulturmethoden	9
3.2.1	Kultivierung von Humanzellen	9
3.2.2	Zellzahlbestimmung und Tryptan-Blau-Färbung	10
3.2.3	Proteinbestimmung mit Sulphorhodamin B	10
3.3	Erzeugung transmitochondrialer Zellen	10
3.3.1	Isolierung von Thrombocyten aus Humanblut	10
3.3.2	Fusion der Thrombocyten mit ρ^0 -Zellen	11
3.4	Polarographische Bestimmung der Atmungsketten-Aktivität	12
3.5	Wachstumskurven	13
3.6	Radioaktive Markierung der mitochondrial synthetisierten Proteine	13
3.7	Verschiedene Molekularbiologische Methoden	14
3.7.1	Isolierung von DNA aus Humanzellen	14

INHALTSVERZEICHNIS

3.7.2	Isopropanol-Präzipitation von DNA	14
3.7.3	Agarose-Gelelektrophorese	15
3.7.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . .	15
3.7.5	Polymerasekettenreaktion	15
3.8	Quantifizierung des Gehaltes an nuklearer und mitochondria- ler DNA	16
3.9	Sequenzierung einzelner Bereiche der mtDNA	18
3.9.1	Sequenzierung der mitochondrialen tRNAs	18
3.9.2	Sequenzierung des A8-Genes der mtDNA	18
3.9.3	Sequenzierung des ND1-Genes der mtDNA	20
3.9.4	Sequenzierung der mitochondrialen rRNA-Gene	20
3.10	Nachweis und Quantifizierung verschiedener Mutationen in den transmitochondrialen Zellen	21
3.10.1	Quantifizierung der Mutationen A4917G und G4924A .	21
3.10.2	Quantifizierung der Mutationen G15928A und T4216C	21
3.10.3	Quantifizierung der Mutation T10463C	22
3.10.4	Quantifizierung der rRNA-Mutationen	23
3.11	Statistische Methoden	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Keine Atmungsdefekte in den transmitochondrialen Zellen des ersten untersuchten Zwillingspaares	24
4.2	Signifikante Erniedrigung der Atmungsaktivität in den trans- mitochondrialen Zellen des zweiten Zwillingspaares	27
4.3	Die gefundenen Atmungsdefekte können das Wachstum der transmitochondrialen Zellen hemmen	28
4.4	Die große Varianz der transmitochondrialen Zellen des gesun- den Bruders deuten auf eine heteroplasmische Mutation hin .	30

INHALTSVERZEICHNIS

4.5	Untersuchung der mitochondrialen Proteinbiosynthese zur Identifikation der Mutation	32
4.6	Gleicher Gehalt an mtDNA in den transmitochondrialen Zellen deutet auf eine Biogenese-Mutation hin	34
4.7	Nachweis von 10 homoplasmischen mtDNA-Mutationen, die in beiden Zwillingen vorkommen	35
5	Diskussion	38
5.1	Nicht in jedem Fall kann die Parkinsonsche Krankheit auf mitochondriale Defekte zurückgeführt werden	38
5.2	Defekte der Atmungskette im zweiten Zwillingsspaar deuten auf eine mögliche Beteiligung an der Erkrankung hin	39
5.3	Homoplasmische Mutationen der mtDNA könnten eine Prädisposition für Parkinson erzeugen	40
5.4	Es gibt Unterschiede der mtDNA zwischen monozygoten Zwillingen, die möglicherweise den divergenten Krankheitsverlauf erklären	43

1 Zusammenfassung

Es wurden zwei Paare monozygoter Zwillinge untersucht, von denen seit fast zwei Jahrzehnten nur jeweils bei einem Bruder die Parkinsonsche Krankheit diagnostiziert worden ist. Da kein Unterschied in Bezug auf die nukleare DNA der Brüder besteht, wurde nach Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) gesucht, die den divergenten Krankheitsverlauf erklären können. An transmitochondrialen Zelllinien, welche die mtDNA der Patienten enthalten, wurde im Labor die Auswirkung der mtDNA der Patienten auf die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette untersucht.

Nur in einem der beiden Paare konnte ein mitochondrialer Atmungsketten-Defekt festgestellt werden. In diesem Falle sind die Aktivitäten aller drei Atmungsketten-Komplexe klar reduziert. Unter Bedingungen, bei denen die Zellen auf ihre Atmungskette angewiesen sind, reicht diese reduzierte Aktivität nicht mehr aus, um ein Wachstum zu gewährleisten und kann daher die Degeneration der Neuronen im Patienten erklären. Lediglich einzelne Zellen mit der mtDNA des gesunden Bruders zeigen normale Atmungsaktivitäten und können möglicherweise den Ausbruch der Erkrankung im gesunden Bruder verhindern. Die Befunde deuten auf genetische Unterschiede in der mtDNA zwischen den monozygoten Zwillingen hin und sind am einfachsten durch eine ungleichmäßig auf die Brüder verteilte heteroplasmische mtDNA-Mutation zu erklären. Keine der bisher identifizierten Abweichungen von der Cambridge-Referenz-Sequenz kann die beobachteten Effekte erklären.

2 Einleitung

2.1 Die wachsende Bedeutung der Alterserkrankungen

Aufgrund der verbesserten medizinischen Betreuung steigt die durchschnittliche Lebenserwartung des Menschen in Deutschland jährlich an. Zusätzlich verändert sich die Bevölkerungsstruktur, so daß der Anteil der älteren Menschen ebenfalls stetig steigt. Damit kommt den typischen Alterserkrankungen eine wachsende Bedeutung zu (Statistisches Bundesamt und Bundesgesundheitsministerium, 2000).

Eine dieser Erkrankungen ist die Parkinsonsche Krankheit, die nach der Alzheimerschen Krankheit die häufigste neurodegenerative Erkrankung ist und in Europa mittlerweile über 2% aller über 65-jährigen betrifft (de Rijk et al., 1997). Erstmals wurde diese Erkrankung 1817 von dem englischen Arzt James Parkinson (1755 - 1824) beschrieben (Parkinson, 1817).

2.2 Die Parkinsonsche Krankheit

Auf histologischer Ebene liegt der Erkrankung eine Degeneration der dopaminergen Neuronen in der *Substantia Nigra pars compacta* zugrunde. Dieser Bereich des Extrapyramidalen Systems des Gehirns erzeugt den Neurotransmitter Dopamin. Er wirkt auf die Neuronen des *Globus Pallidus*, der an der Steuerung der willkürlichen Bewegungen beteiligt ist.

Bei der Parkinsonschen Krankheit führt das Absterben der dopaminergen Neuronen zum Verlust der Kontrolle über willkürliche Bewegungen. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine Verzögerung der Bewegungen (Akinese) beziehungsweise des Beginns der Bewegung (Bradykinese). Weiterhin leiden die Patienten unter einer hohen Muskelspannung und Steifheit (Rigor) und dem wahrscheinlich bekanntesten Symptom, einem unkontrollierbaren Zittern der Muskeln (Tremor). Auch eine Vielzahl anderer Symptome wird beobachtet, darunter psychosomatische Störungen und Schweißausbrüche.

Während das Absterben der Neuronen in der *Substantia Nigra* die genannten Hauptsymptome erklärt, bleibt die Ursache für diese Degeneration der Neuronen bislang weitgehend ungeklärt.

Einen ersten Erfolg auf der Suche nach den Ursachen der Degeneration erzielten Polymeropoulos et al. (1997), die eine Mutation in einem nuklearen Gen unbekannter Funktion identifizierten. Diese Mutation korreliert in einer großen Familie mit dem Auftreten der Erkrankung. Mittlerweile wurden weitere nukleare Gene gefunden (Leroy et al., 1998; Kitada et al., 1998; de Silva et al., 2000), die allerdings alle nur in bestimmten Familien oder seltenen Einzelfällen für die Erkrankungen verantwortlich gemacht werden konnten. In weiteren Einzelfällen wurden Umweltbedingungen wie beispielsweise bestimmte Pflanzenschutzmittel als mögliche Ursachen der Erkrankungen diskutiert (Gorrel et al., 1996). Die überwiegende Mehrheit der typischen Parkinson-Fälle leidet an der idiopathischen ("sporadischen") Form der Erkrankung, deren Ursache - wie der Name bereits andeutet - ungeklärt ist.

Neue Hinweise auf eine mögliche Ursache ergaben sich, als 1982 in Kalifornien bei jungen Drogenkonsumenten eine drogeninduzierte Form der Erkrankung auftrat. Sie wurde auf eine Verunreinigung (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) der konsumierten Droge zurückgeführt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dieses Neurotoxin auf die Atmungsketten-Enzyme der Mitochondrien wirkt (Nicklas et al., 1985; Ramsay et al., 1986; Sayre, 1989). Mitochondrien stellen das zentrale Energieversorgungssystem der Zelle dar. Defekte der Mitochondrien wären daher eine leicht verständliche Erklärung für das Absterben der Neuronen. In Folge konzentrierten sich eine Reihe von Untersuchungen auf Defekte der mitochondriale Atmungskette beziehungsweise des mitochondrialen Systems der Oxidativen Phosphorylierung bei Parkinson-Patienten.

2.3 Parkinson - Eine mitochondriale Erkrankung?

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus drei Enzymkomplexen, die Elektronen von der reduzierten Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotids

(NADH) in drei Schritten auf molekularen Sauerstoff übertragen (Abbildung 1). Zunächst werden die Elektronen von Komplex I, der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, auf Ubichinon übertragen. Der Komplex III, die Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase, überträgt die Elektronen auf Cytochrom c, von wo aus sie abschließend durch Komplex IV, der Cytochrom c-Oxidase, auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen werden. Diese exergonen Redoxreaktion der Atmungskette sind gekoppelt mit einer Protonentranslokation über die innere Mitochondrienmembran. Das entstehende Protonenpotential wird durch die ATPase zur ATP-Synthese genutzt (Mitchel, 1961).

Bei Untersuchungen der mitochondrialen Atmungskette von Parkinson-Patienten wurden Aktivitätserniedrigungen des Komplex I der Atmungskette in verschiedenen Geweben von Parkinson-Patienten gefunden (Shapira et al., 1989; Minzuno et al., 1990; Benecke et al., 1992). Diese Befunde konnten jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Shapira et al., 1990; Cardellach et al., 1993; diDonato et al., 1993). Grund für diese Diskrepanz sind möglicherweise Probleme bei der Durchführung und Reproduzierbarkeit der Untersuchungen an Biopsiematerial. Swerdlow et al. (1996) übertrugen daher die Mitochondrien von Parkinson-Patienten in Laborzellen, da sich die Mitochondrien der Patienten in diesem System beliebig vermehren lassen. Sie fanden in diesem Laborsystem in den Patienten-Mitochondrien eine Aktivitätserniedrigung des Komplex I um 20% gegenüber den Mitochondrien der untersuchten Kontrollpatienten.

Durch dieses Experiment konnte gleichzeitig auch die Ursache für die Aktivitätserniedrigung des Enzymes eingegrenzt werden. Von den vielen Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe sind 11 Untereinheiten zusammen mit den zu ihrer Expression notwendigen rRNAs und tRNAs auf der DNA der Mitochondrien (mtDNA) kodiert. Bei der Überführung der Patienten-Mitochondrien wurde nur die mtDNA der Patienten in die Laborzellen eingebracht. Die nukleare DNA stammte aus der Laborzelle und ist in allen Zellen vergleichbar. Der gefundene Defekt der Atmungskette ist also auf Mutationen in den Strukturgenen oder den tRNA- beziehungsweise rRNA-

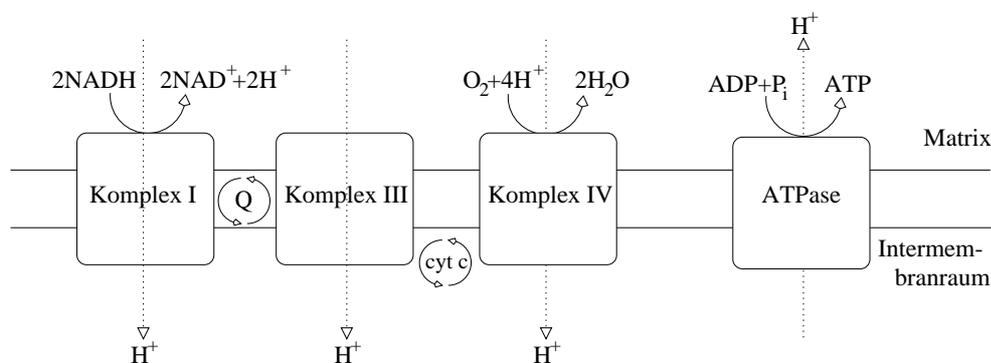


Abbildung 1: Schematische Darstellung des mitochondrialen Systems der oxidativen Phosphorylierung (Q=Ubichinon, cyt b=Cytochrom b).

Genen der mtDNA im Patienten zurückzuführen.

2.4 Besonderheiten der mitochondrialen Genetik erklären bestimmte Aspekte der Parkinsonschen Krankheit

Die Vermutung lag nahe, daß Mutationen der mtDNA eine generelle Ursache der bei Parkinson-Patienten beobachteten Defekte der Atmungskette sein könnten. Die mtDNA der Spermien geht jedoch nach der Befruchtung der Eizelle verloren, so daß die mtDNA rein maternal vererbt wird. Ein entsprechender maternaler Erbgang wird jedoch nur in einzelnen Ausnahmefällen gefunden (Swerdlow et al., 1998; Simon et al., 1999). Zwei Gründe können aber erklären, warum der zu erwartende maternale Erbgang nicht erkennbar ist. Zum einen weist die mtDNA eine deutlich höhere Mutationsrate als die nukleare DNA auf, was auf das Fehlen von schützenden Histonen und weniger effiziente Reparaturmechanismen zurückzuführen ist (Wallace, 1992). Mutationen der mtDNA können also während der Entwicklung somatisch, das heißt außerhalb der Keimbahn, entstehen und weisen somit *per definitionem* keinen maternalen Erbgang auf. Ferner enthält jedes Mitochondrium mehrere Kopien der mtDNA, und jede Zelle mehrere hundert Mitochondrien. Für die Entstehung von Parkinson relevante Mutationen könnten also in fast

beliebigen Verhältnissen neben unmutierter mtDNA vorliegen, was man als Heteroplasmie bezeichnet. Durch die überwiegende Anzahl nicht mutierter Kopien werden die Auswirkungen der heteroplasmischen Mutationen normalerweise unterdrückt. Somit sind nicht unbedingt Krankheitssymptome bei allen Mutationsträgern zu beobachten - was die Identifikation eines maternalen Erbganges erschwert. Weiterhin verhindert zusätzlich ein Schutzmechanismus während der Oogenese die Weitergabe von drastischen Mutationen an die nachfolgende Generation. Die mtDNA der Eizelle wird ausgehend von wenigen mtDNA-Kopien repliziert ("genetischer Flaschenhals"). Durch diese vorübergehende Reduktion der Kopienzahl wird in der Mehrzahl der Oocyten die Mutation nicht mehr vorkommen. In einigen wenigen Oocyten liegt die Mutation dagegen angereichert vor. Diese Oocyten entwickeln sich jedoch nicht weiter, wenn die Mutation die Funktion der Enzyme beeinträchtigt (Jennuth et al., 1996). Vererbt werden also entweder relativ milde Mutationen der mtDNA oder schwerwiegendere Mutationen nur in einem sehr geringen Heteroplasmiegrad.

