

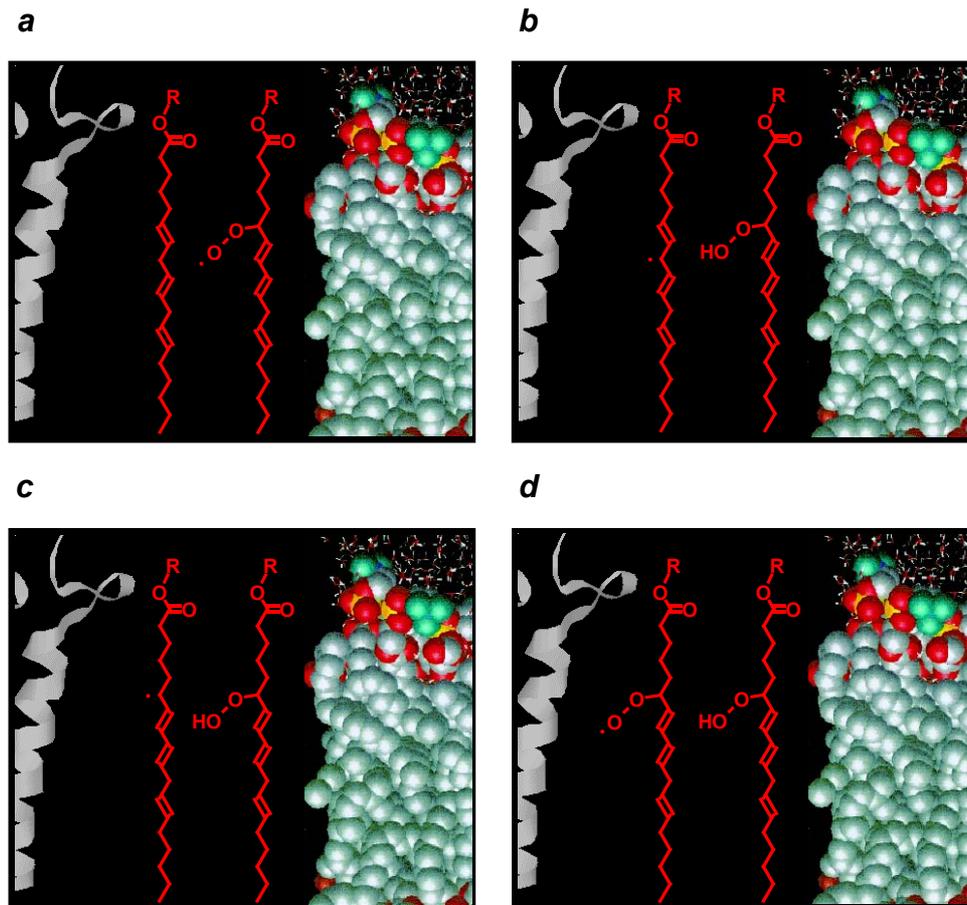
## 4 Diskussion und Perspektive

### 4.1 Membranproteine als atypische Antioxidantien und cytoprotektive Strukturen

Eine große Zahl von phenolischen Verbindungen zeigt unter gewissen Voraussetzungen antioxidativ cytoprotektive Wirkungen in biologischen Systemen, insbesondere auch in der experimentellen Zellkultur. Während bei komplexen Polyphenolen wie den Flavonoiden spezielle strukturelle Bedingungen gegeben sein müssen, damit antioxidative Wirkungen beobachtet werden können, die sich mit der Notwendigkeit der energetisch günstigen Stabilisierung eines transient gebildeten Antioxidansradikals erklären lassen, scheint dieses quantenchemisch-energetische Problem bei einfachen Monophenolen in der Regel nicht aufzutreten (van Acker *et al.*, 1996; Lien *et al.*, 1999, Ishige *et al.*, 2001). Berechnungen und Messungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung bei einfachen Phenolen haben oft die Bevorzugung, doch nicht die Notwendigkeit eines speziellen Substitutionsmusters der Monophenole gefunden, wie beispielsweise der p-Alkoxy-Substitution im Tocopherolmolekül (Burton *et al.*, 1980; van Acker *et al.*, 1993; Moosmann und Behl, 1999). Ein für cytoprotektive Wirkungen jedoch häufig als unerlässlich beschriebener Molekülaspekt ist eine hohe Lipophilie und mithin die Schlußfolgerung, daß der Wirkort cytoprotektiver Antioxidantien die Lipidmembran ist (Moosmann *et al.*, 2001). Die Bedeutung des Lipidankers für die antioxidativen Wirkungen unter anderem von Tocopherol (Vitamin E) und Ubichinon sowie für deren intramembranäre Topologie ist in detaillierten Studien charakterisiert worden, und die übereinstimmende Interpretation dieser Untersuchungen geht von einer sterischen Anordnung dieser Substanzen in der Membran aus, bei welcher der Lipidanker in den sehr hydrophoben Kernbereich der Membran ragt, die phenolischen Gruppen sich jedoch im Bereich der Lipidkopfgruppen befinden (Niki *et al.*, 1985; Di Bernardo *et al.*, 1998; Noguchi und Niki, 2000; Nohl *et al.*, 2001). Für niedermolekulare cytoprotektive Antioxidantien und deren radikaliserbare Kopfgruppen wird also genau diejenige topologische Anordnung in der Membran angenommen, die auch für die radikaliserbaren Seitengruppen integraler Membranproteine vorliegt. Die in Tabelle 1 zusammengefaßte Untersuchung zur Struktur-Wirkungs-Beziehung von Tyrosin- und Tryptophanderivaten als Antioxidantien kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, daß ein Lipidanker eine essentielle Voraussetzung für verschiedenartige cytoprotektive Funktionen dieser Aminosäuren darstellt, und die Schlußfolgerung, daß auch Membranproteine eine atypische, weil makromolekulare Form von cytoprotektiven Antioxidantien darstellen, wird schließlich dadurch untermauert, daß in Membranproteinen die hydrophoben Reste der

benachbarten Aminosäuren der jeweiligen Transmembranhelix oder alternativen Transmembransekundärstruktur diesen Lipidanker darstellen. Überdies zeigen die durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärten Proteinstrukturen verschiedener integraler Membranproteine, daß die diskutierten transmembranären Tyrosin- und Tryptophanreste nicht im Inneren der Transmembrandomäne verborgen sind (was auch nur bei *multi-span* Transmembranproteinen möglich wäre), sondern in die Lipiddomäne hinausragen. Somit erscheint die Wahl und Synthese von Aminoacyllipiden wie in Abbildung 5 dargestellt als relevant und zulässig zur Modellierung des Redoxverhaltens von Membranproteinen in zellulären Membranen.

