

## 1 Einführung

Tyrosin und Tryptophan sind zwei aromatische, genetisch codierte Aminosäuren, die eine Reihe struktureller und funktionaler Aufgaben in Peptiden und Proteinen erfüllen und die metabolische Vorläufer für eine Reihe spezieller Funktionsmoleküle in vielzelligen Organismen sind. Sowohl Tyrosin wie Tryptophan gehören in allen Spezies zu den seltener codierten Aminosäuren; im nicht-redundanten Proteom des Menschen, wie es im Januar 2002 im *EMBL – European Bioinformatics Institute* geführt wurde, macht Tryptophan 1,23 % aller Codons aus, Tyrosin 2,68 %, während die dritte codierte aromatische Aminosäure, Phenylalanin, von 3,64 % der Codons codiert wird. Die Varianz der Codonhäufigkeit zwischen verschiedenen Organismen ist dabei beträchtlich; *Borrelia burgdorferi* (0,49 % Tryptophan) und *Mycobacterium tuberculosis* (2,07 % Tyrosin) zeigen die statistisch gesehen niedrigsten Häufigkeiten für jeweils eine dieser beiden Aminosäuren, *Escherichia coli* (1,52 % Tryptophan) und *Sulfolobus solfataricus* (4,82 % Tyrosin) markieren die Höchstwerte innerhalb der 56 im Januar 2002 vollständig sequenzierten und ausgewerteten Arten.

Biosynthetisch leitet sich Tyrosin vom Phenylalanin ab, während Tryptophan aus einer Zwischenstufe der Phenylalaninsynthese entsteht. Tyrosin entsteht direkt aus Phenylalanin in einer Sauerstoff- und Tetrahydrobiopterin-abhängigen Reaktion durch die katalytische Wirkung der Phenylalanin-4-monooxygenase; der Biosyntheseweg zum Tryptophan zweigt von demjenigen zum Phenylalanin bereits auf der Stufe des Chorismats ab, aus dem durch die Anthranilat-Synthase 2-Aminobenzoessäure (Anthranilsäure) entsteht. Eine Kondensation am Stickstoff mit 5-Phosphoribosyl-pyrophosphat liefert nach Isomerisierung und anschließender Cyclisierung den späteren Indolring des Tryptophans in Form der Verbindung 3-Indolylglycerolphosphat. Aus diesem bildet die Tryptophan-Synthase in einer Serin-anhängigen Reaktion Tryptophan. Ebenfalls vom Chorismat leiten sich die redox-aktiven Chinone Ubichinon (Coenzym Q) und Menachinon (Vitamin K<sub>2</sub>) ab; aus Tyrosin entsteht über die Zwischenstufe Homogentisat das Antioxidans Tocopherol (Vitamin E). Darüberhinaus sind die aromatischen Aminosäuren in vielzelligen Spezies Ausgangspunkt der Synthesen zu einer großen Zahl von regulatorischen Molekülen wie Serotonin, Melatonin, und Indolacetat, die aus Tryptophan entstehen, oder Dopamin, Adrenalin, und Thyroxin, die auf Tyrosin aufbauen. Tryptophan ist überdies Startpunkt für die Bildung der Nikotinsäure, einem Bestandteil von des Coenzym Nicotinsäureamid-Adenindinucleotid (NAD). Große quantitative und qualitative Bedeutung besitzen die aromatischen Aminosäuren für die Bildung pflanzlicher Strukturpolymere wie Lignin und einer wichtigen Klasse pflanzlicher

Sekundärmetaboliten, der Flavonoide. Für Säuger sind Tryptophan und Phenylalanin essentielle Aminosäuren.

Eine Besonderheit stellen die vier sich aus Tyrosin und Tryptophan ableitenden Chinon-Redox-Cofaktoren Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ), Tryptophan-Tryptophyl-Chinon (TTQ), Topa-Chinon (TPQ) und Lysyl-Topa-Chinon (LTQ), sowie der Cysteinyl-Tyrosin-Cofaktor (CT) dar, da sie bis auf PQQ *in situ* in den Proteinen, in denen sie final als Cofaktoren dienen werden, durch meist Sauerstoff-abhängige Reaktionen erzeugt werden (McIntire, 1998).