In dieser heteroplasmischen Form behindert die Mutation den Organismus zunächst nicht. Doch zwei verschiedene Mechanismen können im Laufe des Lebens zu einer pathologischen Anreicherung der Mutation führen. Durch das rein statistische Phänomen der replikativen Segregation kann es während der Verteilung der mtDNA bei der Zellteilung zu einer Anreicherung der Mutation in bestimmten Zellen kommen. Während der Embryogenese kann sich hierdurch die Mutation in bestimmten Geweben anreichern und damit die Gewebespezifität der Erkrankung erklären. Zum zweiten gibt es Hinweise darauf, daß bestimmte mutierte Formen der mtDNA einen replikativen Vorteil in den Mitochondrien erlangen können (Hofhaus und Gattermann, 1999). Die mutierte DNA wird dadurch stärker als die unmutierte Form repliziert und reichert sich im Laufe des Lebens in der Zelle an.

Die Akkumulation von Mutationen der mtDNA, die erst bei Überschreiten einer kritischen Grenze zum Zusammenbruch der Energieversorgung der Zelle führen, kann also insbesondere die klare Altersabhängigkeit und den unklaren Erbgang der Parkinsonschen Krankheit erklären. Daher wurde von verschiede-

denen Gruppen der Versuch unternommen, relevante Mutationen der mtDNA von Parkinson-Patienten zu identifizieren (Brown et al., 1996; Kösel et al., 1998; Grasbon-Frodl et al., 1999; Kösel et al., 2000; Simon et al., 2000). Es konnten jedoch bislang keine Mutationen der mtDNA identifiziert werden, die bei Parkinson-Patienten gehäuft auftraten. Dies ist aber vielleicht auch nicht zu erwarten, da eine Vielzahl von Mutationen der mtDNA mit der zentralen Energieversorgung der Zelle interferieren und zum Absterben der Zellen führen können.

Ein generelles Argument gegen eine genetische Ursache für die idiopathische Form von Parkinson - und damit implizit auch gegen mtDNA-Mutationen, waren die Befunde von Untersuchungen an Paaren von mono- und dizygoten Zwillingen. Bei genetischen Ursachen für die Krankheit sollten bei den genetisch identischen monozygoten Zwillingen beide Geschwister an Parkinson erkranken. Tatsächlich jedoch findet sich bei ihnen keine größere Konkordanz im Krankheitsverlauf als bei den genetisch verschiedenen dizygoten Zwillingen (Tanner et al., 1999; Vieregge et al., 1999). Die schließt allerdings nur dann Mutationen als Ursachen für die Krankheitsentstehung aus, wenn monozygote Zwillinge auch bezüglich ihrer mtDNA genetisch identisch sind (Parker Jr. et al., 1999). Im Falle von heteroplasmischen Mutationen der mtDNA könnten diese jedoch auch bei monozygoten Zwillingen unterschiedlich zwischen den Geschwistern verteilt sein und somit die fehlende Konkordanz erklären.

2.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Identifikation möglicher heteroplasmischer Mutationen der mtDNA bei monozygoten Zwillingen mit divergentem Krankheitsverlauf, um die Entstehung von Parkinson in nur einem der beiden Geschwister erklären zu können.

Dazu wurde, wie schon in der Untersuchung von Swerdlow et al. (1996), das Laborsystem der transmitochondrialen Zellen verwendet. Zur Erzeugung der transmitochondrialen Zellen werden mtDNA-lose ρ^0 -Zellen mit Thrombocy-

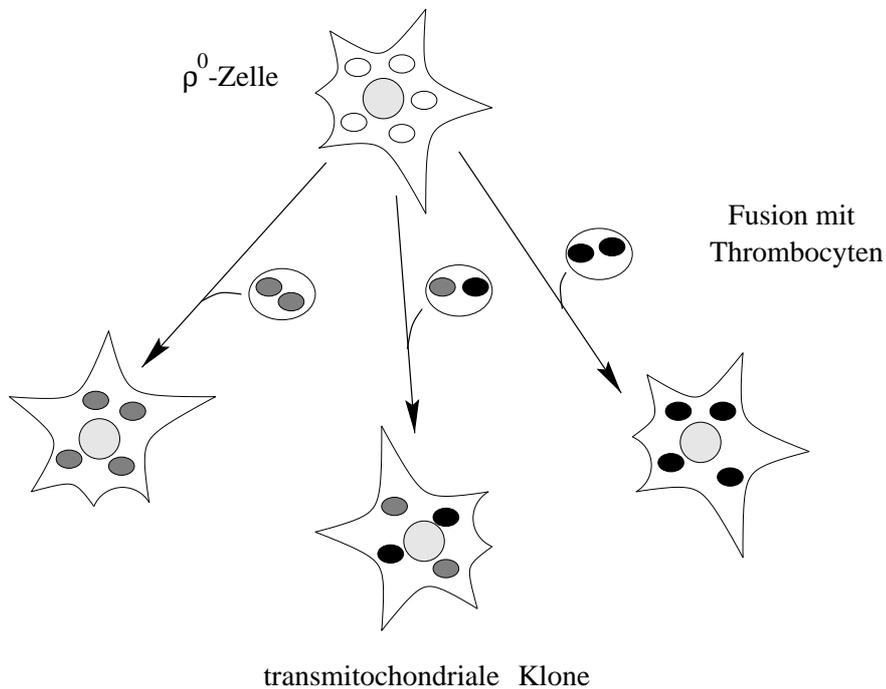


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transformation von ρ^0 -Zellen mit den Thrombocyten aus einem Patienten

ten aus dem Blut des Patienten verschmolzen (King und Attardi, 1989). Aus jeder Fusion eines Blutplättchens mit einer ρ^0 -Zelle entsteht eine transmitochondriale Zelllinie (Abbildung 2). Beim Vorliegen einer heteroplasmischen Mutation unterscheiden sich diese einzelnen Zelllinien in ihrem Heteroplasmiegrad. In einigen dieser Zellen ist die Mutation stark angereichert und führt bei pathologisch relevanten Mutationen zu einem Atmungsketten-Defekt in diesen Zellen. Ein direkter Vergleich zwischen stark und schwach betroffenen Zelllinien vereinfacht die Identifizierung der Mutation. Durch diese Methode werden nur Mutationen identifiziert, die zu Defekten der Mitochondrien führen. Die Bedeutung der so gefundenen Defekte für Parkinson kann anschließend im Falle der divergenten Zwillinge durch Korrelation des Grades der Heteroplasmie mit dem Krankheitsverlauf zwischen den beiden Brüdern abgeschätzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden zwei Paare von monozygoten Zwillingen untersucht, von denen jeweils einer der beiden Brüder seit 19 beziehungsweise 20 Jahren an Parkinson erkrankt ist, während sein Bruder weiterhin gesund ist. Bei den beiden erkrankten Patienten lautete die longitudinale Diagnose auf idiopathische, L-Dopa therapierbare Parkinsonsche Krankheit. Der Nachweis der Monozygotität erfolgte durch serologische Faktoren (ABO, Rh, und HLA Typisierung) sowie ihren genetischen Fingerabdruck (Vierегge et al., 1992).

Die mtDNA beider Zwillingspaare wurde bereits in einer anderen Untersuchung partiell sequenziert (Kösel et al., 2000).

3.2 Allgemeine Zellkulturmethoden

3.2.1 Kultivierung von Humanzellen

Zur Untersuchung wurden die menschliche Osteosarkoma-Zelllinie 143.TK⁻ sowie die aus ihr hervorgegangenen mtDNA-losten ρ^0 -Zellen verwendet.

Routinemäßig wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, welches mit 5% fetalem Kälberserum (FCS), 5 mU/ml Penicillin, 5 μ g/ml Streptomycin und 100 μ g/ml Kanamycin versetzt wurde, kultiviert. ρ^0 -Zellen wurden ferner mit 50 μ g/ml Uridin supplementiert (alle Reagentien Gibco BRL).

Zum Ernten wurden die Zellen 4 min in TD-Puffer (25 mM TrisHCl, 137 mM NaCl, 7 mM NaHPO₄, 5 mM KCl; pH 7,0) mit 0,02% EDTA und 0,06% Trypsin inkubiert. Die Behandlung wurde durch Zugabe von 10% Serum von neugeborenen Kälbern gestoppt und die Zellen für 4 min bei 800 g abzentrifugiert (Labofuge 400, Heraeus Instruments, 1100 rpm).

3.2.2 Zellzahlbestimmung und Tryptan-Blau-Färbung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Kammer verwendet. Dabei wurden von jeder Probe 4 x 1 μ l unter dem Phasenkontrastmikroskop (Eduval 4, Leitz) ausgezählt. Der Zustand der Zellmembran wurde anhand einer Tryptan-Blau-Färbung bestimmt. In der 3:1-Mischung aus einer 1%igen Tryptan-Blau-Lösung und der Zellsuspension wurde der Anteil gefärbter Zellen in der Neubauer-Kammer ermittelt.

3.2.3 Proteinbestimmung mit Sulphorhodamin B

Als Maß für die Zellzahl wurde bei Wachstumskurven die Proteinmenge in einer Mikrotiterplatten-Vertiefung mit Sulphorhodamin B bestimmt (Skehan et al., 1990). Dabei wurden in jede Vertiefung zu 100 μ l Zellkulturmedium 25 μ l einer 25%igen Trichloressigsäure gegeben und die Platte für 1 h bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und jede Vertiefung dreimal mit 200 μ l aqua bidest gewaschen. Nach dem Trocknen wurden in jede Vertiefung 50 μ l einer 0,4%igen Sulphorhodamin B-Lösung in 1%iger Essigsäure gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde nichtgebundenes Sulphorhodamin B durch Waschen mit 1%iger Essigsäure entfernt. Nach dem Trocknen wurde das an das Protein gebundene Sulphorhodamin B durch Zugabe von 100 μ l Trispuffer (1 mM TrisHCl; pH 10,4) und anschließender 5 minütiger Inkubation unter wiederholtem Schütteln gelöst. Die Menge an Sulphorhodamin B wurde anhand der Extinktion bei 570 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (Biorad 550 Microplate Reader) bestimmt.

3.3 Erzeugung transmitochondrialer Zellen

3.3.1 Isolierung von Thrombocyten aus Humanblut

Mit EDTA stabilisierte Blutproben der Patienten wurden innerhalb von 48 h nach der Entnahme für 10 min bei 1000 g (Labofuge 400, Heraeus Instru-

ments, 1200 rpm) ohne Bremse zentrifugiert, um die Thrombocyten von Erythrocyten und Leukocyten zu trennen. Dreiviertel des Überstandes wurden abgenommen und mit Citrat-Puffer (100 mM Natriumcitrat, 150 mM NaCl; pH 7,0) wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Zur Bestimmung der Thrombocytenzahl wurde eine Probe entnommen und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Thrombocyten suspension wurde zur Entfernung weiterer Leukocyten erneut zentrifugiert. Die gereinigten Thrombocyten wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 2500 g (3000 rpm) sedimentiert und erneut im ursprünglichen Volumen in Citrat-Puffer aufgenommen.

3.3.2 Fusion der Thrombocyten mit ρ^0 -Zellen

Ca. 1×10^8 Thrombocyten wurden der Thrombocyten-Suspension entnommen und 20 min bei 2500 g (Labofuge 400, Heraeus Instruments, 3000 rpm) zentrifugiert. Die ρ^0 -Zellen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben geerntet und zweimal mit DMEM gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl (in einer Neubauer-Kammer) wurde die Zellsuspension auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt und die Thrombocyten mit 1 ml der Zellsuspension überschichtet. Nach 4 minütiger Zentrifugation bei 800 g (1100 rpm) wurde das Sediment aus Thrombocyten und ρ^0 -Zellen in 100 μ l Polyethylenglykol 1000 resuspendiert, wobei die beiden Zellarten miteinander verschmolzen. Die Fusion wurde nach 60 sec durch Zugabe von 10 ml ρ^0 -Medium gestoppt und 10 Zellkulturplatten mit je 1 ml des Ansatzes (1×10^5 Zellen) angeimpft.

Drei Tage nach der Fusion wurden die Zellen auf Selektionsmedium (DMEM mit 5% dialysiertem FCS, ohne Uridin) umgestellt, in dem keine ρ^0 -Zellen wachsen können. Das Medium wurde alle 4 - 5 Tage gewechselt. Nach 2 bis 3 Wochen wurden individuelle Klone auf den Platten zufällig ausgewählt und durch Trypsinisieren in einem Glasring isoliert. Diese Klone wurden einzeln expandiert und nach Erreichen einer Zellzahl von ca. 1×10^6 Zellen zur Hälfte in Kryomedium (DMEM mit 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.4 Polarographische Bestimmung der Atmungsketten-Aktivität

Platten mit einem Durchmesser von 10 cm wurden 2 Tage vor der Messung mit 2×10^6 Zellen angeimpft. 24 h vor der eigentlichen Messung wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

Zur Messung wurden circa 4×10^6 Zellen wie oben beschrieben (3.2.1) geerntet. Das Zellsediment wurde in 500 μl O_2 -Medium (250 mM Saccharose, 20 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, 10 mM MgCl_2 ; pH 7,3) resuspendiert und zur Permeabilisierung mit 5 μl Digitoninlösung (1% Digitonin - gereinigt nach (Kun et al., 1979) - in Dimethylsulfoxid) inkubiert. Nach 60 sec wird mit 5 ml O_2 -Medium aufgefüllt und 4 min bei 800 g (Labofuge 400, Heraeus Instruments, 1200 rpm) zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5,5 ml O_2 -Medium resuspendiert, wie zuvor beschrieben erneut zentrifugiert, in 100 μl Meßpuffer (O_2 -Medium mit 1 mM ADP und 2 mM NaHPO_4) aufgenommen und mit 900 μl Meßpuffer in der Meßkammer der Sauerstoffelektrode vereinigt.

Zur Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Permeabilisierung wurden zwei Proben von 10 μl entnommen, mit 30 μl Tryptan-Blau versetzt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt.

Die Aktivität der Atmungsketten-Komplexe wurde durch Messung des Sauerstoffverbrauchs mit einer Clark-Sauerstoffelektrode (Bachhofer und Hansatech Instruments) bestimmt. Die Meßkammer wurde auf 37 °C thermostatisiert und mit einem Magnetrührer gerührt (Hofhaus et al., 1996). Das Signal der Elektrode wurde elektronisch verstärkt und über eine A/D-Wandlertarte von einem Rechner registriert. Zur Eichung der Elektrode wurde der Stromfluß in O_2 -gesättigtem Wasser und (nach Zugabe von Natriumdithionit) in O_2 -freiem Wasser gemessen. Die Sauerstoffkonzentration in Wasser bei 37 °C wurde mit 217 nmol/ml angenommen (Truesdale und Downing, 1954). Nach Verschließen der Kammer wurden die Substrate mittels einer Hamilton-Spritze zugegeben und der resultierende Sauerstoffverbrauch pro Zelle in fmol O_2 / min bestimmt.