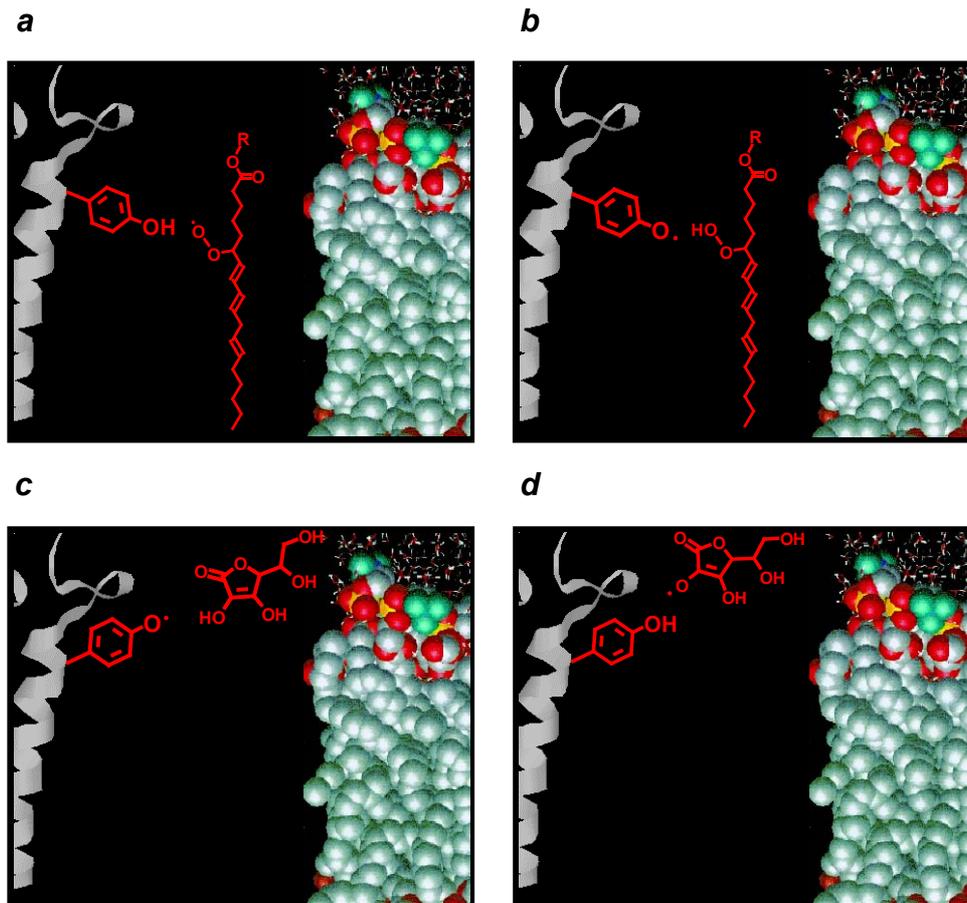
Lipophile, cytoprotektive Antioxidantien wie Tocopherol und Estrogen bewirken ihren direkten cytoprotektiven Effekt, der von anderen Effekten dieser Verbindungen wie den genomischen Effekten im Falle des Estrogens (Behl *et al.*, 2000) oder modulatorischen Effekten an der Proteinkinase C im Falle des Tocopherols (Ricciarelli *et al.*, 2001) klar unterscheidbar ist, vermutlich durch die Inhibition der Lipidperoxidation. Diese radikalische Kettenreaktion, deren Verlauf in Abbildung 15 dargestellt ist, entfaltet insbesondere durch ihre im Verhältnis zu wäßrigen Radikalkettenreaktionen geringe Abbruchrate ein hohes zerstörerische Potential, da ein einzelnes Initiatorradikal zur chemischen Transformation einer großen Zahl and Lipiden führen kann.



**Abbildung 15.** Verlauf der membranären Lipidperoxidation.

Die Lipidperoxidation ist eine Kettenreaktion freier Radikale, die unter Verbrauch von gelöstem Sauerstoff und ungesättigter Membranlipide zur Bildung von Lipidhydroperoxiden führt. Am Beispiel von Linolensäure als Substrat und einem Alkylperoxyradikal als Initiatorradikal sind die molekularen Vorgänge exemplarisch verdeutlicht. **a**, ein Initiatorradikal trifft auf ein Substratmolekül, worauf dieses ein Wasserstoffradikal aus einer bis-allylischen Position abgibt und das Initiatorradikal zum Lipidhydroperoxid reduziert (**b**). Bis-allylische Positionen sind aufgrund ihrer mesomeren Stabilisierung bevorzugte Nucleophile für die radikalische Wasserstoffabstraktion. Das gebildete Radikal lagert sich zu einem Dienylradikal um (**c**), welches mit gelöstem Sauerstoff ein Dienylperoxyradikal bildet (**d**). Dieses Radikal ist in der Lage, weitere Membranlipide anzugreifen (**a**).

In Abbildung 16 ist ein Mechanismus postuliert, nach welchem die Tyrosin- und Tryptophanreste integraler Membranproteine mit der Propagation der Lipidperoxidationsreaktion interferieren könnten, und der wesentliche strukturelle Merkmale der Membranproteine sowie der Chemie von Tyrosin (Phenol) und Tryptophan (Indol) berücksichtigt.



**Abbildung 16.** Der postulierte Mechanismus der Verhinderung der membranären Lipidperoxidation durch integrale Membranproteine.

Das Alkylperoxyradikal aus Abbildung 15 trifft anstelle eines ungesättigten Lipids auf einen proteinischen Tyrosinrest (*a*), von welchem es ein Wasserstoffradikal abstrahiert (*b*). Das deutlich reaktionsträgere tyrosinische Phenoxyradikal hat eine hinreichende Lebensdauer, um durch eine diffusorische Änderung seiner relativen räumlichen Position in den wasserreichen Bereich der Membran einzudringen, in welchem hydrophile Reduktantien wie Ascorbat vorliegen (*c*). Durch eine Redoxreaktion mit dem Ascorbatmolekül wird der Tyrosinrest wieder reduziert (*d*), wohingegen das Ascorbylradikal im wäßrigen Kompartiment beispielsweise von der NADH-abhängigen Semidehydroascorbat-Reduktase rereduziert wird. Durch einen Durchlauf dieses Reaktionszyklus wird ein ansonsten zur Propagation fähiges membranäres Radikal so reduziert, daß eine weitere Propagation unterbunden wird.

