

# **Evolutionäre Veränderungen in der Nutzung redox-aktiver Aminosäuren und ihre Ursachen**

**Evolutionary Variability in the Use of Redox-  
Active Amino Acids: Causes and Consequences**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Mario Schindeldecker  
geb. am 20. Dezember 1978 in Rodalben a.d. Rodalb

Mainz, 2014

**Dekan:**

**1. Gutachter:**

**2. Gutachter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2015**

## **Eidesstattliche Versicherung**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Oxidativer Stress.....	1
1.2 Mitochondrien.....	1
1.2.1 Aufbau und Funktion.....	2
1.2.2 Mitochondriale Atmungskette und oxidative Phosphorylierung.....	4
1.2.3 Abweichungen vom universellen genetischen Code.....	11
1.3 Freie Radikal-Theorie des Alterns.....	12
1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies.....	12
1.3.2 Mitochondriale Freie Radikal-Theorie des Alterns.....	14
2 Fragestellung und Ziele.....	17
3 Material.....	18
3.1 Proteindatensätze.....	18
3.1.1 Lebensdauern, Körpermassen und Proteinsequenzen untersuchter Tierarten.....	18
3.1.2 Humane Proteinsequenzen einzelner Kompartimente.....	20
3.1.3 Nukleär und mitochondrial kodierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe.....	21
3.2 Computerprogramme und Software-Pakete.....	21
3.3 Spezielle Chemikalien.....	21
3.4 Geräteliste.....	22
3.5 Zellkultur.....	23
3.5.1 Klonale Zellen.....	23
3.5.2 Primäre Zellen.....	23
3.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	23
3.7 Lösungen für biochemische und zellbiologische Assays.....	24
3.8 Puffer und Lösungen für die Protein- bzw. Lipidanalytik.....	24
3.9 Antikörper.....	27
4 Methoden.....	29
4.1 Bioinformatische Analysen.....	29
4.1.1 Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren in Proteinsequenzen.....	29
4.1.2 Identifikation von Membranbereichen.....	29
4.2 Zellkultur.....	29
4.2.1 Bestimmung des Zellalters von IMR90-Zellen.....	29

4.2.2 Zellernte und Proteinquantifizierung.....	30
4.3 Präparation von Rattenhirnlipiden.....	30
4.4 Biochemische Assays.....	31
4.4.1 TBARS-Assay der Lipidperoxidation.....	31
4.4.2 8-Isoprostan Lipidperoxidationsassay.....	31
4.4.3 Trans-Fettsäureanalyse.....	32
4.5 Zellbiologische Assays.....	33
4.5.1 MTT-Assay der Zellviabilität.....	33
4.5.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
4.5.3 Western Blot.....	34
4.5.4 Immunodetektion.....	35
4.6 Statistische Analysen.....	35
5 Ergebnisse.....	37
5.1 Analyse der differenzierten Aminosäurenutzung.....	37
5.1.1 Vergleich von peroxisomalen zu zellulären Proteinen.....	38
5.1.2 Vergleich von mitochondrialen zu zellulären Proteinen.....	39
5.1.3 Vergleich von mitochondrial kodierten zu mitochondrial lokalisierten Proteinen.....	40
5.1.4 Verhältnisse und Korrelationen der Aminosäurenutzung bei den untersuchten Tierarten .....	42
5.1.5 Nutzung von Aminosäuren in mitochondrial lokalisierten und kodierten Proteinen bei lang- und kurzlebigen Tieren.....	43
5.1.6 Spezifität der beobachteten Aminosäure Lebensdauer - Korrelationen.....	46
5.1.7 Vergleich der Aminosäurenutzung in Proteinen der Atmungskette von freilebenden, ae- roben versus parasitären, anaeroben Helminthen.....	48
5.1.8 Ranking-Analyse der beobachteten Aminosäureveränderungen in allen fünf Modellen.....	50
5.2 Spezielle Analyse der differenzierten Methioninnutzung.....	51
5.2.1 Vergleich der Methioninnutzung in verschiedenen subzellulären Bereichen.....	53
5.2.2 Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette bei 361 Tierarten.....	56
5.3 Lipophile Thiole als Modell für intramembranäre Cysteinnutzung.....	61
5.3.1 Analyse der Zellviabilität nach Applikation verschiedener Modellsubstanzen.....	61
5.3.1.1 Zellüberleben in klonalen HT22 Zellen.....	61
5.3.1.2 Zellüberleben in IMR90 Zellen.....	63
5.3.1.3 Einfluss von Antioxidantien auf die Toxizität lipophiler Thiole in IMR90 Zellen.....	66

5.3.2 Molekulare Analyse der Toxizität von Dodecanthiol auf Proteinebene.....	67
5.3.3 Molekulare Analyse der Toxizität von 12SH auf Lipidebene.....	71
5.3.4 Messung der Lipidperoxidation in IMR90 Zellen.....	73
5.3.5 Analyse der trans-Fettsäurenkonzentration in IMR90 Zellen nach Behandlung mit 12SH .....	75
6 Diskussion.....	77
6.1 Proteine in oxidativen Kompartimenten der Zelle zeigen charakteristische Aminosäurenut- zungen.....	77
6.2 Proteinogene Methioninreste wirken als strukturelle Antioxidantien.....	79
6.2.1 Methioninakkumulation tritt hauptsächlich in der Nähe der Atmungskette auf.....	81
6.2.2 Einzelsträngige RNA/DNA-bindende Proteine zeigen erhöhte Methioninspiegel.....	82
6.2.3 Anreicherung von Methionin in Komplex I spricht für einen cis-wirkenden antioxidati- ven Effekt.....	83
6.2.4 Der mitochondrial kodierte Methioningehalt bei ektothermen Tieren spiegelt die aerobe Metabolismusrate wieder.....	84
6.3. Intramembranäre Thiolgruppen besitzen eine pro-oxidative cytotoxische Redox-Chemie..	87
6.3.1 Lipophile Thiole sind cytotoxisch.....	88
6.3.2 Dodecanthiol induziert proteotoxischen Stress in IMR90-Zellen.....	89
6.3.3 Intramembranäres Cystein als Kettentransferagens.....	90
6.3.4 Dodecanthiol induziert die Isomerisierung von cis- zu trans-Fettsäuren in vivo.....	91
7 Zusammenfassung.....	95
8 Synopsis.....	96
9 Literatur.....	99
10 Appendix I.....	107
11 Appendix II.....	108
12 Appendix III.....	110
11 Lebenslauf.....	111
12 Eigene Publikationen.....	112
13 Danksagung.....	113

## Abkürzungsverzeichnis

2SH	Mercaptoethanol
4SH	1-Butanthiol
8SH	1-Octanthiol
10SH	1-Decanthiol
12SH	1-Dodecanthiol
14SH	1-Tetradecanthiol
18SH	1-Octadecanthiol
ABAM-Mix	Antibiotika-Antimykotika-Mix
AChE	Acetylcholinesterase
AA	Arachidonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
CAM	Cysteamin
CAT	<i>Catalase</i> , Katalase
CYS	Cystein
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DES	3-Mercaptopropionsäure
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMS	Dodecylmethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOH	1-Dodecanol
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
CstF	<i>cleavage stimulation factor</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETF	<i>electron transferring flavoprotein</i>
EtOH	Ethanol
FBS/FCS	<i>fetal bovine/calf serum</i> , fötales Rinderserum
FMN	Flavinmononukleotid
GRase	Glutathionreduktase

GSH	Glutathion
GPX	Glutathionperoxidase
h	<i>hours(s)</i> , Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
MAM	<i>mitochondria-associated ER-membrane</i>
MEM NEAA	<i>Minimum Essential Medium, Non-Essential Amino Acids</i>
MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i>
M	Molar
min	Minute(n)
mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
Msr	Methioninsulfoxidreduktase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUFA(s)	monounsaturated fatty acid(s), einfach ungesättigte Fettsäure(n)
mM	Millimolar
mW	Milliwatt
µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOX	NADPH-Oxidase
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
nm	Nanometer
Oxa1	<i>mitochondrial oxidase assembly protein 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PD	<i>population doublings</i>
PUFA(s)	<i>polyunsaturated fatty acid(s)</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure(n)
RHL	Rattenhirnlipide
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SRP	<i>signal recognition particle</i>

t12SH	tert-Dodecanthiol
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> , Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>trans fatty acids</i> , Transfettsäuren
TM	transmembran
TOC	$\alpha$ -Tocopherol, Vitamin E
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TRX	Thioredoxin
TWEEN	Polysorbat
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>

## 1 Einleitung

### 1.1 Oxidativer Stress

Im physiologischen Zusammenhang beschreibt die Bezeichnung „Oxidativer Stress“ eine Verschiebung des zellulären Redox-Gleichgewichts zu Gunsten des Auftretens von oxidierenden, oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gegenüber der Fähigkeit des Organismus, diese Metaboliten zu detoxifizieren oder die daraus entstandenen Schäden zu reparieren (Sies, 1986). Oxidativer Stress wird durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt, zu denen zum Beispiel Sauerstoffradikale und Peroxide gehören. Oxidativer Stress kann sowohl bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und der zerebralen Ischämie, als auch bei Krankheiten wie Arteriosklerose beobachtet werden (Halliwell and Gutteridge, 1999). In all diesen Erkrankungen wird die Zunahme von endogenen ROS als Auslöser oder zumindest als ein wesentlicher krankheitsfördernder Faktor diskutiert. Um den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies an pathologischen Prozessen und dem Prozess des Alterns zu verstehen, sind Kenntnisse über die Reaktivität und Herkunft dieser Substanzen nötig. Da die Mitochondrien als Hauptbildungsort für ROS gelten, werden diese im Folgenden bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Funktion näher beleuchtet.

### 1.2 Mitochondrien

Diese ellipsoiden, gelegentlich auch kugelförmigen Organellen haben einen Durchmesser von 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ , eine Länge von 2-4  $\mu\text{m}$ , kommen in fast allen eukaryotischen Zellen vor und dienen dort der Produktion von energiereichem Adenosintriphosphat (ATP). Nach der Endosymbionten-Theorie zufolge invaginierte ein  $\alpha$ -Proteobakterium (Sagan, 1967) in eine eukaryotische Vorläuferzelle und entwickelte sich dort zu den rezenten Mitochondrien, welche in der Lage sind, ATP unter Verwendung von Sauerstoff zu synthetisieren. Diese so genannte mitochondriale Atmungskettenphosphorylierung erzeugt laut Literatur ungefähr 30 Moleküle ATP pro Molekül Glucose (Rich, 2003) - die Glykolyse im Vergleich dazu nur zwei Moleküle ATP. Sie ist somit die wichtigste Quelle von ATP in aeroben, eukaryotischen Zellen und ist daher essentiell für jegliche Lebensvorgänge (Scheffler, 2008).

Als eine weitere Besonderheit besitzen Mitochondrien ein eigenes Genom, die so genannte mitochondriale DNA (mtDNA), die beim Menschen für zwei rRNAs, 13 Proteinuntereinheiten der At-

mungskette und 22 tRNAs kodiert. Dieses Genom ist als eine zirkuläre doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) organisiert und befindet sich innerhalb der mitochondrialen Matrix an die innere Membran angelagert (Albring et al., 1977). Eukaryotische Zellen können hundert bis mehrere tausend Kopien dieser Erbinformation enthalten (Bogenhagen and Clayton, 1974), wobei pro Mitochondrium 10 bis 15 Kopien der mtDNA vorkommen können. Mitochondrien besitzen aufgrund ihrer Herkunft zwei Membranen und bilden damit fünf mitochondriale Kompartimente.

### 1.2.1 Aufbau und Funktion

Die ungefaltete äußere Mitochondrienmembran setzt sich aus Phospholipiden und Proteinen in einem Verhältnis von etwa 1:1 zusammen und umschließt die ganze Organelle. Damit grenzt sie das Cytosol von dem Intermembranraum ab. Zahlreiche integrale Proteine, so genannte Porine, bilden Kanäle durch die Membran. Diese dienen der freien Diffusion von Molekülen und Ionen, wobei Moleküle, die größer sind als 5000 Dalton, nicht passieren können (Alberts, 2002; Vander Heiden et al., 2001). Zur Translokation vom Cytosol durch die äußere Membran benötigen größere Proteine eine N-terminale Signalsequenz (MTS), die mit der Translokase der äußeren Membran (TOM) interagiert (Herrmann and Neupert, 2000). Kleinere Intermediärprodukte der Atmungskette können jedoch frei durch die Porine wandern.

Über einen temporären Zusammenschluss ihrer Membranen können Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum eine Art Membrannetzwerk bilden (MAM), das für den Austausch von Signalmolekülen und Lipiden erforderlich ist (Hayashi et al., 2009).

Der zwischen Außen- und Innenmembran liegende Intermembranraum besitzt aufgrund der freien Diffusionsmöglichkeit kleiner Moleküle die gleiche Konzentration an Ionen und Zucker wie das Cytosol (Alberts, 2002). Unterschiede sind in den Konzentrationen größerer Moleküle zu beobachten, welche eine Signalsequenz zum Import in den Intermembranraum benötigen und dadurch in diesem Kompartiment fixiert werden können, wie z.B. die Adenylat-Kinase, Creatin-Kinase oder Cytochrome *c* (Chipuk et al., 2006).

In der inneren Mitochondrienmembran sind im wesentlichen fünf verschiedene Klassen von Proteinen lokalisiert, die sich durch ihre Funktion unterscheiden: Proteine der oxidativen Phosphorylierung, ATP-Synthasen, Transport-Proteine, Peptide der Protein-Import-Maschinerie und Proteine zur Fusion und Spaltung von Mitochondrien. Sie ist auch quantitativ stark mit Proteinen angereichert und weist ein sehr hohen Protein-zu-Phospholipid-Gewichtsverhältnis von 3:1 auf. Dies bedeutet,

dass auf ein Protein etwa 15 Phospholipide kommen, und dass rund ein fünftel der gesamten mitochondrialen Proteine in der inneren Membran lokalisiert sind (Alberts, 2002). Als Lipid-Hauptbestandteil der inneren Membran kommt vor allem Cardiolipin, ein ungewöhnliches Phospholipid, vor, welches charakteristisch für mitochondriale und bakterielle Plasmamembranen ist (McMillin and Dowhan, 2002). Im Gegensatz zu anderen Phospholipiden enthält Cardiolipin vier anstelle von zwei Fettsäuren, die sowohl einfach als auch zweifach ungesättigt sein können (Schlame et al., 1993), und es ist für die spezifische Ionenundurchlässigkeit der Membran verantwortlich. Cardiolipin ist außer in der inneren Membran der Mitochondrien nur bei Prokaryoten zu finden, was neben der ringförmigen mtDNA und anderen Faktoren einen weiteren Hinweis auf einen prokaryotischen Vorläufer darstellt (Munk and Abröhl, 2008). Dieses Phospholipid ist das einzige, welches im Mitochondrium selbst synthetisiert wird. Im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran sind in der inneren Membran keine Porine eingelagert, und sie ist für alle Moleküle undurchlässig. Daher sind fast alle Ionen und Moleküle beim Eindringen oder Verlassen der mitochondrialen Matrix auf spezielle Transporter angewiesen. Der Proteinimport wird im Allgemeinen über die Translokase der inneren Membran (TIM) oder über Oxa1 gesteuert (Herrmann and Neupert, 2000). Zwischen dem Intermembranraum und der Matrix besteht ein elektrochemisches Membranpotential, das durch die Enzyme der Atmungskette gebildet und aufrecht gehalten wird.

Bezüglich der Morphologie der Invagination der inneren Mitochondrienmembran unterscheidet man drei Typen von Mitochondrien: Cristae-, Tubuli- und Sacculi-Typ. Der Cristae-Typ ist durch zahlreiche Einstülpungen an der inneren Membran gekennzeichnet. Durch diese Faltungen wird die Oberfläche der inneren Membran, an der chemische Reaktionen stattfinden können, erheblich vergrößert, was zu einer beschleunigten ATP-Produktion führt. Große Proteinkomplexe der Atmungskette, welche für die ATP-Gewinnung zuständig sind, sind in der inneren Membran dieses Typs lokalisiert. Der Tubuli-Typ, bei dem die innere Mitochondrienmembran Röhren ausbildet, ist in steroidproduzierenden Zellen zu finden (Munk and Abröhl, 2008). Liegen schlauchförmige Invaginationen mit perlenartigen runden Aussackungen vor, spricht man vom Sacculi-Typ. In der Morphologie der Mitochondrien manifestiert sich eine Gewebs- und Nutzungsspezifität; so besitzt die innere Membran in Mitochondrien einer Leberzelle eine bis zu fünfmal größere Fläche als die äußere Membran. Je nach Stoffwechsellage und ATP-Bedarf variiert dieses Verhältnis, was in beanspruchten Muskelzellen mit einem erhöhten Auftreten von Cristae einhergeht. Die Innenseiten der Cristae sind mit den so genannten F<sub>1</sub>-Partikeln, Elementarpartikeln oder ATP-Synthase-Partikeln besetzt, die einen Durchmesser von 8,5 nm besitzen. In diesen Partikeln findet im Zuge der Zellatmung die

ATP-Synthese statt. Die Invaginationen der inneren Membran sind also nicht zufällig, sondern reguliert und können einen Einfluss auf die chemiosmotische Funktion der Atmungskette haben (Mannella, 2006).

Die Matrix wird von der inneren Mitochondrienmembran umschlossen und ist mit der internen viskösen Flüssigkeit des Mitochondriums gefüllt (Dieteren et al., 2011). Zwei Drittel aller mitochondrialen Proteine kommen in diesem Kompartiment vor (Alberts, 2002), deshalb ist im Allgemeinen die Proteinkonzentration in der Matrix gegenüber dem Cytosol besonders hoch. Neben den Proteinen des Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation enthält die Matrix spezielle, mitochondriale Ribosomen, tRNAs und 10 bis 15 Kopien des mitochondrialen Genoms. Durch Lokalisation des Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation innerhalb der Matrix, ist hier die Konzentration an Intermediaten dieser beiden Stoffwechselwege sehr hoch.

Durch diese zwei Stoffwechselwege, werden die so genannten Reduktionsäquivalenten oder Coenzyme NADH und  $\text{FADH}_2$  hergestellt. Diese dienen der mitochondrialen Atmungskette als Elektronendonator. NADH kann darüber hinaus auch durch den Abbau der Aminosäure Tryptophan oder direkt in der Glykolyse gewonnen werden. FAD kann im Gegensatz zu  $\text{NAD}^+$  einzelne Elektronen übertragen, dadurch können Oxidoreduktasen mittels FAD molekularen Sauerstoff aktivieren. Diese beiden energiereichen reduzierten Coenzyme geben unter Reaktion mit z.B. einer Dehydrogenase Elektronen ab. Im Falle des Mitochondriums bewirkt die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  und leitet danach die Elektronen über Eisen-Schwefel-Cluster innerhalb des Komplexes weiter. FAD ist als prosthetische Gruppe ein Teil der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), welche im sechsten Schritt des Citratzyklus Succinat zu Fumarat oxidiert. Die Wasserstoffe von  $\text{FADH}_2$  liegen in der mitochondrialen Matrix, währenddessen FAD fest mit Succinat-Dehydrogenase verbunden ist. So wird gewährleistet, dass die so gewonnenen Elektronen in die Elektronentransportkette fließen.

### **1.2.2 Mitochondriale Atmungskette und oxidative Phosphorylierung**

In eukaryotischen Zellen ist der Ort der oxidativen Phosphorylierung, also der Ort der größten ATP-Produktion, die mitochondriale Atmungskette, welche in die innere Mitochondrienmembran eingelagert ist (Abbildung 1 und 2). Die fünf verschiedenen Atmungskettenkomplexe sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut, von denen ein Teil im mitochondrialen Genom, und der andere in der nukleären DNA kodiert ist (Tabelle 1). Innerhalb dieser Komplexe kann zwischen katalytischen und

akzessorischen Untereinheiten unterschieden werden, wobei der Mehrzahl der mitochondrial kodierten Untereinheiten eine katalytische Funktion zugeschrieben wird. Wegen der Einlagerung in die innere Membran ist der Membrananteil dieser Proteine besonders hoch (Abbildung 1) und liegt bei Homo sapiens in allen Proteinen der Atmungskette bei 14 %, in den mitochondrial kodierten Proteinen sogar bei 53 % (Schindeldecker et al., 2011).

Untereinheiten	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V
nDNA-kodiert	≥38	4	10	10	12
mtDNA-kodiert	7	0	1	3	2

Tabelle 1: Anzahl der nukleär und mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette bei Homo sapiens.

Die mitochondriale Atmungskette stellt eine Elektronentransportkette dar und ist aus einer Reihe hintereinander geschalteter redox-aktiver Proteinkomplexe aufgebaut, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in der Lage sind Elektronen aufzunehmen bzw. abzugeben. Über die Elektronentransportkette werden Elektronen von niedrigeren Redoxpotentialen auf höhere weitergeleitet, wobei sich am Ende eine Verdoppelung des Redoxpotentials ergibt.

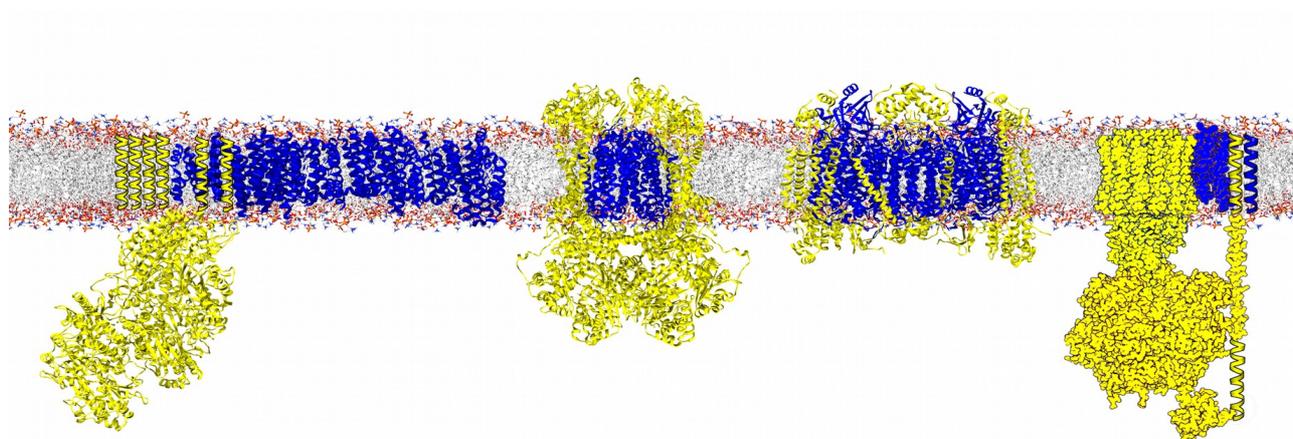


Abbildung 1: Mitochondriale Atmungskettenkomplexe und innere Mitochondrienmembran. Von links nach rechts: Komplex I, Komplex III, Komplex IV und Komplex V. Gelb sind die nukleär und blau die mitochondrial kodierten Untereinheiten dargestellt. Grafik aus Schindeldecker et al., 2011.

Neben den Komplexen I bis V, sind auch die mobilen Wasserstoff- bzw. Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom *c* an der Atmungskette beteiligt. Cytochrom *c* ist ein kleines basisches Protein, das ein kovalent gebundenes Häm *c*-Zentrum als prosthetische Gruppe trägt. Als gemeinsames Charakteristikum aller Cytochrome kann das zentrale Eisenatom der Hämgruppe durch Redoxreak-

tionen zwischen  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  ein Elektron aufnehmen und wieder abgeben. Dabei ist Cytochrom c lose mit der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran assoziiert und dient als Elektronenüberträger zwischen Komplex III und Komplex IV. Ubichinon ist ein extrem hydrophobes Isoprenoid, dessen Kopfgruppe durch den Wechsel zwischen der oxidierten Chinon- und der reduzierten Hydrochinon-Form zwei Elektronen aufnehmen und wieder abgeben kann. Im Gegensatz zu Cytochrom c müssen bei vollständiger Reduktion von Ubichinon gleichzeitig zwei Protonen zur Kompensation der Ladung aufgenommen werden (Crane, 2001). Dieses generelle Prinzip der Kopplung einer Redoxreaktion an eine Protonenaufnahme bzw. -abgabe wird von Komplex III benutzt, um Protonen in den Intermembranraum zu transportieren. Das Ubichinon diffundiert nach der klassischen Theorie frei in der inneren Mitochondrienmembran, nimmt Elektronen von allen Dehydrogenasen auf und überträgt sie auf den Komplex III. So treffen beim Ubichinon alle Redoxäquivalente aus den verschiedenen Eingangsrouten zusammen. Da Ubichinon im stöchiometrischen Überschuss vorliegt, dient es als Redoxpuffer zwischen den verschiedenen Dehydrogenasen. Deshalb spricht man in diesem Fall von einer Poolfunktion des Ubichinons. Eine neuere, alternative Theorie geht davon aus, dass die Atmungskettenkomplexe I bis IV nicht einzeln in der inneren Membran vorliegen, sondern in sogenannten Superkomplexen organisiert sind (Schägger, 2001). Dadurch kann die Diffusionsstrecke der Intermediate klein gehalten werden, was die Effizienz der Atmungskette steigert.

Komplex I oder NADH-Dehydrogenase ist der größte Enzymkomplex (940 kDa) der Atmungskette und oxidiert das vor allem im Citratzyklus, in der  $\beta$ -Oxidation und durch die Pyruvatdehydrogenase produzierte NADH und reduziert gleichzeitig das in der inneren Mitochondrienmembran befindliche Ubichinon (Abbildung 2). Die freiwerdende Redoxenergie wird zum Transport von vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt. Von den 42 Untereinheiten bei *Homo sapiens* werden sieben durch das mitochondriale Genom kodiert. Diese bilden den Kernkomplex des Enzyms und sind im besonderen Maße hydrophob. Die nukleär kodierte Untereinheiten bilden den peripheren Arm des Komplexes, welcher in die Matrix hineinragt (Sazanov et al., 2013). In diesem liegen das Coenzym FMN und acht Eisen-Schwefel-Cluster. Es wird angenommen, dass FMN durch Hybrid-Transfer beide Elektronen gleichzeitig vom NADH übernimmt und diese einzeln auf eine lineare Kette aus sieben der acht zwei- und vierkernigen Eisen-Schwefel-Cluster überträgt. Am Ende dieser Kette werden die Elektronen an Ubichinon weitergegeben, was mit einer Aufnahme von zwei Protonen aus der Matrix verbunden ist (Brandt, 2006).

Komplex II oder Succinat-Dehydrogenase ist der kleinste Komplex der Atmungskette (140 kDa bei

Homo sapiens); er besteht bei Säugetieren aus nur vier Untereinheiten welche alle im nukleären Genom kodiert sind (Apweiler et al., 2004; Abbildung 2). Dieser Komplex ist formal in den Citratzyklus integriert. Das produzierte Reduktionsäquivalent  $\text{FADH}_2$  überträgt seine Elektronen im selben Enzymkomplex weiter auf Ubichinon, was zur Bildung von Ubihydrochinon führt, wobei diesmal aber keine Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden. Mechanistisch wird der Transport der Elektronen also wiederum von einem Flavin koordiniert, welches ein Elektronenpaar aufnimmt und sukzessive auf das erste einer Kette von drei Eisen-Schwefel-Clustern überträgt.

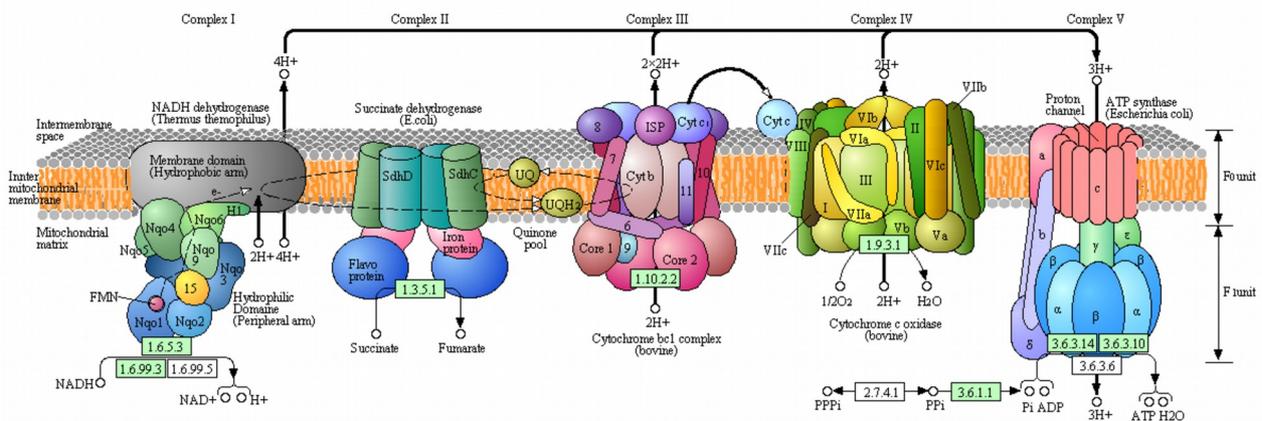


Abbildung 2: Oxidative Phosphorylierung in der mitochondrialen Elektronentransportkette (Kanehisa Laboratories; www.kegg.jp)

Neben der NADH-Dehydrogenase existieren noch andere Dehydrogenasen, die Reduktionsäquivalente in die Atmungskette einschleusen und ein Flavin als Elektronenüberträger nutzen. Da die prosthetische Gruppe  $\text{FADH}_2$  nicht frei diffundieren kann, reduziert die Acyl-CoA-Dehydrogenase der  $\beta$ -Oxidation zuerst ein kleines Überträgerprotein, das ETF (*electron transferring flavoprotein*). Dieses Flavoprotein wird von der ETF:Ubichinon-Oxidoreduktase oxidiert, die danach, wiederum unter Beteiligung eines Eisen-Schwefel-Clusters, Ubichinon reduziert. Eine weitere Dehydrogenase ist die Glycerophosphat:Ubichinon Oxidoreduktase (Glycerophosphat-Dehydrogenase), welche ermöglicht, cytoplasmatische Reduktionsäquivalente in die Atmungskette zu übertragen. Im Cytoplasma wird Dihydroxyacetonphosphat durch die cytoplasmatische Glycerophosphat-Dehydrogenase ( $\text{GPDH}_C$ ) unter Verwendung von NADH zu  $\alpha$ -Glycerophosphat reduziert. Die Reoxidation dieses Moleküls wird durch die mit der inneren Mitochondrienmembran assoziierte Glycerophosphat-Dehydrogenase ( $\text{GPDH}_M$ ) FAD-abhängig bewerkstelligt, wobei Ubichinon zu Ubihydrochinon reduziert wird (Löffler, 2007).

In den Mitochondrien von Säugetieren kann Ubihydrochinon enzymatisch ausschließlich durch den Komplex III, die sogenannte Cytochrom-*c*-Reduktase oder den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex, reoxidiert werden. In Mitochondrien von Säugetieren ist der Komplex III aus 11 Untereinheiten aufgebaut, von denen drei den katalytischen Kern bilden (Abbildung 2). Dabei wird das sehr hydrophobe Cytochrom *b* vom mitochondrialen Genom kodiert und trägt zwei Häm *b*-Zentren (Häm  $b_L$  und Häm  $b_H$ ), die einen Elektronentransportweg über die Membran ausbilden. Das Häm *c*-Zentrum von Cytochrom  $c_1$  liegt genauso wie der zweikernige Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins in einer peripheren Domäne auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Mitochondrienmembran. Der Mechanismus des Protonentransports läuft in Komplex III über den sogenannten Ubichinon-Zyklus (Q-Zyklus) ab, wobei hier das Prinzip der Ladungskompensation zum Tragen kommt. So besitzt Komplex III zwei aktive Zentren, ein Ubihydrochinon-Oxidationszentrum auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Mitochondrienmembran, und ein Ubichinon-Reduktionszentrum auf der Matrixseite. Da diese zwei Zentren über die beiden Häm *b*-Gruppen miteinander verbunden sind, können Elektronen, die auf der einen Seite durch Oxidation freigesetzt werden, auf der anderen Seite zur Reduktion benutzt werden, wobei gleichzeitig ein Ladungstransport über die Membran stattfindet. Da der Wechsel zwischen Oxidation und Reduktion von Ubichinon mit einer Protonenabgabe bzw. -aufnahme gekoppelt ist, können so netto Protonen über die Membran transportiert werden, ohne dass sie im eigentlichen Sinne gepumpt werden. Angetrieben wird dieser Ladungstransport dadurch, dass die Elektronen, die auf das Cytochrom *b* übertragen werden sollen, zunächst auf ein höheres Energieniveau gebracht werden. Dies geschieht mittels einer Art „Redox-Wippe“ dadurch, dass jeweils das erste Elektron des Ubihydrochinons in einer exergonen Reaktion auf das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein übertragen wird, wodurch ein stark reduzierendes Ubisemichinon entsteht, das dann Cytochrom *b* reduzieren kann. Diese Verzweigung im Elektronentransport und die Rückübertragung jedes zweiten Elektrons auf ein Ubichinon im Reduktionszentrum bedingt, dass in einem vollständigen Zyklus zwei Moleküle Ubihydrochinon auf der cytoplasmatischen Seite oxidiert und ein Molekül Ubichinon auf der Matrixseite reduziert werden müssen, um netto die Oxidation von einem Ubihydrochinon zu ergeben (Crofts, 2004).

Komplex IV der Atmungskette, oder auch Cytochrom *c*-Oxidase genannt, überträgt Elektronen von Cytochrom *c* auf Sauerstoff, wobei Wasser entsteht. Zeitgleich werden je Sauerstoffatom zwei Protonen über die Membran befördert (Abbildung 2). Da die Wasserbildung zwei zusätzliche Protonen benötigt, werden diese von der Matrixseite her aufgenommen. Da dieser Aufnahme von zwei Protonen die Abgabe von zwei Elektronen durch Cytochrom *c* auf der anderen Seite der Membran gegen-

übersteht, ergibt sich ein vektorieller Transport von zwei weiteren Ladungen über die innere Mitochondrienmembran. Die Protonenbilanz wird formal durch die beiden Protonen des Komplex III ausgeglichen. So pumpt die Cytochrom *c*-Oxidase vier Ladungen für jedes reduzierte Sauerstoffatom in den Intermembranraum. In Mitochondrien von Säugetieren ist die Cytochrom *c*-Oxidase aus 13 Untereinheiten aufgebaut, von denen drei den katalytischen Kern bilden und im mitochondrialen Genom kodiert sind. Zwei dieser mitochondrial kodierten Untereinheiten tragen die Redoxzentren, so dass sich die Bindungsstelle für Cytochrom *c* und ein zweikerniges, mit Cu<sub>A</sub> bezeichnetes Kupferzentrum in der Untereinheit 2 befinden. Da das Kupferzentrum, ähnlich wie ein Eisen-Schwefel-Cluster, nur ein Elektron auf- und wieder abgeben kann, fließen die Elektronen über das Häm a-Zentrum der Untereinheit 1 auf das sogenannte binukleäre Zentrum. Häm a<sub>3</sub> und eines als Cu<sub>B</sub> bezeichnetes Kupferatom bilden das binukleäre Zentrum, welches die Reduktionsstelle für den Sauerstoff ist und sich ebenfalls in Untereinheit 1 befindet. Zu erwähnen ist, dass der Sauerstoff erst binden kann, nachdem das binukleäre Zentrum mit vier Elektronen besetzt ist. So kann das Sauerstoffmolekül sehr schnell durch vier Elektronen reduziert und in seine beiden Einzelatome gespalten werden ohne dass ein Peroxidintermediat entstehen. Dieser Mechanismus verhindert effektiv, dass schädliche Superoxid-Radikale entstehen können (Voet, 2011).

Durch das Wirken der einzelnen Komplexe ergibt sich eine Pumpleistung von insgesamt 10 Protonen pro oxidiertem NADH über die innere Mitochondrienmembran. Werden die Elektronen über den Komplex II und die alternativen Dehydrogenasen eingeschleust, wobei Komplex I übergangen wird, gelangen nur sechs Protonen in den Intermembranraum (Löffler, 2007).

Dieser elektrochemische Protonengradient (*proton motive force*) wird nach der chemiosmotischen Theorie zur Produktion von ATP verwendet (Mitchell, 1961), wobei diese Aufgabe von der ATP-Synthase, auch Komplex V oder F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATP-Synthase genannt, übernommen wird. Rechnerisch müssen nach heutigem Wissen pro gebildetem ATP 3 1/3 Protonen zurück in die Matrix fließen (Löffler, 2007). Diese Zahl hat direkte Konsequenzen für die Energiebilanz der Atmungskettenphosphorylierung und damit auch der aeroben Glykolyse und wird durch die Struktur und dem Mechanismus der ATP-Synthase erklärt. Komplex V ist aus 16 Untereinheiten aufgebaut, wovon zwei mitochondrial kodiert werden (Abbildung 2). Grob können zwei Bereiche unterschieden werden: einen membranständigen F<sub>0</sub>-Teil, durch den die Protonen fließen, und einen in die Matrix hineinragenden F<sub>1</sub>-Teil, welcher die Nucleotid-Bindungsstellen besitzt. Ein peripherer Stil verbindet den F<sub>0</sub>- mit dem F<sub>1</sub>-Teil, und ein weiterer zentraler Stil ragt bis in die Spitze des F<sub>1</sub>-Teils. Während der isolierte F<sub>1</sub>-Teil alleine in der Lage zur ATP-Hydrolyse ist, ist nur der vollständige F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub>-Komplex zur ATP-

Synthese bzw. der Umkehrung dieser Reaktion, dem ATP-getriebenen Pumpen von Protonen, fähig. Der membranäre Rotor der ATP-Synthase setzt sich aus einem Ring aus c-Untereinheiten im  $F_0$ -Teil und dem zentralen Stil aus den Untereinheiten  $\gamma$  und  $\epsilon$  zusammen. Jede dieser c-Untereinheiten trägt einen essentiellen Asparaginsäure-Rest im hydrophoben Bereich. Es wird angenommen, dass immer eine dieser sauren Gruppen durch die a-Untereinheit maskiert wird. Zudem besitzt die Untereinheit a zwei Protonenkanäle, die Protonen an die saure Gruppe heran und wieder wegführen können. Damit induziert ein Proton, welches sich durch diese Kanäle von einer Seite der Membran zur anderen bewegt, das Weiterrücken des Rings um eine c-Untereinheit, was eine Drehbewegung zur Folge hat, die über den zentralen Stil in den  $F_1$ -Teil übertragen wird. Die Funktionsweise des  $F_0$ -Teils entspricht damit der eines Flagellenmotors, welcher auch durch einen Protonengradienten angetrieben wird (Löffler, 2007; Nakamoto et al., 2008).

