

**Die Bedeutung von molekularem Sauerstoff für
die Evolution des genetischen Codes**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Matthias Granold

geb. in Mainz

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2015

Inhalt

1. EINLEITUNG	5
1.1 Der Ursprung des Lebens	5
1.1.1 Organische Moleküle und die Entstehung von Leben	7
1.2 Der genetische Code	10
1.2.1 Entstehung des genetischen Codes	13
1.2.2 Evolution des genetischen Codes	14
1.2.3 Mechanismen der Evolution des genetischen Codes	16
1.2.4 Aminosäureselektion	18
1.2.5 Sukzessive Aufnahme von Aminosäuren in den genetischen Code	21
1.3 Ziele der Arbeit	23
2. MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Chemikalien	25
2.2 Methoden	28
2.2.1 Quantenchemische Berechnungen	28
2.2.2 Analyse des Metabolismus aromatischer Aminosäuren	29
2.2.3 Organische Synthesen	30
2.2.4 Biochemische Methoden	31
2.2.5 Lipidperoxidation	34
2.2.6 Zellkultur	37
2.2.7 Hoechst-Färbung von IMR-90-Fibroblasten	37
3. ERGEBNISSE	39
3.1 Die Quantenchemische Charakterisierung der Aminosäuren	39
3.1.1 Semi-empirische Berechnung der Grenzorbitale	43
3.1.2 <i>Ab initio</i> -Berechnung der Grenzorbitale	46
3.2 Der Shikimatweg und die Synthese aromatischer Aminosäuren	47
3.2.1 Quantenchemische Eigenschaften der redox-aktiven Strukturen	51
3.3 Experimente zur Reaktivität proteinogener Aminosäuren gegenüber Radikalen	53
3.3.1 Reaktion mit dem Peroxylradikal	54
3.3.2 Reaktion mit weiteren Radikalen	55
3.3.3 Radikalisierungsenthalpien der <i>codon capture</i> -Aminosäuren	56

3.4 Lipidperoxidationsexperimente.....	57
3.4.1 Lipidperoxidation in Rattenhirnmembranen	58
3.4.2 Cytotoxizität in humanen Fibroblasten	59
3.5 Die Untersuchung der Tryptophan-Analoga Benzofuranylalanin (BFA) und Benzothiophenylalanin (BTA)	61
3.5.1 Experimenteller Vergleich von Tryptophan und seinen Struktur-Analoga BFA und BTA	62
4 DISKUSSION	66
4.1 Die Bedeutung von molekularem Sauerstoff für die Evolution des genetischen Codes	66
4.2 Die Eigenschaften der Grenzorbitale determinieren das evolutionäre Auftreten von Aminosäuren	67
4.3 Die HOMO-LUMO-Bandlücke ist ein quantenchemisches Korrelat für die biochemische Reaktivität von Aminosäuren	68
4.3.1 Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen	69
4.3.2 Reaktivität gegenüber artifiziellen Radikalen	72
4.4 Tryptophan und Tyrosin verhindern Lipidperoxidation und schützen lebende Zellen vor oxidativem Zelltod.....	74
4.4.1 Die Präferenz von Tryptophan gegenüber BFA und BTA als genetisch selektierte Aminosäure basiert auf der Fähigkeit mit Radikalen zu interagieren	76
4.5 Die Aufnahme redox-aktiver Aminosäuren in den genetischen Code als adaptiver Prozess der biochemischen Evolution	77
4.5.1 Die Oxygenierung der Erde schuf die Voraussetzungen für die Bildung von Sauerstoffradikalen	77
4.5.2 <i>Das Great Oxidation Event</i> formte den modernen genetischen Code	80
4.5.3 Cystein, Methionin, Selenocystein und das <i>Great Oxidation Event</i>	84
4.6 Alternativhypothese: Der Einbau reaktiver Aminosäuren in den genetischen Code vor dem <i>Great Oxidation Event</i>	87
4.7 Die Aufnahme von Tryptophan in den genetischen Code.....	89
5. LITERATURVERZEICHNIS	92
6. ZUSAMMENFASSUNG	102
7. ABSTRACT	104
8. ANHANG	106

8.1	Abbildungsverzeichnis	106
8.2	Tabellenverzeichnis	107
8.3	Lebenslauf	108
8.4	Eigene Publikationen	109
8.5	Danksagung	110

1. Einleitung

1.1 Der Ursprung des Lebens

Die Erde ist vor 4,54 Milliarden Jahren durch Akkumulation von interstellarem Gas und Staub entstanden (Manhes et al., 1980). Aufgrund astronomischer, geologischer sowie biologischer Phänomene und Ereignisse lässt sich die Geschichte der Erde in verschiedene Erdzeitalter (Äonen) unterteilen (Abb. 1).

Zu Zeiten des Hadaikums bildete sich vor etwa 4,3 Milliarden Jahren durch das Ausgasen von Wasserdampf, Schwefeldioxid, Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und anderen Gasen, die im Zuge von Vulkanausbrüchen in die Erdatmosphäre gelangten, eine Hydrosphäre und damit ein Urozean, der die Grundlage für die Entstehung von Leben schuf (Cavosie et al., 2005). Der Ursprung und die Evolution des Lebens auf der Erde stellen eines der größten Rätsel der Evolutionsbiologie dar. Untersuchungen von Sedimentgestein mittels Uran-Blei-Datierung lassen auf eine biologische CO₂-Fixierung und demnach einem Auftreten erster Organismen während des Archaikums vor circa 3,8 Milliarden Jahren schließen (Mojzsis et al., 1996; Rosing, 1999). Erste Mikrofossilien konnten in 3,5 Milliarden Jahren altem Gestein nachgewiesen werden (Schopf, 1993). Somit entstand das Leben nach dem sogenannten Großen Bombardement, das von terrestrischen Einschlägen von Asteroiden und anderen Himmelskörpern geprägt war und sich vor 4,1 bis 3,8 Milliarden ereignete (Chyba and Sagan, 1992).

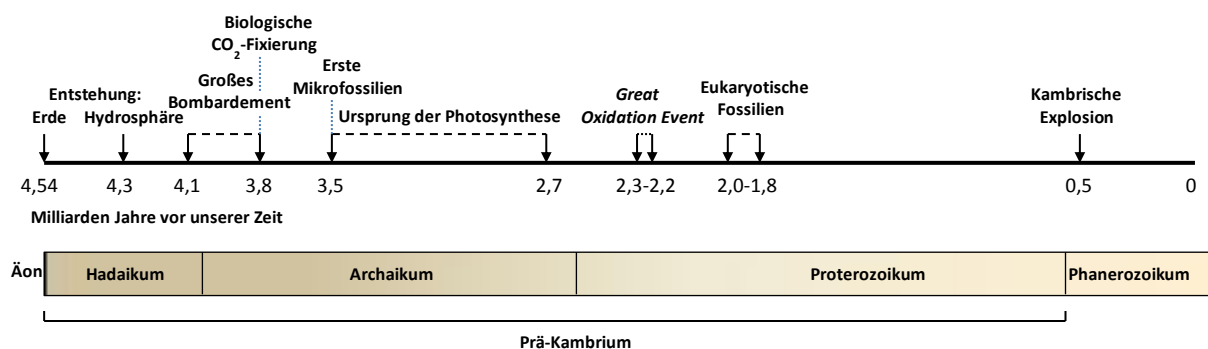


Abb. 1 Erdzeitalter (Äonen) und die Entstehung von Leben. Die Erde entstand vor 4,54 Milliarden Jahren während des Hadaikums. Erste Lebensformen traten vermutlich nach Bildung der Hydrosphäre und dem Großen Bombardement vor 3,8 bzw. 3,5 Milliarden Jahren während des Archaikums auf. Vor spätestens 2,7 Milliarden Jahren entstanden die ersten sauerstoffproduzierenden Cyanobakterien, die einige Millionen Jahre später das Great Oxidation Event zu Zeiten des Proterozoikums verursachten. In diesem Äon evolvierten auch die ersten Eukaryoten. Aus der Kambrischen Explosion vor ca. 540 Millionen Jahren, die das Ende des Prä-Kambriums und den Beginn des Phanerozoikums markiert, resultiert die moderne Vielfalt der Pflanzen- und Tierwelt.

Es ist bis heute umstritten, in Form welcher Organismen das Leben seinen Anfang nahm. Die Ergebnisse der beschriebenen Uran-Blei-Datierung lassen auf einen autotrophen Organismus schließen, wobei auch heterotrophe Uroorganismen als erste Lebensformen in Frage kommen. Ebenfalls unbekannt ist der Ursprung der Photosynthese, die ein wichtiges Ereignis in der Erdgeschichte darstellt. Es gibt Hinweise auf die Existenz photosynthetisch aktiver Organismen in 3,5 bis 3,2 Milliarden Jahren alten Stromatolithen, bei denen es sich um biogene Sedimente handelt, die womöglich durch die Aktivität sauerstoffproduzierender Cyanobakterien gebildet wurden (Blankenship, 2010). Aufgrund der Entdeckung molekularer Fossilien von biologischen Lipiden wird das Auftreten der Cyanobakterien auf spätestens 2,7 Milliarden Jahre vor unserer Zeit datiert (Brocks, 1999). Damit verbunden war die Oxygenierung der Erdatmosphäre, die jedoch erst wesentlich später, vor etwa 2,3 bis 2,2 Milliarden Jahren, zu Zeiten des Proterozoikums erfolgte und als *Great Oxidation Event* bezeichnet wird (Holland, 2006). Der Zeitpunkt der Entstehung erster eukaryotischer Zellen wird gleichermaßen kontrovers diskutiert. Erste eukaryotische Fossilien wurden in 2 bzw. 1,8 Milliarden Jahren alten Gesteinsschichten identifiziert (Han and Runnegar, 1992; Knoll et al., 2006). Die heutige eukaryotische Artenvielfalt wurde jedoch erst durch die sogenannte Kambrische Explosion vor circa 540 Millionen Jahren erreicht, die das Ende des Prä-Kambriums und den Beginn des Phanerozoikums markiert (Abb.1) (Valentine, 2002).

Unabhängig von der Komplexität der unterschiedlichen Spezies lässt sich ein universelles Prinzip beobachten: Jede Form von Leben ist in Zellen organisiert, die sich durch eine physikalische Abgrenzung von ihrer Umwelt, strukturierten Selbstorganisation, einen auf Redoxreaktionen basierenden Energiestoffwechsel sowie die Fähigkeit zur Eigenreplikation auszeichnen. Das zentrale Dogma des Lebens, auch Dogma der Molekularbiologie genannt, beschreibt den sequentiellen Informationsfluss in jenen biologischen Systemen: Informationen, die in der DNA gespeichert sind, werden mithilfe von RNA zur Synthese von Proteinen genutzt (Crick, 1956). Die Proteinbiosynthese als universeller, molekularer Mechanismus des Lebens beruht demnach auf den Eigenschaften komplexer Biomoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine. Daraus ergibt sich die Frage nach dem Ursprung bzw. der Synthese dieser organischen Makromoleküle und wie sie sich zu einer eigenständigen Funktionseinheit, einer Urzelle, organisieren konnten.

1.1.1 Organische Moleküle und die Entstehung von Leben

Die organischen Moleküle moderner Zellen könnten kosmischen oder terrestrischen Ursprungs sein. Kosmische Quellen stellen Asteroiden, Kometen und Meteoriten dar, die während des Großen Bombardements vor 4,1-3,8 Milliarden Jahren auf der Erde einschlugen (Chyba and Sagan, 1992). Hinweise auf die Anwesenheit organischen Materials aus dem Kosmos lieferte unter anderem der 1969 eingeschlagene und nach dem Ort des Ereignisses benannte Murchison-Meteorit. Dieser Meteorit besitzt ein Alter von circa 4,6 Milliarden Jahren und stellt einen sogenannten kohligen Chondriten dar, der sich durch einen großen Anteil an Kohlenstoff (3 %) auszeichnet. Bei einer ersten Analyse des Meteoriten konnten die Aminosäuren Glycin, Alanin, Glutamat, Valin und Prolin sowie mehrere langkettige Alkane identifiziert werden (Kvenvolden et al., 1970). Die organische Zusammensetzung des Meteoriten wurde in den nachfolgenden Jahren mehrfach analysiert, sodass mittlerweile 66 Amino- und Diaminosäuren sowie unterschiedliche Nukleobasen nachgewiesen werden konnten (Cronin et al., 1981; Cronin and Pizzarello, 1983; Meierhenrich et al., 2004; Lu and Freeland, 2006; Martins et al., 2008). Weiterhin konnten eine Reihe proteinogener wie nicht-proteinogener Aminosäuren aus dem Kometen Wild 2 sowie dem Yamato-Meteoriten extrahiert und identifiziert werden (Cronin and Moore, 1971; Shimoyama et al., 1979; Glavin et al., 2008). Auch diese extraterrestrischen Objekte, die aus den Anfängen des Sonnensystems stammen, indizieren, dass organische Moleküle im Kosmos vorkommen und als Bausteine des Lebens gedient haben könnten.

Erste Hypothesen zum terrestrischen Ursprung organischer Strukturen wurden von Haldane (1929) und Oparin (1938) postuliert. Haldane stellte die Theorie auf, dass UV-Strahlung die Energie für die Synthese organischer Moleküle aus Methan, Ammoniak und Wasser bereitstellte. Im Laufe der Zeit konnten sich diese organischen Moleküle in einer primordialen „Ursuppe“ anreichern und die Bausteine für die Synthese komplexer Biomoleküle liefern, aus denen sich über viele Millionen Jahre die ersten Zellen entwickeln konnten, welche die verbliebenen organischen Moleküle als Energiequelle nutzten. Demgemäß hätte es sich bei den ersten Organismen um heterotrophe Fermentierer gehandelt (Haldane, 1929). Unabhängig davon postulierte Oparin die Synthese organischer Moleküle in einer reduzierenden Uratmosphäre, die sich im Urozean anreicherten und zellähnlichen Koazervaten, bei denen es sich um tröpfchenartige Gebilde handelt, als Energie- und Elektronenquelle dienten (Oparin, 1938). Diese als Oparin-Haldane-Hypothese bekannt gewordene Theorie wurde in den 1950er Jahren durch Stanley und Miller experimentell überprüft. Hierbei wurde in einem kleinen

Kolben eine Atmosphäre bestehend aus Methan, Ammoniak, Wasserstoff und Wasserdampf simuliert und elektrischen Entladungen ausgesetzt. Nach einigen Tagen konnten im Kondensat dieses Gemisches die Aminosäuren Glycin, α -Alanin, β -Alanin, Aspartat und α -Amino-n-butansäure identifiziert werden. In diesem als Urey-Miller-Experiment bekannt gewordenen Versuch wurde folglich erstmals der Nachweis einer abiotischen Synthese organischer Moleküle erbracht (Abb. 2) (Miller, 1953).

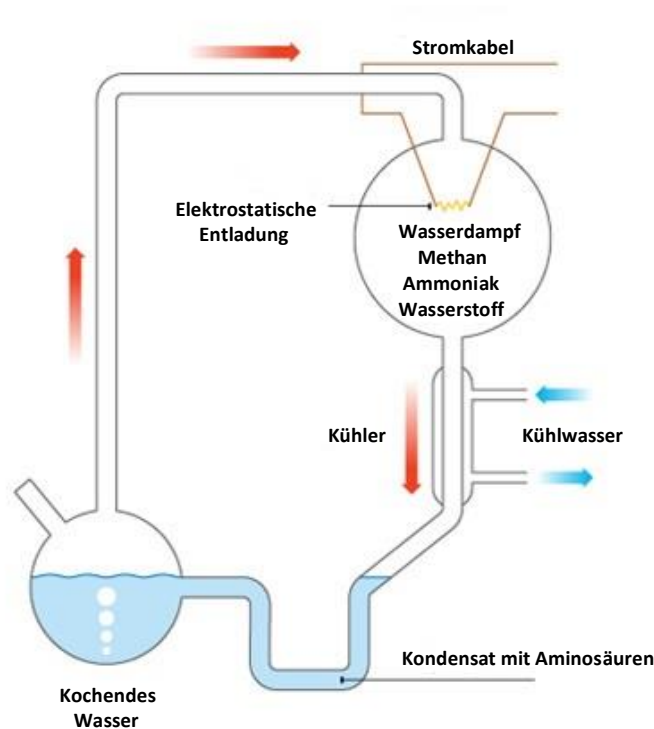


Abb.2 Urey-Miller-Experiment. Im dargestellten Urey-Miller-Experiment wurde Wasser in einem Rundkolben erhitzt und der entstehende Wasserdampf in einen weiteren Kolben geleitet, der die Gase Methan, Ammoniak und Wasserstoff als Bestandteile einer hypothetischen Uratmosphäre enthielt. Um urzeitliche Gewitter zu simulieren, wurde dieses Gemisch elektrostatischen Entladungen ausgesetzt. Nach Kühlung des Reaktionsansatzes konnten im Kondensat des Gemisches unter anderem Aminosäuren nachgewiesen werden (modifiziert nach: www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/images/aqa_chem_miller-urey.jpg).

Unter ähnlichen Bedingungen wurden bei einem nachfolgenden Experiment organische Säuren sowie Harnstoff nachgewiesen (Miller and Urey, 1959). Auf Basis des klassischen Urey-Miller-Experiments wurden weitere Versuche zur Aminosäuresynthese in modifizierter Form durchgeführt, wobei unter anderem Alanin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Isoleucin, Leucin, Prolin, Serin, Threonin und Valin nachgewiesen werden konnten (Wolman et al., 1972; Keefe et al., 1995; Johnson et al., 2008; Parker et al., 2011). Nachdem Aminosäuren und andere einfache organische Säuren auf diese Weise synthetisiert werden konnten, gelang

Oró und Kimball erstmals die ebenfalls abiotische Synthese der Nukleinbase Adenin, wodurch sie einen entscheidenden Beitrag zur Untersuchung der Entstehung von Leben (Oró and Kimball, 1961) leisteten und die Grundlage für die RNA-Welt-Hypothese schufen. Nach dieser Hypothese liegt der Ursprung von Leben in der präbiotischen Bildung eines zellähnlichen Kompartiments, in welchem RNA oder RNA-ähnliche Polymere sowohl die Funktion als Informationsträger wie auch als biochemischer Katalysator übernahmen und Proteine sowie DNA erst später entstanden (Gilbert, 1986).

In einem alternativen Szenario läge der terrestrische Ursprung organischer Moleküle und der ersten Zellen nicht an der Oberfläche eines Ozeans, in dem sich eine RNA-Welt entwickelte, sondern in einer unterseeischen vulkanischen Eisen-Schwefel-Welt (Wächtershäuser, 1988, 1992). Demnach bildeten sich in der Nähe von Hydrothermalquellen Strukturen aus Eisensulfid (Pyrit), die zusammen mit weiteren kationischen Übergangsmetallhaltigen Mineralen eine katalytische Oberfläche darstellten. An diesen katalytischen Zentren könnte demgemäß die Synthese organischer Materialien aus anorganischen Molekülen vulkanischen Ursprungs stattgefunden haben. Folglich wurde postuliert, dass die Synthese erster Biomoleküle auf dem reduktiven Citratzyklus beruht, der eine Form der CO₂-Fixierung darstellt (Wächtershäuser, 1992). Die sulfidhaltigen Minerale könnten hierbei nicht nur als Katalysatoren, sondern auch als Bindestellen für die neu synthetisierten, anionischen, organischen Gruppen fungiert haben. Nach dieser Theorie entwickelte sich ein chemoautotropher „Pionierorganismus“, wie er von Wächtershäuser bezeichnet wurde (Wächtershäuser, 1988, 1992, 2006). Dieser Organismus entwickelte zunächst einen autotrophen Metabolismus, bei dem unter anderem auch die organischen Bestandteile von Nucleinsäuren synthetisiert wurden, bevor die genetische Maschinerie evolvierte. Entgegen der RNA-Welt-Hypothese, bei der RNA als replikatives Element vorausgesetzt wird und sich der Prozess der Proteintranslation im Laufe der Evolution entwickelte, wird in der Eisen-Schwefel-Welt eine Coevolution von Transkription und Translation postuliert (Wächtershäuser, 2006).

Unabhängig von den Modellen zur Entstehung erster Zellen bzw. Organismen stellt sich die Frage, wie der komplexe Prozess der Proteintranslation in der hypothetischen RNA-Welt bzw. Eisen-Schwefel-Welt evolvierte und die damit verbundene Entstehung eines genetischen Codes ihren Anfang nahm.

1.2 Der genetische Code

Der genetische Code übersetzt die Nukleotidsequenz der *messenger*-RNA (mRNA) in die Aminosäuresequenz der Proteine. Die Entschlüsselung des genetischen Codes begann mit dem von Nirenberg und Matthaei durchgeführten Poly-U-Experiment. Hierzu wurde ein *E. coli*-Extrakt verwendet, der unter anderem aus Ribosomen, mRNAs, tRNAs, ATP, GTP und Aminosäuren bestand. Nach dem Verdau der nativen mRNAs durch eine Ribonuclease wurden dem Extrakt künstliche *template*-RNAs (mRNAs) und radioaktiv markierte Aminosäuren hinzugefügt. Durch Messung der Radioaktivität der aus den markierten Aminosäuren gebildeten Peptide konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung eines Uridin-Polynukleotids als *template* ein Polypeptid synthetisiert wurde, das ausschließlich aus Phenylalanin-Einheiten bestand. Diente jedoch Polyadenin oder ein Gemisch aus Polyuridin und Polyadenin als *template*, so erfolgte kein Einbau von radioaktivem Phenylalanin in Proteine, wodurch die Nukleotidsequenz UUU als Codon für Phenylalanin identifiziert werden konnte (Nirenberg and Matthaei, 1961). In den nachfolgenden Jahren konnten auf Grundlage verschiedener Bindungsstudien alle 64 Codons entschlüsselt werden.

Von den 64 mRNA-Codons codieren 61 für die 20 proteinogenen Standard-Aminosäuren, wohingegen 3 Codons (UAA, UAG, UGA) als Stoppsignal der Translation dienen. Die Aminosäuren können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Farbe der Markierung; Abb. 3). Wie in Abb. 3 weiterhin zu erkennen, werden die Aminosäuren durch eine unterschiedliche Anzahl an Triplets codiert: Während jeweils 6 Codons die Aminosäuren Leucin, Serin und Arginin codieren, existiert für Methionin- und Tryptophan nur je ein Codon. Die Eigenschaft der Aminosäuren-Codierung durch mehrere Codons wird als Degeneration des genetischen Codes bezeichnet.

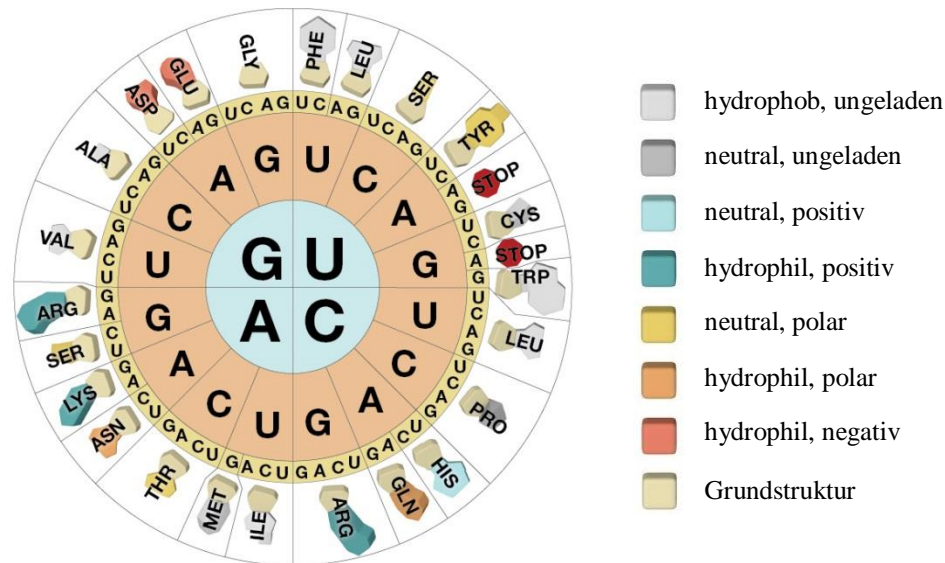


Abb. 3. Der genetische Code und die 20 proteinogenen Standard-Aminosäuren. Der genetische Code besteht aus 64 Codons, von denen 61 für die 20 kanonischen Aminosäuren codieren. Die Codons UAA, UAG und UGA dienen als Stopp-Codons. Die Aminosäuren sind anhand ihrer chemischen Eigenschaften als hydrophob, ungeladen (hellgrau), neutral, ungeladen (dunkelgrau), neutral positiv (hellblau), hydrophil, positiv (türkis), neutral, polar (gelb), hydrophil, polar (orange) und hydrophil, negativ (rot) dargestellt (modifiziert nach: Miller and Levine („Biology“)).

Die Informationen, die in Form der Basentriplets der mRNA (Codons) gespeichert sind, werden während der Translation zur Synthese von Proteinen genutzt. Der sukzessive Einbau der Aminosäuren, der durch die Abfolge an Tripletts der mRNA vorgegeben ist, erfordert eine vorherige Aktivierung und Verknüpfung der Aminosäure an eine spezifische tRNA.

Dieser zweistufige Prozess wird durch das Enzym Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AARS) katalysiert und wurde bereits vor Entdeckung der Triplet-Natur des Codes beschrieben (Berg and Offengand, 1958; Hoagland et al., 1958). Hierbei erfolgt zunächst die Aminosäureaktivierung durch ATP, wodurch die AMP-gebundene Aminosäure (Aminoacyladenylat) und Pyrophosphat entstehen. Anschließend wird unter Abspaltung des Pyrophosphats die aktivierte Aminosäure mit dem 3'-Ende (CCA-Triplett) der tRNA verknüpft. Anhand der Katalyseprodukte werden zwei Klassen von AARSs unterschieden: Klasse-I-AARSs katalysieren die Bindung der jeweiligen Aminosäure an die 2'-OH-Gruppe des terminalen Adenosins der tRNA, wohingegen Klasse-II-AARSs eine Verknüpfung mit der 3'-OH-Gruppe herstellen (Abb. 4).

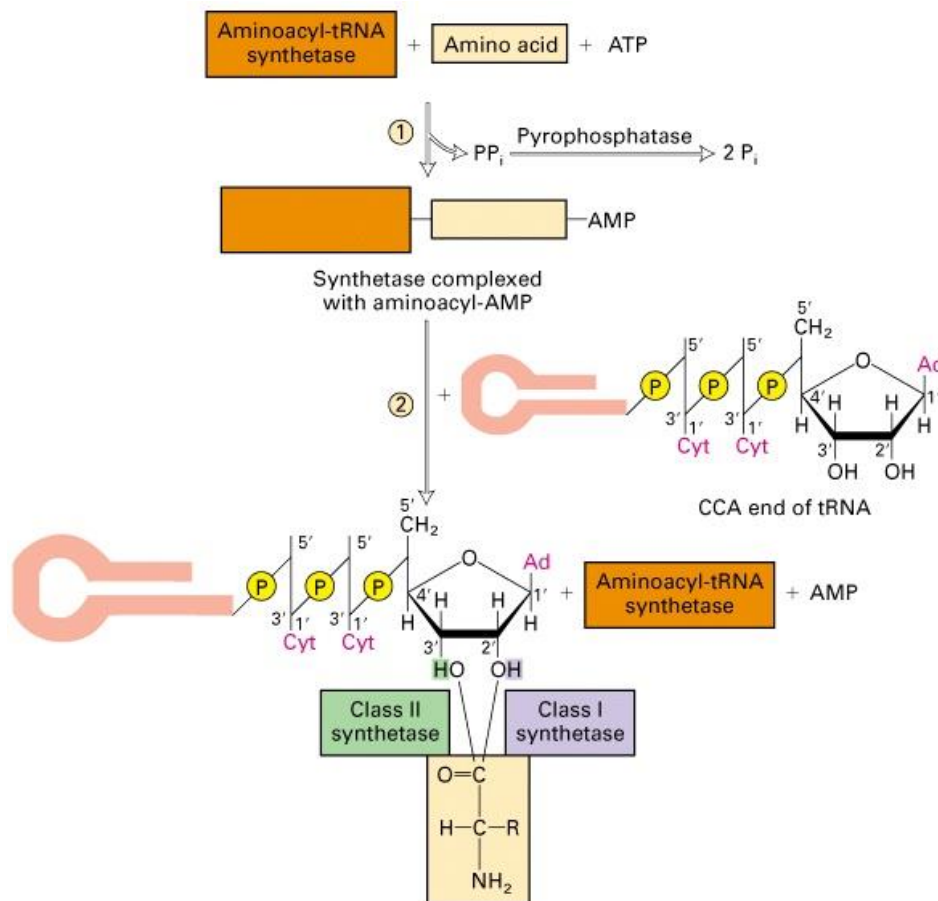


Abb. 4 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AARSs) katalysieren die ATP-abhängige Aktivierung von Aminosäuren zu den entsprechenden Aminoacyladenylaten (Aminoacyl-AMP). Anschließend werden die Aminosäuren am 3'-Ende (CCA-Triplett) der tRNA mit der 2'-OH-Gruppe (Klasse-I-AARSs) oder 3'-OH-Gruppe (Klasse-II-AARSs) des terminalen Adenosins zur Aminoacyl-tRNA verknüpft (modifiziert nach: <http://web.uconn.edu/mcb201/F04-29.JPG>).

Die mit der entsprechenden Aminosäure beladene tRNA ist nun in der Lage, über ihr Anticodon, bei dem es sich ebenfalls um ein Basentriplett handelt, mit dem komplementären Codon eine Bindung einzugehen. Interessanterweise wird diese Bindung meist nur über die beiden ersten Basen des Codons (5'→3') bzw. die beiden letzten Basen des Anticodons (3'→5') spezifiziert. Die dritte Basenpaarung ist flexibler, weshalb sie als *wobble*-Basenpaarung bezeichnet wird. Dies erklärt, warum mehrere Codon-Triplets, die sich nur in der dritten Base voneinander unterscheiden und die gleiche Aminosäure codieren, von derselben tRNA erkannt werden können. Diese Besonderheit wurde erstmals in der Wobble-Hypothese beschrieben, die somit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der der Proteintranslation beisteuerte (Abb. 5) (Crick, 1966).

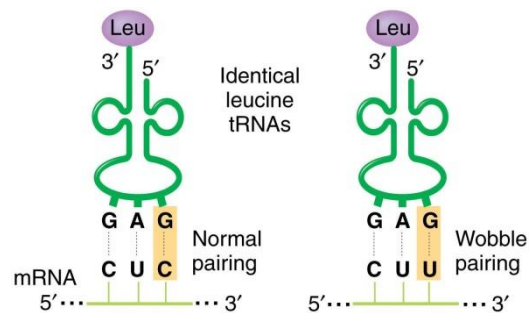


Abb. 5. Wobble-Basenpaarung. Das Anticodon GAG einer mit Leucin beladenen tRNA bindet komplementär an das Leucin-Codon (CUC) der mRNA (linke Seite). Die identische tRNA ist zusätzlich in der Lage, an das Codon CUU zu binden, das ebenfalls Leucin codiert, da nur die Komplementarität der ersten beiden Basenpaarungen (5'→3' auf der mRNA) die Bindung spezifiziert. Die dritte Paarung (G der tRNA mit U der mRNA) wird daher als Wobble-Basenpaarung bezeichnet (modifiziert nach: 2010 PJ Russell, iGenetics 3rd ed.).

1.2.1 Entstehung des genetischen Codes

Die Entschlüsselung aller 64 Codons und die Entdeckung der molekularen Mechanismen der Proteintranslation lieferten wichtige Erkenntnisse zur Beschreibung von Leben, beantworten jedoch nicht die Frage, welchem Prinzip die Codierung unterliegt. Zur Entstehung und den ersten Evolutionsschritten des Codes gibt es vier bekannte Erklärungsmodelle: die *frozen accident*-Theorie, die Stereochemische Theorie, die Adaptive Theorie und die Co-Evolutionstheorie.

Der genetische Code galt lange Zeit als universell und unveränderbar. Dies wurde in der sogenannten *frozen accident theory* postuliert, nach welcher der genetische Code das Resultat eines Zufallsprozesses darstellt und jede Veränderung des genetischen Codes zu einer letalen Mutation in Proteinen führen würde, weshalb der Code als nicht evolvierbar betrachtet wurde (Crick, 1968).

Nach der Stereochemischen Theorie hingegen fanden in einer hypothetischen RNA-Welt spezifische, räumliche, stereochemische Interaktionen zwischen Aminosäuren und Codons bzw. Anticodons einer als Ribozym vorliegenden RNA statt. Dies würde bedeuten, dass Codons solche Aminosäuren codieren, die zu ihnen oder den entsprechenden Anticodons komplementär sind. Durch diese Komplementarität wäre die Codierung, die man als *Codon assignment* bezeichnet, festgelegt worden (Dunnill, 1966; Koonin and Novozhilov, 2009; Pelc and Welton, 1966). Auch wenn Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und Nukleinsäuren eine Rolle bei der Etablierung des genetischen Codes gespielt haben könnten,

gilt die Stereochemische Theorie heute als unwahrscheinlich, da direkte Interaktionen für die meisten Aminosäuren nicht nachgewiesen werden konnten (Di Giulio, 2008).

Im Gegensatz zu diesem nichtadaptiven Ansatz basiert die Adaptive Theorie auf der Fehlerminimierung bei der Translation. Grundlage hierfür ist die Sequenzähnlichkeit von Codons, die zwar verschiedene, jedoch chemisch verwandte Aminosäuren codieren. Demzufolge würde der Austausch einer einzigen Base in einem Codon zu einer Substitution einer Aminosäure durch eine chemisch eher verwandte Aminosäure führen, sodass Struktur und Funktion des translatierten Proteins häufig erhalten blieben (Woese et al., 1966; Haig and Hurst, 1991).

Nach der Co-Evolutionstheorie hingegen werden Aminosäuren in zwei Gruppen unterteilt, die als Phase I- und Phase II-Aminosäuren bezeichnet werden. Während Phase I-Aminosäuren abiotisch verfügbar waren, wurden Phase II-Aminosäuren im Laufe der Evolution durch enzymatische oder nicht-enzymatische Katalysatoren aus Phase I-Aminosäuren biosynthetisiert. Nach dieser Theorie wird postuliert, dass der genetische Code zunächst nur für die abiotischen Aminosäuren codierte und die neu synthetisierten Aminosäuren Codons ihrer Synthesevorgänger übernahmen (Wong, 1975). Dies setzt eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen Synthesevorläufer und -produkt voraus, wodurch die beiden Moleküle um die Aminosäurebindestelle der tRNA des Vorläufers konkurrieren konnten. Wird die neue Aminosäure in das Protein eingebaut, spricht man von einer prätranslationalen Biosynthese. Beispiele hierfür sind die Synthese von Glutamin und Asparagin aus Glutamat und Aspartat sowie die anschließende Besetzung der Vorläufer-tRNAs durch die Syntheseprodukte. Dies spiegelt sich in den heute verwendeten Codons wider, die sich zwischen Glutamat und Glutamin einerseits, Aspartat und Asparagin andererseits, nur um eine Base voneinander unterscheiden.

1.2.2 Evolution des genetischen Codes

Die unterschiedlichen Theorien beschreiben die Codierungs-Prinzipien des Codes und mögen in unterschiedlichem Maße eine Erklärung für die Bildung des Standard-Codes liefern. Interessanterweise existieren in einigen Organismen jedoch genetische Codes, die vom Standard-Code abweichen. Die Existenz alternativer Codes indiziert, dass der genetische Code nicht universell ist, sondern evolutionären Veränderungen unterworfen ist. Somit

widerspricht dies der ursprünglichen Annahme, dass es sich bei der ursprünglichen Entstehung um einen *frozen accident* gehandelt hat.

Das Phänomen der Abweichung vom Standard-Code wurde zuerst bei Untersuchungen der mitochondrialen und nucleären Codes von Mensch und Rind festgestellt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Codon UGA in den nucleären Codes als Stopcodon fungiert, in den mitochondrialen Codes jedoch die Aminosäure Tryptophan codiert (Barrell et al., 1979). Es sind mittlerweile zahlreiche mitochondriale wie nucleäre Codes beschrieben worden, die von universellen Standardcode abweichen (Clark-Walker and Weiller, 1994; Hayashi-Ishimaru et al., 1997, 1996; Kano et al., 1993; Kück et al., 2000). Interessanterweise haben unabhängig voneinander identische Code-Veränderungen in nicht miteinander verwandten Arten innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums von einigen Millionen Jahren stattgefunden (Knight et al., 2001). Die heute bekannten Variationen sind in Abb. 6 dargestellt.

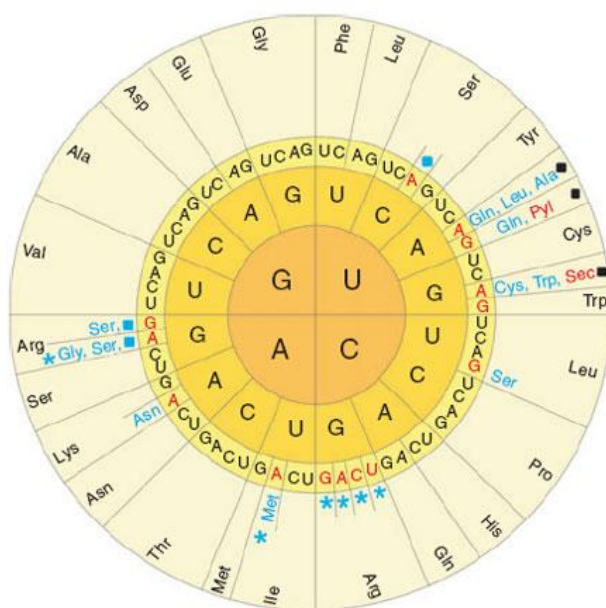


Abb. 6. Alternative genetische Codes. Zusätzlich zum Standard-Code (schwarz markiert) existieren in zahlreichen mitochondrialen, bakteriellen und nucleären Genomen alternative genetische Codes. Die betroffenen Codons sind rot, die korrespondierenden Standard-Aminosäuren blau markiert. Selenocystein und Pyrrolysin sind als nicht-kanonische Aminosäuren in Rot dargestellt. Einige Codons sind in bestimmten Organismen *unassigned* (blauer Stern). Blaue Quadrate symbolisieren alternative, schwarze Quadrate Standard-Stopp-Codons (modifiziert nach: Ambrogelly et al., 2007).