Der zu Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und den Chinonen führende Shikimisäure-Weg und der durch die Reaktion der ebenfalls Sauerstoff-abhängigen Steroid-Aromatase gekennzeichnete Stoffwechselweg zu den Estrogenen stellen die einzigen bekannten biosynthetischen Wege zu C<sub>6</sub>-aromatischen Systemen dar.

Der aromatische Charakter ist der wichtigste Erklärungshintergrund für die speziellen Eigenschaften und die spezielle Verwendung von Tyrosin und Tryptophan in Proteinen und Peptiden. Dennoch ergeben sich signifikante Unterschiede in einigen physikalischen Parametern und den daraus resultierenden chemischen Reaktivitäten im Verhältnis zu Phenylalanin, der aromatischen Aminosäure mit einem unsubstituierten Benzolring in der Seitenkette. Gemeinsam kann man Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan als hydrophobe, aber dennoch polare Strukturen charakterisieren. Eine für biologische Prozesse äußerst wichtige physikalische Eigenschaft dieser Aromaten ist die Ausbildung von Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen (Ma und Dougherty, 1997). Die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung besteht in einer zur Aromatenebene senkrechten Bindung von kationisch geladenen Strukturen über eine hauptsächlich elektrostatische attraktive Interaktion, die aus dem Quadrupolmoment des Aromaten und der Ladung des Kations resultiert. Für Alkalimetallionen und Benzol liegt sie zwischen 16 und 38 kcal/mol (Dougherty, 1996). Ihre hauptsächlich biologische Bedeutung könnte darin liegen, daß sie eine Stabilisierung von kationischen Strukturen auch innerhalb einer hydrophoben Umgebung, beispielsweise in der Lipidmembran oder im Inneren globulärer Proteine, ermöglicht. Prominente Beispiele für die Bedeutung von Kation- $\pi$ -Wechselwirkung sind Proteine, die den kationischen Neurotransmitter Acetylcholin binden, wie die Acetylcholin-Esterase oder die Rezeptoren für Acetylcholin (Hucho und Weise, 2001), oder Kationenkanäle, in deren Transmembranporen der Ionentransport über aromatische Aminosäuren bewerkstelligt werden könnte (Heginbotham und MacKinnon, 1992). Auch Protein-DNA-Wechselwirkungen könnten zum Teil auf Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen beruhen (Wintjens *et al.*, 2000).