Diese induzierte Rotationsbewegung kann über Konformationsänderungen im  $F_1$ -Teil zur Ausbildung einer energiereichen Phosphorsäureanhydrid-Bindung genutzt werden. Jeder  $F_1$ -Teil, der aus drei  $\alpha$ - und drei  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut ist, besitzt drei katalytische Zentren, die in drei verschiedenen Konformationen vorliegen. In der L-Form wird ADP und Phosphat an das Zentrum gebunden, während in der O-Form die Affinität sowohl für  $ADP+P_i$  als auch für ATP gering ist. Die dritte Konformation ist entscheidend für die Bildung der Phosphorsäureanhydrid-Bindung des ATP. Diese so genannte T-Form, die während der ATP-Synthese aus der mit ADP und  $P_i$  beladenen L-Form entsteht, bindet ATP mit sehr hoher Affinität, was seine Bildung aus  $ADP+P_i$  fördert. Zusätzlich wird in dieser Konformation Wasser aus der Bindungstasche verdrängt, was die Reaktion ebenfalls in Richtung Kondensation verschiebt. Auf Grund der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion bildet sich in der T-Form unter diesen Bedingungen ATP praktisch spontan. Dies bewirkt jedoch eine sehr feste Bindung des ATP an die T-Form, die nur durch Einsatz von Energie wieder gelöst werden kann. Diese Energie wird durch den Übergang der T-Form in die O-Form erreicht, welche eine geringe Affinität zur ATP hat. Da sich jeweils in der L-, O- und T-Form ein katalytisches Zentrum befindet, werden bei jeder vollständigen Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit drei ATP synthetisiert (Löffler, 2007; Nakamoto et al., 2008).

### 1.2.3 Abweichungen vom universellen genetischen Code

In den Mitochondrien von Tieren liegt das mitochondriale Genom als ein einzelnes zirkuläres Molekül mit einer durchschnittlichen Länge von 16 kB vor und trägt kodierende 37 Gensequenzen. 1979

wurde erkannt, dass das humane mitochondriale Genom einen alternativen genetischen Code gegenüber dem Nukleus verwendet (Barrell et al., 1979). Ähnliche Unterschiede sind bei vielen Tieren zu beobachten, wobei diese zwischen verschiedenen Tierstämmen variieren können. Im Standardcode kodieren die Codons AGA und AGG für Arginin, im Mitochondrium der Säugetiere aber fungieren diese als Stopp-Codons. In Invertebraten kodieren diese zwei Codons für die Aminosäure Serin. Die Tatsache, dass AUA anstatt Isoleucin für Methionin, und UGA anstatt einer Stoppfunktion für Tryptophan kodiert, ist sowohl bei Mammalia, Invertebraten und Pilzen anzutreffen (Knight et al., 2001). Manche dieser Änderungen werden mit einer evolutionären Adaptation an veränderte Lebensbedingungen in Verbindung gebracht, da sie mit anderen Aminosäurehäufigkeiten einhergehen (Bender et al., 2008). Die Nutzung von Methionin anstatt Isoleucin stört aufgrund der annähernd gleichen Form und Größe dabei nicht die strukturelle Integrität des jeweiligen Proteins. Speziell wird gezeigt, dass alle höheren Tierarten, im Unterschied zu niederen Arten, zwei Codons für Methionin in ihrem mitochondrialen Genom besitzen. Es wird angenommen, dass dieser Unterschied in der Natur der Aminosäure Methionin begründet liegt. Da Methionin eine leicht oxidierbare Aminosäure darstellt, deren Oxidation durch das Enzym Methioninsulfoxid-Reduktase wieder rückgängig gemacht werden kann (Levine et al., 1996), wird postuliert, dass die Umkodierung des Isoleucin-Codons AUA zu einem methioninkodierenden Codon in höheren Tierarten auf erhöhten oxidativen Stress in deren Mitochondrien zurückzuführen ist (Bender et al., 2008). Diese Änderung im mitochondrialen Code wird nicht auf die „codon-capture“-Hypothese zurückgeführt, sondern auf die „ambiguous decoding“-Hypothese, die evolutionär getriebene Veränderungen im genetischen Code mit einschließt und besagt, dass direkt nach der Codon-Neuordnung die alte Aminosäure am Protein durch die neue Aminosäure ersetzt wird (Santos et al., 2004). Ein weiterer Hinweis auf die antioxidative Nutzung von Methioninresten in mitochondrial kodierten Proteinen ist, dass die Akkumulation von Methionin vor allem auf Proteinoberflächen innerhalb der inneren Mitochondrienmembran stattfindet (Bender et al., 2008), die für eine erhöhte oxidative Belastung bekannt ist.

### **1.3 Freie Radikal-Theorie des Alterns**

#### **1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies**

Auch unter normalen, physiologischen Bedingungen entstehen während der oxidativen Phosphorylierung reaktive Sauerstoffspezies. Superoxid wird immer dann produziert, wenn ein einzelnes

Elektron auf Sauerstoff übertragen wird (Chance et al., 1979). Zur Zeit sind mehrere Stellen in der mitochondrialen Atmungskette bekannt, die reaktive Sauerstoffspezies freisetzen können. Diese liegen primär in den Proteinkomplexen NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) und Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) (Brand, 2010; Quinlan et al., 2012; Abbildung 3).

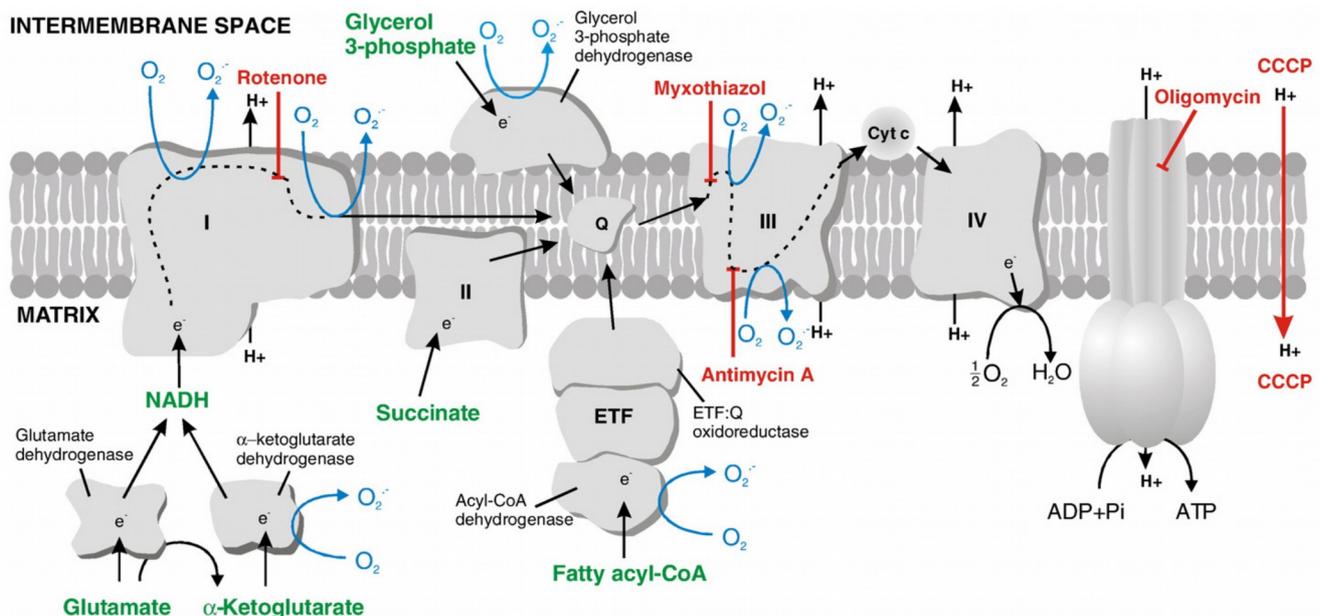


Abbildung 3: Mitochondrialer Metabolismus, Organisation der Atmungskettenkomplexe, Stellen der Elektronenlecks und Effekte von Modulatoren der Atmungskette. Übernommen aus (Tahara et al., 2009).

Neben dem Superoxid-Anion (Hyperoxid-Anion,  $O_2^{\cdot-}$ ) zählen zu den freien Radikalen, wie das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ( $OH\cdot$ ), Hydroperoxyl-Radikal ( $HOO\cdot$ ), Peroxylradikal ( $ROO\cdot$ ) oder Alkoxyradikal ( $RO\cdot$ ) zu den reaktiven Sauerstoffspezies, zum anderen aber auch stabilere molekulare Oxidantien, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroperoxid ( $ROOH$ ), Ozon ( $O_3$ ), das Hypochlorit-Anion ( $Ocl^-$ ), oder Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ).

Endogen werden reaktive Sauerstoffspezies über verschiedene Mechanismen gebildet, die sowohl eine Zell-, als auch eine Gewebsspezifität aufweisen. Zu den Hauptproduzenten gehören die zellmembranständige NADPH-Oxidase-Komplexe (NOX), die Mitochondrien, die Peroxisomen und das endoplasmatische Retikulum (Armstrong and Browne, 1994; Han et al., 2001; Muller, 2000). Im Mitochondrium wird unter normalen Bedingungen Sauerstoff zu Wasser reduziert, aber ca. 0,1 – 2 % der Elektronen verlassen die Elektronentransportkette (*electron leak*) und reagieren in einer 1-Elektronen-Reduktion mit Sauerstoff zu Superoxid (Li et al., 2013; Tahara et al., 2009). Superoxid

an sich ist nicht sehr toxisch, es kann aber bestimmte Enzyme inaktivieren und in ihrer protonierten Form als Hydroperoxyl-Radikal ( $\text{HO}_2\cdot$ ) die radikalische Lipidperoxidation initiieren. Da der pKa des Hydroperoxyl-Radikals 4,8 beträgt, liegt die Mehrheit bei physiologischem pH-Wert als Superoxid vor (Salvador et al., 2001).

Zur Bestimmung der Produktionsorte von reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der mitochondrialen Elektronentransportkette wurden Inhibitoren der verschiedenen Atmungskettenkomplexe verwendet. Diese unterbrechen den Elektronentransport, führen so zu einer erhöhten Elektronendichte innerhalb des betroffenen Komplexes, und damit zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in bzw. an dem inhibierten Protein.

In Komplex I bewirkt Rotenon eine Unterbrechung im Elektronentransport von den Eisen-Schwefel-Clustern auf Ubichinon, was zu einer Störung im NADH-Stoffwechsel führt. Dadurch wird Komplex I daran gehindert, die Elektronen auf Ubichinon zu übertragen, was eine Anreicherung von Elektronen im Intermembranraum auslöst (Li, 2003). Diese können dann zellulären Sauerstoff zu Sauerstoffradikalen reduzieren und damit oxidativen Stress induzieren.

Stigmatellin ist ein potenter Inhibitor der Oxidation von Hydrochinon durch den Cytochrom  $\text{bc}_1$ -Komplex. Es bindet an die  $\text{Q}_o$ -Seite von Komplex III ( $\text{Q}_o$ -Seite-Inhibitor) in der „(heme) b<sub>l</sub> distalen“ Position, was zu einer Bindung mit dem Rieske-Eisen-Schwefel-Protein über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Histidin an Position 181 (His-181) führt. Dieser Histidin-Rest ist ein Ligand der Eisen-Schwefel-Cluster in dieser Untereinheit und die Wasserstoffbrückenbindung verhindert eine Konformationsänderung in der cytoplasmatischen Domäne des Rieske-Proteins und damit die normale Funktion des Proteins (Zhang et al., 1998). Ein anderer Inhibitor der  $\text{Q}_o$ -Seite von Komplex III ist Myxothiazol, welches im Gegensatz zu Stigmatellin keine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rieske-Eisen-Schwefel-Protein eingeht, sondern stattdessen in der „b-proximalen“ Region von Cytochrom b bindet. Deshalb ist die Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne des Rieske-Proteins von diesem Inhibitor nicht betroffen (Tahara et al., 2009; Thierbach and Reichenbach, 1981).

Das Antibiotikum Antimycin A, ein  $\text{Q}_i$ -Seite-Inhibitor von Komplex III, inhibiert die Oxidation von Ubichinon durch Komplex III. Die Hemmung des Elektronentransports an dieser Stelle stört die Bildung des für die oxidative Phosphorylierung notwendigen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran. Daher bleiben alle Komponenten der Atmungskette, die vor dem Wirkungsort des Inhibitors im Komplex III liegen reduziert, wohingegen alle Komponenten dahinter oxidiert bleiben. Durch diesen Mechanismus wird der Verbrauch von Sauerstoff im Komplex IV

und die Synthese von ATP im Komplex V gehemmt (Potter and Reif, 1952; Tahara et al., 2009). Aus vergleichenden Studien kann geschlossen werden, dass Antimycin A die Akkumulation von Semichinon fördert, während Myxothiazol die Bildung von Semichinon hemmt. Beide Inhibitoren induzieren, durch ihre spezifische Bindung, eine starke Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (Tahara et al., 2009).

Ein weit verbreiteter Inhibitor von Komplex IV ist die Stoffklasse der Cyanide. Diese binden an das Eisenatom innerhalb des Proteins und verhindern dadurch, dass die Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff übertragen werden können.

Oligomycin A, ein Antibiotikum, blockiert den Protonenkanal innerhalb der Fo-Untereinheit von Komplex V, welcher essentiell für die Phosphorylierung von ADP zu ATP ist, indem es an die Oberfläche des  $c_{10}$ -Rings bindet und, dadurch einen Kontakt zwischen zwei benachbarten Molekülen bewirkt, welcher den Protonenfluss durch den Protonenkanal hemmt (Huijing and Slater, 1961; Symersky et al., 2012). Damit wird nicht nur die ATP-Produktion inhibiert, sondern auch der Elektronentransport über die Atmungskette stark reduziert, da der dazu benötigte Protonengradient wesentlich langsamer abgebaut werden kann (Jastroch et al., 2010).

Neben den endogenen Ursachen, sind auch exogene Faktoren, wie Umweltverschmutzung, Tabak, Rauch, Drogen, Xenobiotika oder Strahlung als Verursacher von reaktiven Sauerstoffspezies bekannt.

### **1.3.2 Mitochondriale Freie Radikal-Theorie des Alterns**

Die Theorie wurde 1956 das erste Mal von Denham Harman postuliert. Sie besagt, dass die biochemischen Ursachen des Alterns in der Akkumulation von freien Radikalen begründet seien, was zu Schädigungen des Genoms, der Proteine und Lipide führt, die vor allem durch Sauerstoff und dessen reaktiven Spezies verursacht werden (Harman, 1956). Demnach bilden sich freie Radikale als metabolische Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels und akkumulieren zeitlebens, bis eine Aufrechterhaltung der Homöostase nicht mehr möglich ist, was zu einem Phänotyp des Alterns und schlussendlich zum Tod führt (Abbildung 4).

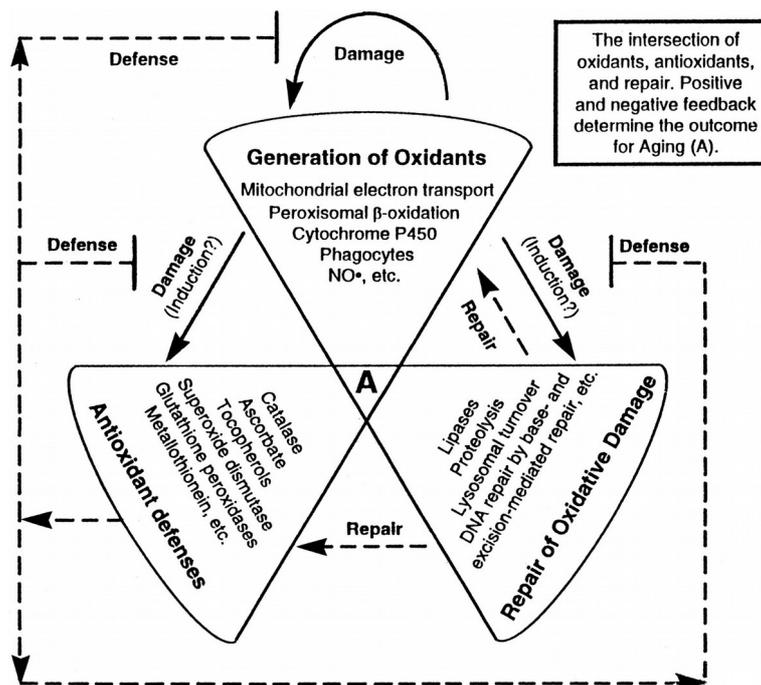


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die Freie Radikal-Theorie des Alterns. Gezeigt ist das Zusammenwirken von oxidativen Ereignissen, antioxidativen Maßnahmen und Reparaturen der oxidativen Schädigungen. Übernommen aus Beckman and Ames, 1998.

Dies wird darauf zurückgeführt, dass reaktive Sauerstoffspezies und Radikale in lebenden Zellen Protein-, Lipid- und DNA-Schäden induzieren können (Beckman and Ames, 1998). Ist die antioxidative Kapazität erschöpft oder das Reparatursystem der Zelle überlastet oder fehlerhaft, führen diese Schädigungen zur Seneszenz (Kirkwood and Kowald, 2012). Es ist bekannt, dass die Überproduktion von Superoxid zu Schäden an Molekülen und Zellstrukturen führen kann. Endogenes mitochondriales Superoxid wird zuerst durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und danach durch die Enzyme Katalase oder Glutathionperoxidase zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  detoxifiziert. Dieser antioxidative Schutz ist aber nicht „perfekt“, und Superoxid, das nicht detoxifiziert werden konnte, reagiert schnell mit Eisen-Schwefel-Clustern und kann darüber hinaus weitere Proteine, Lipide oder DNA schädigen (Imlay, 2008; Smith et al., 2003; Abbildung 5).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist relativ unreaktiv, kann aber in der Präsenz von  $\text{Fe(II)}$  ein hochreaktives Hydroxylradikal bilden, was die Lipidperoxidation von Membranen auslösen kann (Halliwell and Gutteridge, 1999). Die Oxidationsprodukte von Zuckern, Proteinen und Lipiden bewirken dann weitere sekundäre Schäden an Proteinen (Shigenaga et al., 1994; Sohal and Weindruch, 1996). Daher kann gefolgert werden, dass eine Erhöhung des mitochondrialen Superoxids oxidativen Stress bewirkt.

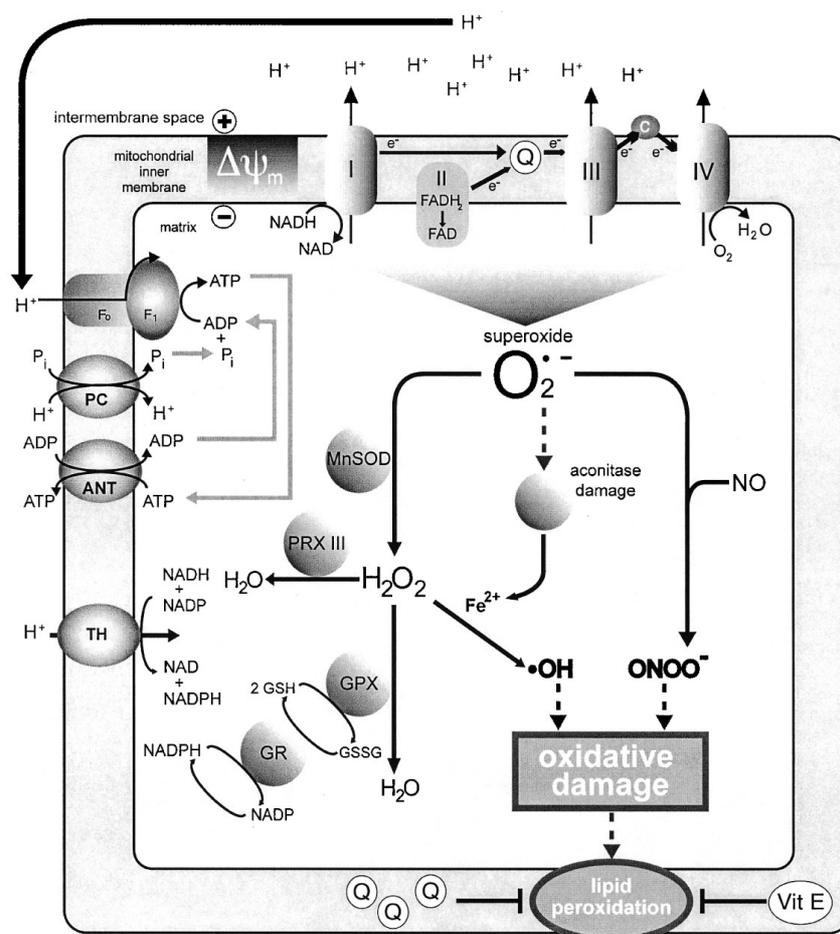


Abbildung 5: Übersicht der Reaktionen von reaktiven Sauerstoffspezies und Nitrospezies im Mitochondrium und dessen Folgen. Übernommen aus Smith et al., 2003.

Die Toxizität von Superoxid in der mitochondrialen Matrix kann an mitochondrialen Mn-SOD Knockout-Mäusen studiert werden, die selbst in Anwesenheit von Antioxidantien nur zwischen 10 und 20 Tagen überlebten (Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995). Im Gegensatz dazu ist ein Knock-out der cytosolischen Cu/Zn-SOD nicht letal, obwohl diese Tiere eine leicht erhöhte Sensibilität gegenüber ROS zeigen (Ho et al., 1998), was die Vermutung zulässt, dass extramitochondriales Superoxid weniger toxisch ist. Ein Kennzeichen der lebenslangen Akkumulation von durch Oxidation geschädigten Proteinen und Lipiden ist das strikt altersabhängige Auftreten von Lipofuscin, einer nicht abbaubaren Einlagerung von lipophilen, aggregierten Proteinen (30–58 %) und Lipiden (19–51 %) in postmitotischen Zellen (Porta, 2002). Lipofuscin tritt besonders stark in Herzmuskel- und Nervenzellen sowie im retinalen Pigmentepithel auf.

Zusammengefasst kann der progressive Verlauf des Alterns mittels dieser Theorie folgendermaßen erklärt werden: Im Verlauf des Alterns akkumulieren konstant oxidierte Proteine. Die Oxidation von

Proteinen führt wiederum zu teilweise un- oder fehlgefalteten Proteinstrukturen, was eine Aggregation dieser Proteine fördert. Aggregation von Proteinen innerhalb einer Zelle bewirkt eine Beeinträchtigung der zellulären proteolytischen Systeme, wie Proteasom oder Lysosom, was zu einer weiteren Akkumulation von oxidierten Proteinen führt. Darüber hinaus können durch vermehrte Oxidation auch Makromoleküle wie DNA und Lipide geschädigt werden, was dazu führen kann, dass diese Zellen entweder seneszent oder durch Apoptose abgebaut werden (Reeg and Grune, 2014).

## **2 Fragestellung und Ziele**

Durch das Auftreten von Sauerstoff in der Natur haben sich sowohl die Zellen als auch deren Stoffwechselfvorgänge verändert und an die neue Situation angepasst. Die oxidative Phosphorylierung kann ein Vielfaches an Energie der Glykolyse produzieren, wobei die extensive Nutzung von Sauerstoff die Gefahr einer ungewollten Oxidation von DNA, Proteinen und Lipiden mit sich bringt. Deshalb beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Frage, ob auf evolutionärer Ebene eine Anpassung in der Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren an die oxidative Belastung in einzelnen Organellen oder Strukturen stattgefunden hat, wobei insbesondere die Verteilung der leicht oxidierbaren schwefeltragenden Aminosäure Methionin in verschiedenen Modellen der oxidativen Belastung untersucht wird. Der zweite Teil beschreibt die experimentellen Arbeiten, die darauf hinzielten, den früher bereits beobachteten, publizierten und auch in dieser Arbeit wiedergefundenen Effekt der Cysteindepletion in mitochondrialen Proteinen von langlebigen Tieren experimentell zu untersuchen, indem eine zu Cystein analoge Substanz in zellulären und biochemischen Systemen analysiert wurde. Daher lässt sich folgende Frage formulieren: „Hat der oxidative Stress eine Rolle bei der Evolution der modernen Proteome gespielt, und hat die Proteinoxidation möglicherweise etwas mit dem biologischen Alterungsprozess zu tun?“

### 3 Material

#### 3.1 Proteindatensätze

##### 3.1.1 Lebensdauern, Körpermassen und Proteinsequenzen untersuchter Tierarten

Zur Analyse der globalen Aminosäurenutzung bei verschiedenen Spezies wurden 28 Arten in Anlehnung an Moosmann und Behl (2008) ausgewählt. Aus dieser Gruppe wurden anhand folgender, zusätzlicher Kriterien weitere Tierarten selektiert: Es wurden die 20 Spezies berücksichtigt, für die mehr als 100 Einträge für mitochondriale Proteine verfügbar waren ferner wurden 4 Arten für die Analyse der peroxisomalen Proteine verwendet, da nur bei diesen über 30 peroxisomale Proteinsequenzen zur Verfügung standen.

Die Sequenzen der 20 untersuchten Spezies aus acht verschiedenen phylogenetischen Stämmen wurden am 27.10.2011 von der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank (The UniProt Consortium, 2012), respektive der NCBI Protein RefSeq Datenbank (Pruitt et al., 2007) bezogen. Beide verwendeten Datenbanken zeichnen sich dadurch aus, dass alle Einträge geprüft, nicht redundant und manuell annotiert sind. Die Datensätze für die Proteom- und Mitochondrienproteine wurden aus der NCBI Protein RefSeq Datenbank gesammelt. Aufgrund der geringen Anzahl an geprüften Einträgen in der NCBI Protein RefSeq Datenbank bezüglich peroxisomaler Proteine, wurden in diesem Fall die Datensätze von UniProtKB/Swiss-Prot verwendet. Die Sequenzen der mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette wurden zusammengestellt wie publiziert (Schindeldecker et al., 2011).

Für den Sequenzvergleich verschiedener anaerober und aerober Tierstämme bezüglich ihrer Methioninnutzung im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette wurde eine Sammlung von insgesamt 365 Tierarten verwendet, die an eine Publikation von Bender et al. angelehnt ist (Bender et al., 2008). Diese Sammlung setzte sich zusammen aus: 95 Mammalia; 14 Aves; 10 Reptilia; 12 Amphibia; 40 Pisces; 16 Echinodermata; 55 Insecta; 30 Crustacea; 21 Arachnida; 15 Nematoda; 10 Plathelminthes; 29 Mollusca; 4 Annelida; 3 Brachiopoda; 8 Cnidaria; 3 Porifera.

Angaben über die jeweiligen maximalen Lebensspannen der Tierarten stammten zum größten Teil von Carey und Judge (Carey and Judge, 2000). Alle übrigen Daten zu Lebensspannen wurden aus von Experten geprüften ökologischen Studien und Monografien übernommen, die in Moosmann und Behl (2008) zusammen gestellt sind.

Die Gruppe der 218 verschiedenen Tierarten für die erweiterte Darstellung der Korrelation zwi-

schen differenzierter Aminosäurenutzung in mitochondrial kodierten Proteinen und deren maximalen Lebensspannen ist aus Schindeldecker et al., 2011 übernommen. Die entsprechenden Sequenzen wurden aus der NCBI Protein RefSeq Datenbank kopiert.

In Tabelle 2 sind die entsprechenden Suchterme am Beispiel *Homo sapiens*, in Tabelle 3 die Anzahl der gefundenen Sequenzen, die maximale Lebensspanne, Körpermasse und die phylogenetischen Stämme dargestellt.

Organelle bzw. Zielstruktur	Suchterm
Proteom (NCBI RefSeq)	"homo sapiens"[Organism] NOT partial[All Fields] NOT isoform[All Fields]
Mitochondrium (NCBI RefSeq)	"homo sapiens"[Organism] AND mitochondrial[All Fields] NOT partial[All Fields] NOT isoform[All Fields]
Peroxisom (UniProt)	Organism:„homo sapiens“ AND reviewed:yes AND annotation:(type:location peroxisome)

Tabelle 2: Suchterme zur Erhebung der Proteinsequenzen am Beispiel *Homo sapiens*

Informationen über die Körpermassen der Wirbeltiere entsprangen der AnAge Internetdatenbank (de Magalhaes, 2005), die der wirbellosen Tieren wurden aus geprüften ökologischen Studien und Monografien übernommen (Moosmann and Behl, 2008).

Spezies	Gruppe / Stamm	Lebensdauer (Jahre)	Körpermasse (kg)	Gesamtes Proteom (Summe der Sequenzen)	Mitochondrium (Summe der Sequenzen)	Peroxisom (Summe der Sequenzen)
<i>Homo sapiens</i>	Mammalia	100	70	15072	978	94
<i>Equus caballus</i>	Mammalia	62	1000	16148	283	
<i>Pan troglodytes</i>	Mammalia	60	45	14349	376	
<i>Macaca mulatta</i>	Mammalia	35	8	15939	314	
<i>Bos taurus</i>	Mammalia	30	750	28590	749	38
<i>Canis familiaris</i>	Mammalia	30	40	14903	429	
<i>Gallus gallus</i>	Aves	30	2,6	15525	301	

Spezies	Gruppe / Stamm	Lebensdauer (Jahre)	Körpermasse (kg)	Gesamtes Proteom (Summe der Sequenzen)	Mitochondrium (Summe der Sequenzen)	Peroxisom (Summe der Sequenzen)
Strongylocentrotus purpuratus	Echinoidea	20	0,1	25696	309	
Oryctolagus cuniculus	Mammalia	18	1,8	14808	269	
Cavia porcellus	Mammalia	15	0,73	16419	204	
Monodelphis domestica	Mammalia	6	0,11	16593	273	
Mus musculus	Mammalia	6	0,021	21551	1186	101
Apis mellifera	Insecta	5	0,00009	8529	204	
Danio rerio	Pisces	5	0,0005	25049	588	
Rattus norvegicus	Mammalia	4	0,3	26060	799	66
Ciona intestinalis	Ascidiae	2	0,0001	11653	203	
Tribolium castaneum	Insecta	2	0,0000025	9340	193	
Drosophila melanogaster	Insecta	0,15	0,000001	9748	162	
Anopheles gambiae	Insecta	0,07	0,00000025	11200	126	
Caenorhabditis elegans	Nematoda	0,05	2,00E-09	23865	219	

Tabelle 3: Phylogenetische Stämme, maximale Lebensspannen, Körpermassen und Anzahl der gesammelten Proteinsequenzen aus den drei untersuchten Kompartimenten, zusammengestellt für 20 Spezies.

### 3.1.2 Humane Proteinsequenzen einzelner Kompartimente

Alle verarbeiteten Sequenzen stammten aus der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank vom 5. Dezember 2012. Insgesamt wurden 20233 annotierte Proteine erfasst, von denen 427 olfaktorische Rezeptoren, aufgrund ihrer sehr geringen Expression und nahen Verwandtschaft zueinander ausgeschlossen wurden. Diese 427 Proteine hätten möglicherweise einen unzulässigen Einfluss auf die Aminosäurestatistik der Cytoplasmamembran bewirkt. Desweiteren wurde eine Mindestlänge von 100 Aminosäuren für jede Proteinsequenz festgelegt, damit die Änderung einer einzelnen Aminosäure keine zu starke Gewichtung der Ergebnisse bewirkte.

So ergab sich eine finale Anzahl von 19806 untersuchten Sequenzen, welche in folgende Datensätze eingeteilt wurden: Mitochondrium (985); endoplasmatisches Retikulum (886); Golgi-Apparat (719); Peroxisom (94); Cytoplasma (4195); innere Mitochondrienmembran (228); äußere Mitochondrienmembran (94); Membran des endoplasmatischen Retikulums (637); Membran des Golgi-Apparates (508); Peroxisomenmembran (37); Cytoplasmamembran (2256); Nukleus (4901).

### **3.1.3 Nukleär und mitochondrial kodierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe**

Die Sequenzen der nukleär Untereinheiten der humanen Atmungskette wurden wie beschrieben gesammelt (Schindeldecker et al., 2011) und umfassten folgende Zuordnungen: 42 Komplex I-Untereinheiten, 9 Komplex III-Untereinheiten, 10 Komplex IV-Untereinheiten und 14 Komplex V-Untereinheiten. Aus diesen 75 Sequenzen, zusammen mit den 13 Proteinen, die in der mitochondrialen DNA kodiert sind, ergab sich der Datensatz „Atmungskette“.

Die Proteinsequenzen der mitochondrial kodierten Proteine von 361 Tierarten aus 10 verschiedenen Tierstämmen wurden nach den Kriterien von Bender et al. (2008) ausgewählt, die hauptsächlich auf der Verfügbarkeit und Verteilung in den verschiedenen Tierstämmen basieren.

## **3.2 Computerprogramme und Software-Pakete**

Aufgrund seiner Vielseitigkeit, Interoperabilität und Offenheit des Systems wurde Gentoo Linux (Kernel 3.\*; glibc 2.17; <http://www.gentoo.org>) als Betriebssystem verwendet. Zur Analyse der durch Datenbankrecherchen gewonnen Daten wurden mehrere Skripte auf Grundlage der als quelloffenen Programmierumgebung Bioperl (Version 1.6.9; Stajich et al., 2002) entwickelt. Mittels der interpretierenden Programmiersprache Perl (Version 5.16.3; <http://www.perl.org>) wurde das Bioperl Modul eingebunden und benutzt. Die statistische Auswertung erfolgte durch SPSS (Version 20.0.0.1; IBM), die grafische Darstellung mit SigmaPlot (Version 11.0; Systat Software, Inc). Strukturformeln und logP-Werte wurden mit Hilfe der Software ChemSketch (ACD Labs) erstellt bzw. aus dem dazugehörigen Sicherheitsdatenblatt entnommen.

## **3.3 Spezielle Chemikalien**

Die zur Durchführung der Experimente erforderlichen Substanzen und Chemikalien wurden mit

dem höchsten Reinheitsgrad von Biomol (Hamburg), Gibco/Invitrogen (Paisley, Schottland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) gekauft und unter Beachtung der Herstellerangaben gelagert und verwendet.

Substanz	Lösungsmittel	Hersteller
2SH, Mercaptoethanol	EtOH	Sigma-Aldrich
4SH, 1-Butanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
8SH, 1-Octanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
10SH, 1-Decanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
12SH, 1-Dodecanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
14SH, 1-Tetradecanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
18SH, 1-Octadecanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
DMS, Dodecylmethylsulfid	EtOH	Sigma-Aldrich
DOH, 1-Dodecanol	EtOH	Sigma-Aldrich
t12SH, tert-Dodecanthiol	EtOH	Sigma-Aldrich
CAM, Cysteamin	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
CYS, Cystein	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
DES, 3-Mercaptopropionsäure	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
GSH, Glutathion	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Spezielle Chemikalien, die in den biochemischen Experimenten genutzt wurden

### 3.4 Geräteliste

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Gelkammer, Mini-PROTEAN <sup>®</sup> 3 Cell	Biorad, Deutschland
Luminometer, Fluorimeter	Wallac Inc., PerkinElmer, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät, Multiskan RC	Thermo Labsystems, Ulm, Deutschland
Sterilbank	SLEE, Mainz, Deutschland
Ultraschallgerät, Sonorex RK510	Bandelin, Berlin, Deutschland
Western-Blot Chemielumineszenz Detektor	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
WetBlot-System Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, Deutschland

Tabelle 5: Liste der benutzten, speziellen Laborgeräte

### **3.5 Zellkultur**

Alle benutzten primären und klonalen Zelllinien wurden bis zum Anfang der Experimente auf flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Kulturmedium mit 10 % DMSO kryokonserviert. Als Kulturmedium diente DMEM mit den unten genannten Zusätzen. Zur Kontrolle des pH-Wertes des Mediums war diesem der pH-Indikator Phenolrot beigemischt. Sämtliche Medien, Puffer und Lösungen für die Verwendung in der Zellkultur wurden von GIBCO/Invitrogen bezogen.

#### **3.5.1 Klonale Zellen**

Für Überlebensexperimente mit Zellen wurden murine, immortalisierte, hippocampale Neurone der Linie HT-22 (Davis and Maher, 1994) verwendet.

#### **3.5.2 Primäre Zellen**

Versuche mit humanen Zellen erfolgten mit primäre, weibliche, fötale Lungenfibroblasten (Nichols et al., 1977), welche über das Coriell-Institut (Coriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, USA) bezogen wurden. Die international gebräuchliche Bezeichnung für diese Zelllinie lautet IMR-90 bzw. I90.