1.2.3 Mechanismen der Evolution des genetischen Codes

Anhand der postulierten Mechanismen der Evolution, die zu alternativen genetischen Codes geführt haben, lassen sich mehrere Theorien voneinander unterscheiden: die *codon capture*-Theorie (CCT), die *ambiguous intermediate*-Theorie (AIT) und die *genome streamlining*-Theorie (GST) (Knight et al., 2001). Die CCT (Osawa et al., 1992) basiert auf den unterschiedlichen genomischen Basenzusammensetzungen der Organismen. Die genomische DNA aller Organismen zeichnet sich durch einen bestimmten GC-Gehalt aus. In der Domäne der Eubakterien beträgt der GC-Gehalt beispielsweise 25-75 %. Dabei sind die großen Unterschiede wohl auf einen evolutionären Mutationsdruck hinsichtlich der DNA-Replikation zurückzuführen. Daraus resultiert eine genomische Zunahme von GC-Basenpaaren oder AT-Basenpaaren bei gleichzeitiger Abnahme des jeweils anderen Paares. Dementsprechend würden nach der CCT z.B. Guanin-reiche Codons eines AT-reichen Genoms nach einiger Zeit aus dem Genom verschwinden, was als *codon unassignment* bezeichnet wird. Unterstützt wird diese Theorie durch das Verschwinden des arginincodierenden CGG-Codons im AT-reichen Genom von *Mycoplasma capricolum*, womit ein Verlust der korrespondierenden tRNA (tRNA^{Arg}) verbunden ist (Oba et al., 1991). Verändert sich jedoch die Basenzusammensetzung desselben Genoms durch genetische Drift, was in diesem Fall eine Erhöhung des GC-Gehalts zur Folge hätte, so besteht die Möglichkeit, dass das „unbelegte“ Codon wieder auftritt und *reassigned* wird, in dem es von einer nicht-komplementären tRNA fälschlicherweise erkannt wird. Dadurch würde sich die Bedeutung des Codons verändern, sodass dieses nun für eine andere als die ursprüngliche Aminosäure codieren würde. Die CCT setzt demnach einen vollständigen Verlust (*unassignment*) eines Codons während eines neutralen Replikationsdrucks voraus, bevor es nach genetischer Drift wieder in Erscheinung tritt und *reassigned* werden kann. Das Prinzip der CCT ist auf Grundlage eines anfänglichen hohen GC-Mutationsdrucks in Abb. 7A veranschaulicht.

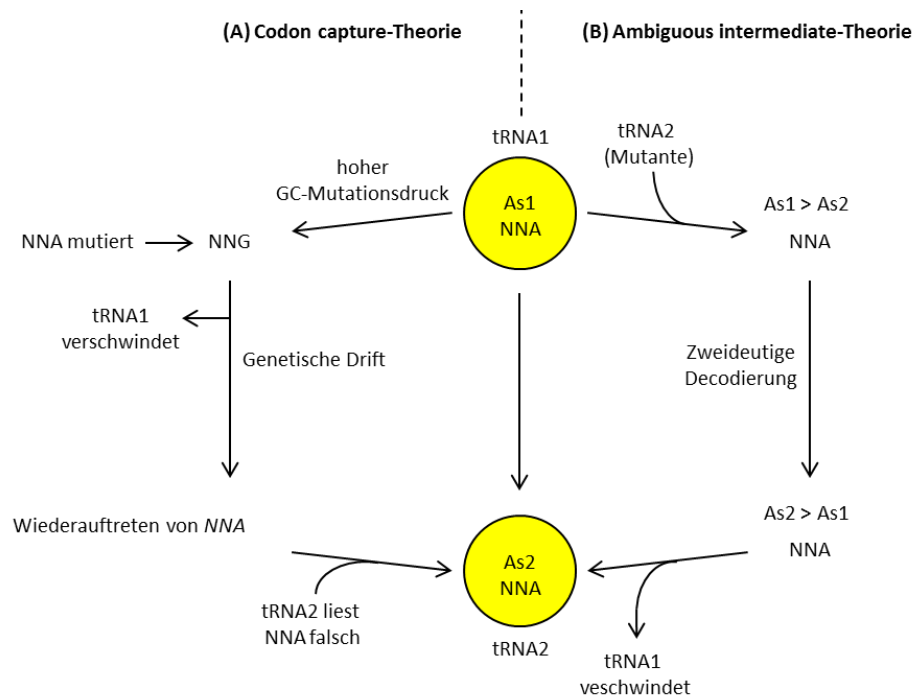


Abb. 7. Mechanismen der Evolution des genetischen Codes. (A) Nach der *codon capture*-Theorie (CCT) führt ein hoher GC-Mutationsdruck zur Mutation des NNA-Codons (N: beliebige Nucleobase), das für die Aminosäure 1 (As1) codiert und durch eine tRNA (tRNA1) erkannt wird, zum NNG-Codon. Das NNA-Codon und die korrespondierende tRNA1 verschwinden (*codon unassignment*). Durch genetische Drift tritt das NNA-Codon später wieder in Erscheinung und wird durch eine nicht-komplementäre tRNA (tRNA2) erkannt, wodurch das Codon entsprechend für eine andere Aminosäure (As2) codiert. (B) Nach der *ambiguous intermediate*-Theorie (AIT) wird das NNA-Codon, das für die As1 codiert, sowohl durch die komplementäre tRNA (tRNA1) als auch durch eine mutierte Form einer weiteren tRNA (tRNA2) erkannt, weshalb eine Codon-Ambiguität entsteht, wobei die ursprüngliche Decodierung zunächst stärker ausgeprägt ist. Führt die alternative Codierung des Codons jedoch zu einem Selektionsvorteil, so besteht die Möglichkeit, dass das NNA-Codon vermehrt durch die tRNA2 erkannt wird, bis die tRNA1 komplett verschwindet. Dadurch würde das Codon ausschließlich für As2 codieren. Im Unterschied zur CCT ist kein Verlust des ursprünglichen NNA-Codons Voraussetzung für das neue *codon assignment* (modifiziert nach: Santos et al., 2004).

Im Gegensatz dazu postuliert die AIT (Schultz and Yarus, 1996), wie in Abb. 7B dargestellt, einen nicht-neutralen Mechanismus des Codon *reassignment*, bei dem Mutationen in einer tRNA zunächst zu einer Erweiterung der Decodierungseigenschaften dieser tRNA führen. Jene mutierte tRNA würde demgemäß an ein nicht-komplementäres Codon binden, das auch von einer anderen, komplementären tRNA erkannt wird. Die Folge wäre eine translationale Ambiguität des Codons. Dies bedeutet, dass das Codon für zwei verschiedene Aminosäuren codiert. Sollte dies nicht zu einer negativen Beeinträchtigung des Proteoms führen oder resultierte aus diesem Mechanismus gar ein Selektionsvorteil, könnte dies den Verlust der komplementären tRNA zur Folge haben. Demnach würde das Codon zuletzt ausschließlich von der mutierten, ehemals nicht-komplementären tRNA erkannt. Auch hierbei handelt es

sich um ein Codon *reassignment*, das jedoch keinen Verlust eines Codons voraussetzt. Eine solche Doppelcodierung konnte in verschiedenen Hefen gezeigt werden: Demnach codiert das CUG-Leucincodon in der Hefe *Candida zeylanoides* nur zu einem geringen Teil Leucin (3-5 %), zum Großteil (95-97 %) jedoch die Aminosäure Serin (Suzuki et al., 1997).

Die GST (Andersson and Kurland, 1991) wiederum postuliert einen Zusammenhang zwischen den Codon *reassignments* und der Genomgröße. Demnach lassen sich *reassignments* bevorzugt in kleinen Genomen, wie sie in Mitochondrien und obligatorischen Parasiten vorkommen, beobachten. Dies diene einer Verringerung der Isoakzeptor-tRNAs und des Translationsapparates. Mechanistisch beruhe die Verkleinerung der Genomgröße auf dem differenziellen Verlust von nicht-funktioneller junk-DNA mittels Selektion oder genetische Drift (Hessen et al., 2010).

1.2.4 Aminosäureselektion

Bis heute gibt es Hinweise auf über 80 präbiotische Aminosäuren (Lu and Freeland, 2006) und 900 biosynthetisierbare Aminosäuren (Uy and Wold, 1977; Fowden, 2001). Weiterhin gibt es weit über 100 synthetische Aminosäuren, die durch eine künstliche Erweiterung des genetischen Codes in Proteine eingebaut werden konnten (Hohsaka and Sisido, 2002). Für die genetische Codierung wurde mit den bekannten 20 Standard-Aminosäuren demnach nur ein Bruchteil der theoretisch verfügbaren Aminosäuren, sei es bei der ersten Etablierung eines Codes oder bei späterer Inkorporation, selektiert.

Unabhängig von der Theorie zum Ursprung und Etablierung des genetischen Codes, sei es Stereochemische Theorie, Adaptive Theorie oder Co-Evolutionstheorie, ist davon auszugehen, dass primordiale genetische Codes nur einen Teil der heute bekannten proteinogenen Aminosäuren umfassten. Der Grund hierfür liegt in der begrenzten Auswahl abiotisch verfügbarer, proteinogener Aminosäuren zu Zeiten der Entstehung erster Zellen oder zellähnlicher Komplexe. Die Quellen für abiotische Aminosäuren waren der bereits beschriebene hypothetische Urozean, die unterseeischen Hydrothermalquellen sowie kosmische Objekte, wie beispielsweise der Murchison-Meteorit. Aufgrund dieser Quellen wurde eine Konsensusgruppe von 10 präbiotischen, proteinogenen Aminosäuren, die Alanin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Isoleucin, Leucin, Prolin, Serin, Threonin und Valin umfasst, gebildet (Doi et al., 2005). Die weiteren 10 Aminosäuren wurden demnach biosynthetisiert,

bevor sie in den genetischen Code aufgenommen werden konnten (Wong, 2005; Trifonov, 2009).

Bei einer ersten detaillierten Betrachtung der Aminosäureauswahl 1981 wurden als potentielle Gründe für die präbiotische Verfügbarkeit, die Fähigkeit Sekundär- und Tertiärstrukturen in Proteinen auszubilden, die Stabilität der Aminosäuren in Lösung, die Stabilität gegenüber Racemisierung, die Stabilität als tRNA-Aminosäureacyl ester sowie die Synthetisierbarkeit aufgeführt (Weber and Miller, 1981). Demnach waren Verfügbarkeit und die Eigenschaft, stabile, gefaltete Proteinstrukturen zu bilden, die Grundvoraussetzungen für die Aminosäureselektion. Die biophysikalischen Parameter, die solche stabil gefalteten Proteinstrukturen bedingen, können demnach unter den Begriffen Hydrophobizität, Größe und Ladung zusammengefasst werden (Lu and Freeland, 2008).

Hydrophobizität ist hierbei die treibende Kraft der Proteinfaltung, bei welcher sich hydrophobe Aminosäuren zu einem hydrophoben Kern zusammenlagern (Kellis et al., 1989). Weiterhin kann Hydrophobizität ein entscheidender Faktor bei der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Liganden sowie bei der Proteinfaltung zwischen Chaperonen und fehlgefalteten Proteinen darstellen (Konuma et al., 2007; Sugase et al., 2007).

Neben der Hydrophobizität ist die Größe einer Aminosäure ein weiteres wichtiges Kriterium, das über Proteinogenität bzw. Nicht-Proteinogenität entscheidet. So konnte gezeigt werden, dass bei einer signifikanten Änderung der Aminosäuregröße die Stabilität des hydrophoben Proteinkerns verringert und die Proteinfaltung gestört wird (Sakurai et al., 2005). Zusätzlich können intermolekulare Wechselwirkungen von der Aminosäuregröße abhängig sein, was insbesondere auf für die Substraterkennung zuständigen Proteinregionen zutrifft (Goto and Klinman, 2002; Masada et al., 2007).

Auch der dritte Parameter, die elektrische Ladung der Aminosäure, ist bei der Strukturgebung von Proteinen von großer Bedeutung. Während der hydrophobe Kollaps zu Beginn der Proteinfaltung von der Hydrophobizität der Aminosäuren bestimmt wird, ist das Erreichen einer nativen Proteinkonformation stark von den spezifischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten abhängig (Kumar and Nussinov, 2002). Saure und basische Aminosäuren sind darüber hinaus häufig Bestandteile aktiver Zentren von Enzymen (Gutteridge and Thornton, 2005).

Unter Berücksichtigung der limitierten Verfügbarkeit abiotischer Aminosäuren ergibt sich die Frage, ob diese hinsichtlich Peptidlänge sowie Hydrophobizität, Größe und Ladung in der Lage waren, stabile Proteinstrukturen zu bilden.

So konnte gezeigt werden, dass für eine kooperative Faltung bezüglich der Peptidlänge lediglich eine Sequenz aus 7-13 Aminosäuren mit bestimmten physikochemischen Eigenschaften benötigt wird. Die postulierte Zahl von 10 abiotischen Aminosäuren müsste demnach für diesen Zweck ausgereicht haben (Akanuma et al., 2002; Davidson et al., 1995; Schafmeister et al., 1997; Walter et al., 2005). Durch die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin und Valin wäre zudem die Voraussetzungen für die Bildung eines hydrophoben Kerns gegeben gewesen. Des Weiteren konnten diese hydrophoben Aminosäuren zusammen mit den abiotisch verfügbaren hydrophilen (Serin und Threonin) und sauren (Aspartat und Glutamat) Aminosäuren die bekannten Sekundärstrukturelemente α -Helix (Alanin, Leucin, Glutamat), β -Faltblatt (Isoleucin, Threonin und Valin) und β -Schleife (Aspartat, Glycin und Prolin) bilden. Zudem ist eine Kombination aus hydrophoben und hydrophilen Aminosäureresten entscheidend für eine stabile Proteinstruktur in Lösung (Dill, 1990). Aufgrund des wahrscheinlichen Fehlens basischer Aminosäuren wäre jedoch die Ausbildung ionischer Bindungen, die ein weiteres wichtiges Proteinstrukturelement darstellen, nicht möglich gewesen (Doi et al., 2005; McDonald and Storrie-Lombardi, 2010). Wenn man darüber hinaus neutrale pH-Bedingungen voraussetzt, hätten sich die ersten Peptide aufgrund der sauren Aminosäuren durch eine negative Ladung ausgezeichnet, wodurch die Proteinfaltung erschwert worden wäre (Longo and Blaber, 2012). Setzt man hingegen saure Umweltbedingungen voraus, so wären die negativen Ladungen durch Protonierung maskiert worden. Ein Fehlen basischer Aminosäuren hätte den Proteinen zudem Halophilie verliehen: Hydratisierte Kationen hätten demgemäß mit Carboxylatgruppen wechselgewirkt, was wiederum zu einer Stabilisierung der Proteine geführt hätte (Eisenberg et al., 1992).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beschriebenen abiotisch verfügbaren Aminosäuren bezüglich der untersuchten Parameter geeignet gewesen sein könnten, um als Bausteine für gefaltete Proteine verwendet zu werden, wodurch die Aminosäureselektion zum Teil plausibilisiert wird. Dennoch sind die Gründe für die Präferenz der proteinogenen Aminosäuren gegenüber den nicht-proteinogenen bis heute weitgehend unbekannt. Inwieweit die verwendete Diversität, die wohl stabile Proteinfaltung und -struktur ermöglichte, einer potentiellen Diversität anderer abiotisch verfügbarer Aminosäuren überlegen war, wurde von Lu und Freeland untersucht (Lu and Freeland, 2008). Für den Vergleich wurden Gruppen aus 20 abiotisch nutzbaren, aber nicht-proteinogenen Aminosäuren (jene des Murchison-Meteoriten) herangezogen und mit den 20 Standard-Aminosäuren verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Standard-Set in Hinblick auf Größe (repräsentiert durch das van-der-

Waals-Volumen) und Ladung eine deutlich größere Vielfalt als die meisten Zufalls-Gruppen aufwies. Wenn man zudem die Wahrscheinlichkeit für den Einbau in Proteine an die jeweiligen Aminosäurekonzentrationen im Meteoriten anpasste, so übertrafen die Standard-Aminosäuren die „Zufalls-Aminosäuren“ ebenfalls hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, dem dritten Selektionsparameter. Da jedoch vermutlich nur ein Teil der Standard-Aminosäuren abiotisch verfügbar war, wurde schließlich untersucht, ob die Gruppe aus 8 proteinogenen Aminosäuren des Meteoriten eine größere Diversität als die verschiedenen Zufallsgruppen aus 8 nicht-proteinogenen Aminosäuren aufwies. Hierbei zeigte sich, dass auch unter Berücksichtigung der Häufigkeit der abiotischen Aminosäuren keine signifikant größere Vielfalt festgestellt wurde (Lu and Freeland, 2008). Die Gründe für die Selektion der ersten Aminosäuren bleiben folglich weiter rätselhaft.

Bei der Erweiterung und Vervollständigung dieser Gruppe zum modernen Standard-Aminosäuresatz könnten gemäß der vorgestellten Studie die beschriebenen Parameter Hydrophobizität, Größe und Ladung eine Rolle gespielt haben. Daraus lässt sich die Frage nach der Chronologie des sukzessiven Einbaus der Aminosäuren in den genetischen Code ableiten.

1.2.5 Sukzessive Aufnahme von Aminosäuren in den genetischen Code

Trotz der Theorie einer schrittweisen Erweiterung des Codes und einer Einteilung in präbiotische (alte) und biosynthetische (neue) Aminosäuren, gibt es hierzu nur wenige umfassende Untersuchungen. Im Jahre 2000 wurde unter Berücksichtigung von 40 unterschiedlichen Kriterien erstmals eine Chronologie der potentiellen Reihenfolge der genetischen Aminosäurenutzung aufgestellt, die einige Zeit später aufgrund eines erweiterten Kriterienkatalogs modifiziert wurde (Trifonov, 2000, 2004, 2009). Die Kriterien lassen sich in Einzel- und Vielfaktor-Kriterien unterteilen, die sich wiederum verschiedenen Gruppen zuordnen lassen. Zu den Einzelfaktorkriterien zählten unter anderem die Ausbeute von Aminosäuren in verschiedenen präbiotischen Experimenten, die chemische Komplexität, die Aminosäurezusammensetzung alter und neuer Proteine, die Thermostabilität evolutionär alter Nukleinsäuren hinsichtlich Codon-Anticodon-Interaktionen, Aspekte des Alters von tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie weitere Kriterien. Die Vielfaktor-Kriterien umfassten Theorien zur Entstehung und Evolution des genetischen Codes, die auf mehreren Prinzipien basieren, wie z.B. die bereits beschriebenen Co-Evolutionstheorie oder Theorien

zur metabolischen Betrachtungen der Nukleinsäure- und Aminosäuresynthese in einer RNA- bzw. Eisen-Schwefel-Welt.

Die Konsensus-Reihenfolge des chronologischen Einbaus der 20 Standard-Aminosäuren in den genetischen Code, die sich aus der Analyse der ursprünglichen und erweiterten Kriterien ergibt, lautet: Glycin, Alanin, Aspartat, Valin, Serin, Prolin, Glutamat, Leucin, Threonin, Arginin, Isoleucin, Glutamin, Asparagin, Lysin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Methionin, Tyrosin und Tryptophan (Trifonov, 2009). Zusätzlich wurde untersucht, ob in Bezug auf diese Kriterien Prinzipien existieren, die mit der dargestellten Chronologie kongruent sind und eine Erklärung für eine schrittweise Codon-Besetzung liefern würden.

Nach Eigen und Schuster sind Komplementarität und Thermostabilität der Codons die Grundlage des Beginns und der Evolution des genetischen Codes (Eigen and Schuster, 1977). Da zwischen Guanin und Cytosin drei, zwischen Adenin und Uracil jedoch nur zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, besitzt das komplementäre GGC-GCC-Codonpaar die größte Thermostabilität. Diese Codons codieren in modernen Zellen Glycin und Alanin, bei denen es sich nach der Konsensus-Reihenfolge um die ältesten Aminosäuren handelt, was unter anderem maßgeblich durch die hohe Ausbeute in Urey-Miller-Experimenten angezeigt wird. Demnach wären Alanin und Glycin in einer primordialen Welt durch die Codons GGC bzw. GCC komplementärer Stränge einer doppelsträngigen RNA codiert worden (Trifonov, 2009). Ausgehend von repetitiven Triplet-Paaren konnten durch Punktmutationen weitere komplementäre Basenpaare entstehen. Für Aspartat und Valin, die beiden nächsten Aminosäuren in der Chronologie, wäre folglich anzunehmen, dass GUC beispielsweise aus dem GGC-Codon des Glycins, und GAC aus dem GCC-Codons des Alanins hervorging. Diese Codons (GUC für Valin und GAC für Aspartat) besitzen von allen in modernen Zellen zur Verfügung stehenden Codons die größte Thermostabilität. Nach diesem Prinzip konnten komplementäre Codons, die sich alle auf die ursprünglichen Glycin- und Alanincodons zurückführen lassen, Schritt für Schritt in den Code eingebaut werden, bis alle 64 Codons besetzt waren. Dies wäre mit der Codierung von Asparagin, die an 13. Stelle der Reihenfolge steht, der Fall gewesen. Weitere Aminosäuren konnten nur durch ein *capture* bereits Aminosäuren-codierender Codons oder von Stopp-Codons Proteinogenität erlangen. Bei diesen sogenannten *codon capture*-Aminosäuren würde es sich demnach um Lysin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Methionin, Tyrosin und Tryptophan handeln (Trifonov, 2009).

1.3 Ziele der Arbeit

Es existieren zahlreiche Theorien zur Entstehung und Evolution des genetischen Codes (1.2.1 und 1.2.2). Zudem sind neutrale und adaptive Mechanismen postuliert worden, welche die beobachteten Abweichungen vom Standard-Code plausibel erklären können (1.2.3). Die Gründe für die Präferenz der selektierten 20 gegenüber den nicht-proteinogenen Aminosäuren sind jedoch bis heute unbekannt. Die analysierten Parameter Hydrophobizität, Größe und Ladung erklären die Selektion nur unzureichend (1.2.4). Hinsichtlich der beschriebenen Reihenfolge des Aminosäureeinbaus in den genetischen Code, die möglicherweise auf den Prinzipien der Komplementarität, Thermostabilität und Prozessivität beruht, gibt es den wissenschaftlichen Konsens eines schrittweisen Einbaus: präbiotische verfügbare Aminosäuren wurden zuerst genetisch determiniert, bevor biotische Aminosäuren in den Code aufgenommen werden konnten. Ungeachtet dessen bleibt die Evolution des genetischen Codes eines der größten Rätsel der Biologie.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob der postulierten Chronologie der Aminosäureinkorporation unter Berücksichtigung der evolutionären Aminosäureselektion ein grundlegendes und umfassendes Prinzip unterliegt.

Da einige der als modern eingestuften *codon capture*-Aminosäuren als redox-aktive Strukturen beschrieben sind, sollte die potentielle Relevanz ihrer Reaktivität hinsichtlich der Evolution des genetischen Codes erforscht werden. Hierzu erfolgte zunächst eine quantenchemische Charakterisierung und metabolische Analyse der Aminosäuren. Darauf basierend sollte die Aminosäure-Reaktivität biochemisch bestimmt sowie die funktionelle Bedeutung von Aminosäurederivaten in Membran- und Zellsystemen untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Allgemeine Geräte

Geräte (allgemein)	Hersteller
Eismaschine Hfr 586 Basic	Heraeus (Hanau)
Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Falcons	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200)	Zeiss (Oberkochen)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Heizplatte MR 3000	Heidolph (Schwabach)
Inkubator	Memmert (Schwabach)
Mikroskop (CKX 31)	Olympus (Hamburg)
Mikrotiterplatten	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Multiscan RC)	Thermo Labsystems (Egelsbach)
Photometer (DU 800)	Beckman Coulter (München)
Ultraschallprozessor (UP50H)	Hielscher (Teltow)
Ultrazentrifuge (Optima TLX)	Beckman Coulter (München)
Vakuumfiltrationsgerät	Schleicher & Schuell (Dassel)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)

2.1.1.2 Zellkulturgeräte- und materialien

Material/Gerät	Hersteller
10 cm-Kulturschalen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Falcons	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Kryoröhrchen	Starlab (Hamburg)
Mikrotiterplatten (96 wells)	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilbank	Baker Company (Sanford, USA)
Zentrifuge (5424 R)	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Heraeus (Hanau)
Zentrifugenröhrchen (Centrif. tubes, 34378)	Beckman Coulter (München)

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)dihydrochlorid, (APPH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), (ABTS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Acetonitril	Roth (Karlsruhe)
Diethylether	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Diphenylpikrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Eisen(II)-sulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Fluorescein	Schleicher & Schuell (Dassel)
Galvinoxyl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hoechst 33342	Thermo Labsystems (Egelsbach)
Isofluran	AbbVie (Ludwigshafen)
Kaliumiodid	Merck (Darmstadt)
Kaliumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Aminosäuren	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
7,7,8,8-Tetraeyanoquinodimethane (TCNQ)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
tert-Butylhydroperoxid (TBH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Thiobarbitursäure (TBA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Für die Lipidperoxidationsexperimente wurde der 8-Isoprostan-EIA-Kit der Firma *Cayman Chemicals* (Ann Arbor, USA) verwendet. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet und aufbewahrt.

2.1.2.1 Aminosäurederivate

N-Acetyl-phenylalaninethylester (NAc-F-OEt), N-Acetyl-tryptophanethylester (NAc-W-OEt) und N-Acetyl-tyrosinethylester (NAc-Y-OEt) wurden von der Firma Bachem erworben. N-Dodecanoyl-alaninethylester (NDo-A-OEt), N-Dodecanoyl-leucinethylester (NAc-L-OEt), N-Dodecanoyl-phenylalaninethylester (NDo-F-OEt), N-Dodecanoyl-tyrosinethylester (NDo-Y-OEt), N-Dodecanoyl-tryptophanethylester (NDo-W-OEt) und N-Dodecanoyl-

valinethylester (NDo-V-OEt) wurden von Dr. Bernd Moosmann als Syntheseprodukte bereitgestellt. Die Synthese erfolgte auf Basis von Vorläuferstrukturen, die von Bachem bezogen worden waren. Benfuranilalanin (BFA), Benzothiohenylalanin (BTA), N-Dodecanoyl-benzofuranilalanin (NDo-BFA) und N-Dodecanoyl-benzothiophenylalanin (NDo-BTA) wurden von Dr. Florin-Dan Irimie, (Universität Cluj-Napoca, Rumänien) zur Verfügung gestellt. N-Dodecanoyl-tryptophan (NDo-W) wurde in der vorliegenden Arbeit synthetisiert (2.2.3.3). Mit Ausnahme des Produktes aus der Eigensynthese sind alle aufgeführten Aminosäurederivate in Abb. 8 dargestellt.

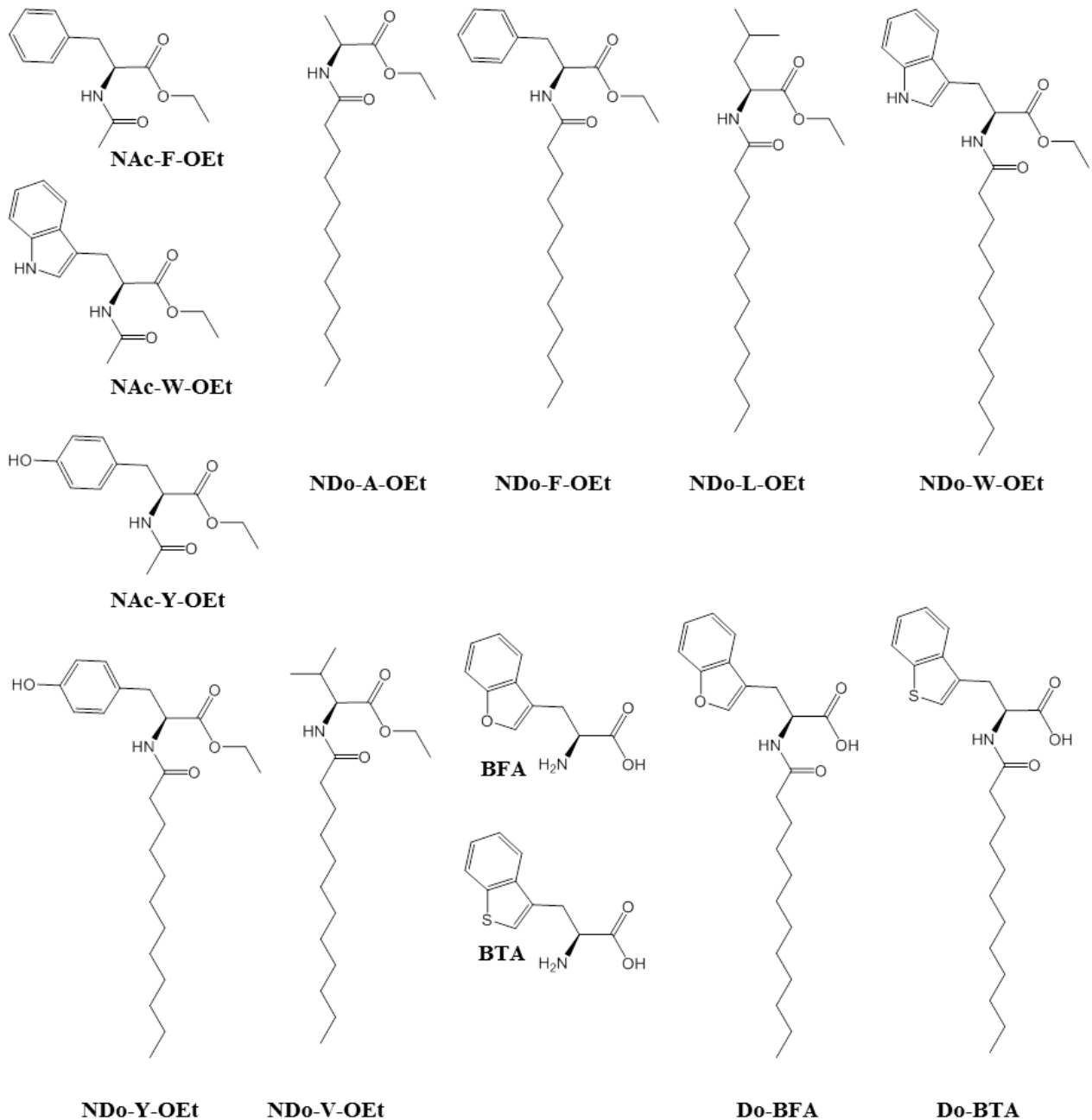


Abb. 8 Aminosäurederivate. Für die verschiedenen Experimente wurden kurzkettinge Derivate von Phenylalanin (NAc-F-OEt), Tryptophan (NAc-W-OEt) und Tyrosin (NAc-Y-OEt), langkettige Derivate von Alanin (NDo-A-OEt), Phenylalanin (NDo-F-OEt), Leucin (NDo-L-OEt), Tryptophan (NDo-W-OEt), Tyrosin (NDo-Y-OEt) und Valin (NDo-V-OEt), die Tryptophan-Analoga Benzothiofuranylalanin (BFA) und Benzothiophenylalanin (BTA) sowie deren langkettige Derivate NDo-BFA und NDo-BTA verwendet. Die Aminosäuren sind in ihrem Einbuchstabencode dargestellt.

2.1.2.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Für Zellkulturexperimente wurden ausschließlich Lösungen und Medien der Firma Invitrogen verwendet. Als Medium diente *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). 500 ml des Mediums wurden mit 50 ml fötalen Kälberserums (FCS), 5 ml Natriumpyruvat (100 mM) und 5 ml einer Antibiotic-Antimycotic-Lösung (100 x, bestehend aus 10 000 units/mL Penicillin, 10 000 µg/mL Streptomycin, und 25 µg/mL Amphotericin B) supplementiert. Das FCS wurde vor Gebrauch bei einer Temperatur von 56 °C für 30 min inaktiviert.

2.1.2.3 Zelllinie

Für die Zellkulturexperimente wurden IMR-90-Zellen, die vom *Coriell Institute for Medical Research* (Camden, USA) erworben wurden, verwendet. Hierbei handelt es sich um humane Lungenfibroblasten, die aus einem 16 Wochen alten weiblichen Fötus stammen (Nichols et al., 1977).

2.2 Methoden

2.2.1 Quantenchemische Berechnungen

Das Erstellen aller chemischer Strukturen sowie die anschließenden quantenchemischen Berechnungen wurden mithilfe der Programme ChemDraw Pro 13.0 bzw. ChemBio3D der Firma CambridgeSoft durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst eine geometrische Optimierung der Moleküle auf Grundlage von Allingers MM2-Molekularmechanik-Kraftfeld (Allinger, 1977). Grundlage der Optimierung sind Berechnungen der atomaren Positionen und Bindungseigenschaften, wie Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkel, die zu einer Minimierung der kumulativen Potentialenergie der Gesamtstruktur führen. Anschließend erfolgten quantenchemischen Berechnungen. Mithilfe dieser Berechnungen kann die elektronische Struktur eines Moleküls beschrieben werden. In dieser Arbeit wurden die sogenannten molekularen Grenzorbitale, die HOMOs und LUMOs umfassen, quantenchemisch bestimmt (siehe 3.1 für weitere Erklärungen). Zur Untersuchung der Radikalisierungseigenschaften wurden weiterhin die Bildungsenthalpien der Aminosäuren und der korrespondierenden Radikalstrukturen berechnet.

Die Energieniveaus der Grenzorbitale wurden mithilfe verschiedener quantenchemischer Methoden bestimmt: Zum einen wurden semi-empirische Methoden, zum anderen ein *ab initio*-Verfahren durchgeführt. Während bei *ab initio*-Verfahren elektronische Eigenschaften von Molekülen auf theoretischer Basis vorhergesagt werden und hierbei vollständig auf experimentelle Daten verzichtet wird, werden bei semi-empirischen Methoden zeitaufwändige Berechnungen bestimmter Integrale durch experimentelle Parameter ersetzt (Gorelsky, 2009). Die semi-empirischen Berechnungen wurden zunächst mithilfe des Zusatzprogramms *Molecular Orbital PACkage* (MOPAC 2009) in ChemBio3D auf Grundlage der AM1-Methode durchgeführt (Dewar et al., 1985). Anschließend erfolgte die semi-empirische Kalkulation auf Basis der PM6-Methode, die eine Weiterentwicklung des AM1-Verfahrens darstellt (Stewart, 2007). Als *ab initio*-Methode wurde die Hartree-Fock-Methode mit dem Basis-Set 6-31G angewandt.

Um die Radikalisierungseigenschaften der Aminosäuren untersuchen zu können, wurde der semi-empirische AM1-Algorithmus angewandt. Hierzu wurden zunächst die Standard-Bildungsenthalpien (H_f^p) der geometrisch optimierten Parentalstrukturen bestimmt. Anschließend erfolgte die Entfernung des Wasserstoffatoms ($H\cdot$), das bei einer potentiellen Interaktion mit einem ($H\cdot$)-abstrahierenden Radikal abgegeben wird, woraus eine Radikalisierung der Aminosäure resultiert. Nach Berechnung der Bildungsenthalpie des Aminosäureradikals (H_f^{rad}) wurde die Differenz ΔH_f der Enthalpien von radikalisierten und parentalen Strukturen, die sogenannte Radikalisierungsenthalpie, berechnet.

2.2.2 Analyse des Metabolismus aromatischer Aminosäuren

Der Metabolismus der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie die Synthesewege einer Reihe von Derivaten dieser Aminosäuren wurden mithilfe der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Datenbank untersucht (Kanehisa and Goto, 2000). Bei den untersuchten Strukturen handelte es sich um Bestandteile der Elektronentransportkette in Mitochondrien (Ubichinon) bzw. Chloroplasten (Plastochinon), Vitamin E-Formen (Tocopherol und Tocotrienol), sekundäre Pflanzenstoffe (Quercetin, Coumarol und Resveratrol), den Radikalvorläufer 5,6-Dihydroxylindol und das Hormon Melatonin.

Hierbei wurden alle enzymatischen Reaktionen, die für die Synthese der Aminosäuren und ihrer Derivate benötigt werden, hinsichtlich ihrer Sauerstoffabhängigkeit analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Biosynthese der bakteriellen Cofaktoren Cysteintyrosyl-Cofaktor, Cysteintryptophylchinon, Lysintyrosylchinon, Pyrrolochinolinchinon, Topa-Chinon und Tryptophantryptophylchinon, die sich ebenfalls von Tyrosin und Tryptophan ableiten, die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs erfordert.

2.2.3 Organische Synthesen

Die Untersuchung der Reaktivität der freien Aminosäuren sowie der Bedeutung von Aminosäuren als Bestandteil von Membranproteinen erforderte die Darstellung verschiedener Moleküle, die nicht kommerziell erhältlich waren und aus diesem Grund aus Vorläuferstrukturen synthetisiert wurden.

2.2.3.1 Synthese des TCNQ-Radikalanions

Für die Synthese des TCNQ-Anions (2.1.2.1) wurden 1,6 g Tetracyanochinodimethan (TCNQ) in 150 ml Acetonitril bei einer Temperatur von 75°C gelöst, bevor 3,5 g Kaliumiodid (KI) hinzugegeben wurden. Aus der Lösung präzipitierten unmittelbar violettfarbene Kristalle aus K^+TCNQ^- . Nachdem der Ansatz auf RT abgekühlt, wurde der Feststoff mithilfe einer Nutsche gesammelt. Die Kristalle wurden anschließend zweimalig mit Acetonitril gewaschen und mittels Zentrifugation bei 5000 g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde daraufhin für 24 h im Exsikkator getrocknet. Die Qualität der Synthese wurde anschließend durch die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums in Ethanol überprüft, in dem die charakteristischen Absorptionsbanden bei 417 und 743 nm detektiert wurden (Melby et al., 1962).

2.2.3.2 Synthese des ABTS-Radikalkations

Die radikalische, kationische Form des Redoxchromophors 2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure, ABTS; 2.1.2.1) wurde mithilfe des Oxidationsmittels

Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$) hergestellt. Hierzu wurden 745 μ l einer 7 mM Lösung von ABTS (in ddH₂O) mit 245 μ l einer 10 mM $K_2S_2O_8$ -Lösung (in ddH₂O) versetzt und für 16 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Bildung des ABTS-Radikalkations ($ABTS^+$) wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 743 nm bestätigt (Re et al., 1999).

2.2.3.3 Synthese von N-Dodecanoyltryptophan

Die Herstellung des N-Dodecanoyltryptophans erfolgte durch alkalische Hydrolyse von N-Dodecanoyltryptophanethylester. Hierzu wurden 50 mg der Substanz in 20 ml methanolischer Kalilauge (90 % Methanol, 10 % 3 M KOH) bei 80°C für 3 Stunden erhitzt. Nach Abkühlung auf RT erfolgte die Zugabe von 20 ml ddH₂O und 40 ml Diethylether. Anschließend wurde die alkalische, wässrige Phase mit 1 ml 6 N HCl neutralisiert. Nach Schütteln wurde die Etherphase von der wässrigen Phase abgetrennt. Nachfolgend erfolgte eine zweifache Etherextraktion der lipophilen Phase, bevor der Ether unter Vakuum abrotiert wurde. Der Extrakt wurde in einem Exsikkator über Nacht getrocknet und per NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert. Die Synthese ist in Abb. 9 dargestellt.