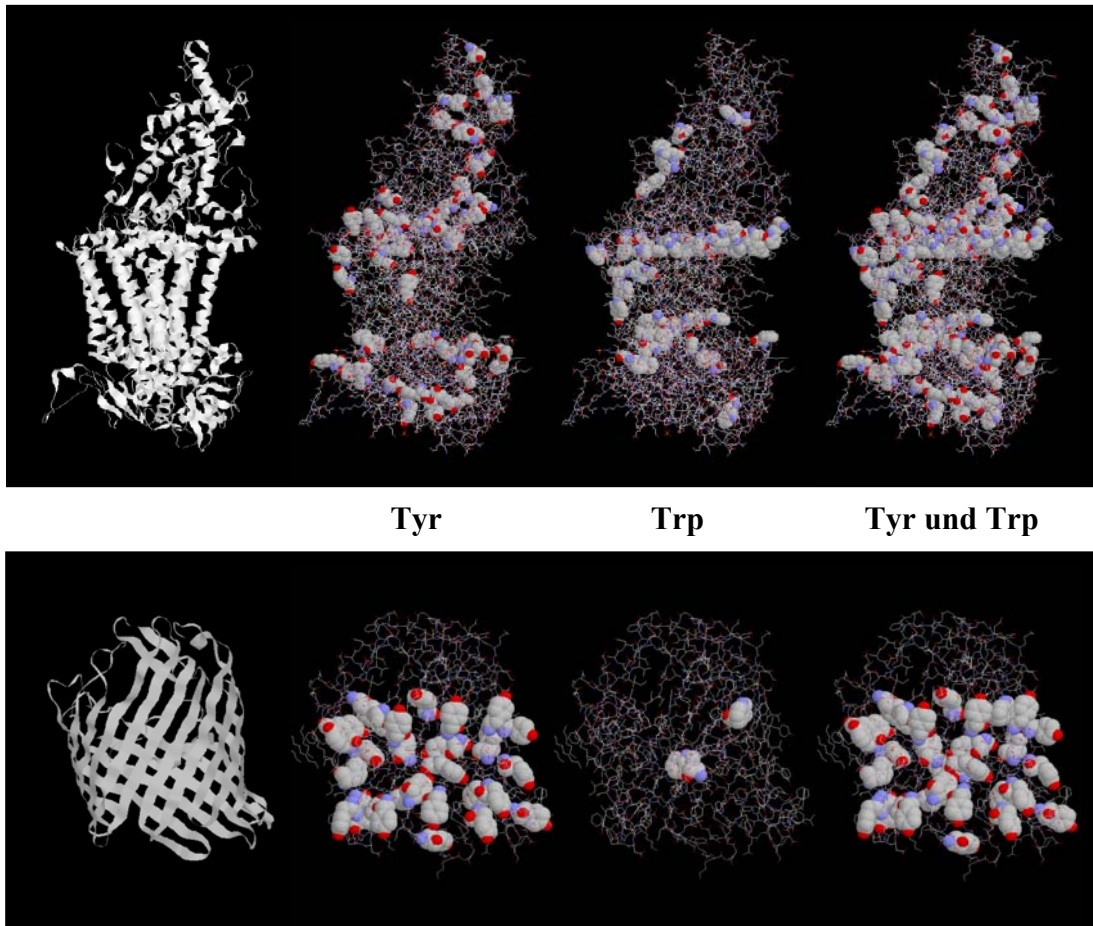
Im Gegensatz zur Kation- $\pi$ -Wechselwirkung, die für alle drei aromatischen Aminosäuren in ähnlicher Größenordnung auftreten kann (Ryzhov *et al.*, 2000), unterscheiden sich Tyrosin und Tryptophan von Phenylalanin insbesondere in ihrer Reaktivität gegenüber Elektrophilen. Während der benzolische aromatische Rest von Phenylalanin gegenüber schwachen und mittelstarken Elektrophilen völlig inert ist, reagieren Tyrosin und Tryptophan mit verschiedenen biologisch relevanten Elektrophilen (Halliwell und Gutteridge, 1999). Die Nitrierung von Tyrosin in der ortho-Position wird beispielsweise als Marker für Peroxynitrit oder das Zusammenkommen von Nitrit und Peroxiden verwendet, und auch die 2-Position des Indolrings wird von sehr unterschiedlichen Elektrophilen als Substrat akzeptiert (Tan *et al.*, 1998; Halliwell und Gutteridge, 1999). Andere biologische Elektrophile, die die ortho-Position des Tyrosins angreifen, sind das Tyrosylradikal selbst oder auch Hypochlorit (Eiserich *et al.*, 1998; Leeuwenburgh *et al.*, 1997; Hensley *et al.*, 1998).

Ein besonderer Unterschied in der Reaktivität von Tyrosin und Tryptophan gegenüber derjenigen von Phenylalanin besteht auch in der Radikalisierbarkeit durch homolytische Dissoziation der aromatischen Heteroatom-Wasserstoff-Bindung, die in Phenylalanin fehlt. Die resultierenden Indolyl- und Phenoxyradikale werden in einigen Enzymen wie der Ribonukleotid-Reduktase oder der mitochondrialen Wasser-Oxidase als eingebaute, katalytische Cofaktoren verwendet, wo sie zum Teil eine Lebensdauer von Tagen oder mehr erreichen können. Im Falle der Ribonukleotid-Reduktase und der DNA Photolyase existieren ganze Ketten von Tyrosin beziehungsweise Tryptophan (und anderen Aminosäuren) zum intraproteinischen Transfer einzelner Elektronen (Jordan und Reichard, 1998; Aubert *et al.*, 2000).