### **3.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur**

Das verwendete fötale Rinderserum (FBS) wurde zur Inaktivierung vor dem Gebrauch für 30 min auf  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

*Kulturmedium für die Zellkultur:*

500 ml DMEM

50 ml FBS

5 ml ABAM-Mix (Antibiotika-Antimykotika-Mix aus 1 % Penicillin und 1 % Streptomycin)

5 ml Pyruvat (100 mM)

5 ml MEM NEAA (100 mM)

### 3.7 Lösungen für biochemische und zellbiologische Assays

*MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Lösung:*

5 mg/ml MTT in ddH<sub>2</sub>O

*MTT-Solubilisierungslösung:*

40 % (w/v) Dimethylformamid

10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

pH 4,0 (Eisessig)

### 3.8 Puffer und Lösungen für die Protein- bzw. Lipidanalytik

*10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):*

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

*Phosphat-gepufferte Salzlösung mit TWEEN-20 (PBS-T):*

1x PBS

0,05 % (v/v) TWEEN-20

pH 7,4

*Zellernte-Puffer (Lysispuffer) ohne SDS:*

50 mM Tris-HCl  
10 % Saccharose  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA  
15 mM HEPES  
1 mM Natrium-Orthovanadat  
1 mM NaF  
Proteinaseinhibitor 1:100 (Sigma-Aldrich)  
Phosphataseinhibitor 1:100 (Sigma-Aldrich)  
pH 6,8

*4x Ladepuffer (Probenpuffer) für die SDS-PAGE:*

200 mM Tris-HCl, pH 6,8  
8 % (w/v) SDS  
40 % (w/v) Glycerol  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau  
20 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

*10x Laufpuffer für die SDS-PAGE:*

250 mM Tris-Base  
2,5 M Glycin  
1 % (w/v) SDS  
pH 8,3

*Trenngel für die SDS-PAGE:*

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8  
10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)  
0,1 % (w/v) SDS  
0,05 % (v/v) TEMED

0,1 % (w/v) APS

*Sammelgel für die SDS-PAGE:*

0,15 M Tris-HCl, pH 6,8

3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)

0,1 % (w/v) SDS

0,05 % (v/v) TEMED

0,1 % (w/v) APS

*10x Transferpuffer:*

250 mM Tris-Base

2,5 M Glycin

Zugabe von 20 % Methanol zu der 1x Verdünnung

*1x Ponceau S:*

0,2 % (w/v) Ponceau S

5 % (v/v) Essigsäure

*Blockierungspuffer:*

5 % (w/v) Trockenmilchpulver (fettfrei) in PBS-T

*Nicht-reduzierender Lipidpuffer (entgast):*

20 mM TRIS, pH 7,4

1 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM KCl

*Puffer für die Fettsäureanalyse:*

1x PBS  
 10  $\mu$ M Phenothiazin  
 1 mM DTT  
 1 mM EDTA

*Luminol-Entwicklerlösungen:*

A: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6  
 0,025 % Luminol  
 B: 0,11 % para-Coumarinsäure in DMSO  
 C: 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*TBARS-Assay Stopplösung:*

5 % Trichloressigsäure in 1 M Eisessig  
 0,5 % Thiobarbitursäure in 10 mM NaOH

**3.9 Antikörper**

Die verwendeten Antikörper wurden in PBS-T auf die unten angegebenen Konzentrationen verdünnt. Zusätzlich wurden die primären Antikörper mit 0,05 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) versetzt.

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
anti-HSP70 (1:1000)	Stressgen, USA
anti-HSP90 (1:1000)	Stressgen, USA
anti-P21 (1:500)	BD Biosciences, USA
anti-P53 (1:1000)	Abcam, USA
anti-P62 (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-Polyubiquitin (1:1000)	Dako, Dänemark
anti-Tubulin (1:1000)	Sigma-Aldrich, Deutschland

Tabelle 6: Primäre Antikörper

---

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Esel anti-Maus-HRP (1:10000)	(Dianova) Jackson ImmunoResearch, USA
Esel anti-Kaninchen-HRP (1:10000)	(Dianova) Jackson ImmunoResearch, USA

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper-HRP Konjugate

## 4 Methoden

### 4.1 Bioinformatische Analysen

#### 4.1.1 Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren in Proteinsequenzen

Die Kalkulation der Aminosäurenutzung in Proteinen erfolgte durch ein selbst entwickeltes Perl-Skript, welches als Eingabe eine FASTA-Sequenzdatei nutzt und mittels Bioperl-Funktionen (Stajich et al., 2002) den prozentualen Anteil jeder Aminosäure an der Proteinsequenz bestimmt.

#### 4.1.2 Identifikation von Membranbereichen

Die Sequenzen der Transmembrandomänen wurden mit der TMHMM 2.0 Software identifiziert, welche in ein Bioperl-Skript eingebettet wurde. Der Algorithmus basiert auf einem Hidden Markov Model mit dem komplette Proteome analysiert werden können (Krogh et al., 2001).

### 4.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Die Zellen wurden nach dem Erreichen von 90 % Konfluenz in einer 10 cm Schale passagiert. HT-22 Zellen wurden zum Splitten mit 0,05 % Trypsin in DPBS, IMR-90 Zellen mit 0,1 % Trypsin in DPBS inkubiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Färbung durch Trypanblau (1:10 in PBS) und Auszählung in der Neubauer Zählkammer wurden jeweils 1 Million Zellen in die neuen Schalen zur weiteren Kultivierung überführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank getätigt, die Inkubation erfolgte im Brutschrank.

#### 4.2.1 Bestimmung des Zellalters von IMR90-Zellen

Das kumulative Alter (*population doublings*) der IMR90-Zellen wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\log(\text{Anzahl geernteter Zellen}) - \log(\text{Anzahl ausgesäter Zellen})}{\log(2)}$$

Abbildung 6: Formel zur PD Bestimmung

Hierzu wurden die jeweiligen Zellzahlen der neuen und der alten Population mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und danach mit der Formel (Abbildung 6) die Zunahme der Verdoppelungen errechnet. Laut Literatur gelten IMR90-Zellen als seneszent, wenn sie eine PD von 60 erreicht haben. So werden IMR90-Zellen zwischen PD 50 und 60 als „alt“ und Zellen mit PD kleiner 30 als „jung“ angesehen (Hayflick, 1965). Für Experimente, in denen nicht explizit alte oder junge Zellen benutzt wurden, erfolgten die Versuche mit Zellen zwischen PD 30 und 40.

#### 4.2.2 Zellernte und Proteinquantifizierung

Zur Ernte der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer für eine Minute inkubiert und daraufhin mit einem Spatel von der Schale gelöst und in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß gegeben. Mit Hilfe eines Ultraschallbades und der darauffolgenden Aufbewahrung der Proben für 5 min bei -80 °C wurden die Zellen lysiert und aufgeschlossen. Die so gewonnenen Proben wurden auf -20 °C für weitere Experimente gelagert oder gleich weiterverwendet.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach dem Bicinchoninsäure-Verfahren (Smith et al., 1985). Dazu wurde ein Kit der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) benutzt. In diesem Verfahren werden zweiwertige Kupferionen quantitativ von Proteinen reduziert, so dass zusammen mit der Bicinchoninsäure eine violette Färbung entsteht, welche photometrisch ausgewertet werden kann. Dem Protokoll folgend wurden die Proben 1:210 in ddH<sub>2</sub>O und BCA-Mix-Lösung verdünnt und anschließend die Absorption bei 560 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen und gegen eine Kalibrierungskurve, welche mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt wurde, abgeglichen.

#### 4.3 Präparation von Rattenhirnlipiden

Eine adulte Sprague-Dawley-Ratte wurde nach Isoflurannarkose dekapitiert und das Gehirn präpariert. Im Anschluss an die Gehirnentnahme wurde in nicht-reduzierendem Lipidpuffer bei 4 °C überschüssige weiße Substanz und das Cerebellum entfernt. Nach der weiteren Zerkleinerung des Gewebes mittels Schere und Pinzette folgte die komplette Homogenisierung in einem gekühlten Homogenisator. Das nach Zentrifugation des Lysates für 5 Minuten bei 3000 g und 4 °C entstandene

ne Pellet wurde in 5 ml nicht-reduzierendem Lipidpuffer resuspendiert, sonifiziert, auf sechs Beckmann-Zentrifugenröhrchen zu je 1 ml aliquotiert und 20 min bei 4 °C und 100 000 g ultrazentrifugiert. Der entstandene klare Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, sonifiziert und erneut, wie oben beschrieben, ultrazentrifugiert. Dieser Wasch- bzw. Aufreinigungsschritt wurde ein drittes Mal wiederholt, bevor alle Proben in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß zusammengeführt wurden. In flüssigem Stickstoff wurden die Hirnlipide kurz bei -196 °C schockgefroren und danach auf -80 °C gelagert.

#### 4.4 Biochemische Assays

##### 4.4.1 TBARS-Assay der Lipidperoxidation

Oxidativer Stress in zellulären Systemen führt zu der Bildung von reaktiven und instabilen Lipidhydroperoxiden. Die Spaltung dieser von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) stammenden labilen Peroxide führt zur Produktion von reaktivem Malondialdehyd, dessen Konzentration fluorimetrisch quantitativ über die kontrollierte Reaktion mit Thiobarbitursäure ermittelt werden kann. Die Messung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS) ist eine etablierte Methode zum Nachweis von Lipidperoxidation (Yagi, 1998; Armstrong and Browne, 1994).

Präparierte Rattenhirnlipide (0,5 mg/ml in H<sub>2</sub>O) wurden laut Protokoll (Hajieva et al., 2009) für 0, 5, 10, 20, 60 und 120 min mit einer radikalproduzierenden Eisen-Ascorbat-Lösung (10 µM Fe<sup>2+</sup> und 200 µM Ascorbat) und einer der folgenden Substanzen inkubiert: 1 ‰ EtOH; 10 µM 12SH; 100 µM 12SH; 1000 µM 12SH. Zur Kontrolle dienten Lösungen aus Hirnlipiden mit 1000 µM 12SH und PBS mit 1000 µM 12SH, jeweils ohne die radikalbildenden Substanzen. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Hinzufügen der TBARS-Stopplösung (1 vol 0,5 % Thiobarbitursäure-Lösung und 3,5 vol 5 % Trichloressigsäure-Lösung). Die Proben wurden anschließend für 60 min bei 95 °C erhitzt und danach auf eine Mikrotiterplatte übertragen. Die Messung erfolgte im Fluorimeter bei einer Exzitation von 531 nm und einer Emission von 572 nm.

##### 4.4.2 8-Isoprostan Lipidperoxidationsassay

Isoprostane sind Prostaglandin-ähnliche Substanzen, die *in vivo* durch eine radikalkatalysierten Peroxidation von essentiellen Fettsäuren, vor allem der Arachidonsäure, entstehen. Bei diesem Bil-

dungsweg der Isoprostane spielt die Aktivität der Cyclooxygenasen keine Rolle. Je nachdem welche Fettsäuren in dieser Reaktion beteiligt sind, entstehen spezifische Isoprostan-Klassen. Zur Detektion von induziertem 8-Isoprostan nach Applikation eines lipophilen Thiols in humanen Fibroblasten wurde das Cayman 8-Isoprostane EIA Kit verwendet. Die Behandlung der zu 75 % konfluenten IMR-90 Zellen erfolgte für 1 h, 2 h, 4 h und 6 h mit je 1 ‰ Ethanol, 10  $\mu\text{M}$  12SH und 100  $\mu\text{M}$  12SH in FCS-freiem DMEM in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Von jeder Probe wurden 50  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen und auf die mitgelieferte Mikrotiterplatte pipettiert. Diese ist mit sekundären Antikörpern gegen Kaninchen beschichtet. Nach Zugabe des primären Antikörpers, gerichtet gegen 8-Isoprostan, und eines 8-Isoprostan-AChE Konjugats wurde die Platte für 18 h bei 4 °C ruhen gelassen. Bei Raumtemperatur folgten fünf Waschschrte mit EIA-Waschpuffer, bevor die Platte mit frisch hergestellten Ellmann's Reagenz für 90-120 min inkubiert wurde. Dem Protokoll folgend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen, nachdem die Absorption der B<sub>0</sub>-Wells (minus Blindprobe) bei dieser Wellenlänge zwischen 0,3 und 1,0 betrug.

Dieser kompetitive Immuno-ELISA beruht auf der konkurrierenden Reaktion des primären Antikörpers mit induziertem 8-Isoprostan und dem zugesetzten 8-Isoprostan-AChE-Konjugat. Nach Antigenbindung bindet der primäre Antikörper an dem auf dem Plattenboden verankerten sekundären Antikörper und fixiert damit das Antigen. Nach Zugabe von Ellmanns Reagenz, einem Substrat der Acetylcholinesterase, entsteht ein gelbes Produkt, dessen Absorption bei 405 nm detektiert werden kann. Dabei ist die Intensität der Absorption umgekehrt proportional zur Konzentration an induziertem 8-Isoprostan.

#### 4.4.3 Trans-Fettsäureanalyse

Die Konfiguration isolierter Doppelbindungen in allen natürlich vorkommenden Fettsäuren in eukaryotischen Zellen ist die cis-Konfiguration (Chatgialoglu et al., 2006). Bestimmte Radikale, darunter Thiyl- und Stickstoffdioxidradikale, sind in der Lage, Doppelbindungen von Fettsäuren zu isomerisieren, so dass trans-Fettsäuren entstehen können (Chatgialoglu and Ferreri, 2005).

Zum Nachweis der durch lipophile Thiole gebildeten trans-Fettsäuren wurden IMR-90 Zellen (PD 26,9) für je 6 h mit 1 ‰ Ethanol, 10  $\mu\text{M}$  12SH, 100  $\mu\text{M}$  12SH und 100  $\mu\text{M}$  DOH behandelt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in einem speziellen Puffer zur Fettsäureanalyse mit einem Spatel von der Kulturschale abgelöst und in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 400 g wurde der Überstand verworfen und das

nasse Zell-Pellet eingefroren. Die Ernte der Zellen erfolgte auf Eis bei 4 °C, die Lagerung bei -80 °C und der Versand der Proben bei -78 °C auf Trockeneis.

Die weitere Analyse der Proben, in puncto der trans-Fettsäurezusammensetzung, bewerkstelligte die Firma Omegametrix GmbH in Martinsried, Deutschland. Dabei kam ein hochauflösendes Verfahren zum Einsatz, das als GC-FID bekannt ist. Der Flammenionisationsdetektor (FID) ist ein Detektor für organische Verbindungen, der überwiegend mit Gaschromatographen (GC) eingesetzt wird. Das Funktionsprinzip beruht auf der Messung der Leitfähigkeit einer Knallgasflamme zwischen zwei Elektroden. Zu analysierende Substanzen werden dann mit einem Trägergasstrom in die Flamme transportiert und dort thermisch ionisiert. Die bei der Ionisierung freiwerdenden Elektronen werden, mittels eines Gitters, das in die Flamme angebracht ist, aufgefangen und durch ein angeschlossenes Datensystem als Peak aufgezeichnet.

## **4.5 Zellbiologische Assays**

### **4.5.1 MTT-Assay der Zellviabilität**

Zur Bestimmung des Zellüberlebens nach Behandlung mit einer potentiell toxischen oder schützenden Substanz wurde der etablierte MTT-Assay verwendet (Mosmann, 1983). Dieses kolorimetrische Verfahren beruht auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen Tetrazols MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch das mitochondriale „Succinat-Tetrazol-Reduktase-System“ zu seinem purpurfarbenen unlöslichen Formazan. Da diese Reduktion einen aktiven Metabolismus der Zelle voraussetzt, korreliert die Absorption des solubilisierten Formazans bei 560 nm mit dem Überleben der behandelten Zellen. So kann quantitativ die Cytotoxizität oder die Zellschutzeigenschaft einer applizierten Substanz durch die entstandene Färbung spektrophotometrisch bestimmt werden.

Hierzu wurden IMR-90 Zellen (PD 28,1) in 96-Well Mikrotiterplatten in einer Dichte von 5000 Zellen pro Well ausgesät, zwei Tage im Brutschrank ruhen bzw. proliferieren gelassen und danach für 72 h mit 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 µM der verschiedenen zu untersuchenden Substanzen respektive der Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Bei den Versuchen mit Antioxidantien wurden die Zellen für 2h vorinkubiert. Die Konzentrationen der Antioxidantien betragen bei  $\alpha$ -Tocopherol 10µM, bei SOD und CAT je 100 Units pro Milliliter. Am Ende der Inkubationszeit wurde zu jedem Well 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) hinzugefügt, bevor nach 3 h im Brutschrank (37 °C, 100 % Luftfeuchte, 5

% CO<sub>2</sub>) 100 µl Solubilisierungslösung in jedes Well pipettiert wurden, um das vorher gebildete schwerlösliche Formazan wieder in Lösung zu bringen. Alle MTT-Assays wurden mit mindestens drei Replikaten durchgeführt. Zur Bestimmung der Intensität der Färbung wurde die Absorption des purpurnen bis blauen Formazans bei 560 nm am darauffolgendem Tag (Lagerung bei RT und Dunkelheit) mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

#### 4.5.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die Methode der denaturierenden diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) gewählt. Das Gel setzt sich hierbei aus zwei Teilen zusammen: dem Sammel- und dem Trenngel. Das Trenngel (pH 8,8) besteht aus 10 % Polyacrylamid, das Sammelgel (pH 6,8) aus 4 % Polyacrylamid und dient der Anreicherung der Proteine vor deren Eintritt in das Trenngel (*stacking-effect*). Nach dem Gießen wurde das Polyacrylamidgel in eine Gelkammer eingespannt und diese mit 1-fach Laufpuffer befüllt.

Die Proteinproben wurden je zu 10 µg aliquotiert und mit 4-fach Ladepuffer versetzt. Nach 5-minütigem Erhitzen bei 95 °C konnten die Proben nach Abkühlung in die Geltaschen pipettiert werden. Das dem Ladepuffer beigemengte Glycerol erhöhte die Dichte der Probenmischung, so dass sie besser auf den Boden der Taschen absinken konnte. In eine Spur wurde der vorgefärbte Peptidmarker peqGOLD Protein-Marker IV (Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) als Größenstandard aufgetragen.

Der nachfolgende Lauf des Gels erfolgte solange bei 60 V, bis die Proben das Sammelgel verlassen hatten. Danach wurde die Spannung auf 130 V erhöht und der Lauf fortgesetzt, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreichte. Durch die angelegte Spannung wandern die durch SDS negativ geladenen, linearisierten Proteine durch das elektrische Feld in Richtung Anode, wobei sie sich wegen der Retardierung durch die Gelmaschen ihrer Größe nach separieren.

#### 4.5.3 Western-Blot

Für die Immunodetektion interessanter Proteine erfolgte die Übertragung der nach Größe separierten Proben von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe des vertikalen Western Blot-Verfahrens in einem WetBlot-System. In diesem wird das Gel auf eine Nitrocellulose-

membran gelegt und wie ein Sandwich, umgeben von beiden Seiten mit Whatmanpapieren und Schwämmen, in eine Kassette gepresst, welche dann in die Blotkammer eingehängt wird. Die Blotkammer selbst ist komplett mit 1-fach Transferpuffer mit 20 % Methanol gefüllt. Bei einer Spannung von 30 V wurden die Protein-SDS-Suspension über Nacht bei Raumtemperatur auf die Membran übertragen. Die Bindung der transferierten Proteine an der Membran erfolgt instantan und ist nahezu irreversibel.

Eine Ponceau S-Färbung diente anschließend zur Kontrolle der Beladung und des Transfers. Hierfür wurde die Nitrocellulosemembran für 5 min in einer Ponceau S-Lösung inkubiert, bevor mit H<sub>2</sub>O der Hintergrund entfärbt wurde.

#### **4.5.4 Immunodetektion**

Eine unspezifische Antikörperbindung an der Nitrocellulosemembran wurde durch Behandlung der Membran für 3 h mit Blockierungspuffer unterbunden. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T für je ca. 10 min folgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper bei 4 °C über Nacht. Die folgenden drei Waschschrte mit PBS-T für jeweils ca. 10 min entfernten restliche und überschüssige Primärantikörper, bevor der sekundäre Antikörper für ca. 3 Stunden einwirken gelassen wurde. Es folgten wiederum drei 10 minütige Waschschrte mit PBS-T. Zur Detektion des an den primären Antikörper gebundenen sekundären Antikörper-HRP-Konjugats wurde die Membran mit einer Peroxidase-abhängigen Chemilumineszenz-Lösung (Luminol-Entwicklerlösungen) benetzt. Das Photographieren des Blots fand in der Peqlab-Entwicklermaschine statt, und die quantitative densitometrische Auswertung geschah mit Hilfe des AIDA-Softwarepakets.

#### **4.6 Statistische Analysen**

##### *Aminosäurenutzung in Proteinsequenzen*

Der Test auf Varianz in der Nutzung der 20 proteinogenen Aminosäuren in Proteinsequenzen der gewählten Paradigmen erfolgte durch eine einfaktorielte, nicht-parametrische Varianzanalyse. Alle Vergleiche in der Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren beziehen sich auf den jeweiligen Gehalt aller zur Verfügung stehenden Proteinsequenzen der ganzen Zelle oder den dazugehörigen Schemen.

---

*Verhältnis der Aminosäurenutzung in Membran- und Nichtmembransequenzen*

Die berechneten Prozentwerte wurden ins Verhältnis zu den zu untersuchenden Paradigmen der zellulären Oxidation gesetzt, wobei vorher eine Normierung auf den durchschnittlichen Membrangehalt durchgeführt wurde. Dabei wurde eine Ratio größer als eins als Akkumulation, und eine Ratio kleiner als eins als Depletion der jeweiligen Aminosäure gewertet.

*Korrelation der Langlebigkeit mit der Aminosäurenutzung in Atmungskettenproteinen im Vergleich zu mitochondrial lokalisierten Proteinen*

Die Überprüfung erfolgte durch eine partielle Korrelation der logarithmierten Daten mit der jeweiligen Körpermasse oder einer phylogenetischen Korrektur basierend auf der Korrelation phylogenetisch unabhängiger Kontraste (Garland et al., 1992).

*Methioninnutzung*

Die verschiedenen humanen Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der einfaktoriellen, nicht-parametrischen Varianzanalyse verglichen, gefolgt von Scheffe's post-hoc Test, durch den festgestellt werden kann, bei welchem Mittelwertspaar Unterschiede vorliegen. Dabei wurde ein p-Wert von 0,001 oder weniger als signifikant angesehen.

*Immunblot Auswertung*

Die Signifikanz der densitometrisch analysierten Immunblots wurde mit der einfaktoriellen, nicht-parametrischen Varianzanalyse berechnet und ein p-Wert von 0,05 oder kleiner als signifikant gewertet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse der differenzierten Aminosäurenutzung

Aminosäuren besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Seitenketten eine Vielzahl von spezifischen chemischen und biologischen Eigenschaften. Manche Aminosäuren sind leichter durch Sauerstoff und dessen reaktive Spezies zu oxidieren als andere, was sich in einer unterschiedlichen Nutzungshäufigkeit dieser Aminosäuren in Bereichen hoher oxidativer Belastung widerspiegeln könnte. Um den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren in Proteinen zu untersuchen, wurden fünf Modelle der oxidativen Belastung untersucht. Dazu wurden Organellen und Kompartimente oder deren Teilmengen definiert, die in Bezug auf Sauerstoff und dessen reaktive Spezies eine prägnante Rolle spielen. Folgende Modelle wurden für den Vergleich der differentiellen Aminosäurenutzung ausgewählt:

- I) Peroxisomale Proteine versus zelluläre Proteine bei vier Tierarten
- II) Mitochondrial lokalisierte Proteine versus zelluläre Proteine bei 20 Tierarten
- III) Mitochondrial kodierte Proteine versus mitochondrial lokalisierte Proteine bei 20 Tierarten
- IV<sub>a</sub>) Veränderungen der Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren bei lang- versus kurzlebigen Tieren in Bezug auf die Modelle II und III
- IV<sub>b</sub>) Korrelation der Aminosäurenutzung in den Modellen II und III zu den maximalen Lebensspannen
- V) Unterschiede in der Aminosäurenutzung in mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette zwischen aeroben und anaeroben Tierarten

In den Abbildungen 7, 8 und 9 sind auf der X-Achse die proteinogenen Aminosäuren und auf der Y-Achse die jeweilige faktorielle Depletion / Akkumulation aufgetragen. Mathematisch wurde bei einer Anreicherung die Formel *Paradigma / Kern* und bei einer Verminderung die Formel  $-(\text{Kern} / \text{Paradigma})$  angewandt. Die faktorielle Darstellung verdeutlicht das Ausmaß der Verhältnisse der Nutzung einer Aminosäure, wobei die Daten der maximalen Lebensspanne nach absteigend geordnet sind.

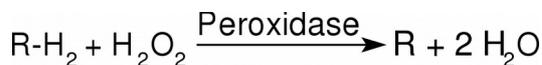
### 5.1.1 Vergleich von peroxisomalen zu zellulären Proteinen

Als erstes Modell wurde das Peroxisom im Vergleich zu der gesamten Zelle gewählt (Abbildung 7), eine Organelle, die vor allem in Leberzellen vorkommt und dort für den oxidativen Abbau von Fettsäuren, Ethanol und anderen Verbindungen verantwortlich ist. So findet exklusiv in den Peroxisomen, im Zuge des Fettabbaus, die  $\beta$ -Oxidation sehr langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren statt. Neben der  $\beta$ -Oxidation sind folgende Stoffwechselwege nur im Peroxisom vorzufinden: Die  $\alpha$ -Oxidation von Phytansäure; die Biosynthese von Plasmalogenen; die Konjugation von Cholsäure im Rahmen der Gallensäuresynthese. Da die beteiligten Monooxygenasen und Oxidasen molekularen Sauerstoff als Co-Substrat verwenden kommt es zur Bildung von Wasserstoffperoxid, einem sehr starken Oxidationsmittel. Zum Abbau existieren zwei Wege:

1. via Katalase:



2. via Peroxidase:



Das Peroxisom ist somit ein akzeptiertes Modell für subzellulären oxidativen Stress (Schrader and Fahimi, 2004). Abbildung 7 zeigt die faktorielle Akkumulation (grün) bzw. Depletion (rot) der 20 Aminosäuren im Vergleich von peroxisomalen zu zellulären Proteinen in vier Arten. Um Veränderungen in der Aminosäurenutzung zwischen Peroxisom und dem zellulären Durchschnitt zu ermitteln, wurden von vier Tieren die peroxisomalen Proteinsequenzen mit sämtlichen bekannten Sequenzen des Proteoms verglichen. Da nur wenige peroxisomale Sequenzen in den Datenbanken verfügbar sind, wurde die Untersuchung auf Homo sapiens, Bos taurus, Mus musculus und Rattus norvegicus beschränkt. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass die Nutzung der Aminosäure Cystein am stärksten vermindert ist, wohingegen die anderen redox-aktiven Aminosäuren, Methionin, Tryptophan und Tyrosin gegenüber dem zellulären Durchschnitt leicht angereichert sind. Da die Anzahl der untersuchten Spezies relativ gering ist und alle hier analysierten Tiere Mammalia darstellen, muss im Weiteren ein systematischer Spezieseffekt ausgeschlossen werden.

### Peroxisomale Proteine / zelluläre Proteine

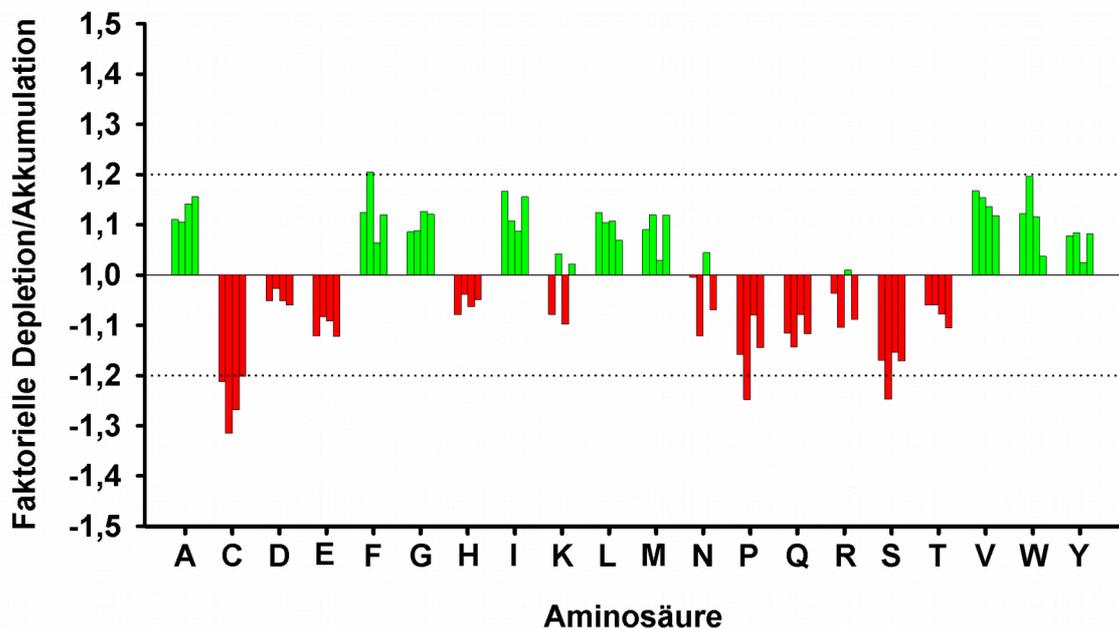


Abbildung 7: Verhältnisse der Aminosäureverteilung zwischen peroxisomalen und zellulären Proteinen bei 4 Arten (von links nach rechts: Homo sapiens, Bos taurus, Mus musculus, Rattus norvegicus).

#### 5.1.2 Vergleich von mitochondrialen zu zellulären Proteinen

Als Modell zwei und drei (Abbildung 8 und Abbildung 9) diente das Verhältnis der Aminosäurenutzung in mitochondrial kodierten Proteine im Vergleich zu zellulären Proteine bzw. mitochondrial kodierten Proteine im Vergleich zu mitochondrial lokalisierten Proteine. Einige Besonderheiten des Mitochondriums sind, dass es als Hauptbildungsort für oxidative Sauerstoffspezies gilt (Brand, 2010), und dass in den mitochondrial kodierten Proteinen von Komplex I die redox-aktive Aminosäure Cystein lebensspannenabhängig depletiert ist (Schindeldecker et al., 2011), wohingegen das ebenfalls redox-aktive Methionin dort unabhängig von der maximalen Lebensspanne angereichert ist (Bender et al., 2008). Dies macht das Mitochondrium zu einem prominenten Modell, an dem evolutionäre Adaptationen an die oxidative Belastung und eine daraus möglicherweise resultierende differenzierte Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren studiert werden können.

### Mitochondriale Proteine / zelluläre Proteine

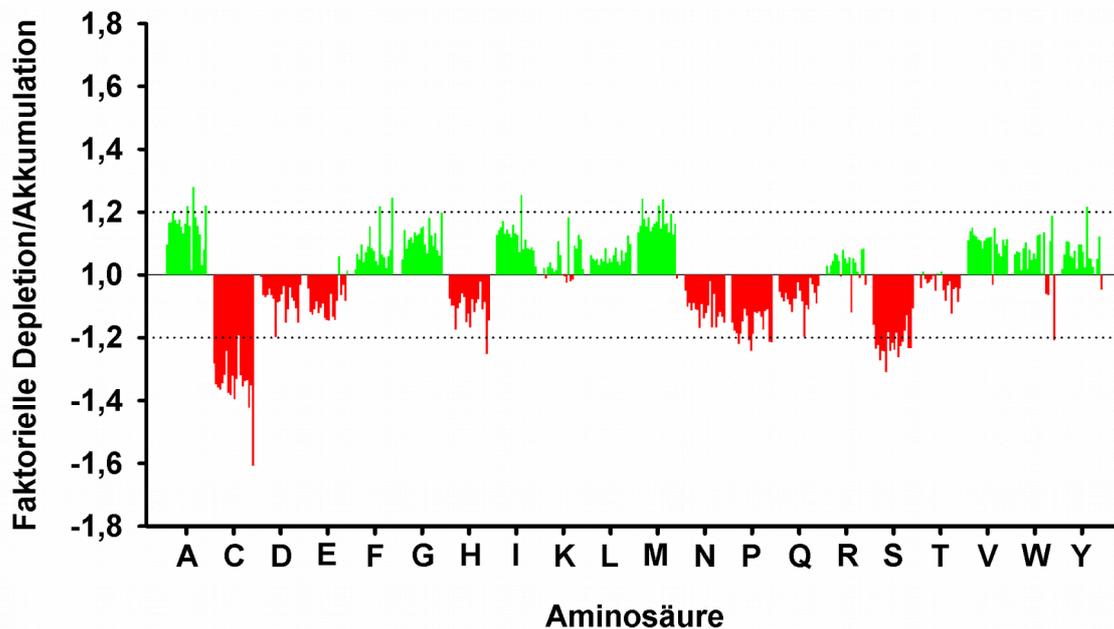


Abbildung 8: Verhältnisse der Depletion bzw. Akkumulation von Aminosäuren zwischen mitochondrialen und zellulären Proteinsequenzen in 20 Arten (siehe Materialteil). Spezies sind von links nach rechts der Lebensspanne absteigend angeordnet.

In diesem Modell der oxidativen Belastung (Abbildung 8) ist der faktorielle Unterschied in der Nutzung von Aminosäuren in mitochondrialen Proteinen im Verhältnis zu zellulären Proteinen aufgetragen. Insgesamt sind die Unterschiede in der Aminosäurenutzung etwas stärker ausgeprägt als in peroxisomalen Proteinen. In diesem Modell ist die redox-aktive Aminosäure Cystein am deutlichsten depletiert. Im Vergleich zu peroxisomalen Proteinen ist die Nutzung von Cystein in mitochondrialen Proteinen bis zu 40 % stärker vermindert. Redox-aktives Methionin hingegen ist diejenige Aminosäure, welche generell die stärkste Zunahme gegenüber dem zellulären Durchschnitt zeigt. Die gemeinsamen Merkmale der zwei am stärksten veränderten Aminosäuren sind also, dass beide redox-aktiv sind und jeweils ein Schwefelatom in ihrer Molekülstruktur tragen. Die Nutzungshäufigkeit von Tyrosin und Tryptophan ist in mitochondrialen Proteinen leicht erhöht.

#### 5.1.3 Vergleich von mitochondrial kodierten zu mitochondrial lokalisierten Proteinen

Das Diagramm in Abbildung 9 zeigt die Ratio der Nutzungshäufigkeiten der proteinogenen Aminosäuren zwischen mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette und den mitochondrial lokalisierten Proteinen.

sierten Proteinen im Allgemeinen.

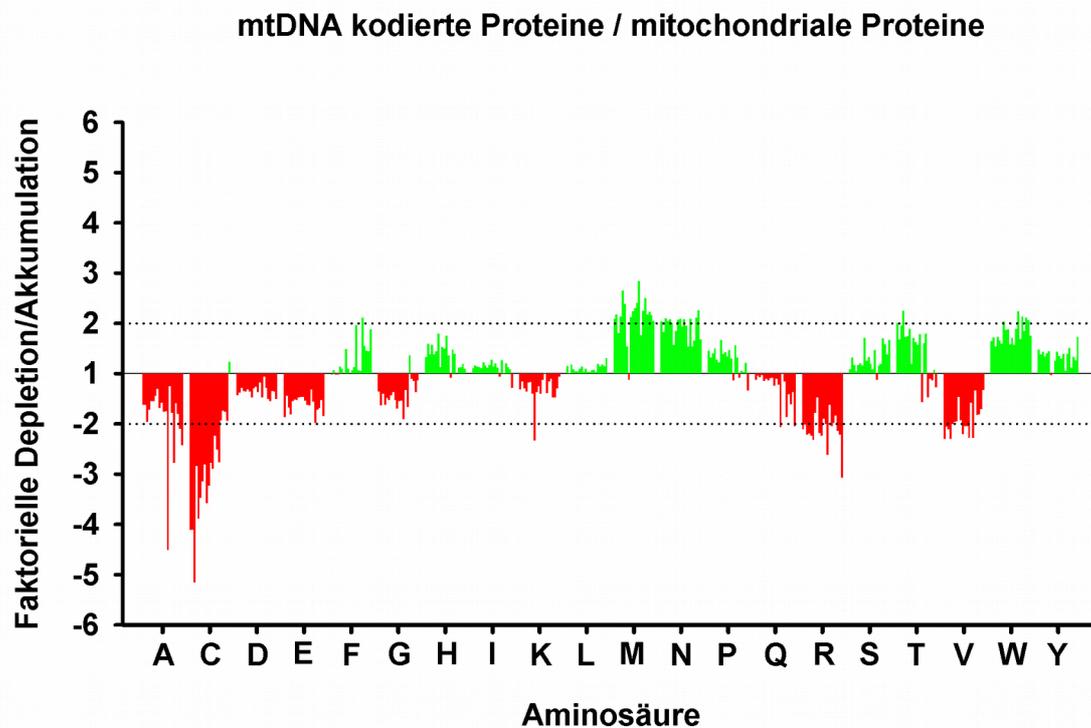


Abbildung 9: Verhältnisse der Depletion bzw. Akkumulation von Aminosäuren zwischen mitochondrial kodierten und mitochondrial lokalisierten Proteinen in 20 Arten (siehe Materialteil). Spezies sind von links nach rechts der Lebensspanne absteigend angeordnet.

Die beobachteten Veränderungen in der Nutzung von Aminosäuren in mitochondrial kodierten Proteinen sind gegenüber den anderen Modellen am stärksten ausgeprägt. Methionin ist in diesem Modell wiederum am deutlichsten akkumuliert. Die Nutzung von Tryptophan ist auch erhöht, allerdings nicht so stark wie bei Methionin. Vor allem Cystein zeigt hier das charakteristische Merkmal der Depletion in mitochondrial kodierten Proteinen auf. So ist Cystein in diesen Proteinen bei langlebigen Tieren stärker abgereichert als bei kurzlebigen Tieren (Moosmann and Behl, 2008; Schindeldecker et al., 2011), es war jedoch nicht bekannt, dass dieser Effekt sich auch in den mitochondrial importierten Proteinen wieder spiegelt. Besonders die Depletion in Komplex I scheint der Träger dieser lebensspannenabhängigen Abreicherung von Cystein zu sein. In Abbildung 9 sind die Tierarten von links nach rechts der maximalen Lebensdauer nach absteigend dargestellt. Die Daten zeigen deutlich die lebensdauerabhängige Depletion von Cystein in mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette. Ein ähnlicher Effekt, allerdings nicht so deutlich ausgeprägt, ist bei Threonin zu erkennen. Im Gegensatz zu Cystein steigt bei Threonin die Nutzungshäufigkeit lebensspannenab-

hängig in mitochondrialen Proteinen an, wobei das Signal in den mitochondrial kodierten Proteinen stärker ist, als in den mitochondrial importierten Proteinen. Dieser Effekt wurde bereits an anderer Stelle erkannt und beschrieben (Kitazoe et al., 2008).

#### 5.1.4 Verhältnisse und Korrelationen der Aminosäurenutzung bei den untersuchten Tierarten

Für eine genauere Interpretation der Ergebnisse folgen hier nun die quantitativen und statistischen Analysen der in den Abbildungen 7, 8 und 9 gezeigten Daten. In Tabelle 8 ist das Verhältnis der Nutzungshäufigkeit der verschiedenen Aminosäuren in den drei Modellen der oxidativen Belastung dargestellt. Daneben ist die jeweilige statistische Auswertung aufgetragen, die mittels einer einfaktoriellem, nicht-parametrischen Varianzanalyse berechnet wurde.