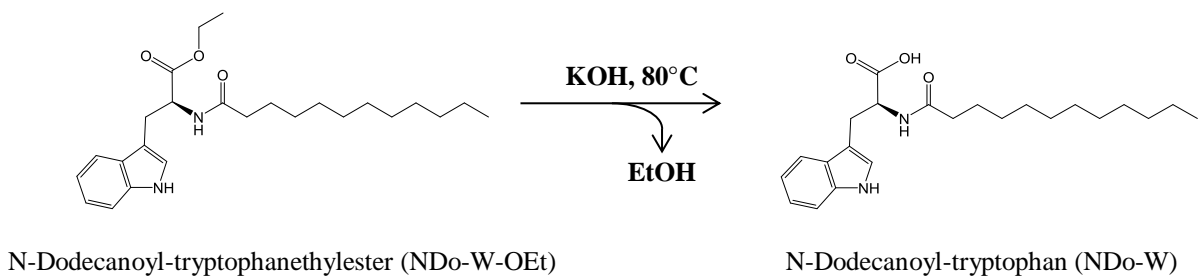


Abb. 9. Synthese von NDo-W aus NDo-W-OEt. Aus dem dodecanoylierten Tryptophanethylester wurde durch alkalische Hydrolyse unter Abspaltung von Ethanol (EtOH) NDo-W synthetisiert.

2.2.4 Biochemische Methoden

Um die Reaktion der 20 Standard-Aminosäuren mit Radikalen zu untersuchen, wurden verschiedene Radikal-Tests durchgeführt, deren Prinzip auf einer Messung der spezifischen

Absorption des verwendeten Radikals (TCNQ-Radikalanion, Galvinoxylradikal, DPPH-Radikal und ABTS-Radikalkation, Abb. 10 und 2.2.4.1/2) oder der Fluoreszenz eines Radikalsubstrats (2.2.4.3) nach Zugabe der entsprechenden Aminosäure beruht.

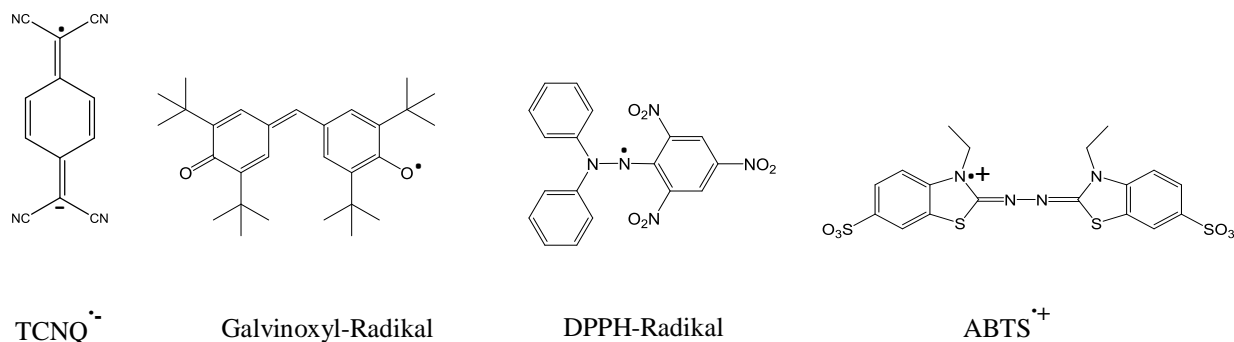


Abb. 10. Verwendete Radikale zur Untersuchung der Aminosäurereaktivität. Die dargestellten Radikale besitzen chromophore Gruppen. Findet eine Reaktion einer Aminosäure mit dem jeweiligen Radikal statt, verändern sich die chromophoren Eigenschaften des Radikals. Die Veränderung der Absorption kann photometrisch bestimmt werden; TCNQ: Tetracyanochinodimethan; DPPH: Diphenylpicrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure).

2.2.4.1 ABTS-Radikalkation-Assay

Die angesetzte ABTS^{•+}-Lösung (2.2.3.2) wurde für das Experiment in einer OD₇₄₃ von 0,7-0,8 verwendet. Die Zugabe der jeweiligen Aminosäure zu dieser verdünnten, wässrigen Lösung erfolgte in einer finalen Konzentration von 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 oder 100 μM. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde die Absorption des verbliebenen, nicht reagierenden ABTS^{•+} spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 734 nm bestimmt (Re et al., 1999).

2.2.4.2 Reaktivitätstests mit TCNQ-, Galvinoxyl- und DPPH-Radikalen

Die Reaktivitätstests der Aminosäuren mit dem TCNQ-Radikalanion, dem Galvinoxyl-Radikal und dem DPPH-Radikal konnten aufgrund der Löslichkeitseigenschaften dieser Radikale unter denselben Bedingungen durchgeführt werden, was einen Vergleich

ermöglichte. Hierbei wurden zunächst gepufferte, ethanolische Lösungen (90 % Ethanol und 10 % PBS) der verschiedenen Radikale hergestellt und jeweils in Eppendorfgefäßen aliquotiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der jeweiligen Aminosäuren in einer finalen Konzentration von 1 mM. Die Proben wurden für 5 h bei 37°C inkubiert. Zur Beurteilung der Aminosäurereaktivität wurde die radikalspezifische Absorption aller Proben spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 743 nm (TCNQ⁻) (Melby et al., 1962), 430 nm (Galvinoxyl-Radikal) (Grilj et al., 2012) bzw. 517 nm (DPPH-Radikal) (Litwinienko and Ingold, 2003) gemessen.

2.2.4.3 Reaktion mit Peroxylradikalen

Zur Untersuchung der Reaktivität zwischen Aminosäuren und Peroxylradikalen wurde der Zerfall des fluoreszierenden Moleküls Fluorescein gemessen. Die Peroxylradikale, die aus der oxidativen Spaltung des Radikalgenerators 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) resultieren, reagieren hierbei mit Fluorescein, das dabei in nicht-fluoreszierende Produkte umgewandelt wird. Ist ein Antioxidans in der Probe vorhanden, das mit Peroxylradikalen reagiert, wird die Oxidation von Fluorescein verzögert bzw. verhindert (Huang et al., 2005).

Das Experiment wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt, die im Folgenden mit A und B gekennzeichnet sind. Hierzu wurde eine PBS-Lösung (pH 7,4), bestehend aus 6 nM Fluorescein, 1 µM EDTA und 1 mM (A) bzw. 10 µM (B) der jeweiligen Aminosäure hergestellt und für 15 min bei 37°C in einer 96-well-Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde der Radikalgenerator 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid (AAPH) in einer finalen Konzentration von 3 mM (A) bzw. 20 mM (B) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert, wobei alle zwei Minuten die Fluorescein-Fluoreszenz bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 538 nm gemessen wurde.

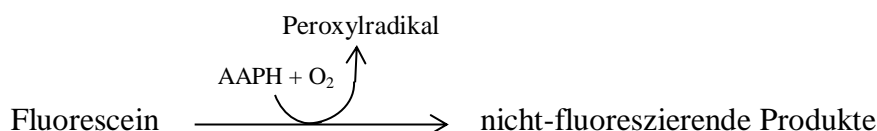


Abb. 11 Oxidative Degradation von Fluorescein. Fluorescein wird durch AAPH-abgeleitete Peroxylradikale oxidativ zu nicht-fluoreszierenden Produkten degradiert.

2.2.5 Lipidperoxidation

Unter dem Begriff der Lipidperoxidation versteht man die oxidative Schädigung von Lipiden einer Biomembran (Abb. 12). Dieser oxidative Prozess wird durch reaktive Sauerstoffradikale initiiert. Hierbei wird beispielsweise durch ein Hydroxylradikal ein Wasserstoffatom (H-Atom) einer mehrfach ungesättigten Fettsäure abstrahiert.

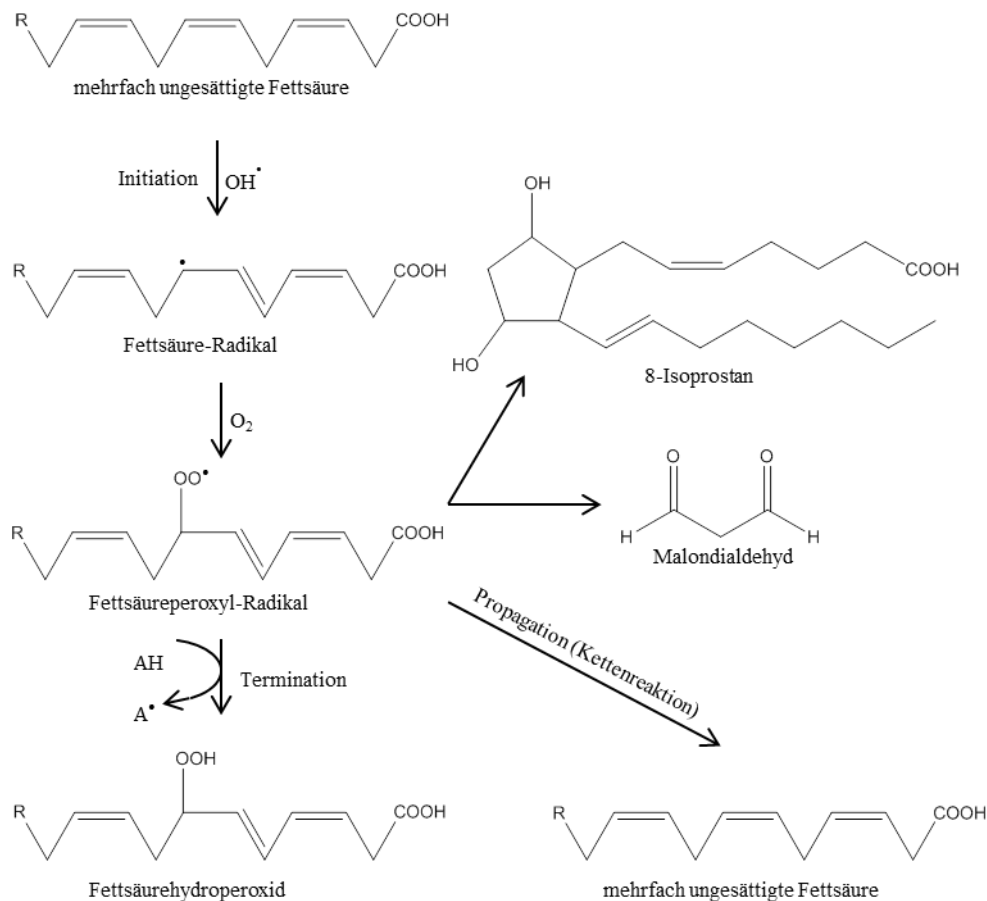


Abb. 12. Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidation wird durch eine Radikal-verursachte Abstrahierung eines H-Atoms einer mehrfach ungesättigten Fettsäure initiiert. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff entsteht aus dem Fettsäure- ein Fettsäureperoxyl-Radikal, das in einer Kettenreaktion H-Atome von weiteren ungesättigten Fettsäuren abstrahieren kann. Der Kettentransfer wird durch die Reaktion eines Antioxidans (AH) mit dem Fettsäureperoxyl-Radikal terminiert, wodurch ein Fettsäurehydroperoxid und die radikalisierte Form des Antioxidans (A $^\bullet$) entstehen.

In Anwesenheit von Sauerstoff entsteht aus dem Fettsäure-Radikal ein Fettsäure-Peroxyradikal, das seinerseits in einer Kettenreaktion weitere ungesättigte Fettsäuren

attackieren kann. Eine Termination der Kettenreaktion erfolgt bei Reaktion zwischen zwei Radikalen oder durch Abfangen eines Fettsäure-Radikals durch ein Antioxidans (AH). In diesem Fall entstehen das relativ unreaktive Fettsäurehydroperoxid und die stabile, radikalisierte Form des Antioxidans (A[•]). Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, können aus dem Fettsäureperoxyl-Radikal durch verschiedene Prozesse unter anderem Malondialdehyd und 8-Isoprostan gebildet werden, bei denen es sich um Lipidperoxidationsprodukte handelt.

2.2.5.1 Präparation von Rattenhirnmembranen

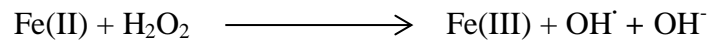
Zur Untersuchung von Lipidperoxidationsprozessen wurden native Membranen aus Rattengehirn verwendet. Demnach wurde eine adulte Sprague-Dawley-Ratte mittels Isofluran anästhesiert und dekapitiert. Anschließend wurde das Gehirn entnommen, mit einem Skalpell zerkleinert und mithilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenisator in einem Puffer (1:3 v/v, Tab.1), der zuvor entgast wurde, homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde im gleichen Volumen des Puffers resuspendiert und bis zur Homogenität sonifiziert. Das Lysat wurde anschließend für 30 min bei 6400 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Pellet in ddH₂O resuspendiert, sonifiziert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 10 ml ddH₂O aufgenommen, nochmals sonifiziert und für 60 min bei 100 000 g und 4°C ultrazentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Pellets in ddH₂O resuspendiert, bevor der Proteingehalt der Suspension mittels eines BCA-Assays ermittelt wurde. Die Rattenhirnmembransuspension wurde anschließend in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tab. 1 Lipidpuffer zur Homogenisierung von Rattenhirngewebe

Komponente	Konzentration [mM]
Kaliumchlorid	5
Magnesiumchlorid	1
Tris, pH 7,4	20

2.2.5.2 Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten

Die Untersuchung der Lipidperoxidation erfolgte in den zuvor präparierten Rattenhirnlipiden nach Inkubation mit pro-oxidativem System aus FeSO₄/Ascorbat. Die pro-oxidative Eigenschaft von FeSO₄ ist auf die Fenton-Reaktion zurückzuführen, bei der Fe(II) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Fe(III), einem Hydroxylradikal (OH[•]) sowie einem Hydroxidion (OH⁻) reagieren.



Das Ascorbat dient in diesem System als Redox-Cycler, indem es das gebildete Fe(III) zu Fe(II) reduziert, das dadurch regeneriert wird und der erneuten Bildung von Hydroxylradikalen zur Verfügung steht.

Zur Durchführung der Lipidperoxidationsexperimente wurde eine Suspension aus Rattenhirnlipiden in PBS (0,5 mg/ml) hergestellt und mit 100 µM der jeweiligen Aminoacyllipide (in Ethanol) für 1 h bei RT vorinkubiert. Zur Initiierung der Lipidperoxidation wurden die Proben mit 10 µM FeSO₄ und 200 µM Ascorbat behandelt. Nach 30 min wurden die Proben hinsichtlich der Bildung von Malondialdehyd und 8-Isoprostan analysiert.

Zur Messung des gebildeten Malondialdehyds wurde zunächst eine Stopp-Lösung aus 3,8 Vol. 5 % Trichloressigsäure in 1 M Essigsäure und 1 Vol. 0,5 % Thiobarbitursäure in 50 mM NaOH hergestellt. Um die Reaktion zu beenden, wurde 1 Vol. der Proben mit 3 Vol. der Stopp-Lösung gemischt. Anschließend wurden die Proben in einem Heizblock für 30 min bei 95°C erhitzt. Die Reaktion wurde durch die Überführung der Proben in ein Eisbad gestoppt. Unlösliche Präzipitate wurden mittels einer Zentrifugation für 10 min bei 14000 x g pelletiert. Der Überstand wurde in eine Mikrotiterplatte (96 wells) überführt und hinsichtlich der Bildung des fluoreszierenden Adduktes aus MDA und TBA (Exzitation: 532 nm / Emission: 572 nm) analysiert.

Die Bildung von 8-Isoprostan wurde mithilfe eines EIA-Kits (*Cayman Chemicals*, Ann Arbor, USA) nachgewiesen. Das Experiment wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die Proben zunächst nach den angegebenen 30 min Inkubationszeit für 5 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung der freigesetzten Isoprostane verwendet. Das Messprinzip beruht auf der kompetitiven Bindung von freiem 8-Isoprostan aus den Proben und mit Acetylcholinesterase

verknüpftem 8-Isoprostan (Tracer) an ein isoprostanspezifisches Antiserum. Dieses wiederum bindet an eine mit Antikörpern vorbeschichteten 96-well-Mikrotiterplatte. Demnach ist die Bindung des Tracers an das Antiserum invers proportional zur Konzentration an freiem 8-Isoprostan der untersuchten Proben. Die Zugabe von Ellmans Reagenz als Substrat der Acetylcholinesterase zu den mit Tracer, Antiserum und Proben vorbehandelten *wells* bewirkte die Freisetzung des Endprodukts 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, dessen Konzentration spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt wurde.

2.2.6 Zellkultur

Die Kultivierung von IMR-90-Zellen erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer Kohlendioxid-Konzentration von 5 %. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die adhärennten Zellen trypsinisiert und im Verhältnis 1:4 auf neue 10 cm-Zellkulturschalen verteilt.

Für die langfristige Aufbewahrung wurden die IMR-90-Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Hierzu wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturmediums trypsinisiert und durch Zentrifugation (4 min, 200 g) pelletiert. Die Zellen wurden in mit 10% DMSO versetztem DMEM-Medium resuspendiert und über einen Zeitraum von zwei Tagen bei -80 °C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

2.2.7 Hoechst-Färbung von IMR-90-Fibroblasten

Bei Hoechst 33342 handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA von lebenden und toten Zellen bindet, weshalb es als Zellkernfarbstoff eingesetzt wird. Da sich einzelne Fibroblasten im Phasenkontrastmikroskop aufgrund ihres dichten Wachstums optisch kaum voneinander unterscheiden lassen, wurde der Hoechst-Farbstoff 33342 als Zellkernindikator zur Quantifizierung verwendet.

Zur Untersuchung der Cytotoxizität in Fibroblasten wurden konfluente Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten in 100 µl Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 5 Stunden mit 10 µM der jeweiligen Aminoacyllipide vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µM *tert*-Butylhydroperoxid. Nach weiteren 5 Stunden wurden die Zellen für

15 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (1 µg/ml) inkubiert. Daraufhin erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Hoechst-Färbung, indem die Zellen manuell gezählt wurden. Zellen, die durch fibroblastentypische dreieckige Zellkörper sowie ausgeprägte, cytoplasmatische Fortsätze gekennzeichnet waren, wurden als Zellen mit normaler Morphologie bewertet. Die Cytotoxizität wurde anhand des Quotienten aus Zellzahl mit normaler Morphologie und der Gesamtzellzahl ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Quantenchemische Charakterisierung der Aminosäuren

Um die Bedeutung der Aminosäurereaktivität für die Evolution des genetischen Codes zu untersuchen, erfolgte eine quantenchemische Analyse diverser präbiotisch verfügbarer Aminosäuren sowie der 20 Standard-Aminosäuren plus Selenocystein. Als präbiotische Gruppe wurden die Aminosäuren des Murchison-Meteoriten herangezogen. Diese Gruppe umfasst 54 nicht-proteinogene Aminosäuren und die 8 proteinogenen Aminosäuren Alanin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Valin (Tab. 2).

Tab. 2 Aminosäuren des Murchison-Meteoriten in alphabetischer Reihenfolge

2,3-Diaminobutansäure	4-Amino-3-methylbutansäure
2,3-Diaminopropansäure	4-Aminopentansäure
2,4-Diaminobutansäure	5-Aminopentansäure
2-Amino-2,3,3-trimethylbutansäure	Alanin
2-Amino-2,3-dimethylbutansäure	α -Aminoadipinsäure
2-Amino-2,3-dimethylpentansäure	α -Aminobutyrat
2-Amino-2,4-dimethylpentansäure	α -Aminoisobutyrat
2-Amino-2-ethyl-3-methylbutansäure	α -Aminopimelinsäure
2-Amino-2-ethylbutansäure	α -Methylnorleucin
2-Amino-2-ethylpentansäure	α -Methylvalin
2-Amino-2-methylhexansäure	Aspartat
2-Amino-3,3-dimethylpentansäure	β -Alanin
2-Amino-3,4-dimethylpentansäure	β -Aminobutyrat
2-Amino-3-ethylpentansäure	β -Aminoisobutyrat
2-Amino-3-methylhexansäure	Cycloleucin
2-Amino-4,4-dimethylpentansäure	γ -Aminobutyrat
2-Amino-4-methylhexansäure	Glutamat
2-Amino-5-methylhexansäure	Glycin
2-Aminoheptansäure	Isoleucin
2-Methylaspartat	Isovalin
2-Methylglutamat	Leucin
2-Methyl-norvalin	N-Ethylglycin
3,3'-Diaminoisobutansäure	N-Methylalanin
3-Amino-2,2-dimethylpropansäure	Norleucin
3-Amino-2-ethylpropansäure	Norvalin
3-Amino-2-methylbutansäure	Ornithin
3-Amino-3-methylbutansäure	Pipecolinsäure
3-Aminopentansäure	Prolin
3-Methylaspartat	Pseudoleucin
4,4'-Diaminoisopentansäure	Valin
4-Amino-2-methylbutansäure	

Für die quantenchemische Analyse wurden die molekularen Grenzorbitale der Aminosäuren (HOMOs und LUMOs) berechnet. Unter dem HOMO eines Moleküls versteht man das Orbital, das von den mit Elektronen besetzten Molekülorbitalen die höchste Energie aufweist. Das LUMO hingegen ist das unbesetzte Orbital mit der niedrigsten Energie. Anhand dieser beiden Grenzorbitale lässt sich die chemische Reaktivität bezüglich einer Vielzahl von Reaktionen vorhersagen (Fukui, 1982). Dies ist in der Eigenschaft der Grenzorbitale, Elektronen abzugeben (HOMO) bzw. aufzunehmen (LUMO) begründet, wobei sowohl ein intra- als auch ein intermolekularer Elektronentransfer möglich ist (Zhang and Musgrave, 2007; Yoshizawa, 2012). Die Bedeutung der Energieniveaus der Orbitale für die Reaktivität eines Moleküls ist in Abb. 13 dargestellt.

Besitzt ein Molekül ein hochenergetisches HOMO (Molekül 2, Abb. 13), das mit 2 Elektronen besetzt ist, so besteht die Möglichkeit der Interaktion mit dem LUMO eines weiteren Moleküls (Molekül 1), dessen Energie nur um einen relativ geringen Betrag größer ist als die von HOMO 2 (Differenz: ΔE_2). Dadurch kann ein Transfer eines Elektrons vom HOMO zum LUMO erfolgen (langer, grüner Pfeil, Abb. 13). Die Differenzen zwischen den HOMOs der beiden anderen dargestellten Moleküle 1 und 3 und dem LUMO von Molekül 2 (ΔE_1 und ΔE_3) hingegen sind zu groß für eine Interaktion, wodurch keine Elektronen übertragen werden können (rote, gestrichelte Pfeile). Der Grund liegt in den vergleichsweise niedrigen Energieniveaus der entsprechenden HOMOs sowie dem hohen Energieniveau von LUMO 2. Ein Sonderfall des intermolekularen Elektronentransfers stellt das HOMO eines Moleküls dar, das nur mit einem Elektron besetzt ist, weshalb es als SOMO (*singly occupied molecular orbital*) bezeichnet wird. SOMOs sind charakteristisch für Radikale und können je nach Energieniveau und Interaktionspartner mit HOMOs oder LUMOs reagieren (nicht dargestellt). Die Möglichkeit eines intramolekularen Elektronentransfers ist hingegen von der Größe der HOMO-LUMO-Differenz abhängig: Bei geringem Energieunterschied kann ein Elektron des HOMOs durch Anregung auf das Energieniveau des LUMOs desselben Moleküls angehoben werden (kurzer, grüner Pfeil, Bandlücke 1). Bei größerer Energie-Differenz ist der Übergang von HOMO zu LUMO nur bei hoher Anregungsenergie möglich (Bandlücken 2 und 3).

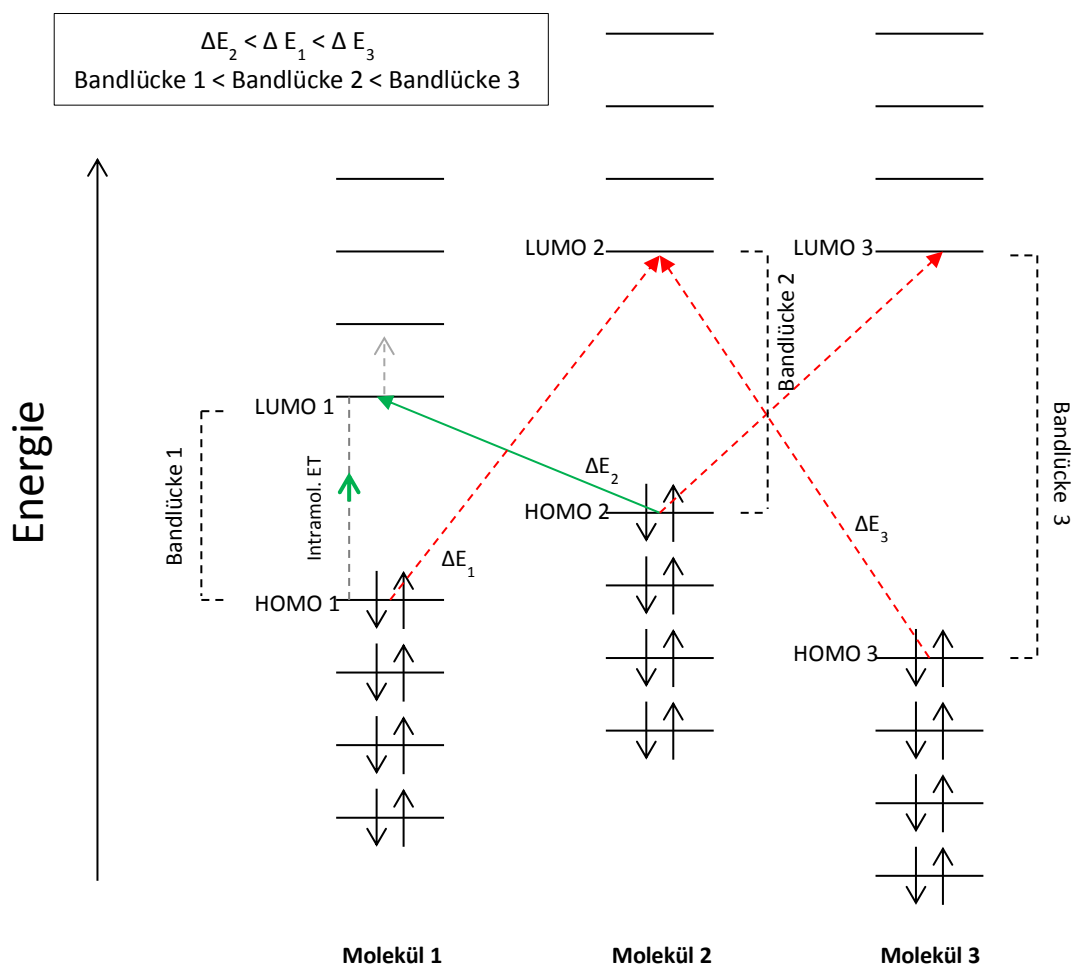


Abb. 13 Molekulare Grenzorbitale (HOMOs und LUMOs). Nach der Grenzorbitaltheorie determinieren die molekularen Grenzorbitale die chemische Reaktivität eines Moleküls (Fukui, 1982). Das theoretische Potential für inter- und intramolekulare Wechselwirkungen ist am Beispiel von drei verschiedenen Molekülen dargestellt. Aufgrund der niedrigen Energiedifferenz (ΔE_2) ist eine Interaktion zwischen dem HOMO von Molekül 2 (HOMO 2) und dem LUMO von Molekül 1 (LUMO 1) möglich (langer, grüner Pfeil). Sind die HOMOs jedoch relativ energiearm (HOMO 1 und 3), so sind die Energiedifferenzen zu einem hochenergetischen LUMO (LUMO 2) zu groß für einen intermolekularen Elektronentransfer (rote Pfeile). Ein intramolekularer Transfer ist nur bei kleiner Bandlücke möglich, wie es für das Elektron in Molekül 1 dargestellt ist, das bei Absorption des Energiebetrags ΔE_1 aus dem HOMO 1 in das LUMO 1 übertragen wird (kurzer, grüner Pfeil). Der graue, gestrichelte Pfeil symbolisiert ein Elektron, das nach inter- oder intramolekularem Transfer LUMO 1 besetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grenzorbitale und daraus abgeleiteten HOMO-LUMO-Differenzen der Aminosäuren des Murchison-Meteoriten und der 21 proteinogenen Aminosäuren auf Grundlage der semi-empirischen AM1- und PM6-Methode sowie *ab initio* mithilfe des Hartree-Fock-Verfahrens quantenchemisch berechnet (siehe 2.2.1). Die ermittelten Werte sind für die proteinogenen Aminosäuren in Tab. 3 vergleichend dargestellt und werden im Folgenden (3.1.1 und 3.1.2) näher erläutert.

Tab. 3 Grenzorbitalenergien und HOMO-LUMO-Differenzen der 21 proteinogenen Aminosäuren. Den 21 proteinogenen Aminosäuren (AS, im Einbuchstabencode) sind die semi-empirisch und *ab initio* berechneten Grenzorbitalenergien sowie HOMO-LUMO-Energiedifferenzen zugeordnet. Die Aminosäuren sind in der Konsensus-Reihenfolge ihres Auftretens (von oben nach unten) aufgelistet (Trifonov, 2009).

AS	Semi-empirisch						<i>Ab initio</i>		
	AM1			PM6			Hartree-Fock		
	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Diff. (eV)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Diff. (eV)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Diff. (eV)
G	-10,297	0,93	-11,114	-10,072	0,383	-10,455	-10,418	4,528	-14,946
A	-10,506	1,169	-11,255	-10,089	0,493	-10,582	-11,151	4,589	-15,74
D	-10,65	0,527	-11,321	-10,283	-0,064	-10,219	-10,786	4,291	-15,077
V	-10,215	1,059	-11,274	-9,911	0,622	-10,533	-10,207	4,667	-14,874
S	-10,293	0,872	-11,165	-10,209	0,441	-10,65	-10,524	4,354	-14,878
P	-9,825	0,9	-11,085	-9,536	0,308	-9,844	-9,69	4,386	-14,076
E	-10,677	0,8	-11,219	-10,178	0,129	-10,307	-11,333	4,264	-15,597
L	-10,186	1,065	-11,273	-9,973	0,546	-10,519	-10,355	4,509	-14,864
T	-10,251	1,012	-11,263	-10,085	0,504	-10,589	-9,998	4,349	-14,347
R	-9,598	1,113	-10,487	-9,657	0,82	-10,477	-9,102	4,467	-13,569
I	-10,282	0,94	-11,256	-9,89	0,557	-10,447	-10,375	4,389	-14,764
Q	-10,324	0,498	-11,188	-9,92	0,652	-10,572	-10,586	3,733	-14,319
N	-10,631	0,46	-10,94	-10,037	0,318	-10,355	-10,61	4,522	-15,132
K	-9,714	0,872	-10,586	-9,708	0,655	-10,363	-9,962	4,642	-14,604
H	-8,981	0,598	-9,946	-9,416	0,352	-9,768	-8,643	3,969	-12,612
F	-9,477	0,391	-9,897	-9,534	0,145	-9,679	-8,803	3,978	-12,781
C	-9,418	0,192	-9,61	-9,37	0,048	-9,418	-10,032	4,199	-14,231
M	-8,667	0,624	-9,291	-8,781	0,298	-9,079	-9,409	4,565	-13,974
Y	-9,131	0,213	-9,371	-9,071	-0,07	-9,001	-8,559	3,664	-12,223
W	-8,545	0,056	-8,601	-8,527	-0,068	-8,459	-7,664	3,555	-11,219
U	-8,07	-0,396	-7,674	-9,062	-0,224	-8,838	-9,173	3,541	-12,714

3.1.1 Semi-empirische Berechnung der Grenzorbitale

Zunächst wurden die Energieniveaus der Grenzorbitale auf Grundlage des semi-empirischen AM1-Algorithmus berechnet (siehe 2.2.1). Aus den Berechnungen konnte jeweils die Energie-Energiedifferenz der Grenzorbitale bestimmt werden. Wie in Abb. 14 dargestellt ist, liegen die HOMO-LUMO-Energiedifferenzen der 62 Aminosäuren des Murchison-Meteoriten in einem Bereich von -10,5 bis -11,5 Elektronenvolt (eV). Die Standard-Aminosäuren von Glycin bis Lysin, die aufgrund der bereits genannten 60 Kriterien (Trifonov, 2009) als „früh“ eingestuft werden, weisen ähnliche Differenzen zwischen den Grenzorbitalen wie die Aminosäuren des Murchison-Meteoriten auf, wobei Arginin mit einem Wert von -10,49 eV und Lysin mit einem Wert von -10,59 eV etwas kleinere Bandlücken als die anderen Aminosäuren besitzen. Aminosäuren, die in verschiedenen Meteoriten bzw. Kometen („Meteoriten-Aminosäuren“) oder Experimenten zur abiotischen Synthese organischer Moleküle („Urey-Miller-Aminosäuren“ und „Hydrothermale Aminosäuren“; Abb. 14) nachgewiesen wurden, sind, mit Ausnahme des Phenylalanins, ausschließlich in der Gruppe der „frühen“ Aminosäuren wiederzufinden. Interessanterweise besitzen Aminosäuren, die als vergleichsweise neu betrachtet werden, deutlich kleinere HOMO-LUMO-Differenzen als die primordialen Aminosäuren: Die Differenzen betragen stets weniger als -10 eV. Zudem ist in dieser zweiten Gruppe eine inverse Korrelation zwischen der Größe der Bandlücke und der Chronologie des Aminosäureeinbaus zu beobachten. Tryptophan weist von den Standard-Aminosäuren mit einer Differenz von -8,6 eV den geringsten Wert auf, der nur noch von Selenocystein mit -7,67 eV unterboten wird.

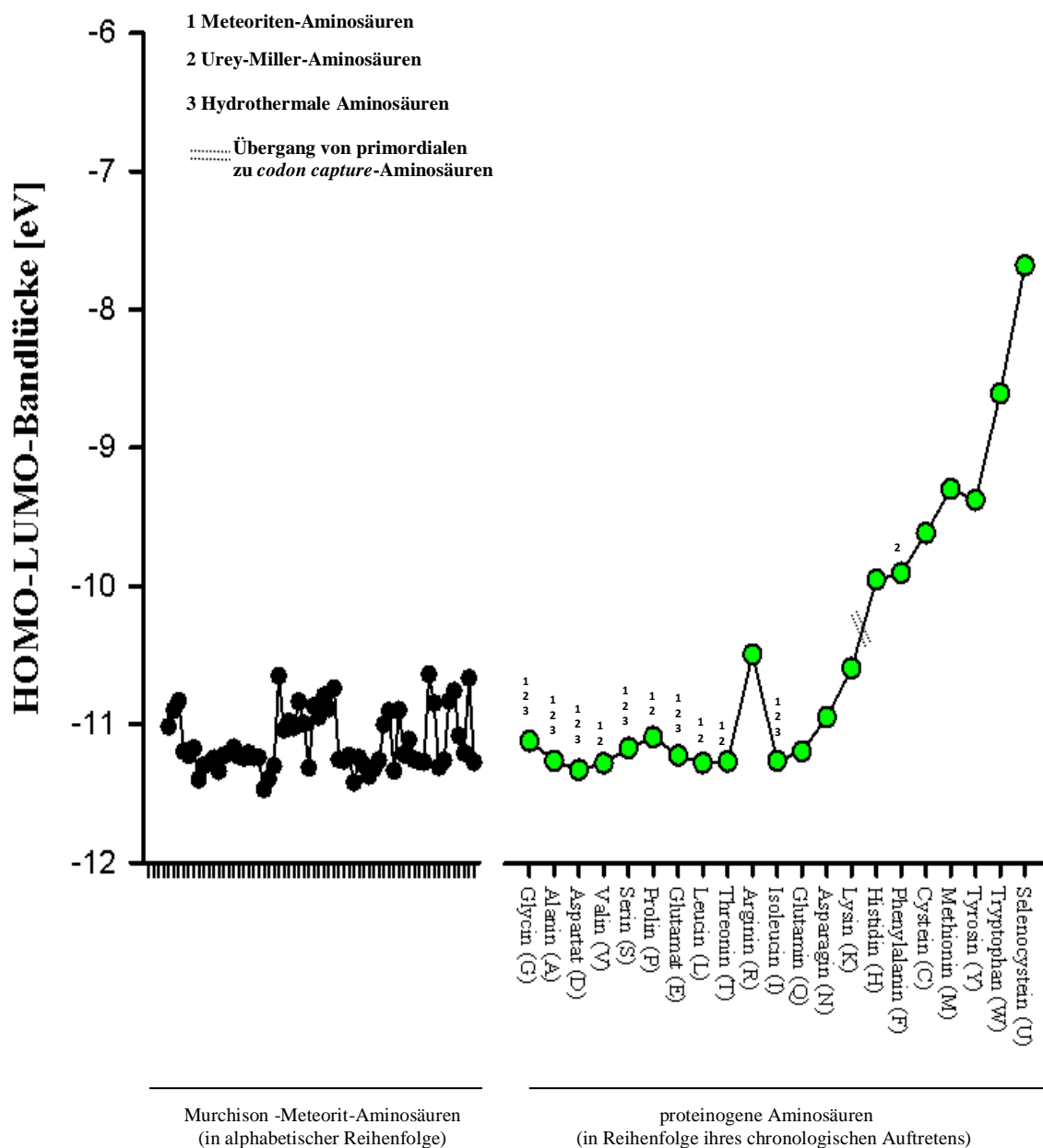


Abb. 14 Semi-empirisch berechnete HOMO-LUMO-Energiedifferenzen aller untersuchten Aminosäuren auf Basis des AM1-Algorithmus. Die 62 Aminosäuren des Murchison-Meteoriten (in alphabetischer Reihenfolge) und die 20 Standard-Aminosäuren plus Selenocystein (in der mutmaßlichen chronologischen Reihenfolge ihres evolutionären Auftretens) sind gegen die entsprechenden HOMO-LUMO-Differenzen aufgetragen, die auf Grundlage der semi-empirischen AM1-Methode berechnet wurden. Aminosäuren, die in extraterrestrischem Material, Urey-Miller-Experimenten oder Hydrothermal-Experimenten nachgewiesen wurden, sind mit 1, 2 bzw. 3 gekennzeichnet. Der postulierte Übergang von den primordialen zu den *codon capture*-Aminosäuren ist durch zwei gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Ein ähnliches Ergebnis liefert die quantenchemische Analyse, die auf Basis des ebenfalls semi-empirischen PM6-Algorithmus (siehe 2.2.1) durchgeführt wurde (Abb. 15). Das

Differenzspektrum der Murchison-Aminosäuren liegt hier in einem Bereich zwischen -10,7 und -9,7 eV. Die proteinogenen, primordialen Aminosäuren zeigen vergleichbar hohe Werte, wobei in diesem Fall Prolin die kleinste Differenz (-9,84 eV) aufweist. Die späten *codon capture*-Aminosäuren besitzen von allen proteinogenen Aminosäuren die geringsten HOMO-LUMO-Energiedifferenzen. Die beobachtete Korrelation zwischen Chronologie des Einbaus und Energieniveau der Grenzorbitale kann bei Anwendung des PM6-Algorithmus bestätigt werden, wobei hier Tryptophan (-8,46 eV) und nicht Selenocystein (-8,84 eV) die geringste HOMO-LUMO-Bandlücke aufweist.