Die Meßwerte wurden mittels eines selbst erstellten Programmes registriert und ausgewertet. Der Sauerstoffverbrauch wurde nach Zugabe von 10 μ l Malat/Glutamat-Stammlösung (je 0,5 M; pH 7,0) beziehungsweise nach Zugabe von 10 μ l Succinat/Glycerin-3-Phosphat-Stammlösung (0,5 M Succinat, 1 M Glycerin-3-Phosphat; pH 7,0) und nach Zugabe von 10 μ l TMPD/Ascorbat-Stammlösung (1 mM Ascorbat, 100 μ M Deferoxamin, 200 μ M TMPD; pH 7,0) gemessen und als Komplex I-, Komplex III- beziehungsweise Komplex IV-Aktivität registriert.

3.5 Wachstumskurven

Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben geerntet und in DMEM ohne Glucose und ohne Pyruvat aufgenommen. Die Dichte der Zellsuspensionen wurde auf 1×10^4 bzw 2×10^4 Zellen/ml eingestellt. 50 μ l der jeweiligen Suspension wurden in den Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte mit 50 μ l DMEM mit 10% dialysiertem FCS, 9000 mg/l Glucose und 220 mg/l Pyruvat beziehungsweise 50 μ l DMEM mit 10% dialysiertem FCS und 9 g/l Glucose versetzt.

Das Wachstum der Zellen wurde für 7 Tage im Abstand von 24 h mittels einer Proteinbestimmung verfolgt (siehe Kapitel 3.2.3).

3.6 Radioaktive Markierung der mitochondrial synthetisierten Proteine

Circa 6×10^5 Zellen wurden 24 h vor der Messung auf einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausplattiert. Vor der Markierung werden die Zellen zweimal mit methioninfreiem Medium gewaschen und zweimal für 10 min in 4 ml des Mediums inkubiert. Frischem methioninfreiem Medium werden 30 μ l Emetin-Stammlösung (10 mg/ml) zugegeben, um die cytosolische Proteinsynthese zu hemmen, und die Zellen darin für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ Ci 35 S-Methionin (ICN Radiochemicals) werden die Zellen 40 min. bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird

das Medium entfernt, die Zellen dreimal mit TD-Puffer (25 mM TrisHCl, 137 mM NaCl, 7 mM NaHPO₄, 5 mM KCl; pH 7,0) gewaschen und wie beschrieben trypsinisiert und geerntet (siehe Kapitel 3.2.1). Das Zellsediment wird in SDS-Lösung (1% Sodiumdodecylsulfat) aufgenommen und bei 100 V 80 mA über ein 15%-20% Gradienten-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Chomyn, 1996). Das Gel wird anschließend 3 h bei 80 °C auf einem Gelrockner getrocknet und zwei Wochen auf einer Imaging-Platte (Fuji-Film) inkubiert. Das Auslesen der Imaging-Platte erfolgte durch einen Bioimager (Fuji-Film BAS-2400, Fuji).

3.7 Verschiedene Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Isolierung von DNA aus Humanzellen

Ca. 1×10^5 Zellen wurden nach dem Ernten mit 5 ml TD-Puffer (25 mM TrisHCl, 137 mM NaCl, 7 mM NaHPO₄ und 5 mM KCl; pH 7,0) gewaschen und 4 min bei 800 g (Labofuge 400, Heraeus Instruments, 1100 rpm) abzentrifugiert. Zur DNA-Isolation wurde das Zellsediment in 100 μ l Lysis-Puffer (10 mM TrisHCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% Tween 20; pH 8,3) mit 100 μ g/ml Proteinase K (aus *Tritiachium alba*; Serva) resuspendiert und 1 h bei 55 °C inkubiert.

Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde der Ansatz 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt und 2 min bei 12000 g (Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, 14000 rpm) zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde mit Isopropanol präzipitiert (siehe 3.7.2) und bei -20 °C aufbewahrt.

3.7.2 Isopropanol-Präzipitation von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen NaCl-Lösung (5 M NaCl) und einem Volumen Isopropanol p.a. versetzt und 60 min bei -20 °C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation bei 12000 g (Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, 14000 rpm) bei 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Isopropanolreste wurden durch Waschen mit -20 °C

kalter 70%iger Ethanollösung entfernt und das Sediment 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, bevor die DNA in aqua bidest. aufgenommen wurde.

3.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

In Abhängigkeit von den zu untersuchenden DNA-Fragmenten wurden 0,8 - 2,5%ige Agarosegele (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer (45 mM TrisHCl, 45 mM Natriumborat, 1 mM EDTA) mit 500 μ g/l Ethidiumbromit verwendet. Nach Elektrophorese bei 2 - 8 V/cm wurden die DNA-Fragmente anhand der Fluoreszenz bei Anregung bei 278 nm sichtbar gemacht (Sambrook et al., 1989).

3.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente wurden die unter dem UV-Licht sichtbaren Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mittels des QuiaEx II Gel Extraction Kits (Quiagen) aus dem Agarosegel eluiert. Die Elution beruht dabei auf der Bindung der durch Auflösen der Agarose freigesetzten DNA an Glasmilch unter chaotropen Bedingungen. Durch mehrmaliges Waschen mit ethanolischer Lösung werden Verunreinigungen entfernt, bevor die DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen eluiert wird.

3.7.5 Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation mitochondrialer Genfragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem Thermocycler GenAmp PCR-System 2400 (Perkin Elmer) wurden DNA-freie, dünnwandige Reaktionsgefäße verwendet (Biozyme). In einem 20 μ l Ansatz wurden 2 μ l Template-DNA (20-100 ng DNA), je 10 pmol der beiden Primer, je 10 nmol der Desoxynucleotide und 2 μ l des 10 x Quiagen-PCR-Puffers (TrisHCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM MgCl_2 ; pH 8,7) mit aqua bidest auf 19,8 μ l aufgefüllt und mit 0,2 μ l Taq-DNA-Polymerase (1 U, Quiagen) versetzt. Ein übliches Programm begann

mit einer 4 minütigen Denaturierung bei 94 °C, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus 30 sec Denaturieren bei 94 °C, 30 sec Annealing bei der für die Primer optimalen Temperatur und einer Elongationsphase bei 72 °C (1 min pro 1000 bp Länge des Amplikons). Abschließend folgte eine verlängerte Elongationsphase von 7 min bei 72 °C, bevor der Ansatz auf 4 °C abgekühlt wurde.

3.8 Quantifizierung des Gehaltes an nuklearer und mitochondrialer DNA

Zur Herstellung von Sonden gegen die nukleare und mitochondriale DNA wurden mittels in Tabelle 1 aufgelisteter Primer und den dort ebenfalls beschriebenen PCR-Bedingungen ein Teil der nuklear kodierten 18S-rRNA beziehungsweise ein Abschnitt der mtDNA amplifiziert (siehe Kapitel 3.7.5). Zur Aufreinigung der Fragmente wurden die PCR-Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend eluiert (Kapitel 3.7.4).

Zur Digoxigenin-Markierung wurden jeweils 500 ng der isolierten Fragmente mit 2 μ l Random-Hexameren Oligonucleotiden (1,56 ng/ml hexamere Oligonucleotide in 500 mM TrisHCl, 100 mM MgCl₂, 1 mM Dithioerythrol, 2 mg/ml Rinder Serum Albumin; pH 7,2; Roche Molecular Biochemicals) und 2 μ l Nucleotiden (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM alkalilabiles Digoxigenin-dUTP; pH 6,5; Roche Molecular Biochemicals) versetzt und auf 19 μ l mit aqua bidest. aufgefüllt. Durch 10 minütiges Kochen der Ansätze im Wasserbad wurde die DNA denaturiert, bevor nach 30 sekundiger Inkubation im Eisbad 1 μ l Klenov-DNA-Polymerase labeling grade (2U; Roche Molecular Biochemicals) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Beendet wurde die Markierung der Sonden durch Zugabe von 2 μ l EDTA (200 mM EDTA; pH 8,0).

Zur Quantifizierung von mtDNA und nDNA wurde die DNA aus 5×10^5 Zellen wie beschrieben isoliert (Kapitel 3.7.1), in 1 ml 0,5 M NaOH aufgenommen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA im

Wasserstrahlvakuum mittels einer SlotBlot-Apperatur (Miniblot II, Schleicher und Schüll) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B, Biodyne) übertragen. Jede Vertiefung wurde zweimal mit 500 μ l 0,5 M NaOH gewaschen.

Die Membran wurde anschließend zweimal für 1 h in Hybridisierungspuffer (250 mM Natriumphosphatpuffer, 2,5 mM EDTA, 7% (w/v) SDS; pH 7,2) im Hybridisierungssofen (Bachhofer Instruments) bei 65 °C inkubiert. 5 ml Hybridisierungspuffer wurden mit 5 μ l der nuklearen oder mitochondrialen Sonde versetzt, für 10 min im kochenden Wasserbad inkubiert und die Membran über Nacht bei 65 °C mit dieser Lösung inkubiert.

Zum Entfernen der nichtgebundenen Sonde wurde die Membran 10 min bei 65 °C mit Waschpuffer I (30 mM Natriumcitrat, 300 mM NaCl; pH 7,0; 0,1% (w/v) SDS) und anschließend nochmals 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gewaschen. Nach einer circa 1 minütigen Inkubation in Malatpuffer (100 mM Natriummalat, 150 mM NaCl; pH 7,5) wurde die Membran 1 h in Blockpuffer (5% (w/v) fettfreie Trockenmilch, 150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl; pH 7,5) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 30 min in einer 10.000-fachen Verdünnung von Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Antikörper (Roche Molecular Biochemicals) in Blockpuffer inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wird durch zweimaliges Waschen für 15 min mit Waschpuffer II (100 mM Natriummalat, 150 mM NaCl, 0,3% Tween 20; pH 7,5) entfernt, die Membran kurz in Trispuffer (100 mM TrisHCl, 1 mM EDTA; pH 7,5) equilibriert und für 30 min mit dem Chemilumineszenz-Substrat (25 mM Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxiethan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)-phenylphosphat in 100 mM TrisHCl, 1 mM EDTA; pH 7,5) inkubiert. Die Chemilumineszenz wird durch Auflegen eines Röntgenfilmes beziehungsweise an einem Fluoreszenzimager (Fuji-Film LAS-1000, Fuji) nachgewiesen.

Tabelle 1: Zur Herstellung der nuklearen und mitochondrialen Sonde verwendete Primer (T_A Annealingtemperatur und t_E Elongationszeit während der PCR)

Sonde	Gen	Länge in bp	Primer	T_A in °C	t_E in sec
nDNA	18S	450	5'-CCTCG ATGCT CTTAG CTGAG TG-3' 5'-CAGCT TTGCA ACCATACTCCC-3'	53	30
mtDNA	ND2	1100	5'-GGAGCTTAAA CCCCCTTA-3' 5'-GATTAGGGTG CTTAG CTG-3'	53	60

3.9 Sequenzierung einzelner Bereiche der mtDNA

3.9.1 Sequenzierung der mitochondrialen tRNAs

Zur Sequenzierung der mitochondrialen tRNAs wurden die einzelnen Bereiche der mtDNA mittels PCR amplifiziert. Als Primer dienten die in Tabelle 2 angegebenen Oligonucleotide (Grasbon-Frodl et al., 1999). Die Amplifikation erfolgte wie unter Abschnitt 3.7.5 beschrieben. Die Annealingtemperatur betrug 53 °C, die Elongationszeit 30 sec. Die Produkte wurden am Neuropathologischen Labor der Maximilians-Universität München mit einem ABI-Prism Sequencer Modell 377 sequenziert.

3.9.2 Sequenzierung des A8-Genes der mtDNA

Zur Sequenzierung des mitochondrial kodierten Gens der ATPase-Untereinheit 8 wurde ein 639 Basenpaar langes Fragment mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern bei der angegebenen Annealingtemperatur amplifiziert. Die Elongationsphase dauerte 1 min. Das Fragment wurde mit den gleichen Primern am Biomedizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem ABI-Prism Sequencer Modell 377 sequenziert.

Tabelle 2: Zur Sequenzierung der mtDNA verwendete Primer sowie ihre optimale Annealingtemperatur (T_A).

Gen	Position in mtDNA	Primersequenz	T_A in °C
tRNA(Phe)	502–519	5'-CATCCTACCCAGCACACA-3'	53
	703–538	5'-TGCTTGCATGTGTAATCT-3'	
tRNA(Val)	1528–1545	5'-AAACCCCTACGCATTAT-3'	53
	1721–1704	5'-GGCTAAGGTTGTCTGGTA-3'	
tRNA(Leu)	3164–3181	5'-CCTTCCCCCGTAAATGAT-3'	53
	3380–3363	5'-CGCTCGGTAAAGCATTAGG-3'	
tRNA(Ile/Gln)	4185–4202	5'-CCTACCACTCACCCAGC-3'	53
	4429–4412	5'-CCCGATAGCTTATTTAGC-3'	
tRNA(Gln/Met)	4308–4325	5'-GGAGCTTAAACCCCTTA-3'	53
	4518–4501	5'-TGCCTGCAAAATGGTAG-3'	
tRNA(Trp/Ala)	5466–5483	5'-ACCACGCTACTCCTACCT-3'	53
	5713–5696	5'-GATTAGGGTGCTTAGCTG-3'	
tRNA(Ala/Asn)	5582–5599	5'-ACAGCTAAGGACTGCAAA-3'	53
	5804–5787	5'-TGAATTGCAAATTCGAAG-3'	
tRNA(Cys/Tyr)	5695–5712	5'-ACAGCTAAGCACCCCTAAT-3'	53
	5952–5935	5'-TTCCAATGTCTTTGTGGT-3'	
tRNA(Ser/Asp)	7407–7424	5'-TACCAACATTCGAAAGAA-3'	53
	7625–7608	5'-AAGTAGGCGTATTGTAGA-3'	
tRNA(Lys)	8228–8245	5'-CCCCTAAAAATCTTTGAA-3'	53
	8465–8448	5'-TAATTATGGTGGGCCATA-3'	
tRNA(Gly)	9946–9963	5'-TGGTTTGACTATTTCTGT-3'	53
	10155–10138	5'-TTTCTATGTAGCCGTGTA-3'	
tRNA(Arg)	10346–10363	5'-ATCCTAGCCCTAAGTCTG-3'	53
	10548–10531	5'-TGAGGTGTGAGCGATATA-3'	
tRNA(His/Ser)	12091–12108	5'-TCTCCTCCTATCCCTCAA-3'	53
	12269–12252	5'-AAGTTGAGAAAGCCATGT-3'	
tRNA(Ser/Leu)	12175–12192	5'-TGACAACAGAGGCTTACG-3'	53
	12381–12364	5'-TAGGGAAAGTCAGGGTTAG-3'	
tRNA(Glu)	14610–14627	5'-TTAGAAGAAAACCCACA-3'	53
	14805–14788	5'-TCGATGAATGAGTGGTTA-3'	
tRNA(Thr/Pro)	15851–14868	5'-ATCTCCCTAATGAA AAC-3'	53
	16095–16078	5'-GAAATACATAGCGGTGT-3'	
rRNA(12S/16S)	314–332	5'-CCGCTTCTGGCCACAGCAC-3'	55
	3359–3340	5'-GCCATTGCGATTAGAATGGG-3'	
A8	8282–8305	5'-CCCCTCTAGAGCCCACTGTAAA-3'	59
	8921–8902	5'-CCTTGTTGGTAAGAAGTGGGC-3'	
ND1	3152–3171	5'-CTTCAAAAAGCGCCTTCCCC-3'	57
	4531–4512	5'-GCTGTGATGAGTGTGCTGC-3'	

3.9.3 Sequenzierung des ND1-Genes der mtDNA

Ein 1381 Basenpaar langes Fragment mit dem mitochondrial kodierten Gen der ND1-Untereinheit des Komplex I wurde mit den in Tabelle 2 angegebenen Primern bei der entsprechenden Annealingtemperatur amplifiziert. Die Elongationsphase dauerte 1,5 min. Das Fragment wurde mit den gleichen Primern bei der Firma Quiagen mit einem ABI-Prism Sequencer Modell 377 sequenziert.