Aminosäure	Peroxisom (I)		Mitochondrium (II)		Atmungskette (III)	
	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>
A	<b>1,13</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,15</b>	<i>3E-05</i>	<b>0,57</b>	<i>1E-07</i>
C	<b>0,80</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,74</b>	<i>1E-07</i>	<b>0,41</b>	<i>1E-07</i>
D	<b>0,95</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,93</b>	<i>4E-04</i>	<b>0,74</b>	<i>2E-07</i>
E	<b>0,91</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,92</b>	<i>2E-06</i>	<b>0,63</b>	<i>6E-08</i>
F	<b>1,13</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,08</b>	<i>5E-05</i>	<b>1,28</b>	<i>1E-02</i>
G	<b>1,11</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,12</b>	<i>4E-04</i>	<b>0,73</b>	<i>1E-06</i>
H	<b>0,95</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,90</b>	<i>3E-06</i>	<b>1,36</b>	<i>3E-05</i>
I	<b>1,13</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,12</b>	<i>2E-03</i>	<b>1,12</b>	<i>4E-03</i>
K	<b>0,98</b>	<i>4E-01</i>	<b>1,04</b>	<i>2E-01</i>	<b>0,79</b>	<i>4E-05</i>
L	<b>1,10</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,06</b>	<i>6E-03</i>	<b>1,11</b>	<i>2E-07</i>
M	<b>1,09</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,16</b>	<i>1E-06</i>	<b>2,14</b>	<i>2E-07</i>
N	<b>0,97</b>	<i>2E-01</i>	<b>0,90</b>	<i>8E-03</i>	<b>1,93</b>	<i>9E-08</i>
P	<b>0,87</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,86</b>	<i>3E-04</i>	<b>1,28</b>	<i>3E-03</i>
Q	<b>0,90</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,93</b>	<i>4E-04</i>	<b>0,81</b>	<i>2E-05</i>
R	<b>0,95</b>	<i>4E-02</i>	<b>1,03</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,49</b>	<i>6E-08</i>
S	<b>0,84</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,82</b>	<i>6E-08</i>	<b>1,29</b>	<i>3E-06</i>
T	<b>0,93</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,97</b>	<i>1E-01</i>	<b>1,48</b>	<i>7E-03</i>
V	<b>1,14</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,10</b>	<i>1E-06</i>	<b>0,53</b>	<i>6E-08</i>
W	<b>1,12</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,05</b>	<i>3E-02</i>	<b>1,81</b>	<i>6E-08</i>
Y	<b>1,07</b>	<i>2E-02</i>	<b>1,06</b>	<i>1E-02</i>	<b>1,33</b>	<i>6E-06</i>

Tabelle 8: Numerische Auswertung der Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren in den Modellen I, II und III (einfaktorielle, nicht-parametrische Varianzanalyse).

\* Der Begriff Ration beschreibt das Verhältnis der Mittelwerte.

Die in Tabelle 8 gezeigte quantitative Analyse bestätigt zumindest in Teilen das visuelle Bild der Abbildungen 7, 8 und 9. Dabei ist die mittlere Abweichung und auch die Signifikanz in den mit-

ochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette sichtlich am stärksten ausgeprägt, wobei aber in diesen Proteinen auch die größte Streuung der Daten auftritt. Die berechneten p-Werte eignen sich aber nicht dazu, verallgemeinerte Aussagen zu tätigen, inwiefern eine Änderung biologisch signifikant ist, sondern diente nur dazu, die einzelnen Aminosäuren untereinander zu vergleichen, da nicht klar ist, ab welchem p-Wert ein Sachverhalt als biologisch signifikant zu betrachten ist.

### **5.1.5 Nutzung von Aminosäuren in mitochondrial lokalisierten und kodierten Proteinen bei lang- und kurzlebigen Tieren**

Wie in der Literatur beschrieben und auch in Abbildung 9 zu erkennen ist, nimmt die Nutzungshäufigkeit von Cystein in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette mit steigender maximaler Lebensdauer ab (Moosmann and Behl, 2008; Schindeldecker et al., 2011). Nach Harman produziert ein Lebewesen zeitlebens freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, welche sukzessiv akkumulieren und so den Phänotyp des Alterns auslösen (Harman, 1956). Es wird spekuliert, dass langlebige Tiere ihren Metabolismus an diesen Druck angepasst haben (Barja, 2002). Somit stellt die Langlebigkeit bei aerob lebenden Tieren ein weiteres Modell der oxidativen Belastung dar. Deshalb wurde in den nachfolgenden zwei Tabellen der Faktor Langlebigkeit mit einbezogen und mit der Aminosäurenutzung in den mitochondrial lokalisierten Proteinen (Modell II) respektive den Proteinen der Atmungskette (Modell III) gegenüber den zellulären Proteinen in Relation gebracht (Modell IV). Es wurden diesen beiden Modelle gewählt, da möglicherweise eine Anpassung an die erhöhte oxidative Belastung genau in den Bereichen stattgefunden hat, in denen laut Literatur die meisten reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikale gebildet werden und damit auch deren Konzentration dort am höchsten ist (Han et al., 2001; Li, 2003; Tahara et al., 2009).

Die in Tabelle 9 gezeigte Gruppenanalyse vergleicht 10 kurz- mit 10 langlebigen Tieren mittels einer nicht-parametrischen Varianzanalyse. Diese Methode liefert bei gegebener Streuung eine hohe Signifikanz, wenn die absoluten Abweichungen groß sind. Wiederum ist Cystein diejenige Aminosäure, welche am signifikantesten in Bezug zur maximalen Lebensspanne variiert: Die lebensspannenabhängige Depletion der Aminosäure Cystein in der mitochondrialen Atmungskette gegenüber dem zellulären Mittelwert aller Proteine erzeugt in diesem Modell mit einem faktoriellen Wert von 0,53 und einer Signifikanzniveau von  $3e^{-04}$  das stärkste beobachtete Signal in dieser bioinformatischen Sequenzanalyse auf.

Gruppe lang- vs. kurzlebig	Mitochondrium (II)		Atmungskette (III)	
	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>
A	<b>1,01</b>	<i>8E-01</i>	<b>1,22</b>	<i>2E-02</i>
C	<b>1,02</b>	<i>6E-01</i>	<b>0,53</b>	<i>3E-04</i>
D	<b>1,01</b>	<i>8E-01</i>	<b>1,00</b>	<i>5E-01</i>
E	<b>0,96</b>	<i>2E-01</i>	<b>1,04</b>	<i>2E-01</i>
F	<b>0,99</b>	<i>4E-01</i>	<b>0,74</b>	<i>2E-02</i>
G	<b>1,00</b>	<i>1E-00</i>	<b>0,84</b>	<i>3E-01</i>
H	<b>1,01</b>	<i>8E-01</i>	<b>1,17</b>	<i>3E-02</i>
I	<b>1,04</b>	<i>3E-03</i>	<b>1,06</b>	<i>3E-01</i>
K	<b>0,97</b>	<i>8E-01</i>	<b>0,92</b>	<i>5E-01</i>
L	<b>0,98</b>	<i>3E-01</i>	<b>0,97</b>	<i>5E-01</i>
M	<b>1,01</b>	<i>8E-01</i>	<b>0,88</b>	<i>2E-01</i>
N	<b>1,01</b>	<i>3E-01</i>	<b>1,04</b>	<i>6E-01</i>
P	<b>0,98</b>	<i>2E-01</i>	<b>1,22</b>	<i>3E-02</i>
Q	<b>1,00</b>	<i>9E-01</i>	<b>1,27</b>	<i>1E-02</i>
R	<b>1,02</b>	<i>6E-01</i>	<b>1,02</b>	<i>6E-01</i>
S	<b>0,97</b>	<i>1E-01</i>	<b>0,93</b>	<i>4E-01</i>
T	<b>1,03</b>	<i>3E-02</i>	<b>1,52</b>	<i>7E-03</i>
V	<b>1,03</b>	<i>2E-01</i>	<b>0,88</b>	<i>1E-01</i>
W	<b>1,02</b>	<i>8E-01</i>	<b>0,91</b>	<i>7E-02</i>
Y	<b>1,01</b>	<i>3E-01</i>	<b>0,98</b>	<i>8E-01</i>

Tabelle 9: Modell IV<sub>a</sub>: Veränderungen der Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren bei lang- versus kurzlebigen Tieren in Bezug auf die Modelle II und III der oxidativen Belastung (einfaktorielle, nicht-parametrische Varianzanalyse).

\* Der Begriff Ration beschreibt das Verhältnis der Mittelwerte.

Es ist zu beobachten, dass in der differenzierten Aminosäurenutzung bei mitochondrialen Proteinen im Vergleich zu allen Proteinen nur ein minimaler Unterschied zwischen lang- und kurzlebigen Tieren besteht. Somit sind die Veränderungen in der Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren bei mitochondrial lokalisierten und cytosolischen Proteinen bei lang- und kurzlebigen Tierarten annähernd gleich. Bei der Nutzungshäufigkeit von Cystein und Threonin in Proteinen der Atmungskette wird deutlich, dass das Ausmaß der Veränderungen von der maximalen Lebensspanne abhängig ist.

In Tabelle 10 ist die zweite Variante der Lebensspannen-Auswertung gezeigt. Diese Variante besteht in einer Korrelation nach Gauss. Die Korrelation stellt den Bezug zur maximalen Lebensdauer her, wobei beide Variablen parametrischer, also linearer Natur sind. Dieses Modell liefert bevorzugt eine hohe Signifikanz, wenn die Streuung der Daten gering ist.

Korrelation zur Lebensspanne	Mitochondrium (II)		Atmungskette (III)	
	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>
A	<b>0,220</b>	<i>4E-01</i>	<b>0,370</b>	<i>1E-01</i>
C	<b>0,523</b>	<i>2E-02</i>	<b>-0,888</b>	<i>2E-07</i>
D	<b>0,220</b>	<i>4E-01</i>	<b>0,190</b>	<i>4E-01</i>
E	<b>-0,505</b>	<i>2E-02</i>	<b>0,215</b>	<i>4E-01</i>
F	<b>-0,175</b>	<i>5E-01</i>	<b>-0,651</b>	<i>2E-03</i>
G	<b>-0,082</b>	<i>7E-01</i>	<b>-0,436</b>	<i>5E-02</i>
H	<b>0,350</b>	<i>1E-01</i>	<b>0,535</b>	<i>2E-02</i>
I	<b>0,616</b>	<i>4E-03</i>	<b>0,502</b>	<i>2E-02</i>
K	<b>-0,375</b>	<i>1E-01</i>	<b>-0,131</b>	<i>6E-01</i>
L	<b>-0,636</b>	<i>3E-03</i>	<b>-0,554</b>	<i>1E-02</i>
M	<b>0,485</b>	<i>3E-02</i>	<b>-0,163</b>	<i>5E-01</i>
N	<b>0,353</b>	<i>1E-01</i>	<b>0,072</b>	<i>8E-01</i>
P	<b>0,020</b>	<i>9E-01</i>	<b>0,669</b>	<i>1E-03</i>
Q	<b>-0,154</b>	<i>5E-01</i>	<b>0,686</b>	<i>8E-04</i>
R	<b>0,053</b>	<i>8E-01</i>	<b>0,321</b>	<i>2E-01</i>
S	<b>-0,369</b>	<i>1E-01</i>	<b>-0,484</b>	<i>3E-02</i>
T	<b>0,490</b>	<i>3E-02</i>	<b>0,697</b>	<i>6E-04</i>
V	<b>0,219</b>	<i>4E-01</i>	<b>-0,562</b>	<i>1E-02</i>
W	<b>0,241</b>	<i>3E-01</i>	<b>-0,474</b>	<i>3E-02</i>
Y	<b>0,223</b>	<i>3E-01</i>	<b>-0,161</b>	<i>5E-01</i>

Tabelle 10: Modell IV<sub>b</sub>: Korrelation der Aminosäurenutzung in den Modellen II und III zu den maximalen Lebensspannen (einfaktorielle, parametrische Varianzanalyse; T-TEST).

\* Der Begriff Ration beschreibt das Verhältnis der Mittelwerte.

Die Korrelation der Aminosäurenutzungsänderung in mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette mit der maximalen Lebensspanne fällt bei Cystein am deutlichsten aus. So ist die Korrelation von Cystein am stärksten ( $r = -0,888$ ) und auch am signifikantesten ( $p = 2e^{-07}$ ). In dieser statistischen Variante erreichen auch kleine Tendenzen einen hohen Korrelationskoeffizienten und zum Teil auch einen niedrigen p-Wert, wenn die entsprechende Streuung in der Population gering ist. Dies ist bei der Aminosäure Leucin zu erkennen: Die Nutzungshäufigkeit von Leucin in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette besitzt einen Korrelationskoeffizienten von  $-0,554$ , aber nur eine geringe statistische Signifikanz ( $p = 1e^{-02}$ ), was einen nicht kausalen Zusammenhang vermuten lässt. Häufig wird angenommen, dass nur diejenigen Korrelationen biologisch signifikant sein können, die auf starken Abweichungen basieren, und nicht auf niedrigen Streuungen. Unter diesen Bedingungen wäre besonders Cystein in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette zu erwähnen, welches in beiden statistischen Verfahren eine signifikante Korrela-

tion und auch Variation mit der maximalen Lebensspanne aufweist.

### 5.1.6 Spezifität der beobachteten Aminosäure Lebensdauer - Korrelationen

Um die Robustheit der in Modell IV (Tabelle 10) beobachteten Korrelationen zu testen, wurden zwei in der Literatur weit verbreitete Korrekturverfahren angewendet. Dabei handelt es sich um die Korrektur der Daten nach Körpermasse, und die Korrektur nach phylogenetischer Interdependenz. Bei der Korrektur nach Körpermasse handelt es sich um eine einfache Partialkorrelation, die angewendet wird, um mögliche Einflüsse dieses Faktors auf das Korrelationsergebnis zu eliminieren. Das Ergebnis einer solchen Korrektur besagt, um wie viel spezifischer die Korrelation [Aminosäure – Lebensspanne] im Vergleich zur Korrelation [Aminosäure – Körpermasse] ist.

Bei der Korrektur nach phylogenetischer Interdependenz wird die Methode der unabhängigen Kontraste nach Felsenstein (Felsenstein, 1985) angewendet. Dabei handelt es sich um ein statistisches Verfahren, in dem jeweils nur Schwestergruppen miteinander verglichen werden. Es ist ein Verfahren, das auf einem Spezialfall der Methode der kleinsten Quadrate beruht und die Topologie und die Astlängen des phylogenetischen Baumes berücksichtigt. Im vorliegenden Fall wurden alle Astlängen des phylogenetischen Baumes auf „1“ gesetzt, da unterschiedliche Angaben in der Literatur zu finden sind, was einen ungünstigen Einfluss auf die Berechnungen ergeben hätte.

In Tabelle 11 sind die Körpermassen- und phylogenetische Korrektur der Korrelation der differentiellen Aminosäurenutzung in den mitochondrial kodierten versus lokalisierten Proteinen bei 20 Tierarten dargestellt.

Korrelation	Rohdaten		Körpermassen-korrektur		Phylogenetische Korrektur	
	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>
A	<b>0,370</b>	<i>1E-01</i>	<b>-0,099</b>	<i>7E-01</i>	<b>0,063</b>	<i>8E-01</i>
C	<b>-0,888</b>	<i>2E-07</i>	<b>-0,162</b>	<i>5E-01</i>	<b>-0,791</b>	<i>6E-05</i>
D	<b>0,190</b>	<i>4E-01</i>	<b>-0,150</b>	<i>5E-01</i>	<b>-0,161</b>	<i>5E-01</i>
E	<b>0,215</b>	<i>4E-01</i>	<b>-0,131</b>	<i>6E-01</i>	<b>0,281</b>	<i>2E-01</i>
F	<b>-0,651</b>	<i>2E-03</i>	<b>0,234</b>	<i>3E-01</i>	<b>-0,170</b>	<i>5E-01</i>
G	<b>-0,436</b>	<i>5E-02</i>	<b>0,084</b>	<i>7E-01</i>	<b>-0,434</b>	<i>6E-02</i>
H	<b>0,535</b>	<i>2E-02</i>	<b>-0,286</b>	<i>2E-01</i>	<b>-0,011</b>	<i>1E-00</i>
I	<b>0,502</b>	<i>2E-02</i>	<b>-0,020</b>	<i>9E-01</i>	<b>0,619</b>	<i>5E-03</i>
K	<b>-0,131</b>	<i>6E-01</i>	<b>-0,221</b>	<i>4E-01</i>	<b>-0,375</b>	<i>1E-01</i>
L	<b>-0,554</b>	<i>1E-02</i>	<b>0,104</b>	<i>7E-01</i>	<b>-0,519</b>	<i>2E-02</i>
M	<b>-0,163</b>	<i>5E-01</i>	<b>-0,285</b>	<i>2E-01</i>	<b>-0,379</b>	<i>1E-01</i>

Korrelation	Rohdaten		Körpermassenkorrektur		Phylogenetische Korrektur	
	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>	Ratio*	<i>p</i>
N	<b>0,072</b>	<i>8E-01</i>	<b>-0,520</b>	<i>2E-02</i>	<b>-0,141</b>	<i>6E-01</i>
P	<b>0,669</b>	<i>1E-03</i>	<b>0,059</b>	<i>8E-01</i>	<b>0,412</b>	<i>8E-02</i>
Q	<b>0,686</b>	<i>8E-04</i>	<b>-0,081</b>	<i>7E-01</i>	<b>0,292</b>	<i>2E-01</i>
R	<b>0,321</b>	<i>2E-01</i>	<b>0,325</b>	<i>2E-01</i>	<b>0,473</b>	<i>4E-02</i>
S	<b>-0,484</b>	<i>3E-02</i>	<b>-0,007</b>	<i>1E-00</i>	<b>0,177</b>	<i>5E-01</i>
T	<b>0,697</b>	<i>6E-04</i>	<b>-0,247</b>	<i>3E-01</i>	<b>0,145</b>	<i>6E-01</i>
V	<b>-0,562</b>	<i>1E-02</i>	<b>0,019</b>	<i>9E-01</i>	<b>-0,577</b>	<i>1E-02</i>
W	<b>-0,474</b>	<i>3E-02</i>	<b>0,133</b>	<i>6E-01</i>	<b>-0,028</b>	<i>9E-01</i>
Y	<b>-0,161</b>	<i>5E-01</i>	<b>-0,369</b>	<i>1E-01</i>	<b>-0,564</b>	<i>1E-02</i>
Körpermasse	<b>0,933</b>	<i>2E-09</i>	-	-	<b>0,886</b>	<i>5E-07</i>

Tabelle 11: Körpermassenkorrektur, phylogenetische Korrektur und direkte Korrelation der Langlebigkeit mit der Aminosäurenutzung in Atmungskettenproteinen gegenüber mitochondrial lokalisierten Proteinen in 20 Tierarten.

\* Der Begriff Ration beschreibt das Verhältnis der Mittelwerte.

In den in Tabelle 11 untersuchten 20 Arten zeigen in der statistischen Auswertung der Rohdaten 17 Aminosäuren eine signifikante Änderung in ihrer Nutzungshäufigkeit. Nach Korrektur mit der jeweiligen Körpermasse zeigen acht Aminosäuren eine signifikante Korrelation. Nur Cystein weist nach phylogenetischer Korrektur eine signifikante Korrelation zwischen differentieller Nutzung und der maximalen Lebensspanne auf. Die Korrelation von Körpermasse mit maximaler Lebensspanne (de Magalhaes, 2005) behält auch nach phylogenetischer Korrektur ihre Signifikanz. Innerhalb dieser Analyse konnte auch die in der Literatur beschriebene positive Korrelation zwischen der Langlebigkeit und der Nutzungshäufigkeit von Methionine in mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette beobachtet werden (Aledo et al., 2011). Dieses Ergebnis behielt, wie bei Aledo et al., auch nach den zwei getätigten Korrekturen seine statistische Signifikanz. Zu beachten ist allerdings, dass die Analyse von Aledo et al. lediglich die Tierklasse der Säugetiere beinhaltete, wohingegen in dieser Arbeit mehrere unterschiedliche Tierklassen mit einbezogen worden sind.

Eine detaillierte Studie der Korrelation der Aminosäurenutzung in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette mit der Langlebigkeit in 218 Tierarten ist zusätzlich mit den entsprechenden Korrekturen zur Körpermasse und Phylogenie im Appendix zu finden.

### 5.1.7 Vergleich der Aminosäurenutzung in Proteinen der Atmungskette von freilebenden, aeroben versus parasitären, anaeroben Helminthen

Um den evolutionären Einfluss von Sauerstoffkonsum auf die Nutzung von Aminosäuren zu analysieren, wurden zwei Gruppen von Helminthen gebildet, die teilweise entfernt verwandt miteinander sind. Diese Gruppierung stellt keine korrekte phylogenetische Einteilung dar, sondern bildet eine vergleichbare Menge an aeroben und anaeroben Tieren mit einer sich gleichenden Morphologie. So sind alle diese Tiere durch konvergente Evolution einander so ähnlich, dass eine Gruppierung als Würmer oder Helminthen zu vergleichenden Zwecken erfolgen kann (Díaz and Allen, 2007; Moore and Willmer, 2007; Poulin, 2011). Damit ergibt sich aus diesen gebildeten Gruppen der wirbellosen Tiere die Möglichkeit, Adaptationen an eine aerobe bzw. anaerobe Lebensweise bezüglich ihrer Aminosäurenutzung zu studieren.

In der nachfolgenden Tabelle ist die differenzierte Aminosäurenutzung in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette zwischen aeroben und anaeroben „Würmern“ dargestellt (Modell V). Im Gegensatz zu den Intraspeziesvergleichen in den Abbildungen 7, 8 und 9 folgt hier ein interspeziesvergleich zwischen insgesamt 86 aeroben und anaeroben Plathelminthen und Nematoden. Dieser Vergleich dient dazu, den möglichen Einfluss von Sauerstoff auf die differenzierte Aminosäurenutzung in den mitochondrial kodierten Proteinen einer Gruppe genauer zu untersuchen. Dafür bietet sich die heterogene Gruppe der Würmer an, da in dieser Gruppe sowohl parasitäre, anaerobe, als auch freilebende, aerobe Vertreter vorkommen. Es ist zu beachten, dass manche Parasiten im juvenilen Stadium freilebend sind und damit auch Sauerstoff respirieren, dies aber im adulten parasitären Stadium nicht mehr der Fall ist. Deshalb besitzen diese Tiere im adulten Stadium noch immer Mitochondrien, die aber aufgrund ihres parasitären und anaeroben Lebensstils nicht mehr zur Energiegewinnung benötigt werden (Gems, 2000; Saz, 1981).

Nutzung	Aerobizität (V)	
	Ratio*	<i>p</i>
A	<b>1,77</b>	<i>6E-05</i>
C	<b>0,43</b>	<i>9E-10</i>
D	<b>0,84</b>	<i>1E-05</i>
E	<b>0,99</b>	<i>6E-01</i>
F	<b>0,82</b>	<i>8E-05</i>
G	<b>0,83</b>	<i>8E-06</i>
H	<b>1,35</b>	<i>4E-11</i>
I	<b>1,16</b>	<i>1E-03</i>

<b>Nutzung</b>	<b>Aerobizität (V)</b>	
K	<b>1,39</b>	<i>5E-05</i>
L	<b>1,01</b>	<i>6E-01</i>
M	<b>1,51</b>	<i>2E-06</i>
N	<b>1,16</b>	<i>1E-02</i>
P	<b>1,63</b>	<i>5E-09</i>
Q	<b>1,77</b>	<i>9E-12</i>
R	<b>1,04</b>	<i>2E-01</i>
S	<b>0,93</b>	<i>5E-05</i>
T	<b>1,68</b>	<i>1E-09</i>
V	<b>0,58</b>	<i>3E-12</i>
W	<b>1,03</b>	<i>6E-01</i>
Y	<b>0,68</b>	<i>2E-11</i>

Tabelle 12: Modell V: Nutzungshäufigkeit von Aminosäuren in mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette in freilebenden, aeroben versus parasitären, anaeroben Helminthen. (einfaktorielle, nicht-parametrische Varianzanalyse mit zwei Kategorien).

\* Der Begriff Ration beschreibt das Verhältnis der Mittelwerte.

Vergleicht man die differenzierte Aminosäurenutzung in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette zwischen aeroben und anaeroben Würmern, fällt auf, dass Cystein die stärkste mittlere Veränderung in Form einer Abreicherung zeigt (Tabelle 12). Die höchste Signifikanz zeigt allerdings Histidin, was somit auf die geringe Streuung der Datenpunkte zurückzuführen ist. Die Nutzungshäufigkeit von Methionin hingegen zeigt innerhalb der untersuchten Tierarten eine hohe Streuung, die verbunden mit einer hohen mittleren Abweichung statistisch eine mittlere Signifikanz liefert. Da die Streuung der Aminosäure Valin gering ist, ergibt sich bei ihr die signifikanteste Veränderung in diesem Modell.

### 5.1.8 Ranking-Analyse der beobachteten Aminosäureveränderungen in allen fünf Modellen

Zusammenfassend ist in der nachfolgenden Tabelle 13 die Rangliste der Veränderungen innerhalb der Aminosäurenutzung in den fünf analysierten Modellen der oxidativen Belastung dargestellt. Dazu wurde mittels eines „Ranking“ die jeweilige Zunahme und Abnahme in der Nutzungshäufigkeit jeder Aminosäure in den 5 Modellen so dargestellt, dass die absolute Abweichung, und nicht die Signifikanz der Abweichung, als erstes Kriterium gilt und als zweites Kriterium dann das Vorzeichen der Veränderung berücksichtigt wird: Die Zahl steht für den Rang der absoluten Veränderung und die Farbe für das Vorzeichen der Veränderung, wobei grün als Zunahme und rot als Abnahme zu bewerten ist. Diese Form des „Rankings“ wurde so gewählt, um innerhalb der Relationen der 20 Aminosäuren mit den verschiedenen Modellen die Suche nach der biologischen Bedeutung der Veränderung leichter zu ermöglichen.

Rang	Peroxisom (I)	Mitochondrium (II)	Atmungskette (III)	Langlebigkeit (IV)	Aerobizität (V)
A	7	5	7	5	2
C	1	1	1	1	1
D	18	13	12	20	13
E	11	11	8	16	19
F	6	12	15	3	11
G	10	7	10	7	12
H	16	9	11	8	10
I	5	6	19	14	15
K	20	18	17	12	9
L	12	16	20	17	20
M	13	3	2	10	7
N	19	8	4	15	14
P	3	4	16	6	6
Q	9	14	18	4	3
R	17	20	3	18	17
S	2	2	14	13	16
T	14	19	9	2	5
V	4	10	5	9	4
W	8	17	6	11	18
Y	15	15	13	19	8

Tabelle 13: Rangfolge der Veränderungen in der Aminosäurenutzung in allen untersuchten Modellen der oxidativen Belastung. Rote Zahlen symbolisieren eine Abnahme, und grüne Zahlen eine Zunahme der jeweiligen Aminosäure in den untersuchten Modellen der oxidativen Belastung.

Die Tabelle 13 zeigt eine Sonderstellung von Cystein an: Cystein zeigt in allen fünf Modellen die größte Veränderung von allen 20 Aminosäuren und ist stets depletiert. Die Nutzung von Cystein ist in Proteinen des Peroxisoms, des Mitochondriums und der Atmungskette gegenüber dem zellulären Durchschnitt am stärksten reduziert. Darüber hinaus variiert die Abnahme von Cystein in mitochondrial kodierten Proteinen am stärksten mit der Langlebigkeit und der Aerobizität in den Proteinsequenzen der untersuchten Tierarten. In der Nutzungshäufigkeit von Methionin fällt auf, dass in mitochondrial lokalisierten und kodierten Proteinen Methionin stärker als alle anderen Aminosäuren angereichert ist. In Atmungskettenproteinen ist die Nutzung von Methionin am zweitstärksten verändert, und in Proteinen des Mitochondriums am drittstärksten. Eine deutliche Korrelation mit Langlebigkeit und Aerobizität kann bei Methionin nicht beobachtet werden. Die beiden anderen redox-aktiven Aminosäuren, Tyrosin und Tryptophan, verhalten sich eher unauffällig. Sie zeigen keine starken Veränderungen in den Modellen I, II und III und korrelieren auch nicht mit Langlebigkeit und Aerobizität.

Neben der Abreicherung von Cystein in den fünf Modellen der oxidativen Belastung fällt also vor allem die Aminosäure Methionin auf, welche in Proteinen des Mitochondriums signifikant akkumuliert ist. Um weitere Aussagen über diese differenzierte Anreicherung von Methionin und dessen Verwendungszweck in verschiedenen subzellulären Bereichen der Zelle treffen zu können, wurde eine Detailanalyse der Methioninnutzung in verschiedenen definierten Regionen im Proteom von *Homo sapiens* durchgeführt. Anschließend wurde die beobachtete Veränderung in der Nutzung von Cystein in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran experimentell untersucht, wobei der Schwerpunkt auf biochemischen und zellbiologischen Analysen lag.

## 5.2 Spezielle Analyse der differenzierten Methioninnutzung

Es ist postuliert worden, dass Methionin in Proteinen eine antioxidative Funktion innehat. Methionin ist eine schwefeltragende Aminosäure, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaft bevorzugt von z.B. ROS oxidiert wird und damit potentiell andere Aminosäuren vor einer Oxidation schützt. Diese Hypothese stützt sich auf den Tatsache, dass in zellulären Systemen die Oxidation von Methionin, welches besonders auf Proteinoberflächen auftritt, durch das Enzym Methioninsulfoxidreduktase rückgängig gemacht werden kann (Levine et al., 1996; Weissbach et al., 2005). Damit folgt die revidierbare Oxidation von Methionin der Definition von Antioxidantien: Eine niedermolekulare Substanz, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in geringen Konzentrationen im Vergleich

zu einem oxidierbaren Substrat, die Oxidation von diesem hemmt oder verlangsamt (Halliwell, 1990). Dabei ist zu beachten, dass neben den oxidierbaren Aminosäuren auch Zucker, DNA und Lipide als Substrate dienen können. Besonders interessant ist die Tatsache, dass eine Akkumulation von Methionin besonders in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran auftritt, was bei den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette durch das Vorhandensein zweier Methionincodons biologisch bedingt ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Akkumulation von Methionin in diesen Proteinen, und damit einhergehend auch die Verdoppelung des Methionincodons in der mitochondrialen DNA, kausal auf die Produktion und das vermehrte Auftreten von ROS in dieser Organelle bzw. Kompartiment zurückzuführen ist (Bender et al., 2008).

Deshalb war es von Interesse die Nutzung von Methionin in verschiedenen Kompartimenten bzw. Bereichen der menschlichen Zelle daraufhin zu untersuchen, ob eine topologisch spezifische Häufigkeit in der Nutzung dieser Aminosäure zu finden ist. Infolgedessen wurden humane Proteinsequenzen aus verschiedenen subzellulären Bereichen auf ihren Methioningehalt analysiert.

### 5.2.1 Vergleich der Methioninnutzung in verschiedenen subzellulären Bereichen

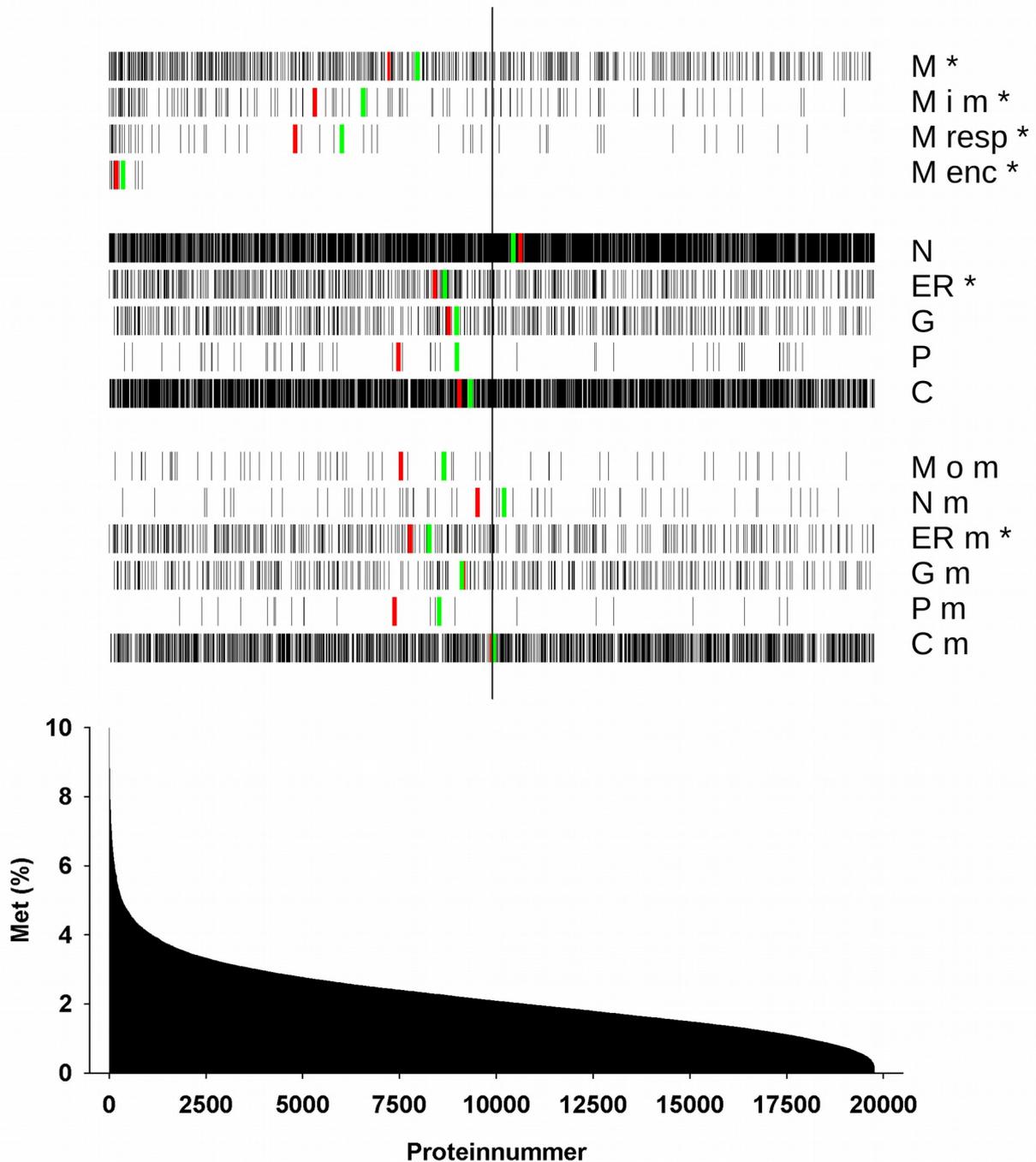


Abbildung 10: Nutzung von Methionin in humanen Proteinen in verschiedenen subzellulären Bereichen. Jeder vertikale Strich symbolisiert ein einzelnes Protein, dessen Position dem Rang in der unten dargestellten Verteilungskurve entspricht. Die grünen Striche stehen für den jeweiligen Durchschnitt, die roten für den jeweiligen Median der Methioninnutzung in den untersuchten Kompartimenten. Die durchgängige vertikale Linie kennzeichnet den globalen Median aller 19806 untersuchten Proteinsequenzen.

In Abbildung 10 ist die statistische Verteilung von Methionin in humanen Proteinen in diversen subzellulären Bereichen dargestellt. Folgende Abkürzungen wurden in Abbildung 10 und in Tabelle 14

verwendet: M = Mitochondrium, M i m = innere Mitochondrienmembran, M o m = äußere Mitochondrienmembran, M resp = Atmungskette, M enc = mitochondrial kodierte Proteine, N = Nucleus, ER = endoplasmatisches Retikulum, G = Golgi-Apparat, P = Peroxisom, C = Cytoplasma. In den letzten fünf Fällen repräsentiert das „m“ die Membranproteine des untersuchten Bereiches. Das Vorhandensein von Transmembranbereichen wurde für jede Proteinsequenz mittels des Programms TMHMM 2.0 einzeln bestimmt. Die quantitative und statistische Auswertung der Daten in Abbildung 10 sind in Tabelle 14 abgebildet, wobei die statistische Auswertung mittels einer einfaktoriellen, nicht-parametrischen Varianzanalyse erfolgte.

Die Verteilung von Methionin in den verschiedenen Kompartimenten bei Homo sapiens zeigt einen klaren Trend (Abbildung 10): So nimmt der Gehalt an Methionin sukzessive zu, je näher die analysierten Proteine an den Hauptproduktionsorten der reaktiven Sauerstoffspezies liegen. Laut Literatur sind die Mitochondrien die Organellen mit der höchsten ROS Produktion. Innerhalb der Mitochondrien ist die Konzentration von ROS an der inneren Mitochondrienmembran am höchsten und in der Matrix am geringsten (Brand, 2010). Beträgt die durchschnittliche Nutzungshäufigkeit von Methionin in allen mitochondrial lokalisierten Proteinen das 1,17-fache des zellulären Mittels, steigt dieser Wert in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran auf das 1,33-fache. In Proteinen der mitochondrialen Atmungskette liegt die durchschnittliche Nutzungshäufigkeit von Methionin bei dem 1,59-fachen und in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette sogar beim 2,61-fachen des zellulären Durchschnitts. In den anderen untersuchten Modellen ist keine deutliche Änderung in der Nutzungshäufigkeit von Methionin zu beobachten, weder in den Membranproteinen noch in den nicht-Membranproteinen.

Da Methionin eine hydrophobe Aminosäure darstellt ist ein erhöhtes Auftreten in hydrophoben Bereichen zu erwarten, welche vor allem in Membran- und Transmembranproteinen vorkommen. Anhand der in Tabelle 14 dargestellten statistischen Daten wird diese ungleiche Verteilung deutlich: So enthalten die nicht-Transmembrandomänen aller untersuchten zellulären Proteine einen Methioningehalt von 2,08 % des zellulären Durchschnitts, wohin gegen die Membranbereiche dieser Proteine einen Methioningehalt von 2,94 % aufweisen. Die gesamte Konzentration von Methionin in allen zellulären Proteinen beträgt 2,11 %. Damit diese ungleiche Verteilung keine Einfluss auf die Berechnung hat, wurde in der Analyse zwischen Membran- und nicht-Membrandomänen der untersuchten Proteine unterschieden. Für die nachfolgenden Berechnungen wurden die jeweiligen Konzentrationen von Methionin in Membranbereichen (**b**), nicht-Transmembranbereichen (**c**) und in allen Proteinbereichen (**d**) auf 100 % gesetzt und die jeweilige Abweichung davon als faktorielle Ver-

änderung dieses Wertes kalkuliert. Zusätzlich wurde der in allen Modellen der jeweilige Membran-gehalt errechnet und in Prozentzahlen angegeben (*a*). Die statistische Auswertung (*e*) erfolgte durch eine nicht-parametrische Varianzanalyse gefolgt von Scheffe's post hoc test.