Die Verteilung von Tyrosin und Tryptophan ohne eine spezielle katalytische Funktion in Proteinen und Peptiden läßt sich weitgehend aus dem Hydrophobizitätsmuster erklären, wobei als zusätzliche energetische Elemente noch die Möglichkeit der Donation beziehungsweise bei Tyrosin auch der Akzeption von Wasserstoffbrücken zählen. Während in globulären Proteinen Tyrosin und Tryptophan weitgehend außerhalb des Kontaktes mit dem wäßrigen Solvens vorliegen und vermutlich über Kation- $\pi$ -,  $\pi$ - $\pi$ -, und van-der-Waalssche Wechselwirkungen zur Stabilität des Proteins beitragen (Richardson, 1981), zeigen Transmembranproteine ein sehr signifikantes Muster in der Häufigkeit und Verteilung von Tyrosin und Tryptophan in der Transmembrandomäne.

Statistische Analysen zu den Verteilungsmustern bestimmter Aminosäuren in Membranproteinen zeigen eine deutliche Akkumulation von Tyrosin und Tryptophan in den

Transmembrandomänen unterschiedlicher Klassen von Membranproteinen (Landolt-Marticorena *et al.*, 1993; von Heijne, 1994; Jones *et al.*, 1994). Sowohl in die Membran einfach durchspannenden Proteinen und Proteinen mit mehreren Transmembransegmenten wird beobachtet, daß Tyrosin und Tryptophan mit signifikant erhöhter Häufigkeit insbesondere in einer speziellen Schicht der Membran auftreten, nämlich der Schicht zwischen den polaren Kopfgruppen der Membranlipide und den beginnenden hydrophoben Alkylketten. In der Klassifikation nach Tieleman *et al.* (1997) handelt es sich hierbei um die Zone mit der höchsten Dichte in der Lipidmembran, deren Zusammensetzung vermutlich die Phasenübergangscharakteristik und die Permeabilität der Membran für im Wäßrigen gelöste Substanzen determiniert. Die spezielle Akkumulation von Tyrosin und Tryptophan wird sowohl für Proteine mit  $\alpha$ -Helix-Bündel- als auch für Proteine mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur notiert. Phenylalanin tritt in Membrandomänen zwar auch mit einer leichten statistischen Häufung auf, jedoch weitgehend in den inneren, sehr hydrophoben Bereichen der Membran (den Zonen 3 und 4 nach Tieleman *et al.*). Diese Verteilungsmuster aromatischer Aminosäuren in Membranproteinen scheinen ein generelles Strukturmerkmal darzustellen (Schirmer und Cowan, 1993; Reithmeier, 1995), und sie lassen sich auch direkt anhand der bekannten Kristallstrukturen integraler Membranproteine visualisieren (Cowan *et al.*, 1992; Deisenhofer *et al.*, 1995; Pebay-Peyroula *et al.*, 1997; Wallace und Janes, 1999) (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Akkumulation von Tyrosin und Tryptophan in den Transmembrandomänen integraler Membranproteine.

Es sind die Strukturen des Photosynthetischen Reaktionszentrums aus *Rhodospseudomonas viridis* (obere Reihe) (Deisenhofer *et al.*, 1995) und eines bakteriellen Porins (untere Reihe) (Cowan *et al.*, 1992) mehrfach abgebildet, wobei in einzelnen Darstellungen die Tyrosin- und Tryptophanreste wie indiziert hervorgehoben sind. Die auf die jeweilige Transmembrandomäne beschränkte Akkumulation von Tryptophan im Photosynthetischen Reaktionszentrum und von Tyrosin im bakteriellen Porin sind besonders augenfällig. Die Strukturen wurden aus der *Protein Data Bank* (PDB) übernommen (PDB-Codenummern 1prc und 2omf).