Die antioxidativen Eigenschaften von membranständigen Tyrosin- und Tryptophangruppen könnten sich aus dem speziellen Vermögen von phenolischen und indolischen Gruppen erklären, innerhalb der Lipidmembran als Donoren von Wasserstoffradikalen an Peroxyradikale oder andere radikalische, die Lipidperoxidation initiiierende oder aufrechterhaltende chemische Spezies zu dienen und dadurch Peroxidationskaskaden in der

Lipidmembran zu verhindern. Die Eigenschaft zur Wasserstoffabgabe besitzen Phenylalanin oder andere in Transmembrandomänen häufig vorkommende Aminosäuren nicht. Die Tyrosin- und Tryptophanreste selbst würden dadurch zu relativ unreaktiven Phenoxyl- und Indolylradikalen oxidiert, was demselben Mechanismus entspräche, der für die antioxidativen Wirkungen von Tocopherol und Estrogen angenommen wird (Burton *et al.*, 1980; Sies und Murphy, 1991; Behl *et al.*, 1997). In humanem Blutplasma sind nach Peroxynitritbelastung proteinische Radikale, die sich ausschließlich auf die spezifische Radikalisierung von Tyrosin und Tryptophan zurückführen ließen, direkt durch ESR-Spektroskopie nachgewiesen worden (Pietraforte und Minetti, 1997a,b). Zur induzierten Radikalisierung von Membranproteinen findet sich jedoch keine ESR-spektroskopische Literatur.

Die Rereduktion von oxidierten, radikalisierten Membranantioxidantien erfolgt in biologischen Membranen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch wasserlösliche Reduktantien wie Ascorbat oder verschiedene Thiole, die auch ohne enzymatische Unterstützung zu einer solchen Redoxreaktion in der Lage zu sein scheinen (Sies und Murphy, 1991; Bisby und Parker, 1995; Bohm *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus könnte auch für Membranproteine zutreffen, und er würde mechanistisch die spezifische Lokalisation von Tyrosin und Tryptophan im Bereich der inneren Kopfgruppen der Lipidmembran (in Zone 2 nach Tieleman *et al.*, 1997; siehe Einleitung) als sehr günstig erscheinen lassen. Durch diese Lokalisation wären Tyrosin und Tryptophan in der Lage, alternierend sowohl mit den hydrophoben Kernbereichen der Membran (Zone 3), in denen sich die höchste Dichte an ungesättigten Valenzen der Lipide befindet, in Kontakt zu kommen (Abbildung 16a,b), als auch nach erfolgter Radikalisierung in den wässrigen Bereich der Membran zu ragen (Zone 1), um dort rereduziert zu werden (Abbildung 16 c,d).

Die Lipidmembran ist eine nicht nur lateral, sondern auch orthogonal zur Membranebene außerordentlich dynamische Struktur, wie eine große Anzahl an theoretischen Überlegungen (Jakobsson, 1997; Saxton und Jacobson, 1997; Gil et al., 1998; Killian, 1998) und experimentellen Beobachtungen (Pawagi und Deber, 1990; McIntosh *et al.*, 1996; Marsh und Horvath, 1998) nahelegen. Insbesondere treten orthogonal zur Membranebene mit einer Zeitskala von Nanosekunden Fluktuationen sowohl einzelner Lipide als auch größerer Lipidcluster auf (Jakobsson, 1997; McIntosh *et al.*, 1996), die vermutlich insbesondere auch die Kontaktregion zwischen Membranlipiden und insertierten Membranproteinen betreffen (Shen *et al.*, 1997; Marsh und Horvath, 1998). Infolgedessen wären auch die auf die Membranzone 2 konzentrierten Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan in der Lage, auf dynamische Weise durch orthogonale Diffusion mit den ungesättigten Alkylketten in Zone 3 der Lipidmembran in Kontakt zu kommen.

Die Gerichtetheit des postulierten Prozesses wäre zum einen durch die gegenüber beispielsweise Alkylperoxyradikalen deutlich höhere Stabilität von Phenoxyl- und Indolyradikalen gegeben, zum anderen durch das Gleichgewicht zwischen oxidierten zu reduzierten wäßrigen Reduktantien sichergestellt, welches von der Zelle strikt reguliert wird, mit einem hohen Überschuß an reduzierter Form (Sies, 1999). Der Prozeß würde insbesondere auch dadurch erleichtert, daß die radikalisierten Formen von Tyrosin und Tryptophan ein deutlich höheres Dipolmoment und mithin eine höhere Polarität als Tyrosin und Tryptophan selbst aufweisen, was im Rahmen der gegebenen Diffusionsfreiheitsgrade dazu führen würde, daß sie nach ihrer Radikalisierung im Endeffekt eine Veränderung ihres gemittelten Aufenthaltsortes in der Membran erfahren würden. Im Falle von 4-Methylphenol, welches als Modell für die Seitenkette des Tyrosins dienen kann, steigt durch die Radikalisierung das berechnete Dipolmoment von 1,23 auf 4,08 Debye, und die approximierte Solvatationsenergie in Wasser bezüglich des Vakuums steigt von 26,1 auf 41,4 kJ/mol. Diese Veränderungen in der Lyophilie würden mit zur Irreversibilität des postulierten Prozesses beitragen.

Nach ihrer Rereduktion durch wäßrige Reduktantien hätten Tyrosin und Tryptophan einen vollständigen Zyklus eines gerichteten Spintransfers aus der Membran ins wäßrige Kompartiment katalysiert. Der biologische Sinn dieses Transfers bestünde zum einen darin, Radikale aus einem Bereich hoher Propagationsraten radikalischer Kettenreaktionen in einen Bereich geringerer Propagationsraten zu übertragen; zum anderen liegen im wäßrigen Kompartiment eine Fülle enzymatischer Reduktionssysteme wie Ascorbat-Reduktase und Glutathion-Reduktase vor, die selbst letztendlich ebenfalls durch im Wäßrigen vorliegendes, aus dem Energiestoffwechsel stammendes NAD(P)H rereduziert werden müssen.