Bereich	TM-Domänen-gehalt <i>a</i>	Met in TM Domänen <i>b</i>	Met in nicht-TM Domänen <i>c</i>	Met ge-samt <i>d</i>	Statistische Signifikanz ( <i>p</i> ) <i>e</i>
Ges. Proteom	3,41 %	100 %	100 %	100 %	
		[2,94% <i>abs.</i> ]	[2,08% <i>abs.</i> ]	[2,11% <i>abs.</i> ]	
M	2,84 %	1,25	1,17	1,17	$9 \cdot 10^{-17}$
M i m	7,53 %	1,40	1,30	1,33	$9 \cdot 10^{-11}$
M resp	14,36 %	1,87	1,44	1,59	$2 \cdot 10^{-04}$
M enc	52,63 %	2,03	2,39	2,61	$1 \cdot 10^{-03}$
N	0,23 %	0,90	1,00	0,98	$2 \cdot 10^{-03}$
ER	8,85 %	0,95	1,09	1,10	$4 \cdot 10^{-04}$
G	4,68 %	1,04	1,06	1,06	$2 \cdot 10^{-01}$
P	2,15 %	0,86	1,09	1,08	$1 \cdot 10^{-00}$
C	0,32 %	0,91	1,04	1,03	$2 \cdot 10^{-03}$
M o m	4,12 %	0,94	1,17	1,16	$1 \cdot 10^{-00}$
N m	3,94 %	0,84	1,00	1,00	$1 \cdot 10^{-00}$
ER m	11,55 %	0,96	1,11	1,12	$5 \cdot 10^{-06}$
G m	6,28 %	1,04	1,05	1,07	$8 \cdot 10^{-01}$
P m	4,57 %	0,84	1,14	1,12	$1 \cdot 10^{-00}$
C m	8,99 %	0,96	0,96	0,98	$1 \cdot 10^{-00}$

Tabelle 14: Relativer Transmembrangehalt und faktorielle Änderungen in der Nutzung von Methionin in humanen Proteinen in verschiedenen zellulären Bereichen. Die statistische Signifikanz wurde mittels einer einfaktoriellen, nicht-parametrischen Varianzanalyse gefolgt von Scheffe's post hoc test berechnet.

In Tabelle 14 ist der Transmembrangehalt sowie die relative Nutzungshäufigkeit von Methionin in Proteinsequenzen der untersuchten zellulären Bereiche, im Vergleich zu allen untersuchten zellulären Proteinen bei Homo sapiens dargestellt. Das gesamte Proteom besteht zu 3,41 % aus Transmembrandomänen. Der Bereich mit den meisten Transmembrandomänen sind die mitochondrial kodierten Atmungskettenproteine (52,63 %), die mit den wenigsten sind die Proteine des Nukleus (0,23 %).

Die Nutzungshäufigkeit von Methionin in diesen Bereichen schwankt deutlich. In den Transmembrandomänen der im Mitochondrium lokalisierten Proteine liegt der Methioningehalt bei dem 1,25-fachen des aus dem zellulären Mittel errechneten Wertes, also eine Anreicherung von Methionin um 25 % gegenüber allen untersuchten zellulären Proteinen, während im Nukleus eine Abreicherung um das 0,90-fache, was 90 % des zellulären Mittels entspricht, zu beobachten ist. Der Gehalt von Methionin in Transmembrandomänen nimmt in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran um das 1,40-fache zu. In Proteinen der Atmungskette liegt die Anreicherung bei dem 1,87-fachen und in den mitochondrial kodierten Proteinen sogar bei dem 2,03-fachen des zellulären Durchschnitts. Diese Zunahme wird in den nicht-Membranbereichen der mitochondrial kodierten Proteinen noch deutlicher: Hier liegt die Akkumulation bei dem 2,39-fachen des zellulären Mittels. Damit ergibt sich eine 2,61-fache Anreicherung von Methionin in allen mitochondrial kodierten Proteinen im Vergleich zu den zellulären Proteinen.

In allen anderen analysierten Modellen der oxidativen Belastung kann keine Änderung in der Nutzungshäufigkeit von Methionin stärker als 14 % weder in den Membran- noch in den nicht-Membranbereichen beobachtet werden. Damit stellt diese oben genannte Anreicherung von Methionin ein Alleinstellungsmerkmal des Mitochondriums und im Besonderen der mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette dar.

### **5.2.2 Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette bei 361 Tierarten**

Da Methionin also im Menschen eine Akkumulation in Proteinen des Mitochondriums aufweist und speziell in mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette in vielen Spezies akkumuliert ist, wie z.B. *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Apis mellifera* etc. (Bender et al., 2008), wird im Folgenden die Methioninnutzung in den mitochondrial kodierten Proteinen der einzelnen Atmungskettenkomplexen im Detail analysiert. Es folgt auf die oben gezeigte Detailanalyse der Methioninnutzung in verschiedenen Kompartimenten bei *Homo sapiens* eine Analyse bei 361 Tierarten aus 16 Tiergruppen, in der die einzelnen Atmungskettenkomplexe auf ihren jeweiligen Methioningehalt hin untersucht wurden. Die Darstellung der Daten in Abbildung 11 wurde so gewählt, dass die Tierarten jeweils in dem ihnen zugehörigen Phylum gruppiert sind, wobei innerhalb jeder Gruppe eine alphabetische Reihenfolge, basierend auf den systematischen Namen, festgelegt wurde.

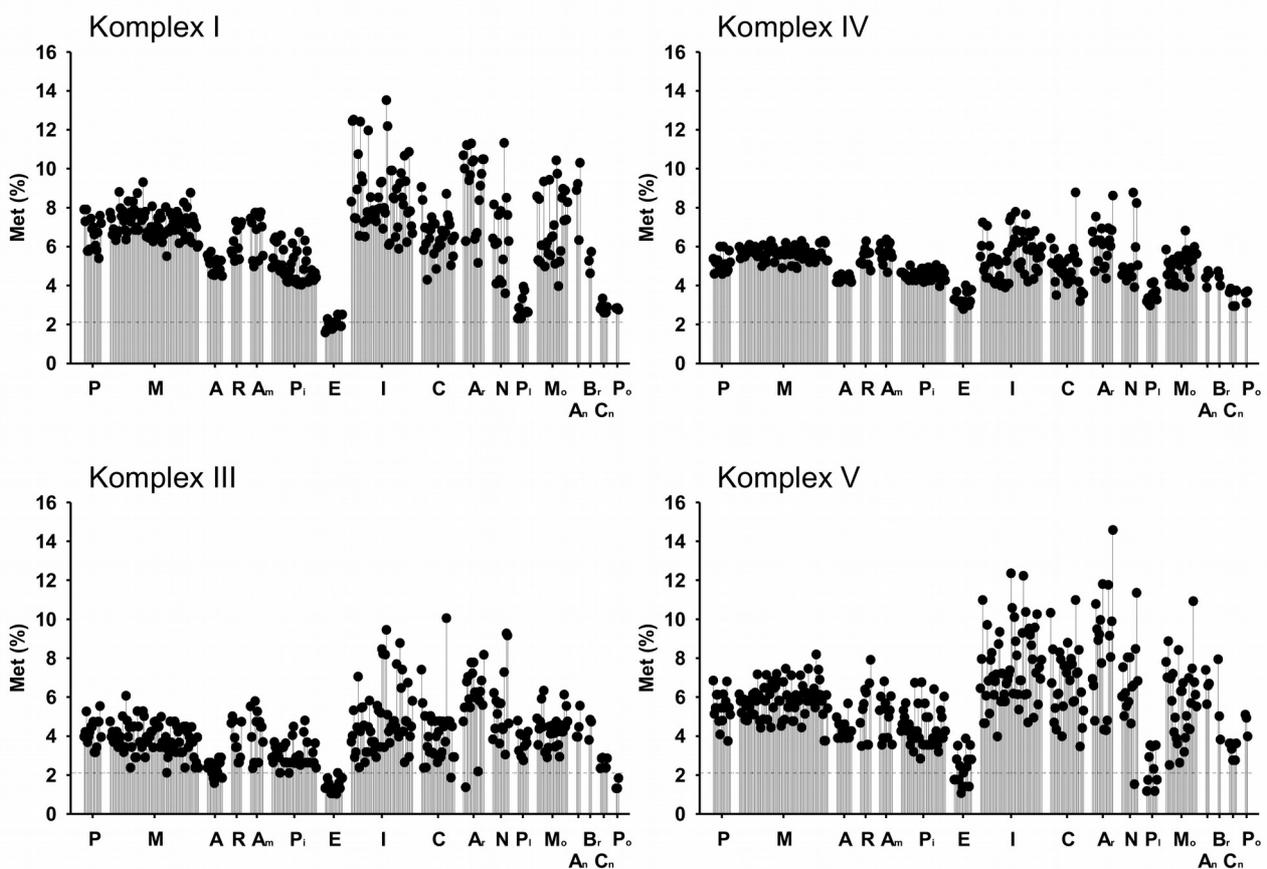


Abbildung 11: Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskettenkomplexe in 361 Tierarten. Folgende Abkürzungen wurden benutzt: P = Primaten; M = andere Mammalia; A = Aves; R = Reptilia; Am = Amphibia; Pi = Pisces; E = Echinodermata; I = Insecta; C = Crustacea; Ar = Arachnida; N = Nematoda; Pl = Plathelminthes; Mo = Mollusca; An = Annelida; Br = Brachiopoda; Cn = Cnidaria; Po = Porifera. Die gestrichelte Linie symbolisiert den durchschnittlichen Methioningehalt in nukleär kodierten Proteinen bei *Homo sapiens* (2,11 %).

In Abbildung 11 ist der Methioningehalt von den vier mitochondrial kodierten Proteinkomplexen in der Atmungskette bei 361 Tierarten aus 17 Tiergruppen bzw. Stämmen dargestellt. Um eine mögliche Sonderstellung der Primaten innerhalb der Mammalia gerecht zu werden, wurden diese gesondert betrachtet. Die dargestellte Methioninnutzung unterscheidet sich zum Teil deutlich zwischen den untersuchten Komplexen und den analysierten Phyla.

Erwähnenswert ist die ausgeprägte Heterogenität in der Methioninnutzung in den Komplexen I, III und V innerhalb der Invertebraten (Insecta, Crustacea, Arachnida, Nematoda, Mollusca und Annelida). Dieser Effekt kann auf die teilweise sehr unterschiedlichen Lebensweisen und Lebensräume innerhalb dieser Tierstämme zurück geführt werden. Dem entgegen zeigen Mammalia und Primaten in diesen drei Komplexen, aber auch in Komplex IV, eine deutliche Homogenität in der Nutzung von Methionin. Die nahe verwandtschaftliche Beziehung dieser Tierarten zueinander könnte möglicherweise für diesen Effekt mit verantwortlich sein.

In den Proteinen von Komplex I ist bei allen untersuchten Tierarten, bis auf Echinodermata, Plathelminthen, Cnidaria und Porifera, eine deutliche Erhöhung des Methioningehalts im Vergleich mit dem zellulären Durchschnitt von Homo sapiens (2,11 %) zu erkennen. Dabei kann die Nutzungshäufigkeit von Methionin um ein Vielfaches ansteigen: So liegt die durchschnittliche Nutzungshäufigkeit von Methionin bei Arachnida bei 9,14 % und bei Echinodermata lediglich bei 2,03 %. In den mitochondrial kodierten Proteinen von Komplex III spiegelt sich dieser Effekt auch wieder: Der niedrigste kalkulierte Wert ist mit 1,41 % bei den Echinodermata, der höchste mit 5,94 % bei den Arachnida zu finden. Dieser Trend wird auch in den mitochondrial kodierten Proteinen von Komplex IV sichtbar: Die stärkste Akkumulation von Methionin in diesem Komplex tritt wiederum bei Arachnida mit 6,16 % auf, die schwächste mit 3,40 % auch wieder bei Cnidaria. Der Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Proteinen von Komplex V folgt auch dem Nutzungsschema, was in den drei anderen Komplexen deutlich wurde: Arachnida verwenden mit 8,29 % das meiste, Echinodermata mit 2,30 % das wenigste Methionin in diesem Atmungskettenkomplex.

In der statistischen Auswertung findet sich bei denjenigen Stämmen, welche zwei Methionin-Codons verwenden eine starke Anreicherung von Methionin (Tabelle 15). Phyla, die nur ein Methionin-Codon in ihrem mitochondrialen Code besitzen, zeigen eine Nutzungshäufigkeit von Methionin, welche sich dem durchschnittlichen Gehalt in nukleär kodierten Proteinen von Homo sapiens annähert. Die Nutzung von zwei Codons, welche für Methionin kodieren, ist nur bei höheren Tieren zu finden und wird auf die erhöhte oxidative Belastung in diesen Tierarten zurückgeführt, da Methionin reversibel oxidiert werden kann und somit als antioxidative Aminosäure gesehen werden kann (Bender et al., 2008; Levine et al., 1996).

In Tabelle 15 folgt eine numerische Zusammenfassung der in Abbildung 11 gezeigten Daten und die Anzahl der Methionin-Codons im jeweiligen mitochondrialen genetischen Code.

<b>Phylum / Gruppe</b>	<b>Komplex I (%)</b>	<b>Komplex III (%)</b>	<b>Komplex IV (%)</b>	<b>Komplex V (%)</b>	<b>Met-Codons</b>
Primaten	6,70	4,23	5,16	5,45	2
Mammalia	7,19	3,85	5,66	5,83	2
Aves	5,06	2,31	4,37	4,38	2
Reptilia	6,26	3,81	5,44	5,35	2
Amphibia	6,70	4,19	5,66	5,04	2
Pisces	5,01	3,03	4,52	4,44	2

Phylum / Gruppe	Komplex I (%)	Komplex III (%)	Komplex IV (%)	Komplex V (%)	Met-Codons
Echinodermata	2,03	1,41	3,32	2,30	1
Insecta	8,57	4,82	5,49	7,50	2
Crustacea	6,62	4,18	4,85	6,81	2
Arachnida	9,14	5,94	6,16	8,29	2
Nematoda	6,50	5,50	5,25	6,54	2
Plathelminthes	2,88	3,72	3,49	2,51	1
Mollusca	7,02	4,34	5,12	5,84	2
Annelida	8,69	4,49	4,41	6,58	2
Brachiopoda	5,21	4,46	4,39	5,59	2
Cnidaria	2,83	2,58	3,40	3,21	1
Porifera	2,81	1,49	3,48	4,67	1

Tabelle 15: Durchschnittlicher Methioningehalt in mitochondrial kodierten Proteinen der einzelnen Komplexe der Atmungskette bei den untersuchten Tiergruppen und die Anzahl der Methionin-Codons im jeweiligen mitochondrialen genetischen Code.

Mittels des durchgeführten Interspeziesvergleich wird eine differentielle Nutzung von Methionin in Proteinen der Atmungskette sichtbar. Ausgehend von der durchschnittlichen Nutzungshäufigkeit von Methionin kann man die untersuchten Tiergruppen in zwei Kategorien aufteilen: Solche, die viel Methionin in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette besitzen und solche, die wenig Methionin in diesen Proteinen tragen. Einen erhöhten Methioningehalt in allen mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette zeigen folgende Gruppen, wobei in Klammer der jeweilige Durchschnittswert angegeben ist: Primaten (5,39 %), Mammalia (5,63 %), Aves (4,03 %), Reptilia (5,22 %), Amphibia (5,40 %), Pisces (4,25 %), Insecta (6,60 %), Crustacea (5,62 %), Arachnida (7,38 %), Nematoda (5,95 %), Mollusca (5,58 %), Annelida (6,04 %) und Brachiopoda (4,91 %). Alle Mitglieder dieser Gruppen besitzen in ihrem mitochondrialen genetischen Code zwei Codons, die für Methionin kodieren, da das Basentriplett „AUA“ für Methionin anstatt Isoleucin kodiert. Die anderen Tiergruppen besitzen einen dem zellulären Durchschnitt von Homo sapiens ähnlichen Methioningehalt, der bei 2,11 % liegt: Echinodermata (2,27 %), Plathelminthes (3,15%), Cnidaria (3,01 %) und Porifera (3,11 %). Die Mitglieder dieser Kategorie zeichnen sich neben einem niedrigen Methioningehalt auch dadurch aus, dass sie nur ein Basentriplett in ihrem mitochondrialen genetischen Code tragen, welches für Methionin kodiert. Das Basentriplett „AUA“ kodiert in diesen Tierarten für Isoleucin und nicht für Methionin.

Im Vergleich der vier Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V, in denen Untereinheiten sowohl aus dem Nukleus als auch aus dem Mitochondrium selbst kommen, ergibt sich ebenfalls eine unterschiedliche Nutzungshäufigkeit von Methionin. Im Durchschnitt besteht Komplex I bei allen untersuchten Tierarten aus 5,84 % Methionin, bei Tieren mit einem Met-Codon aus 2,64 % und bei Tieren mit zwei Met-Codons aus 6,82 % Methionin; Komplex III bei allen aus 3,79 % Methionin, bei Tieren mit einem Met-Codon aus 2,30 % und bei Tieren mit zwei Met-Codons aus 4,24 % Methionin. Komplex IV bei allen aus 4,72 %, bei Tieren mit einem Met-Codon aus 3,42 % und bei Tieren mit zwei Met-Codons aus 5,11 % Methionin; Komplex V bei allen Tierarten aus 5,31 %, bei Tieren mit einem Met-Codon aus 3,17 % und bei Tieren mit zwei Met-Codons aus 5,97 % Methionin. Die größte Differenz innerhalb der verschiedenen Komplexen ist dementsprechend bei Komplex I zu beobachten. Hierbei ergibt sich zwischen Tieren mit einem Met-Codon und Tieren mit zwei Met-Codons eine Differenz in der Nutzungshäufigkeit von Methionin von 4,18 %.

### **5.3 Lipophile Thiole als Modell für intramembranäre Cysteinnutzung**

Da die Nutzungshäufigkeit von Cystein in Proteinen der mitochondrialen Atmungskette negativ mit oxidativem Stress korreliert, was ein Vergleich zwischen aeroben und anaeroben Tieren aufzeigte (Moosmann and Behl, 2008; Schindeldecker et al., 2011), wurde versucht diesen Effekt experimentell durch Applikation lipophiler Thiole weiter zu charakterisieren. Als Substanzen dienten neben lipophilen Thiolen mit unterschiedlichen Kettenlängen auch ein langkettiger Alkohol (DOH) und ein Thioether (DMS). Die entsprechenden Strukturformeln sind in Tabelle 20 aufgelistet. Grundlage der Auswahl dieser Substanzen war nicht in der Ähnlichkeit zur Struktur von Cystein begründet, sondern folgte der Hypothese, dass Lipophilie und Reaktivität entscheidend für den bei Cystein beobachteten Effekt sind. Die beiden zuletzt genannten Substanzen dienten als Kontrolle und sollten die Bedeutung der Thiolgruppe klären, da sich Cystein vor allem durch die endständige Thiolgruppe von anderen Aminosäuren unterscheidet. Diese Funktion ist auch für die Redox-Reaktionen verantwortlich, für die Cystein bekannt ist.

#### **5.3.1 Analyse der Zellviabilität nach Applikation verschiedener Modellsubstanzen**

Um die Toxizität einer applizierten Substanz in einem Zellsystem zu testen, wurden die Überlebensraten von behandelten Zellen mit Hilfe des MTT-Assays bei verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen ermittelt. Die als Kontrolle dienenden Zellen wurden mit dem jeweiligen Lösungsmittel inkubiert. Als Zellsysteme wurden murine neuronale HT22 Zellen und humane IMR90 Fibroblasten gewählt.

##### **5.3.1.1 Zellüberleben in klonalen HT22 Zellen**

In den nachfolgenden Abbildungen 12 und 13 ist das Zellüberleben von murinen, neuronalen HT22 Zellen nach 72 stündiger Inkubation mit verschiedenen Substanzen gezeigt. Es wurden sowohl die wasserlöslichen Chemikalien Cysteamin (CAM), 3-Mercaptopropionsäure (DES), Cystein (CYS) und Glutathion (GSH), als auch die inkrementell lipophilen Substanzen Mercaptoethanol (2SH), 1-Butanthiol (4SH), 1-Octanthiol (8SH) und 1-Dodecanthiol (12SH) getestet (Tabelle 20).

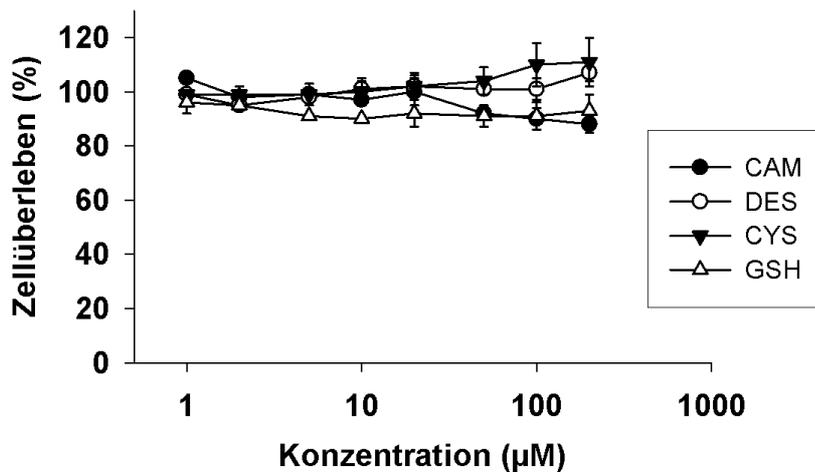


Abbildung 12: Überlebensrate von HT22 Zellen nach Inkubation mit 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM CAM, DES, CYS und GSH für 72h (n >= 3).

Die in Abbildung 12 benutzten wasserlöslichen Substanzen CAM, DES, CYS und GSH zeigen nach 72 stündiger Inkubation bei keiner der verwendeten Konzentrationen einen toxischen Effekt auf HT22 Zellen.

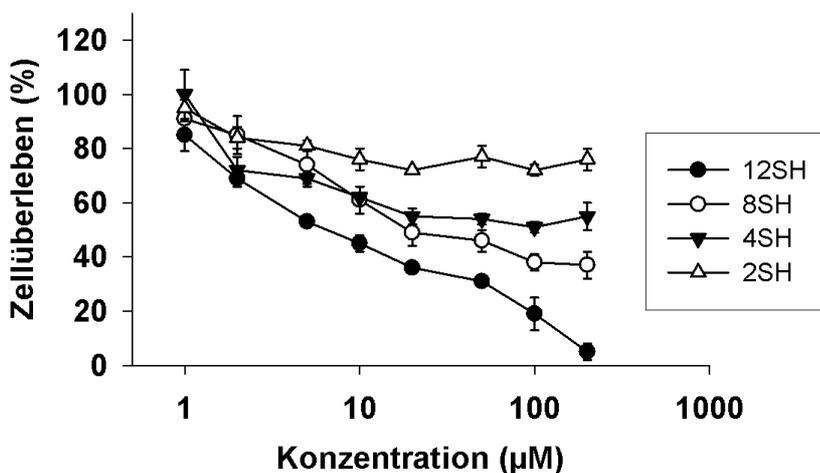


Abbildung 13: Überlebensrate von HT22 Zellen nach Inkubation mit 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM 2SH, 4SH, 8SH und 12SH für 72h (n >= 3).

Nach 72h Inkubation von HT22 Zellen mit den lipophilen Substanzen 2SH, 4SH, 8SH und 12SH zeigt sich eine differenzierte Toxizität. Mit steigender Konzentration nimmt bei allen Substanzen die Toxizität zu. Am stärksten ausgeprägt ist der toxische Effekt bei 12SH, dann bei 8SH, 4SH und 2SH. Damit korreliert die Toxizität mit der Alkylkettenlänge und der eingesetzten Konzentration der

applizierten Chemikalie. Eine starke Toxizität, bei der nur noch 10 % oder weniger der behandelten Zellen überlebten, ist einzig bei 12SH und Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  zu erkennen. Auf Basis dieser Messwerte scheint es so, dass Thiole und im besonderen lipophile Thiole einen spezifischen, cytotoxischen Effekt besitzen.

### 5.3.1.2 Zellüberleben in IMR90 Zellen

Die allgemeine Gültigkeit dieser Aussage, dass Thiole einen spezifischen, cytotoxischen Effekt vermitteln, sollte nun in primären Zellen überprüft werden. Die folgenden vier Abbildungen (14, 15, 16 und 17) zeigen das Zellüberleben von humanen Fibroblasten nach Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen. IMR90 Zellen eignen sich für Experimente mit Substanzen, die mutmaßlich toxisch sind, aber auch mit Substanzen, die eine vorzeitige Alterung induzieren könnten, da IMR90 Zellen primäre Fibroblasten darstellen und daher nur eine bestimmte Anzahl an Teilungen eingehen können, bevor sie in die sogenannte Seneszenz gehen.

Des weiteren kann durch Nutzung von zwei Zellsystemen aus verschiedenen Geweben und verschiedenen Tieren ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt ein artspezifisches bzw. gewebsspezifisches Phänomen ist.

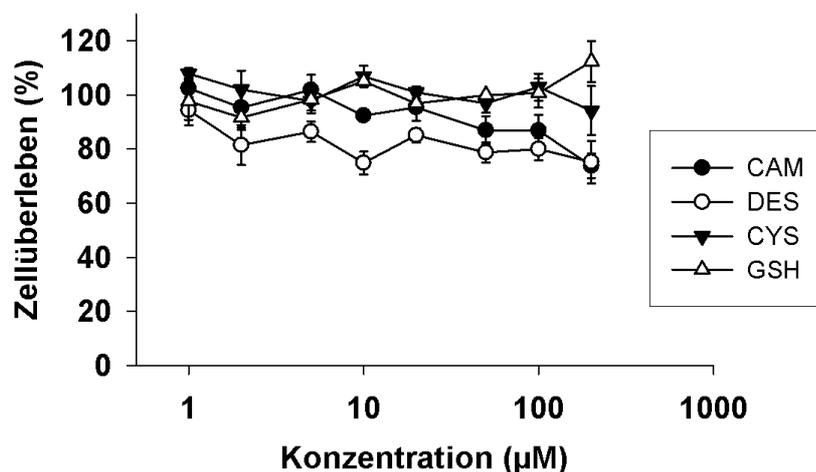


Abbildung 14: Überlebensrate von IMR90 Zellen (PD 28,1) nach 72h Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  CAM, DES, CYS und GSH ( $n \geq 3$ ).

In Abbildung 14 ist eine allenfalls geringe Toxizität der wasserlöslichen Substanzen CAM, DES, CYS und GSH in IMR90 Zellen zu erkennen. Bei der Behandlung mit DES, CYS und GSH beein-

flusste die Konzentration nicht die toxische Wirkung. Nur CAM zeigte eine geringe konzentrationsabhängige Toxizität nach 72h.

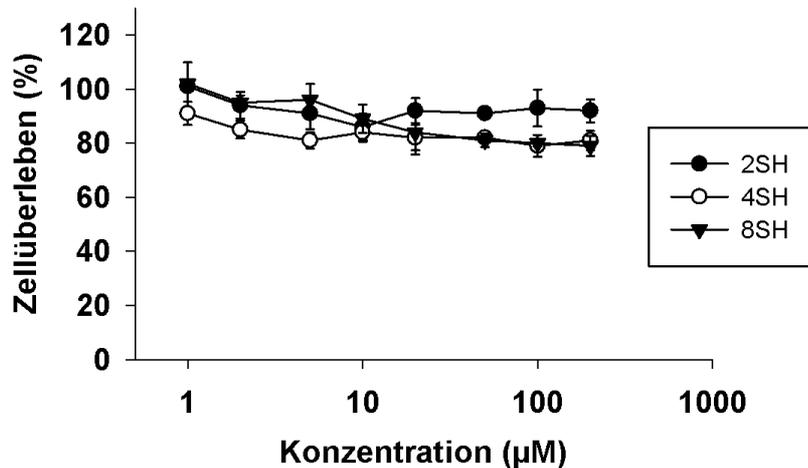


Abbildung 15: Zellüberleben von IMR90 Zellen (PD 28,1) nach 72h Inkubation mit 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM 2SH, 4SH und 8SH (n >= 3).

Nach 72 stündiger Behandlung der IMR90 Zellen mit den zunehmend lipophilen Substanzen 2SH, 4SH und 8SH zeigte sich ebenfalls eine geringe Toxizität (Abbildung 15). Alle drei applizierten Substanzen zeigten keine deutlichen dosisabhängigen Effekte.

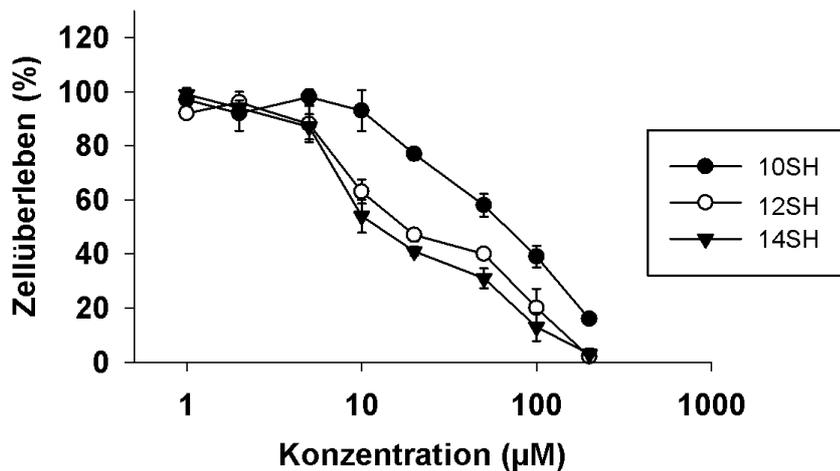


Abbildung 16: Überlebensrate von IMR90 Zellen (PD 28,1) nach 72h Inkubation mit 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM 10SH, 12SH, 14SH (n >= 3).

Die Überlebensrate von für 72h mit 10SH, 12SH und 14SH behandelten IMR90 Zellen nahm kon-

zentrationsabhängig stark ab (Abbildung 16). Dabei ist zu erkennen, dass die Toxizität mit zunehmender Alkylkettenlänge ausgeprägter wurde, was zu einer maximalen Toxizität (0 % Überleben) bei Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  12SH bzw. 14SH führte. Vergleicht man das Zellüberleben nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen 12SH bei HT22 und IMR90 Zellen, so ist eine ähnliche toxische Wirkung erkennbar. Um die Rolle der Thiolgruppe im Zusammenhang mit den beobachteten toxischen Effekten der applizierten Substanzen näher zu charakterisieren, wurden IMR90 Zellen mit Dodecylmethylsulfid (DMS) bzw. 1-Dodecanol (DOH) behandelt. Im Falle von DOH befindet sich anstatt einer Thiolgruppe eine Hydroxylgruppe am Ende der Alkylkette. Die funktionelle Gruppe bei DMS besteht aus einem Thioether.

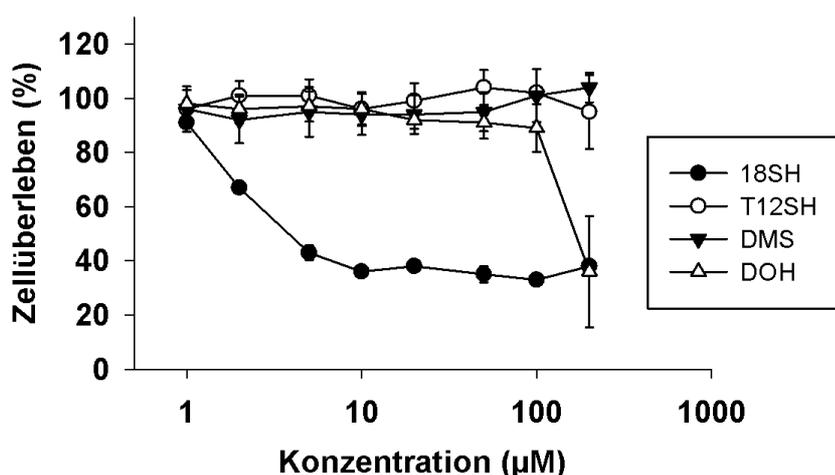


Abbildung 17: Überlebensrate von IMR90 Zellen (PD 28,1) nach 72h Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  18SH, T12SH, DMS und DOH ( $n \geq 3$ ).

Nach 72 stündiger Inkubation von IMR90 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an DOH zeigten sich bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine toxischen Effekte (Abbildung 17). Erst ab einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  nahm die Toxizität sprunghaft zu (40 % Überleben), wobei in diesen Fällen die Standardabweichung auch zunahm. Wurden die gleichen Zellen über den gleichen Zeitraum mit verschiedenen Konzentrationen an DMS behandelt, konnte keine toxische Wirkung mittels dieses Tests festgestellt werden. Dadurch wird deutlich, dass die Thiofunktion von 12SH notwendig für diesen speziellen toxischen Effekt war.

Die fehlende Toxizität von T12SH innerhalb dieses Experimentes ist unklar, wobei sich zwei mögliche Erklärungen ergeben: Erstens könnte aufgrund der räumlichen Struktur die Zellpenetration gestört sein, oder zweitens dass die tertiäre Thiolgruppe andere chemische Eigenschaften besitzt, als

eine primäre Thiolgruppe, wie sie bei 12SH vorkommt.

Bei der Applikation von 18SH entstand zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung, die aber mit steigender Konzentration nicht weiter zunahm. 18SH ist ein sehr lipophiler Stoff, welcher nach Zugabe aus einer Ethanollösung im wässrigen sehr leicht aggregiert und möglicherweise nicht zellgängig ist. Die toxische Wirkung bei sehr niedrigen Dosen könnte also durch eine Inhibition der Zellteilung und/oder eine nicht spezifische Wirkung auf die Zelloberfläche ausgelöst worden sein. Die Abwesenheit einer vollständigen Toxizität auch bei hohen Dosen spricht für einen anderen Mechanismus als bei 12SH.

### 5.3.1.3 Einfluss von Antioxidantien auf die Toxizität lipophiler Thiole in IMR90 Zellen

Um den toxischen Mechanismus von lipophilen Thiolen in IMR90 Zellen weiter zu charakterisieren, wurden die Zellen vor der 72-stündigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an 12SH jeweils mit den Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol (TOC) bzw. Superoxiddismutase (SOD) und/oder Katalase (CAT) für eine Stunde vorbehandelt (Abbildung 18). Die jeweils eingesetzte Konzentration an Antioxidantien betrug bei SOD und CAT 100 Units und bei TOC 10  $\mu\text{M}$ .

Da SOD und CAT Proteine sind, die nicht durch die Plasmamembran in die Zelle gelangen können, ist ihre direkte antioxidative Wirkung auf den Extrazellulärraum begrenzt. Dabei kann das Enzym Katalase nur Wasserstoffperoxid detoxifizieren, welches durch die Plasmamembran in den Extrazellulärraum diffundiert. Deshalb zielt der Einsatz von Katalase auf die Detoxifikation von diffusiblen Wasserstoffperoxid hin, welches intrazellulär durch endogene SOD erzeugt werden kann. Die zugegebenen Enzyme bilden somit einen extrazellulären Abfluss für intrazellulär produziertes, diffusibles Wasserstoffperoxid. Das Enzym Superoxiddismutase katalysiert die Reaktion von Superoxid zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ). Da Superoxid nicht durch die Plasmamembran diffundieren kann (Brand, 2010), bewirkt die Zugabe von SOD im extrazellulären Raum nur die Detoxifikation von an der Oberfläche der Plasmamembran entstandenem Superoxid. Das Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) ist dafür bekannt, dass es als lipophile Substanz innerhalb des hydrophoben Bereiches von Phospholipidmembranen akkumuliert und dort seinen Wirkungsort hat (Cordeiro, 2013). Dabei wirkt  $\alpha$ -Tocopherol als Radikalfänger, da es unter Radikaleinwirkung selbst zu einem mesomeriestabilisierten Radikal reagiert, welches reaktionsträge ist. Die Detoxifikation des Tocopherol-Radikals läuft dann weiter über die Reaktion mit Ascorbat zu einem Ascorbatradikal. Dieses wird durch Dismutation oder durch NADPH-abhängige Enzyme wieder zu Ascorbat reduziert (May

et al., 1998).

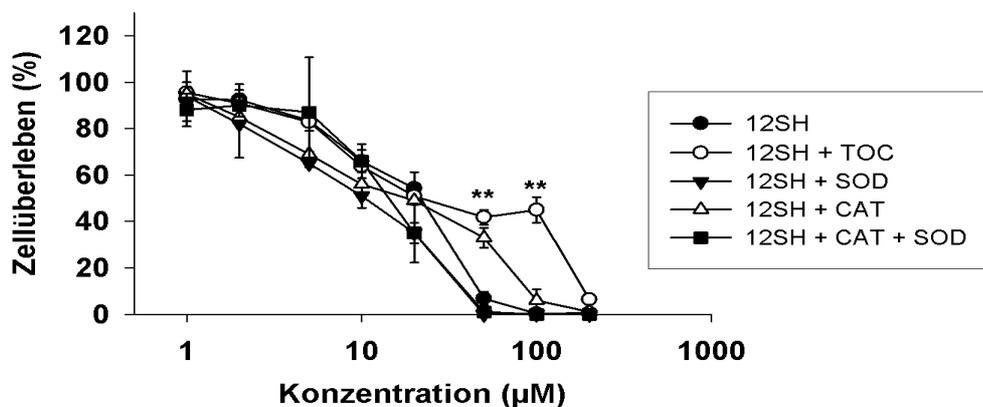


Abbildung 18: Zellüberleben von IMR90 Zellen (PD 28,1) nach 72h Behandlung mit 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM 12SH und den Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol (10 µM), Superoxiddismutase (100 Units/ml) und Katalase (100 Units/ml) ( $n \geq 3$ ; T-Test).