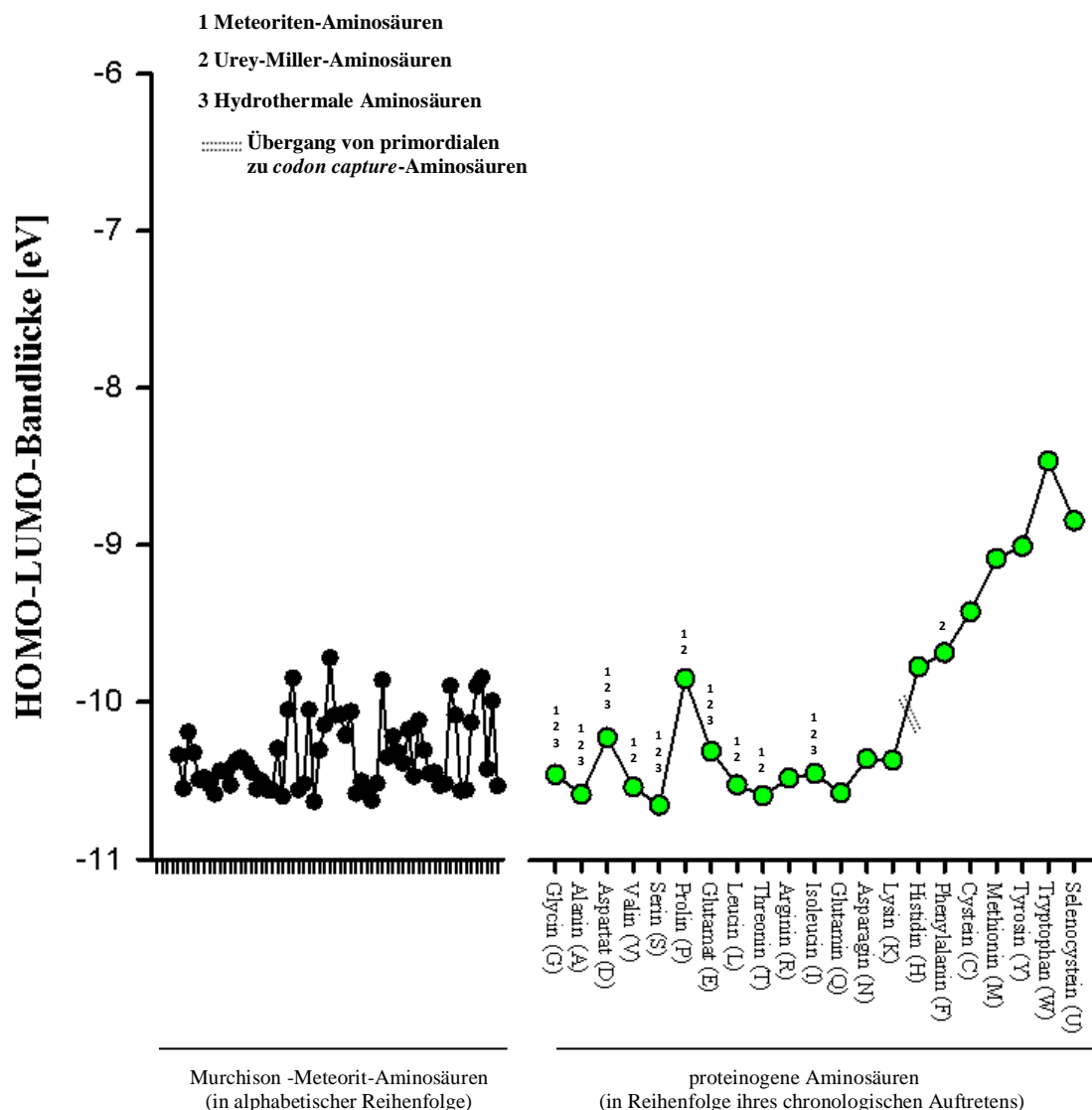


Abb. 15 Semi-empirisch berechnete HOMO-LUMO-Energiedifferenzen aller untersuchten Aminosäuren auf Basis des PM6-Algorithmus. Die bereits in Abb. 14 dargestellten Aminosäuren sind gegen die jeweilige HOMO-LUMO-Energiedifferenz aufgetragen, die auf Grundlage der alternativen, semi-empirischen PM6-Methode berechnet wurden. Kennzeichnung und Reihenfolge der Aminosäuren entspricht der Darstellung in Abb. 14.

3.1.2 *Ab initio*-Berechnung der Grenzorbitale

Zusätzlich zu den semi-empirischen Berechnungen wurden die Energien der Grenzorbitale der Aminosäuren auf Grundlage der Hartree-Fock-Methode *ab initio* berechnet (siehe 2.2.1). Wie in Abb. 16 dargestellt, ist auch auf Basis der Hartree-Fock-Methode ein evolutionärer Trend erkennbar. Die Aminosäuren des Murchison-Meteoriten und die frühen, proteinogenen Aminosäuren weisen großen HOMO-LUMO-Energiedifferenzen auf, wohingegen die späten *codon capture*-Aminosäuren tendenziell kleinere Energiedifferenzen besitzen. Allerdings sind die HOMO-LUMO-Bandlücken bei dieser Berechnungsmethode größer als bei den semi-empirischen Verfahren. Demnach weisen die Murchison-Meteorit-Aminosäuren HOMO-LUMO-Energiedifferenzen zwischen -14 und -15,74 eV auf, wobei nur eine geringe Streuung zu beobachten ist.

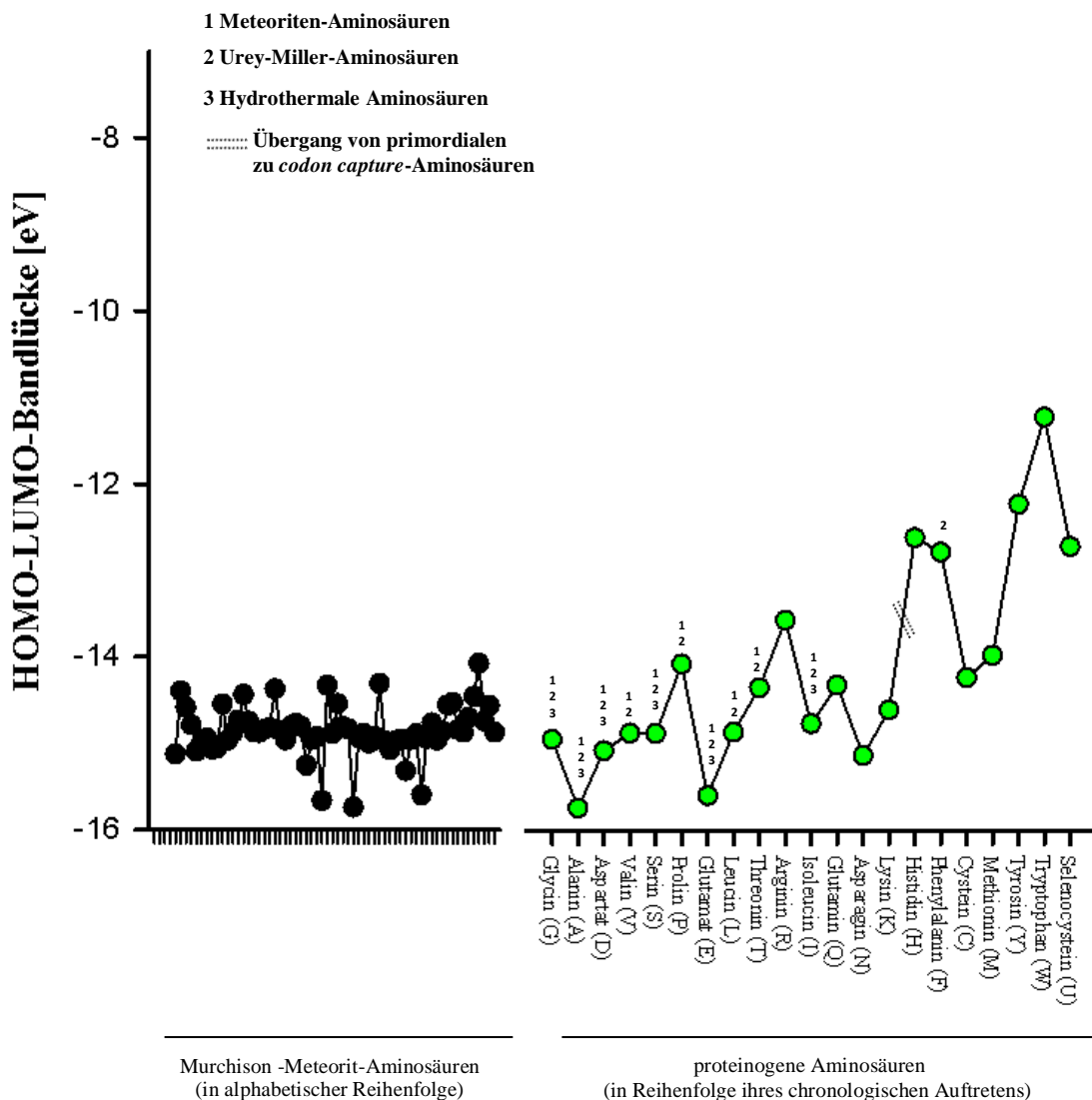


Abb. 16 *Ab initio* berechnete HOMO-LUMO-Energiedifferenzen aller untersuchten Aminosäuren auf Basis der Hartree-Fock-Methode. Die Darstellungsweise entspricht jenen aus Abb. 14 und 15.

Auffällig ist bei dieser Berechnungsmethode die recht große Streuung im Falle der proteinogenen Aminosäuren: Bei primordialen Aminosäuren liegt der Energiedifferenzbereich zwischen -15,74 eV (Alanin) und -13,57 eV (Arginin). Insgesamt liegt das Spektrum der HOMO-LUMO-Werte auf einem auffällig hohen Differenzniveau, das dem der Meteoriten-Aminosäuren vergleichbar ist. Von den *codon capture*-Aminosäuren sind bei Histidin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Selenocystein deutlich geringere Bandlücken als bei den Murchison-Aminosäuren und primordialen Aminosäuren zu beobachten, wohingegen die Differenzniveaus der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin relativ hoch sind. Wie im Falle der PM6-basierten semi-empirischen Methode weist Tryptophan mit einer Differenz von -11,22 eV den geringsten Wert auf.

3.2 Der Shikimatweg und die Synthese aromatischer Aminosäuren

Die Ergebnisse der semi-empirischen und *ab initio*-Berechnungen zeigen eine evolutionäre Tendenz an: „Frühe“ Aminosäuren besitzen große HOMO-LUMO-Bandlücken, wohingegen „späte“ Aminosäuren kleine HOMO-LUMO-Bandlücken aufweisen. Da ein kleiner Energieunterschied als quantenchemisches Korrelat für hohe Reaktivität betrachtet werden kann, stellte sich die Frage, warum neue Aminosäuren in den genetischen Code aufgenommen wurden bzw. wie dies mit einer möglichen Reaktivität der Aminosäuren zusammenhängen könnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden exemplarisch die Synthesewege der beiden jüngsten Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, die durch eine sehr geringe HOMO-LUMO-Differenzen gekennzeichnet sind, untersucht. Hierzu wurden die *pathway maps* der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Datenbank herangezogen (Kanehisa and Goto, 2000).

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind Produkte des Shikimatweges, einem Stoffwechselweg, der in Mikroorganismen und Pflanzen vorkommt (Herrmann and Weaver, 1999). Aus dem Zwischenprodukt Shikimat, nach dem der Weg benannt ist, entsteht Chorismat, das in Prephenat umgewandelt werden kann, aus dem wiederum Phenylalanin oder, über die Stufe des Hydroxyphenylpyruvats, Tyrosin gebildet wird. Alternativ wird Chorismat zu Anthranilat umgesetzt, das für die Synthese von Tryptophan verwendet werden kann. Für die Synthese von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan wird kein molekularer Sauerstoff benötigt (grüne Pfeile, Abb. 17).

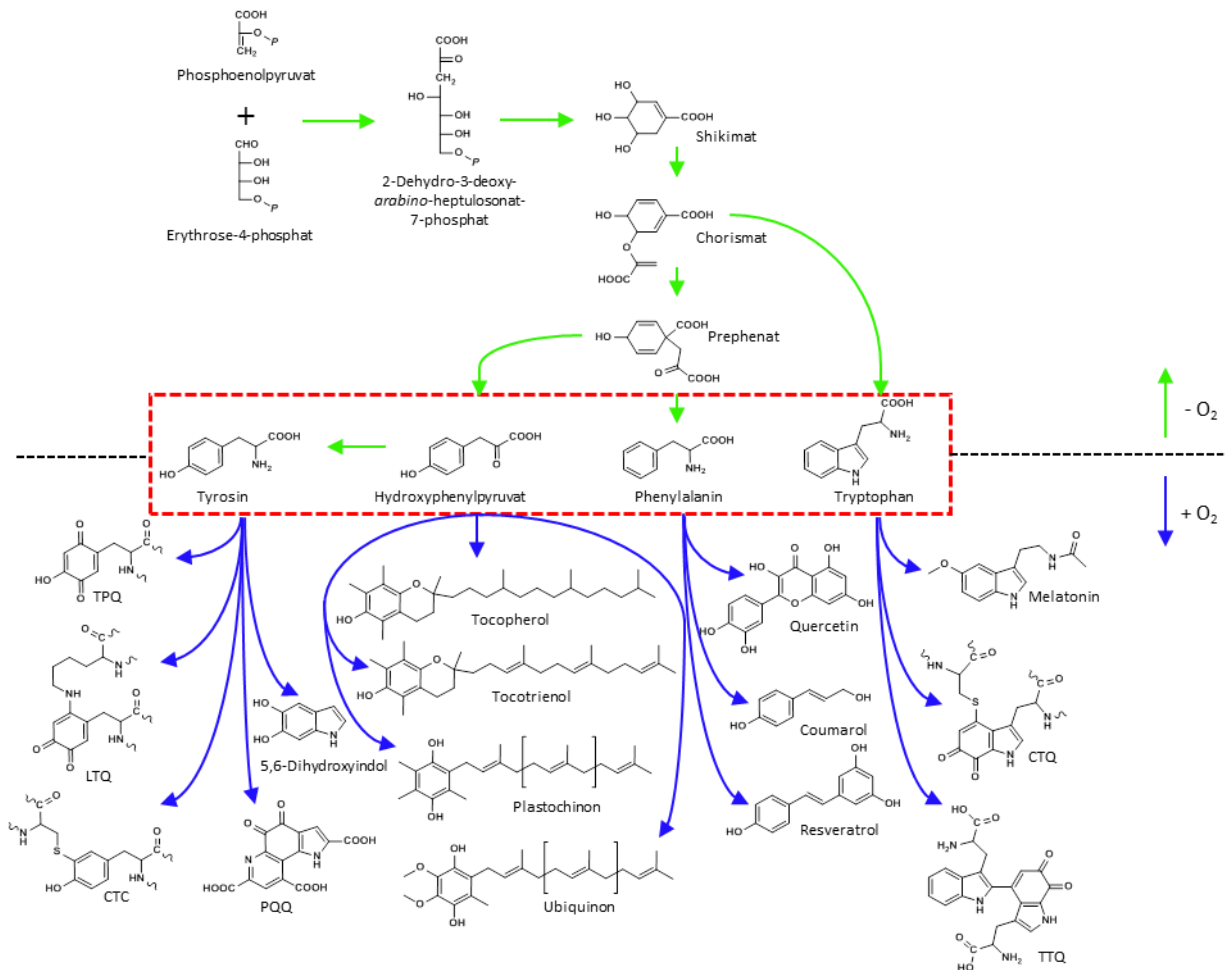


Abb. 17 Shikimatweg und Derivate von Shikimat. Der Shikimat-Weg, der ausschließlich anaerobe Synthesewege umfasst (grüne Pfeile), bringt unter anderem Hydroxyphenylpyruvat sowie die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin hervor. Aus diesen Molekülen leiten sich Strukturen ab, die funktionell relevant sind und für deren Biosynthese die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs erforderlich ist (blaue Pfeile). CTC: Cysteintyrosyl-Cofaktor; CTQ: Cysteintryptophylchinon; LTQ: Lysintyrosylchinon; PQQ: Pyrrolochinolinchinon; TPQ: Topa-Chinon; TTQ: Tryptophanryptophylchinon.

Die aromatischen Aminosäuren stellen wiederum Ausgangsstrukturen für die Synthese zahlreicher, funktionell relevanter Moleküle dar, wodurch sich wiederum die Frage nach der Existenz und Bedeutung von Tryptophan und Tyrosin ableitet. Bei diesen biologisch funktionellen Strukturen handelt es sich um Bestandteile der Elektronentransportkette in Mitochondrien (Ubichinon) bzw. Chloroplasten (Plastochinon), Vitamin E-Formen (Tocopherol und Tocotrienol), sekundäre Pflanzenstoffe (Quercetin, Coumarol und Resveratrol), den Polymervorläufer 5,6-Dihydroxyindol, das Hormon Melatonin oder die bakteriellen Cofaktoren Cysteintyrosyl-Cofaktor (CTC), Cysteintryptophylchinon (CTQ),

Lysintyrosylchinon (LTQ), Pyrrolochinolinchinon (PQQ), Topa-Chinon (TPQ) und Tryptophantryptophylchinon (TTQ).

Die aufgeführten Substanzen zeichnen sich durch zwei Charakteristika aus: Zum einen besitzen diese eine hohe Redox-Aktivität, zum anderen wird für mindestens einen Schritt ihrer Biosynthese molekularer Sauerstoff benötigt (blaue Pfeile, Abb. 17). Die sauerstoffabhängigen Biosynthesewege und die redox-aktiven Eigenschaften der Shikimat-Derivate sind anhand ausgewählter Publikationen in Tab. 4 zusammengefasst.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass insbesondere Tyrosin und Tryptophan, unter Berücksichtigung ihrer speziellen quantenchemischen Eigenschaften, eine wichtige Rolle zukommen könnte. Da kleine HOMO-LUMO-Energiedifferenzen chemische Reaktivität determinieren und die Tryptophan- und Tyrosinderivate redox-aktive Eigenschaften besitzen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass diese beiden Aminosäuren aufgrund ihrer Redox-Reaktivität in den genetischen Code aufgenommen wurden. Die Abhängigkeit der Biosynthesewege der Derivate von molekularem Sauerstoff lässt zudem auf eine Bedeutung der Aminosäuren bei der Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen schließen.

Tab. 4 Biosynthese und Redox-Eigenschaften der Shikimat-Derivate.

Shikimat-Derivat	Biosynthese	Redox-Eigenschaften
Coumarol	Die Cinnaminsäure-4-Hydroxylase (EC 1.14.13.11) ist ein Cytochrom P450, das in höheren Pflanzen den ersten Oxygenierungsschritt des allgemeinen Phenylpropanoidmetabolismus katalysiert (Teutsch et al., 1993).	Phenylpropanoide sind kettenbrechende Antioxidantien, die durch die Abgabe von Elektronen oder Wasserstoffatomen Radikale abfangen können und dabei in mesomeriestabilisierte Phenoxy-Radikale umgewandelt werden (Teixeira et al., 2013).
Cofaktoren	Die aufgeführten Cofaktoren entstehen aus oxidativen Prozessen, die durch die Addition von molekularem Sauerstoff an eine Tyrosin- oder Tryptophan-Seitenkette initiiert werden (Klinman and Bonnot, 2014).	Der proteingebundene Cofaktor wird während der Katalyse in eine reduzierte Chinolform konvertiert, die zur Vervollständigung des katalytischen Zyklus in den oxidierten Cofaktor umgewandelt werden muss (Klinman, 2001).
5,6-DHI	Tyrosinase (EC 1.14.18.1) katalysiert die Hydroxylierung von Tyrosin zum 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und die Oxidation von DOPA zum Dopachinon, das wiederum in Melaninpigmente umgesetzt wird (Zaidi et al., 2014).	Melanin besitzt die Fähigkeit, mit Superoxidradikalen und Singulett-Sauerstoff zu reagieren (Tada et al., 2010).
Melatonin	Der erste Schritt der Melatoninbiosynthese wird von der Tryptophan-5-Monooxygenase (EC 1.14.16.4) katalysiert und umfasst die Hydroxylierung von Tryptophan, die in Anwesenheit von Biopterin und Sauerstoff erfolgt (Cianchetta et al., 2010).	Die Abgabe von Elektronen stellt den wichtigsten Weg der Melatonin-Oxidation dar. Das entstehende Melatonin-Radikalkation kann mit dem Superoxidradikal reagieren und somit Radikalkettenreaktionen unterbinden (Poeggeler et al., 2002).
PQ	Die p-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die essentiell für die Plastochinon-Biosynthese ist, katalysiert die irreversible Addition von zwei Sauerstoffmolekülen an Hydroxyphenylpyruvat (Norris et al., 1998).	Während des Elektronentransfers im Photosystem II wird Plastochinon zum Semichinon-Radikal reduziert, welches das Elektron wiederum an ein sekundäres Plastochinon transferiert. Dieses wird nach einem zweiten photochemischen <i>turnover</i> zum vollständig reduzierten Chinol reduziert (Cox et al., 2009).
Quercetin	Naringenin-3-dioxygenase (EC 1.14.11.9) katalysiert die ersten Schritte der Quercetinsynthese, in denen 2-Oxoglutarat und molekularer Sauerstoff zu Succinat und Kohlendioxid reagieren (Turnbull et al., 2004).	Aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale können Flavonoide freie Radikale reduzieren. Hierbei erfolgt die Abgabe des Wasserstoffatoms der Hydroxylgruppe, das mit einem Hydroxy- oder Peroxylradikal reagieren kann (Kumar and Pandey, 2013).
Resveratrol	Die Cinnaminsäure-4-Hydroxylase (EC 1.14.13.11) ist ein Cytochrom P450, das in höheren Pflanzen den ersten Oxygenierungsschritt des allgemeinen Phenylpropanoidmetabolismus katalysiert (Teutsch et al., 1993).	Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilben) ist ein natürliches Antioxidans. Die Oxidation der 4'-OH-Gruppe führt zur Bildung von stabilen Phenoxy-Radikalen (Shang et al., 2009).
Tocopherol Tocotrienol	Die Tocopherol- und Tocotrienolbiosynthese wird unter anderem durch die p-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (EC1.13.11.27) bewerkstelligt. Dieses Enzym katalysiert den komplexen und irreversiblen Einbau von zwei Sauerstoffmolekülen in Hydroxyphenylpyruvat (Norris et al., 1998).	Vitamin E reagiert mit Lipidradikalen wodurch das korrespondierende Chromoxyradikal entsteht. Die Regenerierung der reduzierten Form erfolgt enzymatisch oder nicht-enzymatisch (Packer et al., 2001).
Ubichinon	Unter aeroben Bedingungen stammen die Sauerstoffatome des Ubichinons von molekularem Sauerstoff (Alexander and Young, 1978a) Unter anaeroben Bedingungen erfolgen drei alternative Hydroxylierungsreaktionen, die keinen molekularen Sauerstoff erfordern (Alexander and Young, 1978b).	Der Protonentransport über die Mitochondrienmembran wird von Ubichinon bewerkstelligt. Während des Elektronentransfers, das die Antriebskraft für den Protonentransport darstellt, wird Ubichinon zum Semi-Ubichinonradikalanion reduziert (Moncelli et al., 1996).

3.2.1 Quantenchemische Eigenschaften der redox-aktiven Strukturen

Die in 3.2 dargestellten Derivate des Shikimat-Wegs wurden ebenfalls quantenchemisch analysiert. Hierzu wurden die Grenzorbitale nach der semi-empirischen AM1-Methode berechnet und mit den Werten der bereits analysierten Aminosäuren (3.1.1) verglichen.

Um die Orbitalenergien der untersuchten Derivate einzuordnen, wurden jeweils die HOMO-LUMO-Energiedifferenzen bestimmt und mit den Bandlücken der Aminosäuren aus Abb. 14 verglichen. Diese auf Grundlage der semi-empirischen AM1-Methode berechneten HOMO-LUMO-Differenzen sind in Abb. 18 dargestellt.

Wie zu erkennen ist, sind die Moleküle erwartungsgemäß durch kleine HOMO-LUMO-Differenzen gekennzeichnet. Sie liegen im Differenzbereich der beiden letzten Aminosäuren Tryptophan und Selenocystein. Daraus gründet sich die in dieser Arbeit postulierte Hypothese, dass es sich bei Tryptophan und Tyrosin ebenfalls um redox-aktive Cofaktoren handelt, die jedoch im Gegensatz zu ihren Derivaten in den genetischen Code integriert wurden.

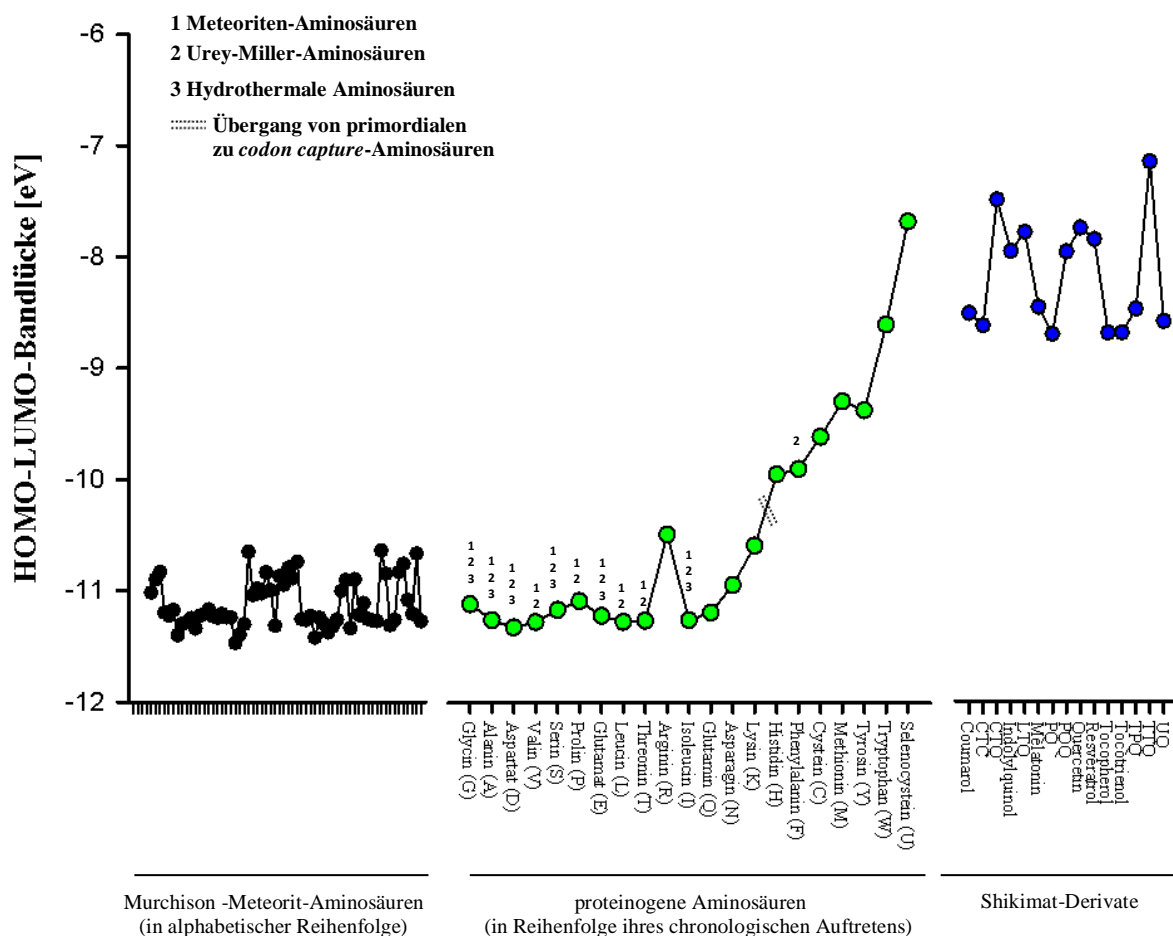


Abb. 18 Vergleich der HOMO-LUMO-Energiedifferenzen der in Abb. 14 dargestellten Aminosäuren und der in Abb. 17 abgebildeten Derivate des Shikimats. Die hier gezeigte Abbildung entspricht Abb. 14 mit der Erweiterung um die quantenchemisch berechneten HOMO-LUMO-Energiedifferenzen der Shikimat-Derivate aus Abb. 17.

Die funktionellen Biomoleküle lassen sich hinsichtlich ihrer Grenzorbitale in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe umfasst die bakteriellen Cofaktoren CTQ, LTQ, PQQ, TPQ und TTQ, die sich im Vergleich zu allen Aminosäuren und den anderen Derivaten durch ein sehr niedriges Energieniveau ihrer LUMOs auszeichnen: Die LUMO-Energien befinden sich in einem Bereich von -1,9 bis -1,7 eV (Abb. 19). Die zweite Gruppe besteht aus Molekülen, deren LUMOs auf einem höheren, aber immer noch niedrigen Energieniveau in einem Bereich von -0,85 bis +0,35 eV liegen. Dieser Gruppe sind die übrigen Shikimat-Derivate, die mit Ausnahme von CTC keine bakteriellen Cofaktoren darstellen, zuzuordnen. Diese Energieniveaus sind vergleichbar mit denen der neuen Aminosäuren Phenylalanin, Cystein, Tyrosin, Tryptophan und Selenocystein, die geringere LUMO-Werte als die Aminosäuren des

Murchison-Meteoriten und die frühen proteinogenen Aminosäuren aufweisen. Weiterhin ist zu erkennen, dass die *codon capture*-Aminosäuren und die Shikimat-Derivate in der Regel durch geringe HOMO-Werte gekennzeichnet sind.

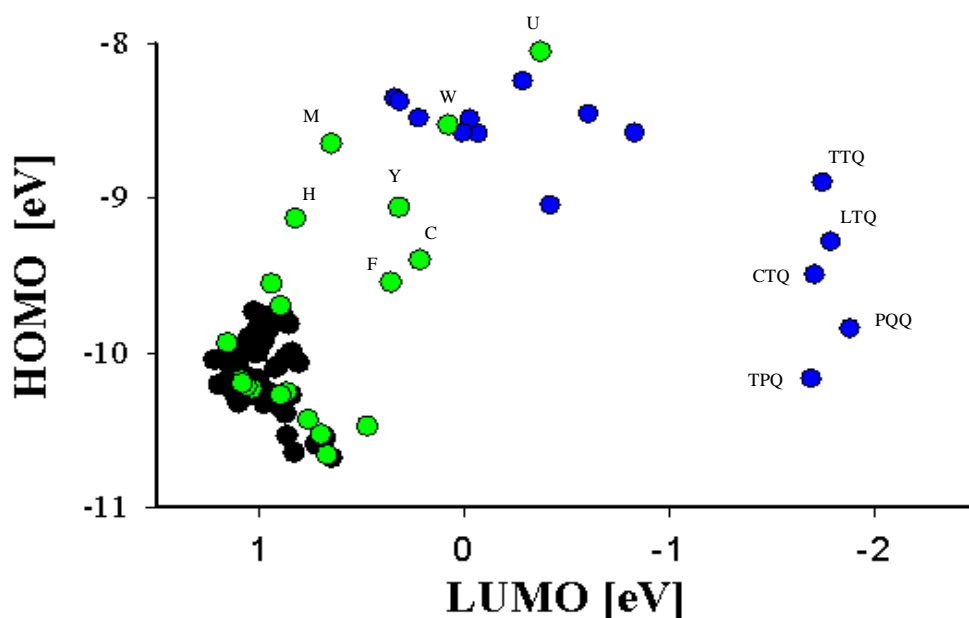


Abb. 19 HOMO- und LUMO-Energiewerte der Murchison-Meteorit-Aminosäuren, der proteinogenen Aminosäuren und der in Abb. 17 dargestellten Shikimat-Derivate. Die Grenzorbitale der dargestellten Aminosäuren wurden auf Grundlage des semi-empirischen AM1-Algorithmus berechnet. Murchison-Meteorit-Aminosäuren sind als schwarze Punkte, die 21 proteinogenen Aminosäuren als grüne Punkte und die nicht-proteinogenen Shikimat-Derivate als blaue Punkte symbolisiert. Die sieben *codon capture*-Aminosäuren sind im Einbuchstabencode, die Shikimat-Derivate, die sehr niedrige LUMO-Energiewerte aufweisen, in der Dreibuchstabenabkürzung dargestellt.

3.3 Experimente zur Reaktivität proteinogener Aminosäuren gegenüber Radikalen

Wie bereits zuvor ausgeführt wurde anhand der metabolischen Analyse, aus welcher hervorging, dass die Shikimat-Derivate redox-aktiv sind und für ihre Synthese molekularer Sauerstoff benötigt wird, die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen der Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen und der Bedeutung „neuer“ Aminosäuren hergestellt (3.2). Daher wurden die Eigenschaften der proteinogenen Standard-Aminosäuren hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen untersucht. Das Peroxylradikal ist ein elektrophiles Sauerstoffradikal, dessen Bildung die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs erfordert. Zusätzlich wurde die Reaktivität der Aminosäuren mit artifiziiellen Radikalen unterschiedlicher Elektrophilie analysiert.

3.3.1 Reaktion mit dem Peroxylradikal

Die Reaktivität der Aminosäuren wurde unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen (siehe 2.2.4.3) durchgeführt. Unter Bedingungen, bei denen das Verhältnis zwischen dem Peroxylradikal-Initiator AAPH und der hinzugefügten Aminosäure 3:1 betrug (3 mM Radikalinitiator AAPH, 1 mM Aminosäure), war bei allen *codon capture*-Aminosäuren mit Ausnahme des Phenylalanins eine Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen festzustellen, während „frühe“ Aminosäuren nicht mit Peroxylradikalen reagierten. Weiterhin war eine Tendenz zwischen Reaktivität und evolutionärer Chronologie erkennbar. Die relative Reaktivität steigt von 68,5 % für Histidin, über 87,8 für Cystein und 90,9 % für Methionin auf 95,1 % für Tyrosin bzw. 97,1 % für Tryptophan, die Standard-Aminosäure, die vermutlich als letzte Proteinogenität erlangte (Abb. 20 A).

Wurde eine AAPH:Aminosäure-Verhältnis von 20000:1 (20 mM AAPH, 10 μ M Aminosäure) gewählt, so nahm der beobachtete Schutzeffekt erwartungsgemäß deutlich ab. Ausschließlich bei Methionin, Tyrosin und Tryptophan war eine Erhaltung der Fluorescein-Fluoreszenz zu beobachten. Während Methionin mit 8,7 % nur schwach reaktiv war, war Tyrosin mit 46,1 % Reaktivität in der Lage, die Peroxylradikale teilweise abzufangen. Wie zuvor wies Tryptophan mit einer Reaktivität von 84,1 % das größte antioxidative Potential auf (Abb. 20 B). Somit wurde innerhalb der *codon capture*-Aminosäuren eine Zunahme der Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen beobachtet.

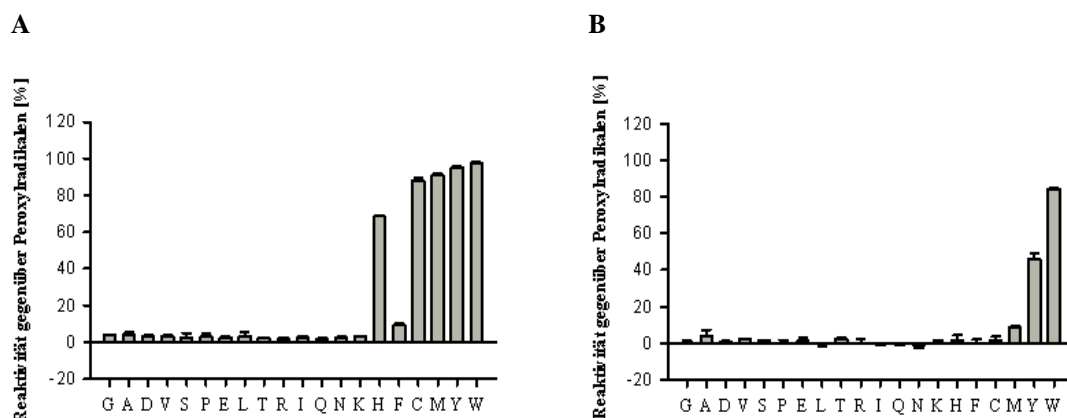


Abb. 20 Reaktivität der proteinogenen Aminosäuren gegenüber Peroxylradikalen. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code gegen die Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen, die unter zwei verschiedenen Bedingungen gemessen wurde, aufgetragen. (A) Das Verhältnis zwischen dem Radikalinitiator AAPH und der jeweiligen Aminosäure betrug 3:1. (B) APPH wurde gegenüber der jeweiligen Aminosäure in deutlichem Überschuss (Verhältnis 20000:1) eingesetzt. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Reaktivitäten wurden auf Grundlage von jeweils drei Replikaten ($n=3$) berechnet.

3.3.2 Reaktion mit weiteren Radikalen

Um die Universalität der Aminosäurereaktivität gegenüber dem untersuchten Peroxylradikal zu testen, wurde die Reaktivität der Standard-Aminosäuren gegenüber weiteren Radikalen, die sich in ihrer Elektrophilie voneinander unterscheiden, untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass frühe Aminosäuren keine Reaktivität zeigen und ausschließlich die späten *codon capture*-Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan in der Lage sind, Radikale abzufangen. Wie in Abb. 21A zu erkennen ist, war ausschließlich Cystein in der Lage mit dem nucleophilen TCNQ-Radikalanion zu reagieren: Die Reaktivität lag bei 77 %. Ein anderes Ergebnis lieferte die Analyse der Aminosäurereaktivität gegenüber den elektrophileren Radikalen DPPH und Galvinoxyl. In beiden Fällen zeigten die *codon capture*-Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan eine Wechselwirkung mit dem jeweiligen Radikal (Abb. 21 B und C).

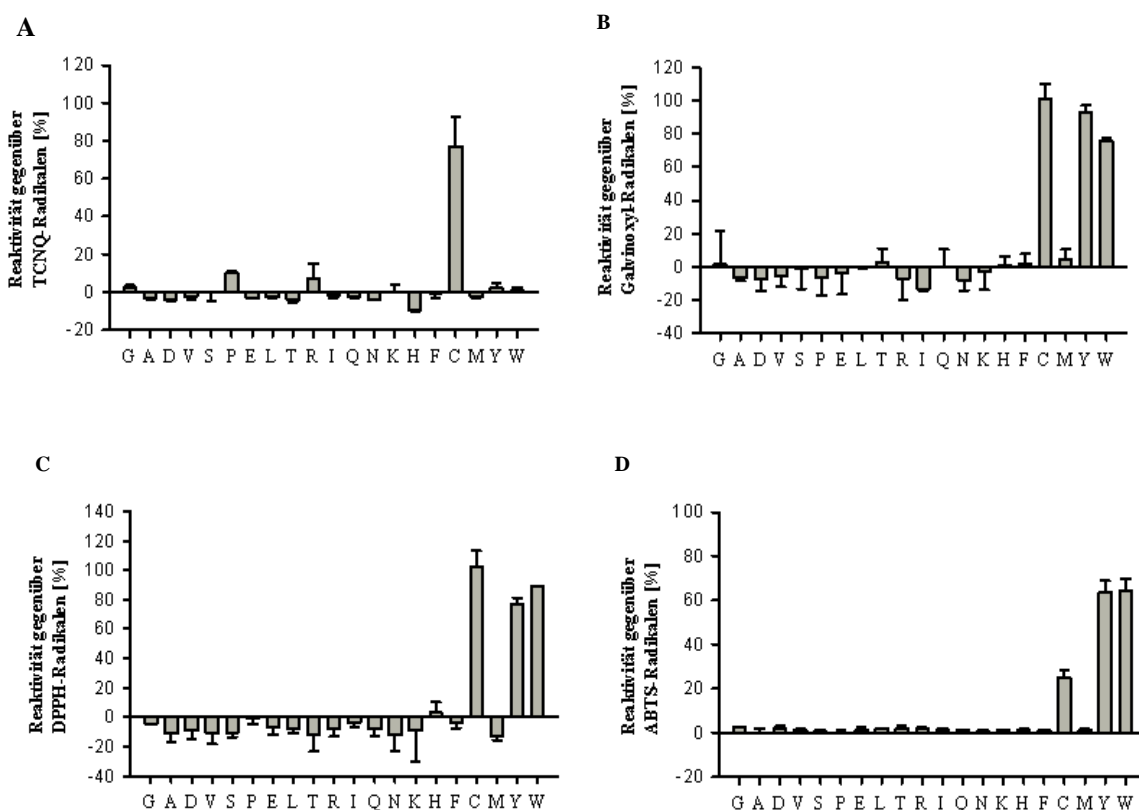


Abb. 21 Reaktivität von Aminosäuren gegenüber verschiedenen Radikalen. Die 20 Standard-Aminosäuren sind im Einbuchstabencode gegen die Reaktivität gegenüber dem nucleophilen TCNQ-Radikalanion (A), dem elektrophilen Galvinoxyl und DPPH-Radikalen (B und C) sowie dem stark elektrophilen ABTS-Radikalkation (D) aufgetragen. Die jeweiligen Mittelwerte (\pm Standardabweichung) resultieren aus jeweils vier Experimenten ($n=4$).