Außer der Reduktion durch wäßrige, oxidierbare Moleküle sind jedoch auch noch alternative Mechanismen des Recyclings sowie auch der Relaxation des Radikalzustandes durch intramolekulare oder intermolekulare Dimerisierungsreaktionen oder Umlagerungsreaktionen, letzteres insbesondere im Falle des Tryptophans, denkbar. Während die Reduktion durch andere membranäre Antioxidantien wie Tocopherol, die ebenfalls auf Rereduktion durch wäßrige Moleküle angewiesen sind, eine für die Cytoprotektion durchaus sinnvolle Reaktion sein könnte, sind jedoch auch andere, potentiell die Funktionalität der Zelle unterminierende Reaktionswege wie die oxidative Tyrosin-Dimerisierung bekannt. Für den Fall des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) wurde gezeigt, daß membranängige Oxidantien wie Peroxynitrit in Zellen mit hoher Rezeptorexpression zu einer Rezeptor-Dimerisierung vermutlich durch Dityrosin-Bildung führen können (van der Vliet *et al.*, 1998). Es ist zu erwarten, daß solche Reaktionswege mit sinkender Konzentration an Antioxidantien in der wäßrigen Phase an Bedeutung zunehmen werden, da sich die Lebensdauern der intermediären Tyrosinyl- und Tryptophanyl-Radikale dann möglicherweise stark erhöhen könnte. Das genaue Schicksal der membranären Radikale des Tyrosins und Tryptophans hängt somit wohl von einer Fülle von lokalen biochemischen Faktoren ab, und der oben postulierte Kreisprozeß der Rereduktion durch wäßrige Reduktantien stellt höchstwahrscheinlich nur eine der in biologischen Membranen realisierten Alternativen dar.

Membranproteine könnten jedoch insbesondere unter Bedingungen, die mit einem Mangel an oder der Abwesenheit von membranären niedermolekularen Antioxidantien verbunden sind, eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität der Lipidmembran spielen. Zum einen träfe dies beispielsweise zu auf einzellige Spezies, die nicht zur Synthese von Tocopherol oder anderen potenten niedermolekularen Antioxidantien in der Lage sind. Zum anderen könnte die antioxidative Funktion von Membranproteinen auch mit zelltypspezifischen Vulnerabilitäten gegenüber Oxidantien in höheren Lebewesen korreliert

sein. Mit Bezug auf das Nervensystem, den lipidreichsten Gewebetyp des Menschen nach dem Speicherfettgewebe, ist beispielsweise gezeigt worden, daß sich der Gesamtproteingehalt von Medulla, Pons und Cerebellum nur in geringem Maße zwischen einem Lebensalter von 45 Jahren und 90 Jahren unterscheidet. Die membranreiche weiße Materie halbiert jedoch in dieser Zeit ihren Proteingehalt und vergrößert auch deutlich ihr Verhältnis von Phospholipiden zu Proteinen (Söderberg *et al.*, 1990). Ebenfalls erhöht sich in dieser Zeit das Ausmaß der Lipidperoxidation in der weißen Materie deutlich (Chia *et al.*, 1983). Schließlich liegen auch Befunde vor, daß sich der Proteingehalt in der betroffenen weißen Materie des Frontallappens bei Demenzpatienten vom Alzheimer-Typ noch deutlicher verringert als bei entsprechenden Kontrollen (Söderberg *et al.*, 1992). Ob diese korrelativen Beobachtungen in sehr komplexen Systemen jedoch in der Lage sind, auf eine gegebene Kausalität hinzuweisen, wie zum Beispiel darauf, daß ein niedriger Membranproteingehalt in neuronalen Membranen deren Vulnerabilität für möglicherweise pathologisch ursächliche Oxidantien erhöht, ist allerdings noch nicht völlig sicher.

#### **4.2 Peptide als Antioxidantien des extrazellulären Raums**

Trotz der überragenden Bedeutung der Lipophilie bei Antioxidantien zur direkten Cytoprotektion sind radikalische Prozesse und unkontrollierte Oxidationen insbesondere auch durch nicht-radikalische Elektrophile auch außerhalb des membranären Kompartiments von großer Bedeutung, beispielsweise bei der Entstehung einer Reihe von pathologischen Befunden des Extrazellulärraumes. Die Oxidation der LDL-Blutfettbestandteile wird mit als ursächlich für den atherosklerotischen Prozeß angesehen (Heinecke, 1999), oxidative Modifikationen von Augenlinsenproteinen beeinflussen deren Aggregationsverhalten, was bei der Entstehung von Katarakten ein Rolle spielen könnte (Christen, 1999), und oxidative Quervernetzungen von Kollagen bedingen nicht nur dessen Reifung, sondern sind im Übermaß bei Diabetes und arthritischen Veränderungen beobachtet worden (Baynes und Thorpe, 1999).

Die Mutmaßung, daß einige biologische Eigenschaften von Hormonen auf ihrer Radikalchemie basieren könnten, ist relativ alt (Borg, 1972), sie hat jedoch in neuerer Zeit insbesondere durch die Beispiel Melatonin (Reiter, 1995, 1998; Lezoualc'h, 1998) und Estrogen (Mooradian, 1993; Behl *et al.*, 1997) starke Unterstützung erfahren. In beiden Fällen sind potente Antioxidanseigenschaften für diese Hormone beschrieben worden, mit jeweils besonderem Bezug für das zentrale Nervensystem.

Die antioxidativen Eigenschaften von sekretorischen Peptidhormonen erfordern in vitro Konzentrationen in mittleren nanomolaren Bereich, wobei je nach experimentellen Bedingungen auch wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich sein können. Die zirkulierenden Plasma-Niveaux der meisten Peptidhormone liegen deutlich darunter, wie beispielsweise derjenige von Met-Enkephalin (0,2 nM; Clement-Jones *et al.*, 1980). Dennoch erscheinen die lokalen Konzentrationen einiger sekretorischer Peptidhormone in kritischen anatomischen Regionen als durchaus kompatibel mit der Schlußfolgerung, daß auch in vivo Peptidhormone als Radikalfänger fungieren könnten. So liegt Met-Enkephalin im Striatum bei 800 nM (Millan *et al.*, 1981), im Hypothalamus bei 1 µM (Przewlocki *et al.*, 1982), und im spezialisierten sekretorischen Gewebe treten noch weit höhere Konzentrationen auf, so wie 10 µM in der Hypophyse. β-Endorphin liegt dort bei 200 µM (Przewlocki *et al.*, 1982). Darüberhinaus erfordern auch manche Peptidhormone in vitro ebenfalls relativ hohe Konzentrationen, um spezifische hormonelle Prozesse hervorzurufen. FSHRF stimuliert die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon in Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 µM, LHRH erfordert 2 - 20 nM Konzentration, um zur Freisetzung von Luteinisierendem Hormon zu führen (Yu *et al.*, 1997). Man kann außerdem eine Additivität des Effektes verschiedener Peptide in demselben biologischen Kompartiment annehmen. Bezüglich des Gesamtorganismus ist jedoch davon auszugehen, daß die antioxidativen Eigenschaften der Peptidhormone im Sinne einer Schutzfunktion sich auf spezielle anatomische Bereiche wie die neurosekretorischen Kerne konzentrieren.