Es zeigte sich, dass die bereits in Abbildung 16 etablierte Toxizität von 12SH durch die Vorinkubation mit SOD oder CAT und SOD mit CAT nicht verhindert werden konnte (Abbildung 18). Einen Schutz bot jedoch  $\alpha$ -Tocopherol bei einer Konzentration von 50 µM ( $p = 0,001627$ ) und 100 µM ( $p = 0,004813$ ) 12SH. Daher ergibt sich die Hypothese, dass für die Toxizität der Thiole eine radikalische Kettenreaktion in Membranen eine Rolle spielt, aber jedoch nicht eine erhöhte Produktion von Superoxid-Anion oder Wasserstoffperoxid.

### 5.3.2 Molekulare Analyse der Toxizität von Dodecanthiol auf Proteinebene

Nach der Erkenntnis, dass eine Behandlung von IMR90 Zellen mit lipophilen Thiolen zu einer dosisabhängigen Toxizität führte, wurde versucht, mittels Immunodetektion von Markerproteinen der proteotoxischen Stressantwort diesen Befund weiter zu beleuchten. Aufgrund der in den MTT-Assays beobachteten Toxizität, seinem lipophilen Charakter und seiner primären Thiol-Funktion wurde 1-Dodecanthiol (12SH) als Modellsubstanz verwendet. Dabei sollte 1-Dodecanthiol mögliche Wirkungen von intramembranärem, endogenem Cystein nachahmen und so darüber Aufschluss geben, warum die Aminosäure Cystein in allen fünf Paradigmen der oxidativen Belastung, und besonders in Membranproteinen der Atmungskette, depletiert ist (Tabelle 13).

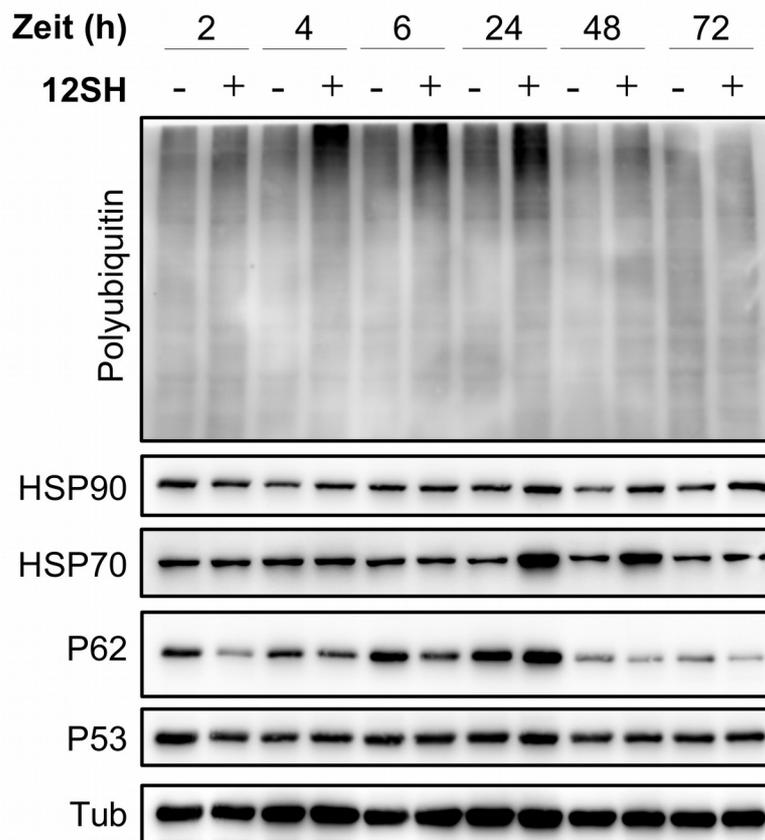


Abbildung 19: Immunodetektion von Markerproteinen der Proteotoxizität in IMR90 Zellen (PD 28,4). Die Zellen wurden für 2h, 4h, 6h, 24h, 48h und 72h mit je 100  $\mu$ M 12SH (+) oder Lösungsmittel (1% EtOH; -) behandelt.

Poly-Ubiquitinierung geschieht gezielt an Proteinen, die für den Abbau vorgesehen sind. Dieser Vorgang kann durch Aminosäuremangel, Fehlfaltung oder Schäden am Protein induziert werden oder im Verlauf des normalen Proteinumsatzes erfolgen. Im Rahmen der aktuellen Experimente kann eine Unterversorgung mit Aminosäuren ausgeschlossen werden, so dass die Poly-Ubiquitinierung als Signal für proteotoxischen Stress betrachtet werden kann. Chaperone wie HSP70 und HSP90 sind Proteine, die neu synthetisierte Peptide dabei unterstützen, sich korrekt zu falten, und dadurch verhindern, dass keine unerwünschten, funktionsuntüchtigen Aggregate entstehen. Zusätzlich können auch Faktoren wie oxidativer Stress oder zelltoxische Substanzen zu einer Akkumulation von Proteinaggregaten führen und dadurch die Expression von Chaperonen induzieren. Das Enzym P62 (Sequestosom 1) ist ein sogenanntes Adapterprotein, das für die Erkennung und Weiterleitung von poly-ubiquitinierten Proteinen in das Proteasom oder in die Autophagie verantwortlich ist. P53 kommt ubiquitär in allen Wirbeltieren vor und spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, da es die Aktivität von Genen beeinflusst, die für die Zellteilung verantwortlich sind. So akti-

viert P53 die Expression von P21, welches seinerseits durch Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen diese inaktiviert und dadurch den Zellzyklus anhält. Die P53-Expression kann unter anderem durch UV-Licht, Schädigungen der DNA, osmotischem Schock oder oxidativem Stress induziert werden. Die Immunodetektion von Tubulin diente in diesen Experimenten als Ladekontrolle.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse von Western-Blots dargestellt, in welchen IMR90 Zellen für einen Zeitraum von 2h, 4h, 6h, 24h, 48h und 72h mit je 100  $\mu$ M 12SH (+) oder der Lösungsmittelkontrolle (1‰ EtOH; -) behandelt wurden.

Nach 2h Inkubation ist der Gehalt an Poly-Ubiquitin in beiden Gruppen gleich. Das Niveau steigt bei den mit 12SH behandelten Zellen nach 4h und 6h ( $p = 0,007$ ) bis zu einem Maximum nach 24h ( $p = 0,02$ ) Inkubationszeit (Abbildung 19 und Abbildung 20). Nach 48h ist kein erhöhtes Signal mehr gegenüber der Kontrolle zu beobachten.

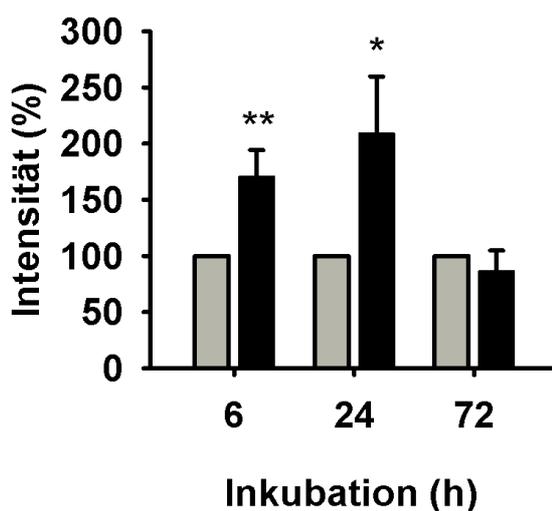


Abbildung 20: Densitometrische Quantifizierung von Poly-Ubiquitin in mit 100  $\mu$ M 12SH behandelten IMR90 Zellen nach 6h, 24h, 72h (n = 3 Western-Blots; einfaktorielles, nicht-parametrisches Varianzanalyse).

Die HSP90 Expression ist zwischen Kontrolle und 12SH ähnlich. Nach 24h, 48h und 72h ist jedoch eine leichte Erhöhung an HSP90-Protein zu erkennen. Vergleichbar verhält sich der Spiegel von HSP70, wobei hier das Signal nach 24h und 48h Behandlung deutlich gesteigert ist. Beides spricht dafür, dass aufgrund der Applikation von 100  $\mu$ M 12SH die Expression von Chaperonen induziert wird, höchstwahrscheinlich als Antwort auf die zuvor erfolgte Proteinschädigung, welche aus dem erhöhten Poly-Ubiquitin-Signal nach 6h und 24h nach der Behandlung mit 100  $\mu$ M 12SH (Abbildung 19 und Abbildung 20) abgeleitet werden kann.

Das Expressionsmuster von P62 ist nicht eindeutig: Nach 2h, 4h und 6h steigt der Gehalt von P62

bei der Alkoholkontrolle stärker als in den mit 100  $\mu$ M 12SH kultivierten Fibroblasten. Nach 24h Behandlungszeit ist das Niveau an P62 bei 12SH Applikation jedoch höher als bei der Ethanolkontrolle. Eine niedrige, basale Expressionsrate von P62 zeigt sich bei 12SH und EtOH dann nach 48h und 72h. Die Ursache und Auswirkung dieses Effektes ist jedoch unklar.

Das Niveau von P53 zeigt weder in der Kontrolle noch in den mit 100  $\mu$ M 12SH behandelten Zellen ein zeitliches Muster, d.h. das experimentell bestimmte Signal verhält sich bei beiden Tests gleich und verändert sich nicht. Daraus könnte man folgern, dass der Zellzyklus in humanen Fibroblasten nicht durch 12SH Gabe beeinflusst wird, was auch im Zuge der Kultivierung der Zellen anhand der Morphologie und des Teilungsverhaltens beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Zum quantitativen Nachweis, dass eine lipophile Alkylkette und eine Thiofunktion notwendig sind, um die beschriebene Poly-Ubiquitinierung und damit proteotoxischen Stress zu induzieren, wurden weitere Komponenten getestet (Abbildung 21). 4SH und 8SH unterscheiden sich in ihrer Kettenlänge von 12SH; DMS und DOH in der funktionellen Gruppe, T12SH ist eine technische Mischung aus isomeren Verbindungen, die alle als Gemeinsamkeit eine oder mehrere Verzweigungen in der Nachbarschaft zur funktionellen Gruppe besitzen.

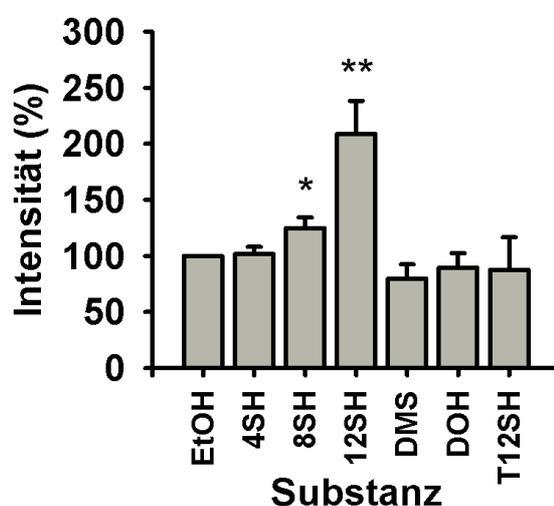


Abbildung 21: Densitometrische Quantifizierung von Poly-Ubiquitin in mit 100  $\mu$ M 4SH, 8SH, 12SH, DMS, DOH und T12SH kultivierten IMR90 Zellen nach 6h ( $n = 3$  Western-Blots; einfaktorielles, nicht-parametrisches Varianzanalyse).

Die densitometrische Quantifizierung von Poly-Ubiquitin nach Inkubation mit 100  $\mu$ M der untersuchten Substanzen für 6h ergab eine statistische signifikante Zunahme bei 12SH und 8SH. Alle anderen getesteten Chemikalien zeigen keinen deutlichen Anstieg an Poly-Ubiquitin in humanen Fi-

broblasten nach 6h Behandlung. Die Inkubation der Zellen mit T12SH zeigte kein erhöhtes Poly-Ubiquitin-Signal und damit keine Proteotoxizität, was darauf hin deutet, dass T12SH möglicherweise einen anderen zytotoxischen Mechanismus induziert als 12SH.

### 5.3.3 Molekulare Analyse der Toxizität von 12SH auf Lipidebene

Folgend der Annahme, dass die Hauptwirkungsorte von lipophilen Thiolen aufgrund ihrer Lipophilie innerhalb der Zellmembranen liegt, folgten weitere Experimente, die die Oxidation von Phospholipiden quantifizieren und näher charakterisieren sollten. Diese Motivation wurde dadurch verstärkt, dass Cystein besonders in Transmembrandomänen von Proteinen der Atmungskette abgereichert ist und Lipidperoxidation von vielen Autoren als ein Marker der ungewollten Oxidation und damit auch der Alterung verstanden wird (Sagai and Ichinose, 1980; Zimniak, 2011).

Rattenhirnlipide eignen sich besonders für Studien der Oxidation von Phospholipiden, da sie besonders reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Da frisch präparierte Rattenhirnlipide wenig endogene Peroxide enthalten, wurde im Zuge dieses Experiments ein Radikalkatalysator zugegeben. Diesen Zweck erfüllte eine Mischung aus 10  $\mu\text{M}$  Eisen und 200  $\mu\text{M}$  Ascorbat. Ein Vorteil an dieser Mischung im Vergleich zur direkten Zugabe von Wasserstoffperoxid oder anderen Peroxiden ist, dass Eisen/Ascorbat gleichmäßig und in niedriger Dosis Radikale freisetzt. Dadurch entstehen keine massiven Schwankungen in der Radikalproduktion, die das Experiment beeinflussen könnten.

Die in Abbildung 22 gezeigte Kurve beschreibt die Bildung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen unter dem Einfluss von drei verschiedenen 12SH-Konzentrationen und einem Radikalkatalysator (Fe/Asc) in nativ präparierten Rattenhirnlipiden.

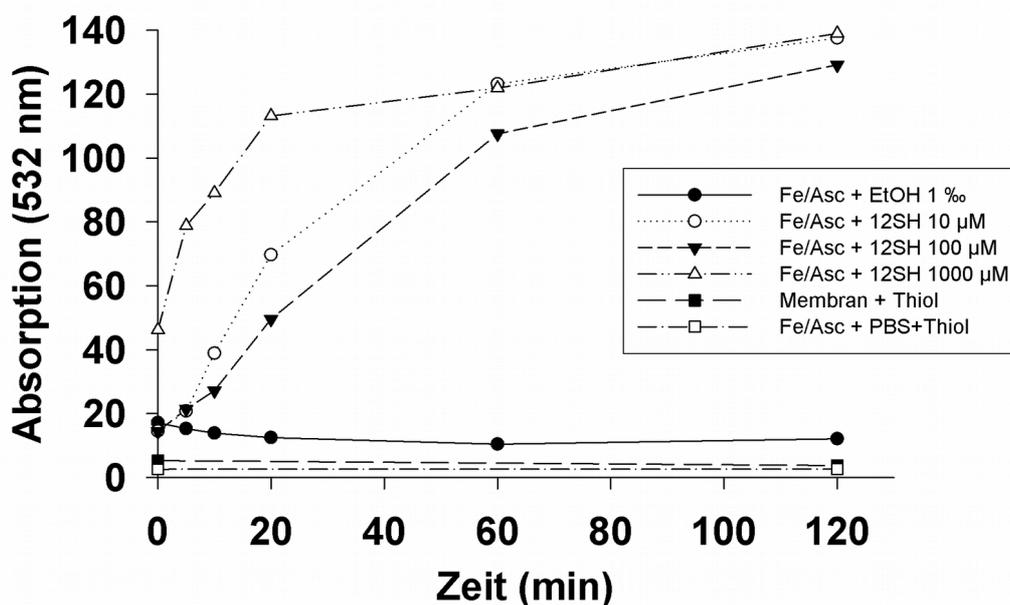


Abbildung 22: TBARS-Assay zur Messung der Lipidperoxidation in nativen Rattenhirnlipiden. Die Proben wurden mit je 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  oder 1000  $\mu\text{M}$  12SH und danach einmalig mit 10  $\mu\text{M}$  Eisen und 200  $\mu\text{M}$  Ascorbat behandelt und für 0, 5, 10, 20, 60, 120 Minuten inkubiert. Es wurden drei Kontrollen durchgeführt: Lösungsmittelkontrolle mit 1 % EtOH, Rattenhirnlipide und dem Radikalkatalysator; Rattenhirnlipide und 1000  $\mu\text{M}$  12SH ohne Radikalkatalysator; PBS, 1000  $\mu\text{M}$  12SH und Eisen/Ascorbat als Radikalkatalysator.

Es ist zu beobachten, dass in allen Kontrollexperimenten die Menge an Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen abnahm. Im Detail bewirkte Fe/Asc mit 1 % Ethanol, Rattenhirnlipide mit 1000  $\mu\text{M}$  12SH allein und Fe/Asc in PBS anstatt Lipiden mit 1000  $\mu\text{M}$  12SH keine Erhöhung der Absorption bei 532 nm. Dem zu Folge war auch der Induktor Fe/Asc alleine unter den gewählten Bedingungen noch nicht in der Lage Lipidperoxidation zu induzieren.

Waren jedoch das lipophile Thiol 12SH und Fe/Asc beteiligt, stieg die Absorption bei 532 nm in den ersten 20 min sehr stark an. Bei allen Konzentrationen an 12SH erreichte die Kurve nach 60 min Inkubationszeit ein hohes Plateau und behielt im weiteren Verlauf der Inkubation dieses hohe Niveau bei. Zu erwähnen ist, dass die Variabilität in diesem Experiment recht groß war. Bei einer mutmaßlichen katalytischen Wirkungsweise von 12SH können sich dadurch Überschneidungen im Wirkungsspektrum bei gewissen Zeitpunkten und Konzentrationen ergeben haben. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt, wobei in Abbildung 22 ein Durchgang exemplarisch dargestellt ist, da alle drei Durchläufe ähnliche Resultate erzielten.

Zusammenfassend zeigt das Ergebnis, dass 12SH Eigenschaften eines Katalysators zeigt und ein kooperativer Effekt auftritt. Dies wird dadurch deutlich, dass Rattenhirnlipide mit dem Radikalkata-

lyikator oder Rattenhirnlipide auch mit hohen Dosen 12SH alleine keinen Anstieg der TBARS bewirkten. Erst nach Zugabe des Radikalkatalysators zusammen mit 12SH zu den nativen Rattenhirnlipiden kam es zur Zunahme in der Absorption. Da lipophile Thiole in der Polymerchemie in der Tat als „Kettentransferagenzien“ eingesetzt werden, könnte hier ein ähnlicher Mechanismus für den beobachteten kooperativen Effekt verantwortlich sein.

#### 5.3.4 Messung der Lipidperoxidation in IMR90 Zellen

Nachdem in früheren Experimenten gezeigt wurde, dass 12SH mit einem Radikalkatalysator zusammen Lipidperoxidation in nativen Rattenhirnlipiden induzieren konnte, wurde jetzt das Ausmaß der durch 12SH induzierbaren Lipidperoxidation in lebenden Zellen ohne Zugabe von einem exogenen Radikalkatalysator, sondern nur mittels endogenen ROS, gemessen. Dazu wurde der Gehalt an 8-Isoprostan im Überstand der behandelten Zellen bestimmt.

Isoprostane gehören zur Familie der Eicosanoide und sind eines nicht-enzymatischen Ursprungs (Morrow et al., 1990). Sie entstehen aus der zufälligen Oxidation von Phospholipiden durch Sauerstoffradikale. Dabei reagieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure mit oxidativen Sauerstoffspezies aus dem Stoffwechsel zu umgelagerten Molekülen mit 20 Kohlenstoffatomen, den Isoprostanen. Arachidonsäure ist in veresterter Form als Lipidbestandteil vor allem in den Zellmembranen lokalisiert und kann dort z.B. durch Reaktion mit Peroxyl-Radikalen zu 8-Isoprostan reagieren. Laut Literatur zählen Isoprostane zu den besten Biomarkern für Lipidperoxidation (Janssen, 2001). In dem nachfolgenden Experiment (Abbildung 23) wurden IMR90 Zellen mit Ethanol, 10  $\mu\text{M}$  12SH oder 100  $\mu\text{M}$  12SH für 1h, 2h, 4h oder 6h behandelt und die 8-Isoprostan Konzentration im Überstand mit Hilfe eines Enzym-Assays bestimmt.

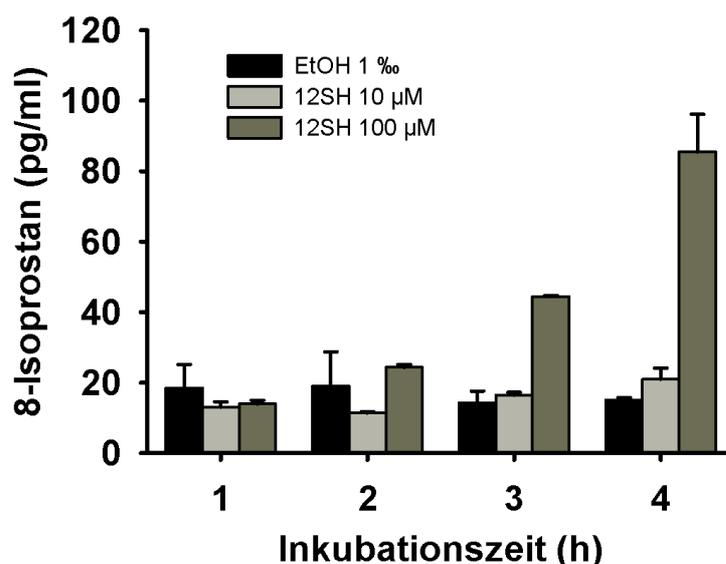


Abbildung 23: 8-Isoprostan Konzentration in IMR90-Zellen nach Behandlung mit EtOH, 10  $\mu\text{M}$  12SH oder 100  $\mu\text{M}$  12SH nach 1h, 2h, 4h oder 6h ( $n = 2$ ).

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, bleibt die 8-Isoprostan Konzentration in allen untersuchten Zeitintervallen bei Behandlung mit 1 ‰ EtOH gleich niedrig. Das gleiche gilt für die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  12SH. Lediglich die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  12SH, einer toxischen Konzentration (Abbildung 16), induziert eine deutliche Zunahme von 8-Isoprostan in den analysierten Proben. So steigt die Konzentration von 8-Isoprostan zwischen 2h und 6h Behandlungszeit in etwa linear an und erreicht nach 6h mit ca. 90 pg/ml im Zellkulturüberstand eine 4,5-fach gesteigerte Menge gegenüber der Kontrolle.

Durch massive oxidative Zerstörung von Lipiden, wie z.B. der Arachidonsäure (AA) oder Docosahexaensäure (DHA) kommt es zur Bildung von 8-Isoprostan und anderen Produkten der Lipidperoxidation. Daher sollte die Konzentration von Arachidonsäure oder Docosahexaensäure gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit 12SH abnehmen. Deswegen wurde die Konzentration dieser beiden Fettsäuren nach Behandlung mit lipophilen Thiolen im Zelllysate von IMR90-Zellen mit Hilfe der GC-FID Methode quantitativ von der Firma Omegametrix GmbH messen gelassen. In Abbildung 24 ist die Konzentration von Arachidonsäure und Docosahexaensäure in den Phospholipiden von IMR90-Zellen nach Inkubation für 6h mit 1 ‰ EtOH, 10  $\mu\text{M}$  12SH, 100  $\mu\text{M}$  12SH und 100  $\mu\text{M}$  DOH dargestellt. Es zeigte sich bei sowohl 10  $\mu\text{M}$  als auch 100  $\mu\text{M}$  12SH eine signifikante Verminderung der Arachidonsäure gegenüber der Ethanolkontrolle. Der langkettige Alkohol DOH erzeugt keine signifikante Veränderung in der Konzentration von Arachidonsäure. Die zweite analy-

sierte mehrfach ungesättigte Fettsäure ist Docosahexaensäure, welche wichtige Stoffwechselfunktionen z.B. im Gehirn innehat. Sie kommt ebenfalls als essentielle Fettsäurekomponente von Phospholipiden und somit als integraler Bestandteil von Membranen vor und ist vor allem in Membranen von Neuronen lokalisiert (O'Brien and Sampson, 1965). Eine signifikante Verminderung dieser Omega-3-Fettsäure wird nur durch die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  12SH bewirkt. In allen anderen Gruppen war keine signifikante Änderung in der Konzentration von Docosahexaensäure in IMR90-Zellen zu beobachten. Anhand dieser Daten wird ersichtlich, dass eine Inkubation von IMR90-Zellen mit einer toxischen Dosis 12SH zu einer Zerstörung der Zellmembranen führt.ä

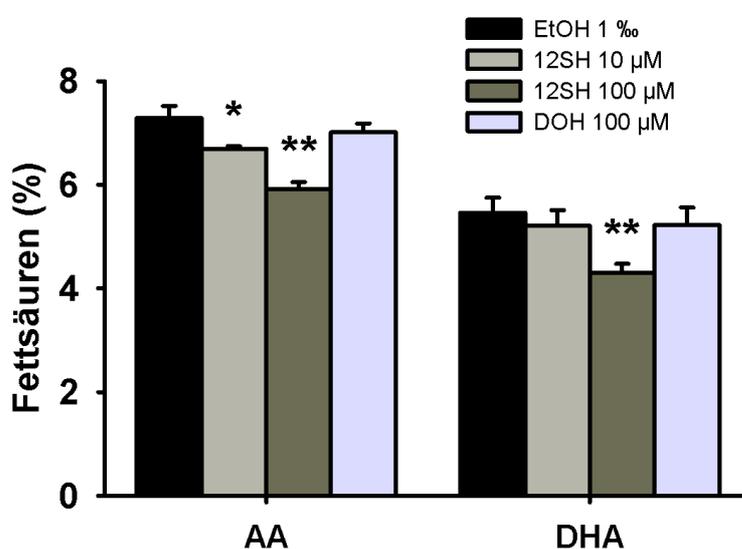


Abbildung 24: Konzentration von Arachidonsäure (AA) und Docosahexaensäure (DHA) in IMR90-Zellen nach Behandlung mit EtOH, 10  $\mu\text{M}$  12SH, 100  $\mu\text{M}$  12SH und 100  $\mu\text{M}$  DOH nach 6h. Signifikanz T-Test:  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

### 5.3.5 Analyse der trans-Fettsäurenkonzentration in IMR90 Zellen nach Behandlung mit 12SH

Um herauszufinden, ob die beobachteten Veränderungen in Zellen und Lipiden nach 12SH Behandlung auf Thiylradikale zurückzuführen sind, wurde ein Experiment durchgeführt, das darauf beruht, dass cis-Fettsäuren spezifisch mit Thiylradikalen zu trans-Fettsäuren reagieren (Chatgililoglu et al., 2006; Chatgililoglu and Ferreri, 2005; Zambonin et al., 2008). Aus diesem Grund wurden IMR90 Zellen für 6h mit je 1 % EtOH, 10  $\mu\text{M}$  12SH, 100  $\mu\text{M}$  12SH und 100  $\mu\text{M}$  DOH inkubiert und anschließend auf ihre Fettsäurezusammensetzung hin analysiert. Das Ergebnis der trans-Fettsäurenanalyse, welche von der Firma Omegamatrix GmbH mittels des GC-FID-Verfahrens durch-

geführt wurde, ist in Abbildung 25 dargestellt.

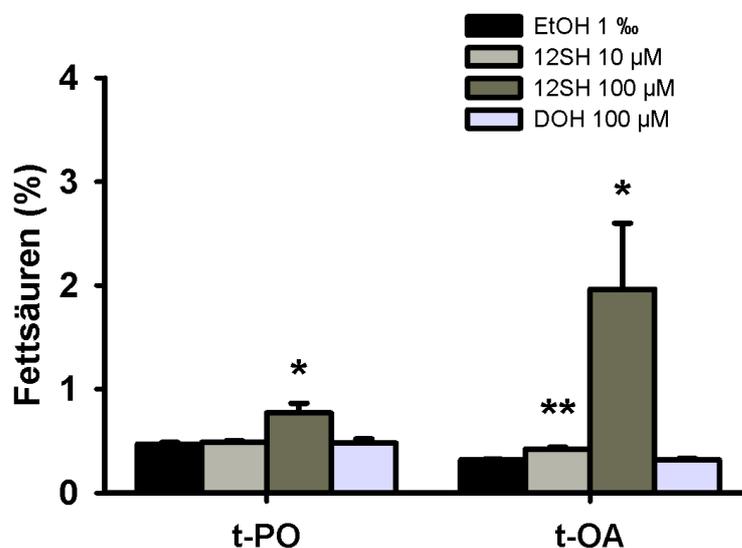


Abbildung 25: Konzentration von trans-Fettsäuren in behandelten IMR90 Zellen. Die Zellen wurden für 6h mit 1 % EtOH, 10 μM 12SH, 100 μM 12SH oder 100 μM DOH inkubiert. Die Nomenklatur der dargestellten Fettsäuren ist wie folgt: t-PO = trans-Palmitoleinsäure; t-OA = trans-Ölsäure (Elaidinsäure). Signifikanz T-Test:  $p < 0,05$  ( $n=3$ ).

Nach 6-stündiger Inkubation mit 100 μM 12SH nahm der Anteil an trans-Palmitoleinsäure gegenüber der Kontrolle und der 10 μM 12SH-Behandlung leicht zu. Ein stärkerer Effekt konnte bei der trans-Isomerisierung von Ölsäure zu Elaidinsäure beobachtet werden. Dort bewirkte die Inkubation mit 100 μM 12SH eine 4-fache Steigerung der Elaidinsäure-Konzentration, wobei 10 μM 12SH bereits eine signifikante Zunahme an Elaidinsäure induzierte. Dieses Ergebnis zeigt, dass 12SH nach Zugabe zu IMR90-Zellen zu Thiylradikalen reagierte, welche möglicherweise auch für andere toxische Auswirkungen jenseits der trans-Fettsäuren-Bildung ursächlich waren.

## 6 Diskussion

### 6.1 Proteine in oxidativen Kompartimenten der Zelle zeigen charakteristische Aminosäurenutzungen

Nachdem Sauerstoff vermehrt im Laufe der Erdgeschichte in der Atmosphäre auftrat, mussten sich fast alle Organismen an die damit erhöhte Sauerstoffkonzentration anpassen. Ein Beispiel für eine solche Anpassung ist die Verwendung von Sauerstoff in den Mitochondrien zur Produktion des zellulären Energieträgers ATP verwendet. Da aber Sauerstoff ein stark oxidierendes Gas ist, wurden zelluläre Schutzmechanismen, wie die Bereitstellung von Antioxidantien, entwickelt, um Gewebe und zelluläre Strukturen vor einer ungewollten Oxidation zu schützen. Da sich Aminosäuren in ihrer Oxidierbarkeit unterscheiden, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine adaptive Veränderung in ihrer Nutzungshäufigkeit in Bezug auf Sauerstoff und dessen reaktive Spezies erfolgte. Um diesen Einfluss auf die proteinogene Aminosäurenutzung zu studieren, wurden drei Kompartimente der Zelle untersucht, die bekannt für einen hohen Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies sind. Zusätzlich wurden die Korrelationen in der differenzierten Nutzung der Aminosäuren in mitochondrial kodierten Proteinen mit den physiologischen Faktoren Langlebigkeit und Sauerstoffnutzung untersucht. Die letzten zwei Modelle entsprechen dem Paradigma, dass je länger ein Lebewesen lebt, oder je schneller es Sauerstoff konsumiert, desto größer der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies ist, wobei deren verursachter Schaden über die Zeit akkumulieren kann (Abele and Puntarulo, 2004; Boveris and Chance, 1973; Hoffman and Brookes, 2009).

Um den Einfluss von Sauerstoff auf die Aminosäurenutzung im Allgemeinen und den Zusammenhang mit Langlebigkeit und Sauerstoffkonsum zu untersuchen wurden, alle proteinogenen Aminosäuren systematisch auf ihre Nutzungshäufigkeit innerhalb fünf verschiedener Modelle der oxidativen Belastung untersucht.

Das Ausmaß der durchschnittliche Veränderungen in der Nutzungshäufigkeit aller Aminosäuren war im Peroxisom weniger stark ausgeprägt als in mitochondrial lokalisierten Proteinen. Die stärksten Signale allerdings konnten in den mitochondrial kodierten Proteinen der Elektronentransportkette festgestellt werden (Tabelle 8). Da sich Aminosäuren in ihrer Hydrophobizität zum Teil stark unterscheiden könnte eine Anreicherung hydrophober Aminosäuren in Kompartimenten mit vielen Membranproteinen bevorzugt sein. Um diesen Einfluss zu eliminieren, wurde vor der Berechnung der Verhältnisse die Daten auf den durchschnittlichen Membrangehalt normiert.

In allen fünf untersuchten Modellen der oxidativen Belastung war Cystein am deutlichsten verändert, wobei die Veränderung in allen Fällen eine Verringerung in der Nutzungshäufigkeit war. Signifikante Veränderungen in Bezug auf die fünf Modelle traten auch bei Methionin, einer leicht hydrophoben Aminosäure auf. Die größten Modifikationen in der Nutzung dieser Aminosäure traten in den mitochondrial kodierten Proteinen der Elektronentransportkette auf.

Des Weiteren konnte in den untersuchten Modellen ein generelles Muster ausgemacht werden. So waren die anionisch geladene Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure leicht abgereichert, während die hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Glycin etwas stärker vorkamen. In den übrigen Modellen war dieses Muster aber weniger stark ausgeprägt, denn so war zum Beispiel die kationische Aminosäure Lysin in mitochondrial lokalisierten Proteinen angereichert und die sehr hydrophobe Aminosäure Leucin nur schwach in diesen Proteinen akkumuliert. Relativ starke Signale konnten auch bei den amphiphilen Aminosäuren Serin und Cystein beobachtet werden. So belegte in allen untersuchten Modellen Serin zwei mal Platz zwei in der Rangliste der Veränderungen in der Nutzungshäufigkeit.

Der Interspeziesvergleich innerhalb der Würmer lieferte die Erkenntnis, dass sich hier kein allgemeines Muster der Anreicherung von hydrophoben Aminosäuren finden lässt. Das deutlichste Signal in allen fünf Modellen lieferte wiederum Cystein, welches in allen Untersuchungen am stärksten verändert und in all diesen Fällen auch depletiert war. Daraus ergab sich die Beobachtung, dass eine generelle Strategie zur Vermeidung von überflüssigen Cysteinresten innerhalb von Proteinen existiert, die der Gefahr von oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die zweite Feststellung betraf die Aminosäure Methionin, welche in Proteinen des Mitochondriums, sowohl in den importierten als auch in den mitochondrial kodierten Peptiden, vermehrt genutzt wurde.

Das Ausmaß der Veränderungen in der Nutzungshäufigkeit der redox-aktiven Aminosäuren Cystein, Methionin, Tyrosin und Tryptophan ist im Folgenden nochmals vergleichend dargestellt:

<b>Relative Nutzung</b>	<b>Peroxisom (I)</b>	<b>Mitochondrium (II)</b>	<b>Atmungskette (III)</b>	<b>Langlebigkeit (IV)</b>	<b>Aerobizität (V)</b>
C	0,80	0,74	0,41	0,53	0,43
M	1,09	1,16	2,14	0,88	1,51
W	1,11	1,05	1,81	0,91	1,03
Y	1,07	1,06	1,33	0,98	0,68

Tabelle 16: Faktorielle Veränderungen in der Nutzungshäufigkeit von redox-aktiven Aminosäuren in den fünf Modellen der oxidativen Belastung.

Zu sehen war eine ausgeprägte Depletion von Cystein in allen fünf Modellen des oxidativen Stresses, wobei die Abnahme in der Nutzungshäufigkeit am deutlichsten in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette ausgeprägt war. Um diesen Effekt mechanistisch aufzuklären, wurden im weiteren Verlauf biochemische Experimente durchgeführt.

Im Gegensatz dazu zeigte Methionin eine starke Zunahme in mitochondrial kodierten Proteinen und eine Zunahme in Korrelation zur Aerobizität. Eine Korrelation mit der maximalen Lebensdauer konnte bei Methionin hier nicht festgestellt werden. In einer Studie, die allerdings nur Tiere aus der Klasse der Mammalia beinhaltete, konnte Aledo et al. zeigen, dass die Nutzungshäufigkeit von Methionin in mitochondrial kodierten Proteinen negativ mit der maximalen Lebensspanne korreliert (Aledo et al., 2011). Die Nutzung von Tryptophan in den mitochondrial kodierten Proteinen der Elektronentransportkette war gegenüber der durchschnittlichen Nutzung in der ganzen Zelle erhöht, wohingegen in den anderen Modellen keine starke Änderung zu erkennen war. Tyrosin zeigte in zwei Modellen erwähnenswerte Änderungen auf: In Atmungskettenproteinen wurde es verstärkt verwendet, aber in Bezug zur Aerobizität stellte sich eine verminderte Nutzung heraus.

Folglich stellte sich die Frage, worin der Vorteil besteht, eine leicht oxidierbare, labile Aminosäure wie Methionin in der Atmungskette, die bekanntlich ein Ort von ROS Produktion ist, vermehrt zu nutzen. In der Literatur wird behauptet, dass Methionin antioxidative Eigenschaften besitzt und durch Verwendung eines zweiten Codons in der mtDNA speziell in diesen Proteinen verstärkt akkumuliert (Bender et al., 2008; Levine et al., 1996). Zusätzlich zu dieser adaptiven Akkumulation kam es auch in importierten Proteinen des Mitochondriums zu einer Steigerung in der Nutzungshäufigkeit. Daher ist klar, dass die Anreicherung von Methionin im Mitochondrium nicht alleine auf den alternativen genetischen Code im Mitochondrium zurückgeführt werden kann. Um die antioxidative Rolle dieser Aminosäure zu beleuchten, folgte eine bioinformatische Detailanalyse der Methioninnutzung in verschiedenen Bereichen des humanen Proteoms, die für ihre erhöhte oxidative Belastung bekannt sind und in den vier mitochondrial kodierten Komplexen der Atmungskette.