Die Reaktivität gegenüber dem elektrophilsten Radikal, dem ABTS-Radikalkation, zeigte ein ähnliches Muster: nur Cystein, Tyrosin und Tryptophan waren in der Lage, das Radikal abzufangen, wobei in diesem Fall Tryptophan mit 64,6 % und Tyrosin mit 63,7 % die größte Reaktivität zeigten. Cystein war mit 24,8 % deutlich weniger reaktiv als die beiden Aminosäuren, die als letzte in den Code aufgenommen wurden (Abb. 21 D).

3.3.3 Radikalisierungsenthalpien der *codon capture*-Aminosäuren

Wie aus den bisherigen Ergebnissen hervorgeht, wird die Aminosäureaktivität mit Radikalen in guter Annäherung durch die quantenchemischen Parameter der HOMO- und LUMO-Werte beschrieben. Zwischen Größe der HOMO-LUMO-Energiedifferenz der untersuchten Aminosäuren und ihrer Fähigkeit, mit Radikalen zu reagieren, besteht tendenziell eine inverse Korrelation.

In einzelnen Fällen war jedoch zu beobachten, dass eine kleine Bandlücke zwischen den Grenzorbitalen nicht als ausschließliche Voraussetzung für das reaktive Potential einer Aminosäure herangezogen werden kann. Beispielsweise war im Falle der Reaktion gegenüber Peroxylradikalen Phenylalanin die einzige neue Aminosäure, die trotz kleiner HOMO-LUMO-Bandlücke keine Reaktion zeigte (Abb. 20A). Neben günstigen kinetischen Bedingungen müssen folglich weitere Parameter, wie die Aktivierungsenergie, zur Beschreibung der Reaktivität betrachtet werden. Während die HOMO-LUMO-Energiedifferenz das reaktive Potential eines Moleküls beschreibt, stellt die Aktivierungsenergie die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand der Aminosäure und ihrem Übergangszustand dar, bei dem es sich um die radikalisierte Form der Aminosäure handelt. Da die Interaktion eines potentiellen Antioxidans (AH) mit einem Peroxylradikal auf der Reaktion eines Wasserstoffatoms ($H\cdot$) des Antioxidans (AH) mit dem Radikal beruht, wurden die Radikalisierungsenthalpien aller Standard-Aminosäuren berechnet (siehe 2.2.1).

Wie in Abb. 22 dargestellt ist, sind die Aminosäuren durch unterschiedlich hohe Radikalisierungsenthalpien gekennzeichnet. Die *codon capture*-Aminosäuren Histidin, Cystein, Methionin, Tyrosin und Tryptophan weisen Radikalisierungsenthalpien auf, die sich in einem Bereich zwischen etwa 30 und 40 kcal/mol befinden. Phenylalanin hingegen besitzt mit über 55 kcal/mol einen deutlich erhöhten Enthalpiewert. Aminosäuren, die als evolutionär alt betrachtet werden, besitzen zum Teil Radikalisierungsenthalpien, die geringer sind als die der *codon capture*-Aminosäuren.

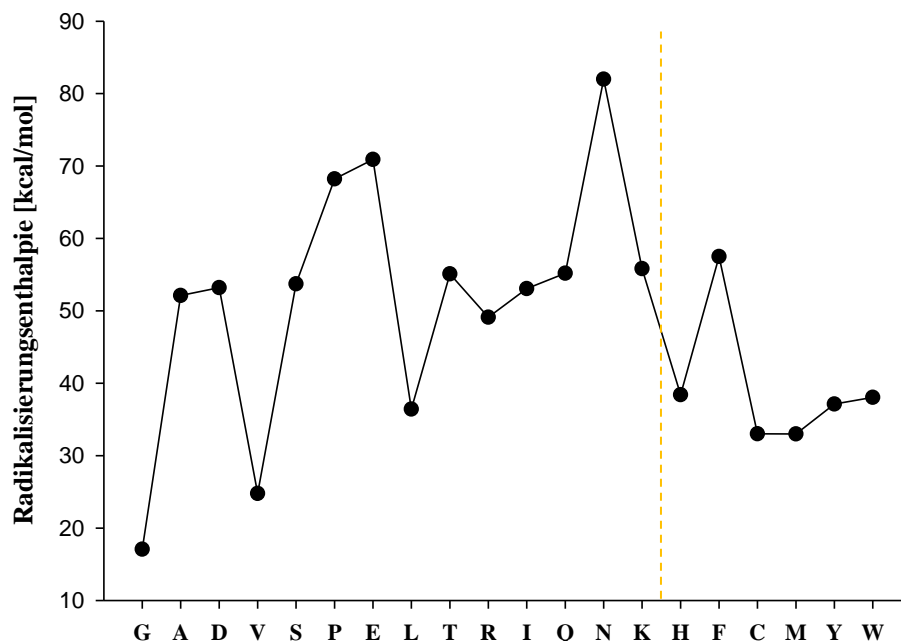


Abb. 22. Radikalisierungsenthalpien der 20 Standard-Aminosäuren. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode gegen ihre jeweilige Radikalisierungsenthalpie [kcal/mol] aufgetragen. Die Werte wurden auf Grundlage der AM1-Methode bestimmt. Der Übergang von den „alten“ zu den „neuen“ Aminosäuren ist durch eine gestrichelte, gelbe Linie dargestellt.

3.4 Lipidperoxidationsexperimente

Aufgrund der Resultate der Radikal-Tests, in denen die unterschiedliche Fähigkeit von Aminosäuren mit verschiedenen Radikalen zu reagieren, demonstriert wurde, wurden weitere biochemische sowie biologische Experimente durchgeführt.

Demnach sind Tryptophan und Tyrosin die einzigen Aminosäuren, die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen in einer Konzentration von 10 μM in der Lage waren, Peroxylradikale abzufangen und damit die Oxidation von Fluorescein zu verhindern (Abb. 20B). Peroxylradikale treten in der Natur beispielsweise in Form von Lipidperoxylradikalen während des Prozesses der Lipidperoxidation auf (Gutteridge, 1995). Dies kann zu oxidativen Schädigungen einer Vielzahl vulnerabler, zellulärer Strukturen und somit zum Zelltod führen (Halliwell and Chirico, 1993). Lipidperoxidationsprozesse können durch lipophile, kettenabbrechende Moleküle, wie beispielsweise α -Tocopherol, verhindert werden. Interessanterweise handelt es sich bei Tocopherolen um lipophile Shikimat-Derivate und somit Strukturverwandte von Tyrosin und Tryptophan.

Aus diesen beiden Gründen wurde die spezifische Fähigkeit von Tyrosin und Tryptophan sowie von repräsentativen, frühen Aminosäuren untersucht, Lipidperoxidation zu verhindern. Da freie Aminosäuren nicht in die membranäre Lipiddoppelschicht integrieren, wurden hierzu lipophile Aminosäurederivate, die in Abb. 8 dargestellt sind, für Lipidperoxidations-Experimente verwendet. Bei den Substanzen, die man als Modelle für die Redox-Reaktivität der Aminosäuren in Membranproteinen betrachten könnte, handelt es sich um die lipophilen, dodecanoylierten Derivate von Alanin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Valin. Darüber hinaus wurden die hydrophileren, acetylierten Derivate von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan getestet. Die Experimente wurden in Rattenhirnlipiden und humanen Fibroblasten durchgeführt. Die Lipidperoxidation wurde anhand der Bildung der Lipidperoxidation-indizierenden Marker Malondialdehyd und 8-Isoprostan gemessen.

3.4.1 Lipidperoxidation in Rattenhirnmembranen

Die Zugabe von Fe(II)/Ascorbat zu Rattenhirnlipiden führte zur induzierten Bildung von Malondialdehyd, einem Marker der Lipidperoxidation („OXID“ = 100 % in Abb. 23, schwarzer Balken). Die kurzkettigen, acetylierten Aminosäurederivate NAc-W-OEt, NAc-Y-OEt und NAc-F-OEt waren nicht in der Lage, diese induzierte Bildung von Malondialdehyd zu verhindern. Dies gilt ebenfalls für die langkettigen, dodecanoylierten Derivate von Phenylalanin (NDo-F-OEt), Leucin (NDo-L-OEt), Valin (NDo-V-OEt) und Alanin (NDo-A-OEt). Durch NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt jedoch, bei denen es sich um hydrophobe Derivate von Tryptophan und Tyrosin handelt, ließ sich der Prozess der Lipidperoxidation auf das Niveau der nicht-induzierten Kontrollen zurückführen (Abb. 23, schwarze Balken).

Die Analyse der Bildung von 8-Isoprostan, einem weiteren, Arachidonsäure-spezifischen Indikator der Lipidperoxidation, lieferte ähnliche Ergebnisse. Das Initiatorsystem Fe(II)/Ascorbat verursachte die Freisetzung von 8-Isoprostanen aus den Rattenhirnlipiden in einer Größenordnung von 90 pg/ml („OXID“ in Abb. 23, graue Balken). Vergleichbar hohe Isoprostanwerte waren auch bei zusätzlicher Zugabe aller kurzkettigen Aminosäurederivate (NAc-W-OEt, NAc-Y-OEt, NAc-F-OEt) sowie der langkettigen Aminoacyllipide von Phenylalanin (NDo-F-OEt), Leucin (NDo-L-OEt), Valin (NDo-V-OEt) und Alanin (NDo-A-OEt) zu beobachten. Ausschließlich NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt verhinderten die Lipidperoxidation signifikant. (Abb. 23, graue Balken).

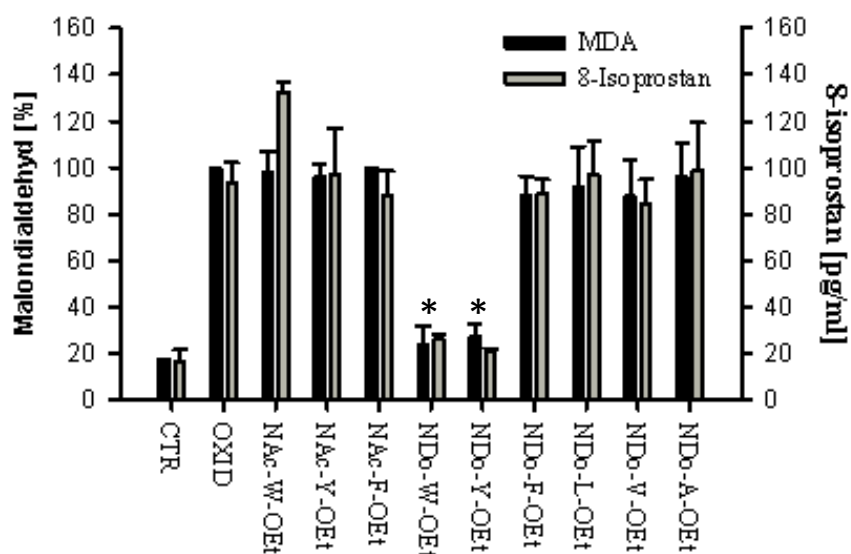


Abb. 23 Lipidperoxidation in Rattenhirnmembranen. Die Lipidperoxidation in Rattenhirnlipiden wurde anhand der Oxidationsmarker Malondialdehyd und 8-Isoprostan analysiert. Unbehandelte Proben („CTR“), mit Eisen/Ascorbat behandelte Proben („OXID“) und Proben, die vor Zugabe des Radikalinitiators mit kurzkettigen oder langkettigen Aminosäurederivaten (je 100 μM) vorinkubiert worden waren, sind gegen die Bildung von Malondialdehyd (in %, schwarze Balken) sowie 8-Isoprostan (in pg/ml, graue Balken) aufgetragen. Eine statistische Signifikanz bezüglich der Unterschiede in der Bildung der Lipidperoxidationsprodukte Malondialdehyd und 8-Isoprostan wurde ausschließlich durch NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt erreicht und ist durch einen Stern markiert ($p < 0,001$ für NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt, jeweils $n=3$; berechnet mittels *Two-way ANOVA* und anschließendem Holm-Sidak's Post-hoc-Test)

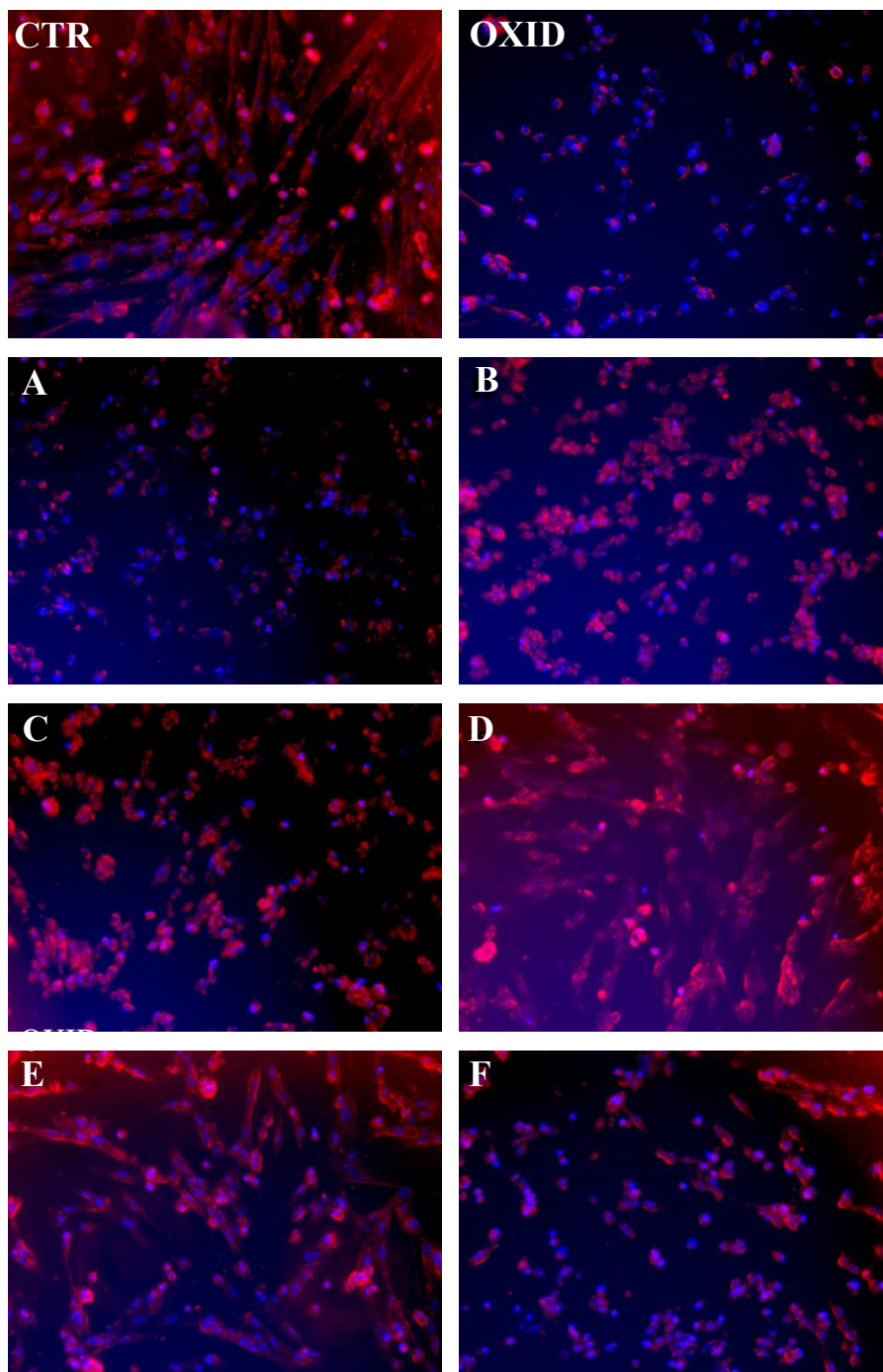
3.4.2 Cytotoxizität in humanen Fibroblasten

Um zu testen, ob die in biochemischen Experimenten beobachtete Lipidperoxidation und deren Verhinderung in biologischen Systemen eine funktionelle Relevanz hat, wurden Cytotoxizitätsexperimente in humanen Fibroblasten durchgeführt.

Als Initiator der Cytotoxizität wurde *tert*-Butylhydroperoxid verwendet, das in Zellen zu Peroxylradikalen zerfällt (Cadenas and Sies, 2005). Das Zellüberleben wurde anhand der Morphologie Hoechst-positiver Zellen bewertet. Die Aminosäurederivate wurden in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt.

Die mit 50 μM *tert*-Butylhydroperoxid behandelten Zellen waren größtenteils kugelförmig und wiesen dementsprechend nicht die charakteristischen, cytoplasmatische Fortsätze auf. Dies spiegelte sich in einer geringen Überlebensrate von 10 % wider („OXID“, Abb. 24).

Unbehandelte Zellen („CTR“) hingegen zeichneten sich durch eine für Fibroblasten charakteristische, längliche Morphologie aus und besaßen eine hohe Überlebensrate von 96 %. Während die langkettigen Tryptophan- und Tyrosinderivate einen signifikanten cytoprotektiven Effekt zeigten (Abb. 24 D, E und J), waren die anderen Derivate nicht antioxidativ und somit nicht cytoprotektiv (Abb. 24 A-C und F-I).



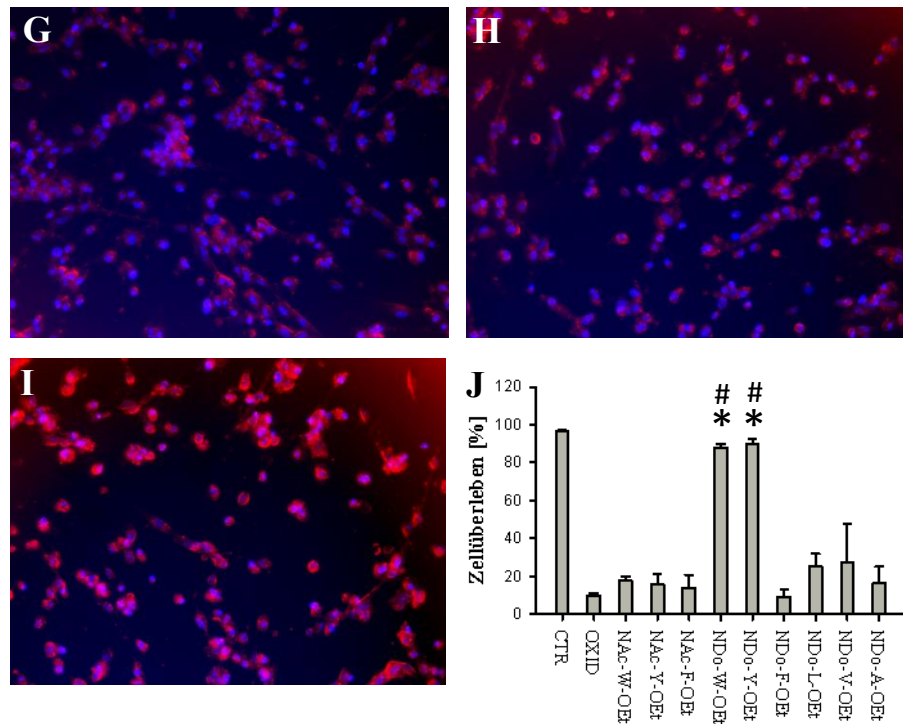


Abb. 24 Lipidperoxidation in humanen Fibroblasten. IMR-90-Fibroblasten waren unbehandelt („CTR“) oder wurden für 5 Stunden mit 50 μM *tert*-Butylhydroperoxid („OXID“) behandelt. (A-I) Die Zellen wurden vor der Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid für 5 Stunden mit 10 μM der kurzkettigen Aminosäurederivate Ac-W-OEt (A), Ac-Y-OEt (B), Ac-F-OEt (C) oder der langkettigen Aminosäurederivate NDo-W-OEt (D), NDo-Y-OEt (E), NDo-F-OEt (F), NDo-L-OEt (G), NDo-V-OEt (H) und NDo-A-OEt (I) inkubiert. (J) Alle Derivate sind gegen das Zellüberleben [%] dargestellt. Ein statistisches signifikantes Zellüberleben wurde ausschließlich durch NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt erreicht und ist durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,001$ für NDo-W-OEt und NDo-Y-OEt; jeweils $n=3$). Diese beiden cytoprotektiven Derivate bewirken zudem ein signifikant höheres Zellüberleben als alle anderen Substanzen (#; $p < 0,001$; jeweils $n=3$). Die statistische Auswertung beruhte auf einem *Two-way ANOVA* und anschließendem Holm-Sidak's Post-hoc-Test.

3.5 Die Untersuchung der Tryptophan-Analoga Benzofuranylalanin (BFA) und Benzothiophenylalanin (BTA)

Die Ergebnisse aus Abb. 14 zeigen einen Zusammenhang zwischen der chronologischen Aufnahme der Aminosäuren in den genetischen Code und der Verkleinerung der HOMO-LUMO-Bandlücke, die bei Tryptophan als „letzter“ Standard-Aminosäure mit 8,6 eV den niedrigsten Wert aufweist. Weiterhin konnte in verschiedenen Radikal-Assays und insbesondere in Experimenten zur Lipidperoxidation das antioxidative Potential von Tryptophan demonstriert werden.

Um die Aminosäureselektion zu untersuchen, wurden Struktur-Analoga von Tryptophan, die nicht in den genetischen Code aufgenommen worden sind, biochemisch und

quantenchemisch analysiert. Hierbei handelte es sich um Benzofuranylalanin (BFA) und Benzothiophenylalanin (BTA) (Abb. 8; 2.1.2.1). BFA und BTA sind Tryptophan strukturell sehr ähnlich und biosynthetisch plausible Tryptophan-Analoga. Für die Berechnungen wurden die Ringsysteme, welche die Aminosäuren charakterisieren, herangezogen.

Indol, Benzofuran und Benzothiophen weisen hinsichtlich Größe, die sich durch die Moleküloberfläche und das Molekülvolumen beschreiben lässt, und Ladung keine wesentlichen Unterschiede auf. Indol besitzt jedoch mit 1,77 Debye ein etwas größeres Dipolmoment als Benzofuran und Benzothiophen mit 1,04 bzw. 0,34 Debye (Tab. 5). Es stellt sich daher die Frage, warum Tryptophan und nicht BFA bzw. BTA in den genetischen Code aufgenommen wurden.

Tab. 5 Molekulare Eigenschaften von Indol, Benzofuran und Benzothiophen

Parameter		Tryptophan	BFA	BTA
Größe	Molekulargewicht [g/mol]	204,23	205,21	221,05
	Moleküloberfläche der Seitenkette [\AA^2]	142,5	137,67	144,68
	Molekülvolumen der Seitenkette [\AA^3]	109,68	105,17	113,67
Ladung	[e] der Seitenkette	0	0	0
Hydrophobizität	Dipolmoment [D] der Seitenkette	1,77	1,04	0,34
	logP der Seitenkette	2,36	2,18	2,94

3.5.1 Experimenteller Vergleich von Tryptophan und seinen Struktur-Analoga BFA und BTA

Um die biologische Relevanz der Parameter der Aminosäureselektion zu untersuchen, wurde ein Peroxylradikal-Test mit Tryptophan und seinen Strukturverwandten BFA und BTA durchgeführt. Weiterhin wurden dodecanoylierte Derivate von Tryptophan, BFA und BTA (NDo-W, NDo-BFA bzw. NDo-BTA, Abb. 8) in Lipidperoxidationsexperimenten getestet.

Wie bereits zuvor gezeigt, besitzt Tryptophan die Fähigkeit, mit Peroxylradikalen zu reagieren (3.3.1). Im Falle von BFA und BTA waren jedoch deutlich niedrigere Reaktivitäten zu verzeichnen (Abb. 25 A). Dies spiegelt sich auch in Lipidperoxidationsversuchen in Rattenhirnmembranen wider. Durch die Zugabe von NDo-W wurde der Prozess der Lipidperoxidation offenbar weitgehend unterbunden, wodurch nur geringe Mengen an Malondialdehyd und löslichem 8-Isoprostan gebildet werden. NDo-BFA und NDo-BTA hingegen zeigen keinen Schutz vor Lipidperoxidation (Abb. 25B).

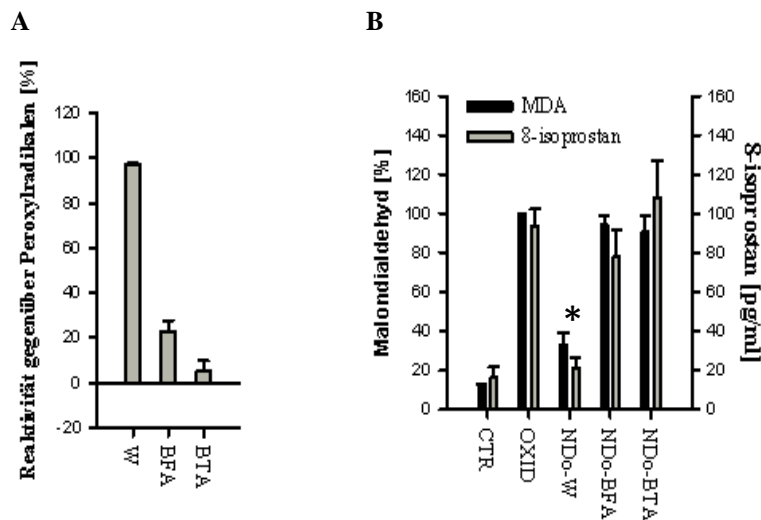


Abb. 25 Vergleich zwischen Tryptophan und seinen Struktur-Analoga Benzofuranylalanin (BFA) und Benzothiophenylalanin (BTA). (A) Die Fähigkeit von Tryptophan (W) und seinen Analoga BFA und BTA, Peroxylradikale abzufangen, wurde untersucht. Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 20B durchgeführt. (B) Einfluss der lipophilen Derivate dieser drei Aminosäuren, NDo-W, NDo-BFA und NDo-BTA, auf die Lipidperoxidation. Als Oxidationsmarker dienten Malondialdehyd (schwarze Balken) sowie 8-Isoprostan (graue Balken). Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 23 durchgeführt. Eine statistische Signifikanz bezüglich der Unterschiede in der Bildung der Lipidperoxidationsprodukte Malondialdehyd und 8-Isoprostan wurde ausschließlich durch NDo-W erreicht und ist durch einen Stern markiert ($p < 0,001$ für NDo-W für $n=3$; berechnet mittels *Two-way ANOVA* und anschließendem Holm-Sidak's Post-hoc-Test).

Der biochemische Unterschied konnte in humanen Fibroblasten verifiziert werden. Zellen, die mit NDo-W vorbehandelt wurden, zeigten nach Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid ein signifikant höheres Zellüberleben als Zellen, die mit NDo-BFA oder NDo-BTA vorinkubiert worden waren, (Abb. 26).

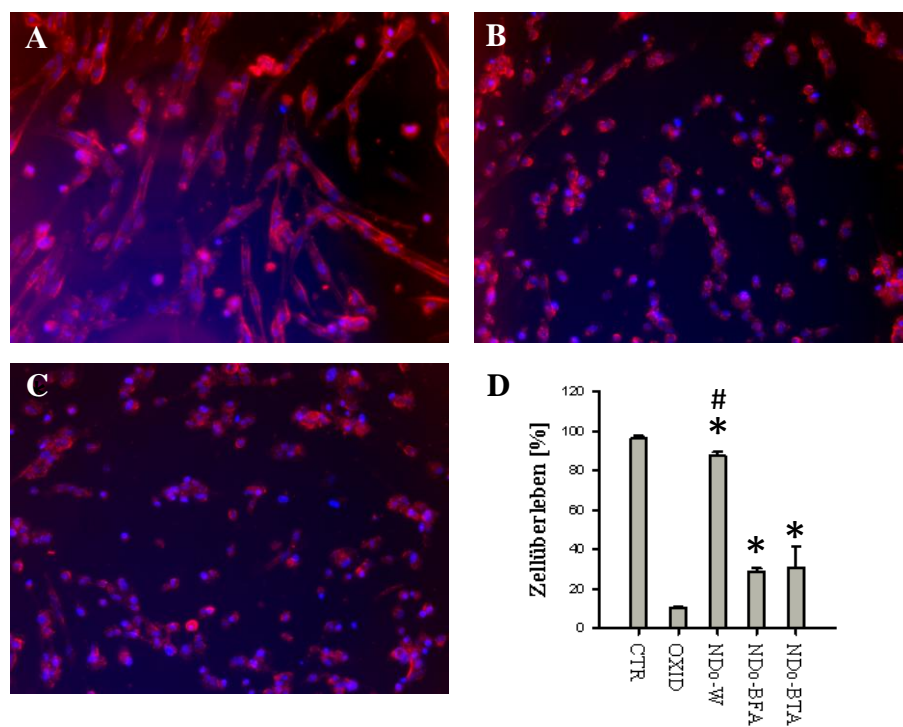


Abb. 26 Untersuchung der Cytoprotektivität von NDo-W, NDo-BFA und NDo-BTA in humanen Fibroblasten. IMR-90-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen, wie in Abb. 24 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden vor Zugabe von tert-Butylhydroperoxid mit NDo-W (A), NDo-BFA (B) oder NDo-BTA (C) inkubiert. Alle Derivate bewirken ein signifikant erhöhtes Zellüberleben (*; $p < 0,001$ für NDo-W; $p = 0,0018$ für NDo-BFA und $p = 0,0012$ für NDo-BTA). Die Unterschiede zwischen NDo-W und NDo-BFA bzw. NDo-BTA sind ebenfalls signifikant (#). Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Two-way ANOVA* und anschließendem Post-hoc-Test.

Offensichtlich gibt es trotz ähnlicher molekularer Parameter zwischen Tryptophan und seinen Analoga sehr große Unterschiede in der Reaktivität und Cytoprotektivität. Aus diesem Grund erfolgte eine quantenchemische Untersuchung dieser Aminosäuren. Wie in Tab. 6 dargestellt, sind die HOMO-LUMO-Differenzen der korrespondierenden Aminosäurestrukturen mit $-8,53$ eV (Tryptophan), $-8,84$ eV (BFA) und $-8,09$ eV (BTA) recht ähnlich. Unterschiede existieren jedoch in Hinblick auf die Radikalisierbarkeit. Die Enthalpien der auf Wasserstoffabstraktion basierenden Radikalisierung betragen $38,45$ kcal/mol für Tryptophan, aber über 70 kcal/mol für BFA ($73,07$ kcal/mol) und BTA ($71,78$ kcal/mol). Dies indiziert eine hohe Wahrscheinlichkeit der Radikalisierung von Tryptophan und eine geringere Wahrscheinlichkeit der Radikalisierung der Analoga.

Tab. 6 Quantenchemische Eigenschaften von Tryptophan, BFA und BTA.

Parameter	Tryptophan	BFA	BTA
Radikalisierungsenthalpie ΔH_{rad} [kcal/mole]	38,45	73,07	71,87
HOMO-LUMO-Bandlücke [eV]	-8,53	-8,84	-8,09

4 Diskussion

Der moderne genetische Code ist als essentielles Merkmal aller Lebensformen nahezu universell konserviert. Bis heute ist unklar, wie der erste genetische Code entstanden ist und welche Prinzipien der Evolution des genetischen Codes zugrunde liegen. Ebenso ist nicht bekannt, warum die bis zu 22 proteinogenen Aminosäuren für die genetische Codierung selektiert wurden. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den reaktiven Eigenschaften proteinogener Aminosäuren und ihrer spezifischen Aufnahme in den Code gibt.

Zunächst werden die Ergebnisse und Hypothesen der vorliegenden Arbeit zusammengefasst (4.1). Nachfolgend ist die Diskussion der jeweiligen Experimente einzeln dargestellt (4.2-4.4). Abschließend werden die Erkenntnisse in Zusammenhang mit der geochemischen Erdgeschichte und der biologischen Evolution diskutiert (4.5-4.7).

4.1 Die Bedeutung von molekularem Sauerstoff für die Evolution des genetischen Codes

Um die Evolution des genetischen Codes zu erforschen wurden in der vorliegenden Arbeit abiotische, nicht-proteinogene Aminosäuren des Murchison-Meteoriten sowie die 21 proteinogenen Aminosäuren quantenchemisch charakterisiert. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen der HOMO-LUMO-Energiedifferenz, die ein negatives quantenchemisches Korrelat für chemische Reaktivität darstellt, und dem evolutionären Auftreten der untersuchten Aminosäuren aufgezeigt werden. Demnach waren die Aminosäuren des Meteoriten und abiotische, proteinogene Aminosäuren durch große HOMO-LUMO-Bandlücken gekennzeichnet, wohingegen „neue“ proteinogene Aminosäuren geringe Bandlücken aufwiesen. Bei einer nachfolgenden Betrachtung des Metabolismus der beiden jüngsten Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, die aus dem anaeroben Shikimat-Weg hervorgehen, konnte ihre Bedeutung als Vorläufer von verschiedenen biologisch funktionellen Molekülen demonstriert werden. Diese Biomoleküle besitzen in den jeweiligen Reaktionsschritten bzw. Stoffwechselwegen eine zentrale Bedeutung als Redox-Cycler und werden dort in der Regel radikalisiert. Interessanterweise erfordert mindestens ein Reaktionsschritt ihrer Biosynthese molekularen Sauerstoff. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass Aminosäuren, die spät in den genetischen Code aufgenommen wurden, das Potential besitzen, mit reaktiven Sauerstoffspezies, wie beispielsweise Peroxylradikalen, zu reagieren. Durch den experimentellen Nachweis in verschiedenen

Radikal-Tests konnte die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen Reaktivität und evolutionärem Alter der Aminosäuren untermauert werden. Da Peroxylradikale während des Prozesses der Lipidperoxidation gebildet werden und Shikimat-Derivate wie α -Tocopherol die Membran vor oxidativer Schädigung schützen, wurde die antioxidative Kapazität von Aminosäuren in nativen Rattenhirnmembranen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ausschließlich lipophile Derivate von Tryptophan und Tyrosin in der Lage sind, Lipidperoxidation zu verhindern. Diese Derivate besaßen zudem die Fähigkeit, humane Fibroblasten vor oxidativem Zelltod zu schützen.

Anhand der quantenchemisch berechneten Eigenschaften, sowie den biochemisch und biologisch gemessenen Reaktivitäten gegenüber Radikalen durch moderne Aminosäuren, die insbesondere durch Tryptophan und Tyrosin repräsentiert werden, wird in der vorliegenden Arbeit folgende Hypothese aufgestellt: Im Laufe der Evolution wurden Aminosäuren, welche die Eigenschaft besitzen, mit reaktiven Sauerstoffmolekülen zu reagieren und diese damit unschädlich zu machen, sukzessive in den genetischen Code aufgenommen. Organismen, die Tryptophan und Tyrosin demnach als redox-aktive Bestandteile von Membranproteinen nutzen konnten, waren vor oxidativen Schädigungen, die durch die Peroxidation von Lipiden hervorgerufen wurde, geschützt und besaßen demnach einen Selektionsvorteil gegenüber Organismen, die über eine nicht ausreichende antioxidative Abwehr verfügten.

In dieser Arbeit konnte oxidativer Stress als potentieller Faktor für die Evolution des genetischen Codes identifiziert werden.

4.2 Die Eigenschaften der Grenzorbitale determinieren das evolutionäre Auftreten von Aminosäuren

Die quantenchemische Analyse der untersuchten Aminosäurestrukturen ergab unabhängig von der angewandten Berechnungsmethode eine Korrelation zwischen der HOMO-LUMO-Energiedifferenz und dem evolutionären Auftreten der Aminosäuren (siehe 3.1). Anhand der quantenchemischen Berechnungen von HOMOs und LUMOs können die untersuchten Strukturen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Eine Gruppe umfasst die 62 ursprünglichen Aminosäuren des Murchison-Meteoriten und proteinogene Aminosäuren, die aufgrund 60 verschiedener Kriterien als ursprünglich betrachtet werden (Trifonov, 2009). Die Aminosäuren dieser Gruppe sind in der Regel durch große HOMO-LUMO-Bandlücken

gekennzeichnet. Die zweite Gruppe besteht größtenteils aus Aminosäuren, die kleine Differenzen in den Energieniveaus der Grenzorbitale aufweisen. Bei Betrachtung der einzelnen Orbitalenergien sind Unterschiede zwischen den Berechnungsmethoden festzustellen. Die Verschiedenheit der Ergebnisse zwischen den semi-empirischen Methoden besteht vornehmlich in den berechneten HOMO-LUMO-Energiedifferenzen von Arginin, Prolin und Selenocystein. Diese Unterschiede sind auf die unterschiedliche Anzahl an berechneten Integralen zurückzuführen. In der AM1-Methode werden rechenaufwändige, sogenannte Zweielektronen-Einzentrum-Integrale durch empirische Parameter ersetzt, wohingegen diese Integrale in der PM6-Methode miteinbezogen werden (Stewart, 2007).

Die Unterschiede innerhalb der proteinogenen Aminosäuren sind bei der angewandten Hartree-Fock *ab initio*-Methode deutlich größer. Die schwefel- bzw. selenhaltigen Aminosäuren Cystein, Methionin und Selenocystein weisen signifikant größere HOMO-LUMO-Energiedifferenzen auf als die Berechnungen auf Grundlage der semi-empirischen Verfahren ergaben. Dies ist der unterschiedlichen Anzahl an berechneten Integralen zuzuschreiben. Weiterhin wird *ab initio* die Elektronenkorrelation, worunter man die Abstoßung zwischen Elektronen versteht, nicht exakt berechnet, wodurch die Orbitalenergiwerte üblicherweise über den reellen Werten liegen (Duan et al., 2004). Die Verwendung empirischer Parameter erlaubt bei semi-empirischen Methoden eine bessere Beschreibung der Elektronenkorrelation, wodurch die elektronischen Eigenschaften der Schwefelatome bzw. des Selenatoms möglicherweise präziser bestimmt werden können.