Von besonderem Interesse könnte jedoch das chemische Schicksal oxidierter Peptidhormone sein, die aus der Interaktion mit von der Zelle zur Signalübermittlung benutzten Radikalen hervorgehen. Eine große Zahl von biologischen Prozessen wird durch radikalische Spezies mit angenommenem Signalcharakter vermittelt oder moduliert, wobei die Zahl der bekannten direkten Zielstrukturen für diese Radikale eher gering ist (Lander, 1997; Maher und Schubert, 2000). Peptidhormone könnten eine solche Zielstruktur sein, was durch die folgenden Überlegungen plausibilisiert wird.

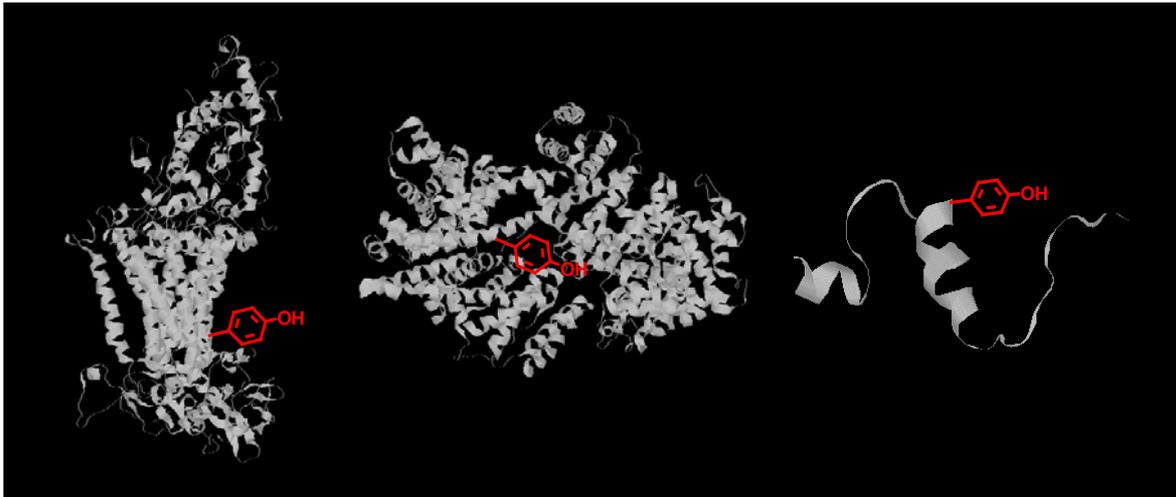
Biologisch sinnvolle Zielstrukturen sollten über einen Mechanismus verfügen, die in ihnen induzierte chemische Veränderung als Signal zu verstärken. Dementsprechend sind die bislang am besten charakterisierten Zielstrukturen Ionenkanäle (Lipton *et al.*, 1998) oder Proteine und Rezeptoren, die an kritischer Stelle in zelluläre Signalkaskaden involviert sind (Lander, 1997; van der Vliet *et al.*, 1998; Buchczyk *et al.*, 2000). Dieses trifft sicherlich auch für Hormone zu.

Peptidhormone erfüllen die strukturellen Voraussetzungen, um bevorzugt nitriert zu werden. Auch wenn es keine besonders stringenten Strukturbeziehungen zwischen der Umgebung eines Tyrosinrestes und seiner Nitrierungshäufigkeit zu geben scheint, so werden doch generell Solvens-exponierte Tyrosine auf flexiblen Peptidschleifen in Proteinen deutlich bevorzugt nitriert (Souza *et al.*, 1999). Diese Bedingungen sind in besonderer Weise in Peptidhormonen wie den in Tabelle 3 aufgeführten realisiert.

Radikalische Signalmoleküle sind intrazelluläre, sekundäre Effektoren für Peptidhormone. Angiotensin II beispielsweise stimuliert die funktionelle Superoxidproduktion in vaskulären Muskelzellen (Griendling *et al.*, 1994). Andererseits ist bereits bekannt, daß Angiotensin II nach in vitro-Nitrierung an seinem Tyrosinrest seine vasokonstriktorisches Eigenschaften verliert (Ducrocq *et al.*, 1998). Dies könnte man als einen sinnvollen Rückkopplungsmechanismus interpretieren, wenn die Nitrierung in vivo durch aus vasorelaxierendem Stickstoffmonoxid und Superoxid entstandenem Peroxynitrit zustande käme. Ein weiteres Beispiel könnte LHRH sein. Sekretorische Nervenendigungen von LHRH-sezernierenden Neuronen liegen direkt benachbart zu Stickstoffmonoxid-freisetzenden Neuronen im Hypothalamus, die die pulsatile LHRH-Freisetzung steuern (Rettori *et al.*, 1993). Ob es jedoch auch in vivo eine direkte Interaktion zwischen Stickstoffmonoxid und LHRH gibt, ist noch offen.