## **6.2 Proteinogene Methioninreste wirken als strukturelle Antioxidantien**

Antioxidantien haben die Aufgabe, Radikale und reaktive Stoffwechselmetaboliten zu entgiften, indem sie direkt mit ihnen reagieren, wobei die Reaktion meist reversibel und daher harmlos ist. Halliwell definierte den Begriff Antioxidans folgendermaßen: Geringe Konzentrationen einer antioxidativen Substanz sind ausreichend, die Oxidation eines Substrates, dessen Konzentration höher ist

als die des Antioxidans, signifikant zu verlangsamen oder gar zu verhindern (Halliwell, 1990). Die klassische Definition beschreibt also eine Konzentrationsabhängigkeit in der Wirkungsweise solcher Substanzen. Nicht berücksichtigt wird dabei die Qualität oder die Gefährlichkeit von oxidativen Reaktionen und Modifikationen. Deshalb könnte eine erweiterte Definition die Möglichkeit einschließen, dass auch solche Substanzen antioxidative Kapazitäten besitzen, die in höheren Konzentrationen als das Substrat vorkommen, wenn die reversible Oxidation dieses Antioxidans keine weitreichenden negativen Effekte für die Zelle zur Folge hat, aber dadurch die Oxidation eines äußerst wichtigen Proteins, Lipids oder der DNA verhindert werden kann.

Methionin ist eine sehr leicht zu oxidierende Aminosäure, deren primäres Oxidationsprodukt Methioninsulfoxid ist. Das durch weitere Oxidation entstehende Methioninsulfon kommt dagegen nur in sehr kleinen Mengen vor. Die physiologische und pathophysiologische Relevanz der Methioninoxidation wird durch die Enzymfamilie der Methioninsulfoxidreduktasen (Msr) verdeutlicht, die in fast allen Organismen vorkommen (Ezraty et al., 2005; Weissbach et al., 2005) und dort die Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin katalysieren. Es sind drei Methioninsulfoxidreduktasen bisher bekannt: MsrA, MsrB und fRmsr. Die Oxidation von Methionin ergibt eine Mischung aus den zwei Diastereomeren S-Methioninsulfoxid und R-Methioninsulfoxid. Das erste Produkt wird durch die MsrA reduziert, das zweite durch MsrB (Kim and Gladyshev, 2004). MsrA kann sowohl freies als auch gebundenes S-Methioninsulfoxid reduzieren, wohingegen die Reduktion von R-Methioninsulfoxid durch MsrB spezifisch für proteingebundenes Methionin ist (Lee et al., 2009). Das Enzym fRmsr katalysiert die Reduktion von freiem R-Methioninsulfoxid zu Methionin in Bakterien und Pilzen (Etienne et al., 2003).

Die Störung dieses Redox-Systems wird mit zahlreichen Pathologien in Verbindung gebracht. So wird eine verminderte Aktivität von Msr im Zusammenhang mit der Alterung und der Alzheimer-Krankheit diskutiert (Moskovitz, 2005). Des Weiteren kann die Oxidation von Methionin zu einem Funktionsverlust in einem neuronalen spannungsabhängigen Calciumkanal führen (Ciorba et al., 1997). Es ist auch bekannt, dass Methioninoxidation die Aktivität von Proteinkinasen beeinflussen kann (Erickson et al., 2008). Methioninoxidation kann auch die Löslichkeit von Proteinen verändern, denn durch Oxidation an einem auf der Proteinoberfläche lokalisierten Methionin nimmt die Hydrophobie dieses Peptids durch induzierte Umfaltungseignisse zu (Chao et al., 1997), was zu einer gestörten nativen Proteinfaltung führen kann.

Wegen dem oben erwähnten Redoxkreislauf wurde vorgeschlagen, dass Methionin als strukturelles Antioxidans betrachtet werden sollte (Levine et al., 1996). In Anlehnung an technische Vorgehens-

weisen, kann Methionin als eine Art Opferanode gesehen werden, die wichtige Bereiche eines Proteins schützt, indem es selbst mit den reaktiven Sauerstoffspezies reagiert. Daher wurde im nachfolgenden mit bioinformatischen Mitteln untersucht, ob eine spezielle Veränderung in der Nutzungshäufigkeit von Methionin in Bereichen hoher oxidativer Belastung stattgefunden hat.

### 6.2.1 Methioninakkumulation tritt hauptsächlich in der Nähe der Atmungskette auf

Um zu testen, dass Methionin ein endogenes proteinogenes Antioxidans darstellt, sollte Methionin verstärkt in Proteinen vorkommen, welche einer oxidativen Belastung ausgesetzt sind, wie z.B. Proteinen der mitochondrialen Atmungskette. Deshalb wurden alle verfügbaren humanen Proteinsequenzen, die einem zu untersuchenden Kompartiment zugeordnet werden können, auf ihren Methioningehalt hin untersucht, und die daraus resultierenden Daten in einer Tabelle dargestellt (Tabelle 14). Mitochondriale Proteine, im Vergleich mit dem zellulären Durchschnitt, offenbarten dabei einen klaren Trend in Richtung Akkumulation von Methionin. Dieser Effekt wurde um so stärker, je mehr sich der analysierte Bereich den Hauptbildungsstellen von reaktiven Sauerstoffspezies näherte. So stieg die Nutzungshäufigkeit von Methionin z.B. in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran, der Atmungskette und zuletzt in den mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette. Der Median der zuletzt genannten Proteine erreichte in der Rangfolge der Methioninnutzung Platz 184 von insgesamt 19806 untersuchten Proteinsequenzen. Neben dem Mitochondrium zeigten nur Proteine des endoplasmatischen Retikulums und Membranproteine des endoplasmatischen Retikulums eine statistisch signifikante Anreicherung von Methionin (Tabelle 14, Spalte *e*).

Da Transmembrandomänen von Proteinen auf Grund der Hydrophobizität von Methionin möglicherweise einen höheren Methioningehalt als die wässrigen Domänen besitzen, war es notwendig die errechneten Daten dahingehend zu prüfen. Deshalb wurden von allen untersuchten Sequenzen, die Transmembranbereiche bestimmt und deren kumulativer Methioningehalt berechnet. Dabei wurde deutlich, dass der Membrananteil in Proteinen, die als Membranproteine in den Datenbanken deklariert wurden, starken Schwankungen unterliegt (Tabelle 14, Spalte *a*). Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass manche Proteine nur einen relativ kleinen Membrananker besitzen, währenddessen andere die Membran mehrfach durchspannen.

Als Ergebnis wurde gefunden, dass der Membrananteil der untersuchten Proteine nicht relevant war, da die erhöhte Nutzung von Methionin sowohl in Membrandomänen, als auch in nicht-Membrandomänen gleich stark ausgeprägt war (Tabelle 14, Vergleich Spalte *b* mit *c*). Zusammenfassend bestä-

tigte sich, dass in mitochondrial lokalisierten Proteinen bevorzugt mehr Methionin verwendet wurde, als in cytosolischen Proteinen und die stärkste Erhöhung von Methionin wiederum in der Subgruppe der mitochondrial kodierten Proteinen vorlag. In diesem Zusammenhang wurde bereits erkannt, dass der alternative mitochondriale genetische Code zu einer adaptiven Anhäufung von Methionin in der Atmungskette führt (Bender et al., 2008).

### 6.2.2 Einzelsträngige RNA/DNA-bindende Proteine zeigen erhöhte Methioninspiegel

In der Verteilungskurve der Methioninnutzung aller untersuchter humaner Proteinsequenzen (Abbildung 10) fiel eine Gruppe von Proteinen auf, die mit 6 % bis 14 % einen sehr hohen Methioningehalt besaßen (Appendix II). Diese sollten im Folgenden näher betrachtet werden. Da bei sehr kleinen Proteinen der Einfluss einer einzelnen Aminosäure auf den Prozentwert sehr stark ist, wurden nur Proteine berücksichtigt deren Aminosäuresequenzen länger als 100 Aminosäuren waren. So wurden 50 Proteine selektiert, die einen stark erhöhten Methioningehalt zeigten. Darunter waren neben nukleär und mitochondrial kodierten Atmungskettenproteinen auch eine heterogene Gruppe von Proteinen, die in der Bindung und Prozessierung von Nukleinsäuren beteiligt sind, sich dabei aber in ihrer Struktur offenbar unterscheiden. In dieser Gruppe waren Proteine zu finden, die direkt RNA binden können und am Spleißen beteiligt sind, wie die kleinen nukleären Ribonukleoproteine A, C und das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein M. Darunter war auch das Ribonukleoprotein Signalerkennungspartikel 54 kDA (SRP), welches direkt an RNA bindet und einen erhöhten Methioningehalt auf der Proteinoberfläche besitzt (Gowda et al., 1998). Dazu kamen noch die Untereinheit 2 des teilungstimulierenden Faktors (CstF), der direkt an RNA bindet und mit verantwortlich ist für die Polyadenylierung von prä-mRNA. Des weiteren konnten mehrere DNA-Einzelstrang-bindende Proteine, die für die Aufrechterhaltung der DNA-Stabilität essentiell sind identifiziert werden (Ashton et al., 2013). Da RNA Moleküle gegenüber Oxidation labil sind ist anzunehmen, dass der besonders hohe Anteil an Methionin in diesen Proteinen dazu beiträgt, einzelsträngige Nukleinsäuren vor oxidativen Reaktionen zu schützen. Somit war ein erhöhter Methioningehalt in der eukaryotischen Zelle nicht nur auf mitochondriale Proteine beschränkt, die nachweislich einer hoher oxidativen Belastung ausgesetzt sind (Bender et al., 2008), sondern kann auch in Proteinen vorkommen, die besonders labile, einzelsträngige Nukleinsäuren vor schädlicher Oxidation bewahren sollen (Johansen et al., 2005).

### 6.2.3 Anreicherung von Methionin in Komplex I spricht für einen cis-wirkenden antioxidativen Effekt

Proteinogenes Methionin ist fest mit einem Protein verbunden und kann daher nicht frei durch die Zelle diffundieren, was dadurch den potentiellen antioxidativen Wirkungsbereich räumlich begrenzt. Um diesen Wirkungsbereich näher einzugrenzen wurde der proteinogene Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette, getrennt nach Komplexen, bei 361 Tieren bestimmt (Abbildung 11). Die untersuchten Tierarten setzten sich aus 10 verschiedene Phyla zusammen, welche eine große Vielfalt an Lebensweisen und metabolischen Grundumsätzen umfassen. Die Ergebnisse zeigten, dass Methionin vor allem in Proteinen von Komplex I und V stark angereichert war. Teilweise betrug der Methioningehalt in diesen Proteinen bis über 10 %, wohingegen Komplex IV durch eine geringere, aber stärker gleichmäßig verteilte Methioninakkumulation charakterisiert ist. Vergleicht man Komplex I (~2100 AS) mit Komplex IV (~1000 AS) und berücksichtigt, dass Komplex IV in allen bisher untersuchten Tiergeweben bei Säugetieren bis zu 6-mal höher exprimiert ist als Komplex I (Lenaz and Genova, 2009), kann daraus eine cis-protective Wirkungsweise von Methionin gefolgert werden: Wenn die antioxidative, protective Wirkung von Methionin einen ganzen Bereich, wie zum Beispiel die innere Mitochondrienmembran, schützen sollte, dann wäre eine Anreicherung in einem dort stark exprimierten Protein mehr von Vorteil als eine Akkumulation in einem niedrig exprimierten Protein. So würde eine Mutation in der mitochondrialen DNA, welche zu einem zusätzlichen Codon für Methionin führt, in den Genen für Komplex IV einen bis zu 6-fach höheren Gehalt an Methionin in der inneren Mitochondrienmembran bedeuten, als würde diese Mutation in den Genen für Komplex I stattfinden. Da genau das Gegenteil der Fall ist, kann angenommen werden, dass die exakte Stelle der Methioninanreicherung von besonderer Bedeutung ist, und dass daher die Methioninakkumulation in Komplex I darauf hinzielt, genau dieses Protein selbst, seine Bindepartner und vielleicht auch die direkt umgebende Membran vor reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen (cis-Antioxidans).

Eine zweite Überlegung in diesem Zusammenhang ist, dass ein Methioninrest auf der Oberfläche von Komplex IV nicht ein Methioninrest auf der Oberfläche von Komplex I gleichwertig in seiner antioxidativen Wirkung ersetzen kann. Der Wirkungsbereich eines Methionins auf der Oberfläche von Komplex I ist geringer als der Abstand zwischen diesem Komplex und Komplex IV (2-5 nm) (Althoff et al., 2011) und daher auch geringer als die Diffusionsstrecke der Mehrzahl der Oxidantien (Pryor, 1986; Schindeldecker et al., 2011). Dadurch wird deutlich, dass der antioxidative Wirkungs-

bereich von Methioninresten auf das methionintragende Protein, Bindepartner oder der direkten Umgebung beschränkt ist. Diesbezüglich unterstützen die Resultate auch die Hypothese, dass Methioninakkumulation in RNA/DNA-bindende Proteine dem Schutz vor Oxidation der RNA bzw. DNA dient, indem die leicht oxidierbare Aminosäure Methionin, deren Oxidation reversibel ist, verstärkt in diesen Proteinen exprimiert ist.

Das Konzept der cis-Protektion in Proteinen der Atmungskette zum selektivem Schutz vor oxidativem Stress, stimmt mit Daten aus der Literatur überein, wonach die Menge an diffusiblen Oxidantien mit zunehmender Entfernung zu inneren Mitochondrienmembran abnimmt (Kirkwood and Kowald, 2012), was eine Akkumulation von strukturellem, antioxidativem Methionin in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran erklären würde. Ein anderes Konzept des benötigten, antioxidativen Schutzes der Atmungskettenkomplexe wurde kürzlich publiziert, und besagt dass die Mangan-Superoxiddismutase, welche die im Mitochondrium vorherrschende SOD ist, direkt mit den Atmungskettenkomplexen I, III und IV innerhalb der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist, um diese Membranproteine direkt vor akutem oxidativem Stress zu schützen (Suthammarak et al., 2013). Die Wirkungsweise der mitochondrialen SOD würde im Gegensatz zu strukturellem Methionin nicht als cis- sondern als trans-antioxidativ gewertet werden müssen.

#### **6.2.4 Der mitochondrial kodierte Methioningehalt bei ektothermen Tieren spiegelt die aerobe Metabolismusrate wieder**

Der Interspeziesvergleich der Methioninnutzung in den mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex I bei 361 Tierarten aus 17 Stämmen zeigte einen stark variierenden Methioningehalt, der von 2 % bei Echinodermen bis zu 13 % bei fliegenden Insekten reicht. Diese Variabilität ist besonders interessant, da die Proteinsequenzen in den mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex I als hoch konserviert gelten (Baradaran et al., 2013). Um diese scheinbare Diskrepanz zu verstehen, wurden bei acht Tierklassen bzw. Tierstämmen, die alle extreme Werte bezüglich ihrer Methioninnutzung in mitochondrial kodierten Proteine aufzeigten, nach charakteristischen Eigenschaften gesucht, welche mit der aeroben Metabolismusrate und Sauerstofftoxizität assoziiert waren (Tabelle 17).

Ein Methioningehalt von 12 % und mehr konnte nur bei zwei Familien von Insekten beobachtet werden, den Bienen (Apidae) und den Mottenschildläusen (Aleyrodoidea). Beide Familien zeichnen sich durch ihre außerordentlich hohe Stoffwechselrate mit bis zu 400 mW/g, die ihrem fliegenden

Lebensstil geschuldet ist, aus (Salvucci and Crafts-Brandner, 2000; Wolf et al., 1996). Dieser Wert liegt ungefähr 100-mal höher als der zu erwartende Wert üblicher ruhender Invertebraten, und liegt auch deutlich über den Metabolismusraten anderer fliegender Insekten, Vögel, Kolibris, Fledermäuse und endothermer Vertebraten (Harrison and Roberts, 2000). Darüber hinaus wiesen Säugetiere und Insekten im Allgemeinen einen hohen Methioningehalt auf. Des Weiteren sind beide Tierklassen durch eine hohe Stoffwechselrate, sowie durch den Besitz eines hoch spezialisierten Atmungssystems gekennzeichnet (Tabelle 17). Die allgemein hohe Stoffwechselrate in beiden Gruppen wurde durch verschiedene experimentelle Vorgehensweisen bestätigt (Harrison and Roberts, 2000; Markarieva et al., 2008). Es ist auch bekannt, dass die absolute Produktionsrate von reaktiven Sauerstoffspezies bei Säugetieren und Insekten höher ist als im Vergleich mit marinen Invertebraten (Abele and Puntarulo, 2004).

Demgegenüber zeigten die vier Tierstämme, die nur ein einziges Codon für Methionin in ihrer mtDNA tragen, ein signifikant niedriges Niveau an Methionin in ihren mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette auf. Interessanterweise sind alle vier Tierstämme für ihre sehr geringe Metabolismusrate bekannt, was an Beispielen wie einer geringen Muskelaktivität, langsamen Wachstum oder einer hohen Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel deutlich wird. Manche Vertreter der Plathelminthen sind z.B. durch ihre anaerobe Lebensweise, die ihrer parasitären Lebensweise geschuldet ist, charakterisiert (Halton, 1997; Moosmann and Behl, 2008; Tielens, 1994). Dementsprechend ist bei diesen Tierstämmen ein nicht voll entwickeltes oder sogar fehlendes System zur Aufnahme und zum Transport von Sauerstoff zu finden (Tabelle 17). Wird der Methioningehalt in Komplex I mit den zwei am besten etablierten morphologischen Kennzeichen des aeroben Stoffwechsels verglichen, nämlich dem Vorhandensein eines sauerstofftransportierenden Pigmentes und dem Grad der Spezialisierung des respiratorischen Systems, so wird deutlich, dass die Nutzungshäufigkeit von Methionin in den mitochondrial kodierten Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase als Marker des aeroben Stoffwechsels wohl mindestens die gleiche Qualität besitzt, wie die eben erwähnten klassischen Kennzeichen. Letztendlich wird dadurch der enge Zusammenhang zwischen Akkumulation von Methionin in Komplex I und dem erhöhten Sauerstoffkonsum deutlich, was die Interpretation stützt, dass ein erhöhter Methioningehalt in den mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette als Schutz gegen unerwünschte Reaktionen von Proteinen, Lipiden und DNA bzw. RNA mit reaktiven Sauerstoffspezies dient (Boveris and Chance, 1973; Brand, 2010; St-Pierre et al., 2002).

Gruppe	Met in Komplex I (%)	Met Codons	Aerobe metabolische Rate	Spezialisiertes respiratorisches System	Sauerstofftransportpigment	Kommentare und Referenzen
Porifera	2,81	1	Niedrig	Nein	Nein	Im Allgemeinen geringe Stoffwechselrate, sowohl in antarktischen als auch tropischen Habitaten (Gatti et al., 2002; Hadas et al., 2008)
Cnidaria	2,83	1	Niedrig	Nein	Nein	Generell geringe Stoffwechselrate and ausgesprochen Hypoxietoleranz (Childress and Seibel, 1998). Bis zu 10x weniger O <sub>2</sub> -Verbrauch als andere Crustaceae im gleichen Habitat unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit (Thuesen and Childress, 1994).
Plathelminthes	2,88	1	Sehr niedrig	Nein	Teilweise (nicht zirkulatorisch)	Alle untersuchten Arten in dieser Arbeit sind im adulten Stadium parasitär; es wird im Allgemeinen angenommen, dass eine Anaerobiose vorliegt unabhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff (Halton, 1997; Tielens, 1994).
Echinodermata	2,03	1	Sehr niedrig	Wasser-Gefäßsystem	Teilweise	Sehr geringe Stoffwechselrate. Zeigt bis zu 8x geringeren Sauerstoffverbrauch als gemeine Invertebraten der gleichen Größe (Takemae et al., 2009).
Insecta	8,57	2	Hoch	Ja	Teilweise	Generell hohe Stoffwechselrate im Vergleich zu gleich großen aquatischen Invertebraten oder kaltblütigen Vertebraten (Lighton, 1996; Makarieva et al., 2008).
Apidae	12,13	2	Sehr hoch	Ja	Ja (nicht zirkulatorisch)	Besonders hohe Stoffwechselrate. Verschiedene Arten zeigen bis zu 30x höhere Stoffwechselraten als nichtfliegende Insekten der gleichen Größe (Harrison and Roberts, 2000; Wolf et al., 1996).
Aleyrodoidea	11,85	2	Sehr hoch	Ja	Ja (nicht zirkulatorisch)	Besonders hohe Stoffwechselrate. Arten zeigen bis zu 10x höhere Stoffwechselrate als Ameisen mit der gleichen Körpergröße (Sal-

Gruppe	Met in Komplex I (%)	Met Codons	Aerobe metabolische Rate	Spezialisiertes respiratorisches System	Sauerstofftransportpigment	Kommentare und Referenzen
						vucci and Crafts-Brandner, 2000).
Mammalia	7,11	2	Hoch	Ja	Ja	Generell hohe Stoffwechselrate. Im Allgemeinen viel höher als bei ektothermen Tieren (Makariewa et al., 2008), etwa auf gleichem Niveau wie fliegende Insekten (Harrison and Roberts, 2000).

Tabelle 17: Aerobe Stoffwechselrate, klassische morphologische Korrelate der Stoffwechselrate und Methioningehalt in mitochondrial kodierten Proteinen von Komplex I in verschiedenen Tiergruppen.

### 6.3. Intramembranäre Thiolgruppen besitzen eine pro-oxidative cytotoxische Redox-Chemie

Obwohl die redox-aktive Aminosäure Methionin in den Atmungskettenkomplexen, besonders in Komplex I, angereichert ist, findet man bei einer anderen redox-aktiven Aminosäure, dem Cystein, eine Depletion in genau diesen Proteinen. Diese Verminderung der Nutzungshäufigkeit korreliert in Komplex I signifikant mit der maximalen Lebensdauer der untersuchten Tierarten (Tabelle 10), ist aber absolut am stärksten in Komplex IV ausgeprägt (Schindeldecker et al., 2011).

Bezüglich der starken Signifikanz in der verminderten Nutzung von redox-aktivem Cystein in den Proteinen der Atmungskette, besonders in Korrelation zur Langlebigkeit (Tabelle 8 und 11), stellte sich die Frage, welche biochemischen Besonderheiten diesem Phänomen zu Grunde liegen. Diese Frage ist insofern relevant, da speziell die Oxidation von zwei Cysteinen zu einem Disulfid oft und vielfältig von der Zelle produktiv genutzt wird, zum Beispiel in vielen Proteinen des sekretorischen Weges, als Teil des Redox-Zyklus von Gluthation oder als Redox-Sensor im KEAP1 System (Di Mascio et al., 1991; Sen and Packer, 1996). Auf Grund dieser Nutzung wird in der Literatur die Oxidation von Cystein als generell „intendiert“ und eher harmlos angesehen. Wieso ist dann ihre Nutzung speziell in Proteinen der inneren Mitochondrienmembran vermindert?

Um diese anscheinend widersprüchlichen Ergebnisse zu verstehen, wurde ein Augenmerk auf die besonderen chemischen Eigenschaften dieser redox-aktiven Aminosäure gelegt. Cystein kann mit seiner relativ reaktiven Thiolgruppe besondere Reaktionen eingehen, die bei keiner anderen Aminosäure möglich sind. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit (Tabelle 12) geht hervor, dass sich der Cysteingehalt in mitochondrial kodierten Proteinen der Atmungskette speziell im Vergleich zwischen

anaeroben und aeroben Tieren signifikant unterscheidet. Darüber hinaus korreliert die verminderte Nutzung von Cystein in aeroben Tierarten mit ihrer maximalen Lebensspanne, was bei anaeroben Tieren nicht beobachtet werden kann. Bei anaeroben Tieren war das Gegenteil der Fall, denn der Cysteingehalt in den mitochondrial kodierten Proteinen war in diesen Tieren höher als im zellulären Mittel von 20 untersuchten Spezies (Schindeldecker et al., 2011). Aus diesen zwei Punkten und der Tatsache, dass die Mitochondrien den Ort der Sauerstoffverwertung darstellen und deshalb ein höheres oxidatives Milieu besitzen als das Cytoplasma, wurde darauf geschlossen, dass die differenzierte Cysteindepletion und die Korrelation von Cystein mit der Langlebigkeit auf Sauerstoff und/oder eine seiner reaktiven Spezies zurückzuführen ist. Da das stärkste Signal der Cysteindepletion in den Membrananteilen der Atmungskettenproteinen auftrat, wobei der Ort der Kodierung keine Rolle spielte (Schindeldecker et al., 2011), wurde angenommen, dass die Oxidation der Thiolfunktion von Cystein in einem lipophilen Milieu von außerordentlicher Bedeutung ist. Aus diesen Grund wurden im Folgenden biochemische Experimente zur Redox-Chemie von intramembranären Thiolgruppen durchgeführt, indem die Folgen der Applikation von lipophilen Thiolen in zwei zellulären System und einem reinen Membransystem, bestehend aus nativ präparierten Rattenhirnlipiden, untersucht wurde.

### 6.3.1 Lipophile Thiole sind cytotoxisch

Beide untersuchten Zelltypen zeigten in ihrer Suszeptibilität gegenüber den untersuchten Substanzen gleiche Tendenzen. Die wasserlöslichen Thiole (CAM, DES, CYS, GSH) zeigten keine Toxizität sowohl in HT22 als auch in IMR90-Zellen (Abbildung 12 und 14). Bei den IMR90-Zellen war eine leichte Variabilität in der Überlebenskurve zu erkennen, was aber wohl keine toxische Ursache hatte, denn auch bei steigender Konzentration der Substanzen blieb die Überlebensrate annähernd gleich; deshalb war von einer veränderten Proliferation auszugehen. Bei HT22-Zellen sank die Überlebensrate sukzessiv mit wachsender Kettenlänge der applizierten lipophilen Thiole, wobei 12SH in diesem Zellsystem den stärksten toxischen Effekt hervorrief (Abbildung 13). Ebenfalls war die Inkubation von IMR90-Zellen mit kurzkettigen Thiolen nicht toxisch, sondern die Toxizität stieg mit zunehmender Kettenlänge stetig an und erreichte mit 12SH ihr Maximum (Abbildung 15 und 16). Damit war die Kettenlänge und damit die Hydrophobizität der applizierten Substanzen für den toxischen Effekt entscheidend. Eine höhere Hydrophobizität bedeutet, dass diese Substanzen sich in hydrophoben Bereichen der Zelle anreichern, was innerhalb der Zelle vor allem auf die

Membransysteme, wie z.B. Cytoplasmamembran und die membranreichen Organellen, wie endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrium zutrifft.

Der leichte Unterschied in der Toxizität von kürzerkettigen Thiolen auf HT22 und IMR90-Zellen kann vermutlich auf den unterschiedlichen Typus der beiden Zelllinien zurückgeführt werden: HT22-Zellen sind klonale neuronale Zellen, wohingegen IMR90-Zellen primäre Lungenfibroblasten sind. Des Weiteren könnte die unterschiedliche Toleranz gegenüber manchen Substanzen dadurch erklärt werden, dass die Zelllinien aus zwei unterschiedlichen Spezies stammen.

Um den Charakter der toxischen Wirkung weiter zu untersuchen, wurden die Proben vor der Inkubation mit 100  $\mu$ M 12SH mit drei verschiedenen Antioxidantien vorinkubiert (Abbildung 18). Dabei stellte sich heraus, dass nur  $\alpha$ -Tocopherol in der Lage war, die toxische Wirkung von 12SH etwas abzuschwächen. Die anderen Antioxidantien sind ausschließlich hydrophil und wirken deshalb nur im wässrigen Milieu, wie im Cytosol oder in der mitochondrialen Matrix. Da 12SH eine lipophile Substanz ist, und nur  $\alpha$ -Tocopherol einen leichten Schutz bieten konnte, bestätigt sich indirekt die Annahme, dass das lipophile Thiol 12SH sich in lipophilen Bereichen der Zelle ansammelte, wie zum Beispiel im Bereich der Phospholipide von Membranen, und dort die gesehene toxische Wirkung vermittelte. Es bleibt zu diskutieren, ob eine zusätzliche Applikation von Ascorbat den antioxidativen Effekt verstärkt hätte, da  $\alpha$ -Tocopherol als kettenabbrechendes Antioxidans mit Radikalen zu  $\alpha$ -Tocopheryl reagiert, welches durch die nachfolgende Reaktion mit Ascorbat, unter Bildung eines Ascorbyl-Radikals, wieder zu  $\alpha$ -Tocopherol umgewandelt wird (May et al., 1998).

Die Applikation von DOH als auch DMS konnte keine vergleichbare toxische Effekte hervorrufen. Die toxische Spezifität von 12SH macht deutlich, dass die schädliche Wirkungsweise auf die Thiolgruppe zurückzuführen ist. Im weiteren ist auch der lipophile Charakter einer Substanz entscheidend, da nur langkettige, nicht aber kurzkettige Thiole die beschriebene zelltoxische Wirkung zeigten. Um die biochemischen Ursachen dieser Cytotoxizität weiter zu definieren, wurden mit Hilfe von Western-Blots verschiedene Proteine untersucht, die mit Proteinschäden und proteotoxischem Stress assoziiert sind.

### 6.3.2 Dodecanthiol induziert proteotoxischen Stress in IMR90-Zellen

Die Behandlung von IMR90-Zellen mit 100  $\mu$ M 12SH zeigte bereits nach 4h eine deutliche Zunahme von polyubiquitinierten Proteinen, die nach 6h weiter anstieg, bis nach 24h das stärkste Signal detektiert wurde (Abbildung 19). Dieser zeitabhängige Anstieg bei einer einmaligen Applikation

von 12SH lässt auf eine sukzessive schädliche Wirkungsweise schließen. Nach 24h war das stärkste Polyubiquitinsignal zu erkennen, und es kam zeitgleich zu einer starken Zunahme an induzierbarem HSP70, was andeutet, dass die Zelle mit der erhöhten Expression des Chaperons HSP70 der schädlichen Wirkung entgegenwirkte. Die erhöhte Expression von HSP70 war nach 48h noch erkennbar, zu einem Zeitpunkt, an dem kein erhöhtes Polyubiquitinsignal mehr feststellbar war. Die Tatsache, dass nach 24h der meiste Schaden entstanden war, lies sich auch an dem erhöhten Signal von P62 ablesen, das als Bindeglied zwischen den zum Abbau vorgesehenen Proteinen und der Autophagie bzw. dem Proteasom fungiert (Behl, 2011). P53, das als Tumorsupressorgen bekannt ist, akkumuliert nach Stress in Zellen (Murray-Zmijewski et al., 2008). Die gleichbleibende Expression von P53 über die ganze Inkubationsdauer hinweg legte nahe, dass die Behandlung keinen akuten Effekt auf den über P53 gesteuerten Zellzyklus hatte, und damit auch, dass die in Abbildung 16 gesehene Toxizität nicht auf fehlende Proliferation gegenüber der Kontrolle basierte. Mit diesen Daten wird deutlich, dass die Inkubation von 100  $\mu$ M 12SH einen proteotoxischen Effekt erzeugte, der nach 4h begann und nach 24h seinen Höhepunkt hatte, was eine Kaskade von Gegenmaßnahmen der Zelle induzierte, wie die verstärkte Expression des Chaperons HSP70 und des Proteins P62.

Der Vergleich mit anderen applizierten Substanzen ergibt, dass exklusiv 12SH ein deutliches Signal von Polyubiquitin erzeugte (Abbildung 21), und dieses nach 24h am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 20). Damit bestätigt sich die durch die MTT-Assays gewonnene Erkenntnis, dass eine gewisse Kettenlänge und die Thiolfunktion nötig sind, um einen cytotoxischen und proteotoxischen Effekt auszulösen.

Durch den stark lipophilen Charakter von 12SH ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass sich 12SH nach der Applikation vor allem in den Membranen der Zelle ansammelte, da diese ein lipophiles Milieu bilden, und dass 12SH dort die gesehene zell- und proteinschädigende Wirkung verursachte. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, die den Grad der Lipidperoxidation messen und dadurch Rückschlüsse über die toxische Wirkungsweise von 12SH innerhalb von Membranen geben.

### **6.3.3 Intramembranäres Cystein als Kettentransferagens**

Innerhalb von Zellmembranen können oxidative Reaktionen zur Peroxidation von Fettsäuren führen, was seinerseits die Entstehung von Aldehyden wie Malondialdehyd bedingt. Diese Aldehyde können dann sowohl andere Fettsäuren als auch die DNA schädigen und zusätzlich zum Cross-Lin-

king von Proteinen führen (Del Rio et al., 2005). Bei der Lipidperoxidation reagieren Phospholipide in Membranen oder Lipoproteine im Plasma mit Radikalen, wie Peroxyl- oder Hydroxylradikalen. Dabei entstehen je nach Reaktionsverlauf Aldehyde wie 4-Hydroxynonenal und Malondialdehyd, oder auch Eicosanoide wie 8-Isoprostan.

Um den toxischen Effekt von lipophilen Thiolen auf Membranen und deren Bestandteile zu untersuchen, wurden in nativen, isolierten Rattenhirnlipiden in PBS, was ein zellfreies System darstellt, TBARS-Messungen durchgeführt. Isolierte Hirnlipide zeichnen sich dadurch aus, dass sowohl antioxidative Enzyme als auch Enzymsubstrate für Proteine, die endogene reaktive Sauerstoffspezies produzieren können weitgehend fehlen, deshalb wurde eine Radikalquelle zugegeben, da ohne diese Quelle keine Lipidperoxidation in diesem System erkenntlich war (Abbildung 22). Mit Eisen und Ascorbat allerdings war eine durch 12SH stark beschleunigte Bildung von TBARS zu beobachten, was durch einen kooperativen Effekt zwischen Radikalquelle und Dodecanthiol erklärt werden könnte. Thiole sind in der Lage, durch eine 1-Elektronen-Oxidation zu radikalisieren, wobei ein Thiylradikal entsteht (Dénès et al., 2014; Munday, 1989; Nauser et al., 2012). Dieses Thiylradikal kann dann die Lipidperoxidation fortführen: Dodecanthiol ist als ein solches Kettentransferagens in der Polymerchemie bekannt, wo es eingesetzt wird, um die Menge an notwendigem Initiator zu minimieren (Hoyle et al., 2004; Maxwell et al., 1992).

In IMR-90 Zellen bewirkte die Behandlung mit Dodecanthiol die Bildung von 8-Isoprostan, das ein radikal-katalysiertes Produkt der Lipidperoxidation ist (Abbildung 23). Bemerkenswert dabei ist, dass hier keine Radikalquelle künstlich zugegeben wurde, d.h. der in Abbildung 23 gesehene Effekt beruhte auf endogenen reaktiven Sauerstoffspezies der Zelle. Die Schlussfolgerung wird durch den TBARS-Assay gestützt, weil dadurch deutlich wurde, dass Dodecanthiol eine Radikalquelle benötigte, um die Lipidperoxidation zu katalysieren.

#### **6.3.4 Dodecanthiol induziert die Isomerisierung von cis- zu trans-Fettsäuren *in vivo***

Um den Mechanismus der Thiol-Redox-Reaktion genauer charakterisieren zu können, wurden die Proben auf ihren Gehalt an trans-Fettsäuren untersucht. Thiylradikale reagieren spezifisch mit cis-Fettsäuren und bilden dabei trans-Fettsäuren (Chatgililoglu et al., 2006; Chatgililoglu and Ferreri, 2005; Zambonin et al., 2008).

Diese spezifische Reaktion von Thiylradikalen mit cis-Fettsäuren ist bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren am stärksten ausgeprägt, da jede einzelne Doppelbindung potentiell mit einem Thiylradi-

kal zu einer trans-Konformation reagieren kann (Chatgialloglu et al., 2006; Hulbert, 2005). Der allgemeine Mechanismus der cis/trans-Isomerisierung von Fettsäuren durch Thiylradikale kann wie folgt beschrieben werden:

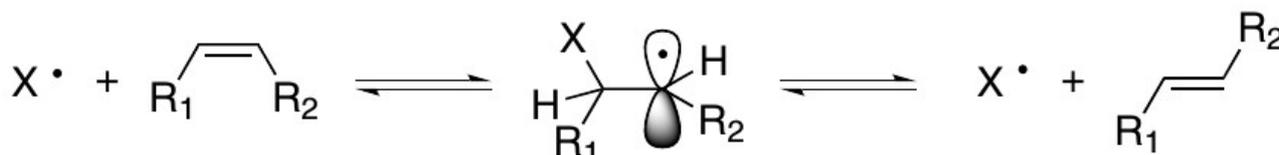


Abbildung 26: Allgemeiner Mechanismus der radikalvermittelten cis/trans-Isomerisierung von cis-Fettsäuren durch ein Radikal X. Nach Chatgialloglu et al., 2006.

Die kinetische Beschreibung der Reaktion basiert auf den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion und zeigt, dass der Übergangszustand ( $A^\cdot$ ) ausgehend von cis- oder trans-Fettsäuren annähernd gleich schnell erreicht wird. Die Reaktion vom Übergangszustand in Richtung trans-Fettsäure ist jedoch favorisiert, da die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion eine Zehnerpotenz höher ist als bei der Reaktion in Richtung cis-Fettsäure (Abbildung 27).

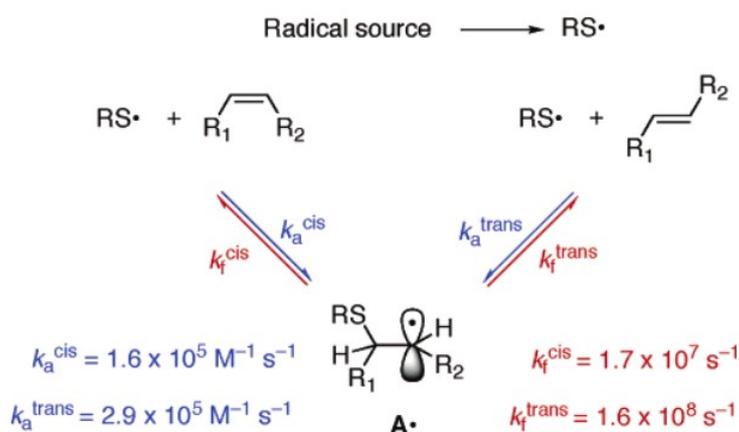


Abbildung 27: Geschwindigkeitskonstanten der cis/trans-Isomerisierung von Fettsäuren durch Thiylradikale. Nach Chatgialloglu and Ferreri, 2005.

Nach einer Inkubationszeit von 6h zeigte die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  12SH eine Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung in IMR90-Zellen (Abbildung 25). So stieg die Konzentration aller analysierten trans-Fettsäuren. Die Konzentration von Elaidinsäure nahm um ungefähr das 6-fache gegenüber der Ethanolkontrolle zu. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass die zell- und proteotoxischen Reaktionen von Dodecanthiol sehr wahrscheinlich auf die Bildung von Thiylradikalen zurückzuführen

ren sind.