Die Anreicherung von Tyrosin und Tryptophan in Membranproteinen ist mit unterschiedlichen biophysikalischen Modellen anhand meist konkreter Einzelbeispiele von Membranproteinen erklärt worden. Es ist beispielsweise sehr wahrscheinlich, daß Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen bei der Translokation von Kationen funktionell relevant sind (Dougherty, 1996). Es wurde ebenso postuliert, daß Tyrosin und insbesondere Tryptophan einen stabilisierenden Effekt auf die Membranproteinstruktur haben könnten (Schiffer *et al.*, 1992). Diese Überlegung wird auch durch Strukturuntersuchungen zur intramembranären Topologie

von sehr kurzen Transmembranpeptiden wie Gramicidin A nahegelegt (Ketchum *et al.*, 1993). Überdies könnten Tyrosin- und Tryptophanreste bei der Insertion von Membranproteinen eine Rolle spielen (von Heijne, 1994; de Planque *et al.*, 1999). Dennoch sind diese Erklärungsmodelle möglicherweise nicht hinreichend, um die beobachtete, generelle Akkumulation von Tyrosin und Tryptophan zu erklären. Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen treten in ähnlicher Stärke auch bei Phenylalanin auf, welches eine völlig abweichende Transmembranverteilung zeigt. Die Natur der möglicherweise stabilisierenden Wechselwirkung von Tyrosin und Tryptophan ist ebenfalls nicht näher definiert, und es gibt viele Beispiele von einfach die Membran durchspannenden Proteinen, die keinerlei Tyrosin oder Tryptophan aufweisen. Dennoch zeigen auch diese Proteine das beschriebene Akkumulationsmuster (Landolt-Marticorena *et al.*, 1993). Dieses Argument spricht ebenfalls gegen eine spezielle physikalische Rolle dieser Aminosäuren beim Proteininsertionsprozeß, was auch durch experimentelle Untersuchungen bestätigt wird (Ridder *et al.*, 2000). Es könnte somit der Fall sein, daß sich die beobachteten Verteilungsmuster von Tyrosin und Tryptophan in integralen Membranproteinen auch aus einer speziellen biologischen Funktion heraus rekrutieren.

## **1.1 Zielsetzung**

Oxidative Reaktionen in der Lipidmembran spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation membranvermittelter Prozesse. Die Integrität der Lipidmembran, welche auch mit der Aufrechterhaltung eines reduzierten Zustandes ihrer Komponenten gleichgesetzt werden kann, ist für die zelluläre Funktion unabdingbar, und Störungen dieses Zustandes sind vermutlich einer der wichtigsten Aspekte der oxidativen Zelltods, der mit einer Vielzahl von Erkrankungen und dem Alterungsprozeß in Verbindung gebracht wird.

Die Erkenntnis, daß strukturell sehr unterschiedliche lipophile Phenole den durch eine Reihe oxidativer Toxine induzierten Verlust an Zellvitalität und Zellfunktionalität nach einem antioxidativen Mechanismus verhindern können (Moosmann *et al.*, 1997; Moosmann und Behl, 1999), führte zu der Fragestellung, ob die Akkumulation von Tyrosin und Tryptophan in Membranproteinen, welche die endogene Hauptquelle von phenolischen Gruppen in der Membran darstellt, möglicherweise einem ähnlichen physiologischen Zweck dienen könnte. Die Resultate zu dieser Fragestellung sollten auch auf andere peptidische Strukturen angewendet werden, und es sollte untersucht werden, welche generellen Erkenntnisse über die möglichen antioxidativen Funktionen von Tyrosin und Tryptophan und deren biologische Bedeutung gewonnen werden könnten.

Schließlich sollte überprüft werden, ob sich aus den erhaltenen Ergebnissen potentiell auch ein Nutzen für den pharmakologischen Aspekt des Phänomens oxidativer Zelltod ziehen ließe.