3.9.4 Sequenzierung der mitochondrialen rRNA-Gene

Um Mutationen der mitochondrial kodierten rRNA-Gene zu finden, wurde ein 3 kb großes DNA-Fragment mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Primern amplifiziert. Zusätzlich wurde dem PCR-Ansatz die "Q-Solution" von Quiagen zugesetzt. Die Elongationsphase dauerte 3 min. Das resultierende PCR-Fragment, welches die Gene der 12S rRNA und der 16S rRNA enthält, wurde bei Quiagen auf einem ABI Prism Sequencer Modell 377 mit den in Tabelle 3 angeführten Primern mittels Primerwalking sequenziert.

Tabelle 3: Zur Sequenzierung der mitochondrialen rRNA-Gene verwendete Primer und ihre optimale Annealingtemperatur (T_A).

Gen	Position in mtDNA	Primersequenz	T_A in °C
rRNA(12S)	314–332	5'-CCGCTTCTGGCCACAGCAC-3'	59
rRNA(12S)	917–936	5'-CAAGTCAATAGAAGCCGGCG-3'	57
rRNA(12S)	1022–999	5'-TAGTCTATTTTGTGTCAACTGGAG-3'	59
rRNA(12S/16S)	1476–1495	5'-GTACA CACCG CCGT CACCC-3'	53
rRNA(12S/16S)	1725–1706	5'-GTTTG GCTAAGGTG TCTGG-3'	55
rRNA(16S)	2559–2578	5'-TGTTT AACGG CCGCGTACC-3'	59
rRNA(16S)	2867–2846	5'-CAATTGGGTG TGAGG AGTTCAG-3'	59
rRNA(16S)	3359–3340	5'-GCCATTGCGATTAGAATGGG-3'	55

3.10 Nachweis und Quantifizierung verschiedener Mutationen in den mitochondrialen Zellen

3.10.1 Quantifizierung der Mutationen A4917G und G4924A

Die beiden mitochondrialen Mutationen A4917G und G4924A im ND2-Gen wurden mittels Sequenzierung quantifiziert. Das entsprechende Fragment wurde mit den in Tabelle 4 aufgeführten Primern amplifiziert (Elongationsphase 30 sec) und über ein Agarosegel aufgereinigt (Kapitel 3.7.4), bevor es am Biomedizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem ABI-Prism Sequencer Modell 377 sequenziert wurde.

Tabelle 4: Primer zum Nachweis verschiedener Mutationen der mtDNA

Gen	Mutation	Position in mtDNA	Primer
ND1	T4216C	3651–3671	5'-AATCCTCTGATCAGGGTGAGC-3'
		4391–4372	5'-GTGTGATAGGTGGCACGGAG-3'
ND2	A4917G	4794–4813	5'-GCCCCCTTTCACTTCTGAGT-3'
	G4924A	5017–4997	5'-GCGTAGCTGGGTCGTGTTTA-3'
tRNA(Thr)	G15928A	15648–15667	5'-CTAGCAATAATCCCCATCCTC-3'
		16547–16527	5'-GGAACGTGTGGCTATTTAGG-3'
tRNA(Arg)	T10463C	10437–10462	5'-CGACTCATTAAATTATGATAATGATAT-3'
		10519–10500	5'-AGAAGTGAGATGGTAAATGC-3'
tRNA(Arg)	Kontrolle	6504–6523	5'-GTCCTAGCTGCTGGCATCAC-3'
		6923–6904	5'-TCAGAGCACTGCAGCAGATC-3'

3.10.2 Quantifizierung der Mutationen G15928A und T4216C

Zum Nachweis der Mutation G15928A im mitochondrialen tRNA-Gen für Threonin wurde ein 899 Basenpaar langes Fragment um die Mutation herum amplifiziert (Tabelle 4, Annealingtemperatur 59 °C). Dieses wurde so gewählt, daß es zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym Msp I enthält. Da eine der beiden Restriktionsstellen des Enzyms durch die Mutation zerstört wird, kann das Vorhandensein der Mutation anhand des Fragmentierungsmusters erkannt werden.

Die mit Isopropanol präzipitierte DNA wurde in NE2 Puffer aufgenommen (50 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithioeritrol; pH 7,9) und mit 5 U Msp I (New England Biolabs) über Nacht geschnitten. Der gesamte Ansatz wurde dann über ein 0,8% Agarosegel aufgetrennt.

Durch die Mutation T4216C im mitochondrialen ND1-Gen entsteht eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym Nla III. Ein 740 Basenpaar langes Fragment wurde amplifiziert (Tabelle 4, Annealingtemperatur 57 °C, 1 min Elongation), das eine Nla III - Schnittstelle enthält. Nach Isopropanolpräzipitation wurde die DNA in Puffer NE4 (20 mM TrisHCl, 10 mM Magnesiumacetat, 50 mM KCl, 1 mM Dithioeritrol; pH 7,9) aufgenommen, über Nacht mit 0,75 U Nla III (New England Biolabs) geschnitten und über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt.

3.10.3 Quantifizierung der Mutation T10463C

Durch die Mutation T10463C wird keine bekannte Schnittstelle erzeugt oder vernichtet. Daher wurde durch eine PCR mit einem fehlgepaarten Primer ("mismatch"-Primer) 5 Basen von der Mutation entfernt ein C durch ein G ersetzt (Abbildung 3). Dadurch entsteht nur bei vorhandener Mutation im Template eine neue Eco RV-Schnittstelle im Fragment. Ist die Mutation nicht in der mtDNA enthalten, wird das Fragment nicht durch Eco RV geschnitten. Bei der PCR (Tabelle 4) wurde aufgrund der Fehlpaarung zwischen Primer und DNA die Annealingtemperatur auf 48 °C und die Elongationstemperatur auf 70 °C gesenkt. Die Annealingzeit betrug 45 sec, die Elongationszeit 30 sec.

Als Kontrolle für den vollständigen Schnitt wurde in einer unabhängigen PCR ein 450 Basenpaar langes Fragment amplifiziert, das eine Eco RV-Schnittstelle enthält. Dieses wurde zusammen mit dem ersten Fragment gefällt, in 20 µl Puffer B (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithioeritrol; pH 7,9) aufgenommen und über Nacht mit 2 U Eco RV (Amersham Pharmacia) geschnitten. Um eine ausreichende Auflösung zu gewährleisten, wurden die Fragmente über ein 2,6%iges Agarosegel (High resolution Agarose, Serva) aufgetrennt.

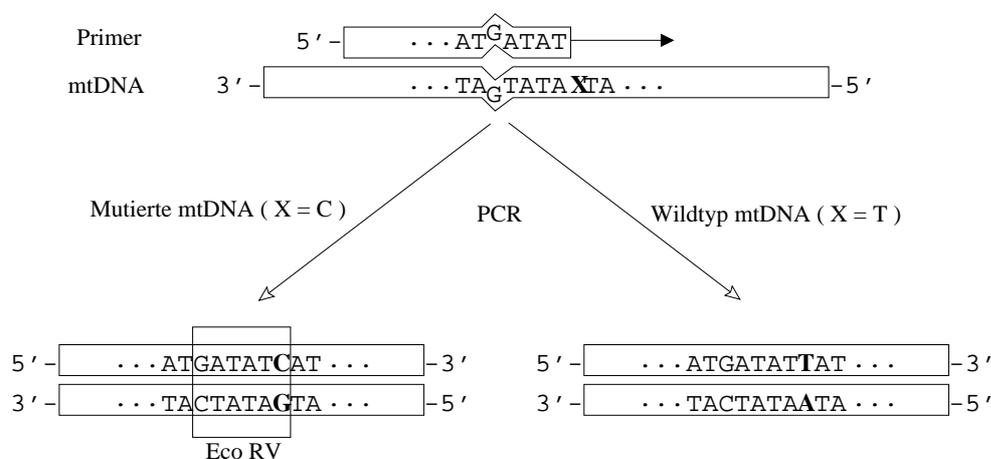


Abbildung 3: Erzeugung einer Eco RV-Schnittstelle in der mutierten mtDNA durch PCR-Mutagenese mit einem fehlgepaarten Primer (“mismatch” Primer)

3.10.4 Quantifizierung der rRNA-Mutationen

Die bei der Sequenzierung der mitochondrialen rRNA-Gene gefundenen Abweichungen von der mitochondrialen Referenz-Sequenz (Cambridge-Sequenz) wurden durch Sequenzierung nachgewiesen (entsprechend Kapitel 3.9.4).

3.11 Statistische Methoden

Signifikanz wurde - sofern nicht anders angegeben - über einen Student’s t-Test berechnet. Alle in den Diagrammen dieser Arbeit dargestellten Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

Die Signifikanz der Streuung der in den Zelllinien des gesunden Patienten vom zweiten Zwillingsspaar gemessenen Aktivitäten wurde mittels einer Varianzanalyse nachgewiesen. Zur besseren Verdeutlichung der Streuung wurden unabhängig von der Varianzanalyse die Mittelwerte der Enzymaktivitäten der einzelnen Komplexe in Prozent des Mittelwertes ausgerechnet und für jede Transformation über alle Enzyme und alle Zelllinien gemittelt.

4 Ergebnisse

Es wurden zwei Paare von monozygoten Zwillingen (I, II) mit divergentem Krankheitsverlauf auf heteroplasmische Mutationen der mtDNA untersucht (Tabelle 5). Dazu wurden 1×10^8 Thrombocyten aus dem Blut des gesunden (G) und erkrankten Bruders (K) isoliert und mit 1×10^6 mtDNA-losen ρ^0 -Zellen verschmolzen. Die Fusionsprodukte wurden ausplattiert und nach 2 Tagen erfolgte ein Medienwechsel auf uridinfreies Selektionsmedium, auf dem nicht transformierte ρ^0 -Zellen absterben. Nach 14 Tagen wurden von jeder Fusion circa 10 unabhängige transmitochondriale Zelllinien isoliert.

Tabelle 5: Untersuchte Patienten

Bezeichnung	Geschlecht		Alter in Jahren	Parkinson	Alter bei Diagnose in Jahren
Paar I	G	m	55	-	-
	K	m	55	Ja	35
Paar II	G	m	34	-	-
	K	m	34	Ja	15

4.1 Keine Atmungsdefekte in den transmitochondrialen Zellen des ersten untersuchten Zwillingspaars

Das erste untersuchte Zwillingspaar (I) war 55 Jahre alt und seit 20 Jahren divergent bezüglich der Parkinsonschen Krankheit. Von beiden Brüdern wurden jeweils vier zufällig ausgewählte Zelllinien polarographisch auf die Aktivität der Atmungsketten-Enzyme untersucht.

Dazu werden Elektronen über spezifische Substrate der Atmungsketten-Enzyme in die Atmungskette eingespeist und der resultierende Sauerstoffverbrauch gemessen (Abbildung 4). Die Zugabe von Malat / Glutamat führt durch die Enzyme des Citratzyklus zur Bildung von NADH, das durch den mitochondrialen Komplex I reduziert wird. Succinat / Glycerin-3-Phosphat

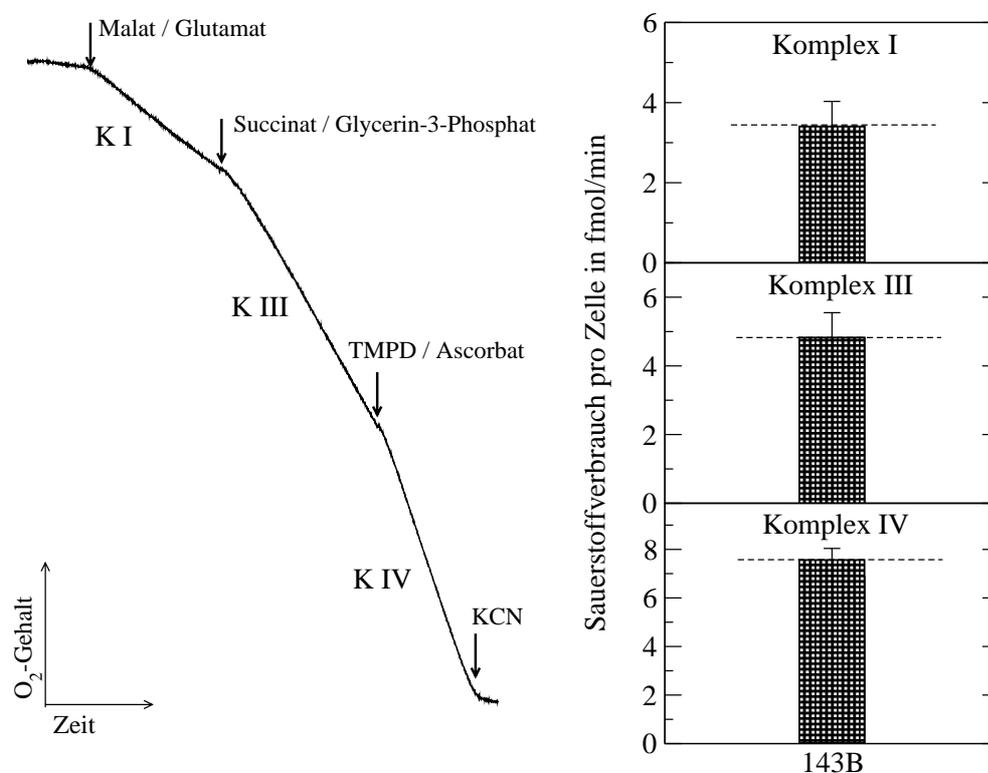


Abbildung 4: Sauerstoffverbrauch von 143B-Zellen nach Zugabe der entsprechenden Substrate. Die aus dem Sauerstoffverbrauch resultierenden Aktivitäten der Atmungsketten-Komplexe sind als Säulendiagramm dargestellt.

speist Elektronen unter Umgehung des Komplex I über die Succinat-Dehydrogenase und Ubichinon in den Komplex III, während TMPD / Ascorbat als künstlicher Elektronendonator für Cytochrom c fungieren und damit Elektronen in den Komplex IV einspeisen. Unter der Annahme, daß die jeweiligen Komplexe geschwindigkeitsbestimmend sind, wurde der Sauerstoffverbrauch nach Malat / Glutamat -, Succinat / Glycerin-3-Phosphat - und TMPD / Ascorbat - Zugabe registriert und der Enzymaktivität der Komplexe I, III und IV gleichgesetzt (Hofhaus et al., 1996). Als Referenz wurde die Aktivität der Atmungsketten-Enzyme von 143B-Zellen untersucht. Diese parentale Zelllinie der ρ^0 -Zellen enthält dieselbe nukleare DNA und bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß sie als Maß für normal atmende Zellen verwendet werden können.