4.3 Die HOMO-LUMO-Bandlücke ist ein quantenchemisches Korrelat für die biochemische Reaktivität von Aminosäuren

Nach der Grenzorbitaltheorie lässt sich anhand der energetischen Eigenschaften der Grenzorbitale, also der HOMOs und LUMOs der untersuchten Moleküle, die chemische Reaktivität bzw. kinetische Stabilität vorhersagen (Fukui, 1982; Pearson, 1986). Diese Korrelation konnte unter anderem in der Beschreibung der Reaktivität von Fullerenen experimentell demonstriert werden (Aihara, 2000). Darüber hinaus wurde die Verwendung der HOMO-LUMO-Differenz als Index für die kinetische Stabilität polyzyklischer Kohlenwasserstoffe beschrieben (Aihara, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Grenzorbitaltheorie in Zusammenhang mit der Reaktivität von Aminosäuren gegenüber Sauerstoff-Radikalen experimentell getestet. Dies

gründete auf der Analyse des Metabolismus der modernen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, die Vorläufer einer Vielzahl von Strukturen darstellen. Die Gemeinsamkeit dieser Derivate besteht in ihrer Eigenschaft als Redox-Cycler und dem damit verbundenen Potential der Radikalisierbarkeit. Darüber hinaus wird in mindestens einem Schritt ihrer Biosynthese molekularer Sauerstoff benötigt (siehe 3.2).

4.3.1 Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Untersuchung der Reaktion von Aminosäuren mit Peroxylradikalen (3.3.1) sind in Abb. 27 nochmals zusammengefasst.

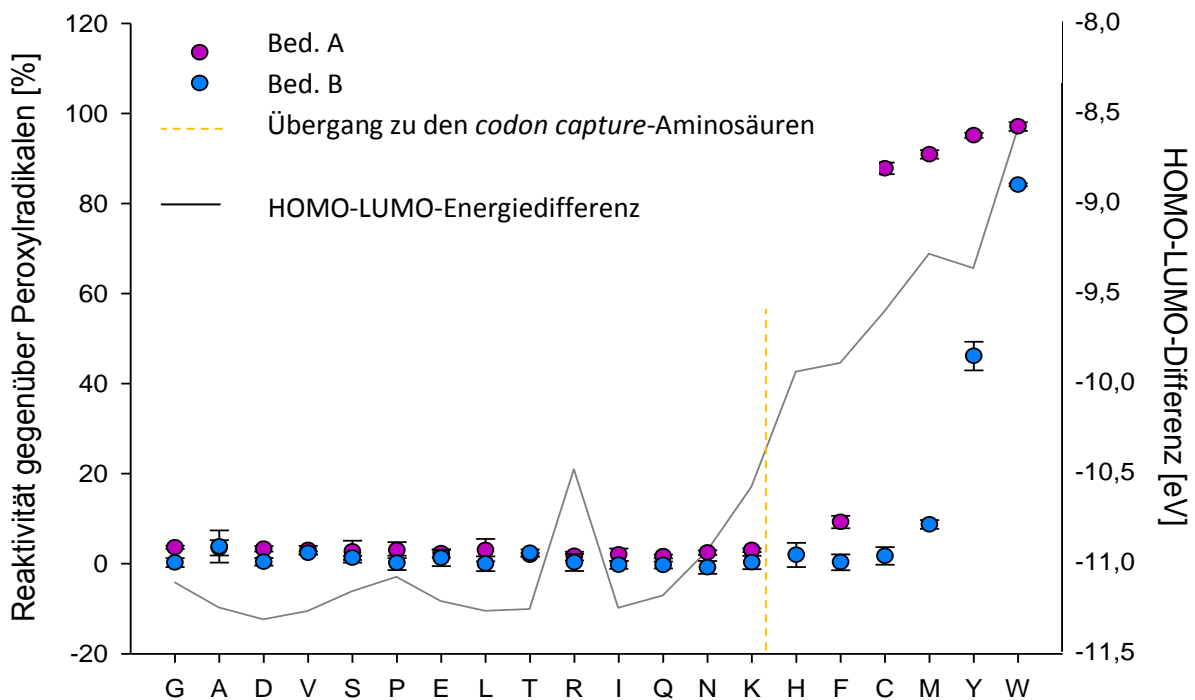


Abb. 27 Zusammenhang zwischen HOMO-LUMO-Energiedifferenz und Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen. Die 20 Standard-Aminosäuren (im Einbuchstaben-Code) sind in der Reihenfolge ihres evolutionären Auftretens gegen die dazugehörige HOMO-LUMO-Differenz (graue Linie) sowie die Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen unter Bedingung A (AAPH-Aminosäureverhältnis 3:1, violette Kreise) bzw. unter Bedingung B (AAPH-Aminosäureverhältnis 20000:1, blaue Kreise) aufgetragen. Der Übergang von primordialen zu den *codon capture*-Aminosäuren ist durch eine gelbe, gestrichelte Linie dargestellt. Es ist eine Korrelation zwischen HOMO-LUMO-Differenz und chemischer Reaktivität festzustellen, die zudem einem evolutionären Trend folgt.

Die 20 Standard-Aminosäuren sind hierbei wiederum in der Konsensus-Reihenfolge ihres Auftretens gegen die dazugehörige HOMO-LUMO-Differenz (berechnet auf Basis der semiempirischen AM1-Methode) und die jeweilige experimentell bestimmte Reaktivität gegenüber dem Peroxylradikal aufgetragen. Wie zu erkennen ist, gibt es eine Korrelation zwischen Größe der HOMO-LUMO-Energiedifferenz und chemischer Reaktivität. Dies bestätigt, dass die Grenzorbitaltheorie auf Aminosäuren anwendbar ist. Darüber hinaus ist ein evolutionärer Trend in Richtung einer abnehmenden Differenz zwischen den Grenzorbitalen und zunehmender Reaktivität erkennbar (Abb. 27).

Nach Angaben aus der Literatur beruht die Fähigkeit eines Moleküls, mit dem Peroxylradikal zu interagieren, in der Regel auf der Abgabe eines Wasserstoffatoms, welches mit dem Peroxylradikal zum Peroxid reagiert, wobei das reagierende Molekül dabei radikalisiert wird (Ou et al., 2001; Huang et al., 2005). Überträgt man dieses Prinzip auf die untersuchten Aminosäuren, wird die Interaktion mit dem Radikal offensichtlich durch eine geringe Differenz der Grenzorbitale, die maßgeblich durch ein hochenergetisches HOMO erreicht wird, energetisch begünstigt. Dies ist der Fall, wenn es sich bei der Bindung zwischen dem zu abstrahierenden Wasserstoffs und seinem Bindungspartner um das HOMO der Aminosäure handelt. Ein solcher Reaktionsmechanismus ist für Tyrosin in Abb. 28 dargestellt. Das HOMO des Tyrosins besteht unter anderem aus der reaktiven O-H-Bindung des Phenolrings. In Anwesenheit eines Peroxylradikals wird das Wasserstoffatom des Phenolrings auf das SOMO des Peroxylradikals übertragen, das dadurch zum Peroxid reduziert wird. Das HOMO des Tyrosins wird durch die Abgabe des Wasserstoffatoms (und somit eines Elektrons) zum SOMO des gebildeten Tyrosylradikals. Dies entspricht der Identifizierung von Tyrosylradikalen in Form von Dityrosin als Oxidationsprodukt der Reaktion zwischen Tyrosin und AAPH-abgeleiteten Peroxylradikalen (Chao et al., 1997).

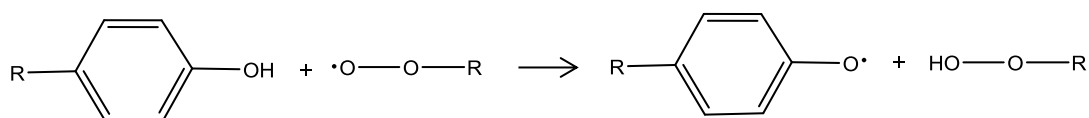


Abb. 28 Reaktion zwischen Tyrosin und dem Peroxylradikal. Tyrosin interagiert mit dem Peroxylradikal über den Mechanismus der Wasserstoffabstraktion. Tyrosin transferiert das Wasserstoffatom der phenolischen OH-Gruppe auf das Peroxylradikal, das hierbei zum Peroxid reagiert. Tyrosin wird während dieser Reaktion radikalisiert und liegt als mesomeriestabilisiertes Tyrosyl-Radikal vor.

Die beobachtete Reaktivität von Histidin und Methionin gegenüber dem Peroxylradikal, die schon zuvor beschrieben wurde (Chao et al., 1997; Ma et al., 1999), lässt sich jedoch nicht anhand des postulierten Mechanismus der Wasserstoff-Abstraktion erklären (Huang et al., 2005). Methionin wird durch 1-Elektronen-Oxidantien, zu denen auch das Peroxylradikal gehört, in der Regel in das Methionin-Radikalkation umgewandelt, welches in einem weiteren Oxidationsschritt zum Methioninsulfoxid reagiert (Chao et al., 1997; Schöneich, 2005). Das direkte Produkt der Oxidation von Histidin durch das Peroxylradikal ist nicht bekannt, wobei in verschiedenen pro-oxidativen Systemen 2-Oxo-Histidin als terminales Oxidationsprodukt identifiziert wurde, das aus der Addition eines Hydroxylradikals an den Imidazolring des Histidins resultiert (Uchida and Kawakishi, 1993; Traoré et al., 2009; Gottfredsen et al., 2013). Alternative Oxidationsmechanismen sind zudem für Tryptophan beschrieben, das in Anwesenheit von Peroxylradikalen zu 5-Hydroxytryptophan, Kynurenin und N-Formylkynurenin oxidiert werden kann (Ma et al., 1999; Ji et al., 2009). Demnach ist von terminal unterschiedlichen Oxidationsprozessen auszugehen, die durch das Peroxylradikal hervorgerufen werden und unter anderem Wasserstoffabstraktion, Elektronenabstraktion und Addition eines Radikals an das Substrat umfassen. In vielen Fällen werden diese Oxidationsprozesse durch ein gemeinsames Aminosäuremerkmal, die HOMO-LUMO-Energiedifferenz, charakterisiert und kinetisch determiniert.

Die HOMO-LUMO-Differenz beschreibt die Reaktion mit dem Peroxylradikal in guter Näherung. Sie ist eine notwendige Voraussetzung für die Reaktivität, auch wenn im Einzelfall weitere Parameter berücksichtigt werden müssen. So ist Phenylalanin trotz einer Differenz, die energetisch jener von Histidin vergleichbar ist, nicht in der Lage, das Peroxylradikal abzufangen. Eine Ursache könnte in der vergleichsweise hohen Orbitalenergie des HOMOs bestehen, das nicht mit dem SOMO des Peroxylradikals überlappen kann. Ein weiterer Grund liegt möglicherweise in der hohen Radikalisierungsenthalpie von Phenylalanin begründet, die ein energetisches Hindernis für die Abgabe eines Wasserstoffatoms darstellt, der beschriebenen Wechselwirkung zwischen Phenylalanin und dem Peroxylradikal (Galano and Cruz-Torres, 2008).

4.3.2 Reaktivität gegenüber artifiziellen Radikalen

Bei der Interpretation der Ergebnisse zur experimentellen Untersuchung der Aminosäure-Reaktivität gegenüber weiteren Radikalen (3.3.2) ist die Elektrophilie der Radikale und der der jeweiligen Reaktion zugrunde liegende Mechanismus zu berücksichtigen. Die Elektrophilie der vier unterschiedlichen Radikale nimmt in der Reihenfolge TCNQ, Galvinoxyl, DPPH und ABTS zu. Da es sich beim TCNQ-Radikalanion um ein nucleophiles Radikal mit einem hochenergetischen SOMO handelt, ist eine Reaktion mit einer Aminosäure zu erwarten, die sich durch ein niedrigerenergetisches LUMO auszeichnet. Die Aminosäuren mit den geringsten LUMO-Werten (nach der AM1-Methode) sind Tryptophan und Cystein. Wie in Abb. 29 zu erkennen ist, reagiert in der Tat einzig Cystein mit dem TCNQ-Radikalanion. Dies kann vermutlich der Struktur von TCNQ zugeschrieben werden, die eine sogenannte n - π -Interaktion fördert, die mit den freien Elektronenpaaren des Cysteins zustande kommen kann (Guo et al., 2004).

Gegenüber den eher elektrophilen DPPH- und Galvinoxylradikalen demonstrierten Cystein, Tyrosin und Tryptophan eine deutliche Reaktion, während in Hinblick auf das höchst elektrophile ABTS-Radikalkation hauptsächlich Tyrosin und Tryptophan eine signifikante Reaktivität zeigten, wohingegen Cystein moderat reaktiv war (Abb. 29). Dies entspricht den Erwartungen, da die reagierenden Aminosäuren durch ein hochenergetisches HOMO gekennzeichnet sind. Somit ist die Möglichkeit einer Übertragung eines Elektrons aus dem entsprechenden HOMO in das einfach besetzte SOMO des Radikals gegeben. Allerdings besitzen Methionin, Histidin, Phenylalanin und Arginin ebenfalls hochenergetische HOMOs, die theoretisch eine Reaktion mit elektrophilen Radikalen ermöglichen sollte. Eine Ursache liegt höchstwahrscheinlich im Mechanismus begründet, welcher der Reaktion mit dem Galvinoxyl-, DPPH- und ABTS-Radikal zugrunde liegt. In diesen Fällen beruht die Reaktion der Aminosäure auf der Abgabe eines Wasserstoffatoms, das mit dem jeweiligen Radikal reagiert. Dies setzt ein hochenergetisches HOMO sowie eine niedrige Radikalisierungsenthalpie der Aminosäure voraus, welche eine vollständige Abstraktion eines Wasserstoffatoms erlaubt. Wie beschrieben, besitzt Phenylalanin trotz geringer HOMO-LUMO-Energiedifferenz eine hohe Radikalisierungsenthalpie. Dies ist ebenfalls bei Arginin der Fall, wodurch seine Nicht-Reaktivität erklärt werden könnte. Der Grund für die ausbleibende Wechselwirkung von Methionin und Histidin mit vielen Radikalen ist vermutlich derselbe wie jener für die fehlende Interaktion mit dem Peroxylradikal. Demnach reagieren Galvinoxyl-, DPPH- und ABTS-Radikale in der Regel über die Abstraktion von

Wasserstoffatomen mit hochenergetischem HOMO, die bei Histidin und Methionin nicht vorkommen (Re et al., 1999; Litwinienko and Ingold, 2003; Barzegar and Moosavi-Movahedi, 2011).

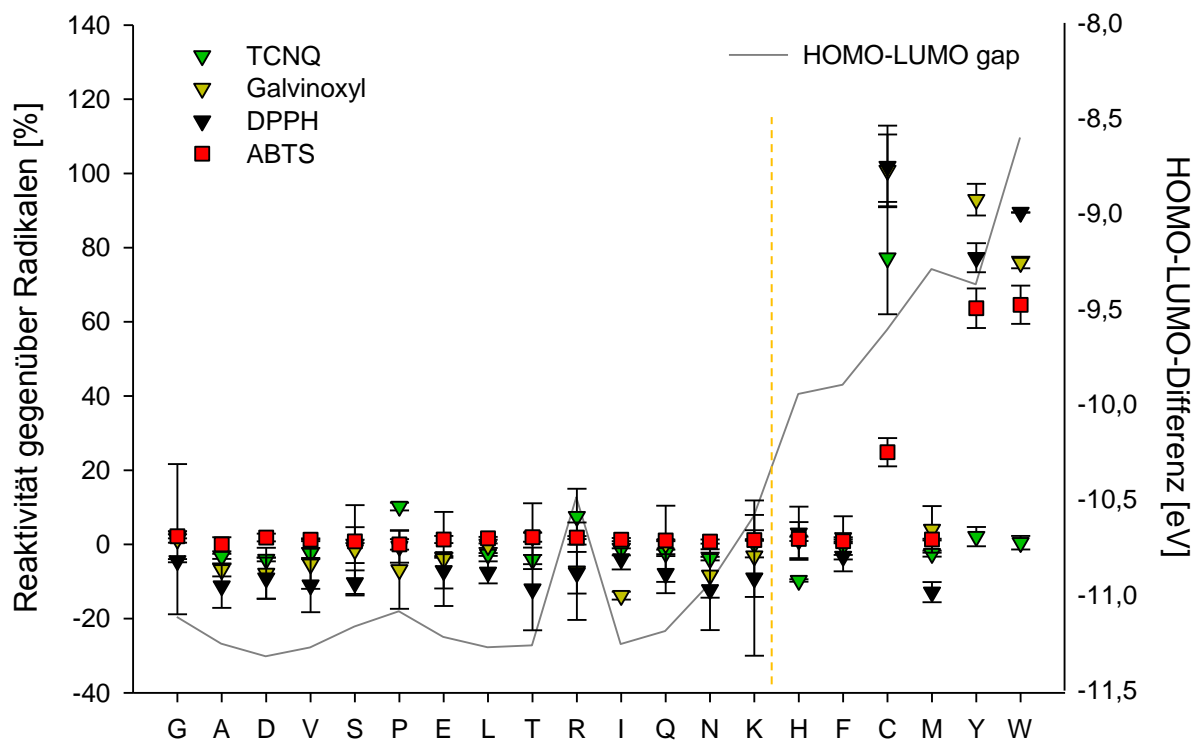


Abb. 29 Reaktivität der Standard-Aminosäuren gegenüber Radikalen unterschiedlicher Elektrophilie. Die 20 Standard-Aminosäuren (im Einbuchstaben-Code) sind in der Reihenfolge ihres evolutionären Auftretens gegen die dazugehörige HOMO-LUMO-Differenz (graue Linie) sowie die Reaktivität gegenüber dem nucleophilen TCNQ-Radikalanion (grüne Dreiecke), den elektrophilen Galvinoxyl- und DPPH-Radikalen (gelbe bzw. schwarze Dreiecke) sowie dem äußerst elektrophilen ABTS-Radikalkation (rote Vierecke) aufgetragen. Der Übergang von primordialen zu *codon capture*-Aminosäuren ist durch eine gelbe, gestrichelte Linie dargestellt. Wie zuvor für die Interaktion mit dem Peroxylradikal beschrieben, ist eine weitgehende negative Korrelation zwischen HOMO-LUMO-Differenz und chemischer Reaktivität festzustellen.

Neben dem Peroxylradikal sind weitere Sauerstoffradikale wie beispielsweise das Hydroxylradikal von biologischer Relevanz. Beim Hydroxylradikal handelt es sich um ein äußerst reaktives Sauerstoffderivat, das zudem weniger spezifisch mit einem potentiellen Substrat als das Peroxylradikal reagiert. Bei einer Analyse der Kinetik der Reaktion von Aminosäuren mit dem Hydroxylradikal wurde interessanterweise ebenfalls eine hohe Reaktivität der *codon capture*-Aminosäuren gezeigt. Demnach wurden für Cystein, Tryptophan, Tyrosin hohe Geschwindigkeitskonstanten mit jeweils über $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

gemessen, während Methionin, Phenylalanin und Histidin von den übrigen Aminosäuren mit $8,5\text{-}4,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mit die höchsten Werte aufwiesen (Xu and Chance, 2007).

Unterschiede zwischen den Aminosäure-Reaktivitäten gegenüber dem Peroxyl- und Hydroxylradikal betreffen vornehmlich Phenylalanin und Cystein. Während Phenylalanin unreaktiv gegenüber dem Peroxylradikal ist, zeigt die Messung der entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten eine beträchtliche Reaktion mit dem Hydroxylradikal an (Xu and Chance, 2007). Dies ist auf einen alternativen Reaktionsmechanismus zurückzuführen. Entgegen der Reaktion mit dem Peroxylradikal, die im Falle des Phenylalanins von der Abstraktion eines Wasserstoffatoms abhängt, findet in Anwesenheit des Hydroxylradikals eine Additionsreaktion an die Aminosäure statt (Galano and Cruz-Torres, 2008). Die Reaktion führt folglich zur einfachen Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin oder, bei mehrfacher Addition, zur Bildung von Dihydroxyphenylalanin (DOPA) bzw. Trihydroxyphenylalanin (TOPA) (Gieseg et al., 1993).

Weiterhin konnte in einer Untersuchung zur Struktur von Oxidationsprodukten von Aminosäuren die Reaktivität von Methionin, Tryptophan, Histidin und Tyrosin gegenüber Singulett-Sauerstoff und dem Superoxidanionradikal demonstriert werden (Suto et al., 2006).

4.4 Tryptophan und Tyrosin verhindern Lipidperoxidation und schützen lebende Zellen vor oxidativem Zelltod

Die untersuchten Peroxylradikale sind bei zahlreichen biologischen Prozessen von Bedeutung. So wurden durch Peroxylradikale verursachte oxidative Schädigung von DNA (Martini and Termini, 1997), Proteinen (Hawkins, 2001) und Lipiden (Halliwell and Gutteridge, 1984) beschrieben. Besondere Relevanz besitzen diese Radikale bei der Peroxidation von Lipiden, da hierbei an mehrfach ungesättigten Fettsäuren Lipidperoxylradikale entstehen, die im Zuge von Kettenttransferreaktionen benachbarte Lipide oxidieren können. Eine direkte Folge dieser Lipidperoxidation ist die Schädigung der Lipidstruktur, die Auswirkungen auf die Fluidität und Permeabilität der betroffenen Membran hat. Sekundäre Schäden entstehen durch die Reaktion von Produkten der Lipidperoxidation mit weiteren zellulären Makromolekülen. So sind oxidative Modifikationen von Nukleinsäuren, Proteinen und Kohlenhydraten als Folge von Lipidperoxidationsprozessen beschrieben (Marnett, 1999; Liu and Wang, 2005), die zum Zelltod führen können (Halliwell and Chirico, 1993).

Um zu untersuchen, inwieweit Oxidationsprozesse für die Evolution des genetischen Codes relevant sind, wurden exemplarisch für biologische Oxidation Lipidperoxidationsexperimente mit lipophilen Derivaten von Aminosäuren, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in Membranen angereichert sind, durchgeführt. Wie gezeigt werden konnte, waren ausschließlich lipophile Derivate von Tryptophan und Tyrosin befähigt, Lipidperoxidationsprozesse in nativen Rattenhirnmembranen zu verhindern, wohingegen langkettige Derivate der übrigen Aminosäuren sowie alle acetylierten, kurzkettigen Strukturen keinen protektiven Effekt demonstrierten (3.4.1). Da Eisen/Ascorbat zu einer Bildung von Fettsäureperoxiden führt (Kunimoto et al., 1981), ist der membranprotektive Effekt von Tryptophan und Tyrosin vermutlich auf das Abfangen von Peroxylradikalen zurückzuführen. Bei dieser Reaktion werden die Peroxylradikale durch die Aufnahme von Wasserstoffatomen der Aminosäuren in relativ unschädliche Lipidhydroperoxide umgewandelt, und aus Tryptophan und Tyrosin entstehen die korrespondierenden Aminosäureradikale, die mesomeriestabilisiert und daher wenig reaktiv sind. Diese Form der antioxidativen Abwehr führt zu einem Abbruch des Kettentransfers von Radikalen innerhalb der Membran, und entspricht dem Mechanismus der Inhibition von Lipidperoxidationsprozessen durch das lipophile Antioxidans α -Tocopherol (Burton et al., 1983). Ungeklärt ist, wie die radikalisierten Tryptophan- und Tyrosinreste reduziert und damit regeneriert werden. Auf Grundlage eines Modells zur Oxidation von Membranproteinen wird folgender Mechanismus postuliert (Granold et al., 2010; Hajieva et al., 2014): Tryptophan und Tyrosin sind bevorzugt in der Übergangzone zwischen dem hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht und den hydrophilen Lipidkopfgruppen lokalisiert (Tieleman et al., 1997). Die während der Lipidperoxidation gebildeten Tryptophanyl- und Tyrosylradikale besitzen eine größere Polarität als ihre parentalen Strukturen. Dadurch besteht die Möglichkeit einer Diffusion der Radikale zu den polaren Kopfgruppen der Lipide, sodass die radikalisierten Aminosäuren durch cytosolische Reduktionsmittel wie Ascorbat regeneriert werden können. Sowohl für Ascorbat als auch für Glutathion ist eine Reduktion und damit Regenerierung von Tryptophanyl- und Tyrosylradikalen beschrieben (Domazou et al., 2009; Gebicki et al., 2010).

Die prinzipielle Wirkung von Tryptophan und Tyrosin als potentielle antioxidative Bestandteile von Biomembranen wurde zudem in humanen Fibroblasten gezeigt, die mit *tert*-Butylhydroperoxid (TBH) behandelt wurden. Langkettige, lipophile Derivate von Tryptophan und Tyrosin in der Lage, die durch TBH induzierte Cytotoxizität zu verhindern (3.4.2). TBH

initiiert durch die Wasserstoff-Abstraktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren Lipidperoxidationsprozesse, die bei Überschreitung der zellulären antioxidativen Kapazität zum Zelltod führen können (Cadenas and Sies, 2005). Dies bestätigt, dass der beobachtete Schutz vor Cytotoxizität aus der Inhibition toxischer Lipidperoxidationsprozesse durch die lipophilen Tryptophan- und Tyrosinderivate ergibt.

4.4.1 Die Präferenz von Tryptophan gegenüber BFA und BTA als genetisch selektierte Aminosäure basiert auf der Fähigkeit mit Radikalen zu interagieren

In dieser Arbeit wird daher postuliert, dass die untersuchten und durch Tryptophan und Tyrosin repräsentierten modernen Aminosäuren in ihrer Funktion als redox-aktive Strukturen in den genetischen Code aufgenommen wurden und den bestehenden Code aus abiotischen, nicht-reaktiven Aminosäuren erweiterten. Doch inwieweit handelte es sich um eine spezifische Selektion der modernen, proteinogenen Aminosäuren, die folglich vermutlich erst nach der Evolution der Proteinbiosynthese erfolgte? Um die Aminosäureselektion zu ergründen, wurden die beschriebenen Parameter von Indol, bei dem es sich um das aromatische Ringsystem von Tryptophan handelt, untersucht und mit den entsprechenden Parametern von ausgewählten Indol-Analoga verglichen, die keine Bestandteile proteinogener Aminosäuren darstellen. Bei diesen Analoga handelt es sich um Benzofuran und Benzothiophen, welche die aromatischen Ringe der nicht-proteinogenen Aminosäuren Benzofuranylalanin bzw. Benzothiophenylalanin bilden, verglichen. Hierbei war lediglich ein Unterschied in der Hydrophobizität festzustellen (3.5). Die berechneten HOMO-LUMO-Energiedifferenzen sind ebenfalls sehr ähnlich. Signifikante Unterschiede bestehen lediglich in den Radikalisierungsenthalpien dieser Aminosäuren (3.3.3; 3.5). Diese Unterschiede sind auf das Wasserstoffatom der indolischen N-H-Bindung zurückzuführen, das leicht abstrahiert werden kann, wohingegen die NH-Gruppe im Fall der Analoga durch ein Sauerstoffatom (Benzofuran) bzw. Schwefelatom (Benzothiophen) ersetzt ist. Um zu eruieren, ob es Unterschiede im reaktiven Verhalten der untersuchten Strukturen gibt, wurden mit Tryptophan, BFA und BTA Experimente zur Interaktion mit Peroxylradikalen durchgeführt. Hierbei zeigte Tryptophan eine signifikante Reaktivität mit Peroxylradikalen, während im Fall von BFA und BTA nur eine geringfügige Reaktivität festzustellen war. Dies spiegelt sich in den Experimenten wider, die in nativen Rattenhirnmembranen und humanen Fibroblasten

durchgeführt wurden (3.5.1). Die Tryptophan-Analoga schützen zwar vor Cytotoxizität in den Fibroblasten, jedoch besitzt NDo-W ein signifikant größeres cytoprotektives Potential. Dies bestätigt wiederum, dass zur vollständigen Beschreibung der biochemischen Reaktivität neben den Berechnungen der Grenzorbitale die Radikalisierungsenthalpie von entscheidender Relevanz ist. Dies ist ein möglicher Hinweis auf die Bedeutung der biochemischen Reaktivität für die Selektion der proteinogenen Aminosäuren.

In dieser Arbeit wird daher postuliert, dass die Präferenz von Tryptophan gegenüber seinen Struktur-Analoga BFA und BTA nicht oder nur teilweise in den postulierten Parametern Hydrophobizität, Größe und Ladung begründet liegt, sondern auf Unterschiede bezüglich der Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen, die durch die Radikalisierungseigenschaften der Aminosäuren bedingt ist, zurückzuführen ist.

4.5 Die Aufnahme redox-aktiver Aminosäuren in den genetischen Code als adaptiver Prozess der biochemischen Evolution

Die quantenchemischen Berechnungen, metabolischen Untersuchungen und Messungen der chemischen Reaktivität indizieren eine evolutionäre Zunahme der Aminosäure-Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen. Dies deutet auf ein adaptives Prinzip der Evolution des genetischen Codes hin. Daraus ergibt sich die Frage nach dem Ursprung von Sauerstoffradikalen und ihrer potentiellen Bedeutung bei der Konstituierung des genetischen Codes.

4.5.1 Die Oxygenierung der Erde schuf die Voraussetzungen für die Bildung von Sauerstoffradikalen

Die Bildung biologisch relevanter Mengen an Sauerstoffradikalen setzt die Existenz molekularen Sauerstoffs (O_2) voraus, obgleich bei der Photolyse von Wasser Hydroxylradikale generiert werden können (Mopper and Zhou, 1990). Die heutige O_2 -Konzentration in der Erdatmosphäre beträgt 20,95 Volumenprozent. Dieser hohe Anteil ist nahezu ausschließlich auf die Aktivität photosynthetisch aktiver Organismen zurückzuführen, welche in einem Zeitraum vor ca. 3,5 bis 2,7 Milliarden Jahren erstmals auf der Erde auftraten (Brocks, 1999; Blankenship, 2010). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die

Biosphäre der Erde, welche die Atmosphäre wie auch die Hydrosphäre umfasst, während des Archaikums und frühen Proterozoikums, also zwischen dem Erscheinen der ersten Lebewesen vor 3,8 Milliarden Jahren und 2,45 Milliarden Jahren nahezu anoxisch war (Holland, 2006). Ein Hauptindikator stellt die massenunabhängige Fraktionierung von Schwefelisotopen dar, die in Sulfiden und Sulfaten von Gesteinsschichten, die älter als 2,45 Milliarden Jahre sind, festgestellt wurde (Farquhar and Wing, 2003). Die zeitliche Einordnung der Sauerstoffentwicklung auf der Erde beruht zudem auf redox-sensitiven Mineralien wie Pyrit (FeS_2), Siderit (FeCO_3) oder Uranitit (UO_2), die ausschließlich unter reduktiven Bedingungen stabil sind und in der Tat nur in Gestein identifiziert wurden, das älter als 2,5 Milliarden Jahre ist (Farquhar and Wing, 2003; Sessions et al., 2009; Sverjensky and Lee, 2010). Demnach betrug die O_2 -Konzentration in den Anfängen der Erdgeschichte weniger als 10^{-5} des heutigen Atmosphärenlevels (Holland, 2006). Ein deutlicher Anstieg atmosphärischen Sauerstoffs auf etwa 0,02-0,04 Atmosphären und eine leichte Oxygenierung der Ozeanoberflächen begann vor ca. 2,45 Milliarden Jahren. Dieses Ereignis, das bis vor ca. 2 Milliarden Jahren andauerte, wird als *Great Oxidation Event* (GOE) bezeichnet. Diese massive Sauerstoffproduktion war auf die Aktivität photosynthetisierender Cyanobakterien zurückzuführen, die als erste Organismen in der Evolutionsgeschichte zur oxygenen Photosynthese fähig waren (Schopf, 2014). Interessanterweise vergingen zwischen der Evolution der Cyanobakterien und einer signifikanten Erhöhung des geobiosphärischen Sauerstoffgehalts über 300 Millionen Jahre. Diese Verzögerung könnte auf die Aktivität von Vulkanen zurückzuführen sein, die reduzierende Gase wie Wasserstoff und Methan in die Atmosphäre ausstießen, die mit Sauerstoff reagierten und dessen Akkumulation verhinderten (Kasting et al., 1993). Nach dem GOE blieb die O_2 -Konzentration während großer Teile des Proterozoikums konstant (Abb. 30). Die Atmosphäre und die oberen Ozeanschichten waren mild oxygeniert, wohingegen die unteren Schichten der Ozeane überwiegend anoxisch blieben (Holland, 2006). Ein weiterer Anstieg des biosphärischen Sauerstoffs auf fast 0,2 Atmosphären erfolgte vor ca. 850 Millionen Jahren während der letzten Ära des Proterozoikums. Die Evolution großer Gefäßpflanzen im Zuge der kambrischen Explosion zu Beginn des Phanerozoikums verursachte einen signifikanten Anstieg der atmosphärischen O_2 -Konzentration auf über 0,3 Atmosphären, bis schließlich der heutige Wert von 0,2095 Atmosphären erreicht wurde (Abb. 30).

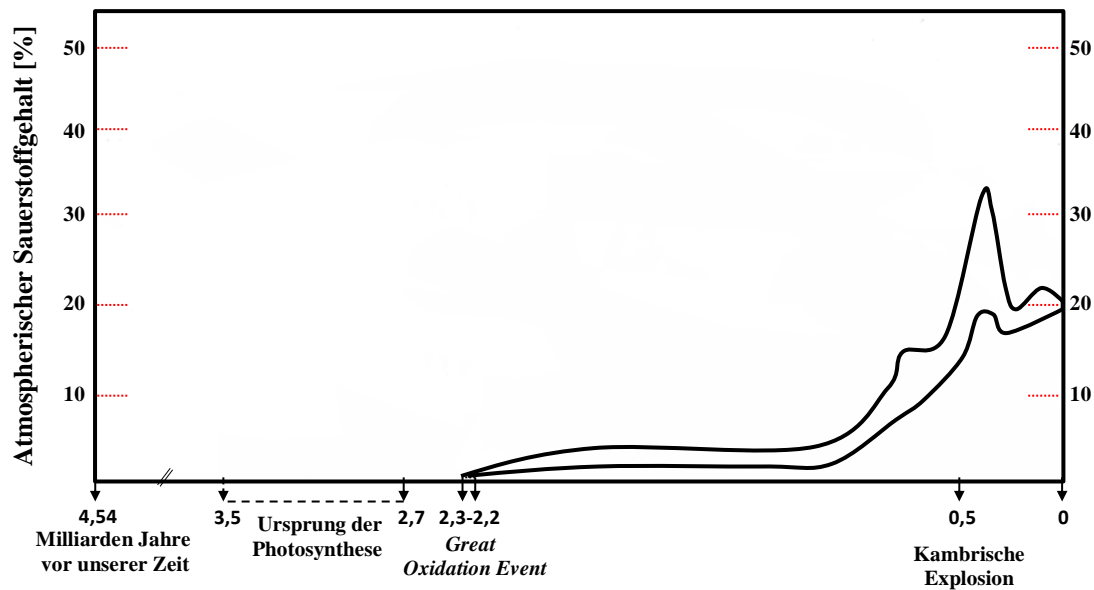


Abb. 30 Entwicklung der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration in der Erdgeschichte. Die Erde war von ihrer Entstehung bis zum *Great Oxidation Event* (*GOE*), das vor etwa 2,3 Milliarden Jahren begann, nahezu anoxisch. Durch das *GOE* stieg der Gehalt an atmosphärischem Sauerstoff (O_2) auf 2-4 Prozent an. Nach einer langen Periode, in der keine zunehmende Oxygenierung erfolgte, kam es vor 850 Millionen Jahren zu einem deutlichen Anstieg von O_2 auf über 15 %. Die Evolution von Landpflanzen während der kambrischen Explosion vor 500 Millionen Jahren ließ den Sauerstoffgehalt auf 20-30 % anwachsen, bevor er den heutigen Wert von 20,95 % erreichte. Die beiden Kurven geben den minimalen (untere Kurve) bzw. maximalen (obere Kurve) geschätzten Sauerstoffgehalt wieder, der anhand geochemischer Indikatoren berechnet wurde; modifiziert nach: Holland (2006).

Die Oxygenierung der Biosphäre begann folglich vor etwa 2,45 Milliarden Jahren während des GOE. Es ist davon auszugehen, dass die Produktion großer Mengen an Sauerstoff erhebliche Auswirkungen auf Organismen hatte, welche zur Zeit des GOE lebten. Die meisten Organismen wurden durch die zunehmende Oxygenierung in hypoxische oder anoxische Milieus gedrängt, während andere Mikroben sich die neuen Umweltbedingungen zunutze machten, indem sie ihren Stoffwechsel modifizierten und O_2 als terminalen Elektronenakzeptor einer aeroben Atmung verwendeten oder Symbiosen bildeten, in denen die Oxidation von organischem Material mit der Reduktion von Sauerstoff gekoppelt war (Falkowski, 2006). Sauerstoff besitzt mit +0,82 eV ein sehr hohes Redoxpotential, weshalb bei der aeroben Atmung ein Vielfaches an ATP und damit Energie als bei anaeroben Atmungsprozessen oder Gärung generiert werden kann. (Hedges et al., 2004). Ein solches Maximierungsprinzip der ATP-Ausbeute ist beispielsweise in *E. coli* zu beobachten, in dem die Expression terminaler, anaerober Reduktasen durch Sauerstoff unterdrückt wird (Unden and Bongaerts, 1997).

Die Bedeutung von Sauerstoff spiegelt sich in der Evolution vielzelliger Lebens wider. Demnach entstanden kurz nach dem GOE die ersten Endosymbionten und Organismen, die aus mehreren differenzierten Zelltypen aufgebaut waren. Neben der positiven Eigenschaft als terminaler Elektronenakzeptor der aeroben Atmung besitzt Sauerstoff jedoch auch das Potential, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden, die in der Lage sind, zelluläre Makromoleküle, wie Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide zu schädigen (Sies, 1986). Es ist demnach davon auszugehen, dass Organismen, die zu Zeiten des GOE lebten, inkrementell oxidativem Stress ausgesetzt waren. Inwieweit dies eine völlig neue Umweltbedingung darstellte, ist unklar. Die Beurteilung der Existenz reaktiver Spezies im Archaikum vor 3,8 bis 2,5 Milliarden Jahren hängt einerseits von der Intensität der UV-Strahlung, andererseits von der Zusammensetzung der archaischen Atmosphäre ab. Bei kurzwelliger UV-Strahlung handelt es sich um eine Form ionisierender Strahlung, die zur Bildung reaktiver Spezies führt (Gniadecki et al., 2000) und deren Intensität zu Zeiten des Archaikums etwa 75 % des heutigen Wertes betrug (Cockell and Raven, 2007). Da im Archaikum durch die Abwesenheit molekularen Sauerstoffs keine Ozonschicht existierte, welche die UV-Strahlung absorbieren konnte, konnte ein Schutz vor der UV-induzierten Bildung reaktiver Spezies nur durch die Anwesenheit einer alternativen atmosphärischen Schicht erfolgen. Bei einem derartigen Schutz könnte es sich um eine Schicht aus Schwefel vulkanischen Ursprungs bzw. Methan-basierten Kohlenwasserstoffen gehandelt haben (Cockell and Raven, 2007). Auch unter Annahme eines gänzlich fehlenden UV-Schutzes, der mit der Bildung reaktiver Spezies verbunden gewesen wäre, stellt das GOE eine Periode in der Erdgeschichte dar, die mit der Entstehung großer Mengen an ROS verbunden ist und primordiale Organismen vor große Herausforderungen stellte.