Im Menschen reicht die Konzentration an trans-Fettsäuren von 0,8% im Blutserum bis zu 14,4% in der Leber (Kinsella et al., 1981). Basierend auf den Daten dieser Arbeit könnte somit angenommen werden, dass die Entstehung von trans-Fettsäuren in tierischen Geweben durch Thiylradikale, wie Cystein-Radikale in Proteinen innerhalb einer Zellmembran, ausgelöst werden kann und damit nicht alleine auf trans-Fettsäuren in der Nahrung zurückzuführen ist. Dabei könnten reaktive Sauerstoffspezies die Radikalisierung von Thiolen, wie z.B. Cystein, zu Thiylradikalen bewirken und somit diese Reaktion initiieren. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Gehalt an trans-Fettsäuren, zusammen mit der beobachteten Abnahme von ungesättigten cis-Fettsäuren wie Docosaheensäure, durch Zugabe von lipophilen Thiolen erhöht werden kann. Da unter physiologischen Bedingungen wohl einzig Thiylradikale in der Lage sind, die cis-trans-Isomersetzung von Fettsäuren zu katalysieren (Chatgililoglu and Ferreri, 2005), ist davon auszugehen, dass Thiylradikale für die Bildung von trans-Fettsäuren verantwortlich waren. Dadurch wird deutlich, dass sich lipophile Thiole stark von den ansonsten als antioxidativ geltenden wässrigen Thiolen unterscheiden.

Durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse ergibt sich ein rationales Bild der differenzierten Nutzung der beiden schwefeltragenden Aminosäuren Cystein und Methionin: Auf der einen Seite findet eine deutliche Anreicherung von antioxidativem Methionin in Proteinen des Mitochondriums statt, die umso ausgeprägter ist, je näher diese Proteine an Orten der ROS-Produktion liegen. Diese Anreicherung konnte bei allen Tieren beobachtet werden, die Sauerstoff zur Energiegewinnung nutzen und eine hohe Stoffwechselrate aufweisen. Untermauert wird dieser Befund dadurch, dass in vielen Tierstämmen eine Verdoppelung des Met-Codons im mitochondrialen genetischen Code stattgefunden hat, und dass eine spezielle Enzymfamilie auf das Recycling von oxidiertem Methionin spezialisiert ist.

Auf der anderen Seite stellte sich Cystein in diesen Untersuchungen nicht als angereicherte, protektive und antioxidative Aminosäure dar, deren vermehrte Nutzung einen antioxidativen Vorteil innerhalb von Proteinen liefern würde. Im Gegenteil war der Gehalt an Cystein in Proteinen, die erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind, stark erniedrigt. Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass lipophile Thiole eine proteotoxische Wirkung besitzen, Lipidperoxidation fördern und in der Lage sind, die Bildung von trans-Fettsäuren zu katalysieren. Eine redox-toxische Wirkung intramembranärer Thiole könnte diese Befunde plausibel erklären.

## 7 Zusammenfassung

Gewebe, Zellen und speziell Zellkompartimente unterscheiden sich in ihrer Sauerstoffkonzentration, Stoffwechselrate und in der Konzentration an gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies. Um eine mögliche Änderung in der Aminosäurenutzung durch den Einfluss von Sauerstoff und seinen reaktiven Spezies untersuchen zu können wurden, Bereiche bzw. Kompartimente der menschlichen Zelle definiert, die einen Referenzrahmen bildeten und bekannt dafür sind, einen relativ hohen Grad an reaktiven Sauerstoffspezies aufzuweisen. Aus dem Vergleich wurde deutlich, dass vor allem die beiden redox-aktiven und schwefeltragenden Aminosäuren Cystein und Methionin durch eine besondere Verteilung und Nutzung charakterisiert sind. Cystein ist hierbei diejenige Aminosäure mit den deutlichsten Änderungen in den fünf untersuchten Modellen der oxidativen Belastung. In all diesen Modellen war die Nutzung von Cystein deutlich reduziert, wohingegen Methionin in Proteinen des Mitochondriums und der Elektronentransportkette angereichert war. Dieser auf den ersten Blick paradoxe Unterschied zwischen Cystein und Methionin wurde näher untersucht, indem die differenzierte Methioninnutzung in verschiedenen Zellkompartimenten von Homo sapiens charakterisiert wurde.

Die sehr leicht zu oxidierende Aminosäure Methionin zeigt ein ungewöhnliches Verteilungsmuster in ihrer Nutzungshäufigkeit. Entgegen mancher Erwartung wird Methionin in zellulären Bereichen hoher oxidativer Belastung und starker Radikalproduktion intensiv verwendet. Dieses Verteilungsmuster findet man sowohl im intrazellulären Vergleich, als auch im Vergleich verschiedener Spezies untereinander, was daraufhin deutet, dass es einen lokalen Bedarf an redox-aktiven Aminosäuren gibt, der einen sehr starken Effekt auf die Nutzungshäufigkeit von Methionin ausübt. Eine hohe Stoffwechselrate, die im Allgemeinen mit einer erhöhten Produktion von Oxidantien assoziiert wird, scheint ein maßgeblicher Faktor der Akkumulation von Methionin in Proteinen der Atmungskette zu sein. Die Notwendigkeit, oxidiertes Antioxidans wieder zu reduzieren, findet auch bei Methionin Anwendung, denn zu Methioninsulfoxid oxidiertes Methionin wird durch die Methioninsulfoxidreduktase wieder zu Methionin reduziert. Daher kann die spezifische Akkumulation von Methionin in Proteinen, die verstärkt reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt sind, als eine systematische Strategie angesehen werden, um andere labile Strukturen vor ungewollter Oxidation zu schützen.

Da Cystein in allen untersuchten Modellen der oxidativen Belastung und im Besonderen in Membranproteinen der inneren Mitochondrienmembran lebensspannenabhängig depletiert war, wurde

dieses Merkmal näher untersucht. Deshalb wurde die Hypothese getestet, ob ein besonderer Redox-Mechanismus der Thiolfunktion für diese selektive Depletion einer im Allgemeinen als harmlos oder antioxidativ geltenden Aminosäure verantwortlich ist. Um den Effekt von Cysteinresten in Membranen nachzustellen, wurden primäre humane Lungenfibroblasten (IMR90) mit diversen Modellsubstanzen behandelt. Geringe Konzentrationen der lipophilen Substanz Dodecanthiol verursachten eine signifikante Toxizität in IMR90-Zellen, die von einer schnellen Zunahme an polyubiquitinierten Proteinen und anderen Indikatoren des proteotoxischen Stresses, wie Sequestosom 1 (P62), HSP70 und HSP90 begleitet wurde. Dieser Effekt konnte spezifisch der Chemie der Thiolfunktion in Membranen zugeordnet werden, da Dodecanol (DOH), Dodecylmethylsulfid (DMS), Butanthiol oder wasserlösliche Thiole weder eine cytotoxische Wirkung noch eine Polyubiquitinierung von Proteinen verursachten. Die Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass Thiole innerhalb von biologischen Membranen als radikalische Kettenttransferagentien wirken. Diese Eigenschaft wird in der Polymerchemie durch Nutzung von lipophilen Thiolen in hydrophoben Milieus technisch für die Produktion von Polymeren benutzt. Da die Thiylradikal-spezifische Reaktion von cis-Fettsäuren zu trans-Fettsäuren in 12SH behandelten Zellen verstärkt ablief, kann gefolgert werden, dass 12SH zellulär radikalisiert wurde. In lebenden Organismen kann demnach die Oxidation von Cystein die Schädigung von Membranen beschleunigen und damit Einfallstore für die laterale Radikalisierung von integralen Membranproteinen schaffen, welche möglicherweise der Langlebigkeit abträglich ist, zumindest, wenn sie in der inneren Mitochondrienmembran auftritt.

## 8 Synopsis

Nearly every cell in higher eukaryotes is influenced by oxygen. Oxygen is omnipresent in the environment of almost every higher animal, and it is used to metabolize substrates to gain the majority of the cell's ATP. On the other side, oxygen is highly reactive when reactive oxygen species are formed as byproducts of the normal energy metabolism. The ensuing oxidative stress can lead to oxidative modifications of amino acid side chains in proteins, which are considered to represent structural damage. Since the chemistry of the amino acids varies in many ways, it was of interest to analyze the differentiated amino acid usage in various models of oxidative stress including organelles and cellular substructures as well physiological factors such as longevity and oxygen consumption. Analyzing the amino acid usage of mitochondrial proteins in 20 different animals, it was found that the two sulfur-containing and redox-active amino acids were employed in

an oppositional way. While methionine accumulated in proteins of the respiratory chain, cysteine was depleted in exactly these peptides.

Regarding the methionine effect, studies on its distribution in 19806 proteins from *Homo sapiens* revealed a clear tendency of methionine to accumulate in proteins located to the vicinity to high oxidative pressure. The accumulation of methionine in proteins of the electron transport chain and the possibility of methionine sulfoxide reductase to reverse the oxidation of methionine indicates that the purpose of methionine accumulation in proteins in an oxidative environment is to act as a sacrificial cathode. As a consequence, it is likely that an elevated methionine content can protect protein surfaces and the surrounding lipids from getting oxidized under oxidative stress conditions. If there is no or little oxidative stress, for example in anaerobic animals like parasites or anaerobic helminths, no methionine accumulation could be seen.

Regarding cysteine, to understand the mechanism of the observed cysteine depletion in proteins of the respiratory chain and in other oxidative sites, a series of biochemical experiments were performed. A new model substance, namely dodecylthiol (12SH), was used to reverse the effect of the evolutionary cysteine and thus thiol depletion in membrane proteins. Primary human lung fibroblasts (IMR90) were treated with different concentrations of 12SH and different control substances. At low concentrations (10-100  $\mu\text{M}$ ), 12SH caused significant toxicity to IMR90 cells, which was accompanied by a rapid increase in the levels of poly-ubiquitinated proteins and other markers of proteotoxic stress like sequestosome 1 (p62), and a delayed upregulation of HSP70 and HSP90 was noted. These effects were specific to the intramembrane accumulation of a thiol group, because dodecyl alcohol (DOH), methylated dodecyl thiol (DMS), butyl thiol (4SH), or other aqueous thiols neither induced cytotoxicity, nor elevated the levels of poly-ubiquitinated proteins. The addition of tocopherol could partially reverse the observed cytotoxicity of 12SH, which could not be achieved by the exogenous addition of catalase or SOD. To study the impact of thiols on lipid peroxidation, isolated brain membranes were treated with 12SH, which alone had no effect, but in combination with low concentrations of radical initiators massively amplified the lipid peroxidation process. To summarize these findings, thiols in biological membranes (and hence cysteine in membrane proteins) seem to possess a highly efficient free radical chain-transfer activity, as known from polymer chemistry. For this reason, cysteine residues might accelerate lipid bilayer decomposition, putatively followed by the lateral radicalization of integral membrane proteins, which might result in selective damage to high-protein, high-oxidant membranes, such as those of the inner mitochondrial membrane.

## 9 Literatur

- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 138, 405–415. doi:10.1016/j.cbpb.2004.05.013
- Alberts, B., 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. ed. Garland Science, New York.
- Albring, M., Griffith, J., Attardi, G., 1977. Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1348–1352.
- Aledo, J.C., Li, Y., de Magalhães, J.P., Ruíz-Camacho, M., Pérez-Claros, J.A., 2011. Mitochondrially encoded methionine is inversely related to longevity in mammals. *Aging Cell* 10, 198–207. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00657.x
- Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.-L., Kühlbrandt, W., 2011. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I<sub>III</sub>II<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>. *EMBO J.* 30, 4652–4664. doi:10.1038/emboj.2011.324
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., 2004. Protein sequence databases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 76–80. doi:10.1016/j.cbpa.2003.12.004
- Armstrong, D., Browne, R., 1994. *The Analysis of Free Radicals, Lipid Peroxides, Antioxidant Enzymes and Compounds Related to Oxidative Stress as Applied to the Clinical Chemistry Laboratory*, in: Armstrong, D. (Ed.), *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Springer US, Boston, MA, pp. 43–58.
- Ashton, N.W., Bolderson, E., Cubeddu, L., O’Byrne, K.J., Richard, D.J., 2013. Human single-stranded DNA binding proteins are essential for maintaining genomic stability. *BMC Mol. Biol.* 14, 9. doi:10.1186/1471-2199-14-9
- Baradaran, R., Berrisford, J.M., Minhas, G.S., Sazanov, L.A., 2013. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494, 443–448. doi:10.1038/nature11871
- Barja, G., 2002. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1167–1172. doi:10.1016/S0891-5849(02)00910-3
- Barrell, B.G., Bankier, A.T., Drouin, J., 1979. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282, 189–194.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- Behl, C., 2011. BAG3 and friends: Co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy* 7, 795–798. doi:10.4161/auto.7.7.15844
- 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. *PNAS* 105, 16496–16501. doi:10.1073/pnas.0802779105
- Bogenhagen, D., Clayton, D.A., 1974. The Number of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid Genomes in Mouse L and Human HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* 249, 7991–7995.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716.
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472. doi:10.1016/j.exger.2010.01.003
- Brandt, U., 2006. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75, 69–92. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539
- Carey, J., Judge, D., 2000. Longevity records: life spans of mammals, birds, reptiles, amphibians and fish. *Odense Monogr. Popul. Aging Ed B Jeune JW Vaupel Odense Univ.*

Press.

- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527–605.
- 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.
- Chatgililoglu, C., Ferreri, C., 2005. *Trans Lipids: The Free Radical Path.* *Acc. Chem. Res.* 38, 441–448. doi:10.1021/ar0400847
- Chatgililoglu, C., Ferreri, C., Lykakis, I., Wardman, P., 2006. trans-Fatty acids and radical stress: What are the real culprits? *Bioorg. Med. Chem.* 14, 6144–6148. doi:10.1016/j.bmc.2006.05.052
- Childress, J.J., Seibel, B.A., 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J. Exp. Biol.* 201, 1223–1232.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Green, D.R., 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 13, 1396–1402. doi:10.1038/sj.cdd.4401963
- Ciorba, M.A., Heinemann, S.H., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T., 1997. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9932–9937.
- Cordeiro, R.M., 2013. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* doi:10.1016/j.bbamem.2013.09.016
- Crane, F.L., 2001. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 591–598. doi:10.1080/07315724.2001.10719063
- Crofts, A.R., 2004. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 689–733. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251
- Davis, J.B., Maher, P., 1994. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 652, 169–173. doi:10.1016/0006-8993(94)90334-4
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 15, 316–328. doi:10.1016/j.numecd.2005.05.003
- De Magalhaes, J.P., 2005. HAGR: the Human Ageing Genomic Resources. *Nucleic Acids Res.* 33, D537–D543. doi:10.1093/nar/gki017
- Dénès, F., Pichowicz, M., Povie, G., Renaud, P., 2014. Thiyl Radicals in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* 114, 2587–2693. doi:10.1021/cr400441m
- Díaz, A., Allen, J.E., 2007. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.* 37, 3319–3326. doi:10.1002/eji.200737765
- Dieteren, C.E.J., Gielen, S.C.A.M., Nijtmans, L.G.J., Smeitink, J.A.M., Swarts, H.G., Brock, R., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., 2011. Solute diffusion is hindered in the mitochondrial matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8657–8662. doi:10.1073/pnas.1017581108
- Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 194S–200S.
- Erickson, J.R., Joiner, M.A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C.V., Bartlett, R.K., Lowe, J.S., O'Donnell, S.E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M.C., Zimmerman, K., Ham, A.-J.L., Weiss, R.M., Spitz, D.R., Shea, M.A., Colbran, R.J., Mohler, P.J., Anderson, M.E., 2008. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462–474. doi:10.1016/j.cell.2008.02.048
- Etienne, F., Spector, D., Brot, N., Weissbach, H., 2003. A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 378–382. doi:10.1016/S0006-291X(02)02870-X

- Ezraty, B., Aussel, L., Barras, F., 2005. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 221–229. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.017
- Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* 125, pp. 1–15.
- Garland, T., Harvey, P.H., Ives, A.R., 1992. Procedures for the Analysis of Comparative Data Using Phylogenetically Independent Contrasts. *Syst. Biol.* 41, 18–32. doi:10.1093/sysbio/41.1.18
- Gatti, S., Brey, T., Müller, W., Heilmayer, O., Holst, G., 2002. Oxygen microoptodes: a new tool for oxygen measurements in aquatic animal ecology. *Mar. Biol.* 140, 1075–1085. doi:10.1007/s00227-002-0786-9
- Gems, D., 2000. Longevity and ageing in parasitic and free-living nematodes. *Biogerontology* 1, 289–307. doi:10.1023/A:1026546719091
- Gowda, K., Black, S.D., Moeller, I., Sakakibara, Y., Liu, M.C., Zwieb, C., 1998. Protein SRP54 of human signal recognition particle: cloning, expression, and comparative analysis of functional sites. *Gene* 207, 197–207. doi:10.1016/S0378-1119(97)00627-6
- Hadas, E., Ilan, M., Shpigel, M., 2008. Oxygen consumption by a coral reef sponge. *J. Exp. Biol.* 211, 2185–2190. doi:10.1242/jeb.015420
- Hajieva, P., Mocko, J.B., Moosmann, B., Behl, C., 2009. Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *J. Neurochem.* 110, 118–132. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06114.x
- Halliwell, B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 9, 1–32.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press Oxford.
- Halton, D.W., 1997. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *Int. J. Parasitol.* 27, 693–704. doi:10.1016/S0020-7519(97)00011-8
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353, 411–416.
- Harman, D., 1956. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
- Harrison, J.F., Roberts, S.P., 2000. Flight respiration and energetics. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 179–205. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.179
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., Su, T.-P., 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 19, 81–88. doi:10.1016/j.tcb.2008.12.002
- Hayflick, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636. doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9
- Herrmann, J.M., Neupert, W., 2000. Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 210–214. doi:10.1016/S1369-5274(00)00077-1
- Hoffman, D.L., Brookes, P.S., 2009. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *J. Biol. Chem.* 284, 16236–16245. doi:10.1074/jbc.M809512200
- Hoyle, C.E., Lee, T.Y., Roper, T., 2004. Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 42, 5301–5338. doi:10.1002/pola.20366
- Ho, Y.S., Gargano, M., Cao, J., Bronson, R.T., Heimler, I., Hutz, R.J., 1998. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273, 7765–7769. doi:10.1074/jbc.273.13.7765
- Huijing, F., Slater, E., 1961. The use of oligomycin as an inhibitor of oxidative phosphorylation. *J. Biochem. (Tokyo)* 49, 493–501.
- Hulbert, A.J., 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234, 277–288. doi:10.1016/j.jtbi.2004.11.024

- Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755–776. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055
- Janssen, L.J., 2001. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280, L1067–1082.
- Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., Brand, M.D., 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47, 53–67. doi:10.1042/bse0470053
- Johansen, M.E., Muller, J.G., Xu, X., Burrows, C.J., 2005. Oxidatively induced DNA-protein cross-linking between single-stranded binding protein and oligodeoxynucleotides containing 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 5660–5671. doi:10.1021/bi047580n
- Kim, H.-Y., Gladyshev, V.N., 2004. Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol. Biol. Cell* 15, 1055–1064. doi:10.1091/mbc.E03-08-0629
- Kinsella, J., Bruckner, G., Mai, J., Shimp, J., 1981. Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 2307–2318.
- Kirkwood, T.B.L., Kowald, A., 2012. The free-radical theory of ageing - older, wiser and still alive. *BioEssays* 34, 692–700. doi:10.1002/bies.201200014
- Kitazoe, Y., Kishino, H., Hasegawa, M., Nakajima, N., Thorne, J.L., Tanaka, M., 2008. Adaptive Threonine Increase in Transmembrane Regions of Mitochondrial Proteins in Higher Primates. *PLoS ONE* 3, e3343. doi:10.1371/journal.pone.0003343
- 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
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Jr, Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M.M., 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9782–9787.
- Lee, B.C., Dikiy, A., Kim, H.-Y., Gladyshev, V.N., 2009. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1471–1477. doi:10.1016/j.bbagen.2009.04.014
- Lenaz, G., Genova, M.L., 2009. Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1750–1772. doi:10.1016/j.biocel.2009.04.003
- 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.
- Lighton, J.R., 1996. Discontinuous gas exchange in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 309–324. doi:10.1146/annurev.en.41.010196.001521
- Li, N., 2003. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516–8525. doi:10.1074/jbc.M210432200
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., Yang, X., 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 6, 19. doi:10.1186/1756-8722-6-19
- Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P.,

- Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C., Epstein, C.J., 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11, 376–381. doi:10.1038/ng1295-376
- Löffler, G., 2007. *Biochemie und Pathobiochemie mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. Springer, Heidelberg.
- Makarieva, A.M., Gorshkov, V.G., Li, B.-L., Chown, S.L., Reich, P.B., Gavrilov, V.M., 2008. Mean mass-specific metabolic rates are strikingly similar across life's major domains: Evidence for life's metabolic optimum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16994–16999. doi:10.1073/pnas.0802148105
- Mannella, C.A., 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 542–548. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.006
- Maxwell, I.A., Morrison, B.R., Napper, D.H., Gilbert, R.G., 1992. The effect of chain transfer agent on the entry of free radicals in emulsion polymerization. *Makromol. Chem.* 193, 303–313. doi:10.1002/macp.1992.021930201
- May, J.M., Cobb, C.E., Mendiratta, S., Hill, K.E., Burk, R.F., 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 273, 23039–23045. doi:10.1074/jbc.273.36.23039
- McMillin, J.B., Dowhan, W., 2002. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 97–107. doi:10.1016/S1388-1981(02)00329-3
- Mitchell, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148. doi:10.1038/191144a0
- Moore, J., Willmer, P., 2007. CONVERGENT EVOLUTION IN INVERTEBRATES. *Biol. Rev.* 72, 1–60. doi:10.1111/j.1469-185X.1997.tb00009.x
- 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
- Morrow, J.D., Harris, T.M., Jackson Roberts, L., 1990. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* 184, 1–10. doi:10.1016/0003-2697(90)90002-Q
- Moskovitz, J., 2005. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 213–219. doi:10.1016/j.bbapap.2004.09.003
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Muller, F., 2000. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. *AGE* 23, 227–253. doi:10.1007/s11357-000-0022-9
- Munday, R., 1989. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 659–673. doi:10.1016/0891-5849(89)90147-0
- Munk, K., Abröhl, C., 2008. *Biochemie - Zellbiologie: 39 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A., Lu, X., 2008. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 702–712. doi:10.1038/nrm2451
- Nakamoto, R.K., Baylis Scanlon, J.A., Al-Shawi, M.K., 2008. The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 43–50. doi:10.1016/j.abb.2008.05.004
- Nauser, T., Koppenol, W.H., Schöneich, C., 2012. Reversible hydrogen transfer reactions in thiyl radicals from cysteine and related molecules: absolute kinetics and equilibrium constants determined by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem. B* 116, 5329–5341. doi:10.1021/jp210954v
- Nichols, W., Murphy, D., Cristofalo, V., Toji, L., Greene, A., Dwight, S., 1977. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196, 60–63. doi:10.1126/science.841339

- O'Brien, J.S., Sampson, E.L., 1965. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.* 6, 545–551.
- Porta, E.A., 2002. Pigments in aging: an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 57–65. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02083.x
- Potter, V.R., Reif, A.E., 1952. Inhibition of an electron transport component by antimycin A. *J. Biol. Chem.* 194, 287–297.
- Poulin, R., 2011. Evolutionary ecology of parasites. Princeton university press.
- Pruitt, K.D., Tatusova, T., Maglott, D.R., 2007. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, D61–D65. doi:10.1093/nar/gkl842
- Pryor, W.A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657–667. doi:10.1146/annurev.ph.48.030186.003301
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255–27264. doi:10.1074/jbc.M112.374629
- Reeg, S., Grune, T., 2014. Protein Oxidation in Aging: Does it play a role in aging progression? *Antioxid. Redox Signal.* doi:10.1089/ars.2014.6062
- Rich, P.R., 2003. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1095. doi:10.1042/BST0311095
- Sagai, M., Ichinose, T., 1980. Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sci.* 27, 731–738. doi:10.1016/0024-3205(80)90326-4
- Salvador, A., Sousa, J., Pinto, R.E., 2001. Hydroperoxyl, superoxide and pH gradients in the mitochondrial matrix: a theoretical assessment. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1208–1215. doi:10.1016/S0891-5849(01)00707-9
- Salvucci, Crafts-Brandner, 2000. Effects of temperature and dietary sucrose concentration on respiration in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Insect Physiol.* 46, 1461–1467. doi:10.1016/S0022-1910(00)00070-6
- Santos, M.A., Moura, G., Massey, S.E., Tuite, M.F., 2004. Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet.* 20, 95–102. doi:10.1016/j.tig.2003.12.009
- Sazanov, L.A., Baradaran, R., Efremov, R.G., Berrisford, J.M., Minhas, G., 2013. A long road towards the structure of respiratory complex I, a giant molecular proton pump. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1265–1271. doi:10.1042/BST20130193
- Saz, H.J., 1981. Energy metabolisms of parasitic helminths: adaptations to parasitism. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 323–341.
- Schägger, H., 2001. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52, 119–128. doi:10.1080/15216540152845911
- Scheffler, I.E., 2008. Mitochondria. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
- 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
- Schlame, M., Brody, S., Hostetler, K.Y., 1993. Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *Eur. J. Biochem.* 212, 727–733. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17711.x
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 122, 383–393. doi:10.1007/s00418-004-0673-1
- Sen, C.K., Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 10,

709–720.

- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10771–10778.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058–1071. doi:10.1002/anie.198610581
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Smith, R.A.J., Kelso, G.F., Blaikie, F.H., Porteous, C.M., Ledgerwood, E.C., Hughes, G., James, A.M., Ross, M.F., Asin-Cayuela, J., Cochemé, H.M., Filipovska, A., Murphy, M.P., 2003. Using mitochondria-targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1295–1299. doi:10.1042/BST0311295
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63. doi:10.1126/science.273.5271.59
- Stajich, J.E., Block, D., Boulez, K., Brenner, S.E., Chervitz, S.A., Dagdigian, C., Fuellen, G., Gilbert, J.G.R., Korf, I., Lapp, H., Lehväslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C.J., Osborne, B.I., Pocock, M.R., Schattner, P., Senger, M., Stein, L.D., Stupka, E., Wilkinson, M.D., Birney, E., 2002. The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res.* 12, 1611–1618. doi:10.1101/gr.361602
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790. doi:10.1074/jbc.M207217200
- Suthammarak, W., Somerlot, B.H., Opheim, E., Sedensky, M., Morgan, P.G., 2013. Novel interactions between mitochondrial superoxide dismutases and the electron transport chain. *Aging Cell* 12, 1132–1140. doi:10.1111/accel.12144
- Symersky, J., Osowski, D., Walters, D.E., Mueller, D.M., 2012. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13961–13965. doi:10.1073/pnas.1207912109
- Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., Kowaltowski, A.J., 2009. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1283–1297. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008
- Takemae, N., Nakaya, F., Motokawa, T., 2009. Low oxygen consumption and high body content of catch connective tissue contribute to low metabolic rate of sea cucumbers. *Biol. Bull.* 216, 45–54.
- The UniProt Consortium, 2012. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D43–D47. doi:10.1093/nar/gks1068
- Thierbach, G., Reichenbach, H., 1981. Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 638, 282–289. doi:10.1016/0005-2728(81)90238-3
- Thuesen, E.V., Childress, J.J., 1994. Oxygen consumption rates and metabolic enzyme activities of oceanic California medusae in relation to body size and habitat depth. *Biol. Bull.* 187, 84–98.
- Tielens, A.G., 1994. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today Pers. Ed* 10, 346–352. doi:10.1016/0169-4758(94)90245-3
- Vander Heiden, M.G., Li, X.X., Gottlieb, E., Hill, R.B., Thompson, C.B., Colombini, M., 2001. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 276, 19414–19419. doi:10.1074/jbc.M101590200

- Voet, D., 2011. *Biochemistry*, 4th ed. ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Weissbach, H., Resnick, L., Brot, N., 2005. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 203–212. doi:10.1016/j.bbapap.2004.10.004
- Wolf, Ellington, Davis, Feltham, 1996. Validation of the doubly labelled water technique for bumblebees *Bombus terrestris* (L.). *J. Exp. Biol.* 199, 959–972.
- Yagi, K., 1998. Simple Assay for the Level of Total Lipid Peroxides in Serum or Plasma, in: *Free Radical and Antioxidant Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 101–106. doi:10.1385/0-89603-472-0:101
- Zambonin, L., Prata, C., Cabrini, L., Maraldi, T., Fiorentini, D., Sega, F.V.D., Hakim, G., Landi, L., 2008. Effect of radical stress and ageing on the occurrence of trans fatty acids in rats fed a trans-free diet. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 594–601. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.034
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.H., 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 392, 677–684. doi:10.1038/33612
- Zimniak, P., 2011. Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1087–1105. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.039

## 10 Appendix I

Korrelation	Rohdaten		Körpermassen - korrektur		Phylogenetische Korrektur	
	r	p	r	p	r	p
A	<b>0,569</b>	5E-20	<b>0,130</b>	6E-02	<b>-0,022</b>	8E-01
C	<b>-0,737</b>	2E-38	<b>-0,322</b>	2E-06	<b>-0,325</b>	1E-06
D	<b>0,039</b>	6E-01	<b>-0,074</b>	3E-01	<b>0,088</b>	2E-01
E	<b>0,516</b>	4E-16	<b>0,387</b>	4E-09	<b>0,119</b>	8E-02
F	<b>-0,740</b>	5E-39	<b>-0,226</b>	1E-03	<b>-0,133</b>	5E-02
G	<b>-0,036</b>	6E-01	<b>0,005</b>	9E-01	<b>0,004</b>	1E-00
H	<b>0,706</b>	4E-34	<b>0,250</b>	2E-04	<b>0,201</b>	3E-03
I	<b>-0,347</b>	2E-07	<b>-0,129</b>	6E-02	<b>0,057</b>	4E-01
K	<b>-0,216</b>	1E-03	<b>0,149</b>	3E-02	<b>0,059</b>	4E-01
L	<b>0,416</b>	2E-10	<b>0,039</b>	6E-01	<b>0,033</b>	6E-01
M	<b>-0,255</b>	2E-04	<b>-0,098</b>	2E-01	<b>-0,007</b>	9E-01
N	<b>-0,351</b>	2E-07	<b>-0,309</b>	4E-06	<b>-0,104</b>	1E-01
P	<b>0,768</b>	1E-43	<b>0,350</b>	2E-07	<b>0,163</b>	2E-02
Q	<b>0,610</b>	2E-23	<b>0,096</b>	2E-01	<b>0,005</b>	9E-01
R	<b>0,475</b>	2E-13	<b>0,077</b>	3E-01	<b>-0,052</b>	4E-01
S	<b>-0,620</b>	2E-24	<b>-0,105</b>	1E-01	<b>-0,036</b>	6E-01
T	<b>0,747</b>	4E-40	<b>0,236</b>	5E-04	<b>0,167</b>	1E-02
V	<b>-0,183</b>	7E-03	<b>-0,022</b>	7E-01	<b>0,024</b>	7E-01
W	<b>0,329</b>	7E-07	<b>0,111</b>	1E-01	<b>0,172</b>	1E-02
Y	<b>-0,518</b>	3E-16	<b>-0,393</b>	3E-09	<b>-0,064</b>	3E-01
Körpermasse	<b>0,868</b>	2E-67	-	-	<b>0,555</b>	6E-19
GC Gehalt	<b>0,742</b>	3E-39	<b>0,389</b>	4E-09	<b>0,153</b>	2E-02

Tabelle 18: Phylogenetische und Körpermassenkorrektur der Rohdaten aus der Korrelation der Aminosäurenutzung mit der maximalen Lebensspanne bei 218 Tierarten.

## 11 Appendix II

UniProt Bezeichnung	Länge	MET	MET (%)	Beschreibung
sp P09234 RU1C_HUMAN	159	22	13,84	U1 small nuclear ribonucleoprotein C
sp Q8NET4 RGAG1_HUMAN	1388	145	10,45	Retrotransposon gag domain-containing protein 1
sp Q9Y284 ASTER_HUMAN	106	11	10,38	Protein Asterix
sp O15431 COPT1_HUMAN	190	17	8,95	High affinity copper uptake protein 1
sp Q6PK57 DMP34_HUMAN	102	9	8,82	Putative GED domain-containing protein DNM1P34
sp P52272 HNRPM_HUMAN	730	63	8,63	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
sp Q9BUE0 MED18_HUMAN	208	17	8,17	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 18
sp Q15532 SSXT_HUMAN	418	34	8,13	Protein SSXT
sp Q00994 BEX3_HUMAN	111	9	8,11	Protein BEX3
sp Q8WU79 SMAP2_HUMAN	429	34	7,93	Stromal membrane-associated protein 2
sp Q5VU69 CA189_HUMAN	101	8	7,92	Uncharacterized protein C1orf189
sp Q5SY68 S1A7B_HUMAN	101	8	7,92	Protein S100-A7-like 2
sp P48431 SOX2_HUMAN	317	25	7,89	Transcription factor SOX-2
sp A4D0T2 CG066_HUMAN	115	9	7,83	Uncharacterized protein C7orf66
sp Q15773 MLF2_HUMAN	248	19	7,66	Myeloid leukemia factor 2
sp Q9Y3E7 CHMP3_HUMAN	222	17	7,66	Charged multivesicular body protein 3
sp O43633 CHM2A_HUMAN	222	17	7,66	Charged multivesicular body protein 2a
sp P61576 REC9_HUMAN	105	8	7,62	HERV-K_5q13.3 provirus Rec protein
sp Q9NP86 CABP5_HUMAN	173	13	7,51	Calcium-binding protein 5
sp P14678 RSMB_HUMAN	240	18	7,50	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B-
sp Q9HBL7 PLRKT_HUMAN	147	11	7,48	Plasminogen receptor (KT)
sp Q9BQI0 AIF1L_HUMAN	150	11	7,33	Allograft inflammatory factor 1-like
sp P49720 PSB3_HUMAN	205	15	7,32	Proteasome subunit beta type-3
sp Q9BYW3 DB126_HUMAN	111	8	7,21	Beta-defensin 126
sp P03891 NU2M_HUMAN	347	25	7,20	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2
sp Q96JQ5 M4A4A_HUMAN	239	17	7,11	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4A
sp Q5J8M3 EMC4_HUMAN	183	13	7,10	ER membrane protein complex subunit 4
sp Q9UQN3 CHM2B_HUMAN	213	15	7,04	Charged multivesicular body protein 2b
sp Q7LBR1 CHM1B_HUMAN	199	14	7,04	Charged multivesicular body protein 1b
sp P03897 NU3M_HUMAN	115	8	6,96	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3
sp Q7Z7G2 CPLX4_HUMAN	160	11	6,88	Complexin-4
sp P02585 TNNC2_HUMAN	160	11	6,88	Troponin C, skeletal muscle
sp Q86UU0 BCL9L_HUMAN	1499	103	6,87	B-cell CLL/lymphoma 9-like protein

UniProt Bezeichnung	Länge	MET	MET (%)	Beschreibung
sp P63316 TNNC1_HUMAN	161	11	6,83	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles
sp Q96PG1 M4A4E_HUMAN	132	9	6,82	Putative membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4E
sp Q96LB4 VATG3_HUMAN	118	8	6,78	V-type proton ATPase subunit G 3
sp Q9BVG4 SSBP4_HUMAN	385	26	6,75	Single-stranded DNA-binding protein 4
sp Q9NRP0 OSTC_HUMAN	149	10	6,71	Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC
sp P62158 CALM_HUMAN	149	10	6,71	Calmodulin
sp Q99967 CITE2_HUMAN	270	18	6,67	Cbp/p300-interacting transactivator 2
sp P81877 SSBP2_HUMAN	361	24	6,65	Single-stranded DNA-binding protein 2
sp Q9NSK7 CS012_HUMAN	152	10	6,58	Protein C19orf12
sp Q96AT9 RPE_HUMAN	228	15	6,58	Ribulose-phosphate 3-epimerase
sp Q9Y261 FOXA2_HUMA	457	30	6,56	Hepatocyte nuclear factor 3-beta
sp P61011 SRP54_HUMAN	504	33	6,55	Signal recognition particle 54 kDa protein
sp Q96C01 F136A_HUMAN	138	9	6,52	Protein FAM136A
sp O43670 ZN207_HUMAN	478	31	6,49	Zinc finger protein 207
sp O95169 NDUB8_HUMAN	186	12	6,45	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8
sp Q9UL33 TPC2L_HUMAN	140	9	6,43	Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein
sp Q8WTQ4 CP078_HUMAN	265	17	6,42	Uncharacterized protein

Tabelle 19: Liste der 50 Proteine von Homo sapiens mit dem höchsten Methioningehalt. Nukleinsäurebindende Proteine sind grau hinterlegt. Es wurden nur Proteinsequenzen mit einer Länge von über 100 Aminosäuren in die Auswertung mit einbezogen (siehe 3.1.2).

## 12 Appendix III

Name	Strukturformel	LogP
2SH Mercaptoethanol		-0,23 ± 0,38
4SH 1-Butanthiol		2,31 ± 0,24
8SH 1-Octanthiol		4,44 ± 0,24
10SH 1-Decanthiol		5,50 ± 0,24
12SH 1-Dodecathiol		6,56 ± 0,24
14SH 1-Tetradecanthiol		7,62 ± 0,24
18SH 1-Octadecanthiol		9,75 ± 0,24
DMS Dodecylmethylsulfid		6,73 ± 0,28
DOH 1-Dodecanol		5,13 ± 0,18
T12SH tert-Dodecathiol		6,20 ± 0,25
CAM Cysteamin		0,03 ± 0,27
CYS Cystein		0,24 ± 0,39
DES 3-Mercaptopropionsäure		0,43 ± 0,26
GSH Glutathion		-5,41

Tabelle 20: Bezeichnung, Strukturformel und logP-Werte der untersuchten Substanzen. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm ChemSketch (ACD Labs) gezeichnet. Die logP-Werte wurden mittels der Software ChemSketch (ACD Labs) berechnet, die von Glutathion aus dem Sicherheitsdatenblatt ([www.merck-chemicals.com](http://www.merck-chemicals.com)) übernommen.

## 11 Lebenslauf

## **12 Eigene Publikationen**

## **13 Danksagung**