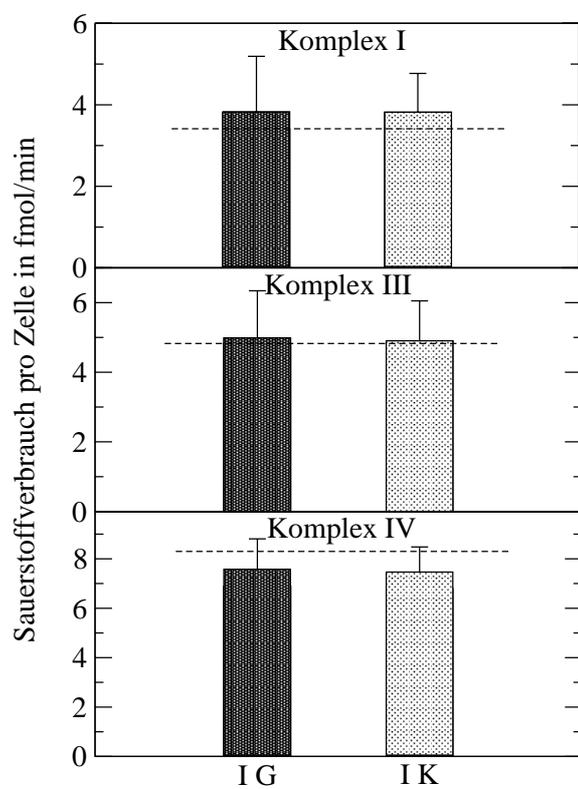


Abbildung 5: Mittlere Atmungsaktivität der Klone des gesunden (G) und kranken Bruders (K) des ersten Zwillingspaares. Die Linie kennzeichnet die mittlere Aktivität der 143B-Zellen.

Beim Vergleich der transmitochondrialen Zelllinien des Zwillingspaares I zeigten sich weder signifikante Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Brüdern noch zu den 143B-Zellen (Abbildung 5). In dem verwendeten experimentellen Rahmen ergaben sich in diesem Zwillingspaar also keine Hinweise auf einen mitochondrialen Defekt. Weitere Untersuchungen des Zwillingspaares im Rahmen dieser Arbeit waren daher nicht interessant.

4.2 Signifikante Erniedrigung der Atmungsaktivität in den transmitochondrialen Zellen des zweiten Zwillingspaars

Das zweite untersuchte Paar monozygoter Zwillinge (II) war 34 Jahre alt und seit 19 Jahren divergent bezüglich der Erkrankung des einen Bruders (II K). Auch mit Blutproben dieser Brüder wurden transmitochondriale Zellen erzeugt und die mitochondrialen Aktivitäten von jeweils sieben Zelllinien polarographisch untersucht.

Die transmitochondrialen Zelllinien des gesunden und des erkrankten Bruders zeigten eine deutliche Erniedrigung in den Aktivitäten aller drei Atmungsketten-Enzyme (Abbildung 6) im Vergleich zu den als Referenz verwendeten 143B-

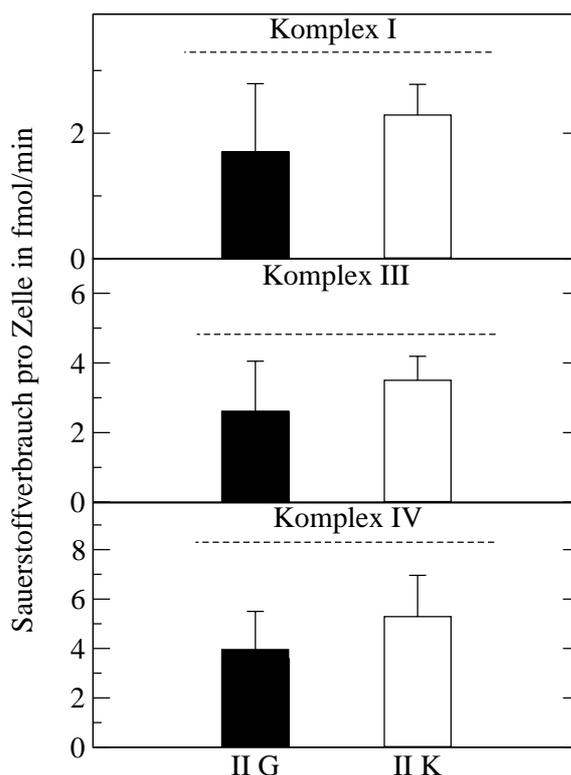


Abbildung 6: Mittlere Atmungsaktivität der Klone des gesunden (G) und erkrankten Bruders (K) des zweiten Zwillingspaars. Die Linie kennzeichnet die mittlere Aktivität der 143B-Zellen.

Zellen (Abbildung 6, gestrichelte Linie). Insgesamt ist die mittlere Aktivität in den transmitochondrialen Zellen des gesunden Bruders sogar etwas geringer als in den Zelllinien seines erkrankten Zwillings und sie weist eine deutlich höhere Standardabweichung auf.

Die Aktivitätserniedrigung muß ihre Ursache in der mtDNA des Zwillingspaars II haben, denn in Bezug auf die nukleare DNA sind die transmitochondrialen Zellen und die 143B-Zellen vergleichbar. Um die physiologische Relevanz der beobachteten Aktivitätserniedrigung in den transmitochondrialen Zellen der Zwillinge zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten der Zellen unter Pyruvatmangel untersucht.

4.3 Die gefundenen Atmungsdefekte können das Wachstum der transmitochondrialen Zellen hemmen

Unter den Bedingungen, unter denen die transmitochondrialen Zellen üblicherweise im Labor kultiviert werden, sind sie nicht auf die mitochondriale Atmungskette angewiesen und können ihren Energiebedarf durch Glykolyse decken (Schwartz und Johnson, 1976). Entzieht man dem Medium jedoch Pyruvat, so sind auch diese Zellen gezwungen, die Atmungskette zur Reoxidation des in den verschiedenen Stoffwechselwegen anfallenden NADH zu nutzen.

Für die Wachstumsversuche wurden von den transmitochondrialen Zellen der Brüder jeweils die Zellen mit der größten und kleinsten Aktivität (II G_{max} und II G_{min} beziehungsweise II K_{max} und II K_{min}) in pyruvatfreiem Medium ausplattiert. Das Wachstum wurde über sieben Tage verfolgt.

Wie Abbildung 7 zu entnehmen ist, ist nur die Atmungsaktivität der aktivsten transmitochondrialen Zelllinie des gesunden Bruders ausreichend, den Zellen das Wachstum auf pyruvatfreiem Medium zu ermöglichen. Selbst die relativ moderaten Aktivitätserniedrigungen in den anderen Zelllinien verhindern das Wachstum der Zellen unter Bedingungen, die die Zellen zur Nutzung

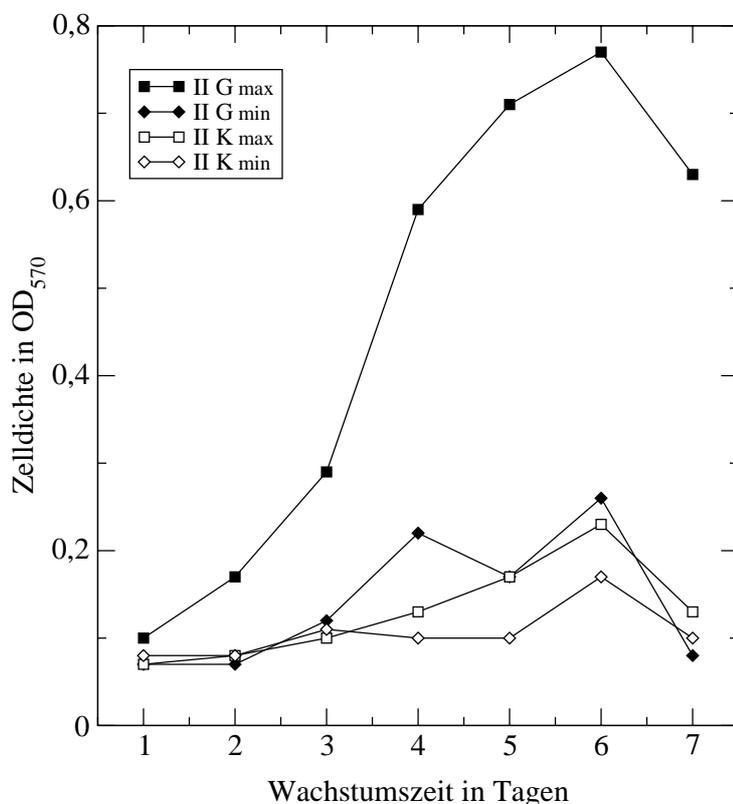


Abbildung 7: Wachstumsverhalten der bezüglich der Atmungsaktivität aktivsten und inaktivsten transmitochondrialen Zelllinien des gesunden (G) und erkrankten (K) Bruders vom Zwillingsspaar II. Die Zellen wurden ohne Pyruvat kultiviert, was sie zur Nutzung der Atmungskette zwingt.

ihrer Atmungskette zwingen. Es ist also vorstellbar, daß diese Atmungsdefekte die Degeneration der dopaminergen Neuronen im Patienten verursachen. Offensichtlich gibt es aber transmitochondriale Zellen mit der mtDNA des gesunden Bruders, die über eine ausreichende Kapazität der Mitochondrien verfügen. Für den Verlauf der Erkrankung ist somit unter Umständen der Anteil der Zellen, deren Atmungsaktivität über einem das Überleben sichernden Grenzwert liegt, wichtig.

4.4 Die große Varianz der transmitochondrialen Zellen des gesunden Bruders deuten auf eine heteroplasmische Mutation hin

Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Aktivität des Komplex I der Atmungskette für die einzelnen untersuchten transmitochondrialen Zelllinien des Zwillingspaars II. Es fällt auf, daß die transmitochondrialen Zellen des erkrankten Bruders alle eine recht einheitliche Aktivität aufweisen, während die Aktivitäten für die Zelllinien seines Bruders um einen Faktor 5 - 6 schwanken. Ein ähnliches Bild ergibt sich für Komplex III und Komplex IV.

Zum Vergleich der Varianz wurde von verschiedenen Fusionsexperimenten die prozentuale Standardabweichung vom Mittelwert über alle drei Atmungskettenenzyme und alle Zelllinien eines Fusionsexperimentes gemittelt. Abbildung

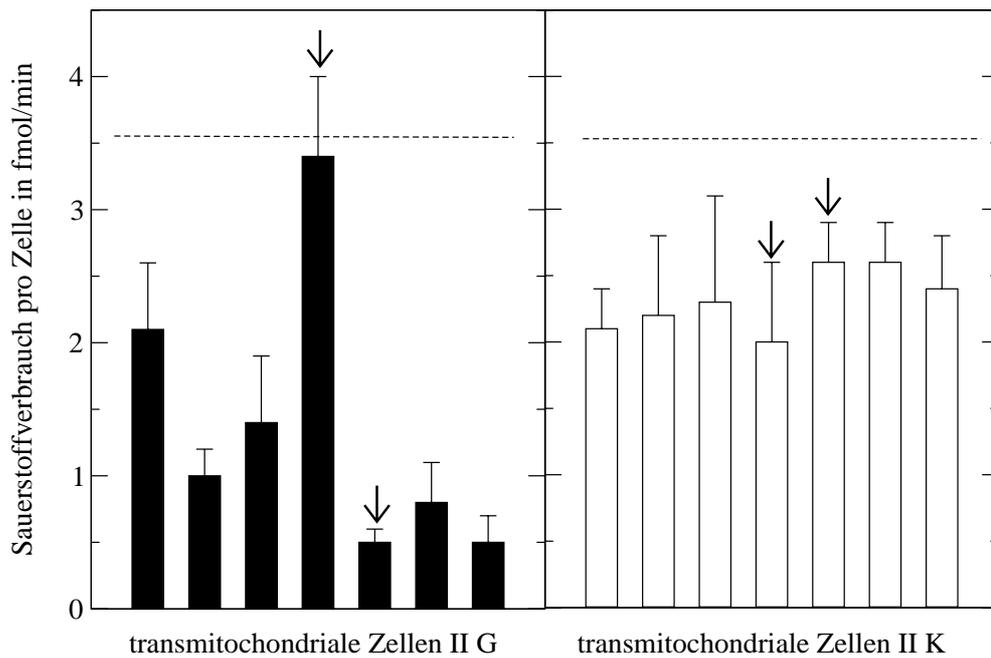


Abbildung 8: Komplex I-Aktivität aller transmitochondrialen Zelllinien der beiden Brüder des Zwillingspaars II. Die Linie kennzeichnet wieder die Aktivität der 143B-Zellen. Mit Pfeilen markiert sind die aktivsten beziehungsweise inaktivsten Zelllinien des gesunden (II G_{max} / II G_{min}) und erkrankten Bruders (II K_{max} / II K_{min}).