Kurze Peptide wie die sekretorischen Peptidhormone unterscheiden sich in der elementaren Chemie ihrer Bestandteile nicht von größeren, globulären Proteinen, dennoch zeigen sie in verschiedenen Experimenten auch bezogen auf identische zahlenmäßige Molekülkonzentrationen deutlich höhere antioxidative Wirkungen (Abbildung 14), was infolgedessen auf Eigenschaften der Sekundärstruktur dieser peptidischen Strukturen zurückzuführen sein muß, da sich die chemischen Eigenschaften der Primärstrukturkomponenten ja nicht unterscheiden. Es erscheint beispielsweise einsichtig, daß globuläre, wasserlösliche Proteine zumindest nicht als direkte Inhibitoren der Membranlipidperoxidation fungieren können. Dieses Bild läßt sich aber noch weiter generalisieren, indem man sich die Strukturprinzipien von Membranproteinen, globulären Proteinen und kurzen Peptiden verdeutlicht. Wie in Abbildung 17 skizziert wird, können Tyrosin und Tryptophan in den Transmembrandomänen von Membranproteinen antioxidative Wirkungen entfalten, weil sie nach außen hin in die Lipidmembran hinein exponiert sind. Analog erklärt sich der prononcierte antioxidativ-cytoprotektive Effekt von Tyrosinyl- und Tryptophanyl-lipiden (Abbildung 6,7; Tabelle 1). Globuläre Proteine weisen nur eine sehr

geringe Zahl an exponierten Tyrosinen und Tryptophanen auf und zeigen deswegen nur in sehr begrenztem Maße antioxidative Eigenschaften, soweit sich nicht über spezielle enzymatisch-antioxidative Funktionen verfügen. Kurzkettige Peptide jedoch zeigen durch ihren Gehalt an Solvent-exponierten Tyrosinen und Tryptophanen und auch durch ihre Diffusionsfähigkeit beispielsweise in lipidisch-wässrige Grenzflächen hinein eine Reihe von ausgeprägten antioxidativen Effekten (Abbildung 17).



**Abbildung 17.** Vermutete Bedeutung der Struktur eines Tyrosin- oder Tryptophan-tragenden Proteins für dessen antioxidativen Effekt.

In den Transmembrandomänen von Membranproteinen sind Tyrosin- und Tryptophanreste in hoher Zahl vorhanden und sind nach außen in die umgebende Lipidmembran hinein exponiert. Sie können deshalb als Membranantioxidantien dienen. In globulären Proteinen liegen die hydrophoben aromatischen Aminosäuren meist außerhalb des Kontakts mit dem umgebenden wässrigen Medium, weswegen sie nicht bevorzugt mit radikalischen Spezies reagieren. Kurze Peptide sind hingegen zu klein, um eine hinreichend stabile und große Sekundärstruktur zur Abschirmung ihrer aromatischen Reste auszubilden; sie zeigen deshalb eine relativ hohe Reaktivität gegenüber auch wässrigen Radikalen. Die Strukturen sind in unterschiedlichen Maßstäben dargestellt.

#### **4.3 Tyrosin- und tryptophanhaltige Peptide und Lipide als antioxidativ wirkende Pharmaka für den Einsatz bei mit oxidativem Streß verbundenen Erkrankungen**

Oxidativer Streß wird mit einer Fülle von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, mit Autoimmun- und Infektionskrankheiten und insbesondere mit degenerativen Erkrankungen des Nervensystems in Verbindung gebracht (Behl, 1997; Halliwell, 2001). Die zelluläre Dysregulation des Gleichgewichts zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies und ihrem Abbau scheint ein generelles Phänomen insbesondere bei vielen altersassoziierten degenerativen und mit graduellem funktionalem Zellverlust verbundenen Erkrankungen zu sein (Harman, 1998). Diese Beobachtung wird durch eine Vielzahl von

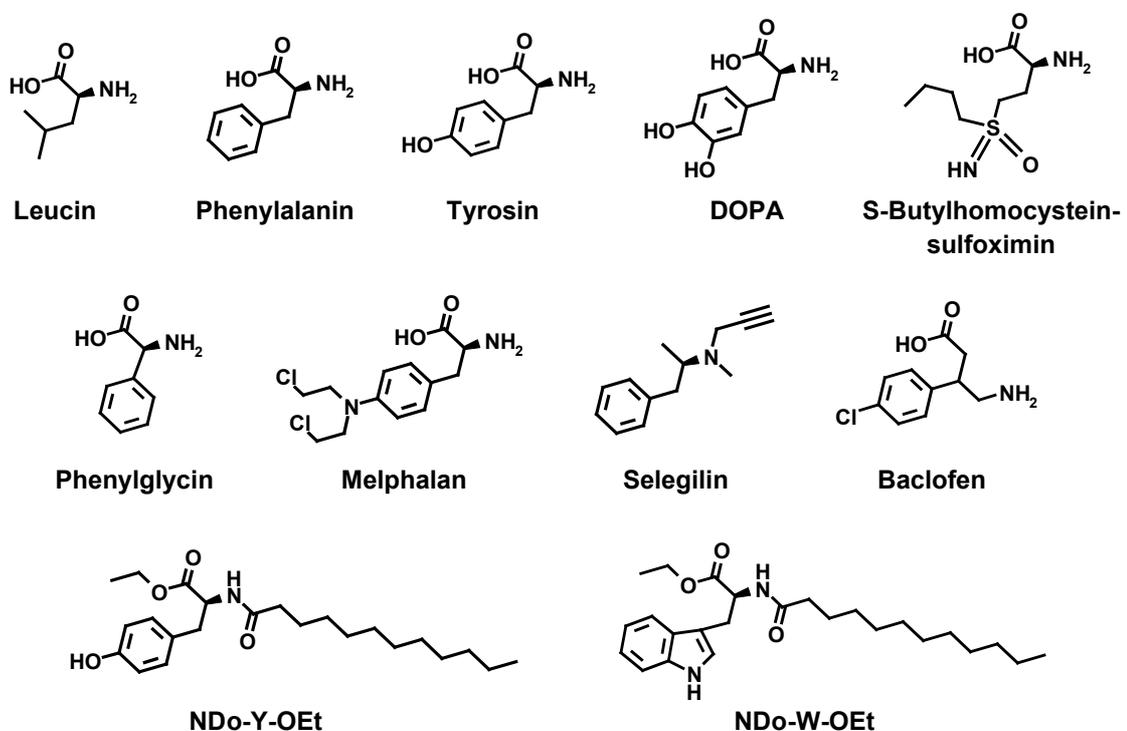
experimentellen Ansätzen plausibilisiert, die oxidativen Streß nicht nur als Folge, sondern vielmehr als Ursache des Alterungsprozesses interpretiert haben. Die Hypothese vom Altern vielzelliger, differenzierter Organismen als Folge von oxidativem Streß (Beckman und Ames, 1998) ist in der Lage, eine Reihe der generellen Aspekte des biologischen Alterungsprozesses in Beziehung zueinander zu setzen, zum Beispiel die Aspekte der Progressivität, Destruktivität, Universalität und der Inhärenz des Funktionsverlustes beim Altern (Zs-Nagy, 1997; Harman, 2001).