4.5.2 Das *Great Oxidation Event* formte den modernen genetischen Code

Die Oxygenierung der Geobiosphäre stellte ein Ereignis in der Erdgeschichte dar, welches das Leben auf der Erde fundamental beeinflusste und die Lebewesen zu Zeiten des *Great Oxidation Events* im positiven wie negativen Sinne vor neue Herausforderungen stellte. In der vorliegenden Arbeit wird postuliert, dass der Grund für die sukzessive Aufnahme der Aminosäuren in den Code in der zunehmenden Reaktivität der Aminosäuren gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies bestanden haben, deren Umfang im Zuge des *Great Oxidation Events* signifikant zugenommen haben muss. Diese Hypothese gründet vor allem auf den

besonderen Eigenschaften von Tryptophan und Tyrosin. Diese nehmen aufgrund ihrer in der vorliegenden Arbeit gezeigten quantenchemischen, reaktiven und antioxidativen Eigenschaften eine Sonderstellung unter den 20 Standard-Aminosäuren ein.

Nach dieser Hypothese „lernten“ bestimmte Organismen, die während des *Great Oxidation Events* lebten, Tryptophan und Tyrosin als neue Biosyntheseprodukte in ihren genetischen Code einzubauen. Durch die Fähigkeit dieser Aminosäuren, Radikale abzufangen, besaßen diese Organismen, die inkrementell reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt waren, einen Selektionsvorteil gegenüber jenen Organismen, welche Tryptophan und Tyrosin nicht synthetisieren konnten bzw. diese nicht in ihren Code aufnehmen. Daraus ergibt sich die Frage, in welcher Form dieser antioxidative Schutz bestanden haben und welcher Mechanismus diesem Schutz zugrunde gelegen haben könnte. Gemäß der Theorie des oxidativen Stresses führt ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies zur oxidativen Schädigung aller zellulären Makromoleküle. Somit sind unter Bedingungen des oxidativen Stresses Nucleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide von oxidativer Schädigung betroffen (Sies, 1986). Die Radikale, die im Zuge der zunehmenden Oxygenierung der Geobiosphäre gebildet wurden, führten im Falle einer Überschreitung der antioxidativen Kapazität folglich zur Oxidation dieser vulnerablen Makromoleküle. In dieser Arbeit wird postuliert, dass Lipidperoxidation eine zentrale Rolle bei der Evolution des genetischen Codes spielte.

Somit könnte die Fähigkeit, Peroxylradikale in Membranen abzufangen und diese dadurch zu entgiften der entscheidende Faktor bei der Integration von Tryptophan und Tyrosin als moderne Redox-Cofaktoren in Proteine gewesen sein. Die auf diese Weise entstandene Möglichkeit der Inhibition schädlicher oxidativer Prozesse, wie jener der Lipidperoxidation, bot diesen Organismen den in dieser Arbeit postulierten Selektionsvorteil. Diese Hypothese impliziert weiterhin, dass die Proteinbiosynthese für einen langen Zeitraum der Evolution ohne Tryptophan und Tyrosin als Aminosäurebausteine erfolgte. Diese Hypothese wird durch die Evolutionsgeschichte dieser beiden Aminosäuren substantiiert.

Wie bereits erläutert, werden Tryptophan und Tyrosin aufgrund verschiedener Kriterien, auf deren Basis eine Chronologie der Aminosäureaufnahme in den genetischen Code erstellt wurde, als neueste Aminosäuren eingestuft (Trifonov, 2009). Demnach konnten Tyrosin und Tryptophan weder in Experimenten zur Untersuchung der abiotischen Synthese von Aminosäuren (Miller, 1953; Miller and Urey, 1959; Huber and Wachtershauser, 2006;

Johnson et al., 2008; Parker et al., 2011; Longo and Blaber, 2012) noch in extraterrestrischem Material nachgewiesen werden (Cronin and Moore, 1971; Shimoyama et al., 1979; Engel and Nagy, 1982). Tryptophan und Tyrosin weisen zudem von allen Aminosäuren die größte Strukturkomplexität auf, die zunächst die Evolution des Shikimat-Wegs erforderte (Papentin, 1980; Jiménez-Montaño, 1999). Phylogenetische Analysen der Tryptophan-Synthase ergaben überdies, dass dieses Enzym vermutlich erst nach der Aufspaltung in die Domänen Bacteria, Archaea und Eukarya evolvierte (Syvanen, 2002). Weitere Indikatoren für ein spätes evolutionäres Auftreten von Tyrosin und Tryptophan sind Besonderheiten hinsichtlich der Verwendung ihrer Codons. Sowohl Tryptophan als auch Tyrosin nutzen Codons, die sich nur in der dritten Base des jeweiligen mRNA-Tripletts (5'→3') von Stopp-Codons unterscheiden (Jukes and Osawa, 1993).

Ebenfalls sind bis heute zahlreiche Abweichungen vom Standard-Code bekannt, in denen das Stopp-Codon UGA die Aminosäure Tryptophan codiert. Dies betrifft das nucleäre Genom von Ciliaten, die Genome der prokaryotischen Firmicutes und Mycoplasmen, die mitochondrialen Genome aller Metazoen und Pilze sowie zahlreicher Algen (Knight et al., 2001). Ein weiteres Merkmal von Tryptophan und Tyrosin als späte Aminosäuren ist die Evolution ihrer korrespondierenden tRNAs, welche als Adaptermoleküle die Voraussetzung für den Einbau der Aminosäuren in Proteine schufen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tryptophan-tRNA im Falle von *E. coli* womöglich ein molekularer Nachkomme der Glycin- oder Arginin-tRNA darstellt. (Staves et al., 1988). Dies gilt ebenfalls für die Tyrosyl-tRNA von *E. coli*, die sich von der 5S-rRNA ableitet (Mullins et al., 1973). Des Weiteren konnte in Kristallstrukturanalysen eine späte Divergenz der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von Tryptophan und Tyrosin festgestellt werden (Doublié et al., 1995). Auf Grundlage phylogenetischer Analysen ist von einer Evolution dieser Enzyme nach dem Zeitpunkt der Aufspaltung von Prokaryoten und Eukaryoten auszugehen (Ribas de Pouplana et al., 1996). Dies indiziert eine Aufnahme Tryptophans und Tyrosins in den genetischen Code, weit nach dem eine basale Form der Proteinsynthese evolvierte.

Die aufgeführten Untersuchungen zeigen ein evolutionär spätes Auftreten von Tryptophan und Tyrosin an, vermögen aber nicht, jenes zu erklären. Die in dieser Arbeit quantenchemisch determinierte und chemisch gemessene Reaktivität von Tryptophan und Tyrosin könnte auf eine enge Verknüpfung zwischen dem *Great Oxidation Event* und der Evolution des genetischen Codes hinweisen. Ein solcher Zusammenhang wird durch

phylogenetische Untersuchungen der Enzyme DNA-Photolyase und Ribonukleotidreduktase gestützt.

Bei der DNA-Photolyase handelt es sich um ein Enzym, dessen Funktion in der Reparatur UV-induzierter Pyrimidindimere liegt. Das Enzym evolvierte vermutlich vor der Oxygenierung der Geobiosphäre und wird interessanterweise durch molekularen Sauerstoff inaktiviert (Eisen and Hanawalt, 1999). Die DNA-Photolyase enthält Flavinadeninindinukleotid (FAD) als essentiellen katalytischen Cofaktor. In ihrem inaktiven Zustand liegt FAD als semi-reduziertes FAD-Radikal (FAD^\cdot) vor. Die Aktivierung erfordert eine Reduktion zum FAD-Anion (FAD^-), die durch einen benachbarten Tryptophan-Rest, der Teil einer Tryptophan-Kaskade darstellt, bewerkstelligt wird (Aubert et al., 2000; Byrdin et al., 2003). Die Kaskade, die aus drei Tryptophan-Resten besteht, wurde aufgrund des späten Aufkommens von Tryptophan möglicherweise erst nachträglich in das Enzym eingebaut, um eine Inaktivierung des Enzyms durch Sauerstoff rückgängig zu machen.

Ein Beispiel für die Bedeutung von Tyrosinradikalen für die Evolution von Enzymen ist die Ribonukleotid-Reduktase (RNR). Dieses Enzym katalysiert die Deoxygenierung von Ribonukleotiden zu den entsprechenden Desoxyribonukleotiden und ist damit essentiell für die DNA-Synthese. Die enzymatische Reaktion wird durch die Bildung eines transienten Thiyl-Radikals initiiert. Anhand des verwendeten Cofaktors zur Radikalbildung und dem Verhältnis zu molekularem Sauerstoff werden drei Klassen von RNRs unterschieden. Klasse-I-RNRs sind aerob und nutzen Tyrosylradikale als Cofaktoren, während es sich beim Cofaktor der Klasse-II-RNRs (aerob wie anaerob) um Adenosylcobalamin handelt. Klasse-III-RNRs sind anaerob und verwenden zur Bildung des Thiylradikals einen radikalisierten Glycin-Rest (Stubbe et al., 2003; Nordlund and Reichard, 2006). Hinsichtlich der Evolutionsgeschichte werden RNRs der Klasse II und III als älteste Isoformen, Klasse-I-RNRs, die vom Tyrosyl-Radikal abhängig sind, jedoch als evolutionär jüngste Isoform betrachtet (Reichard, 1993; Poole et al., 2002). Die Evolution einer neuen, ausschließlich aeroben Isoform konnte erst nach dem Auftreten von Tyrosin stattgefunden haben und indiziert ein spätes evolutionäres Auftreten von Tyrosin.

Die Hypothese der Etablierung von Tryptophan und Tyrosin als proteinogene Aminosäuren im genetischen Code während oder nach dem GOE wird darüber hinaus durch die Synthese und die Funktion der in Abb. 17 dargestellten Derivate begründet. Während die Biosynthese der Vorläufermoleküle Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin anaerob erfolgt, wird für die Synthese dieser Strukturen molekularer Sauerstoff benötigt, der vermutlich erst im Zuge des GOE in ausreichenden Mengen vorhanden war.

4.5.3 Cystein, Methionin, Selenocystein und das *Great Oxidation Event*

Betrachtet man die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse der quantenchemischen Analyse und der Radikaltests, ergibt sich die Frage, ob womöglich die Aufnahme weiterer Strukturen in den genetischen Code, wie die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein sowie Selenocystein mit dem *Great Oxidation Event* in Zusammenhang stehen könnte.

Für Cystein, bei dem es sich ebenfalls um eine schwefelhaltige, späte Aminosäure handelt, sind eine Reihe von strukturellen und katalytischen Funktionen beschrieben, die auf die Redox-Eigenschaften dieser Aminosäure zurückzuführen sind (Giles et al., 2003b). Die Vielfalt an Funktionen dieser Aminosäure spiegelt sich in einer hohen Anzahl verschiedener Oxidationszustände des Schwefels wider. Dieser kann unter anderem als Thiol, Disulfid, Thiyl-Radikal oder Sulfonsäure vorliegen (Giles et al., 2003a). Die Reaktivität von proteingebundenem Cystein ist jedoch auch von den chemischen Eigenschaften der Nachbaraminosäuren abhängig. Unter physiologischen Bedingungen liegt Cystein aufgrund seines relativ hohen pKs-Wertes von 8,5 als Thiol vor (Benesch and Benesch, 1955), während es in manchen redox-aktiven Proteinen aufgrund der Nachbarschaft zu basischen Aminosäuren als reaktives, nucleophiles Thiolat vorkommt (Netto et al., 2007). Dies ist insbesondere in Eisen-Schwefel-Komplexen von Bedeutung, die als prosthetische Gruppe Bestandteile von Eisen-Schwefel-Proteinen sind, die vielfältige Funktionen wie den Transfer von Elektronen, die Speicherung von Eisen oder die Regulation der Expression bestimmter Gene übernehmen (Johnson et al., 2005). Eisen-Schwefel-Proteine kommen in allen Domänen des Lebens vor und stellen die älteste Form einer prosthetischen Gruppe dar (Beinert, 1997). Dies würde ein evolutionär frühes Auftreten von Cystein implizieren. Interessanterweise erfordert die Synthese der FeS-Komplexe jedoch nicht zwangsläufig die Anwesenheit von Cystein. Dies wurde in methanogenen Archaeobakterien gezeigt, die strikt anaerob leben und Sulfid für die Synthese von Eisen-Schwefel-Komplexen verwenden (Liu and Wang, 2005; Liu et al., 2010). Neben FeS-Komplexen besteht die heutige Bedeutung von Cystein insbesondere in der Bildung von Disulfidbrücken, die aus der Oxidation von Cysteinresten resultieren und ein wichtiges Strukturmerkmal vieler extrazellulärer Proteine darstellen sowie die Proteinvialt erhöhen (Reddie and Carroll, 2008). Es ist jedoch nicht bekannt, wann die ersten Disulfid-tragenden Proteine evolvierten. Die Disulfid-Bildung in modernen eukaryotischen Zellen erfordert ein oxidatives Milieu (Feige and Hendershot,

2011), allerdings könnte die Oxidation von Cystein und damit die Bildung von Disulfidbrücken in einer hypothetischen Urzelle auch durch UV-Strahlung erfolgt sein. Die Redox-Reaktivität von Cystein spiegelt sich weiterhin in seiner Funktion als Baustein des Tripeptids Glutathion wider, das Teil des zellulären, antioxidativen Systems ist. Hierbei übernimmt es die Entgiftung freier Sauerstoffradikale und den Austausch von Thiolen in Disulfidbindungen (DeLeve and Kaplowitz, 1991). Als Baustein von Proteinen kann die leichte Oxidierbarkeit von Cystein jedoch negative Auswirkungen haben. So konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der Cystein-Codierung in der mitochondrialen DNA von aerob lebenden Tieren ein molekularer Indikator für Langlebigkeit darstellt: Langlebige Tiere weisen in ihren Atmungskettenkomplexen einen signifikant niedrigeren Cysteingehalt als kurzlebige Tiere auf (Moosmann and Behl, 2008). Dies wird der schädlichen Eigenschaft von Cystein-abgeleiteten Thiyl-Radikalen, eine Quervernetzung von Proteinen verursachen zu können, zugeschrieben (Giles and Jacob, 2002). Dies ist insbesondere in mitochondrialen Membranproteinen von Bedeutung, die in hohem Maße von oxidativem Stress betroffen sind (Schindeldecker et al., 2011). Aufgrund der negativen Effekte in Membranen, die durch Cystein hervorgerufen werden, ist eine Codierung dieser Aminosäure als Adaptation auf das GOE unwahrscheinlich.

Die schwefelhaltige Aminosäure Methionin ist in vielen Proteinen als wichtiges Strukturmerkmal beschrieben, wobei bisher keine essentielle Funktion der Methionin-spezifischen Thioethergruppe gezeigt werden konnte. Weiterhin ist keine katalytische Funktion von Methionin bekannt (Levine et al., 1996). Bei Methionin handelt es sich um eine reaktive Aminosäure, die durch verschiedene ROS über die Stufe des Methioninradikalkations zum Methioninsulfoxid oxidiert wird (Vogt, 1995; Chao et al., 1997; Schöneich, 2005; Xu and Chance, 2007; Pattison et al., 2012; Berlett and Levine, 2014). Die Regenerierung des Methionins erfolgt enzymatisch durch die Methioninsulfoxid-Reduktasen, die sowohl freies wie proteingebundenes Methioninsulfoxid zu Methionin reduzieren können (Weissbach et al., 2002). Aufgrund dieses Redox-Zyklus wurde für Methionin eine Funktion als Antioxidans postuliert, das durch das Abfangen von ROS die Oxidation benachbarter Moleküle, wie beispielsweise proteinassoziierter Cofaktoren, verhindert (Levine et al., 1996). Falls korrekt, ließe dies auf eine evolutionäre Bedeutung von Methionin als Antioxidans schließen. Stark untermauert wird dies durch die Betrachtung der Methionin-spezifischen Codon-Nutzung: Methionin wird im Standard-Code nur durch das

AUG-Triplett codiert. Mit Ausnahme weniger Phyla besitzen alle vielzelligen Tiere jedoch einen mitochondrialen Code, in dem neben dem AUG-Codon zusätzlich das AUA-Triplett Methionin codiert. Es handelt sich demnach um ein *Codon reassignment* von Isoleucin, das im Standard-Code durch AUA codiert wird, zu Methionin (Knight et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese zusätzliche Codon-Nutzung zu einer Akkumulation von Methionin-Resten in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran, in der in besonderem Maße ROS produziert werden, führt. Darüber hinaus konnte für diese Atmungskettenproteine ein überproportional gehäuftes Auftreten von Methionin an der Proteinoberfläche demonstriert werden. Aus beiden Aspekten wurde ein durch Methionin bedingter antioxidativer Schutz und damit ein Selektionsvorteil abgeleitet, der auf dem Evolutionsmechanismus des *Codon reassignments* beruht (Bender et al., 2008).

Selenocystein wird als 21. Aminosäure bezeichnet und kommt in allen Domänen des Lebens vor (Turanov et al., 2011). Pflanzen, Pilze und die meisten Archaeobakterien besitzen jedoch kein Selenocystein. Selenocystein wird wie Tryptophan und Methionin nur durch ein einziges Codon codiert, bei dem es sich um das UGA-Triplett, das normalerweise als Stopp-Codon fungiert, handelt. Da Selenocystein keine eigene tRNA-Synthetase besitzt, erfolgt der Aminosäureeinbau über den Prozess der prätranslationalen Synthese. Diese beginnt mit der Verknüpfung eines Serins mit einer Selenocystein-spezifischen tRNA (tRNA^{Sec}), die ein UCA-Anticodon trägt. Das tRNA-gebundene Serin wird anschließend in Selenocystein umgewandelt. Die Interpretation von UGA als Selenocystein-Codon erfolgt durch einen spezifischen Elongationsfaktor (SelB), der eine Haarnadelschleife auf der mRNA (*selenocysteine insertion sequence, SECIS*) erkennt, die tRNA^{Sec} bindet und den Einbau der Aminosäure in die naszierende Polypeptidkette veranlasst (Bröcker et al., 2014). Diese Besonderheit hinsichtlich des komplexen Einbaus mittels prätranslationaler Synthese und des äußerst seltenen Vorkommens lassen darauf schließen, dass Selenocystein erst vor kurzem in den genetischen Code aufgenommen wurde (Gladyshev and Kryukov, 2001). Selenocystein ist Bestandteil vieler Enzyme des antioxidativen Systems, wie der Glutathion-Peroxidase, der Thioredoxin-Reduktase und einiger Methioninsulfoxid-Reduktasen. Dies ist auf die hohe Redox-Aktivität des Selenocysteins zurückzuführen (Hondal et al., 2013). Daher ist davon auszugehen, dass der Einbau von Selenocystein in Proteine ebenfalls eine Adaptation auf oxidativen Stress, der durch das *Great Oxidation Event* hervorgerufen wurde, darstellte.

4.6 Alternativhypothese: Der Einbau reaktiver Aminosäuren in den genetischen Code vor dem *Great Oxidation Event*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Oxygenierung der Geobiosphäre während des GOEs, das vor etwa 2,45 Milliarden Jahren begann, zu einer massiven Produktion von ROS führte, die ein entscheidender Faktor für die Evolution des genetischen Codes darstellte (4.5). Nach dieser Hypothese wurden Aminosäuren, die in der Lage waren, mit diesen reaktiven Spezies zu reagieren, während des GOEs in den genetischen Code aufgenommen. Dies impliziert, dass sich der genetische Code weit nach der Entstehung von Leben veränderte, das vor spätestens 3,8 Milliarden Jahren seinen Anfang nahm (Mojzsis et al., 1996; Rosing, 1999). Die drei Domänen Bacteria, Archaea und Eukarya, die sämtliche Lebensformen umfassen gingen höchstwahrscheinlich aus einem gemeinsamen Urvorfahr, dem sogenannten *last universal common ancestor* (LUCA) hervor, dessen evolutionäres Alter auf etwa 3,8-3,5 Milliarden Jahre geschätzt wird (Fox et al., 1980; Koonin, 2003). Es ist nicht bekannt, in welcher Form der genetische Code und die Proteintranslation im LUCA organisiert waren. Es wird postuliert, dass es sich beim genetischen Code des LUCA um einen nahezu universellen Code handelte, der jedoch aus mehreren genetischen Codes hypothetischer zellulärer Vorläuferstadien, den *progenotes*, aus horizontalem Gentransfer hervorging (Vetsigian et al., 2006). Andererseits wird vermutet, dass der genetische Code eines gemeinsamen Vorfahren nur abiotische Aminosäuren umfasste und erst später um neue Aminosäuren erweitert wurde (Brooks et al., 2004).

Ausgehend von der in dieser Arbeit postulierten Bedeutung der Aminosäurereaktivität wäre unter der Annahme einer sehr frühen Etablierung eines (nahezu) universellen Codes ein alternatives Szenario der Evolution des genetischen Codes denkbar: Der Einbau neuer Aminosäuren in den Code erfolgte nicht während des GOE, sondern während der Evolution des LUCA als Adaptation auf Umweltbedingungen, welche die damals lebenden Organismen vor enorme Herausforderungen stellten, die womöglich denen des GOE ähnelten. Es ist plausibel anzunehmen, dass das GOE zu einer Bildung von ROS führte, die in diesem Ausmaß in der Erdgeschichte zuvor nicht erreicht worden war. Doch auch in einer präbiotischen Welt waren die Voraussetzungen für die Entstehung von reaktiven Radikalen gegeben. So konnte an mineralischen Oberflächen unter Einfluss von UV-Strahlung die Bildung von Superoxidationradikalen und Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. Die Bildung dieser Radikale erforderte interessanterweise keinen molekularen Sauerstoff und wäre somit in einer anoxischen, primordialen Welt möglich gewesen (Xu et al., 2013).

Reaktive Sauerstoffradikale können zudem bei der Photolyse von Wasser gebildet werden (Mopper and Zhou, 1990).

Neben dieser primordialen ROS-Produktion ist das Auftreten der ersten sauerstoffproduzierenden Cyanobakterien ein weiteres Ereignis, das oxidativen Stress verursacht haben könnte. Cyanobakterien evolvierten vor 3,5 bis 2,7 Milliarden Jahren und damit deutlich vor dem GOE (Brocks, 1999; Blankenship, 2010). Die um mindestens 300 Millionen Jahre verzögerte Akkumulation von Sauerstoff ist wahrscheinlich auf die Aktivität von Vulkanen zurückzuführen, die reduzierende Gase wie Wasserstoff und Methan in die Atmosphäre ausstießen, die mit Sauerstoff reagierten (Kasting et al., 1993). Es wird jedoch vermutet, dass an der Ozeanoberfläche sogenannte Sauerstoffoasen existierten, in denen Sauerstoffkonzentration von bis zu 10 μM erreicht wurden (Olson et al., 2013).

Aus diesen beiden erdgeschichtlichen Perioden einer potentiellen ROS-Produktion lässt sich somit eine Erklärung zur Evolution des genetischen Codes formulieren, die eine Alternative zu der in dieser Arbeit vorgestellten Hypothese darstellt: Der Einbau reaktiver Aminosäuren erfolgte nicht als Adaptation von Organismen während des GOEs, sondern vor über 3,5 Milliarden Jahren in einem hypothetischen Urvorfahr oder in weit vor dem GOE lebenden Cyanobakterien bzw. in anderen Prokaryoten. Doch auch nach dieser Hypothese bot sich den Organismen, die beispielsweise Tryptophan in ihren genetischen Code aufnahmen, ein Selektionsvorteil.

Doch worin bestand dieser Selektionsvorteil, wenn dieser in einer sehr frühen Phase der Evolution erfolgte? Aus den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen lässt sich vermuten, dass der Vorteil auch in diesen alternativen Fällen aus dem Schutz vor der Oxidation vulnerabler Makromoleküle, die Lipide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Proteine umfassen, hervorging. Reaktive Aminosäuren könnten in freier Form und als Bestandteil von Proteinen eine antioxidative Funktion und somit das Potential besessen haben, diese Makromoleküle vor oxidativer Schädigung zu schützen. Denkbar wäre eine Verhinderung von Peroxidationsprozessen durch reaktive Aminosäuren innerhalb der Membran, die in dieser Arbeit demonstriert werden konnte (3.4.1). Es ist jedoch nicht bekannt, ob ein hypothetischer LUCA im Besitz mehrfach ungesättigter Fettsäuren war, die Voraussetzung für die Peroxidation von Lipiden sind (Gutteridge, 1995). Von modernen Cyanobakterien hingegen ist bekannt, dass diese mehrfach ungesättigte Fettsäuren besitzen (Parker et al., 1967; Chi et al., 2008). Daraus kann ein durch Tyrosin und Tryptophan

gebotener Schutz vor Lipidperoxidation postuliert werden, der einen Selektionsvorteil für Cyanobakterien, die weit vor dem GOE lebten, darstellte.

4.7 Die Aufnahme von Tryptophan in den genetischen Code

Bei den 64-Basentriplets, die den genetischen Code bilden, handelt es sich um 61 Codons, welche die 20 Standard-Aminosäuren codieren sowie um die drei Codons UAA, UAG und UGA, die als Stopp-Codons fungieren bzw. Selenocystein und Pyrrolysin codieren. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Aminosäuren ist davon auszugehen, dass der genetische Code ursprünglich nur einen Teil der heute bekannten proteinogenen Aminosäuren umfasste und im Laufe der Evolution um neue Aminosäuren ergänzt wurde (Trifonov, 2000; Doi et al., 2005; Lu and Freeland, 2006). In verschiedenen Theorien wurden mögliche Prinzipien der Codierung der primordialen Aminosäuren und der Erweiterung des Codes postuliert (Pelc and Welton, 1966; Woese et al., 1966; Crick, 1968; Wong, 1975).

In der vorliegenden Arbeit wird ein adaptiver Mechanismus der Evolution des Codes vorgeschlagen, der sich in einer Zunahme reaktiver Aminosäuren im Laufe der Evolution widerspiegelt. Daraus ergibt sich das Postulat einer Prägung des genetischen Codes durch oxidativen Stress. Es ist jedoch unklar, wie die Evolution des Codes mechanistisch erfolgt haben könnte. Der Mechanismus der Aufnahme von Tryptophan soll anhand der Co-Evolutionstheorie (Wong, 1975) und adaptiven *Codon ambiguity*-Theorie (Schultz and Yarus, 1996) dargestellt werden.

Bei der Konstituierung des Codes könnten die Prinzipien der Komplementarität und Thermostabilität eine entscheidende Rolle gespielt haben, die zu einer Besetzung aller 64 bzw. 61 zur Verfügung stehenden Codons durch eine begrenzte Anzahl an Aminosäuren führte (Eigen and Schuster, 1977; Trifonov, 2004). Folglich konnten neue Aminosäuren wie Tryptophan nur dann in den Code aufgenommen werden, wenn sie bereits besetzte Codons übernahmen, weshalb diese als *codon capture*-Aminosäuren bezeichnet werden (Trifonov, 2004, 2009). Tryptophan ist neben Methionin die einzige Aminosäure, die ausschließlich durch ein einziges Codon (UGG) codiert wird. Dieses Codon unterscheidet sich nur in einer Base von den Stopp-Codons UAG bzw. UGA, weshalb vermutet wird, dass das Tryptophan-Codon ursprünglich ebenfalls ein Stopp-Codon darstellte (Trifonov, 2004). Dies gründet unter anderem auf Beobachtungen, nach denen die nucleären und mitochondrialen Codes einiger Spezies vom Standard-Code abweichen (Clark-Walker and Weiller, 1994; Kück et al., 2000; Knight et al., 2001). Interessanterweise handelt es sich beim *assignment* des UGA-

Stopp-Codons als Tryptophan-Codon, wie es beispielsweise im Bakterium *Mycoplasma capricolum* auftritt (Yamao et al., 1985), um die am häufigsten auftretende Divergenz des Standard-Codes (Sengupta et al., 2007). Überträgt man die vorgeschlagenen Mechanismen zur Bildung alternativer Codes (Santos et al., 2004; Ambrogelly et al., 2007) auf die Evolution des Standard-Codes, könnte der Einbau von Tryptophan wie folgt stattgefunden haben: Um das *assignment* eines hypothetischen UGG-Stopp-Codons in ein Tryptophan-Codon zu ändern, ist zunächst die Anwesenheit einer Tryptophanyl-tRNA und somit auch einer Tryptophanyl-tRNA-Synthetase erforderlich, die das UGG-Codon über ein korrespondierendes Anticodons (ACC) bindet. Außerdem ist eine Mutation des translationalen Terminationsfaktors notwendig, sodass dieser das Stopp-Codon nur zum Teil oder gar nicht als Terminationssignal erkennt. Zudem setzt das *assignment*. Das UGG-Codon hätte demnach zwei Bedeutungen annehmen können: Die Funktion als Stopp-Codon sowie die als Tryptophan-Codon, weshalb dies als *codon ambiguity* bezeichnet wird.

Auf Grundlage der Co-Evolutionstheorie hingegen ist von einem alternativen Mechanismus der Tryptophan-Inkorporation auszugehen. Diese Theorie postuliert einen Zusammenhang zwischen der Evolution des genetischen Codes und der schrittweisen Biosynthese neuer Aminosäuren, welche Codons der entsprechenden Vorläufer-Aminosäuren übernahmen und somit in den Code aufgenommen wurden. Diese Beziehung aus Vorläufer und Produkt spiegelt sich in der Ähnlichkeit genutzter Codons wider. Ein solcher Einbau beruht auf einer prätranslationalen Synthese der Produkt-Aminosäure. Diese kann unter zwei Bedingungen erfolgen: Zum einen, wenn Vorläufer und Produkt eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, die zu einer Erkennung des Produktes durch die Synthetase der Vorläufer-Aminosäure führt. Zum anderen, wenn der tRNA-gebundene Vorläufer zum entsprechenden Produkt umgesetzt wird. Beispielsweise besitzen einige gram-positive Bakterien keine Glutamyl-tRNA-Synthetase. Der Einbau von Glutamin erfolgt durch die enzymatische Umsetzung von tRNA-gebundenem Glutamat (Glutamyl-tRNA) zu Glutamin durch die Amidotransferase (Wilcox and Nirenberg, 1968). Zudem sind bis heute keine tRNA-Synthetasen bekannt, die Formyl-Methionin oder Selenocystein mit ihren spezifischen tRNAs verknüpfen, weshalb der Einbau dieser Aminosäuren ebenfalls über die prätranslationale Synthese erfolgt (Commans and Böck, 1999). Die prätranslationale Synthese und der damit verbundenen Einbau von Tryptophan in Proteine wären demnach über Serin erfolgt, das den Aminosäure-Vorläufer in der Tryptophan-Synthese bildet. Serin und Tryptophan sind damit ein Vorläufer-Produkt-Paar, was sich in der Nutzung der Codons widerspiegelt: Das

Tryptophan-Codon UGG unterscheidet sich nur um die zweite Base vom UCG-Codon des Serins. Ein weiterer Indikator für die genetische Codierung von Tryptophan über die Stufe des Serins ist die Übereinstimmung in der Sequenz der Anticodon-Schleife einer Seryl-tRNA-Form und Tryptophanyl-tRNA .

Die Theorien zur Inklusion von Tryptophan in Proteine unterscheiden sich sowohl mechanistisch als auch in ihren Auswirkungen voneinander. Unter der Voraussetzung, dass eine Änderung in der Codierung nicht zur Synthese dysfunktioneller Proteine geführt hätte, wäre der Einbau von Tryptophan als antioxidativer Aminosäure möglicherweise von Vorteil gewesen. Unter Anwendung der *Codon ambiguity*-Theorie hätten Organismen, die Tryptophan bereits vor dem GOE durch die Besetzung eines Stopp-Codons in Proteine einbauten einen Selektionsvorteil gegenüber Organismen gehabt, welche UGG ausschließlich als Stopp-Codon nutzten. Nach der Co-Evolutionstheorie wäre der Selektionsvorteil durch die Substituierung von Serin durch Tryptophan entstanden.

Die Hypothese des Auftretens von Tryptophan als moderne, proteinogene Aminosäure impliziert ein Grundprinzip, das der Evolution des genetischen Codes zugrunde liegen könnte: die zunehmende Reaktivität von Aminosäuren als Adaptation auf oxidativen Stress während des *Great Oxidation Events*.

5. Literaturverzeichnis

- Aihara, J., 1999. Reduced HOMO–LUMO Gap as an Index of Kinetic Stability for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Phys. Chem. A* 103, 7487–7495. doi:10.1021/jp990092i
- Aihara, J., 2000. Correlation found between the HOMO–LUMO energy separation and the chemical reactivity at the most reactive site for isolated-pentagon isomers of fullerenes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 3121–3125. doi:10.1039/b002601h
- Akanuma, S., Kigawa, T., Yokoyama, S., 2002. Combinatorial mutagenesis to restrict amino acid usage in an enzyme to a reduced set. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 13549–13553. doi:10.1073/pnas.222243999
- Alexander, K., Young, I.G., 1978a. Three hydroxylations incorporating molecular oxygen in the aerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* 17, 4745–4750. doi:10.1021/bi00615a023
- Alexander, K., Young, I.G., 1978b. Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* 17, 4750–4755. doi:10.1021/bi00615a024
- Allinger, N.L., 1977. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8127–8134. doi:10.1021/ja00467a001
- Ambrogelly, A., Palioura, S., Söll, D., 2007. Natural expansion of the genetic code. *Nat. Chem. Biol.* 3, 29–35. doi:10.1038/nchembio847
- Andersson, G.E., Kurland, C.G., 1991. An extreme codon preference strategy: codon reassignment. *Mol. Biol. Evol.* 8, 530–544.
- Aubert, C., Vos, M.H., Mathis, P., Eker, A.P., Brettel, K., 2000. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405, 586–590. doi:10.1038/35014644
- Barrell, B.G., Bankier, A.T., Drouin, J., 1979. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282, 189–194. doi:10.1038/282189a0
- Barzegar, A., Moosavi-Movahedi, A.A., 2011. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. *PLoS ONE* 6, e26012. doi:10.1371/journal.pone.0026012
- Beinert, H., 1997. Iron-Sulfur Clusters: Nature’s Modular, Multipurpose Structures. *Science* 277, 653–659. doi:10.1126/science.277.5326.653
- Bender, A., Hajieva, P., Moosmann, B., 2008. Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16496–16501. doi:10.1073/pnas.0802779105
- Benesch, R.E., Benesch, R., 1955. The Acid Strength of the -SH Group in Cysteine and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5877–5881. doi:10.1021/ja01627a030
- Berg, P., Offengand, E.J., 1958. An Enzymatic Mechanism for Linking Amino Acids to RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44, 78–86.
- Blankenship, R.E., 2010. Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiol.* 154, 434–438. doi:10.1104/pp.110.161687
- Bröcker, M.J., Ho, J.M.L., Church, G.M., Söll, D., O’Donoghue, P., 2014. Recoding the Genetic Code with Selenocysteine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 319–323. doi:10.1002/anie.201308584
- Brocks, J.J., 1999. Archean Molecular Fossils and the Early Rise of Eukaryotes. *Science* 285, 1033–1036. doi:10.1126/science.285.5430.1033
- Brooks, D.J., Fresco, J.R., Singh, M., 2004. A novel method for estimating ancestral amino acid composition and its application to proteins of the Last Universal Ancestor. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20, 2251–2257. doi:10.1093/bioinformatics/bth235
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U., 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch. Biochem. Biophys.* 221, 281–290.

- Byrdin, M., Eker, A.P.M., Vos, M.H., Brettel, K., 2003. Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8676–8681. doi:10.1073/pnas.1531645100
- Cadenas, E., Sies, H., 2005. Low Level Chemiluminescence of Liver Microsomal Fractions Initiated by tert-Butyl Hydroperoxide: Relation to Microsomal Hemoproteins, Oxygen Dependence, and Lipid Peroxidation. *Eur. J. Biochem.* 124, 349–356. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06599.x
- Cavosie, A.J., Valley, J.W., Wilde, S.A., E.I.M.F., 2005. Magmatic $\delta^{18}\text{O}$ in 4400–3900 Ma detrital zircons: A record of the alteration and recycling of crust in the Early Archean. *Earth Planet. Sci. Lett.* 235, 663–681. doi:10.1016/j.epsl.2005.04.028
- Chao, C.C., Ma, Y.S., Stadtman, E.R., 1997. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2969–2974.
- Chi, X., Yang, Q., Zhao, F., Qin, S., Yang, Y., Shen, J., Lin, H., 2008. Comparative Analysis of Fatty Acid Desaturases in Cyanobacterial Genomes. *Comp. Funct. Genomics* 2008, 1–25. doi:10.1155/2008/284508
- Chyba, C., Sagan, C., 1992. Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life. *Nature* 355, 125–132. doi:10.1038/355125a0
- Cianchetta, G., Stouch, T., Yu, W., Shi, Z.-C., Tari, L.W., Swanson, R.V., Hunter, M.J., Hoffman, I.D., Liu, Q., 2010. Mechanism of Inhibition of Novel Tryptophan Hydroxylase Inhibitors Revealed by Co-crystal Structures and Kinetic Analysis. *Curr. Chem. Genomics* 4, 19–26. doi:10.2174/1875397301004010019
- Clark-Walker, G.D., Weiller, G.F., 1994. The structure of the small mitochondrial DNA of *Kluyveromyces thermotolerans* is likely to reflect the ancestral gene order in fungi. *J. Mol. Evol.* 38, 593–601.
- Cockell, C.S., Raven, J.A., 2007. Ozone and life on the Archaean Earth. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 365, 1889–1901. doi:10.1098/rsta.2007.2049
- Commans, S., Böck, A., 1999. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 335–351.
- Cox, N., Jin, L., Jaszewski, A., Smith, P.J., Krausz, E., Rutherford, A.W., Pace, R., 2009. The Semiquinone-Iron Complex of Photosystem II: Structural Insights from ESR and Theoretical Simulation; Evidence that the Native Ligand to the Non-Heme Iron Is Carbonate. *Biophys. J.* 97, 2024–2033. doi:10.1016/j.bpj.2009.06.033
- Crick, F.H., 1966. Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19, 548–555.
- Crick, F.H., 1968. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38, 367–379.
- Cronin, J.R., Gandy, W.E., Pizzarello, S., 1981. Amino acids of the Murchison meteorite: I. Six carbon acyclic primary alpha-amino alkanonic acids. *J. Mol. Evol.* 17, 265–272.
- Cronin, J.R., Moore, C.B., 1971. Amino Acid Analyses of the Murchison, Murray, and Allende Carbonaceous Chondrites. *Science* 172, 1327–1329. doi:10.1126/science.172.3990.1327
- Cronin, J.R., Pizzarello, S., 1983. Amino acids in meteorites. *Adv. Space Res. Off. J. Comm. Space Res. COSPAR* 3, 5–18.
- Davidson, A.R., Lumb, K.J., Sauer, R.T., 1995. Cooperatively folded proteins in random sequence libraries. *Nat. Struct. Biol.* 2, 856–864. doi:10.1038/nsb1095-856
- DeLeve, L.D., Kaplowitz, N., 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 52, 287–305.
- Dewar, M.J.S., Zebisch, E.G., Healy, E.F., Stewart, J.J.P., 1985. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902–3909. doi:10.1021/ja00299a024
- Di Giulio, M., 2008. An extension of the coevolution theory of the origin of the genetic code. *Biol. Direct* 3, 37. doi:10.1186/1745-6150-3-37
- Dill, K.A., 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry (Mosc.)* 29, 7133–7155.