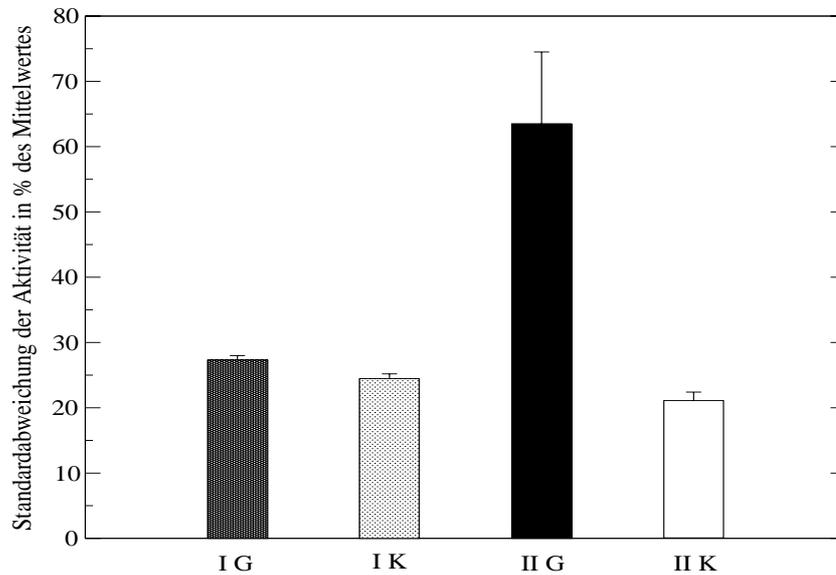


Abbildung 9: Standardabweichung in Prozent der Aktivität gemittelt über alle Atmungsketten-Komplexe der untersuchten transmitochondrialen Zellen. Dargestellt sind die Daten für den gesunden (G) und kranken Bruder (K) der beiden untersuchten Zwillingspaare.

9 zeigt, daß diese Streuung bei den anderen Fusionsexperimenten, die mit derselben Charge ρ^0 -Zellen durchgeführt wurden, nicht beobachtet wurde.

Die Ursache für die Streuung muß in der mtDNA des gesunden Bruders (II G) liegen und ist am einfachsten durch das Vorhandensein einer heteroplasmischen Mutation zu erklären. Die Mutation sollte in den Zellen des Bruders II G_{min} stark angereichert vorliegen und daher dort am einfachsten zu identifizieren sein. Als Kontrolle bei der Suche nach der Mutation dienten die Zellen II G_{max} , in denen die Mutation nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden sein sollte. Nach Identifikation der Mutation kann ihr Vorkommen auf der Ebene der mtDNA problemlos auch im erkrankten Bruder untersucht und somit Aussagen über ihre Relevanz für die Entwicklung von Parkinson gemacht werden.

4.5 Untersuchung der mitochondrialen Proteinbiosynthese zur Identifikation der Mutation

Durch die Untersuchung der mitochondrialen Proteinbiosynthese wurde versucht, die Suche nach der Mutation auf bestimmte Gene einzuschränken. So würden Biogenese-Mutationen in den mitochondrialen rRNA- oder tRNA-Genen zu einer generellen Erniedrigung der Proteinbiosynthese führen, ebenso wie Mutationen, die den Gehalt an mtDNA erniedrigen. Mutationen in Strukturgenen äußern sich dagegen eventuell in einer reduzierten Markierung oder in Laufunterschieden der einzelnen Proteine.

Zur Untersuchung der mitochondrialen Translationsprodukte wurde die cytosolische Proteinbiosynthese der Zellen mit Emetin gehemmt. ^{35}S -markiertes Methionin und Cystein wird dann nur noch in mitochondrial synthetisierte Proteine eingebaut. Die Proteine werden durch SDS-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und die entsprechenden Translationsprodukte anhand der Radioaktivität sichtbar gemacht.

In Abbildung 10 ist das Ergebnis für eine 40 minütige Markierung mit ^{35}S -Methionin dargestellt. Der herausragendste Unterschied beim Vergleich der Markierungsmuster von II G_{max} und II G_{min} ist die drastische Erniedrigung der Expression der ND1-Untereinheit in letzterer Zelllinie. Außerdem zeigt die als A8 identifizierte Bande einen deutlichen Migrationsunterschied. Beide Veränderungen könnten jedoch die gemessene Aktivitätserniedrigung aller drei Atmungsketten-Komplexe nicht erklären.

In den II G_{min} -Zellen ist ferner die Expression der ND5- und Cytochrom b-Untereinheiten reduziert. In ihrer Gesamtheit deuten diese Befunde damit eher auf eine Biogenese-Mutation oder einen reduzierten Gehalt an mtDNA hin.

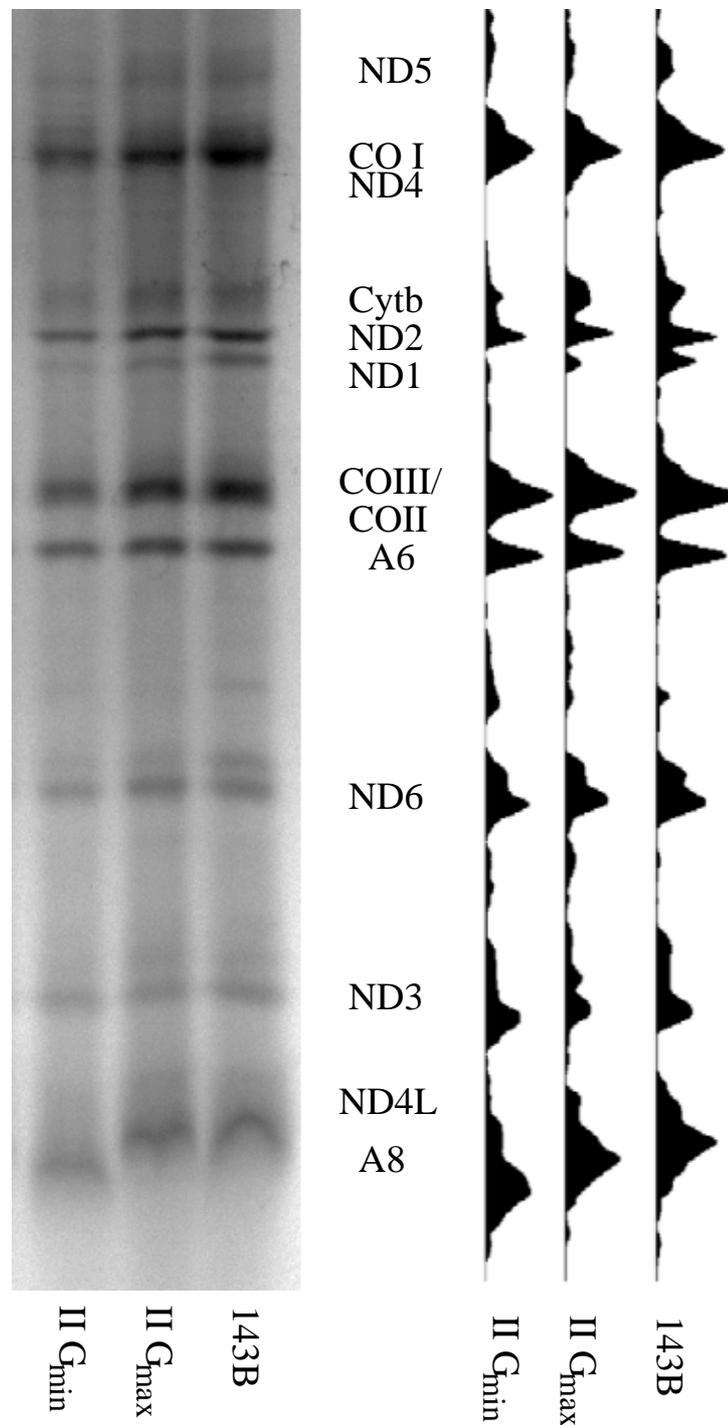


Abbildung 10: Autoradiographie der 40 minütigen ^{35}S -Markierung der mitochondrial synthetisierten Proteine von 143B-Zellen sowie der aktivsten und inaktivsten transmitochondrialen Zelllinie des gesunden Bruders vom zweiten Zwillingpaar (A) und ihre densitometrische Auswertung (B).

4.6 Gleicher Gehalt an mtDNA in den transmitochondrialen Zellen deutet auf eine Biogenese-Mutation hin

Durch Mutationen, die die Replikation der mtDNA behindern, kann der Gehalt an mtDNA in den Zellen erniedrigt werden. Eine solche Erniedrigung könnte die Auffälligkeiten im Expressionsmuster der mitochondrial kodierten Proteine erklären.

Zur Überprüfung des mtDNA-Gehaltes wurde die gesamte DNA der Zellen durch Behandlung mit einem Detergenz und Proteinase K freigesetzt und auf einer positiv-geladenen Nylonmembran fixiert. Durch Southern-Hybridisierung

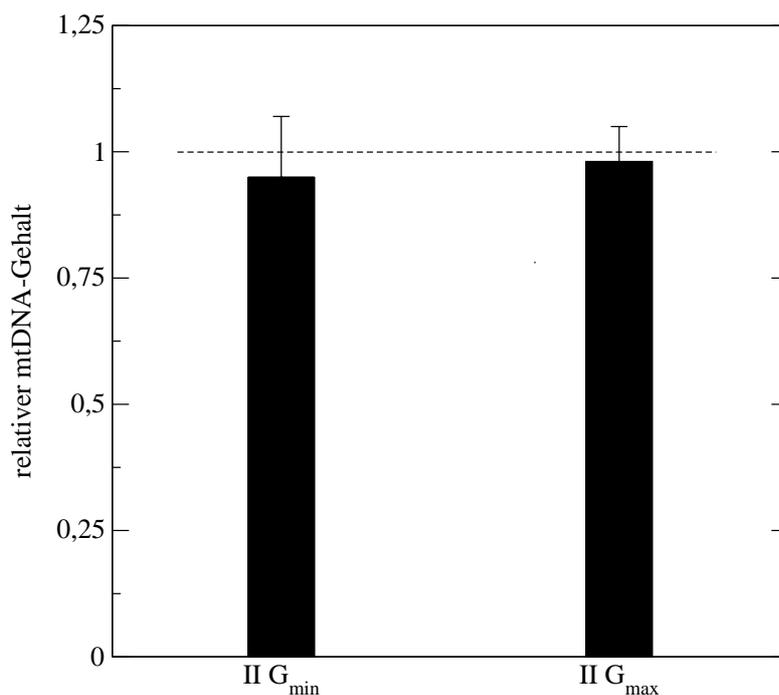


Abbildung 11: Verhältnis von nuklearer DNA zu mtDNA in 143B-Zellen sowie den aktivsten und inaktivsten transmitochondrialen Zelllinien des gesunden Bruders im zweiten Zwillingspaar

mit Sonden für die nukleare 18S-rRNA und die mitochondriale ND2-Untereinheit wurde das Verhältnis von mtDNA zu nuklearer DNA der Zellen bestimmt (Abbildung 11).

Der Gehalt an mtDNA der II G_{min} Zellen ist nicht signifikant verschieden von dem der II G_{max} beziehungsweise der 143B-Zellen. Es bleiben somit noch Mutationen der tRNA und rRNA-Gene, also der direkt an der Biogenese der mitochondrial kodierten Proteine beteiligten Gene, als Erklärungsmöglichkeit für die gefundenen Differenzen zwischen den Zellen von II G_{min} und II G_{max} .

4.7 Nachweis von 10 homoplasmischen mtDNA-Mutationen, die in beiden Zwillingen vorkommen

Zur Identifizierung möglicher tRNA-Mutationen wurden die 22 auf der mtDNA kodierten tRNA-Gene sequenziert. Dabei wurden zwei Mutationen in den Genen der Arginin-tRNA und Threonin-tRNA identifiziert (Tabelle 6). Beide Mutationen wurden in den aktivsten und inaktivsten transmitochondrialen Zellen über Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen quantifiziert. Exemplarisch ist das Ergebnis für die Mutation G15928A in der Threonin-tRNA in Abbildung 12 dargestellt. Mittels PCR wurde ein 899 Basenpaar langes Fragment um die Mutation herum amplifiziert, welches zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym Msp I enthält. Durch die Kontrollschnittstelle wird das Fragment auf 816 Basenpaare verkürzt. Diese Schnittstelle dient als Kontrolle für die Vollständigkeit der Restriktion durch das Enzym. Durch die zweite Schnittstelle wird das Fragment in zwei Teile von 597 und 279 Basenpaare zerlegt. Diese zweite Schnittstelle wird durch die Mutation G15928A zerstört. Abbildung 12 zeigt, daß die Mutation in den untersuchten Zelllinien sowohl des gesunden als auch des erkrankten Bruders homoplasmisch vorhanden ist und den Unterschied in der Atmungsaktivität insbesondere zwischen II G_{min} und II G_{max} nicht erklären kann.

Die Quantifizierung der zweiten gefundenen tRNA-Mutation ergab, daß auch

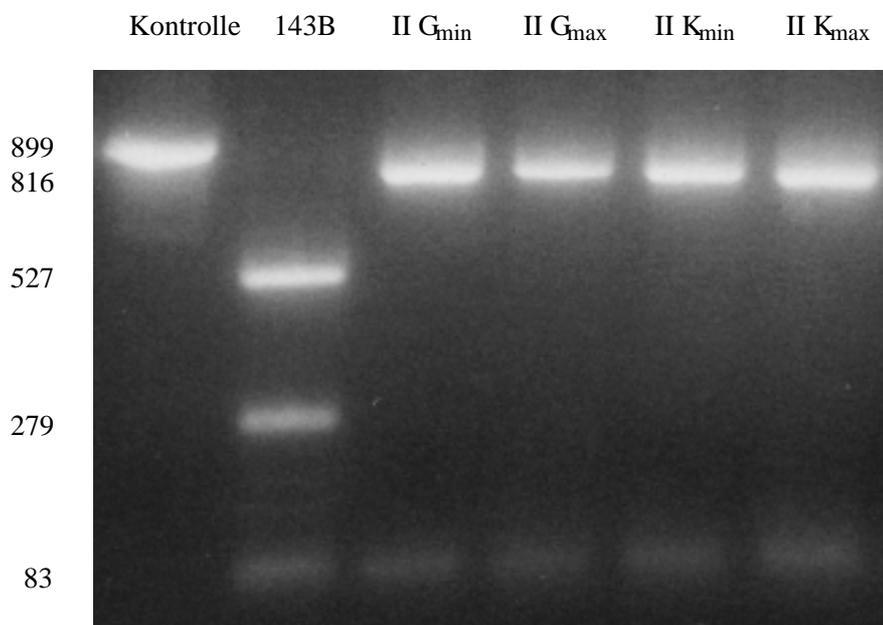


Abbildung 12: Gelanalyse zum Nachweis der Mutation G15928A in den transmitochondrialen Zellen des Zwillingspaares II. Als Kontrolle wurde das ungeschnittene PCR-Fragment aufgetragen. Bei den 143B-Zellen wird das Fragment zweimal durch das Restriktionsenzym Msp I geschnitten (Wildtyp-mtDNA), während in den transmitochondrialen Zellen eine der Schnittstellen durch die Mutation vernichtet wird.

diese homoplasmisch in den Zelllinien des gesunden und erkrankten Bruders vorliegen.

Bei der Sequenzierung der beiden mitochondrialen rRNA-Gene wurden fünf Abweichungen von der Cambridge-Sequenz gefunden (Tabelle 6), die sowohl in II G_{min} als auch in II G_{max} vorkommen. Eine genaue Analyse der Elektropherogramme ergab keine Hinweise auf eine Heteroplasmie einer dieser Mutationen.