In Übereinstimmung mit dieser Annahme haben eine Reihe von antioxidativ wirksamen Substanzen in verschiedenen Modellen des Alterns eine Verlängerung der durchschnittlichen Lebensdauer erbracht, wobei die durch Supplementation bewirkten Effekte jedoch bei niedrigeren Organismen in der Regel deutlich größer waren als beispielsweise bei Säugern (Sohal *et al.*, 2000). Tocopherol bewirkt bei *Caenorhabditis elegans* eine deutliche Verlängerung der durchschnittlichen Lebensdauer (Harrington und Harley, 1988), zeigt jedoch näherungsweise keine Effekte in Säugern (Morley und Trainor, 2001). Auch die Applikation von Superoxid-Dismutase-Mimetika war eine erfolgreiche antioxidativ-lebensverlängernde Strategie in Nematoden (Melov *et al.*, 2000), was damit übereinstimmt, daß die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) als der am besten mit der durchschnittlichen Lebensdauer einer Spezies korrelierende antioxidative Parameter gilt (Tower, 2000). Die Überexpression von humaner SOD in *Drosophila melanogaster* hat zu einer deutlichen Lebensverlängerung dieser Fliegen geführt, und zwar auch dann, wenn die Expression auf Motorneurone beschränkt war (Parkes *et al.*, 1998). Nullmutanten für die endogen exprimierte SOD zeigten eine deutlich verkürzte Lebensspanne, die durch humane SOD, exprimiert in den Motorneuronen, auf das Normalmaß zurückgeführt wurde. Tiermodellen mit veränderter SOD kommt insbesondere deshalb große Bedeutung bei, weil funktionserweiternde Mutationen in der Cu/Zn-SOD als Ursache für einen Teil der familiären Fälle der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), einer im Erwachsenenalter auftretenden degenerativen Erkrankung der Motorneurone im Motorcortex und Rückenmark, identifiziert worden sind (Rosen *et al.*, 1993). Auch in einem transgenen Mausmodell für die ALS haben pharmakologische SOD-Mimetika deutliche lebensverlängernde Effekte gezeigt (Jung *et al.*, 2001).

Auf solchen biochemischen und tierexperimentellen Erkenntnissen aufbauende klinische Studien mit Antioxidantien haben zum Teil gewisse Erfolge erbracht (Halliwell, 2001; Moosmann und Behl, 2002), wie Tocopherol bei der Alzheimerschen Erkrankung (Sano *et al.*, 1997) und bei ALS (Desnuelle *et al.*, 2001), oder Ubichinon bei der Huntingtonschen

Erkrankung (Huntington Study Group, 2001). Es sind jedoch bei diesen Untersuchungen eine Vielzahl problematischer Aspekte aufgetreten, die nicht nur die klinische Seite betrafen, wie beispielsweise die Nachweisbarkeit von protektiven Effekten, sondern insbesondere auch die pharmakologische Seite (Moosmann und Behl, 2002). Als eine der wesentlichen Herausforderungen an das pharmakologische Moleküldesign zum Einsatz von Antioxidantien bei neurodegenerativen Erkrankungen stellte sich die Passage der Blut-Hirn-Schranke dar (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit charakterisierten Aminoacyllipide könnten auf eine Lösung für dieses Problem hindeuten. Tyrosin- und Tryptophan-haltige Aminoacyllipide sind sehr potente neuroprotektive Antioxidantien (Tabelle 1) und zeigen in etwa eine dem Tocopherol vergleichbare protektive Potenz. Möglicherweise sind sie jedoch auch in erhöhtem Maße Blut-Hirn-Schranken-gängig, da sie von einem Carrierprotein an der Blut-Hirn-Schranke, dem L-System-Carrierprotein für große neutrale Aminosäuren (LNAAC), als Substrat akzeptiert werden könnten. Abbildung 18 zeigt einige pharmakologisch etablierte Substanzen, für deren Transport durch die Blut-Hirn-Schranke der LNAAC verantwortlich ist (Smith, 1993). Tocopherol ist nur in minimalem Ausmaß Blut-Hirn-Schranken-gängig, und auch bei täglicher Substitution im Grammbereich ließen sich beispielsweise die Tocopherol-Spiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit nur um 76 % steigern (Vatassery *et al.*, 1998).



**Abbildung 18.** Die Strukturen einiger endogener sowie pharmakologischer Substanzen, die vom L-System-Carrierprotein für große neutrale Aminosäuren (LNAAC) durch die Blut-Hirn-Schranke gepumpt werden.

Außer einigen endogenen Aminosäuren akzeptiert das LNAAC-Protein auch verschiedenste pharmakologische Moleküle mit nur geringem strukturellem Bezug zu seinen eigentlichen Substraten, wie den Monoaminoxidase-Hemmer Selegilin, das zentrale Muskelrelaxans Baclofen oder das Cytostatikum Melphalan. Auch einige lipophile Derivate von Tyrosin und Tryptophan könnten möglicherweise vom LNAAC-Protein als Substrat akzeptiert und durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden.

Auch im Hinblick auf die Prävention von oxidativen Prozessen im Extrazellulärraum nicht-neuronaler Gewebe gelten phenolische Antioxidantien als eine mögliche pharmakologische Alternative (Noguchi und Niki, 2000). Vergleicht man das antioxidative Potential peptidischer Antioxidantien mit demjenigen einiger etablierter Strukturen wie Melatonin, Estradiol, oder Probucol, so fällt es auf, daß Peptide wie LHRH und einige Derivate hiervon durchaus gleichwertige, partiell sogar überlegene Eigenschaften aufweisen (Abbildung 14), und daß es einzelnen, einfachen Peptiden wie beispielsweise LHRH möglich ist, in verschiedenen Experimenten, die unter anderem sehr unterschiedliche Löslichkeitseigenschaften erfordern, potente antioxidative Eigenschaften zu entfalten (Abbildung 10). Diese Tatsache kombiniert mit der skizzierten Struktur-Wirkungs-Analyse (Abbildung 11) legen nahe, daß peptidische Antioxidantien wie beispielsweise endokrinologisch neutrale Derivate von LHRH eine potentiell interessante pharmakologische Zielstruktur für Extrazellulärraum-Antioxidantien darstellen könnten. Es wird jedoch nötig sein, die involvierten Mechanismen insbesondere bezüglich eines möglichen intra-peptidischen Radikaltransfers zwischen den sich in van-der-Waals-Distanz befindlichen Tyrosin- und Tryptophanresten (Prutz *et al.*, 1980) von LHRH noch genauer aufzuklären, um zu möglicherweise noch effektiveren Substanzen zu gelangen. Aus einem pharmakologischen Blickwinkel betrachtet könnten somit Tyrosinyl- und Tryptophanylpeptide ein biologisch sinnvoller und metabolisch verträglicher Weg sein, um antioxidative phenolische und indolische Gruppen in potentielle Wirkstoffe einzubauen.