- Doi, N., Kakukawa, K., Oishi, Y., Yanagawa, H., 2005. High solubility of random-sequence proteins consisting of five kinds of primitive amino acids. *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 279–284. doi:10.1093/protein/gzi034
- Domazou, A.S., Koppenol, W.H., Gebicki, J.M., 2009. Efficient repair of protein radicals by ascorbate. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1049–1057. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.001
- Doublié, S., Bricogne, G., Gilmore, C., Carter, C.W., 1995. Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase. *Struct. Lond. Engl.* 1993 3, 17–31.
- Duan, X.-M., Song, G.-L., Li, Z.-H., Wang, X.-J., Chen, G.-H., Fan, K.-N., 2004. Accurate prediction of heat of formation by combining Hartree-Fock/density functional theory calculation with linear regression correction approach. *J. Chem. Phys.* 121, 7086–7095. doi:10.1063/1.1786582
- Dunnill, P., 1966. Triplet Nucleotide–Amino-acid Pairing; a Stereo-chemical Basis for the Division between Protein and Non-protein Amino-acids. *Nature* 210, 1267–1268. doi:10.1038/2101267a0
- Eigen, M., Schuster, P., 1977. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften* 64, 541–565.
- Eisenberg, H., Mevarech, M., Zaccai, G., 1992. Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv. Protein Chem.* 43, 1–62.
- Eisen, J.A., Hanawalt, P.C., 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.* 435, 171–213.
- Engel, M.H., Nagy, B., 1982. Distribution and enantiomeric composition of amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* 296, 837–840. doi:10.1038/296837a0
- Falkowski, P.G., 2006. Evolution. Tracing oxygen's imprint on earth's metabolic evolution. *Science* 311, 1724–1725. doi:10.1126/science.1125937
- Farquhar, J., Wing, B.A., 2003. Multiple sulfur isotopes and the evolution of the atmosphere. *Earth Planet. Sci. Lett.* 213, 1–13. doi:10.1016/S0012-821X(03)00296-6
- Feige, M.J., Hendershot, L.M., 2011. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 167–175. doi:10.1016/j.ceb.2010.10.012
- Fowden, L., 2001. Plant amino acid research in retrospect: from Chinball to Singh. *Amino Acids* 20, 217–224.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., Woese, C.R., 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209, 457–463.
- Fukui, K., 1982. Role of Frontier Orbitals in Chemical Reactions. *Science* 218, 747–754. doi:10.1126/science.218.4574.747
- Galano, A., Cruz-Torres, A., 2008. OH radical reactions with phenylalanine in free and peptide forms. *Org. Biomol. Chem.* 6, 732. doi:10.1039/b716024k
- Gebicki, J.M., Nauser, T., Domazou, A., Steinmann, D., Bounds, P.L., Koppenol, W.H., 2010. Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance. *Amino Acids* 39, 1131–1137. doi:10.1007/s00726-010-0610-7
- Gieseg, S.P., Simpson, J.A., Charlton, T.S., Duncan, M.W., Dean, R.T., 1993. Protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 4780–4786.
- Gilbert, W., 1986. Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618–618. doi:10.1038/319618a0
- Giles, G.I., Jacob, C., 2002. Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biol. Chem.* 383. doi:10.1515/BC.2002.042
- Giles, N.M., Giles, G.I., Jacob, C., 2003a. Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 1–4. doi:10.1016/S0006-291X(02)02770-5

- Giles, N.M., Watts, A.B., Giles, G.I., Fry, F.H., Littlechild, J.A., Jacob, C., 2003b. Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function. *Chem. Biol.* 10, 677–693. doi:10.1016/S1074-5521(03)00174-1
- Gladyshev, V.N., Kryukov, G.V., 2001. Evolution of selenocysteine-containing proteins: Significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *BioFactors* 14, 87–92. doi:10.1002/biof.5520140112
- Glavin, D.P., Dworkin, J.P., Sandford, S.A., 2008. Detection of cometary amines in samples returned by Stardust. *Meteorit. Planet. Sci.* 43, 399–413. doi:10.1111/j.1945-5100.2008.tb00629.x
- Gniadecki, R., Thorn, T., Vicanova, J., Petersen, A., Wulf, H.C., 2000. Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress. *J. Cell. Biochem.* 80, 216–222.
- Gorelsky, S.I., 2009. Ab initio and Semiempirical Methods, in: King, R.B., Crabtree, R.H., Lukehart, C.M., Atwood, D.A., Scott, R.A. (Eds.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Goto, Y., Klinman, J.P., 2002. Binding of dioxygen to non-metal sites in proteins: exploration of the importance of binding site size versus hydrophobicity in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 13637–13643.
- Gottfredsen, R.H., Larsen, U.G., Enghild, J.J., Petersen, S.V., 2013. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biol.* 1, 24–31. doi:10.1016/j.redox.2012.12.004
- Granold, M., Moosmann, B., Behl, C., Hajieva, P., 2010. Integral Membrane Proteins are the Predominant Site of Protein Oxidation in the Aged CNS and in Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 49, S155. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.437
- Grilj, J., Zonca, C., Daku, L.M.L., Vauthey, E., 2012. Photophysics of the galvinoxyl free radical revisited. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 6352. doi:10.1039/c2cp23577c
- Guo, Y., Shao, S., Xu, J., Shi, Y., Jiang, S., 2004. A specific colorimetric cysteine sensing probe based on dipyrromethane–TCNQ assembly. *Tetrahedron Lett.* 45, 6477–6480. doi:10.1016/j.tetlet.2004.06.109
- Gutteridge, A., Thornton, J.M., 2005. Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* 30, 622–629. doi:10.1016/j.tibs.2005.09.006
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819–1828.
- Haig, D., Hurst, L.D., 1991. A quantitative measure of error minimization in the genetic code. *J. Mol. Evol.* 33, 412–417.
- Hajieva, P., Bayatti, N., Granold, M., Behl, C., Moosmann, B., 2014. Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *J. Neurochem.* n/a–n/a. doi:10.1111/jnc.12987
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S–724S; discussion 724S–725S.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Han, T., Runnegar, B., 1992. Megascopic eukaryotic algae from the 2.1-billion-year-old neogaunee iron-formation, Michigan. *Science* 257, 232–235. doi:10.1126/science.1631544
- Hawkins, C., 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1504, 196–219. doi:10.1016/S0005-2728(00)00252-8
- Hayashi-Ishimaru, Y., Ehara, M., Inagaki, Y., Ohama, T., 1997. A deviant mitochondrial genetic code in prymnesiophytes (yellow-algae): UGA codon for tryptophan. *Curr. Genet.* 32, 296–299.
- Hayashi-Ishimaru, Y., Ohama, T., Kawatsu, Y., Nakamura, K., Osawa, S., 1996. UAG is a sense codon in several chlorophycean mitochondria. *Curr. Genet.* 30, 29–33.
- Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L., Shoe, J.L., 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* 4, 2. doi:10.1186/1471-2148-4-2
- Herrmann, K.M., Weaver, L.M., 1999. THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 473–503. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.473

- Hessen, D.O., Jeyasingh, P.D., Neiman, M., Weider, L.J., 2010. Genome streamlining and the elemental costs of growth. *Trends Ecol. Evol.* 25, 75–80. doi:10.1016/j.tree.2009.08.004
- Hoagland, M.B., Stephenson, M.L., Scott, J.F., Hecht, L.I., Zamecnik, P.C., 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 231, 241–257.
- Hohsaka, T., Sisido, M., 2002. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 809–815.
- Holland, H.D., 2006. The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 903–915. doi:10.1098/rstb.2006.1838
- Hondal, R.J., Marino, S.M., Gladyshev, V.N., 2013. Selenocysteine in Thiol/Disulfide-Like Exchange Reactions. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1675–1689. doi:10.1089/ars.2012.5013
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c
- Huber, C., Wachtershauser, G., 2006. -Hydroxy and -Amino Acids Under Possible Hadean, Volcanic Origin-of-Life Conditions. *Science* 314, 630–632. doi:10.1126/science.1130895
- Ji, J.A., Zhang, B., Cheng, W., Wang, Y.J., 2009. Methionine, tryptophan, and histidine oxidation in a model protein, PTH: Mechanisms and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 98, 4485–4500. doi:10.1002/jps.21746
- Jiménez-Montaño, M.A., 1999. Protein evolution drives the evolution of the genetic code and vice versa. *Biosystems* 54, 47–64. doi:10.1016/S0303-2647(99)00058-1
- Johnson, A.P., Cleaves, H.J., Dworkin, J.P., Glavin, D.P., Lazcano, A., Bada, J.L., 2008. The Miller Volcanic Spark Discharge Experiment. *Science* 322, 404–404. doi:10.1126/science.1161527
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., Johnson, M.K., 2005. STRUCTURE, FUNCTION, AND FORMATION OF BIOLOGICAL IRON-SULFUR CLUSTERS. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247–281. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518
- Jukes, T.H., Osawa, S., 1993. Evolutionary changes in the genetic code. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 106, 489–494. doi:10.1016/0305-0491(93)90122-L
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30.
- Kano, A., Ohama, T., Abe, R., Osawa, S., 1993. Unassigned or nonsense codons in *Micrococcus luteus*. *J. Mol. Biol.* 230, 51–56. doi:10.1006/jmbi.1993.1125
- Kasting, J.F., Egger, D.H., Raeburn, S.P., 1993. Mantle redox evolution and the oxidation state of the Archean atmosphere. *J. Geol.* 101, 245–257.
- Keefe, A.D., Miller, S.L., McDonald, G., Bada, J., 1995. Investigation of the prebiotic synthesis of amino acids and RNA bases from CO₂ using FeS/H₂S as a reducing agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11904–11906.
- Kellis, J.T., Nyberg, K., Fersht, A.R., 1989. Energetics of complementary side chain packing in a protein hydrophobic core. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 4914–4922. doi:10.1021/bi00437a058
- Klinman, J.P., 2001. How many ways to craft a cofactor? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14766–14768. doi:10.1073/pnas.011602498
- Klinman, J.P., Bonnot, F., 2014. Intrigues and Intricacies of the Biosynthetic Pathways for the Enzymatic Quinocofactors: PQQ, TTQ, CTQ, TPQ, and LTQ. *Chem. Rev.* 114, 4343–4365. doi:10.1021/cr400475g
- Knight, R.D., Freeland, S.J., Landweber, L.F., 2001. Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nat. Rev. Genet.* 2, 49–58. doi:10.1038/35047500
- Knoll, A., Javaux, E., Hewitt, D., Cohen, P., 2006. Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1023–1038. doi:10.1098/rstb.2006.1843
- Konuma, T., Sakurai, K., Goto, Y., 2007. Promiscuous binding of ligands by beta-lactoglobulin involves hydrophobic interactions and plasticity. *J. Mol. Biol.* 368, 209–218. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.077
- Koonin, E.V., 2003. Sequence - evolution - function: computational approaches in comparative genomics. Kluwer Academic, Boston.

- Koonin, E.V., Novozhilov, A.S., 2009. Origin and evolution of the genetic code: The universal enigma. *IUBMB Life* 61, 99–111. doi:10.1002/iub.146
- Kück, U., Jekosch, K., Holzamer, P., 2000. DNA sequence analysis of the complete mitochondrial genome of the green alga *Scenedesmus obliquus*: evidence for UAG being a leucine and UCA being a non-sense codon. *Gene* 253, 13–18.
- Kumar, S., Nussinov, R., 2002. Close-range electrostatic interactions in proteins. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* 3, 604–617. doi:10.1002/1439-7633(20020703)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013, 1–16. doi:10.1155/2013/162750
- Kunimoto, M., Inoue, K., Nojima, S., 1981. Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 646, 169–178.
- Kvenvolden, K., Lawless, J., Perring, K., Peterson, E., Flores, J., Ponnampereuma, C., Kaplan, I.R., Moore, C., 1970. Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* 228, 923–926.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15036–15040.
- Litwinienko, G., Ingold, K.U., 2003. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph*) in alcohols. *J. Org. Chem.* 68, 3433–3438. doi:10.1021/jo026917t
- Liu, W., Wang, J.-Y., 2005. Modifications of protein by polyunsaturated fatty acid ester peroxidation products. *Biochim. Biophys. Acta* 1752, 93–98. doi:10.1016/j.bbapap.2005.07.011
- Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Whitman, W.B., White, R.H., 2010. Cysteine is not the sulfur source for iron-sulfur cluster and methionine biosynthesis in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J. Biol. Chem.* 285, 31923–31929. doi:10.1074/jbc.M110.152447
- Longo, L.M., Blaber, M., 2012. Protein design at the interface of the pre-biotic and biotic worlds. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 16–21. doi:10.1016/j.abb.2012.06.009
- Lu, Y., Freeland, S., 2006. On the evolution of the standard amino-acid alphabet. *Genome Biol.* 7, 102. doi:10.1186/gb-2006-7-1-102
- Lu, Y., Freeland, S.J., 2008. A quantitative investigation of the chemical space surrounding amino acid alphabet formation. *J. Theor. Biol.* 250, 349–361. doi:10.1016/j.jtbi.2007.10.007
- Manhes, G., Allègre, C.J., Dupré, B., Hamelin, B., 1980. Lead isotope study of basic-ultrabasic layered complexes: Speculations about the age of the earth and primitive mantle characteristics. *Earth Planet. Sci. Lett.* 47, 370–382. doi:10.1016/0012-821X(80)90024-2
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83–95.
- Martini, M., Termini, J., 1997. Peroxy radical oxidation of thymidine. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 234–241. doi:10.1021/tx960154l
- Martins, Z., Botta, O., Fogel, M.L., Sephton, M.A., Glavin, D.P., Watson, J.S., Dworkin, J.P., Schwartz, A.W., Ehrenfreund, P., 2008. Extraterrestrial nucleobases in the Murchison meteorite. *Earth Planet. Sci. Lett.* 270, 130–136. doi:10.1016/j.epsl.2008.03.026
- Masada, S., Terasaka, K., Mizukami, H., 2007. A single amino acid in the PSPG-box plays an important role in the catalytic function of CaUGT2 (Curcumin glucosyltransferase), a Group D Family 1 glucosyltransferase from *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett.* 581, 2605–2610. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.002
- Ma, Y.-S., Chao, C.-C., Stadtman, E.R., 1999. Oxidative Modification of Glutamine Synthetase by 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 129–134. doi:10.1006/abbi.1998.1076
- McDonald, G.D., Storrie-Lombardi, M.C., 2010. Biochemical constraints in a protobiotic earth devoid of basic amino acids: the “BAA(-) world.” *Astrobiology* 10, 989–1000. doi:10.1089/ast.2010.0484

- Meierhenrich, U.J., Munoz Caro, G.M., Bredehoft, J.H., Jessberger, E.K., Thiemann, W.H.-P., 2004. Identification of diamino acids in the Murchison meteorite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 9182–9186. doi:10.1073/pnas.0403043101
- Melby, L.R., Harder, R.J., Hertler, W.R., Mahler, W., Benson, R.E., Mochel, W.E., 1962. Substituted Quinodimethans. II. Anion-radical Derivatives and Complexes of 7,7,8,8-Tetracyanoquinodimethan. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3374–3387. doi:10.1021/ja00876a029
- Miller, S.L., 1953. A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions. *Science* 117, 528–529. doi:10.1126/science.117.3046.528
- Miller, S.L., Urey, H.C., 1959. Organic compound synthesis on the primitive earth. *Science* 130, 245–251.
- Mojzsis, S.J., Arrhenius, G., McKeegan, K.D., Harrison, T.M., Nutman, A.P., Friend, C.R., 1996. Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature* 384, 55–59. doi:10.1038/384055a0
- Moncelli, M.R., Becucci, L., Nelson, A., Guidelli, R., 1996. Electrochemical modeling of electron and proton transfer to ubiquinone-10 in a self-assembled phospholipid monolayer. *Biophys. J.* 70, 2716–2726. doi:10.1016/S0006-3495(96)79841-7
- Moosmann, B., Behl, C., 2008. Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan. *Aging Cell* 7, 32–46. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00349.x
- Mopper, K., Zhou, X., 1990. Hydroxyl radical photoproduction in the sea and its potential impact on marine processes. *Science* 250, 661–664. doi:10.1126/science.250.4981.661
- Mullins, D.W., Lacey, J.C., Hearn, R.A., 1973. 5S rRNA and tRNA: Evidence for a Common Evolutionary Origin. *Nature. New Biol.* 242, 80–82. doi:10.1038/newbio242080a0
- Netto, L.E.S., de Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P.D., Cussiol, J.R.R., Discola, K.F., Demasi, M., Silva, G.M., Alves, S.V., Faria, V.G., Horta, B.B., 2007. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 146, 180–193. doi:10.1016/j.cbpc.2006.07.014
- Nichols, W.W., Murphy, D.G., Cristofalo, V.J., Toji, L.H., Greene, A.E., Dwight, S.A., 1977. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196, 60–63.
- Nirenberg, M.W., Matthaei, J.H., 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47, 1588–1602. doi:10.1073/pnas.47.10.1588
- Norris, S.R., Shen, X., DellaPenna, D., 1998. Complementation of the *Arabidopsis* pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* 117, 1317–1323.
- Oba, T., Andachi, Y., Muto, A., Osawa, S., 1991. CGG: an unassigned or nonsense codon in *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 921–925.
- Olson, S.L., Kump, L.R., Kasting, J.F., 2013. Quantifying the areal extent and dissolved oxygen concentrations of Archean oxygen oases. *Chem. Geol.* 362, 35–43. doi:10.1016/j.chemgeo.2013.08.012
- Oro, J., Kimball, A.P., 1961. Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. I. Adenine from hydrogen cyanide. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 217–227.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., Muto, A., 1992. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* 56, 229–264.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619–4626.
- Packer, L., Weber, S.U., Rimbach, G., 2001. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr.* 131, 369S–73S.
- Papentin, F., 1980. On order and complexity. I. General considerations. *J. Theor. Biol.* 87, 421–456. doi:10.1016/0022-5193(80)90230-1
- Parker, E.T., Cleaves, H.J., Dworkin, J.P., Glavin, D.P., Callahan, M., Aubrey, A., Lazcano, A., Bada, J.L., 2011. Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 Miller H₂S-rich spark discharge experiment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5526–5531. doi:10.1073/pnas.1019191108

- Parker, P.L., Van Baalen, C., Maurer, L., 1967. Fatty acids in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. *Science* 155, 707–708. doi:10.1126/science.155.3763.707
- Pearson, R.G., 1986. Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8440–8441.
- Pelc, S.R., Welton, M.G., 1966. Stereochemical relationship between coding triplets and amino-acids. *Nature* 209, 868–870.
- Poeggeler, B., Thuermann, S., Dose, A., Schoenke, M., Burkhardt, S., Hardeland, R., 2002. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* 33, 20–30.
- Poole, A.M., Logan, D.T., Sjöberg, B.-M., 2002. The evolution of the ribonucleotide reductases: much ado about oxygen. *J. Mol. Evol.* 55, 180–196. doi:10.1007/s00239-002-2315-3
- Reddie, K.G., Carroll, K.S., 2008. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 746–754. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.028
- Reichard, P., 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260, 1773–1777.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Ribas de Pouplana, L., Frugier, M., Quinn, C.L., Schimmel, P., 1996. Evidence that two present-day components needed for the genetic code appeared after nucleated cells separated from eubacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 166–170.
- Rosing, 1999. ¹³C-Depleted carbon microparticles in >3700-Ma sea-floor sedimentary rocks from west greenland. *Science* 283, 674–676.
- Sakurai, Y., Mizuno, T., Hiroaki, H., Oku, J.-I., Tanaka, T., 2005. Optimization of aromatic side chain size complementarity in the hydrophobic core of a designed coiled-coil. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* 66, 387–394. doi:10.1111/j.1399-3011.2005.00304.x
- Santos, M.A.S., Moura, G., Massey, S.E., Tuite, M.F., 2004. Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet. TIG* 20, 95–102. doi:10.1016/j.tig.2003.12.009
- Schafmeister, C.E., LaPorte, S.L., Miercke, L.J.W., Stroud, R.M., 1997. A designed four helix bundle protein with native-like structure. *Nat. Struct. Biol.* 4, 1039–1046. doi:10.1038/nsb1297-1039
- Schindeldecker, M., Stark, M., Behl, C., Moosmann, B., 2011. Differential cysteine depletion in respiratory chain complexes enables the distinction of longevity from aerobicity. *Mech. Ageing Dev.* 132, 171–179. doi:10.1016/j.mad.2011.03.002
- Schöneich, C., 2005. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1703, 111–119. doi:10.1016/j.bbapap.2004.09.009
- Schopf, J.W., 1993. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260, 640–646.
- Schopf, J.W., 2014. Geological evidence of oxygenic photosynthesis and the biotic response to the 2400–2200 ma “great oxidation event.” *Biochem. Biokhimiia* 79, 165–177. doi:10.1134/S0006297914030018
- Schultz, D.W., Yarus, M., 1996. On malleability in the genetic code. *J. Mol. Evol.* 42, 597–601.
- Sengupta, S., Yang, X., Higgs, P.G., 2007. The Mechanisms of Codon Reassignments in Mitochondrial Genetic Codes. *J. Mol. Evol.* 64, 662–688. doi:10.1007/s00239-006-0284-7
- Sessions, A.L., Doughty, D.M., Welander, P.V., Summons, R.E., Newman, D.K., 2009. The Continuing Puzzle of the Great Oxidation Event. *Curr. Biol.* 19, R567–R574. doi:10.1016/j.cub.2009.05.054
- Shang, Y.-J., Qian, Y.-P., Liu, X.-D., Dai, F., Shang, X.-L., Jia, W.-Q., Liu, Q., Fang, J.-G., Zhou, B., 2009. Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented Analogues: Influence of the Solvent, Radical, and Substitution. *J. Org. Chem.* 74, 5025–5031. doi:10.1021/jo9007095

- Shimoyama, A., Ponnamperna, C., Yanai, K., 1979. Amino acids in the Yamato carbonaceous chondrite from Antarctica. *Nature* 282, 394–396. doi:10.1038/282394a0
- Sies, H., 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058–1071. doi:10.1002/anie.198610581
- Staves, M.P., Bloch, D.P., Lacey, J.C., 1988. Evolution of *E. coli* tRNA(Trp). *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* 18, 97–105.
- Stewart, J.J.P., 2007. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* 13, 1173–1213. doi:10.1007/s00894-007-0233-4
- Sugase, K., Dyson, H.J., Wright, P.E., 2007. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* 447, 1021–1025. doi:10.1038/nature05858
- Suto, D., Ikeda, Y., Fujii, J., Ohba, Y., 2006. Structural Analysis of Amino Acids, Oxidized by Reactive Oxygen Species and an Antibody against N-Formylkynurenine. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 38, 107–111. doi:10.3164/jcbn.38.107
- Suzuki, T., Ueda, T., Watanabe, K., 1997. The “polysemous” codon—a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. *EMBO J.* 16, 1122–1134. doi:10.1093/emboj/16.5.1122
- Sverjensky, D.A., Lee, N., 2010. The Great Oxidation Event and Mineral Diversification. *Elements* 6, 31–36. doi:10.2113/gselements.6.1.31
- Syvanen, M., 2002. Recent emergence of the modern genetic code: a proposal. *Trends Genet. TIG* 18, 245–248.
- Tada, M., Kohno, M., Niwano, Y., 2010. Scavenging or Quenching Effect of Melanin on Superoxide Anion and Singlet Oxygen. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 46, 224–228. doi:10.3164/jcbn.09-84
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F., 2013. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–11. doi:10.1155/2013/251754
- Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4102–4106.
- Tieleman, D.P., Marrink, S.J., Berendsen, H.J., 1997. A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 235–270.
- Traoré, D.A.K., Ghazouani, A.E., Jacquamet, L., Borel, F., Ferrer, J.-L., Lascoux, D., Ravanat, J.-L., Jaquinod, M., Blondin, G., Caux-Thang, C., Duarte, V., Latour, J.-M., 2009. Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein. *Nat. Chem. Biol.* 5, 53–59. doi:10.1038/nchembio.133
- Trifonov, E.N., 2000. Consensus temporal order of amino acids and evolution of the triplet code. *Gene* 261, 139–151.
- Trifonov, E.N., 2004. The Triplet Code From First Principles. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 22, 1–11. doi:10.1080/07391102.2004.10506975
- Trifonov, E.N., 2009. The origin of the genetic code and of the earliest oligopeptides. *Res. Microbiol.* 160, 481–486. doi:10.1016/j.resmic.2009.05.004
- Turanov, A.A., Xu, X.-M., Carlson, B.A., Yoo, M.-H., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., 2011. Biosynthesis of Selenocysteine, the 21st Amino Acid in the Genetic Code, and a Novel Pathway for Cysteine Biosynthesis. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 2, 122–128. doi:10.3945/an.110.000265
- Turnbull, J.J., Nakajima, J. -i., Welford, R.W.D., Yamazaki, M., Saito, K., Schofield, C.J., 2004. Mechanistic Studies on Three 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases of Flavonoid Biosynthesis: ANTHOCYANIDIN SYNTHASE, FLAVONOL SYNTHASE, AND FLAVANONE 3 - HYDROXYLASE. *J. Biol. Chem.* 279, 1206–1216. doi:10.1074/jbc.M309228200
- Uchida, K., Kawakishi, S., 1993. 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett.* 332, 208–210.

- Uden, G., Bongaerts, J., 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1320, 217–234. doi:10.1016/S0005-2728(97)00034-0
- Uy, R., Wold, F., 1977. Posttranslational covalent modification of proteins. *Science* 198, 890–896. doi:10.1126/science.337487
- Valentine, J.W., 2002. P RELUDE TO THE C AMBRIAN E XPLOSION. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 30, 285–306. doi:10.1146/annurev.earth.30.082901.092917
- Vetsigian, K., Woese, C., Goldenfeld, N., 2006. Collective evolution and the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 10696–10701. doi:10.1073/pnas.0603780103
- Wächtershäuser, G., 1988. Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol. Rev.* 52, 452–484.
- Wächtershäuser, G., 1992. Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 58, 85–201. doi:10.1016/0079-6107(92)90022-X
- Wächtershäuser, G., 2006. From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1787–1806; discussion 1806–1808. doi:10.1098/rstb.2006.1904
- Walter, K.U., Vamvaca, K., Hilvert, D., 2005. An Active Enzyme Constructed from a 9-Amino Acid Alphabet. *J. Biol. Chem.* 280, 37742–37746. doi:10.1074/jbc.M507210200
- Weber, A.L., Miller, S.L., 1981. Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids. *J. Mol. Evol.* 17, 273–284. doi:10.1007/BF01795749
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St. John, G., Nathan, C., Brot, N., 2002. Peptide Methionine Sulfoxide Reductase: Structure, Mechanism of Action, and Biological Function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 172–178. doi:10.1006/abbi.2001.2664
- Wilcox, M., Nirenberg, M., 1968. Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61, 229–236.
- Woese, C.R., Dugre, D.H., Dugre, S.A., Kondo, M., Saxinger, W.C., 1966. On the fundamental nature and evolution of the genetic code. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 31, 723–736.
- Wolman, Y., Haverland, W.J., Miller, S.L., 1972. Nonprotein amino acids from spark discharges and their comparison with the murchison meteorite amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 809–811.
- Wong, J.T., 1975. A co-evolution theory of the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1909–1912.
- Wong, J.T.-F., 2005. Coevolution theory of the genetic code at age thirty. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 27, 416–425. doi:10.1002/bies.20208
- Xu, G., Chance, M.R., 2007. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem. Rev.* 107, 3514–3543. doi:10.1021/cr0682047
- Xu, J., Sahai, N., Eggleston, C.M., Schoonen, M.A.A., 2013. Reactive oxygen species at the oxide/water interface: Formation mechanisms and implications for prebiotic chemistry and the origin of life. *Earth Planet. Sci. Lett.* 363, 156–167. doi:10.1016/j.epsl.2012.12.008
- Yamao, F., Muto, A., Kawachi, Y., Iwami, M., Iwagami, S., Azumi, Y., Osawa, S., 1985. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2306–2309.
- Yoshizawa, K., 2012. An orbital rule for electron transport in molecules. *Acc. Chem. Res.* 45, 1612–1621. doi:10.1021/ar300075f
- Zaidi, K.U., Ali, A.S., Ali, S.A., Naaz, I., 2014. Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. *Biochem. Res. Int.* 2014, 1–16. doi:10.1155/2014/854687
- Zhang, G., Musgrave, C.B., 2007. Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations. *J. Phys. Chem. A* 111, 1554–1561. doi:10.1021/jp061633o

6. Zusammenfassung

Die Entstehung und Evolution des genetischen Codes, der die Nukleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt, zählen zu den größten Rätseln der Biologie. Die ersten Organismen, die vor etwa 3,8 Milliarden Jahren auf der Erde auftraten, nutzten einen ursprünglichen genetischen Code, der vermutlich ausschließlich abiotisch verfügbare Aminosäuren terrestrischer oder extraterrestrischer Herkunft umfasste. Neue Aminosäuren wurden sukzessive biosynthetisiert und selektiv in den Code aufgenommen, welcher in der modernen Form aus bis zu 22 Aminosäuren besteht. Die Ursachen für die Selektion und die Chronologie ihrer Aufnahme sind bis heute unbekannt und sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erforscht werden.

Auf Grundlage quanten-chemischer Berechnungen konnte in dieser Arbeit zunächst ein Zusammenhang zwischen der HOMO-LUMO-Energiedifferenz (H-L-Distanz), die ein inverses quanten-chemisches Korrelat für allgemeine chemische Reaktivität darstellt, und der chronologischen Aufnahme der Aminosäuren in den genetischen Code aufgezeigt werden. Demnach sind ursprüngliche Aminosäuren durch große H-L-Distanzen und neue Aminosäuren durch kleine H-L-Distanzen gekennzeichnet. Bei einer Analyse des Metabolismus von Tyrosin und Tryptophan, bei denen es sich um die beiden jüngsten Standard-Aminosäuren handelt, wurde ihre Bedeutung als Vorläufer von Strukturen ersichtlich, die sich durch eine hohe Redox-Aktivität auszeichnen und deren Synthese gleichzeitig molekularen Sauerstoff erfordert. Aus diesem Grund wurden die Redox-Aktivitäten der 20 Standard-Aminosäuren gegenüber Peroxylradikalen und weiteren Radikalen getestet. Die Untersuchungen ergaben eine Korrelation zwischen evolutionärem Auftreten und chemischer Reaktivität der jeweiligen Aminosäure, die sich insbesondere in der effizienten Reaktion zwischen Tryptophan bzw. Tyrosin und Peroxylradikalen widerspiegelte. Dies indizierte eine potentielle Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei der Konstituierung des genetischen Codes. Signifikante Mengen an ROS wurden erst zu Beginn der Oxygenierung der Geobiosphäre, die als *Great Oxidation Event (GOE)* bezeichnet wird und vor circa 2,3 Milliarden Jahren begann, gebildet und müssen zur oxidativen Schädigung vulnerabler, zellulärer Strukturen geführt haben. Aus diesem Grund wurde das antioxidative Potential von Aminosäuren beim Prozess der Lipidperoxidation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass lipophile Derivate von Tryptophan und Tyrosin befähigt sind, die Peroxidation von Rattenhirnmembranen zu verhindern und humane

Fibroblasten vor oxidativem Zelltod zu schützen. Daraus gründete sich das in dieser Arbeit aufgestellte Postulat eines Selektionsvorteils primordialer Organismen während des GOEs, die Tryptophan und Tyrosin als redox-aktive Aminosäuren in Membranproteine einbauen konnten und somit vor Oxidationsprozessen geschützt waren. Demzufolge wurde die biochemische Reaktivität als Selektionsparameter sowie oxidativer Stress als prägender Faktor der Evolution des genetischen Codes identifiziert.

7. Abstract

The origin and evolution of the genetic code which translates nucleotide sequence into amino acid sequence, is one of the greatest mysteries of biology. It is assumed that the first organisms, which appeared about 3.8 billion years ago, used only abiotic amino acids of terrestrial or extraterrestrial origin for the constitution of a primordial genetic code. During evolution, the genetic code expanded through the addition of biotic amino acids, to its modern form encoding up to 22 amino acids. The rationale for the selection of specific amino acids to build proteins, and the principles underlying the chronology of amino acid appearance remain enigmatic.

In this work, a characterization of amino acids was performed comprising quantum-chemical calculations, metabolic analyses, biochemical assays and cell culture experiments, in order to investigate the evolution of the genetic code.

In a basic quantum-chemical approach, a strong correlation could be demonstrated between the HOMO-LUMO gap which is a quantum-chemical correlate of chemical reactivity, and the chronology of amino acid appearance. Thus, primordial amino acids are characterized by large HOMO-LUMO gaps, whereas amino acids considered to be young have small energy differences between their frontier orbitals. Subsequent metabolic analysis of the last two standard amino acids, tryptophan and tyrosine, revealed that these anaerobically produced metabolites of the shikimate pathway are precursors to various molecules whose biological function consists in the transfer of electrons. Moreover, the biosynthesis of these molecules requires molecular oxygen. Therefore, the redox-activities of the 20 standard amino acids towards different radicals were tested, and a significant correlation between evolutionary appearance and reactivity towards radicals could be demonstrated, indicating a potential role of oxygen and reactive oxygen species (ROS) in the constitution of the genetic code. As the primordial production of ROS primarily resulted from the rise of molecular oxygen in the biosphere during the Great Oxidation Event 2.3 billion years ago, it is concluded that oxygen-dependent oxidative stress was a selection factor in the late phase of genetic code evolution. To test this, the antioxidant potential of amino acids was analyzed in terms of cytotoxicity and lipid peroxidation processes. It could be shown that lipophilic derivatives of tryptophan and tyrosine are indeed able to prevent the peroxidation of native lipid bilayers and to protect living cells from oxidative cell death.

In this work, it is proposed that organisms which incorporated tryptophan and tyrosine as redox-active amino acids in membrane proteins were protected from oxidative processes and

thereby possessed a selective advantage during the oxygenation of the earth. Hence, the factor “biochemical reactivity” was identified as a novel potentially decisive selection parameter for genetic code evolution.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel
1	Erdzeitalter (Äonen) und die Entstehung von Leben
2	Urey-Miller-Experiment
3	Der genetische Code und die 20 proteinogenen Standard-Aminosäuren
4	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen
5	Wobble-Basenpaarung
6	Alternative genetische Codes.
7	Mechanismen der Evolution des genetischen Codes
8	Aminosäurederivate
9	Synthese von NDo-W aus NDo-W-OEt
10	Verwendete Radikale zur Untersuchung der Aminosäurereaktivität
11	Oxidative Degradation von Fluorescein
12	Lipidperoxidation.
13	Molekulare Grenzorbitale (HOMOs und LUMOs)
14	Semi-empirisch berechnete HOMO-LUMO-Energiedifferenzen aller untersuchten Aminosäuren auf Basis des AM1-Algorithmus
15	Semi-empirisch berechnete HOMO-LUMO-Energiedifferenzen aller untersuchten Aminosäuren auf Basis des PM6-Algorithmus
16	<i>Ab initio</i> berechnete HOMO-LUMO-Energiedifferenzen aller untersuchten Aminosäuren auf Basis der Hartree-Fock-Methode.
17	Shimimatweg und Derivate von Shikimat
18	Vergleich der HOMO-LUMO-Energiedifferenzen der in Abb. 14 dargestellten Aminosäuren und der in Abb. 17 abgebildeten Derivate des Shikimats
19	HOMO- und LUMO-Energiewerte der Murchison-Meteorit-Aminosäuren, der proteinogenen Aminosäuren und der in Abb. 17 dargestellten Shikimat-Derivate
20	Reaktivität der proteinogenen Aminosäuren gegenüber Peroxylradikalen
21	Reaktivität von Aminosäuren gegenüber verschiedenen Radikalen
22	Radikalisierungsenthalpien der 20 Standard-Aminosäuren
23	Lipidperoxidation in Rattenhirnmembranen
24	Lipidperoxidation in humanen Fibroblasten
25	Vergleich zwischen Tryptophan und seinen Struktur-Analoga Benzofuranylanilin (BFA) und Benzothiophenylalanin (BTA).
26	Untersuchung der Cytoprotektivität von NDo-W, NDo-BFA und NDo-BTA in humanen Fibroblasten
27	Zusammenhang zwischen HOMO-LUMO-Energiedifferenz und Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen
28	Reaktion zwischen Tyrosin und dem Peroxylradikal
29	Reaktivität der Standard-Aminosäuren gegenüber Radikalen unterschiedlicher Elektrophilie
30	Entwicklung der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration in der Erdgeschichte.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab	Titel
1	Lipidpuffer zur Homogenisierung von Rattenhirngewebe
2	Aminosäuren des Murchison-Meteoriten in alphabetischer Reihenfolge
3	Grenzorbitalenergien und HOMO-LUMO-Differenzen der 21 proteinogenen Aminosäuren
4	Biosynthese und Redox-Eigenschaften der Shikimat-Derivate
5	Molekulare Eigenschaften von Indol, Benzofuran und Benzothiophen
6	Quantenchemische Eigenschaften von Tryptophan, BFA und BTA

8.3 Lebenslauf

8.4 Eigene Publikationen

- **Granold M**, Hajieva P, Tosa M, Irimie FD, Moosmann B (manuscript in preparation). Molecular oxygen and the modern genetic code.
- Sebastiani A, **Granold M**, Ditter A, Sebastiani P, Gölz C, Pöttker B, Luh C, Schaible EV, Timaru-Kast R, Werner C, Schäfer MK, Engelhard K, Moosmann B, Thal SC (2015). Delayed GABAA receptor activation by propofol increases brain damage, limits long-term neurofunctional recovery via p75NTR and induces calpain dependent cell death after acute brain injury in adult mice. *Crit Care Med.* (submitted).
- **Granold M**, Moosmann B, Lasarzik I, Arendt T, del Rey A, Engelhard K, Behl C, Hajieva P (2015). High membrane protein oxidation in the human cerebral cortex. *Redox-Biology* (Epub ahead of print).
- Hajieva P, Bayatti N, **Granold M**, Behl C, Moosmann B (2014). Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *J Neurochem* (Epub ahead of print).
- Ohlow MJ, **Granold M**, Schreckenberger M, Moosmann B (2012). Is the chromanol head group of vitamin E nature's final truth on chain-breaking antioxidants? *FEBS Lett.* 586(6): 711-6.
- **Granold M**, Moosmann B, Behl C, Hajieva P (2010). Integral membrane proteins are the predominant site of protein oxidation in the aged CNS and in Alzheimer's disease. 17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM) 2010, Orlando, FL, USA. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, S155.

8.5 Danksagung