Die Gene A8 und ND1, deren Expressionsmuster bei der Untersuchung der mitochondrialen Biosynthese deutliche Unterschiede zwischen II G_{min} und II G_{max} aufwiesen, wurden ebenfalls sequenziert. In der Untereinheit A8 konnten keine Mutationen gefunden werden. Auch bei der Sequenzierung der ND1-Untereinheit konnten keine Mutationen identifiziert werden, die die gemessenen Befunde erklären. Die mitochondrialen Untereinheiten des

Tabelle 6: Zusammenstellung aller im Zwillingspaar II gefundenen mtDNA-Mutationen. Nicht aufgelistet sind Sequenzabweichungen in Strukturgenen, die nicht zum Austausch einer Aminosäure führen. Jede der Mutationen wurde in den transmitochondrialen Zellen des Zwillingpaares II homoplasmisch nachgewiesen (RFLP Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus).

Gen	Position in mtDNA	Basentausch	Auswirkung auf Protein	Nachweis der Homoplasmizität
tRNA(Arg)	10463	T → C	-	RFLP
tRNA(Thr)	15928	G → A	-	RFLP
rRNA(12S)	709	G → A	-	Sequenzierung
rRNA(12S)	930	G → C	-	Sequenzierung
rRNA(12S)	1438	A → T	-	Sequenzierung
rRNA(16S)	1888	G → A	-	Sequenzierung
rRNA(16S)	2706	A → G	-	Sequenzierung
ND1*	4216	T → C	His → Tyr	RFLP
ND2*	4924	G → A	Ser → Asn	Sequenzierung
ND2*	4917	A → G	Asn → Asp	Sequenzierung

* Identifikation der Mutationen durch Kösel et al. (2000).

Komplex I des kranken und des gesunden Bruders sind bereits im Rahmen einer anderen Untersuchung sequenziert worden (Kösel et al., 2000), und die dort identifizierten Mutationen in den ND1- und ND2-Untereinheiten konnten über Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen beziehungsweise Sequenzierung in den transmitochondrialen Zellen homoplasmisch nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Nicht in jedem Fall kann die Parkinsonsche Krankheit auf mitochondriale Defekte zurückgeführt werden

Es wurden zwei Paare monozygoter Zwillinge, die seit mindestens 19 Jahren divergent bezüglich der Erkrankung an der Parkinsonschen Krankheit sind, auf Mutationen der mtDNA untersucht, die den divergenten Krankheitsverlauf erklären können. Dazu wurden mit der mtDNA der Zwillinge transmitochondriale Zelllinien erzeugt, um mit Hilfe dieses Labormodels relevante mtDNA-Mutationen zu identifizieren.

Die polarographische Untersuchung der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe ergab nur in einem der beiden Paare Hinweise auf einen Atmungsketten-Defekt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß zu geringe Anteile an mutierter mtDNA keinen Defekt hervorrufen, da sie durch unmutierte Kopien kompensiert werden. Doch aufgrund der in einzelnen Zelllinien erwarteten Anreicherung der Mutation ist die in dieser Untersuchung verwendete Methode deutlich sensitiver bezüglich der Identifikation von Atmungsdefekten als andere Untersuchungen direkt am Blut. Daher liegt vermutlich im Falle des Zwillingspaars II tatsächlich kein mitochondrialer Defekt der Erkrankung zugrunde. Dieser Befund entspricht anderen Studien, die mit verschiedenen Untersuchungen in Biopsiematerial ebenfalls nur bei einem Teil der untersuchten Parkinson-Patienten mitochondriale Defekte gefunden haben (Shapira et al., 1990; Cardellach et al., 1993; diDonato et al., 1993). Das Parkinson-Syndrom wird mittlerweile als etiologisch sehr heterogen angesehen, das heißt es gibt eine Vielzahl von Ursachen, die zu der Erkrankung führen können, und mitochondriale Defekte sind nur eine davon.

Mit der in dieser Untersuchung gewählten Methode können keine mitochondrialen Defekte identifiziert werden, die sich nur auf das betroffene Gewebe der *Substantia Nigra* beschränken würden, wie von Mann et al. (1992) vorgeschlagen. Ob Untersuchungen an leicht zugänglichen Geweben wie dem Blut

sinnvoll sind, hängt davon ab, ob der mitochondriale Defekt bei Parkinson-Patienten systemisch ist, also in allen Geweben des Patienten vorkommt. Es gibt sowohl eine Vielzahl biochemischer Untersuchungen (Bindoff et al., 1989; Parker et al., 1989; Shoffner et al., 1991; Benecke et al., 1993) als auch molekularbiologische Untersuchungen (Kösel et al., 2000), die mitochondriale Defekte beziehungsweise Mutationen im Blut der Patienten gefunden haben. Auch wenn einzelne Untersuchungen diese Befunde nicht bestätigen können (Shapira et al., 1990; Cardellach et al., 1993; diDonato et al., 1993), deuten die Befunde in ihrer Gesamtheit auf einen systemischen Defekt hin, der den gewählten Ansatz rechtfertigt.

5.2 Defekte der Atmungskette im zweiten Zwillingsspaar deuten auf eine mögliche Beteiligung an der Erkrankung hin

In den transmitochondrialen Zelllinien des zweiten untersuchten Zwillingsspaars konnte eine deutliche Aktivitätserniedrigung der Atmungsketten-Enzyme nachgewiesen werden. Da der Defekt mit der mtDNA in transmitochondriale Zellen überführt wurde, liegt die Ursache des Defektes in der mtDNA.

Die biochemischen Auswirkungen der bislang noch nicht identifizierten Mutation betreffen alle Atmungsketten-Enzyme gleichermaßen. In der Literatur wurde bei Parkinson-Patienten meist eine Erniedrigung der Komplex I-Aktivität beschrieben, in einigen Fällen verbunden mit einem Defekt des Komplex IV (Shapira et al., 1989; Minzuno et al., 1990; Benecke et al., 1992, 1993; Swerdlow et al., 1996). Auf der mtDNA von Parkinson-Patienten wurden verschiedene tRNA-Mutationen gefunden (Shoffner et al., 1993; Brown et al., 1996; Grasbon-Frodl et al., 1999), die zu ähnlichen Effekten wie den im Zwillingsspaar II beobachteten führen könnten (Fabrizi et al., 1996; Enter et al., 1991). Insofern decken sich die Ergebnisse dieser Untersuchung mit den von Gu et al. (1998) bei einem Parkinson-Patienten beschriebenen Defekten, die ebenfalls auf eine nicht identifizierte tRNA-Mutation zurückgeführt werden.

5.3 Homoplasmische Mutationen der mtDNA könnten eine Prädisposition für Parkinson erzeugen

Die Analyse der mtDNA des Zwillingspaars II hat insgesamt 10 verschiedene Abweichungen von der Cambridge-Sequenz ergeben. Diese Abweichungen kommen in allen transmitochondrialen Zelllinien des Zwillingspaars II homoplasmisch vor. Nicht gezählt wurden Abweichungen in den Strukturgenen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen.

Fast alle dieser homoplasmischen Mutationen wurden zuvor bereits mit der Parkinsonschen Krankheit oder einer anderen Krankheit assoziiert (Tabelle 7). Für die meisten ist der Bezug zur Erkrankung jedoch umstritten. Die Mutationen werden nur bei einzelnen Patienten gefunden und kommen in gesunden Kontrollen ebenfalls vor. Dies gilt insbesondere für die rRNA-Mutationen, bei denen ihr Vorkommen auch in nicht erkrankten Personen zu einer Einstufung als Sequenzpolymorphismen führte (Prezant und Agapian, 1994). Es ist auffällig, daß einzelne der Mutationen mit mehreren Erkrankungen assoziiert wurden, was darauf hindeutet, daß keine dieser Mutationen wirklich spezifisch für eine der Erkrankungen ist. Trotzdem überrascht ihr massives Auftreten in der mtDNA des zweiten Zwillingspaars. Möglicherweise erzeugen sie in der Summe eine Art Prädisposition. Bildlich gesprochen würden sie in der Summe sozusagen das "Faß" der mitochondrialen Mutationen füllen, und erst bei Überschreiten einer kritischen Grenze bricht die Erkrankung aus. Die Natur der jeweiligen Mutationen, die zum Füllstand des Faßes beitragen, ist dabei irrelevant, entscheidend ist ihr Zusammenwirken und gehäuftes Auftreten. Dies würde ihr Auftreten bei verschiedenen Erkrankungen ebenso wie ihr Vorkommen auch in gesunden Personen erklären.

Im Sinne der Prädisposition könnten die in dieser Untersuchung gefundenen Abweichungen von der Cambridge-Sequenz einzeln oder in der Summe zumindest einen Teil der erniedrigten mitochondrialen Aktivität im Zwillingsspaar II erklären. Folgende Anhaltspunkte sprechen jedoch dagegen: i) Alle Mutationen sind auch in der Zelllinie II G_{max} des gesunden Bruders enthal-

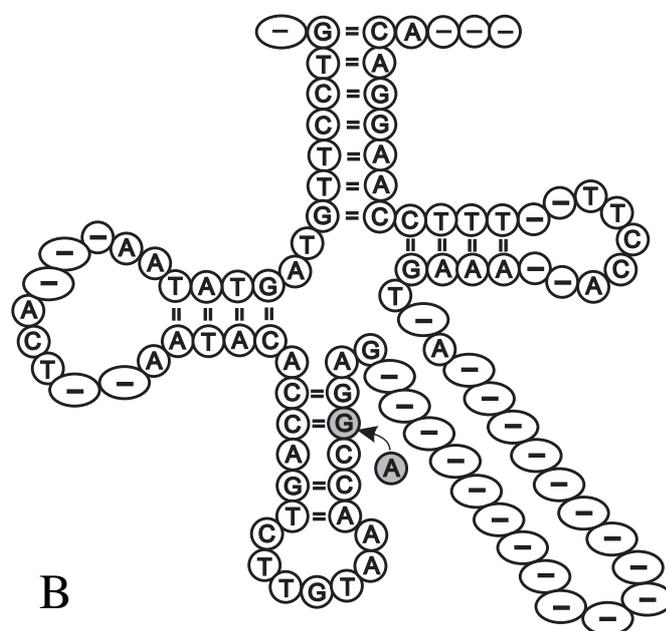
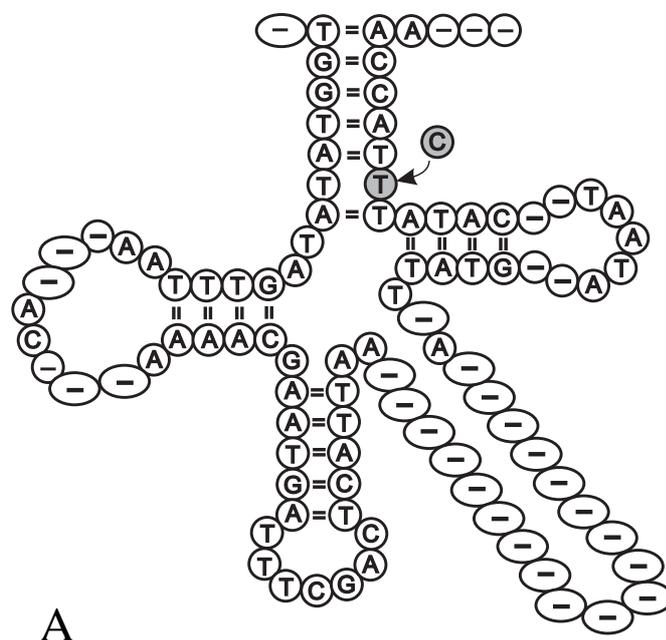


Abbildung 13: Struktur der mitochondrialen tRNAs für Arginin (A) und Threonin (B) nach Sprinzl et al. (1999). Grau hervorgehoben sind die durch die im zweiten Zwillingenpaar vorhandenen Mutationen hervorgerufenen Basenaustausche angedeutet.

Tabelle 7: Die meisten der in dem zweiten Zwillingpaar gefundenen homoplasmischen Mutationen wurden zuvor in der Literatur im Zusammenhang mit verschiedenen anderen Krankheiten diskutiert.

Gen	Mutation	Beschrieben im Zusammenhang mit	Literatur
tRNA(Thr)	G15928A	Parkinson	1, 2
	G15928A	Alzheimer	3
tRNA(Arg)	T10463C	Rett-Syndrom	4, 5
rRNA(12S)	G709A/G930C/A1438T	Taubheit	6
	G709A/A1438T	Cardiomyopathie	7
	G709A/G930C/A1438T	Parkinson	8
	A1438T	Polymorphismus	9
rRNA(16S)	A2706G	Parkinson	10
	A2706G	Cardiomyopathie	7
	A2706G	Polymorphismus	9
ND1	T4216C/A4917G	Optikusatrophie	11, 12, 13
	T4216C	Alzheimer/Parkinson	14

1 Mayr-Wohlfart et al., 1997; 2 Simon et al., 2000; 3 Chagnon et al., 1999; 4 Lewis et al., 1995; 5 Cardaioli et al., 1999; 6 Prezant et al., 1993; 7 Obayashi et al., 1992; 8 Ozawa et al., 1991; 9 Prezant und Agapian, 1994; 10 Ikebe et al., 1995; 11 Johns, 1992; 12 Oostra et al., 1994; 13 Mashima et al., 1998; 14 Brown et al., 1996

ten, die eine völlig normale Atmungsaktivität aufweist. ii) Mutationen in den Untereinheiten des Komplex I sollten zu einem isolierten Komplex I-Defekt führen. Daher erklären die Mutationen in den ND1- und ND2-Genen nicht die beobachtete Erniedrigung aller mitochondrialen Atmungsketten-Enzyme. iii) Von den zwei tRNA-Mutationen führt nur die Mutation G15928A zur Zerstörung einer Interaktion im Anti-Codonarm der Kleeblattstruktur. Ein stärkerer Einfluß auf die Synthese von Threonin-reichen Untereinheiten wie ND2 konnte jedoch nicht beobachtet werden. iv) Die gefundenen rRNA-Mutationen sind regelmäßig in gesunden Kontrollen gefunden worden und scheinen Merkmale eines mitochondrialen Haplotypes zu sein. Über eine ge-

häufte Erkrankung dieses Haplotypes an der Parkinsonschen Krankheit ist nichts bekannt.

Unabhängig von der Frage einer generellen Aktivitätserniedrigung kann jedoch keine der Mutationen aufgrund ihrer homoplasmischen Natur die beobachteten Unterschiede zwischen gesundem und erkranktem Bruder erklären und stellen daher nicht die Mutation dar, die im Falle des erkrankten Zwillingbruders II das Faß zum Überlaufen bringt.