#### **4.4 War molekularer Sauerstoff in der Biosphäre die Ursache für das Aufkommen von Tyrosin und Tryptophan als codierten Aminosäuren?**

Eine Reihe voneinander unabhängiger experimenteller Befunde deutet darauf hin, daß Tyrosin und Tryptophan in der bioevolutiven Geschichte des genetischen Codes und der Translationslogik von Nukleotidsequenzen in Peptidsequenzen erst verspätet zu einem bereits früher etablierten Translationssystem hinzugekommen sind (Wong, 1975; Osawa *et al.*, 1992;

Woese *et al.*, 2000). Als wesentliche Belege für eine verspätete Hinzufügung von Tyrosin und Tryptophan sind deren Abweichung von einer ansonsten fast durchgängig aufrechterhaltenen Hydrophobizitäts-Korrelation zwischen Aminosäure und anticodonischem Dinukleotid angeführt worden (Lacey *et al.*, 1992), die Abweichungen von universellen Code für Tryptophan und, in einigen Spezies, auch Tyrosin in Mitochondrien (Osawa *et al.*, 1992), sowie eine Reihe von evolutiv-strukturellen Befunden von Elementen des Translationsapparates. So scheint sich die tRNA<sup>Tyr</sup> von der bereits früher etablierten Struktur der ribosomalen 5S-RNA abzuleiten (Mullins *et al.*, 1973), und auch für die tRNA<sup>Trp</sup> wurde auf Grund struktureller Untersuchungen eine evolutiv späte Anticodon-Zuordnung postuliert (Staves *et al.*, 1987). Auch auf der Ebene der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde auf Grund phylogenetischer Analysen die Schlußfolgerung gezogen, daß sich die heutigen Tyrosinyl- und Tryptophanyl-tRNA-Synthetasen fundamental von den tRNA-Synthetasen der anderen 18 Aminosäuren unterscheiden und möglicherweise erst nach der Trennung von Eubakterien und Zellen mit Zellkern hinzugekommen sind (Ribas de Pouplana *et al.*, 1996). Eine biochemische Plausibilisierung der Sonderstellung von Tyrosin und Tryptophan in evolutiver Hinsicht gibt es bisher nicht.

Sollte es eine wie von diesen Arbeiten geschlußfolgerte, deutlich verspätete Aufnahme von Tyrosin und Tryptophan in den genetischen Code gegeben haben, so muß davon ausgegangen werden, daß ein bedeutender evolutiver Druck existiert haben muß, der der verbreiteten Verwendung (und beispielsweise nicht nur der sporadischen Verwendung als lösliche Coenzyme) der beiden Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan Vorschub geleistet haben muß. Da die Radikalierbarkeit dieser beiden Aminosäuren (mit der Alternative verschiedenartigster Nachfolgereaktionen) deren möglicherweise einzige chemische Eigenschaft ist, die sie beide gemeinsam aufweisen, die sie aber deutlich von allen anderen Aminosäuren unterscheidet, und die durchaus neuartige chemische Möglichkeiten und somit einen klaren und direkten Selektionsvorteil unter bestimmten Umweltbedingungen nach sich gezogen haben könnte, erscheint es denkbar, daß der evolutive Druck zur Verwendung von Tyrosin und Tryptophan im genetischen Code im Aufkommen von Sauerstoff in der Atmosphäre bestanden haben könnte. Plausible evolutive Vorteile wären die Verwendung von permanenten Tyrosylradikalen in der enzymatischen Katalyse, deren Bildung generell sauerstoffabhängig ist (Stubbe und van der Donk, 1998), aber auch die antioxidativen, membranschützenden und cytoprotektiven Eigenschaften von Tyrosin und Tryptophan, die in einer Atmosphäre zunehmenden Sauerstoffgehalts eine Rolle gespielt haben könnten. Ein sehr direktes Beispiel für die Selektionsmechanismen, die potentiell zum Tragen gekommen sein

mögen, liefert der obligate Anaerobier *Porphyromonas gingivalis*. Durch Kontakt mit Luft wird in dieser Spezies eine Fe-SOD induziert. Ohne dieses Enzym sterben die Zellen an Luft binnen von etwa 2 h, mit SOD sind sie über viele Stunden völlig resistent gegenüber Luftsauerstoff (Nakayama, 1994). Es ist auch gezeigt worden, daß für die katalytische Aktivität dieser SOD ein einzelner, konservierter Tryptophanrest, W159, essentiell ist (Yamakura *et al.*, 1998), wobei jedoch noch nicht bekannt ist, auf welcher Funktion des Tryptophanrestes dies beruht. *P. gingivalis* stellt somit ein Beispiel eines an eine sauerstofffreie Umgebung angepaßten Organismus dar, der letztendlich Dank eines einzigen Tryptophanrestes auch in sauerstoffhaltiger Umgebung für längere Zeit überleben kann.

Die Bedeutung des Aufkommens von Sauerstoff in der Atmosphäre und mithin die Bedeutung von zellulärem oxidativem Streß für evolutive Veränderungen wird nicht zuletzt auch durch das Beispiel Selenocystein verdeutlicht. Es gilt als weitgehend akzeptiert, daß Selenocystein eine evolutiv junge, vermutlich die jüngste Aminosäure ist (Gladyshev und Hatfield, 1999). Gleichzeitig fällt es auf, daß sämtliche bekannten Selenoproteine in Redoxreaktionen involviert sind, von denen die meisten nur in aeroben Lebewesen sinnvoll erscheinen, und daß etliche der Selenoenzyme wie die Glutathion-Peroxidase oder die Thioredoxin-Reduktase direkt der antioxidativen Verteidigung gegen oxidativen Streß dienen (Kohrl *et al.*, 2000).

Möglicherweise stellen Tyrosin und Tryptophan somit weitere Beispiele für sehr junge, antioxidativ wirksame Aminosäuren dar, die in der Folge des Aufkommens von Sauerstoff in der Biosphäre hinzugekommen sind.