5.4 Es gibt Unterschiede der mtDNA zwischen monozygoten Zwillingen, die möglicherweise den divergenten Krankheitsverlauf erklären

Die große Varianz der mitochondrialen Atmungsaktivitäten zwischen den transmitochondrialen Zelllinien mit der mtDNA des gesunden Bruders weisen auf eine heteroplasmische Mutation hin, die in den Zellen mit geringer Aktivität angereichert vorliegt. Aufgrund der Entwicklung der Brüder aus derselben Zygote ist es wahrscheinlich, daß diese Mutation auch im erkrankten Bruder vorkommt und dort für die moderate Aktivitätserniedrigung verantwortlich ist. Sie muß aber dort homogener verteilt sein und so kann keine der Zelllinien mit der mtDNA des erkrankten Bruders auf pyruvatfreiem Medium wachsen, während dies bei einzelnen transmitochondrialen Zellen mit der mtDNA des gesunden Bruders gelingt. Wenn diese Verteilung auch die Situation in der *Substantia Nigra* repräsentiert, so könnten die wenigen überlebenden Zellen den Ausbruch der Erkrankung im gesunden Bruder bisher verhindert haben.

Ist die heteroplasmische Mutation für die Entstehung von Parkinson im erkrankten Bruder verantwortlich, so sollten sich auch beim gesunden Bruder Auffälligkeiten in den Zellen der *Substantia Nigra* zeigen, auch wenn diese möglicherweise weniger drastisch sind und nicht zur Erkrankung führen. Tatsächlich fanden andere Zwillingstudien, bei denen divergente monozygote Zwillinge mittels F^{18} -Dopa und Positronen-Emissionstomatographie untersucht wurden, auch in den gesunden Zwillingen häufig Störungen in den

entsprechenden Hirnarealen (Holthoff et al., 1994; Piccini et al., 1998; Laihin et al., 2000). Es scheint also, als ob auch bei ihnen Defekte vorliegen, die jedoch weniger drastisch als in den erkrankten Zwillingen sind. Dies entspricht genau dem, was man erwarten würde, wenn aufgrund einer unterschiedlichen Verteilung einer heteroplasmischen mtDNA-Mutation beim gesunden Zwilling einzelne Zellen überlebt haben, während beim erkrankten Zwilling der Defekt zum Absterben aller Neuronen führt.

Ohne eine Identifikation der heteroplasmischen Mutation und den Nachweis in der mtDNA des erkrankten Bruders bleibt dies jedoch Spekulation, und alternative wenn auch weniger wahrscheinliche Erklärungen mit bisher nicht identifizierten Mutationen können nicht ausgeschlossen werden. Es erscheint fraglich, ob die Sequenzierung das probate Mittel zur Identifizierung der gesuchten heteroplasmischen Mutation darstellt. Einerseits wurden im Laufe dieser Untersuchung homoplasmische Mutationen gefunden, die bei einer ersten Sequenzierung der mtDNA der Zwillinge nicht entdeckt wurden (Kösel et al., 2000). Andererseits wurden auch "Mutationen" gefunden, bei denen durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen gezeigt werden konnte, daß es sich um Sequenzierungs-Artefakte handelt.

Die Untersuchungen machen auf jeden Fall deutlich, daß es Unterschiede zwischen gesundem und erkranktem Bruder gibt. Da diese Unterschiede in transmitochondrialen Zellen gefunden wurden, sind diese Unterschiede in der mtDNA zu finden. Dieser genetische Unterschied der monozygoten Zwillinge in Bezug auf die mtDNA könnte den divergenten Krankheitsverlauf zwischen den Brüdern erklären.

Literatur

- Benecke, R., Strümper, P., und Weiss, H. (1992): Electron transfer complex I defect in idiopathic dystonia. *Ann Neurol.*, 32:683–686.
- Benecke, R., Strümper, P., und Weiss, H. (1993): Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndrome. *Brain*, 116:1451–1463.
- Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., Cartlidge, N. E. F., Parker, W. D., und Turnbull, D. M. (1989): Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet*, 2:49.
- Brown, M. D., Shoffner, J. M., Kim, Y. L., Jun, A. S., Graham, B. H., Cabell, M. F., Gurley, D. S., und Wallace, D. C. (1996): Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Am J Med Genet.*, 61:283–289.
- Cardaioli, E., Dotti, M. T., Hayek, G., Zapella, M., und Federico, A. (1999): Studies on mitochondrial pathogenesis of Rett syndrome: ultrastructural data from skin and muscle biopsies and mutational analysis at mtDNA nucleotides 10463 and 2835. *J Submicrosc Pathol.*, 31:301–304.
- Cardellach, F., Martini, M. J., Fernandez-Sola, J., Marin, C., Hoeck, J. B., Tolosa, E., und Urbano-Marquez, A. (1993): Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 43:2258–2262.
- Chagnon, P., Gee, M., Filion, M., Robitaille, Y., Belouchi, M., und Gauvreau, D. (1999): Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer's disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet.*, 85: 20–30.
- Chomyn, A. (1996): In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Meth Enzymol.*, 264:197–211.

- de Rijk, M. C., Tzouriiio, C., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertan, J. M., Alperovitch, A., und Rocca, W. A. (1997): Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European community concerted action on the epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 62:10–15.
- de Silva, H. R., Khan, N. L., und Wood, N. W. (2000): The genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Genet Dev.*, 10(3):292–8.
- diDonato, S., Zeviani, M., Giovannini, P., Savarese, N., Rimoldi, M., Mariotti, C., Girotti, F., und Caracensi, T. (1993): Respiratory chain and mitochondrial DNA in muscle and brain in Parkinson's disease patients. *Neurology*, 43:2262–2268.
- Enter, C., Muller-Hocker, J., Ziertz, S., Kurlemann, G., Pongratz, D., Foster, C., Obermaier-Kussler, B., und Gerbitz, K. D. (1991): A specific point mutation in the mitochondrial genome of caucasians with MELAS. *Hum Genet.*, 88:233–236.
- Fabrizi, G. M., Cardaioli, E., Grieco, G. S., Cavallaro, T., Malandrini, A., Manneschi, L., Dotti, M. T., Frederico, A., und Guazzi, G. (1996): The A to G transition at nt 3243 of the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) may cause an MERRF syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61:47–51.
- Gorrel, J. M., DiMonte, D., und Graham, D. (1996): The role of the environment in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.*, 104:652–654.
- Grasbon-Frodl, E. M., Kösel, S., Sprinzel, M., von Eitzen, U., Mehraein, P., und Graeber, M. B. (1999): Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease. *Neurogenetics*, 2:121–127.
- Gu, M., Cooper, J. M., Taanman, J. W., und Shapira, A. H. (1998): Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, 44:177–186.

- Hofhaus, G. und Gattermann, N. (1999): Mitochondria harbouring mutant mtDNA - a cockoo in the nest? *Biol Chem.*, 380:871–877.
- Hofhaus, G., Shakeley, R. M., und Attardi, G. (1996): Use of polarography to detect respiratory defects in cell cultures. *Meth Enzymol.*, 264:476–483.
- Holthoff, V. A., Vieregge, P., Kessler, J., Pietrzyk, U., Herholz, K., Bönner, J., Wagner, R., Wienhard, K., Pawlik, G., und Heiss, W.-D. (1994): Discordant twins with Parkinson's disease: positron emission tomography and early signs of impaired cognitive circuits. *Ann Neurol.*, 36:176–182.
- Ikebe, S., Tanaka, M., und Ozawa, T. (1995): Point mutations of mitochondrial genome in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res.*, 28:281–295.
- Jenuth, J. P., Peterson, A. C., Fu, K., und Shoubridge, E. A. (1996): Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 14:1996.
- Johns, D. R. (1992): Mitochondrial ND1 mutation in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Hum Gen.*, 50:872–874.
- King, M. P. und Attardi, G. (1989): Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246:500–503.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., und Shimizu, N. (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392:605–608.
- Kösel, S., Grasbon-Frodl, E. M., Hagenah, J. M., Graeber, M. B., und Vieregge, P. (2000): Parkinson's disease: analysis of mitochondrial DNA in monozygotic twins. *Neurogenetics*, 2:227–230.
- Kösel, S., Grasbon-Frodl, E. M., Mautsch, U., Egensperger, R., von Eitzen, U., Frishman, D., Hofmann, S., Gerbitz, K. D., Mehraein, P., und Graeber, M. B. (1998): Novel mutations of mitochondrial complex I in pathologically proven Parkinson's disease. *Neurogenetics*, 1:197–204.

- Kun, E., Kristen, E., und Piper, W. N. (1979): Stabilisation of mitochondrial functions with digitonin. *Meth Enzymol.*, 55:115–118.
- Laihinén, A., Ruottinen, H., Rinne, J. O., Haaparanta, M., Solin, O., Koskenvuo, M., Marttila, R., und Rinne, U. K. (2000): Risk for Parkinson's disease: twins studies for the detection of asymptomatic subjects using [18F]6-fluorodopa PET. *J Neurol.*, 247:II/110–II/113.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnagalada, S., und Chernova, T. (1998): The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395:451–452.
- Lewis, D. W., Erichson, C. E., und Castora, F. J. (1995): Mutation analysis of mitochondrial transfer RNA genes in Rett syndrome. *Pediatric Neurology*, 11:143–144.
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Daniel, S. E., Shapira, A. H. V., und Marsden, C. D. (1992): Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain*, 115:333–342.
- Mashima, Y., Yamada, K., Wakakura, M., Kigasawa, K., Kudoh, J., Shimizu, N., und Oguchi, Y. (1998): Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's optic neuropathy. *Curr Eye Res.*, 17:403–408.
- Mayr-Wohlfart, U., Rodel, G., und Henneberg, A. (1997): Mitochondrial tRNA(Glu) and tRNA(Thr) gene variants in Parkinson's disease. *Eur J Med Res.*, 2:111–113.
- Minzuno, Y., Suzuki, K., und Ohta, S. (1990): Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.*, 96:49–57.
- Mitchel, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type or mechanism. *Nature*, 191:144–148.

- Nicklas, W. J., Vyas, I., und Heikkila, R. E. (1985): Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine a metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.*, 36: 2503–2508.
- Obayashi, T., Hattori, K., Sugiyama, S., Tanaka, M., Tanaka, T., Itoyama, S., Deguchi, H., Kawamura, K., Koga, Y., Toshima, H., Takeda, N., Nagano, M., Ito, T., und Ozawa, T. (1992): Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart Journal*, 124:1263–1269.
- Oostra, R. J., Bolhuis, P. A., Wijburg, F. A., Zorn-Ende, G., und Bleeker-Wagemakers, E. M. (1994): Leber's hereditary optic neuropathy: correlations between mitochondrial genotype and visual outcome. *J Med Genet.*, 31:280–286.
- Ozawa, T., Tanaka, M., Ino, H., Ohno, K., Sano, T., Wada, Y., Yoneda, M., Tanno, Y., Miyatake, T., Tanaka, T., Itoyama, S., Ikebe, S., Hattori, N., und Minzuno, Y. (1991): Distinct clustering of point mutations in mitochondrial DNA among patients with mitochondrial encephalomyopathies and with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Comm.*, 176:938–946.
- Parker, W. D., Boyson, S. J., Luderer, A. S., und Parks, J. K. (1989): Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, 26:719–723.
- Parker Jr., W. D., Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Davis II, J. N., Trimmer, P., Bennett, J. P., und Wooten, G. F. (1999): Parkinson's disease in twins [letters to the editor]. *J. Am. Medic. Assoc.*, 282:1328.
- Parkinson, J. (1817): An Essay on the the Shaking Palsy. *Sherwood Nesly and Jones, London.*
- Piccini, P., Burn, D. J., Ceravolo, R., Maraganore, D., und Brooks, D. J. (1998): The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol.*, (45):577–582.

- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., und Boyer, R. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276:2045–2047.
- Prezant, T. R. und Agapian, J. V. (1994): Corrections to the human mitochondrial ribosomal RNA sequences. *Hum Genetics*, 93:87–88.
- Prezant, T. R., Agapian, J. V., Bohlmann, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W. Q., Arnos, K. S., Cortopassi, G. A., Jaber, L., Rotter, J. I., Shohat, M., und Fischel-Ghodsian, N. (1993): Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genetics*, 4:289–294.
- Ramsay, R. R., Kowal, A. T., Dagar, J., und Singer, T. P. (1986): Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem Biophys Res Commun.*, 135:269–275.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Press, New York, 2nd edition, (1989).
- Sayre, L. M. (1989): Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Lett.*, 48:121–149.
- Schwartz, J. P. und Johnson, G. S. (1976): Metabolic effects of glucose deprivation and of various sugars in normal and transformed fibroblast cell lines. *Arch Biochem Biophys.*, 172:237–245.
- Shapira, A. H. V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., und Marsden, C. D. (1989): Mitochondrial complex I and II deficiency in Parkinson's disease. *Arch Biochem Biophys.*, 172:237–245.
- Shapira, A. H. V., Cooper, J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J. B., und Marsden, C. D. (1990): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.*, 54:823–824.

- Shoffner, J. M., Brown, M. D., Torroni, A., Lott, M. T., Cambell, M. F., Mirra, S. S., Beal, M. F., Yang, C. C., Gearling, M., und Salvo, R. (1993): Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Genomics*, 17:171–184.
- Shoffner, J. M., Watts, R. L., Juncos, J. L., Torroni, A., und Wallace, D. C. (1991): Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, 30:332–339.
- Simon, D. K., Mayeux, R., Marder, K., Kowall, N. W., Beal, M. F., und Johns, D. R. (2000): Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease. *Neurology*, 54:703–709.
- Simon, D. K., Pulst, S. M., Sutton, J. P., Browne, S. E., Beal, M. F., und Johns, D. R. (1999): Familial multisystem degeneration with parkinsonism associated with 11778 mitochondrial DNA mutation. *Neurology*, 53:1787–1793.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., S, S. K., und Boyd, M. R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.*, 82.
- Sprinzel, M., Vassilenko, K. S., Emmerich, J., und Bauer, F. (1999): Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. <http://www.uni-bayreuth.de/departments/biochemie/trna/>.
- Statistisches Bundesamt und Bundesgesundheitsministerium (2000): Gesundheitsbericht 2000. <http://www.gbe.de>.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., II, J. N. D., Cassarino, D. S., Trimmer, P. A., Currie, L. J., Dougherty, J., Bridges, W. S., Bennett, J. P., Wooten, G. F., und Parker, W. D. (1998): Matrilineal inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family. *Am Neurol Assoc.*, 44:1998.

- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Miller, S. W., Tuttle, J. B., Trimmer, P. A., Sheehan, J. P., Bennett Jr., J. P., Davis, R. E., und Parker Jr., W. D. (1996): Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Am Neurol Assoc.*, 40:663–671.
- Tanner, C. M., Ottman, R., Goldmn, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., und Langston, J. W. (1999): Parkinson disease in twins - an etiologic study. *J. Am. Medic. Assoc.*, 281:341–346.
- Truesdale, G. A. und Downing, A. L. (1954): Solubility of Oxygen in Water. *Nature*, 173:1236.
- Vierегge, P., Hagenah, J., Heberlein, I., Klein, C., und Ludin, H.-P. (1999): Parkinson's disease in twins - A follow-up study. *Neurology*, 53:566–752.
- Vierегge, P., Schiffke, K. A., Friedrich, H. J., Müller, B., und Ludin, H. P. (1992): Parkinson's disease in twins. *Neurology*, 42:1453–1461.
- Wallace, D. C. (1992): Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.*, 242:1427–1430.